

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265323



7



Αρ. ατ.:.....1953.....200.8





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

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA (MMR) ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΚΑΙ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ**

ΕΥΔΟΚΙΑ Δ. ΑΡΚΟΥΜΑΝΗ
Παθολογοανατόμος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Αρκουμάνη Ευδοκίας: 26-5-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 506^α/10-6-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Στεφάνου Δημήτριος Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπατιστάτου Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 4-7-2003

«Μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) σε παθήσεις του μαστού. Συσχέτιση και με άλλους προγνωστικούς δείκτες»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 607^α/29-5-2007

Αγνάντη Νίκη	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βουγιουκλάκης Θεόδωρος	Καθηγητής Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τσατσούλης Αγαθοκλής	Καθηγητής Παθολογίας -Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάτσης Χαράλαμπος	Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 4-9-2007

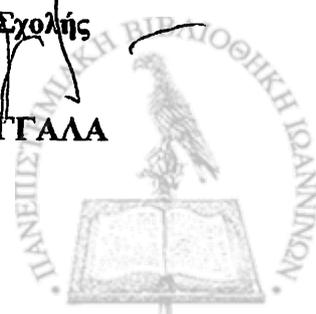
ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Γραμματέας της Σχολής
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο μαστός αποτελεί ένα όργανο στο οποίο αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός παθήσεων, καλοήθων και κακοήθων. Επιπλέον, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την συχνότερη μορφή κακοήθειας που προσβάλλει τις γυναίκες του Δυτικού κόσμου. Πολλές από τις παθήσεις αυτές εμφανίζονται λόγω γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών. Σημαντικούς μηχανισμούς αποτελούν η γενετική αστάθεια και τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA.

Αν και η έρευνα πάνω στις παθήσεις του μαστού είναι εκτεταμένη και συνεχιζόμενη, αρκετά πεδία δεν έχουν διευκρινιστεί. Επιπρόσθετα, η πρόγνωση και η επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού δεν έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια. Συνεπώς, η ανάγκη για ανεύρεση νέων προγνωστικών δεικτών είναι ακόμη επιτακτική.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη ενός βασικού συστήματος, του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών που παράγονται στις παθήσεις του μαστού, όπου τα δεδομένα είναι ελάχιστα και αντιφατικά.

Επιπρόσθετα, έγινε προσπάθεια συσχέτισμού των πρωτεϊνών αυτών με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, καθώς και διερεύνηση της πιθανής προγνωστικής τους αξίας.

Αρχικά, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, Καθηγήτη κυρία Νίκη Αγάντη, για την ανάθεση του θέματος αυτής της διατριβής, για τη συνεχή βοήθειά της στην εκπόνηση αυτής ως επιβλέπουσα, αλλά και για όλη την κατάρτισή μου στο αντικείμενο της Παθολογικής Ανατομικής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κύριο Δημήτριο Στεφάνου, τόσο για τη βοήθειά του ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής στην εκπόνηση αυτής της διατριβής όσο και για τη βοήθεια καθ'όλην τη διάρκεια της εκπαίδευσής μου.

Στην Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Άννα Μπατιστάτου θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τη συμβολή της ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, αλλά και για τις γενικότερες γνώσεις και εμπειρία που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της ειδίκευσής μου.



Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κύριο Μιχάλη Αλεξίου, την κυρία Άντα Χριστοδούλου και την κυρία Ντίνα Ευσταθοπούλου για την συμβολή τους στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας, καθώς και στην κυρία Αφροδίτη Κατσαράκη η οποία ανέλαβε τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα στο σημείο αυτό να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές μου, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Βασιλική Μαλάμου- Μήτση, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κυρία Μαίρη Μπάη και τη Λέκτορα Παθολογικής Ανατομικής κυρία Άννα Γούσια για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου προσέφεραν.

Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους συναδέλφους του Παθολογοανατομικού και Κυτταρολογικού Εργαστηρίου για τη βοήθεια και τη φιλία που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, τεράστια ευγνωμοσύνη οφείλω στους γονείς μου και την αδερφή μου για τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1-40
1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	2-4
• Ανάπτυξη	2
• Ανατομική δομή	2-3
• Ιστολογία	3-4
2. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	4-20
2.1. Καλοήθεις παθήσεις και νεοπλάσματα	4-6
• Ινοκυστική νόσος	4-5
• Σκληρυντικές αλλοιώσεις	6
• Καλοήθη νεοπλάσματα	6
2.2. Καρκίνος του μαστού	
• Επιδημιολογία	7
• Αιτιολογικοί παράγοντες	7-10
• Εντόπιση	11
• Πολυεστιακότητα	11
• Αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη	11-12
• Διάγνωση	12-13
• Ιστολογικός τύπος	13-14
• Ορμονικοί υποδοχείς	14-15
• Οδοί επέκτασης και μεταστάσεις	15-16
• Θεραπεία	16-17
• Πρόγνωση	17-20
3. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	20-26
A. Κυτταρογενετική	20
B. Ενίσχυση του DNA	20-21



Γ. Ογκογονίδια	21-23
Δ. Απώλεια ετεροζυγωτίας	23
Ε. Ογκοκατασταλτικά γονίδια	23-24
ΣΤ. Μικροδορυφορική αστάθεια	25
Ζ. Μοντέλα γονιδιακής έκφρασης	25
Η. Το μοντέλο της πολυσταδιακής καρκινογένεσης στο μαστό	25-26
4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ: Ο ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ	
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	27-29
• Εισαγωγή	27
• Κριτήρια χαρακτηρισμού του καρκίνου του μαστού	27-28
• Οικογενής κίνδυνος καρκίνου του μαστού	28-29
• Συσχετίσεις του οικογενή καρκίνου του μαστού με άλλους καρκίνους	29
• Οικογενής κίνδυνος καρκίνου του μαστού: Πιθανά μοντέλα	29
5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ BRCA1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	30-35
• Επιδημιολογία	30
• Διαγνωστικά κριτήρια	30
• Διεσδυτικότητα	31
• Κλινικά στοιχεία	31
• Ιστολογία	31-32
• Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες	32
• Σχέση του γονιδίου BRCA1 με άλλους όγκους	32-33
• Γενετικά στοιχεία	33-34
Α. Εντόπιση και δομή του γονιδίου	33
Β. Έκφραση του γονιδίου	33
Γ. Λειτουργία του γονιδίου	34
• Πρόγνωση και τρόποι πρόληψης	35
6. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA	
(MISMATCH REPAIR SYSTEM)	36-38
Γενετική των γονιδίων MLH1, MSH2 και MSH6	
Α. Χρωμοσωμική εντόπιση	36
Β. Προϊόντα των γονιδίων	37



Γ. Λειτουργία των γονιδίων	37
Δ. Μεταλλάξεις των γονιδίων	37
Ε. Μικροδορυφορική αστάθεια	38
ΣΚΟΠΟΣ	39-40
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41-84
ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ	42
• Επιλογή δείγματος	42-43
• Ασθενείς-Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα-Επιβίωση	43-45
• Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας	45-47
• Μέθοδος αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	48-49
• Στατιστική αξιολόγηση	49-50
Προβλήματα αξιολόγησης προγνωστικών παραγόντων	50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51-78
1. Καλοήθεις παθήσεις και προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού	51-55
• Καλοήθεις παθήσεις	51-52
• Προκαρκινικές αλλοιώσεις (in situ καρκίνωμα)	52-54
• ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54-55
2. Οικογενής καρκίνος του μαστού	56-62
• hMLH1	57-59
• hMSH2	59-60
• hMSH6	60-62
3. Σποραδικός καρκίνος του μαστού	62-70
• hMLH1	62-66
• hMSH2	66-68
• hMSH6	68-70
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	70-78
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79-80
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	81-82
ABSTRACT	83-84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85-102



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ανάπτυξη

Ο μαστός σχηματίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη από τη μαστική γραμμή, η οποία αποτελεί πάχυνση της επιδερμίδας και αναπτύσσεται αμφοτερόπλευρα στην πρόσθια επιφάνεια του σώματος. Η αρχέγονη αυτή γραμμή εμφανίζεται αρχικά περίπου κατά τη διάρκεια της 6^{ης} εμβρυϊκής εβδομάδας και στη συνέχεια ατροφεί, εκτός από το τμήμα της από το οποίο θα αναπτυχθεί ο μαζικός αδένας [1,2].

Κατόπιν, κατά τον έκτο μήνα, αναπτύσσονται 15 έως 20 συμπαγείς επιθηλιακές αθροίσεις οι οποίες έως τον 9^ο μήνα σχηματίζουν αυλό. Ο μαστός αποτελείται από διακλαδιζόμενους πόρους και ο μεσεγγυματικός ιστός που τους περιβάλλει διαφοροποιείται σε συνδετικό ιστό. Κατά τη διάρκεια της ήβης στα κορίτσια και πριν την εμμηναρχή παρατηρείται ανάπτυξη των μαστών λόγω της υπερπλασίας τόσο των πόρων όσο και του στρώματος [3].

Ανατομική δομή

Κατά την αναπαραγωγική ηλικία οι μαστοί της γυναίκας αποτελούνται από αδενικό ιστό και υπόστρωμα. Ο μαζικός αδένας περιλαμβάνει 15-20 ακανόνιστους λοβούς που χωρίζονται μεταξύ τους με πυκνό συνδετικό ιστό, καθώς και λιπώδη ιστό σε διάφορες αναλογίες [2]. Κάθε λοβός αποτελεί έναν ξεχωριστό αδένα με το δικό του γαλακτοφόρο πόρο. Οι πόροι αυτοί έχουν ανεξάρτητη έξοδο ο καθένας τους στη θηλή του μαστού. Αναλόγως με την ηλικία και τις επικρατούσες στον οργανισμό συνθήκες μεταβάλλεται και η ιστολογική δομή του μαζικού αδένα. Έτσι, στη νεαρή γυναίκα οι μαστοί έχουν συνήθως πυκνό αδενικό ιστό και μικρότερη ποσότητα κυτταρολιπώδους υποστρώματος. Με την πάροδο της ηλικίας, η σχέση μεταξύ τους μεταβάλλεται με ταυτόχρονη αύξηση του χαλαρού κυτταρολιπώδους υποστρώματος [4].

Ανατομικά, ο μαστός διακρίνεται σε δύο κύρια μέρη, το εκφορητικό και το εκκριτικό. Το εκφορητικό μέρος διαμορφώνεται από τους κύριους εκφορητικούς πόρους



(γαλακτοφόροι πόροι), οι οποίοι λίγο πριν την εκβολή τους στη θηλή εμφανίζουν ατρακτοειδή διεύρυνση σχηματίζοντας έτσι το γαλακτοφόρο πόρο. Το εκκριτικό μέρος του μαστού συγκροτείται από το λόβιο με τους λεπτούς λοβιακούς πόρους και χαρακτηρίζεται ως λοβιακή μονάδα [1,2].

Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού είναι υποκοίλη και έρχεται σε επαφή με το μείζονα θωρακικό μυ και, σε μικρότερη έκταση, με τον πρόσθιο οδοντωτό μυ. Από τους μύες αυτούς ο μαστός χωρίζεται με την εν τω βάθει ή θωρακική περιτονία, καθώς και με μια λεπτή ζώνη χαλαρού συνδετικού ιστού η οποία παρεμβλλόμενη μεταξύ περιτονίας και μαστού, επιτρέπει στο όργανο κάποιο βαθμό κινητικότητας. Για πρακτικούς λόγους, ο μαστός χωρίζεται σε 4 τεταρτημόρια (άνω έσω, άνω έξω, κάτω έσω και κάτω έξω) και μία κεντρική περιοχή σε ακτίνα 1 εκ. περί τη θηλαία άλω. Από τα τέσσερα αυτά τμήματα του μαστού, το άνω έξω τεταρτημόριο περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα αδενικού ιστού, γεγονός στο οποίο αποδίδεται η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στη θέση αυτή [1,2].

Ιστολογία

- Η λοβιακή μονάδα αποτελείται από τη βασική μεμβράνη και από δύο τύπους κυττάρων: τα επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν το εσωτερικό των αδενοκυψελών και του αυλού των τελικών πόρων και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα που διατάσσονται μεταξύ της βασικής μεμβράνης και του επιθηλίου. Τα επιθηλιακά κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης και η λειτουργία τους είναι εκκριτική. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν τις αδενοκυψέλες και τους τελικούς λοβιακού πόρους. Η λειτουργία τους είναι συσταλτική και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η έξοδος του εκκρίματος από τα επιθηλιακά κύτταρα και η προώθησή του στο σύστημα των εκφορητικών πόρων [2].
- Το υπόστρωμα του αδένου έχει ελάχιστες ελαστικές ίνες, ενώ γύρω από τους πόρους εμφανίζεται λιγότερο διαφοροποιημένο [1,2].
- Η κατασκευή της θηλής και της θηλαίας άλω παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Ουσιαστικά αποτελούν τμήματα της υπόλοιπης επιδερμίδας, αλλά διακρίνονται από αυτή λόγω της εντυπωσιακής αύξησης της μελανίνης και την ευκαιριακή



παρουσία διαυγών κυττάρων στη βασική τους στιβάδα [5]. Η θηλαία άλλως περιέχει πολυάριθμους σημηματογόνους αδένες, τους αδένες του Montgomery, οι οποίοι εκβάλλουν απευθείας στην επιφάνεια του δέρματος [6].

2. ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

2.1. Καλοήθεις παθήσεις και νεοπλάσματα

Ινοκυστική νόσος. Αποτελεί μία ιδιαίτερα σημαντική βλάβη του μαστού λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισής της, καθώς και της ιδιότητάς της –σε κάποιες μορφές- να υποδύεται κλινικά, ακτινολογικά, μακροσκοπικά και μικροσκοπικά τη μορφολογία του καρκίνου. Επιπλέον, έχει ιδιαίτερη σημασία η πιθανή σχέση κάποιων υποτύπων της νόσου με την εξέλιξη σε καρκίνωμα. Έχουν προταθεί κατά καιρούς διάφορες ονοματολογίες για τη νόσο αυτή, αλλά καμία δεν υπήρξε απόλυτα ικανοποιητική και ενίοτε ήταν καθαρά υποκειμενικές: κυστική νόσος, κυστική μαστοπάθεια, κυστική υπερπλασία, μαζική δυσπλασία, νόσος του Reclus, χρόνια κυστική μαστίτιδα κ.ά. Η πλέον διαδεδομένη ονομασία είναι ο όρος ‘ινοκυστική νόσος’ [1,2, 7-13].

Η ινοκυστική νόσος παρατηρείται, σε κλινικό κυρίως επίπεδο, μεταξύ των 25 και 45 ετών. Η πραγματική επίπτωση της κατάστασης αυτής είναι δύσκολο να εκτιμηθεί με ακρίβεια, λόγω του γεγονότος ότι η διάγνωση είναι υποκειμενική και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον ορισμό που δίνει ο εκάστοτε κλινικός γιατρός και ο παθολογοανατόμος.

Το ορμονικό προφίλ παίζει αποδεδειγμένα ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου, αλλά οι ακριβείς παθογενετικοί μηχανισμοί δεν έχουν δευκρινιστεί πλήρως.

Η ινοκυστική νόσος αναπτύσσεται συνήθως αμφοτερόπλευρα, αλλά ο ένας μαστός μπορεί να εμφανίζει εντονότερες αλλοιώσεις και να φαίνεται κλινικά ότι είναι ο μοναδικός που νοσεί.

Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε ότι η ινοκυστική νόσος προσβάλλει αρχικά την τελική λοβιακή μονάδα, αν και η επιθηλιακή υπερπλασία



μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερους πόρους. Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία στη μακροσκοπική και μικροσκοπική εμφάνιση. Οι κύριες μορφολογικές και ιστολογικές αλλοιώσεις είναι οι εξής:

- **Σχηματισμός κύστεων.** Οι κύστεις αυτές ανευρίσκονται σε μικροσκοπικό επίπεδο, αλλά μπορεί να είναι ορατές και με γυμνό μάτι. Περιέχουν υγρό διαυγές ή και κιτρινωπό και εάν ραγούν προκαλούν φλεγμονώδη αντίδραση στο στρώμα με άφθονα αφρώδη μακροφάγα και κρυστάλλους χοληστερόλης. Ο Azzopardi τονίζει ότι οι κύστεις, ασχέτως μεγέθους, προέρχονται από την τελική λοβιακή μονάδα και όχι από τους πόρους.
- **Αποκρινής μετάπλαση.** Αποτελεί μία πολύ συχνή αλλοίωση και ανευρίσκεται συνήθως στους κυστικούς σχηματισμούς, αλλά και στα φυσιολογικά λόβια.
- **Ίνωση του στρώματος.** Εμφανίζεται συχνά, αλλά σε ποικίλους βαθμούς. Πιθανολογείται ότι αποτελεί δευτερογενές φαινόμενο στη ρήξη των κύστεων.
- **Ασβέστωση.** Εμφανίζεται λιγότερο συχνά στην ινοκυστική νόσο σε σχέση με την πορεκτασία και τα καρκινώματα.
- **Χρόνια φλεγμονή.** Αποτελεί σύνηθες φαινόμενο, αλλά δευτεροπαθές. Σχετίζεται με τη ρήξη των κύστεων και την απελευθέρωση του εκκρίματος στο στρώμα. Τα κυρίαρχα στοιχεία είναι λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα και αφρώδη ιστιοκύτταρα.
- **Ινοαδενοματώδεις αλλοιώσεις.** Είναι η αλλοίωση που αναγνωρίζεται λιγότερο συχνά ως συστατικό της ινοκυστικής νόσου.
- **Επιθηλιακή υπερπλασία.** Αποτελεί την σημαντικότερη αλλοίωση της ινοκυστικής νόσου, αλλά και την πλέον προβληματική. Επίσης, η σημασία της αυξάνεται λόγω της πιθανής συσχέτισής της με την ανάπτυξη καρκινώματος, καθώς και με το γεγονός ότι είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες διαγνωστικές δυσκολίες μεταξύ ινοκυστικής νόσου και καρκινώματος σε μικροσκοπικό επίπεδο. Η επιθηλιακή υπερπλασία αφορά τόσο τους πόρους όσο και τα λόβια και διακρίνεται σε τρεις βαθμούς: ήπια, μέτρια και άτυπη.



Σκληρυντικές αλλοιώσεις. Οι αλλοιώσεις αυτές αποτελούν μία ομάδα η οποία χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος, κεντρική ίνωση και ποικίλου βαθμού επιθηλιακή υπερπλασία. Συνήθως ανευρίσκονται στο πλαίσιο της ινοκυστικής νόσου και δημιουργούν διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα με το καρκίνωμα. Η συσχέτιση με την ανάπτυξη κακοήθους νεοπλασματος διχάζει τους ερευνητές. Πολλοί θεωρούν ότι η πλειοψηφία των καρκινωμάτων σωληνώδους τύπου προέρχεται από την εξαλλαγή προϋπάρχουσας ακτινωτής ουλής, άλλοι όμως αμφισβητούν τη συνάφεια [14].

Καλοήγη νεοπλάσματα. Τα κυριότερα καλοήγη νεοπλάσματα του μαστού είναι το ινοαδένωμα, οι διάφοροι τύποι αδενωμάτων και τα θηλώματα.

- **Ινοαδένωμα.** Είναι ο πιο συχνός ινοεπιθηλιακός όγκος του μαστού και συγχρόνως η τρίτη κατά σειρά πάθηση μετά την ινοκυστική νόσο και τον καρκίνο. Απαντάται κυρίως σε νεαρές γυναίκες, ηλικίας 15-35 ετών. Αναπτύσσεται αργά και υπόκειται σε ορμονικά ερεθίσματα, είναι συνήθως μονήρες και σπάνια υπερβαίνει τα 3 εκ. Βέβαια, έχουν αναφερθεί και γιγάντιες μορφές, τα εμβρυϊκά ή νεανικού τύπου ινοαδενώματα. Ιστογενετικά, προέρχεται από την τελική λοβιακή μονάδα και για το λόγο αυτό όχι μόνο συνυπάρχει με την ινοκυστική νόσο, αλλά επιπλέον μπορούμε να παρατηρήσουμε τις αλλοιώσεις της μέσα στο ινοαδένωμα [15]. Η ανάπτυξη καρκίνου μέσα σε ένα ινοαδένωμα είναι πολύ σπάνια και συνήθως είναι μη διηθητικού τύπου (in situ) [16].
- **Αδενώματα.** Αυτά διαιρούνται σε κατηγορίες: σωληνώδες, πορογενές αδένωμα γαλουχίας, αποκρινές και αδένωμα θηλής [17].
- **Θηλώματα.** Το μονήρες θήλωμα είναι συνήθως ένας μικρός όγκος που δεν ξεπερνά τα 3 εκ, απαντάται σε γυναίκες σχετικά μεγάλης ηλικίας και δεν θεωρείται προκαρκινωματώδης κατάσταση. Αντίθετα, τα πολλαπλά θηλώματα, τα οποία είναι δέκα φορές πιο σπάνια από το μονήρες θήλωμα, παρατηρούνται σε νεαρότερες γυναίκες και στο 25% συνυπάρχουν με καρκίνο, ο οποίος περιορίζεται κατά κύριο λόγο στο προδιηθητικό στάδιο [18].



2.2.Καρκίνος του μαστού

Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το πιο συχνό καρκίνωμα του γυναικείου πληθυσμού και την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Απαριθμεί το 22% στο σύνολο των γυναικείων καρκινωμάτων, ποσοστό διπλάσιο της επίπτωσης των καρκινωμάτων άλλων περιοχών. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης είναι η Βόρεια Αμερική, η Ευρώπη και η Αυστραλία όπου το 6% των γυναικών αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού πριν την ηλικία των 75 ετών [19]. Στην Αφρική, την Ασία και την Ιαπωνία η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού ανέρχεται στο 1/3 της πιθανότητας στις προηγούμενες χώρες [20]. Η νόσος βρισκόταν σε έξαρση μέχρι τις αρχές του 1980 τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου συνεχίζει να βρίσκεται σε ανοδική πορεία. Αντίθετα, στις αναπτυγμένες χώρες ο συνδυασμός της έγκαιρης διάγνωσης λόγω της ευρείας χρήσης της μαστογραφίας, καθώς και της χορήγησης συμπληρωματικής ορμονοθεραπείας συνέβαλλε τα μέγιστα στην επιμήκυνση της επιβίωσης, μειώνοντας τόσο την επίπτωση όσο και τη θνησιμότητα [21,22].

Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, όπως στους περισσότερους επιθηλιακούς όγκους, αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας. Οι καμπύλες επίπτωσης έχουν χαρακτηριστική κατανομή, με απότομη αύξηση κατά την ηλικία της εμμηνόπαυσης [21,22].

Αιτιολογικοί παράγοντες

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού είναι πολυπαραγοντική και περιλαμβάνει διαιτητικούς, αναπαραγωγικούς, περιβαλλοντικούς και ορμονικούς παράγοντες.

- *Αναπαραγωγικοί παράγοντες.* Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες με πρόωρη εμμηναρχή και καθυστερημένη εμμηνόπαυση, σε άτεκνες και σε γυναίκες που τεκνοποίησαν για πρώτη φορά σε προχωρημένη ηλικία.

Ο θηλασμός, στον οποίο αρχικά είχε αποδοθεί έντονος προστατευτικός ρόλος κατά της ανάπτυξης καρκίνου, σήμερα θεωρείται λιγότερο σημαντικός παράγοντας [23,24].



- **Εξωγενείς ορμόνες.** Δύο είναι οι κύριες ομάδες ορμονικών σκευασμάτων οι οποίες έχουν μελετηθεί σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού: τα αντισυλληπτικά δισκία και θεραπεία υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση.

Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι παρατηρείται μία μικρή αύξηση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου στις γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά δισκία, αλλά δε σχετίζεται με τη διάρκεια χορήγησης, τον τύπο και τη δόση του σκευάσματος. Ο καρκίνος που εμφανίζεται στην ομάδα αυτή δεν παρουσιάζει μορφολογικές διαφορές ή διαφορές στην πρόγνωση και την επιβίωση σε σχέση με τις γυναίκες που δε λαμβάνουν αντισυλληπτικά δισκία.

Σχετικά με την ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν μία μικρή αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκινώματος, κυρίως σε γυναίκες που κάνουν μακροχρόνια χρήση των σκευασμάτων. Στην ομάδα αυτή, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο καρκίνος που αναπτύσσεται έχει καλύτερη πρόγνωση [24,25].
- **Διατροφή.** Η διαίτα που στηρίζεται στα φρούτα και στα λαχανικά σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Αντίθετα, ο υψηλός δείκτης μάζας σώματος, ο οποίος συνδέεται με υψηλή συνολικά θερμιδική πρόσληψη και ανισορροπία μεταξύ πρόσληψης-κατανάλωσης θερμίδων, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου.

Η κατανάλωση κρέατος, καθώς και η συνολική ποσότητα πρόσληψης λιπών σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Το κόκκινο κρέας ενοχοποιείται περισσότερο από όλες τις υπόλοιπες τροφές [24].
- **Κατανάλωση αλκοόλ.** Το αλκοόλ έχει σχετιστεί επίσης με μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου και μάλιστα η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη [26].
- **Κάπνισμα.** Η σχέση μεταξύ καπνίσματος και καρκίνου του μαστού παραμένει αμφιλεγόμενη. Σε αρκετές μελέτες θεωρείται ως προστατευτικός παράγοντας λόγω της αντιοιστρογονικής του δράσης [27].
- **Φυσική δραστηριότητα.** Φαίνεται ότι δρα ευεργετικά μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε ποσοστό 20-40%, σύμφωνα με αρκετές μελέτες. Δεν επηρεάζεται η προστατευτική της δράση από την εμμηνόπαυση [28].



- **Σωματικό βάρος.** Η σχέση βάρους και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού εξαρτάται από το αν η γυναίκα είναι προεμμηνοπαυσιακή ή μετεμμηνοπαυσιακή. Πολυάριθμες πολυκεντρικές έρευνες επιβεβαιώνουν ότι το υψηλό σωματικό βάρος αυξάνει το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η συσχέτιση αυτή είναι ανεξάρτητη των παραγόντων αναπαραγωγής και τρόπου ζωής που προαναφέρθηκαν, καθώς και της φυσικής δραστηριότητας [28].
- **Ιονίζουσα ακτινοβολία.** Αυξημένη εμφάνιση καρκινώματος του μαστού έχει παρατηρηθεί σε άτομα που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία [29].
- **Ινοκυστική νόσος, επιθηλιακή υπερπλασία και καλοήγη νεοπλάσματα.** Η σχέση τους με τον καρκίνο έχει αναφερθεί στην προηγούμενη ενότητα
- **Ενδογενείς ορμόνες.** Υπάρχουν πλέον αδιάσειστες αποδείξεις από επιδημιολογικές μελέτες ότι τα ενδογενή στεροειδή (ανδρογόνα, οιστρογόνα και προγεσταγόνα) παίζουν έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Η επίπτωση του καρκίνου αυξάνει απότομα στην ηλικία πριν την εμμηνόπαυση παρά αργότερα, όπου σταματά η σύνθεση οιστρογόνων και προγεστερόνης και μειώνεται σταδιακά η παραγωγή ανδρογόνων από τις ωοθήκες [30].

Η βασική θεωρία αφορά στην υπόθεση της υπερβολικής παραγωγής οιστρογόνων. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού εξαρτάται άμεσα από την έκθεση του μαζικού ιστού στα οιστρογόνα. Μελέτες *in vitro* δείχνουν αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή της απόπτωσης. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις οποίες παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα τεστοστερόνης, ανδροστενεδιόνης, οιστρονής και οιστραδιόλης και μειωμένα επίπεδα δεσμευτικής των στεροειδών σφαιρίνης (SHBG) [31].

Η δεύτερη επικρατούσα θεωρία αφορά στην υπόθεση 'οιστρογόνα και προγεστερόνη'. Σε σύγκριση με την προηγούμενη θεωρία, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται όταν συνυπάρχουν αυξημένα επίπεδα στο πλάσμα και στον μαζικό ιστό τόσο οιστρογόνων όσο και προγεστερόνης [31].

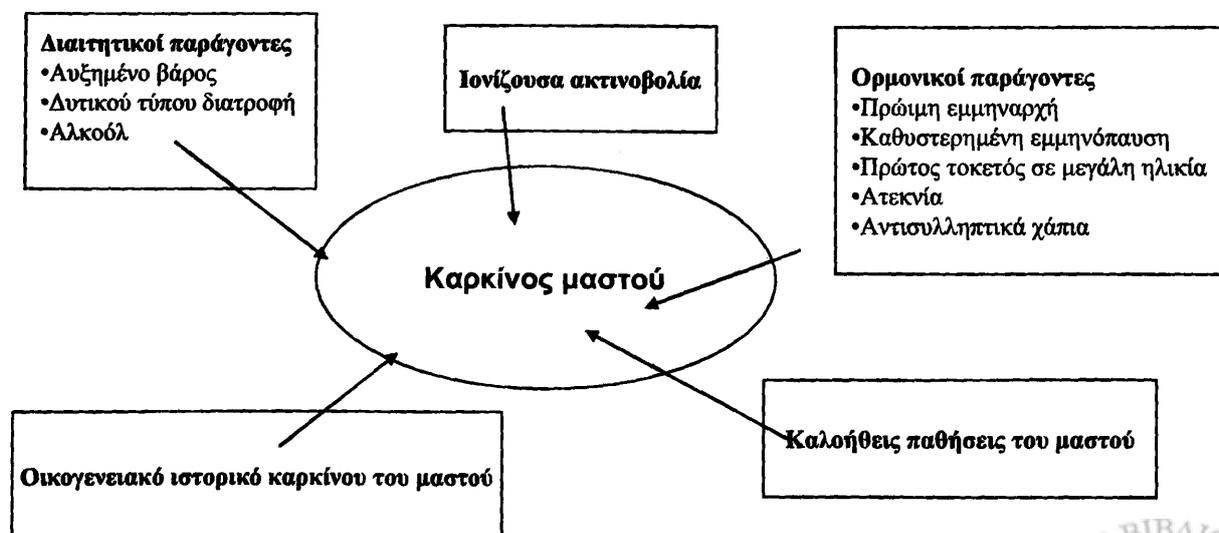
Οι μελέτες δεν έχουν καταφέρει προς το παρόν να αποδείξουν ότι οι ίδιοι μηχανισμοί ισχύουν και για τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.



Η μεταβολική αλληλουχία της αύξησης του σωματικού βάρους και της έλλειψης φυσικής άσκησης οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη. Αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη σύνθεση στεροειδών ορμονών από τις ωοθήκες ή/και από τα επινεφρίδια, κυρίως ανδρογόνων και σε μείωση της σύνθεσης SHBG από το ήπαρ. Ιδιαίτερα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η αύξηση των κυκλοφορούντων ανδρογόνων οδηγεί σε περαιτέρω σχηματισμό οιστρογόνων στο λιπώδη ιστό και αναπόφευκτα σε αύξηση των επιπέδων οιστρονής και οιστραδιόλης. Νέες μελέτες δείχνουν ότι ο ινσουλινικός αυξητικός παράγοντας-I (IGF-I) και η δεσμευτική του πρωτεΐνη (IGFR-I) αποτελούν σημαντικούς δείκτες κινδύνου [32,33]. Σήμερα, οι ερευνητές προσανατολίζονται σε μια καινούρια κατεύθυνση, αυτή της έκθεσης σε διάφορους παράγοντες κατά την εμβρυϊκή ζωή in utero.

- **Οικογενειακό ιστορικό.** Γυναίκες με συγγενή πρώτου βαθμού πάσχουσα από καρκίνο του μαστού αποκτούν αυτόματα 2-3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να νοσήσουν και οι ίδιες σε σχέση με το γενικό πληθυσμό. Διάφορα γονίδια εμπλέκονται, με κυρίαρχα τα γονίδια BRCA1 και BRCA2. Το οικογενειακό ιστορικό και τα γονίδια αυτά θα αναλυθούν εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.

Διαγραμματικά, οι αιτιολογικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού



Εντόπιση

Η εντόπιση του καρκινώματος του μαστού προσδιορίζεται συνήθως σε σχέση με τα τεταρτημόρια του μαζικού αδένα. Το 50% των καρκινωμάτων περίπου εμφανίζονται στο άνω-έξω τεταρτημόριο, το 15% στο άνω-έσω, το 10% στο κάτω-έξω, το 5% στο κάτω-έσω, το 17% στην κεντρική περιοχή και το 3% είναι διάχυτα (γενικευμένα ή πολυεστιακά). Η σημαντική αυτή διαφορά συχνότητας εμφάνισης σε σχέση με τα τεταρτημόρια εξηγείται εύκολα, αν τη συνδυάσουμε με την ποσότητα μαζικού παρεγχύματος που περιέχεται σε κάθε τεταρτημόριο. Επιπλέον, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η εμφάνιση καρκινώματος είναι ελαφρά πιο συχνή στον αριστερό παρά στο δεξιό μαστό [34].

Πολυεστιακότητα

Ως πολυεστιακότητα ορίζεται η παρουσία καρκινώματος σε κάποιο τεταρτημόριο διαφορετικό από αυτό στο οποίο αναπτύσσεται ο κύριος όγκος. Πολυεστιακότητα ανευρίσκεται, σύμφωνα με μελέτες, σε ποσοστό 13,4% των διηθητικών καρκινωμάτων, είτε ως μικρότερες διηθητικές εστίες (στο 1/3 των περιπτώσεων) είτε ως *in situ* καρκινώματα και είναι πιο συχνή στα λοβιακά παρά στα πορογενή καρκινώματα. Μελέτες κλωνικής ανάλυσης υποδεικνύουν ότι οι ταυτόχρονοι αυτοί όγκοι δεν αναπτύσσονται ανεξάρτητα, αλλά ως μία εξεργασία η οποία εξαπλώνεται στο μαζικό παρέγχυμα [35,36].

Αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη

Η συχνότητα αμφοτερόπλευρης ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος μαστού σε γυναίκες που έχουν ήδη νοσήσει είναι περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το γενικό πληθυσμό και αυξάνεται ακόμη περισσότερο αν υπάρχει οικογενειακό ιστορικό. Η επίπτωση είναι ιδιαίτερα υψηλή στο λοβιακό καρκίνωμα *in situ* εγγίζοντας ποσοστό 25-50% σε κάποιες μελέτες. Η αμφοτερόπλευρη εμφάνιση μπορεί να είναι είτε σύγχρονη είτε μετάχρονη. Οι επικρατούσες θεωρίες είναι η ενδομαζική επέκταση και ο μηχανισμός των ανεξάρτητων γεγονότων, ο οποίος φαίνεται και ο πιο συχνός. Η ευρεία χρήση



συμπληρωματικής χημειοθεραπείας έχει μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης μετάχρονου ετερόπλευρου καρκινώματος [37].

Διάγνωση

- **Κλινική εξέταση.** Η κλινική εξέταση, κυρίως η ψηλάφηση, αποτελεί ίσως την πιο αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδο ανίχνευσης και εκτίμησης νόσου του μαστού. Παραμένει εξαιρετικά χρήσιμη και πρακτική, αφού πραγματοποιείται τόσο από τον κλινικό γιατρό όσο και από την ίδια την ασθενή. Ωστόσο, η ευαισθησία της είναι περιορισμένη, αφού μόνο το 60% των μαστογραφικά ανιχνεύσιμων βλαβών είναι ψηλαφητές. Οι ίδιοι περιορισμοί ισχύουν και για την εκτίμηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων.
- **Μαστογραφία.** Η ευρεία εφαρμογή της μαστογραφίας άλλαξε ριζικά τη διαγνωστική προσέγγιση του καρκίνου του μαστού. Με την τεχνική αυτή μπορούμε να ανακαλύψουμε μικρά ογκίδια, μεγέθους 1-2 χιλιοστών, η οποία βασίζεται κυρίως στην παρουσία αποτιτανώσεων. Αποτιτανώσεις παρατηρούνται στο 60% περίπου των καρκινωμάτων και στο 20% των καλοήθων παθήσεων. Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές διαφορές στην εμφάνιση των αποτιτανώσεων [38].
Είναι σημαντικό όμως να θυμόμαστε πως μία αρνητική μαστογραφία δεν αποκλείει την πιθανότητα ύπαρξης καρκινώματος, αφού περίπου 20% των ψηλαφητών όγκων δεν ανιχνεύεται με τη μέθοδο αυτή.
- **Κυτταρολογική εξέταση διά λεπτής βελόνης (FNA).** Είναι μία τεχνική που όταν εκτελείται από έμπειρους γιατρούς έχει μεγάλη διαγνωστική αξία, με μέση ευαισθησία που εγγίζει το 87%. Υπάρχουν όμως ακόμη αρκετοί περιορισμοί [39].
- **Βιοψία διά βελόνης.** Αποτελεί ακόμη μία χρήσιμη μέθοδο προκειμένου να διευκρινιστεί η κακοήθης φύση μίας αλλοίωσης, με ευαισθησία που φθάνει το 90%. Η ευρεία εφαρμογή της τεχνικής αυτής τα τελευταία χρόνια μείωσε κατά πολύ τη χρήση της ανοικτής βιοψίας και της ταχείας βιοψίας [40].
- **Ανοικτή βιοψία και ταχεία βιοψία.** Οι διαδικασίες αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή διαγνωστική ακρίβεια και αποτελούσαν επί σειρά ετών την πάγια προσέγγιση για τα ογκίδια του μαστού. Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή τους



έχει περιοριστεί λόγω των καινούριων μεθόδων και του γεγονότος ότι θεωρείται πλέον ότι μια μικρή καθυστέρηση μεταξύ της διάγνωσης και της μαστεκτομής δεν επηρεάζει την πορεία της ασθενούς [41].

Ιστολογικός τύπος

Δύο είναι οι παρατηρήσεις-κλειδιά που πρέπει να γίνουν κατά τη μορφολογική εξέταση του καρκινώματος του μαστού: 1) αν ο όγκος περιορίζεται στο αδενικό στοιχείο του μαστού (*in situ* καρκίνωμα) ή διηθεί το στρώμα (διηθητικό καρκίνωμα) και 2) αν είναι πορογενούς ή λοβιακού τύπου.

Η πιο καθιερωμένη κατάταξη των ιστολογικών τύπων του καρκίνου του μαστού βασίζεται στην κατάταξη που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization, WHO), με σκοπό την υιοθέτηση ενός ενιαίου συστήματος χαρακτηρισμού των όγκων. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της κατάταξης των όγκων του μαστού, θα αναφερθούν περιληπτικά ορισμένες βασικές κατηγορίες [42].

Πορογενές καρκίνωμα διηθητικό και μη (*in situ*). Οι όγκοι που δημιουργούνται από το επιθήλιο των πόρων μπορούν να βρεθούν μόνο στο εσωτερικό των πόρων προέλευσης, δηλαδή οι όγκοι είναι ενδοπορικοί, δεν διασπύουν τη βασική μεμβράνη και δεν εισχωρούν στο περιβάλλον στρώμα. Η κατηγορία των καρκινωμάτων αυτών αναφέρεται ως πορογενές καρκίνωμα *in situ*.

Οι πιο συχνοί τύποι καρκινωμάτων *in situ* είναι ο φαγεσωρικός (*comedo*), ο ηθμοειδής (*cribriform*), ο θηλώδης (*papillary*), ο συμπαγής (*solid*) και ο μικροθηλώδης (*micropapillary*). Μεταξύ τους παρατηρούνται εκτός από μορφολογικές διαφορές και διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά, π.χ. ο φαγεσωρικός τύπος εμφανίζει υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού και μπορεί να εξελιχθεί σύντομα σε διηθητικό καρκίνωμα.

Αν τα κύτταρα διασπάσουν τη βασική μεμβράνη, τότε ο καρκίνος χαρακτηρίζεται ως διηθητικός. Στην κατηγορία αυτή ο τύπος με τη μεγαλύτερη συχνότητα είναι ο μη ειδικός τύπος (NST, *non specific type*) και αποτελεί το 80% όλων των καρκίνων του μαστού. Στα διηθητικά πορογενή καρκινώματα που παρουσιάζουν ειδικό τύπο ιστολογικής δομής ανήκουν: το θηλώδες, το μυελοειδές, το βλεννώδες, το σωληνώδες, το αδενοειδές κυστικό, το αποκρινικό και το νεανικό ή εκκριτικό.



Λοβιακό καρκίνωμα διηθητικό και μη (*in situ*). Η δεύτερη μεγάλη κατηγορία όγκου είναι το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού, το οποίο αναπτύσσεται μέσα στις λοβιακές μονάδες του μαζικού παρεγχύματος. Το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* πολύ συχνά αποτελεί τυχαίο μικροσκοπικό εύρημα σε ασθενείς που χειρουργούνται με ένδειξη ινοκυστικής μαστοπάθειας. Ποσοστό 20-30% των ασθενών αυτών έχει κίνδυνο να αναπτύξει διηθητικό καρκίνωμα με συχνότητα δέκα φορές μεγαλύτερη από το γενικό πληθυσμό.

Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα είναι πιο συχνό σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε ποσοστό 60% συνυπάρχει με *in situ* λοβιακό καρκίνωμα. Όπως προαναφέρθηκε είναι συχνά πολυεστιακό και αμφοτερόπλευρο και επιπλέον διαθέτει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ορμονικούς υποδοχείς σε σχέση με τους λοιπούς ιστολογικούς τύπους. Η ιστογένεση του λοβιακού καρκινώματος αποτέλεσε αντικείμενο συζητήσεων και έντονων διαφωνιών. Εν τέλει αποδείχθηκε ότι τόσο το πορογενές όσο και το λοβιακό καρκίνωμα προέρχονται από το ίδιο τμήμα του μαστού, την τελική λοβιακή μονάδα (TDLU).

Ορμονικοί υποδοχείς

Μία από τις πλέον σημαντικές ανακαλύψεις πάνω στον καρκίνο του μαστού είναι το γεγονός ότι η παρουσία ορμονικών υποδοχέων στον ιστό του όγκου σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία. Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης μπορούν να μετρηθούν εύκολα και αξιόπιστα με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα, με βιοχημικές τεχνικές για τις οποίες όμως χρειάζεται φρέσκος ιστός, καθώς και με *in situ* υβριδισμό που θεωρείται και ως η πιο ακριβής μέθοδος [43].

Δεν παρατηρείται ουσιαστική σχέση μεταξύ του αρχιτεκτονικού τύπου του καρκινώματος και της παρουσίας ορμονικών υποδοχέων, δηλαδή δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ πορογενούς και λοβιακού τύπου. Εντούτοις, αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι τα μυελοειδή και τα φαγεσωρικού τύπου καρκινώματα είναι συνήθως αρνητικά, ενώ τα βλεννώδη παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά θετικότητας [44].

Γενικά, οι συγκεντρώσεις οιστρογονικών υποδοχέων είναι χαμηλότερες σε όγκους προεμμηνοπαυσιακών γυναικών σε σχέση με τις μετεμμηνοπαυσιακές. Επιπλέον, φαίνεται ότι η παρουσία ορμονικών υποδοχέων σχετίζεται με χαμηλότερο βαθμό



κακοηθείας, απουσία νέκρωσης, παρουσία έντονης ελάστωσης του όγκου και μεγαλύτερες ηλικιακές ομάδες [42,44].

Οδοί επέκτασης και μεταστάσεις

Το καρκίνωμα του μαστού επεκτείνεται με διήθηση κατά συνέχεια ιστών, με τη λεμφογενή και την αιματογενή οδό. Αρκετές από τις μεταστάσεις αυτές υπάρχουν ήδη τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ άλλες εμφανίζονται κλινικά μήνες, χρόνια ή και δεκαετίες μετά την αρχική θεραπεία [42].

Η τοπική διήθηση αφορά στο ίδιο το μαζικό παρέγχυμα, τη θηλή, το δέρμα, την περιτονία, το θωρακικό μυ και άλλες δομές του θωρακικού τοιχώματος. Ιδιαίτερη σημασία έχει η αναγνώριση μικροσκοπικής διήθησης, κυρίως τώρα λόγω του συνεχώς αυξανόμενου αριθμού συντηρητικών χειρουργικών επεμβάσεων που πραγματοποιούνται. Σχετικό πρόβλημα είναι και η μικροσκοπική διήθηση της θηλής, η οποία παραμένει στις ογκεκτομές. Το ποσοστό της μικροσκοπικής διήθησής της είναι αρκετά υψηλό φθάνοντας το 23-31%. Η συντριπτική πλειοψηφία αφορά όγκους που βρίσκονται σε απόσταση 2,5 εκ από τη θηλή [42].

Η τοπική υποτροπή μετά από μαστεκτομή εμφανίζεται ως επιφανειακά οζίδια μέσα ή κοντά στην χειρουργική τομή ή και ως υποδόρια παραστερνικά οζίδια. Η κακοήθης φύση τους πρέπει πάντα να επιβεβαιώνεται με βιοψία. Αν και οι ασθενείς που υποτροπιάζουν τοπικά έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης και απομακρυσμένων μεταστάσεων, τα γεγονότα αυτά φαίνεται να είναι ανεξάρτητα. Υποτροπή του όγκου μετά από τοπική αφαίρεση συνήθως αναπτύσσεται στο ίδιο τμήμα του μαστού [45,46].

Η πιο συχνή θέση λεμφαδενικής συμμετοχής είναι η μασχालιαία χώρα και ακολουθούν η υπερκλείδια και η εσωτερική μαζική περιοχή. Μεταστάσεις στους μασχالياίους λεμφαδένες ανευρίσκονται σε ποσοστό 40-50% των περιπτώσεων. Μεταστατική συμμετοχή της εσωτερικής μαζικής αλυσίδας παρατηρείται στο 22% των ασθενών, κυρίως με όγκο που εντοπίζεται στο έσω ημιμόριο του μαστού ή στο έξω ημιμόριο, αλλά με θετικούς μασχالياίους λεμφαδένες [45,46].

Συμμετοχή των υπερκλείδιων λεμφαδένων είναι σχεδόν ανύπαρκτη σε ασθενείς με αρνητικούς μασχالياίους λεμφαδένες, ενώ εγγίζει το 20% όταν αυτοί είναι θετικοί.



Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αφορούν κυρίως το σκελετικό σύστημα, τους πνεύμονες και τον υπεζωκότα, τις ωοθήκες, τα επινεφρίδια, καθώς και το κεντρικό νευρικό σύστημα [42].

Ο Fisher κατόπιν αρκετών πολυκεντρικών μελετών κατέληξε στα εξής συμπεράσματα [46]:

1. Δεν υπάρχει πρότυπο επέκτασης του όγκου.
2. Οι επιχώριοι λεμφαδένες είναι αναποτελεσματικοί ως φραγμοί για την εξάπλωση του όγκου.
3. Η αιματογενής οδός είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εξάπλωση του όγκου.
4. Η αλληλεπίδραση μεταξύ όγκου και οργανισμού επηρεάζει κάθε στάδιο της νόσου.
5. Ο χειρουργήσιμος καρκίνος του μαστού πρέπει να θεωρείται ως συστηματική νόσος.
6. Παραλλαγές στην τοπική θεραπεία δε φαίνεται να επηρεάζουν την επιβίωση.

Θεραπεία

Η αντιμετώπιση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνει: χειρουργική αφαίρεση, ορμονοθεραπεία και χημειοθεραπεία.

Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι παραδοσιακά συνώνυμη με τη ριζική μαστεκτομή του Halsted, αλλά πλέον έχει καθιερωθεί μια μεγάλη ποικιλία επιλογών, όπως η μερική μαστεκτομή (ογκεκτομή ή τμηματεκτομή), απλή ολική μαστεκτομή και η τροποποιημένη μαστεκτομή [47,48].

Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται συνήθως ως προεγχειρητική συμπληρωματική αντιμετώπιση, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που θα εφαρμοστεί περιορισμένη χειρουργική επέμβαση, σπανιότερα ως πρωταρχική θεραπεία ή και για αντιμετώπιση μιας τοπικής υποτροπής [49].

Με την εφαρμογή συντηρητικών επεμβάσεων, έγινε ιδιαίτερα σημαντική η μικροσκοπική εκτίμηση των χειρουργικών ορίων αφαίρεσης. Ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής, καθώς και απομακρυσμένων μεταστάσεων.

Η συστηματική θεραπεία χορηγείται ως παρηγορητική θεραπεία ασθενών με γενικευμένη νόσο. Επιπλέον, η ορμονική θεραπεία, η οποία παλαιότερα ήταν συνώνυμη της



αφαίρεσης των ωοθηκών, των επινεφριδίων ή και της υπόφυσης, σήμερα λαμβάνει χώρα μέσω αντιοιστρογονικών φαρμάκων, με κύριο εκπρόσωπο την ταμοξιφένη [48].

Η χημειοθεραπεία έχει σημαντική επίδραση πάνω στην επιβίωση ασθενών με μεταστατική νόσο, κυρίως η συνδυασμένη. Επιπρόσθετα, η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται πλέον ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν θετικούς λεμφαδένες, αλλά έχουν υποβληθεί σε συντηρητική χειρουργική επέμβαση. Η απόφαση για το είδος της συμπληρωματικής θεραπείας (ορμονοθεραπεία ή χημειοθεραπεία) που πρέπει να χορηγηθεί σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες δεν είναι πάντα εύκολη και εξαρτάται από διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους [50,51].

Πρόγνωση

Η συνολική 5ετής επιβίωση των ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού είναι 60% για κλινικά εντοπισμένη νόσο και 34% για νόσο με επιχώρια επέκταση. Η εικόνα αυτή όμως τροποποιείται από μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων [2,42,52-56]. Εδώ θα αναφερθούν οι σημαντικότεροι:

1. **Ηλικία της ασθενούς.** Γυναίκες νεώτερες των 50 ετών κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχουν την καλύτερη πρόγνωση. Η επιβίωση μειώνεται πολύ σε ηλικιωμένες, ενώ για τις νεαρές ασθενείς (<35 ετών) οι απόψεις δίστανται με αρκετούς ερευνητές να θεωρούν ότι ο κίνδυνος τοπικής υποτροπής και μεταστάσεων είναι ιδιαίτερα υψηλός.
2. **Έγκαιρη διάγνωση.** Η σχετική 5ετής επιβίωση σε ασθενείς με ασυμπτωματικό καρκίνο του μαστού εγγίζει το 88%, ποσοστό πολύ πιο υψηλό από το αντίστοιχο των ασθενών με κλινικά ανιχνεύσιμο καρκίνο. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι οι όγκοι αυτοί είναι συνήθως μικροί σε μέγεθος και δε δίνουν εύκολα λεμφαδενικές μεταστάσεις.
3. **Απουσία ή παρουσία διηθητικού στοιχείου.** Αποτελεί αναντίρρητα τον πλέον σημαντικό προγνωστικό παράγοντα. Τα καρκινώματα *in situ* είναι πρακτικά 100% ιάσιμα κατόπιν μαστεκτομής.
4. **Μέγεθος του όγκου.** Η διάμετρος του πρωτοπαθούς όγκου εμφανίζει καλή συσχέτιση με την ανάπτυξη λεμφαδενικών μεταστάσεων και με την επιβίωση.



Για την ακρίβεια θεωρείται ως ο πλέον ισχυρός προγνωστικός παράγοντας εξάπλωσης και υποτροπής σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

5. **Αρχιτεκτονικός τύπος.** Δε φαίνεται να υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά στην πρόγνωση μεταξύ πορογενούς και λοβιακού καρκινώματος. Στην ομάδα των πορογενών καρκινωμάτων, καλύτερη πρόγνωση έχουν το σωληνώδες, το μυελοειδές και το αμιγώς βλενώδες καρκίνωμα. Ιδιαίτερα κακή πρόγνωση εμφανίζει ένας υπότυπος του λοβιακού καρκινώματος, το καρκίνωμα με κύτταρα 'δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου'(signet ring carcinoma), καθώς και το φλεγμονώδες καρκίνωμα.
6. **Βαθμός κακοηθείας (grade).** Το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα αποτελεί η μικροσκοπική διαβάθμιση κατά Bloom-Richardson, το οποίο τόσο στην αρχιτεκτονική δομή όσο και την πυρηνική ατυπία. Αφού και οι δύο αυτοί παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την πρόγνωση, πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν σε συνδυασμό.
7. **Νέκρωση του όγκου.** Σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων και θνητότητα.
8. **Αντίδραση του στρώματος.** Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι, πλην του μυελοειδούς καρκινώματος, η απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης στην περιφέρεια του όγκου μειώνει τον κίνδυνο μετάστασης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και συνεπώς βελτιώνει την πρόγνωση.
9. **Μικρογγοειακή πυκνότητα.** Οι σύγχρονες μελέτες επικεντρώνονται ιδιαίτερα στην αγγειογένεση: διηθητικά καρκινώματα με αυξημένη αγγείωση στρώματος συμπεριφέρονται με επιθετικό τρόπο σε σχέση με άλλα.
10. **c-erbB-2 (neu/HER-2) ογκογονίδιο.** Ενίσχυση του ογκογονιδίου αυτού, το οποίο κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με δράση τυροσινικής κινάσης, γνωστής ως p185, ανευρίσκεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις φαγεσωρικού ενδοπορικού καρκινώματος, στο 10-40% των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων και σε ελάχιστες περιπτώσεις λοβιακού καρκινώματος. Ανιχνεύεται είτε με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους όπου αναδεικνύεται το πρωτεϊνικό προϊόν είτε με *in situ* υβριδισμό του mRNA. Η αναγνώριση της ενίσχυσης αυτής του ογκογονιδίου ταυτοποιεί μία ομάδα



ασθενών με πτωχή πρόγνωση, ιδιαίτερα αν έχουν ήδη λεμφαδενικές μεταστάσεις. Ειδικά, σχετίζεται πολύ στενά με τον ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης του όγκου. Επιπλέον, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι ασθενείς με υπερέκφραση του c-erbB-2 έχουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία.

11. **p53.** Συσσωρευση της πρωτεΐνης p53 σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα.
12. **Bcl-2.** Οι περισσότερες μελέτες συνδυάζουν την έκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης με μακρά επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, η Bcl-2 σχετίζεται και με τους οιστρογονικούς υποδοχείς.
13. **Διήθηση του δέρματος και της θηλής.** Στην πρώτη περίπτωση φαίνεται ότι μειώνεται η επιβίωση, ενώ στη δεύτερη αυξάνεται η πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων.
14. **Έμβολα στα λεμφαγγεία.** Θεωρούνται υπεύθυνα κυρίως για την τοπική υποτροπή του καρκινώματος.
15. **Έμβολα στα αιμοφόρα αγγεία.** Το εύρημα αυτό εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με το μέγεθος, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, την ύπαρξη ή μη μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων και τελικά με πτωχή πρόγνωση.
16. **Οιστρογονικοί υποδοχείς.** Αρκετοί συγγραφείς καταλήγουν ότι οι ασθενείς των οποίων ο όγκος εκφράζει οιστρογονικούς υποδοχείς περνούν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερες νόσου σε σχέση με τις άλλες ασθενείς. Μακροπρόθεσμα όμως οι διαφορές στην πρόγνωση είναι ελάχιστες και ίσως μη σημαντικές στατιστικά.
17. **Κυτταρικός πολλαπλασιασμός.** Ο παράγοντας αυτός έχει αναδειχθεί σε ιδιαίτερα σημαντικό για την πρόγνωση.
18. **Μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες.** Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους προγνωστικούς παράγοντες, αφού υπάρχει σαφής διαφορά στη επιβίωση μεταξύ ασθενών με θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες. Επιπλέον όμως, η επιβίωση των ασθενών με θετικούς λεμφαδένες εξαρτάται και από άλλους παράγοντες: από το επίπεδο λεμφαδένων που έχει προσβληθεί, τον απόλυτο αριθμό, την παρουσία ή μη εξωλεμφαδενικής εξάπλωσης και την παρουσία καρκινικών κυττάρων στα προσαγωγά αγγεία.



19. **Τοπική υποτροπή.** Αποτελεί δείγμα πτωχής πρόγνωσης: οι ασθενείς συνήθως καταλήγουν.
20. **Τύπος θεραπείας.** Το ζήτημα αυτό είναι ιδιαίτερα πολυπαραγοντικό και περίπλοκο. Ως γενική αρχή, μπορούμε να πούμε ότι η εξέλιξη του καρκίνου του μαστού εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη φύση και τα χαρακτηριστικά του εκάστοτε όγκου παρά από τον τύπο θεραπείας που εφαρμόστηκε.

3. ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Όπως και σε όγκους άλλων θέσεων, έχει πλέον γίνει σαφές ότι και τα καρκινώματα του μαστού αναπτύσσονται μέσω μιας διαδοχικής συσσώρευσης γενετικών αλλαγών, στην οποία περιλαμβάνονται **ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.**

A. Κυτταρογενετική

Προς το παρόν, δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια χαρακτηριστική καρυοτυπική αλλαγή στον καρκίνο του μαστού, όπως έχει βρεθεί για παράδειγμα η t(8;14) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Δεν υπάρχει καν ένας κυτταρογενετικός δείκτης για κάποιον ιστολογικό υπότυπο του καρκίνου αυτού. Η έλλειψη αυτή πιθανώς οφείλεται στην γενετική περιπλοκότητα του όγκου αυτού.

Εντούτοις, αρκετές εκατοντάδες πρωτοπαθών όγκων έχουν υποβληθεί σε ανάλυση καρυότυπου, γεγονός που επιτρέπει την καθιέρωση κάποιων προτύπων: για παράδειγμα τα 2/3 των καρκινωμάτων του μαστού περιέχουν υπερπλοϊδικό DNA, όπως αναδεικνύεται από την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής. Οι κύριες παρατηρούμενες μεταθέσεις είναι οι i(1)(q10) και der(1;16)(q10;p10) [57].

B. Ενίσχυση του DNA

Με το συγκριτικό γενομικό υβριδισμό (comparative genomic amplification, CGH) έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από είκοσι περιοχές με αυξημένο αριθμό αντιγράφων DNA, στις



οποίες περιλαμβάνονται οι περιοχές 1q31-q32, 8q24, 11q13, 16p13, 17q12, 17q22-q24 και 20q13.

Με την ίδια μέθοδο ανιχνεύεται και απώλεια χρωμοσωμικού υλικού, πρότυπο το οποίο ταιριάζει με τα δεδομένα της απώλειας ετεροζυγωτίας [57].

Γ. Ογκογονίδια

Ένας ικανός αριθμός γνωστών ογκογονιδίων έχει βρεθεί ότι ενισχύεται σε κατηγορίες καρκίνου του μαστού χρησιμοποιώντας Southern blot ανάλυση, in situ υβριδισμό και συγκριτικό γενομικό υβριδισμό. Τα κύρια ογκογονίδια που ενισχύονται και συμμετέχουν στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού είναι τα εξής:

- **7p13.** Το γονίδιο του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενισχύεται σε ποσοστό περίπου 3% των καρκινωμάτων του μαστού [58].
- **8p12.** Το γονίδιο του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGFR), το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενισχύεται σε ποσοστό περίπου 10% των καρκινωμάτων του μαστού [59].
- **MYC.** Το MYC κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Ανευρίσκεται στο 20% των καρκινωμάτων του μαστού [60].
- **10q26.** Το γονίδιο του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα 2 (FGFR2), το οποίο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, ενισχύεται σε ποσοστό περίπου 12% των καρκινωμάτων του μαστού [58].
- **11q13.** Ενίσχυση του γονιδίου της κυκλίνης D1 (CCND1), το οποίο κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, έχει εντοπιστεί σε ποσοστό 15-20% των όγκων του μαστού και σχετίζεται επίσης με θετικότητα στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Η κυκλίνη D1 μπορεί ακόμη να συνδεθεί με τον υποδοχέα οιστρογόνων οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε ανεξάρτητη ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ανοσοϊστοχημικά, η κυκλίνη D1



υπερεκφράζεται στο 80% των διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων, χωρίς όμως να συνοδεύεται πάντα από ενίσχυση του γονιδίου [61,62].

- **17q12.** Τα πρωτοογκογονίδιο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (ERBB2), γνωστό και ως γονίδιο HER2, κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με δράση τυροσινικής κινάσης. Η ενίσχυση του ERBB2 οδηγεί στην υπερέκφραση της ERBB2 πρωτεΐνης, αλλά αυτό δε σημαίνει ότι στους όγκους με υπερέκφραση εντοπίζεται πάντα ενίσχυση του γονιδίου 17q12. Υπερέκφραση απαντάται σε ποσοστό περίπου 20-30% των καρκινωμάτων του μαστού. Πολυάριθμες μελέτες λαμβάνουν χώρα προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση του ERBB2 με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του όγκου [63].
- **17q22-24.** Τουλάχιστον τρία γονίδια (RPS6KB1, PAT1 και TBX2) έχει βρεθεί ότι ενισχύονται και υπερεκφράζονται σε ποσοστό περίπου 10% των καρκινωμάτων του μαστού. Η ριβοσωμική πρωτεϊνική κινάση S6 (RPS6KB1) όταν ενεργοποιείται πιστεύεται ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση ενός ευρέως φάσματος κυτταρικών διαδικασιών, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών, η μεταγραφή ειδικών τύπων mRNA και η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση [64].
- **20q13.** Προς το παρόν είναι άγνωστο αν το γονίδιο CSE1L/CAS, το γονίδιο NCOA3 ή κάποιο άλλο στην περιοχή αυτή χρησιμεύει ως στόχος για ενίσχυση αυτή που ανευρίσκεται στο 15% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Το γονίδιο CAS κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στον έλεγχο της απόπτωσης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το γονίδιο NCOA3 κωδικοποιεί έναν ενεργοποιητή του οιστρογονικού υποδοχέα και η ενίσχυσή του σχετίζεται με θετικότητα του υποδοχέα αυτού [65].

Επιπλέον, το STK15 γονίδιο (γνωστό και ως BTAK και Aurora-A) ενισχύεται σε ποσοστό 12% των καρκινωμάτων του μαστού, καθώς και σε καρκινώματα ωοθήκης, παχέος εντέρου, προστάτη και τραχήλου μήτρας. Το γονίδιο STK15 κωδικοποιεί μία κεντροσωμική κινάση και μπορεί να υπερεκφράζεται σε όγκους στους οποίους δεν ανευρίσκεται ενίσχυση του γονιδίου 20q13. Η αυξημένη



έκφραση του STK15 ενεργοποιεί τους μηχανισμούς που οδηγούν σε χρωμοσωμική αστάθεια [66].

Δ. Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH)

Η απώλεια ετεροζυγωτίας έχει βρεθεί ότι προσβάλλει όλους τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων του καρκίνου του μαστού σε ποικίλους βαθμούς. Τόσο μία ειδική απώλεια ενός αλληλόμορφου όσο και μία αστάθεια μεταξύ των αλληλόμορφων γονιδίων καλείται απώλεια ετεροζυγωτίας. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιχειρήσει να χαρτογραφήσουν τις συχνότερες περιοχές όπου παρατηρείται απώλεια ετεροζυγωτίας. Η χαρτογράφηση αυτή θα μπορούσε να επισημαίνει πιο εύκολα τη θέση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου με μεγαλύτερη ακρίβεια βοηθώντας έτσι την ταυτοποίησή του [67].

Ε. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Αρκετές χρωμοσωμικές περιοχές οι οποίες εμφανίζουν συχνά απώλεια ετεροζυγωτίας έχουν ερευνηθεί εκτενώς, λόγω του γεγονότος ότι αποτελούν ιδανικές υποψήφιες για την εντόπιση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στις περιοχές αυτές περιλαμβάνονται οι : 1p32-36, 3p14-21, 6q25, 7q31, 8p12-21, 9p21, 13q12-q14, 16q22, 16q24, 17p13, 18q21. Αρκετά ενδιαφέροντα ογκοκατασταλτικά γονίδια υπάρχουν στις περιοχές αυτές, όπως το FANCA στο 16q24, το FHIT στο 3p14, το TP73 στο 1p36, αλλά ο ρόλος τους στον καρκίνο του μαστού δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως [42].

Εξ' ορισμού, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο είναι ένα γονίδιο του οποίου η φυσιολογική λειτουργία είναι να αναστέλλει την απαρχή ή την εξέλιξη μίας ογκόμορφης εξεργασίας. Η λειτουργία αυτή μπορεί να αναδειχθεί με βιολογικές, βιοχημικές ή γενετικές μεθόδους, οι οποίες δε βρίσκονται πάντα σε πλήρη συμφωνία. Με βάση αυστηρά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί, ελάχιστα ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί στα καρκινώματα του μαστού [42,67].

Αναφέρονται τα σημαντικότερα:



- **6q26.** Το γονίδιο IGF2R, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα, απενεργοποιείται πολύ συχνά κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Το IGF2R θεωρείται ογκοκατασταλτικό λόγω της ικανότητας να συνδέεται και να αποδομεί τον μιτογόνο παράγοντα IGF-II, να ενεργοποιεί τον αυξητικό αναστολέα TGFβ και να ρυθμίζει τα λυσοσωμικά ένζυμα. Μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί σε ποσοστό 6% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού [68].
- **7q31.** Το ST7 είναι ένα γονίδιο με άγνωστη προς το παρόν κυτταρική λειτουργία, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στο μηχανισμό εξέλιξης του καρκίνου του μαστού [69].
- **8q11.** Η πρωτεΐνη RB1CC1 είναι ο ρυθμιστής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB1. Εντοπίζεται στον πυρήνα και φαίνεται να παίζει ρόλο μεταγραφικού παράγοντα. Στο 20% των καρκινωμάτων του μαστού παρατηρούνται σωματικές μεταλλάξεις της RB1CC1 [70].
- **16q22 (CDH1).** Το μόριο προσκόλλησης **E-cadherin** δρα ως ένας ισχυρός ογκοκατασταλτικός παράγοντας σε πειραματικά μοντέλα. Συχνές μεταλλάξεις του CDH1 έχουν παρατηρηθεί σε ποσοστό άνω του 60% στα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα, αλλά όχι και στα πορογενή. Οι περισσότερες μεταλλάξεις επισυμβαίνουν σε συνδυασμό με απώλεια ετεροζυγωτίας και έτσι δεν παρατηρείται ανοσοϊστοχημική έκφραση της E-cadherin. Μεταλλάξεις του CDH1 έχουν βρεθεί και στο λοβιακό καρκίνωμα *in situ* [71].
- **17p13.** Το γονίδιο TP53 κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη η οποία συνδέεται με το DNA και συμμετέχει στην μεταγραφή και στην αντιγραφή του. Το φυσιολογικό p53 προάγει την απόπτωση. Μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ή μεταβάλλουν τις λειτουργίες του παρατηρούνται σε ποσοστό 20% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταλλάξεων συνοδεύεται και από απώλεια του άγριου τύπου του αλληλόμορφου (LOH). Οι μεταλλάξεις του TP53 μπορούν να ανιχνευθούν και ανοσοϊστοχημικά [72].



ΣΤ. Μικροδορυφορική αστάθεια

Η μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) είναι ένα γενετικό ελάττωμα που προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2). Η συχνότητα της μικροδορυφορικής αστάθειας στον καρκίνο του μαστού ποικίλει σημαντικά σε διάφορες μελέτες [73].

Z. Μοντέλα γονιδιακής έκφρασης

Οι όγκοι του μαστού εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία στην έκφραση γονιδίων, αλλά παρά την ποικιλία αυτή, παρατηρούνται επίσης σημαντικές ομοιότητες, γεγονός που παρέχει νέες προοπτικές στην κατάταξη των όγκων [74-76].

- Οι ER-θετικοί και οι ER-αρνητικοί όγκοι εμφανίζουν διαφορετικά μοντέλα έκφρασης.
- Τα καρκινώματα του μαστού που αναπτύσσονται σε γυναίκες με μετάλλαξη στο BRCA1 πρέπει να διαχωρίζονται από τη σποραδική μορφή του καρκίνου και από τους όγκους που εμφανίζονται σε φορείς μεταλλάξεων του BRCA2.
- Η ομάδα των καρκινωμάτων που εκφράζει το ERBB2 εκφράζει επίσης και άλλα γονίδια, όπως το GRB7.

Η. Το μοντέλο της πολυσταδιακής καρκινογένεσης στο μαστό

Το υποθετικό αυτό μοντέλο δείχνει ότι το διηθητικό καρκίνωμα αναπτύσσεται διαμέσου μίας σειράς ενδιάμεσων υπερπλαστικών και νεοπλαστικών σταδίων. Όσον αφορά τον καρκίνο του παχέος εντέρου, υπάρχει μία σαφώς αναγνωρισμένη προδιηθητική αλλοίωση με τη μορφή του αδενώματος, γεγονός που βοήθησε στην ταυτοποίηση των γενετικών αλλαγών αυτής της προδρόμου βλάβης. Δε συνέβη όμως το ίδιο και με το μαστό: οι μελέτες πάνω στο όργανο αυτό έγιναν περίπλοκες λόγω της μορφολογικής ετερογένειας των προδιηθητικών αλλοιώσεων. Επιπλέον, η ετερογένεια του μαζικού

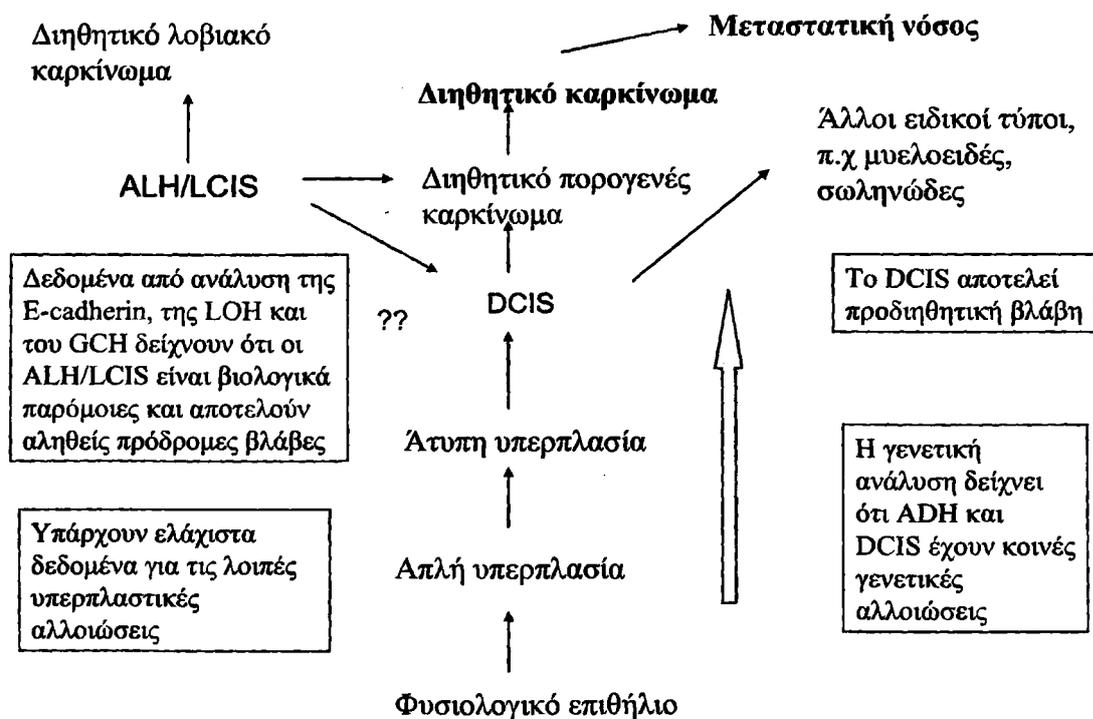


παρεγχύματος στο οποίο περιέχεται λίπος, αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία και φλεγμονώδη στοιχεία σε άμεση επαφή με την τελική λοβιακή μονάδα, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη γενετική ανάλυση.

Οι σύγχρονες μελέτες καταλήγουν στα εξής συμπεράσματα [77,78]:

- Μία ενδιάμεση φάση πολλαπλασιασμού προηγείται της εμφάνισης του καρκίνου του μαστού.
- Η άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία και πορογενές καρκίνωμα *in situ* αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκινώματος.
- Οι δύο αυτές αλλοιώσεις εμφανίζουν παρόμοιες γενετικές αλλαγές και ίσως πρέπει να περιγράφονται κάτω από τον όρο *in situ* νεοπλασία.

Διαγραμματικά, το μοντέλο καρκινογένεσης:



4. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΗ: Ο ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή

Η κληρονομική βάση του καρκίνου του μαστού έχει αναγνωριστεί εδώ και 100 χρόνια. Οι επιδημιολογικές μελέτες προσπάθησαν να υπολογίσουν τον κίνδυνο συσχετίζοντας το οικογενειακό ιστορικό και εξετάζοντας αν το πρότυπο είναι συμβατό με την επίδραση ενός και μόνο γονιδίου υψηλής διεισδυτικότητας, περισσότερα γονίδια που δρουν αθροιστικά, περιβαλλοντικούς παράγοντες ή, το οποίο φαίνεται να είναι και πιο πιθανό, με συνδυασμό των προαναφερθέντων [79,80].

Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκε ένας αριθμός ειδικών γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται με κάποιο τρόπο με σημαντικότερα τα γονίδια BRCA1 και BRCA2. Εντούτοις, αυτά τα δύο γονίδια ευθύνονται μόνο για το 1/5 του συνολικού αριθμού των οικογενών καρκινωμάτων του μαστού και εξηγούν λιγότερες από τις μισές υψηλού κινδύνου οικογένειες [81,82].

Κριτήρια χαρακτηρισμού του καρκίνου του μαστού

Οι Lynch και Lynch [83,84] ταξινομούν τον καρκίνο του μαστού σε τρεις κατηγορίες με βάση την κληρονομική προδιάθεση:

1. **Σποραδικός καρκίνος του μαστού:** η εμφάνιση ενός μεμονωμένου περιστατικού καρκίνου χωρίς προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό σε τουλάχιστον δύο γενιές είτε από την πλευρά της μητέρας είτε από την πλευρά του πατέρα.
2. **Οικογενής καρκίνος του μαστού:** περιστατικό εμφάνισης καρκίνου σε συνδυασμό με θετικό ιστορικό στην οικογένεια που περιλαμβάνει μία ή περισσότερες πρώτου ή δεύτερου βαθμού συγγενείς με καρκίνο του μαστού και δεν εμπίπτει στην κατηγορία του κληρονομικού καρκίνου του μαστού.
3. **Κληρονομικός καρκίνος του μαστού:** περιστατικό εμφάνισης καρκίνου με προηγούμενη εκδήλωση καρκίνου του μαστού στην οικογένεια και ενίοτε και άλλων όγκων (καρκίνος ωοθηκών και ενδομητρίου κτλ.) με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα. Χαρακτηρίζεται επίσης από προδιάθεση για εκδήλωση



της νόσου σε νεαρή ηλικία (πριν την εμμηνόπαυση), αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αμφοτερόπλευρου όγκου, καθώς και άλλων πρωτοπαθών όγκων.

Βέβαια, είναι δύσκολο να διαχωρίσεις τους περιβαλλοντικούς από τους κληρονομικούς παράγοντες και ακόμη πιο δύσκολο τον οικογενή από τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού. Για το λόγο αυτό, οικογενής χαρακτηρίζεται ο καρκίνος του μαστού στον οποίο η νόσος έχει εμφανιστεί σε πρώτου βαθμού συγγενείς ή, ανεξάρτητα από αυτό, σε δύο τουλάχιστον συγγενείς δευτέρου βαθμού. Τα νέα αυτά κριτήρια επιλύουν αρκετά κλινικά προβλήματα.

Οικογενής κίνδυνος καρκίνου του μαστού

Ουσιαστικά, όλες οι μελέτες επισημαίνουν τον σημαντικά αυξημένο σχετικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε συγγενείς καρκινοπαθών με τον όγκο αυτό. Εντούτοις, τα αποτελέσματα ποικίλουν ανάλογα με τον αριθμό των προσβεβλημένων σύγγενών, την ηλικία διάγνωσης των αρχικών ατόμων που εμφάνισαν τη νόσο, τη θέση εμφάνισης του όγκου και το γενικό σχεδιασμό της μελέτης. Οι περισσότερες έρευνες αναφέρουν σχετικό κίνδυνο μεταξύ 2 και 3 για τις γυναίκες πρώτου βαθμού συγγένειας χωρίς να λαμβάνουν υπόψη την ηλικία διάγνωσης ή την πλευρά όπου εμφανίζεται ο όγκος. Σε μία μεγάλη αναδρομική μελέτη, αναφέρεται ότι ο κίνδυνος για τις γυναίκες πρώτου βαθμού συγγένειας με ασθενείς στις οποίες η νόσος εκδηλώθηκε πριν την ηλικία των 80 είναι 1,8. Αν η νόσος εκδηλώθηκε σε νεαρή ηλικία (κάτω από τα 50 έτη), αυτόματα ο σχετικός κίνδυνος αυξάνεται στο 2,6 και μάλιστα με μεγάλες πιθανότητες να νοσήσουν και αυτές σε νεαρή ηλικία. Σε οικογένειες με δύο προσβεβλημένες αδερφές ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σε ηλικία κάτω των 50 ετών σε συγγενείς ανεβαίνει κατακόρυφα στο 4,9 [85].

Σε μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα μελέτη ερευνήθηκε ένας μεγάλος αριθμός διδύμων στη Σκανδιναβία, προκειμένου να εκτιμηθεί η αναλογία συμμετοχής μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Με βάση τα δεδομένα αυτά, οι ερευνητές υπολόγισαν το σχετικό κίνδυνο μεταξύ διδύμων, ο οποίος ήταν 2,8 για τα διζυγωτικά και 5,2 για τα μονοζυγωτικά δίδυμα. Έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 27% των καρκινωμάτων



του μαστού οφείλεται σε κληρονομικούς λόγους, ενώ μόνο το 6% μπορεί να αποδοθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες [86].

Άλλο ένα στοιχείο που υποδεικνύει την ισχυρή οικογενή προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, είναι η εμφάνιση καρκινώματος μαστού σε άρρενες. Έχει εκτιμηθεί ότι συγγενείς αρρένων ασθενών έχουν 2 -3 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Συσχετίσεις του οικογενή καρκίνου του μαστού με άλλους καρκίνους

Ένας ικανός αριθμός μελετών αναφέρει ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος και για άλλες μορφές καρκίνου σε συγγενείς ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι συχνότερα αναφερόμενοι είναι ο καρκίνος ωοθήκης, μήτρας, προστάτη και παχέος εντέρου. Αναμφίβολα, στην πλειοψηφία των ασθενών αυτών υπεύθυνο γονίδιο είναι το BRCA1 [87,88].

Οικογενής κίνδυνος καρκίνου του μαστού: Πιθανά μοντέλα

Τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 εξηγούν τη μειοψηφία (περίπου 20%) του συνόλου των περιπτώσεων, αν και μπορεί να συνεισφέρουν σε μεγαλύτερο βαθμό στον κατά τέσσερις φορές αυξημένο κίνδυνο στις μικρότερες ηλικίες. Υποθέτοντας συνολικό κίνδυνο αυξημένο κατά δύο φορές σε συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με καρκίνο του μαστού και επιπλέον ότι τα γονίδια αυτά δρουν με αθροιστικό τρόπο, παραμένει υπολειπόμενος κίνδυνος της τάξης του 1,8, ο οποίος πρέπει να εξηγηθεί με άλλα γονίδια ή και με περιβαλλοντικούς παράγοντες [86].

Αυτά μπορεί να είναι γονίδια παρόμοια σε δράση με τα BRCA1 και BRCA2, αλλά με μικρότερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου ή μία ομάδα κοινών πολυμορφισμών σε σχετικά γονίδια. Γενικά όμως, τα γονίδια δεν αποτελούν το μοναδικό παράγοντα που προκαλεί την παρατηρούμενη οικογενή σχέση. Ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορεί επίσης να προκαλούν μία οικογενή συνάθροιση, εντούτοις οι έως τώρα γνωστοί περιβαλλοντικοί παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού θεωρούνται απίθανοι να συμβάλλουν σημαντικά στο συνολικό οικογενή κίνδυνο [89,90].



5. ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ BRCA1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Επιδημιολογία

Η συχνότητα των μεταλλάξεων του BRCA1 στους περισσότερους Καυκάσιους πληθυσμούς εκτιμάται ότι κυμαίνεται γύρω στο 1 ανά 883 άτομα [91]. Εντούτοις, σε συγκεκριμένους πληθυσμούς είναι υψηλότερη, όπως π.χ. στους Εβραίους Ashkenazi, όπου το ποσοστό κυμαίνεται στο 1% [92]. Χρησιμοποιώντας τεχνικές ανασύνθεσης, μεταλλάξεις του BRCA1 χρονολογούνται από τους πρώιμους Ρωμαϊκούς χρόνους [93].

Διαγνωστικά κριτήρια

Αδιαμφισβήτητη διάγνωση επιτυγχάνεται μόνο με γενετικό έλεγχο. Οι μεταλλάξεις του BRCA1 είναι συχνές σε συγκεκριμένους πληθυσμούς και σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του μαστού σε νεαρή ηλικία (≥ 4 περιπτώσεις σε ηλικία $<$ των 60 ετών) ή σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών ανεξαρτήτως ηλικίας σε συνδυασμό με καρκίνο του μαστού σε νεαρή ηλικία. Η πιθανότητα μετάλλαξης είτε στο BRCA1 είτε στο BRCA2 είναι μικρότερη ($<30\%$), όταν μόνο δύο ή τρία περιστατικά καρκίνου του μαστού έχουν εμφανιστεί στην οικογένεια. Η κύρια διαφορά μεταξύ των BRCA1 και BRCA2 είναι ο αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού σε άνδρες λόγω του BRCA2.

Η Αμερικανική Εταιρία Κλινικής Ογκολογίας (American Society of Clinical Oncology, ASCO) προτείνει γενετικό έλεγχο σε άτομα με πιθανότητα μετάλλαξης $>10\%$, αλλά άλλες χώρες προσφέρουν τον έλεγχο αυτό σε άτομα με πιθανότητα $>30\%$, λόγω του υψηλού κόστους [94-97].

Πιθανότητα μετάλλαξης BRCA1/2	Κλινικά κριτήρια
$<10\%$	Μεμονωμένο περιστατικό καρκίνου του μαστού/ωοθήκης <40 ετών
10-30%	2-3 περιστατικά καρκίνου του μαστού σε γυναίκες (όχι ωοθήκης/μαστού σε άνδρα)
30%	4 περιστατικά καρκίνου του μαστού σε γυναίκες <60 ετών
$>60\%$	<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 περιστατικά καρκίνου του μαστού σε γυναίκες και καρκίνου ωοθήκης σε οποιαδήποτε ηλικία • ≥ 2 περιστατικά καρκίνου του μαστού σε γυναίκες και καρκίνου μαστού σε άνδρα σε οποιαδήποτε ηλικία



Διεισδυτικότητα

Μελέτες σε πληθυσμούς του Ηνωμένου Βασιλείου με καρκίνο του μαστού αναφέρουν χαμηλή διεισδυτικότητα και υποδεικνύουν ότι μία μετάλλαξη σε μία οικογένεια δεν συμβάλλει σε υψηλή διεισδυτικότητα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην εμπλοκή άλλων γονιδίων ή επιδημιολογικών παραγόντων που συνυπάρχουν στην οικογένεια αυτή. Αναφέρεται επίσης ποικίλη διεισδυτικότητα εξαρτώμενη από τη θέση της μετάλλαξης στο γονίδιο του BRCA1 [96].

Κλινικά στοιχεία

Στους φορείς μετάλλαξης του BRCA1, ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται σε νεαρότερες ηλικίες, τυπικά πριν τα 40 έτη. Τείνει να εξελίσσεται άμεσα σε διηθητική νόσο και συνυπάρχει με πορογενές καρκίνωμα *in situ*.

Σύμφωνα με αυτά, φαίνεται ότι υπάρχει μικρότερη πιθανότητα πρώιμης διάγνωσης σε μαστογραφικό έλεγχο (αφού το screening ξεκινά σε μεγαλύτερες ηλικίες) και υψηλότερη αναλογία διηθητικών καρκινωμάτων [98].

Επιπλέον, παρατηρείται μία σχεδόν γραμμική αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης αμφοτερόπλευρου καρκίνου του μαστού από την ηλικία των 35 ετών, ο οποίος φθάνει το επίπεδο του 64% περί τα 80 έτη [99].

Ιστολογία

Συγκεκριμένοι ιστολογικοί τύποι καρκινώματος, στους οποίους περιλαμβάνεται το μυελοειδές και το σωληνώδες καρκίνωμα και το λοβιακό καρκίνωμα διηθητικό και μη (*in situ*), αναφέρεται πως αναπτύσσονται συχνότερα σε ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού [100].

Σε ασθενείς με μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA1 παρατηρείται σημαντική αύξηση της συχνότητας ανάπτυξης τυπικού και άτυπου μυελοειδούς καρκινώματος, σε σύγκριση με ομάδες ελέγχου [101]. Επιπλέον, τα καρκινώματα που εμφανίζονται σε φορείς μετάλλαξης του BRCA1 είναι συνήθως υψηλότερου βαθμού κακοηθείας από τις αντίστοιχες σποραδικές μορφές. Πολυπαραγοντικές αναλύσεις δεδομένων αναφέρουν ότι



τα στοιχεία που σχετίζονται με το BRCA1 είναι η μιτωτική δραστηριότητα, τα όρια του όγκου και η λεμφοκυτταρική διήθηση [102,103].

Οι BRCA1-σχετιζόμενοι όγκοι εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα να μην εκφράζουν οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς, όπως και το c-erbB-2, για το οποίο όμως οι ήδη υπάρχουσες μελέτες είναι περιορισμένες [104,105]. Επιπρόσθετα, στους BRCA1-σχετιζόμενους όγκους παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων του TP53 και έκφρασης του p53 σε σχέση με τα σποραδικά καρκινώματα του μαστού [106,107]. Τέλος, στους όγκους αυτούς η έκφραση της κυκλίνης D1 είναι χαμηλή τόσο στο διηθητικό όσο και στο *in situ* στοιχείο. Η απουσία της κυκλίνης D1 μπορεί να αποτελεί μία επιπρόσθετη απόδειξη της ορμονικής ανεξαρτησίας των BRCA1-σχετιζόμενων καρκίνων του μαστού [108,109].

Πρόγνωση και προγνωστικοί παράγοντες

Οι μελέτες πάνω στο ζήτημα αυτό είναι αντικρουόμενες και τα αποτελέσματα ποικίλουν σημαντικά, με εύρος που κυμαίνεται από πτωχή πρόγνωση, καμία διαφορά έως και καλύτερη πρόγνωση [110].

Σχέση του γονιδίου BRCA1 με άλλους όγκους

- **Καρκίνος των ωοθηκών.** Περίπου το 7-10% των καρκινωμάτων της ωοθήκης οφείλονται σε κληρονομούμενες μεταλλάξεις του BRCA1 (ή του BRCA2) γονιδίου. Καθώς ανευρίσκονται σε αυτοσωματικά γονίδια, κληρονομούνται είτε από τον πατέρα είτε από την μητέρα. Η διεισδυτικότητα του γονιδίου φθάνει το 44-60% έως την ηλικία των 70 ετών, ποσοστό σημαντικά υψηλότερο από τον κίνδυνο της τάξης του 1,8% ανάπτυξης σποραδικού καρκίνου των ωοθηκών σε γυναίκες που ζουν στις ανεπτυγμένες χώρες. Το καρκίνωμα που αναπτύσσεται είναι κυρίως ορώδες κυσταδενοκαρκίνωμα με πτωχή συνήθως πρόγνωση [110-114].
- **Καρκίνος των σαλπίνγων.** Η συχνότερη μορφή είναι το ορώδες θηλώδες καρκίνωμα. Τα στοιχεία που διαθέτουμε έως τώρα δεν επαρκούν για εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την πρόγνωση και την επιβίωση, κυρίως λόγω του



μικρού αριθμού των περιστατικών που περιγράφονται στη βιβλιογραφία [114-116].

- *Άλλοι όγκοι.* Το BRCA1, σε αντίθεση με το BRCA2, δεν προδιαθέτει για καρκίνο του μαστού σε άνδρες. Σε μία μεγάλη πολυκεντρική μελέτη από τον Ford παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος για καρκίνο του παχέος εντέρου και του προστάτη. Σε μεταanalύσεις αναφέρεται επίσης συμμετοχή του BRCA1 και στον καρκίνο του παγκρέατος [117].

Γενετικά στοιχεία

A. Εντόπιση και δομή του γονιδίου

Το BRCA1 γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21. Περιέχει 24 εξόνια και από αυτά το εξόνιο 11 κωδικοποιεί το 61% της παραγόμενης πρωτεΐνης [118,119].

B. Έκφραση του γονιδίου

Το γονίδιο BRCA1 παράγει αρκετές πρωτεΐνες με κύριες την 100 και 97-kDa Δ11 που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και την 220- kDa που είναι πυρηνική. Η έκφραση και η φωσφορυλίωσή τους είναι εξαρτώμενες από τον κυτταρικό κύκλο, ξεκινώντας από τη G1 φάση και φθάνοντας το μέγιστο στην πρόιμη S φάση. Βλάβη του DNA οδηγεί σε υπερφωσφορυλίωση του BRCA1 [119,120]. Έχει ταυτοποιηθεί ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, το οποίο αποτελείται από άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA, γνωστό ως BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex, BRCA1-σχετιζόμενο σύμπλεγμα επαγρύπνησης του γονιδιώματος) [121].

Συμβατό με το ρόλο του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ο άγριος τύπος του BRCA1 χάνεται στη πλειοψηφία των όγκων σε άτομα με κληρονομούμενες μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα απώλεια της φυσιολογικής πρωτεΐνης. Στο σποραδικό καρκίνο, η έκφραση της BRCA1 πρωτεΐνης απουσιάζει στην πλειονότητα των υψηλού βαθμού κακοηθείας καρκινωμάτων του μαστού [122-124]. Αν και ελάχιστες σωματικές μεταλλάξεις της αλληλουχίας του BRCA1 έχουν ταυτοποιηθεί, θεωρείται ότι μπορεί να συμβεί σωματική απενεργοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης μέσω αρκετών μηχανισμών, στους οποίους

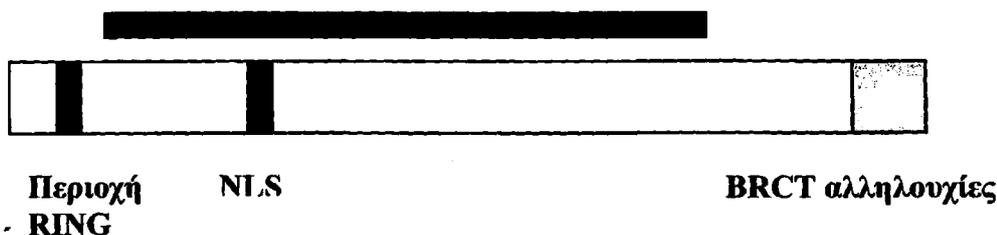


περιλαμβάνονται οι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις (περίπου το 50% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού εμφανίζουν απώλεια ετεροζυγωτίας στο χρωμόσωμα 17q21) και η επιγενετική απενεργοποίηση της έκφρασης, όπως η υπερμεθυλίωση του ενισχυτή [125].

Γ. Λειτουργία του γονιδίου

Οι περιοχές του γονιδίου φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:

Εξόνιο 11



Λειτουργικές περιοχές του BRCA1.
 Η περιοχή RING αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες.
 NLS= πυρηνική εντόπιση σήματος
 BRCT= C-τελικό άκρο του BRCA1

Η περιοχή BRCT κωδικοποιεί πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Η περιοχή RING μεσολαβεί της αλληλεπίδρασης με το BARD1. Και οι δύο αυτές περιοχές είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη λειτουργία του BRCA1. Μελέτες σε επίμυες υποδεικνύουν το ρόλο του BRCA1 στην απάντηση κατόπιν βλάβης του DNA [126].

Έκφραση του άγριου τύπου σε BRCA1-ελαττωματικά κύτταρα επαναφέρει την αντίσταση σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA και αρκετά συμπλέγματα που περιέχουν το BRCA1 και εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA έχουν ταυτοποιηθεί. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται και οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, *MLH1*, *MSH2* και *MSH6*. Οι παράγοντες που βλάπτουν το DNA προάγουν την



υπερφωσφορυλίωση του BRCA1, η οποία με τη σειρά της φαίνεται ότι ρυθμίζει την αλληλεπίδραση με τα συμπλέγματα αυτά [127].

Πρόγνωση και τρόποι πρόληψης

Ο μέσος όρος ζωής σε γυναίκες φορείς μεταλλάξεων BRCA1 μειώνεται λόγω του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης νεοπλασίας, κυρίως σε νεαρές ηλικίες. Σήμερα, γίνονται προσπάθειες για να βελτιωθεί η πρόγνωση των γυναικών αυτών με τους εξής τρόπους [128]:

- Τακτική παρακολούθηση.
- Προφυλακτικές χειρουργικές επεμβάσεις, π.χ. η προφυλακτική αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού κατά 90%.
- Χημειοπροφύλαξη. Οι αντιοιστρογονικοί παράγοντες, όπως η ταμοξιφένη, φαίνεται ότι μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης διηθητικών και προδιηθητικών παθήσεων του μαστού σε γυναίκες υψηλού κινδύνου.



6. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΟΥ DNA (MISMATCH REPAIR SYSTEM)

Γενετική των γονιδίων MLH1, MSH2 και MSH6

Α. Χρωμοσωμική εντόπιση

Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στο σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και έχουν ταυτοποιηθεί είναι πέντε: τα MLH1, MSH2, PMS2, MSH6 και MLH3. Η εντόπισή τους φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα [129].

Γονίδιο	Χρωμοσωμική εντόπιση
MSH2	2p31
MLH1	3p21-p23
PMS2	7p22
MSH6	2p21
MLH3	14q24.3

Η πρώτη αναφορά του συστήματος αυτού έγινε με την ανακάλυψη ότι οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις τους ευθύνονται για τον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC), μία διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο και χαρακτηρίζεται από ανάπτυξη ορθοκολικού καρκίνου, καρκίνου του ενδομητρίου και άλλων όγκων [130]. Ως παραδείγματα αναφέρονται η απώλεια της πρωτεΐνης MLH1 στον καρκίνο ενδομητρίου που σχετίζεται με το HNPCC, αλλά και σε σποραδικές μορφές μέσω της σωματικής απενεργοποίησης του MLH1, καθώς και η απώλεια της πρωτεΐνης MSH2 ή/και MSH6 στον κληρονομικό μη πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο, κυρίως σε νεαρές ηλικίες [131-133].



B. Προϊόντα των γονιδίων

Οι πρωτεΐνες που παράγονται εκφράζονται πυρηνικά στους ανθρώπινους ιστούς των ενηλίκων και η έκφρασή τους είναι ιδιαίτερα έκδηλη στο γαστρεντερικό σωλήνα, τους όρχεις και τις ωοθήκες. Επιπλέον, εκφράζονται στο φυσιολογικό ενδομήτριο, ενώ η απώλειά τους αποτελεί πρώιμο στάδιο της καρκινογένεσης στο όργανο αυτό [134-137]. Μελέτες πάνω σε φορείς μεταλλάξεων του *MLH1* και του *MSH2* έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί απωλέσουν την έκφρασή τους ακόμη και στη άτυπη υπερπλασία ή και στην υπερπλασία ενδομητρίου χωρίς ατυπία, αρκετούς μήνες πριν τη διάγνωση καρκινώματος, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανοσοϊστοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών *MLH1* και *MSH2* μπορεί να αποβεί χρήσιμη ως μέθοδος ελέγχου [138,139].

Γ. Λειτουργία των γονιδίων

Οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα γονίδια είναι οι βασικοί ρυθμιστές της επιδιόρθωσης των λαθών που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA. Δύο διαφορετικά ετεροδιμερή σύμπλοκα είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των λαθών: *MSH2-MSH3* και *MSH2-MSH6*. Η παρουσία του *MSH2* είναι ουσιαστικής σημασίας για τη λειτουργία του συμπλόκου, ενώ το *MSH3* μπορεί να αντικαταστήσει σε ορισμένες περιπτώσεις το *MSH6*. Επιπλέον, τα σύμπλοκα *MLH1-PMS2* και *MLH1-MLH3* μαζί με άλλες πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη επιδιόρθωση του DNA [140,141].

Εκτός από τη διόρθωση βιοσυνθετικών λαθών, οι πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA αναγνωρίζουν και εξαλείφουν διάφορους τύπους ενδογενούς και εξωγενούς βλάβης του DNA με ποικίλη ικανότητα διόρθωσης, γεγονός το οποίο μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη όγκων σε διαφορετικά όργανα [142].

Δ. Μεταλλάξεις των γονιδίων

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 155 διαφορετικές μεταλλάξεις του γονιδίου *MSH2* και 200 του γονιδίου *MLH1*, μαζί με 30, 5 και 10 των γονιδίων *MSH6*, *PMS2* και *MLH3* αντίστοιχα. Εντούτοις, ποσοστό 30% των μεταλλάξεων των *MLH1* και *MSH6* είναι δυσυνθετικές (missence mutations), κάτι το οποίο αποτελεί διαγνωστικό πρόβλημα σχετικά την παθογένειά τους [143].



Ε. Μικροδορυφορική αστάθεια

Η μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό των όγκων που αναπτύσσονται σε φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, κυρίως των MLH1, MSH2 και MSH6.

Η μικροδορυφορική αστάθεια υπολογίζεται ως αλλαγή στο μήκος απλών επαναλαμβανόμενων γενωμικών αλληλουχιών. Αφού οι αλληλουχίες αυτές εμφανίζουν την τάση να δημιουργούν λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA, ελάττωμα στο σύστημα επιδιόρθωσης αναμένεται να προκαλέσει αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων [144-146].

Ο ορισμός της μικροδορυφορικής αστάθειας δεν ήταν σαφής και για το λόγο αυτό το 1998 μία διεθνής ομάδα εργασίας πρότεινε τη χρήση πέντε δεικτών προκειμένου να καθοριστεί η MSI [144].

- Ως όγκοι με υψηλή συχνότητα MSI (MSI-H) χαρακτηρίζονται αυτοί στους οποίους δύο ή περισσότεροι δείκτες εμφανίζουν αστάθεια.
- Ως όγκοι με χαμηλή συχνότητα MSI (MSI-L) χαρακτηρίζονται αυτοί στους οποίους ένας μόνο δείκτης εμφανίζει αστάθεια.

Τα νεοπλάσματα με υψηλή συχνότητα μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H) αποτελούν μία ιδιαίτερη ομάδα με διαφορετική πρόγνωση, διαφορετική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και ιδιαίτερα κλινικοπαθολογοανατομικά και μοριακά χαρακτηριστικά.

Η προσέγγιση των καρκινωμάτων αυτών είναι σημαντική για τους ασθενείς. Η μελέτη της MSI όμως έχει υψηλό κόστος και απαιτεί εξειδικευμένο εργαστήριο και προσωπικό. Πολλές μελέτες στρέφονται γύρω από την αξία της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης ως εναλλακτικής μεθόδου και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου στον οποίο απώλεια έκφρασης των πρωτεϊνών MLH1 και MSH2 παρατηρείται σε ποσοστό 75% των περιπτώσεων με MSI. Περαιτέρω μελέτες μπορεί να διερευνήσουν διάφορους τύπους καρκινωμάτων.



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, hMLH1, hMSH2 και hMSH6, καθώς και της πρωτεΐνης BRCA1, η οποία εμπλέκεται επίσης στον ίδιο μηχανισμό, σε καλοήθεις και προκαρκινικές αλλοιώσεις, καθώς και σε δείγματα οικογενή και σποραδικού καρκίνου του μαστού με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη διερεύνηση της προγνωστικής αξίας των δεικτών αυτών και της συσχέτισής τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

Αναλυτικότερα μελετήθηκαν:

- Η έκφραση των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2 και hMSH6 από τα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα και οι αλλαγές που παρατηρούνται στην αλληλουχία *"φυσιολογικός ιστός- καλοήθεις παθήσεις- μη διηθητικό καρκίνωμα- διηθητικό καρκίνωμα"*.
- Η προγνωστική αξία της ποσοτικής αυτής καταγραφής σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Οι κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτροι που μελετήθηκαν είναι η ηλικία, ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός κακοηθείας, το μέγεθος του όγκου, οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, η έκφραση του c-erbB-2, το στάδιο της νόσου, η παρουσία λεμφαδενικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων, η λεμφαγγειογένεση και η λεμφαγγειακή διασπορά. Οι δύο τελευταίοι παράγοντες εκτιμήθηκαν με τη χρήση του ειδικού λεμφαγγειακού δείκτη podoplanin, ο οποίος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία θεωρείται ο πλέον ευαίσθητος και ειδικός.



Έγινε επίσης σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά των ήδη δημοσιευμένων μελετών.

- Οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ των δύο βασικών ομάδων καρκίνου του μαστού: του οικογενή και του σποραδικού. Αξιολογήθηκε εάν η παρουσία ή η απουσία τους χαρακτηρίζει περισσότερο κάποια από τις δύο ομάδες.
- Η σχέση της πρωτεΐνης BRCA1 με τις πρωτεΐνες hMLH1, hMSH2 και hMSH6 και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση στους παθογενετικούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιλογή δείγματος

Ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης ήταν αναδρομικός. Από το αρχείο δειγμάτων ασθενών του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων αναζητήθηκαν μονιμοποιημένα δείγματα διαφόρων παθήσεων του μαστού, τα οποία καλύπτουν ευρύ φάσμα της παθολογίας του οργάνου αυτού. Τα δείγματα αυτά είχαν μονιμοποιηθεί με διάλυμα φορμόλης 10% και είχαν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης. Η αναζήτηση κάλυψε τη χρονική περίοδο 1994-2004. Συνολικά, το δείγμα περιελάμβανε: 190 ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις του μαστού, 60 με αποκλειστικά μη διηθητικό καρκίνωμα (*in situ*), 124 με σποραδικό καρκίνο και 30 με οικογενή τύπο καρκίνου του μαστού. Η τελευταία κατηγορία επιλέχθηκε από το αρχείο μαστού της Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων βάση του οικογενειακού τους ιστορικού και των κριτηρίων που έχουν θεσπιστεί στη βιβλιογραφία και αναφέρονται στο γενικό μέρος της διατριβής.

Ακολούθησε προσεκτική αξιολόγηση όλων των αρχειοθετημένων τομών παραφίνης που ήταν χρωσμένες με αιματοξυλίνη – ηωσίνη, ώστε να επιλεγεί ο ένας και καταλληλότερος κύβος για κάθε ασθενή.

Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν:

- Στις καλοήθεις παθήσεις και στα καρκινώματα *in situ*, περιοχές που να περιλαμβάνουν τόσο επαρκές τμήμα της αλλοίωσης όσο και περίξ φυσιολογικό ιστό.
- Στα κακοήθη νεοπλάσματα, περιοχές που να περιλαμβάνουν επίσης επαρκές τμήμα του όγκου και περίξ φυσιολογικό ιστό, αλλά επιπλέον και καρκίνωμα *in situ*. Στην περίπτωση που αυτό δεν ήταν εφικτό, χρησιμοποιήθηκε και ένας ακόμη κύβος παραφίνης της ίδιας ασθενούς, ο οποίος περιελάμβανε το μη διηθητικό στοιχείο.



Κύβοι που παρουσίαζαν εκτεταμένες περιοχές νέκρωσης ή/και έντονης φλεγμονής απορρίφθηκαν. Οι τομές αιματοξυλίνης – ηωσίνης χρησιμοποιήθηκαν επίσης για την αξιολόγηση του ιστολογικού τύπου και του βαθμού διαφοροποίησης (grade).

Από τον κάθε κύβο παραφίνης κόπηκαν σε μικροτόμο συνεχείς τομές πάχους 4μm η καθεμία και τοποθετήθηκαν σε ειδικά πλακάκια (superfrost) για τη τέλεση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Η σειρά των τομών καταγράφηκε, ώστε αυτές να είναι συνεχόμενες.

Ασθενείς- Κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα- Επιβίωση

Τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα των ασθενών, τα δείγματα των οποίων επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη, συλλέχθηκαν από το αρχείο ιστολογικών εκθέσεων του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, καθώς και από το αρχείο της Ογκολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου. Από το τελευταίο πήραμε και τις πληροφορίες σχετικά με τη σταδιοποίηση και την επιβίωση των ασθενών.

Καταγράφηκε η ηλικία, το είδος της βλάβης και στις κακοήθειες επιπλέον ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός κακοηθείας, το μέγεθος του όγκου, οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, η έκφραση του c-erbB-2, το στάδιο της νόσου, η παρουσία λεμφαδενικών και απομακρυσμένων μεταστάσεων και η μεταθεραπευτική παρακολούθηση των ασθενών, ως αριθμός μηνών μέχρι την τελευταία κλινική εξέταση ή την κλινική κατάληξη. Οι πληροφορίες καταχωρήθηκαν σε αρχείο επεξεργασίας δεδομένων με αριθμητική κωδικοποίηση, ώστε να μη μπορεί να αποκαλυφθεί η ταυτότητα των ασθενών.

Αναλυτικά, τα δεδομένα των ασθενών στις διάφορες κατηγορίες που μελετήθηκαν φαίνονται στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα.



Πίνακας 1. Ασθενείς με καλοήθειες και προκαρκινικές αλλοιώσεις.

	ηλικία	Τύπος αλλοίωσης
Καλοήθειες παθήσεις	25-66	<ul style="list-style-type: none"> • 20 θηλώματα • 10 ινοαδενώματα • 1 πορογενές αδένωμα • 2 αδενώματα θηλής • 1 νεανική θηλωμάτωση • 11 ακτινωτές ουλές • 1 σύνθετη σκληρυντική αλλοίωση • 94 περιστατικά ινοκυστικής νόσου (κύστεις, BDA, UDH, ADH, ALH)
Προκαρκινικές αλλοιώσεις (In situ καρκινώματα)	31-72	<ul style="list-style-type: none"> • 15 συμπαγή • 12 φαγεσωρικά • 8 θηλώδη • 10 ηθμοειδή • 15 λοβιακά

Πίνακας 2. Ασθενείς με οικογενή καρκίνο του μαστού.

ηλικία	28-75 (διάμεσος: 56,27)
Ιστολογικός τύπος	21 πορογενή 9 λοβιακά
Βαθμός διαφοροποίησης (grade)	
• I	4
• II	16
• III	10
Μέγεθος όγκου	1-9 εκ (διάμεσος: 3,36 εκ)
Λεμφαδενικές μεταστάσεις	
• Παρούσες	17
• Απούσες	13
Οιστρογονικοί υποδοχείς	
• Θετικοί	16
• Αρνητικοί	14
Προγεστερονικοί υποδοχείς	
• Θετικοί	13
• Αρνητικοί	17
c-erbB2	



• score 0	15
• score 1	5
• score 2	4
• score 3	6

Πίνακας 3. Ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού.

ηλικία	28-77 (διάμεσος: 55,06)
Ιστολογικός τύπος	84 πορογενή 40 λοβιακά
Βαθμός διαφοροποίησης (grade)	
• I	18
• II	64
• III	42
Μέγεθος όγκου	1-9 εκ (διάμεσος: 3,113 εκ)
Λεμφαδενικές μεταστάσεις	
• Παρούσες	72
• Απούσες	52
Οιστρογονικοί υποδοχείς	
• Θετικοί	70
• Αρνητικοί	54
Προγεστερονικοί υποδοχείς	
• Θετικοί	54
• Αρνητικοί	70
c-erbB2	
• score 0	70
• score 1	14
• score 2	18
• score 3	22

Περιγραφή τεχνικών ανοσοϊστοχημείας

Η ανίχνευση αντιγόνων σε τομές παραφίνης καθίσταται δυνατή εφόσον προσδεθεί στο αντιγόνο το αντίστοιχο του αντίσωμα και ακολούθως σε αυτό προσδεθεί ένας ιστοχημικά γνωστός δείκτης, η χρώση του οποίου αποκαλύπτει εμμέσως την παρουσία του αναζητούμενου αρχικού αντιγόνου [147].



Στην παρούσα μελέτη, η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης και τη χρήση του HRP-EnVision kit της εταιρείας DAKO (Denmark). Τα βασικά από τα βήματα που περιγράφονται ακολούθως (antigen retrieval, συγκέντρωση αντισώματος, χρόνος επώασης) τυποποιήθηκαν για τα δείγματά μας με επανειλημμένες δοκιμές (standarization).

Αναλυτικά, τα βήματα της τεχνικής περιγράφονται παρακάτω:

- Τοποθέτηση των πλακιδίων με τις τομές παραφίνης πάχους 4μm σε κλίβανο θερμοκρασίας 60 ° C για 24 ώρες, ώστε να αποξηρανθούν.
- Αποπαραφίνωση με εμβύθιση των τομών σε ξυλόλη για 20 λεπτά.
- Ενυδάτωση των τομών σε διαδοχικά αραιούμενα (κατιόντα) διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Διαδικασία επεξεργασίας και αποκάλυψης του αναζητούμενου αντιγονικού επιτόπου (**antigen retrieval**): η διαδικασία αυτή ήταν διαφορετική αναλόγως του χρησιμοποιούμενου αντισώματος. Χρησιμοποιήθηκαν βασικά δύο μέθοδοι. Η πρώτη αφορούσε την εμβύθιση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (**citrate buffer**) και την τοποθέτησή τους σε φούρνο μικροκυμάτων στα 300 W, για δύο κύκλους των 15 λεπτών έκαστος. Στη δεύτερη, οι τομές εμβυθίστηκαν σε διάλυμα υψηλού pH (**high pH buffer**) και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων στα 800 W, για δύο κύκλους των 5 λεπτών έκαστος.
- Αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης με την τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ σε απόλυτη μεθανόλη (0.01M) για 30 λεπτά.
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη της κάθε τομής με το αντίστοιχο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση και επώασή του για τον απαιτούμενο χρόνο.
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).
- Επικάλυψη των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα (EnVision/HRP) και επώασή τους για 30 λεπτά σε θάλαμο υγρασίας σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS).



- Εφαρμογή χρωμογόνου (διαμινοβενζιδιντετραϊδροχλωρίδιο- DAB). Έλεγχος των πλακιδίων με τις τομές σε κοινό μικροσκόπιο μέχρις ότου εμφανιστεί η ειδική καφέ χρώση των κυττάρων.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Χρώση των τομών με αιματοξυλίνη Harris για 3 λεπτά.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Αφυδάτωση των τομών σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης σε δοχεία διαδοχικώς αυξανόμενης συγκέντρωσης (ανιόντα).
- Έκπλυση των τομών σε ξυλόλη.
- Επικάλυψη των τομών.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

1. **MHL1**, G 168-15, BIOCARE MED, Walnut Creek, CA, USA, μέθοδος citrate buffer, αραίωση 1:20.
2. **MSH2**, FE-11, BIOCARE MED, Walnut Creek, CA, USA, μέθοδος citrate buffer, αραίωση 1:100.
3. **MSH6**, IgG1 clone 44, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA μέθοδος high pH, αραίωση 1:50.
4. **BRCA1**, IgM clone GLK-2, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA, μέθοδος high pH, αραίωση 1:25.
5. **Podoplanin**, ευγενική προσφορά Dr S. Geleff, μέθοδος citrate buffer, αραίωση 1:2000.



Μέθοδος αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών έγινε σε όλες τις περιπτώσεις από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους, οι οποίοι δε γνώριζαν εκ των προτέρων τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα και την έκβαση των ασθενών (blind). Τυχόν διαφορές στην αξιολόγηση συζητήθηκαν και τα αμφιλεγόμενα πλακίδια επανεκτιμήθηκαν από κοινού.

Οι μέθοδοι μέτρησης της έκφρασης παρουσιάζονται αναλυτικότερα παρακάτω:

- **Πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA.** Εκτιμήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση τριών πρωτεϊνών: *hMLH1*, *hMSH2* και *hMSH6*. Η χρώση είναι πυρηνική και η έντασή της βαθμολογήθηκε με τριβάθμιο σύστημα: απουσία χρώσης = 0, ασθενώς θετική = 1, μετρίως θετική = 2 και έντονα θετική = 3. Ο βαθμός ανοσοαντίδρασης των θετικών κυττάρων αξιολογήθηκε βάση του ακόλουθου συστήματος, το οποίο στηρίζεται στο ποσοστό των κυττάρων στα οποία παρατηρείται έκφραση της πρωτεΐνης : 0 = 0-5%, 1 = 5-20%, 2 = 20- 80% και 3 = 80- 100%. Κατόπιν, δημιουργήσαμε έναν συνδυαστικό δείκτη ανοσοαντίδρασης (immunoreactivity score, IS) πολλαπλασιάζοντας το βαθμό αντίδρασης με το βαθμό έντασης. Ο δείκτης αυτός θεωρήθηκε θετικός σε τιμές > 4.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ο λόγος που επιλέχθηκε το συγκεκριμένο σύστημα. Τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και οι πρωτεΐνες τους αποτελούν ένα σχετικά νέο πεδίο της μοριακής βιολογίας του καρκίνου και ιδιαίτερα του καρκίνου του μαστού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφωνία μεταξύ των ερευνητών σχετικά με τη μέθοδο αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων. Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε η μέθοδος που χρησιμοποιεί η πλειοψηφία των σχετικών μελετών. Επιπλέον, προκειμένου να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα λόγω τεχνικών λαθών, σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικοί μάρτυρες.

- **Πρωτεΐνη BRCA1.** Αντίστοιχος δείκτης ανοσοαντίδρασης επιλέχθηκε και για τη μέτρηση της έκφρασης της πρωτεΐνη BRCA1. Και στην περίπτωση αυτή, για την επιλογή της μεθόδου στηριχθήκαμε στη βιβλιογραφία και χρησιμοποιήσαμε εσωτερικούς μάρτυρες.



- **Ποδοπλανίνη.** Ο δείκτης αυτός θεωρείται ειδικός για την ανίχνευση λεμφαγγείων. Για την αξιολόγησή του χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά Weidner. Συγκεκριμένα, σε κάθε τομή αναγνωρίστηκαν σε μικρή μεγέθυνση ($\times 40$) τρεις περιοχές με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λεμφαγγείων (hot spots). Ακολούθως τα αγγεία καταμετρήθηκαν σε μεγάλη μεγέθυνση ($\times 400$) και ο αριθμός τους διαιρέθηκε διά του 3. Το αποτέλεσμα που προέκυψε αντιστοιχούσε στη λεμφαγγειακή πυκνότητα ανά οπτικό πεδίο (με το εμβαδόν του πεδίου να ισούται με 0.7386 mm^2). Συνήθως στα καταμετρούμενα μικροαγγεία, ο αυλός ήταν ορατός, αυτό όμως δεν ήταν απαραίτητη προϋπόθεση για την καταμέτρησή τους. Αρκούσε μόνο η θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη. Η μέση τιμή (mean) της λεμφαγγειακής πυκνότητας χρησιμοποιήθηκε ως κατώφλι (cut-off) για το διαχωρισμό των όγκων με υψηλή ($\geq \text{mean}$) και χαμηλή πυκνότητα ($< \text{mean}$). Η μέση αυτή τιμή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το **12**.

Καταγράφηκε η λεμφαγγειακή πυκνότητα τόσο στην εντός περιοχή του όγκου (intratumoral lymphatic density, ILD) όσο και σε απόσταση τουλάχιστον 5mm πέρα από τον όγκο- φυσιολογικού ιστού (peritumoral lymphatic density, PLD). Επιπλέον, σημειώθηκε η ύπαρξη νεοπλασματικών εμβόλων στα εντός και εκτός του όγκου λεμφαγγεία (intratumoral lymphatic invasion, ILI και peritumoral lymphatic invasion, PLI).

Στατιστική αξιολόγηση

Η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης ποσοτικοποιήθηκε με τους τρόπους που περιγράφησαν προηγουμένως και τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το εάν υπερέκφραζαν ή όχι τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Η ομαδοποιημένη πλέον ποσοτική έκφραση της κάθε πρωτεΐνης εισήχθη σε πίνακες 2x2 μαζί με τους λοιπούς κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες και η συσχέτιση τους έγινε με τη δοκιμασία chi-square (χ^2) κατά Pearson και με το Fisher- exact test. Για τη συσχέτιση των κατηγοριοποιημένων μεταβλητών με ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία One-way Anova [148].



Ως προς την προγνωστική αξία της έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης, η αξιολόγηση έγινε με τη μέθοδο Kaplan- Meier και το log-rank test. Σχεδιάστηκαν οι καμπύλες Kaplan- Meier, οι οποίες δείχνουν την πιθανότητα για ένα μέλος καθεμιάς από τις συγκρινόμενες ομάδες ασθενών να μην έχει εκδηλώσει την εξεταζόμενη έκβαση μετά από συγκεκριμένη διάρκεια παρακολούθησης [148].

Καθένας από τους παράγοντες με πιθανή προγνωστική σημασία (τόσο κλινικοί όσο και ανοσοϊστοχημικοί) εξετάστηκε επίσης ξεχωριστά σε μονοπαραγοντικό μοντέλο. Όσοι από τους παραπάνω παράγοντες βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την κλινική έκβαση εισήλθαν σε πολυπαραγοντικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox (Cox logistic regression) για να βρεθούν οι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες.

Όλες οι στατιστικές δοκιμασίες θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αν η τιμή του p ήταν μικρότερη του 0.05 ($p < 0.05$). Οι παρουσιαζόμενες τιμές p είναι αμφίπλευρες (two-tailed).

Για την εκτέλεση των στατιστικών δοκιμασιών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα ανάλυσης SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Προβλήματα αξιολόγησης προγνωστικών παραγόντων

Οι μελέτες προγνωστικών παραγόντων σε ασθενείς με κακοήθεις νεοπλασίες παρουσιάζουν μία σειρά από προβλήματα που καθιστούν δύσκολη την αξιολόγηση και τη σύνθεση των αποτελεσμάτων τους. Τέτοια είναι το μέγεθος του δείγματος, οι διαφορετικές συνθήκες εκτέλεσης των πειραμάτων, η έλλειψη λεπτομερούς περιγραφής των συνθηκών αυτών, η χρήση διαφορετικών αντισωμάτων κ.ά [149]. Παρατηρείται επίσης επιλεκτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων εκ μέρους των συγγραφέων (selective reporting), ώστε να τονίζονται τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. Επίσης γίνεται επιλογή της τιμής κατωφλιού (cut-off), ώστε να αποδίδει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις [150,151].

Για τους λόγους αυτούς επιλέχθησαν τα cut-off που χρησιμοποιεί η πλειοψηφία των μελετών, καθώς και η overall survival όχι η cause-specific mortality, η οποία αποτελεί "μαλακότερη" έκβαση και ενέχει μεγαλύτερο κίνδυνο σφάλματος ταξινόμησης των ασθενών.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Καλοήθειες παθήσεις και προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού

Καλοήθειες παθήσεις

Δεν παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε καμία από τις περιπτώσεις καλοήθων παθήσεων που μελετήθηκαν και περιελάμβαναν θηλώματα, αδενώματα, ινοαδενώματα, ακτινωτές ουλές, σύνθετες σκληρυντικές αλλοιώσεις και ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων ινοκυστικής μαστοπάθειας.

Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην εκτίμηση της έκφρασης των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2 και hMSH6 στην άτυπη πορογενή υπερπλασία (atypical ductal hyperplasia, ADH) και στην άτυπη λοβιακή υπερπλασία (atypical lobular hyperplasia, ALH), για το λόγο ότι οι καταστάσεις αυτές θεωρείται ότι αυξάνουν την πιθανότητα ανάπτυξης νεοπλασματικής νόσου του μαστού, αλλά οι παθογενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί.

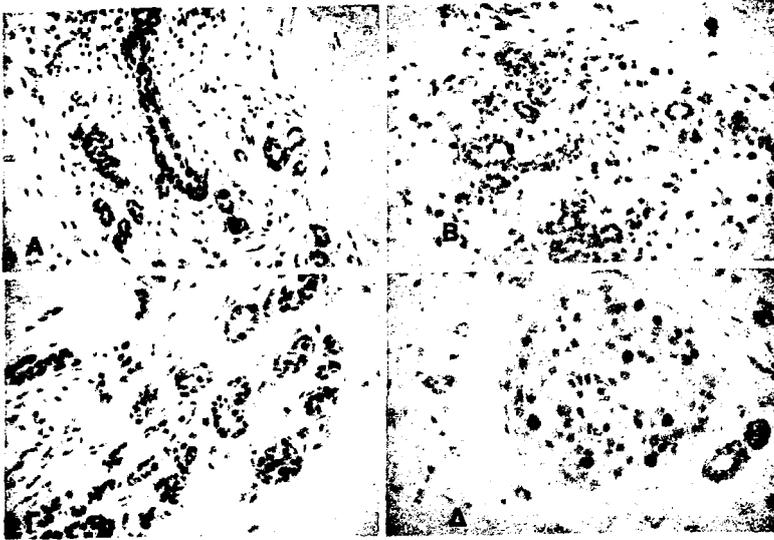
Το δείγμα που ελέγχθηκε ήταν αρκετά μεγάλο και ικανοποιητικό για την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA δε φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των παθήσεων αυτών του μαστού, ούτε στην εξέλιξη της απλής επιθηλιακής υπερπλασίας σε άτυπη, πορογενή ή λοβιακή, κατάσταση για την οποία πιθανολογούνται άλλοι παθογενετικοί μοριακοί μηχανισμοί, οι οποίοι αναφέρθηκαν στο γενικό μέρος της παρούσας μελέτης.

Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνεται η έκφραση των πρωτεϊνών στο φυσιολογικό μαστό και σε ορισμένες καλοήθειες καταστάσεις (Εικόνα 1).

Εικόνα 1. Α) Έκφραση της πρωτεΐνης HMLH1 σε φυσιολογικό μαζικό ιστό. Β) Έκφραση της πρωτεΐνης HMSH2 και Γ) Έκφραση της πρωτεΐνης HMSH6 σε αδένωση. Δ) Έκφραση της πρωτεΐνης HMSH2 σε άτυπη υπερπλασία του μαστού (x200).





Προκαρκινικές αλλοιώσεις (in situ καρκίνωμα)

Μελετήθηκαν 60 περιπτώσεις μη διηθητικού καρκινώματος (in situ): 15 συμπαγούς τύπου, 12 φαγεσωρικού, 10 ηθμοειδούς, 8 θηλώδους και 15 λοβιακού.

Σε όλες τις περιπτώσεις in situ καρκινώματος που μελετήθηκαν, η χρώση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, hMLH1, hMSH2 και hMSH6 ήταν πυρηνική τόσο στα νεοπλασματικά κύτταρα όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες. Έκφραση των πρωτεϊνών παρατηρήθηκε στο φυσιολογικό επιθήλιο του μαζικού αδένα, στα στρωματικά κύτταρα και στα λεμφοκύτταρα, καθώς και στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία διατηρούνται στα μη διηθητικά καρκινώματα.

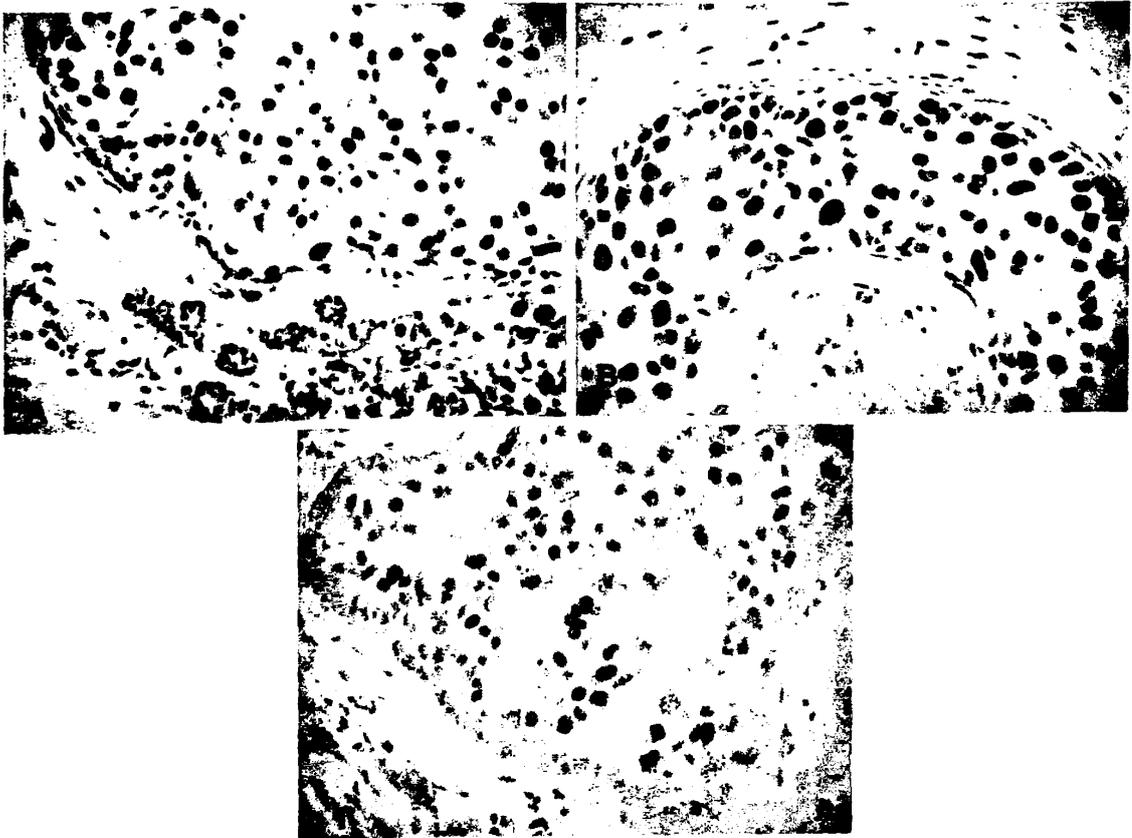
Πυρηνική έκφραση των εξεταζόμενων πρωτεϊνών παρατηρήθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% των νεοπλασματικών κυττάρων των περιστατικών που μελετήθηκαν. Η παρουσία και η ένταση της ανοσοαντίδρασης και των τριών αντισωμάτων ήταν συγκρίσιμη με αυτή των παρακείμενων μη-νεοπλασματικών κυττάρων σε 57 περιπτώσεις.



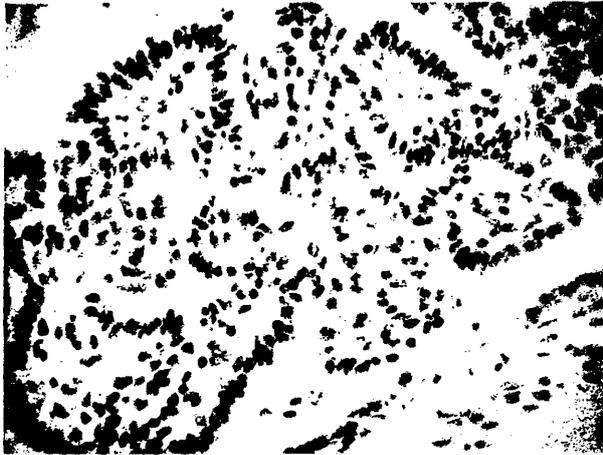
Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση μεταξύ των διαφόρων ιστολογικών τύπων και την ιστολογικής διαβάθμισης των *in situ* καρκινωμάτων (χαμηλού-ενδιάμεσου-υψηλού πυρηνικού βαθμού κακοηθείας, low-intermediate-high nuclear grade). (Εικόνα 2 Α, Β, Γ).

Η μοναδική διαφορά ήταν σε τρεις περιπτώσεις πορογενούς καρκινώματος, θηλώδους τύπου, όπου παρατηρήθηκε εντονότερη ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη hMSH2, πάντα σε σύγκριση με το παρακείμενο φυσιολογικό παρέγχυμα (Εικόνα 3). Δε συνέβη το ίδιο και με τις πρωτεΐνες hMLH1 και hMSH6, των οποίων η ένταση ήταν παρόμοια με τα φυσιολογικά στοιχεία του μαστού.

Συμπερασματικά, δεν αναδείχθηκε απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, hMLH1, hMSH2 και hMSH6 στα καρκινώματα *in situ*.



Εικόνα 2. Α) Έντονη έκφραση της πρωτεΐνης hMLH1 σε πορογενές in situ καρκίνωμα, ηθμοειδούς τύπου, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στο παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Β) Διατήρηση της πρωτεΐνης hMSH2 σε πορογενές in situ καρκίνωμα, φαγεσωρικού τύπου. Γ) Έντονη πυρηνική χρώση της πρωτεΐνης hMSH6 σε πορογενές in situ καρκίνωμα, ηθμοειδούς τύπου (x400).



Εικόνα 3. Θηλώδες καρκίνωμα in situ, το οποίο εμφανίζει εντονότερη πυρηνική χρώση της πρωτεΐνης hMSH2 σε σύγκριση με τη χρώση των μυοεπιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων που φαίνονται στο κάτω δεξιό μέρος της φωτογραφίας (x400).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μελέτες που υπάρχουν πάνω στο ρόλο του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στις προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού είναι ελάχιστες. Ως αποτέλεσμα, δεν έχει γίνει ακόμη ξεκάθαρο σε ποιο στάδιο της καρκινογένεσης εκδηλώνεται η μικροδορυφορική αστάθεια [152,153]. Τα στοιχεία που υπάρχουν πάνω στον καρκίνο του παχέος εντέρου δείχνουν ότι υπάρχει υψηλή συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης μικροδορυφορικής αστάθειας και της απώλειας έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης (κυρίως των hMLH1 και hMSH2), όπως αυτή καταδεικνύεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους [154-155].

Σε προηγούμενες μελέτες, οι συγγραφείς δεν παρατήρησαν απώλεια της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης σε καρκινώματα in situ, ακόμη και στις περιπτώσεις στις οποίες



αναγνωρίστηκε μικροδορυφορική αστάθεια. Τα αποτελέσματα συνηγορούν στο γεγονός ότι η μικροδορυφορική αστάθεια στις προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού προκαλείται μέσω διαφορετικών μηχανισμών σε σχέση με τις αντίστοιχες αλλοιώσεις και τον καρκίνο που αναπτύσσονται στο παχύ έντερο [156]. Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 σε ασθενείς με πορογενές μη διηθητικό καρκίνωμα, οι οποίοι έφεραν μετάλλαξη του γονιδίου BRCA2 [157]. Γενικά, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι τα ελαττώματα στο σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA με συνοδό μείωση ή/ και απώλεια της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών είναι σπάνια συμβάματα στα μη διηθητικά καρκινώματα του μαστού.

Στον αντίλογο όμως, άλλοι συγγραφείς αναφέρουν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο hMLH1 μπορεί να αποτελούν το παθογενετικό υπόβαθρο του λοβιακού μη διηθητικού καρκινώματος [158,159]. Επιπλέον, μία μελέτη αναφέρει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης hMSH2 μειώνεται κατά την εξέλιξη του *in situ* σε διηθητικό καρκίνωμα. Εντύπωση προκαλεί ότι στην ίδια μελέτη, η αύξηση της ίδιας πρωτεΐνης σχετίζεται με υψηλότερο πυρηνικό βαθμό κακοηθείας και αυξημένο δείκτη πολλαπλασιασμού [160,161].

Στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε απώλεια σε καμία από τις τρεις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν (hMLH1, hMSH2 και hMSH6) στα *in situ* καρκινώματα μαστού, στα οποία συμπεριλήφθησαν διάφοροι ιστολογικοί τύποι με ποικιλία στον πυρηνικό βαθμό κακοηθείας τους. Είναι πιθανόν ότι οι πρωτεΐνες που ανιχνεύονται ανοσοϊστοχημικά να χάνουν τη λειτουργικότητά τους μέσω επιγενετικών αλλαγών. Επίσης, άλλη μία υπόθεση που μπορούμε να κάνουμε είναι ότι πιθανόν να εμπλέκονται άλλα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, πλην του MMR συστήματος, προκαλώντας έτσι τη μικροδορυφορική αστάθεια που παρατηρείται σε ένα ποσοστό *in situ* καρκινωμάτων.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι η αύξηση της έντασης της χρώσης της hMSH2 στα *in situ* θηλώδη καρκινώματα. Γνωρίζοντας ότι οι θηλώδεις αλλοιώσεις εμφανίζουν ιδιαίτερα μορφολογικά στοιχεία, είναι πιθανόν το εύρημα αυτό να αποτελεί άλλο ένα στοιχείο του μοναδικού τους προφίλ διαφοροποίησης. Φυσικά, απαιτούνται περαιτέρω μοριακές μελέτες προκειμένου να καταλήξουμε σε αποδεδειγμένα συμπεράσματα.



2. Οικογενής καρκίνος του μαστού

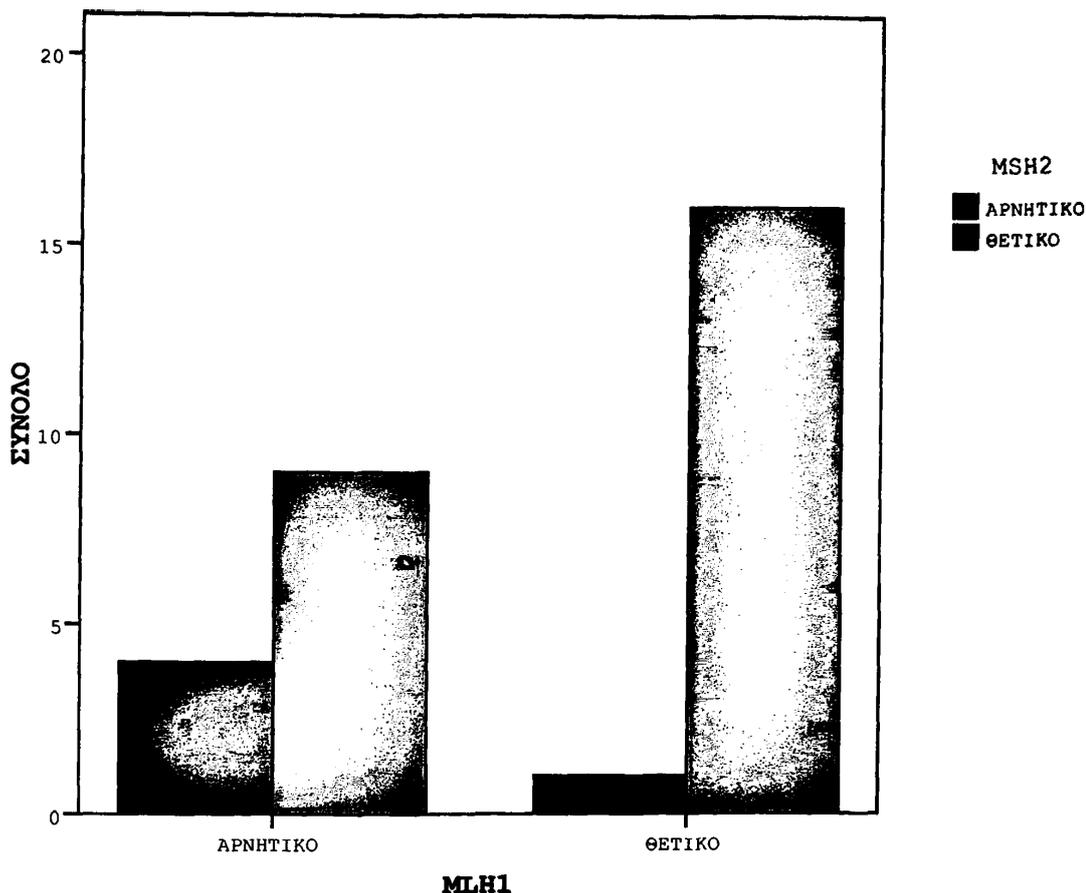
Μελετήθηκαν, όπως αναφέρθηκε, 30 περιστατικά οικογενούς καρκίνου του μαστού. Παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 σε 13 από αυτά (43,3%), της πρωτεΐνης hMSH2 σε 5 (16,7%) και της πρωτεΐνης hMSH6 σε 14 (46,7%). Ακολουθούν κάποιες αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες με φυσιολογική και μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Φυσιολογική έκφραση των hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε πορογενές (Α), λοβιακό (Β) και θηλώδες καρκίνωμα (Γ). Απώλεια της έκφρασης των hMLH1 και hMSH2 (Δ, Ε) (x200).

Επιπλέον, 4 καρκινώματα εμφάνισαν παράλληλη απώλεια της έκφρασης για τις hMLH1 και hMSH2, 6 για τις hMLH1 και hMSH6 και 3 για τις hMSH2 και hMSH6.

Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των hMLH1 και hMSH2, καθώς και μεταξύ των hMSH2 και hMSH6 ($p < 0.05$). Στο παρακάτω διάγραμμα φαίνεται η κατανομή των hMLH1 και hMSH2.



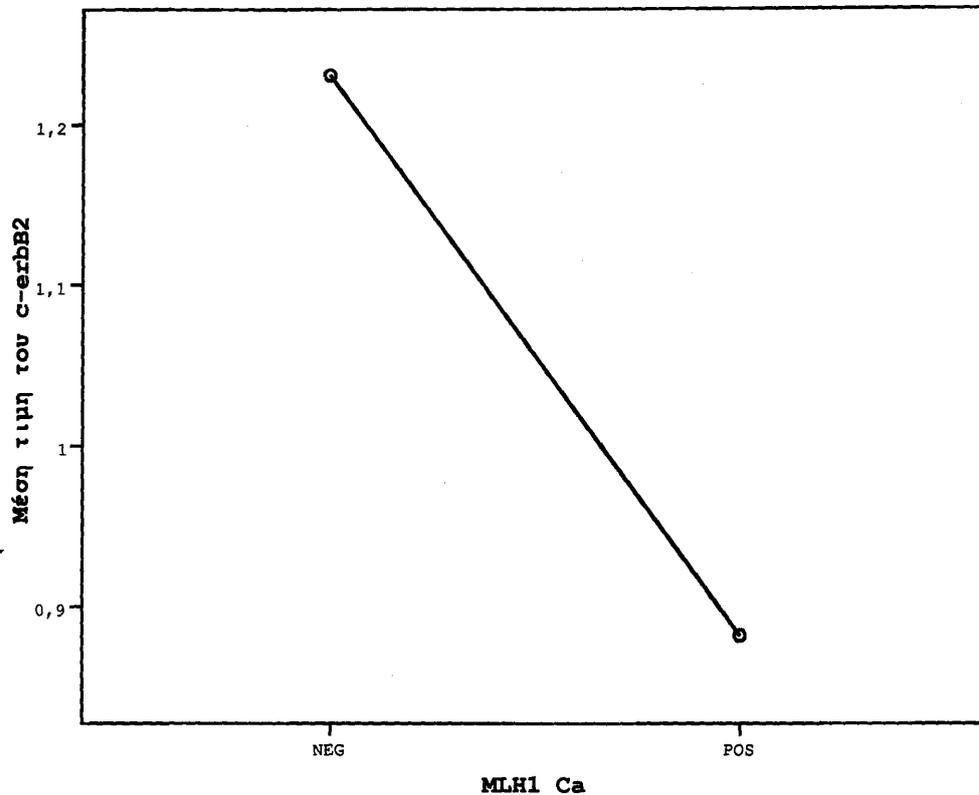
Διάγραμμα 1. Συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών MLH1 και MSH2.

Αναλυτικότερα, οι συσχετίσεις για κάθε πρωτεΐνη:

1. hMLH1. Η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης δε σχετιζόταν με την ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου και την ύπαρξη ή όχι λεμφαδενικών μεταστάσεων. Επιπλέον, δε βρέθηκε οποιαδήποτε συσχέτιση με το στάδιο της νόσου.

Αντίθετα, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικά συσχέτιση της απώλειας της πρωτεΐνης hMLH1 με τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, το οιστρογονικό προφίλ, καθώς και την έκφραση του c-erbB-2. Συγκεκριμένα, μείωση της hMLH1 παρατηρήθηκε συχνότερα στα πορογενή καρκινώματα σε σχέση με τα λοβιακά (χ^2

$p=0.022$), σε όγκους με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας ($\chi^2 p=0.027$), στις περιπτώσεις με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς ($\chi^2 p=0.02$) και σε όγκους που υπερέκφραζαν το δείκτη c-erbB-2 ($\chi^2 p=0.016$) (Διάγραμμα 2).



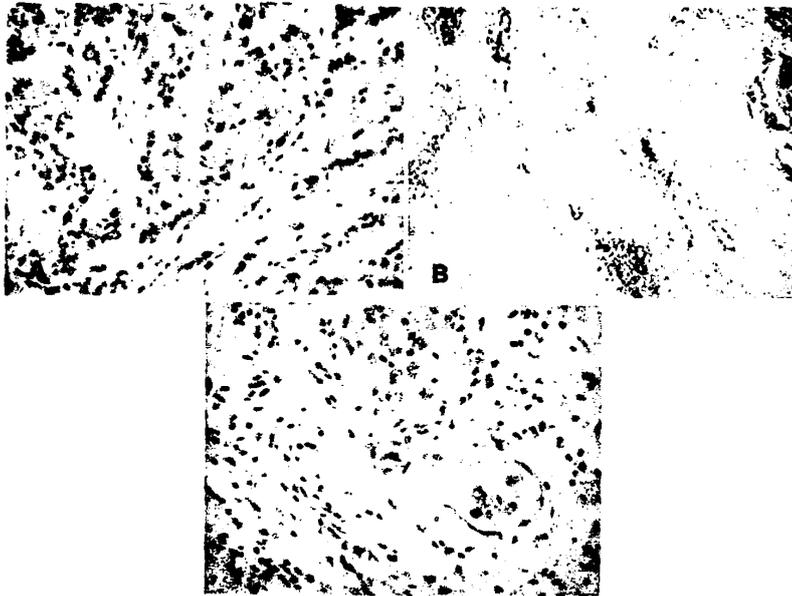
Διάγραμμα 2. Σχέση της έκφρασης της hMLH1 με το c-erbB-2. (NEG= αρνητικό, POS= θετικό)

Αν και δεν ήταν στατιστικά σημαντικό, παρατηρήθηκε επίσης μία τάση συσχετισμού μεταξύ της απώλειας της πρωτεΐνης hMLH1 και της πρωτεΐνης BRCA1 ($\chi^2 p=0.068$).

Τέλος, τα καρκινώματα στα οποία δεν εκφραζόταν η hMLH1 παρατηρήθηκε αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα τόσο εντός όσο και εκτός του όγκου, καθώς και αυξημένη ενδοογκική λεμφαγγειακή διήθηση ($\chi^2 p=0.001$) (Εικόνα 5). Δεν παρατηρήθηκε αύξηση των νεοπλασματικών εμβόλων στην περίξ του όγκου περιοχή. Αυτό ίσως να εξηγεί και το γεγονός ότι η μείωση της hMLH1 δε φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων, αφού τα νεοπλασματικά έμβολα εκτός του όγκου θεωρούνται υπεύθυνα και όχι αυτά εντός του όγκου. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα, σύμφωνα με τα οποία βρήκαμε στατιστικά σημαντική θετική



συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης λεμφαδενικών μεταστάσεων, της ύπαρξης νεοπλασματικών εμβόλων στα λεμφαγγεία περίξ του όγκου (χ^2 $p=0.004$) και της αυξημένης λεμφαγγειακής πυκνότητας εντός του όγκου (χ^2 $p=0.043$).

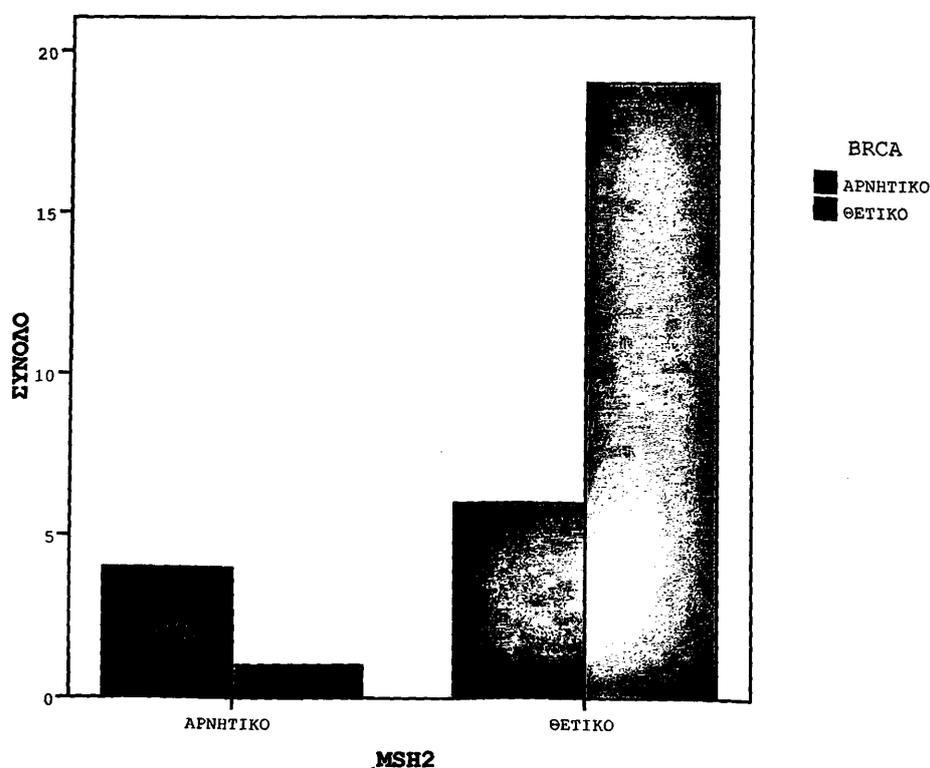


Εικόνα 5. Α) Μειωμένη έκφραση της hMLH1 (x400). Β) Αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα περίξ του όγκου (x100). Γ) Νεοπλασματικά έμβολα εντός του όγκου (x400).

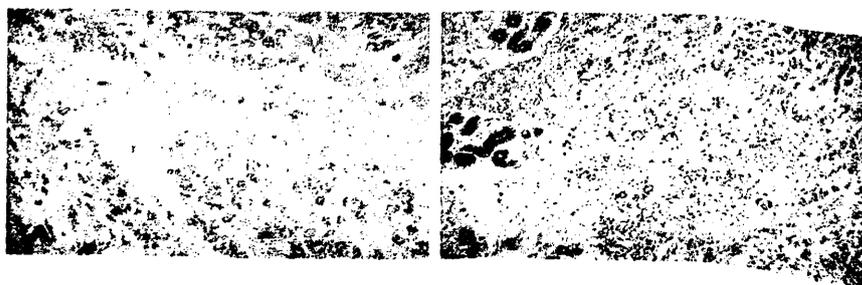
2. hMSH2. Τα αποτελέσματα της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής εμφάνισαν ουσιαστικές ομοιότητες, αλλά και διαφορές. Παρατηρήθηκαν οι ίδιες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της απώλειας της έκφρασης της hMSH2 με τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, το οιστρογονικό προφίλ, την έκφραση του c-erbB-2, τη λεμφαγγειακή πυκνότητα και την παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων εντός και εκτός του όγκου, ενώ δεν υπήρξε συσχέτιση με την ηλικία, το μέγεθος του όγκου και το στάδιο της νόσου.

Οι διαφορές όμως ήταν στην παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και την έκφραση του BRCA1. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ισχυρή στατιστικά συσχέτιση μεταξύ της μείωσης της hMSH2 και της παρουσίας λεμφαδενικών μεταστάσεων (χ^2 $p=0.001$), καθώς και της μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης BRCA1 σε ποσοστό 33,3% των

περιστατικών (χ^2 $p=0.015$) (Διάγραμμα 3 και εικόνα 6). Η μείωση της τελευταίας σχετίζεται με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπερέκφραση του c-erbB-2 και αυξημένη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων ($r = -0.333$, $p=0.015$), δηλαδή με επιθετικότερους κλινικά όγκους.



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών MSH2 και BRCA1.

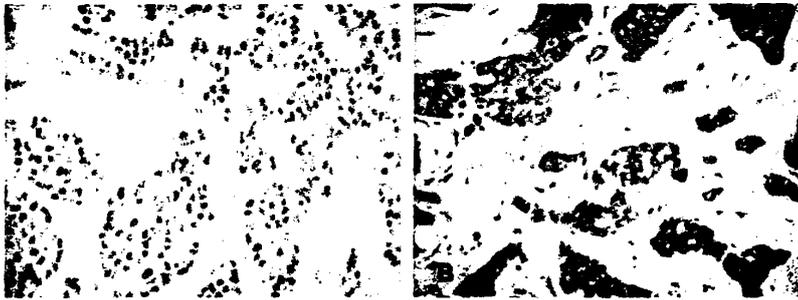


Εικόνα 6. Απώλεια της HMLH2 και της BRCA1. Στη δεύτερη φωτογραφία παρατηρείται η φυσιολογική έκφραση της BRCA1 σε παρακείμενα μη νεοπλασματικά λόβια. ($\times 400$ και $\times 100$ αντίστοιχα).

3. hMSH6. Η τρίτη αυτή πρωτεΐνη παρουσιάζει τις λιγότερες συσχετίσεις με τις λοιπές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας ($p=0.027$) και με την έκφραση του c-erbB-2 ($p=0.016$) και θετική συσχέτιση με την έκφραση της hMSH2 ($p=0.001$).

Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την ηλικία, το μέγεθος του όγκου, το στάδιο, τους οιστρογονικούς υποδοχείς, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και την ύπαρξη εμβόλων πέριξ του όγκου.

Επιπλέον, αν και μη στατιστικά σημαντική υπήρχε μία τάση συσχέτισης με την πρωτεΐνη BRCA1 ($\chi^2 p=0.068$) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διατήρηση της έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών hMSH6 (A) και BRCA1 (B) σε πορογενές καρκίνωμα μαστού.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν καμπύλες Kaplan-Meier προκειμένου να αξιολογηθεί αν οι εξεταζόμενες πρωτεΐνες σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των hMLH1, hMSH2, hMSH6 και BRCA1 και της επιβίωσης. Βέβαια, πρέπει να τονίσουμε ότι το δείγμα ήταν πολύ μικρό για την εξαγωγή σίγουρων αποτελεσμάτων σχετικά με την πρόγνωση.

Συμπερασματικά, η απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στον οικογενή καρκίνο του μαστού σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας, αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπερέκφραση του c-erbB-2, αύξηση της

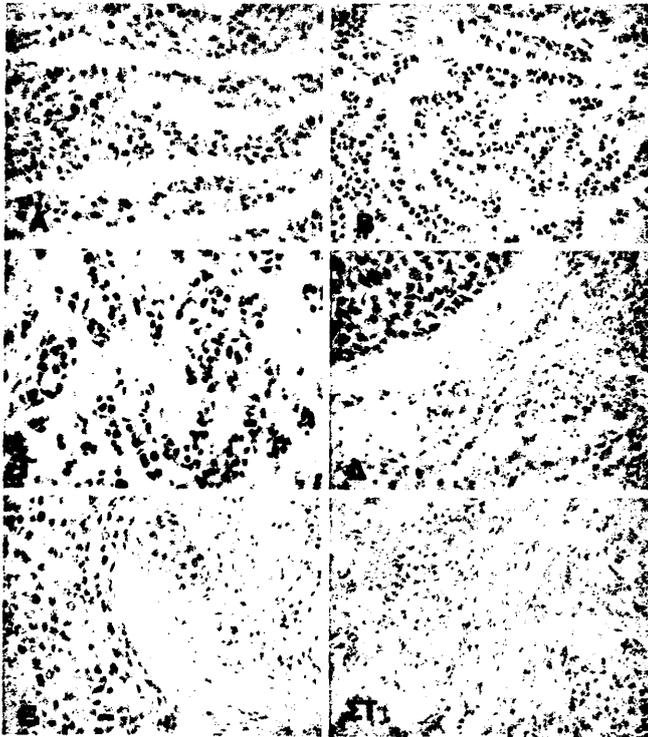


εμφάνισης μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, αύξηση των νεοπλασματικών εμβόλων και απώλεια της BRCA1 πρωτεΐνης, η οποία θεωρείται ότι χαρακτηρίζει επιθετικότερους όγκους. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά αυτά στοιχεία μεταβάλλουν την πρόγνωση, καθώς και τον τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας των ασθενών.

3. Σποραδικός καρκίνος του μαστού

Εξετάσθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA σε 124 περιστατικά σποραδικού καρκίνου. Παρατηρήθηκε μείωση/απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 σε 50 καρκινώματα (40,3%), της hMSH2 σε 26 (21%) και της hMSH6 σε 64 (51,6%).

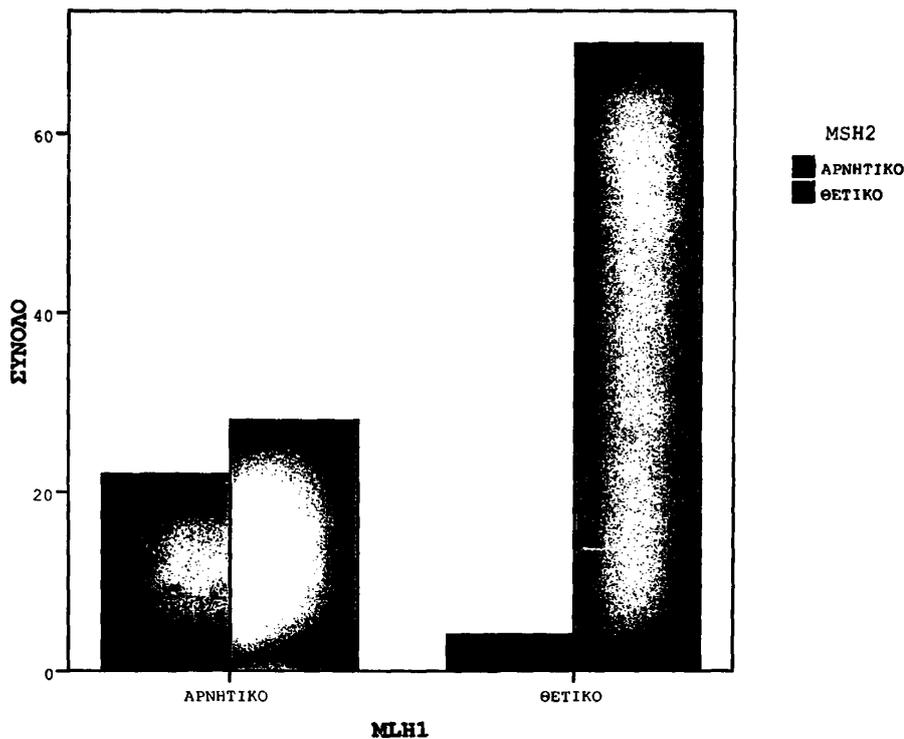
Στην εικόνα 8 παρουσιάζονται κάποιες χαρακτηριστικές φωτογραφίες με φυσιολογική και μειωμένη έκφραση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 8. Έκφραση των πρωτεϊνών hMLH1 (A), hMSH2 (B) και hMSH6 (Γ) σε διάφορα καρκινώματα μαστού. Μειωμένη ανοσοχρώση για την hMLH1 (Δ) και την hMSH2 (Ε). Το παρακείμενο μη διηθητικό (in situ) στοιχείο δεν εμφανίζει μεταβολές στην έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Σχεδόν πλήρης απώλεια της πρωτεΐνης hMSH6 (ΣΤ) (x 400).

Παρατηρήθηκε ισχυρή θετική στατιστική συσχέτιση μεταξύ των τριών πρωτεϊνών: hMLH1-hMSH2 $p= 0.001$ (Διάγραμμα 4), hMLH1-hMSH6 $p= 0.028$ και hMSH2-hMSH6 $p= 0.049$.

Επιπλέον, 32 καρκινώματα (ποσοστό 25,8%) εμφάνισαν παράλληλη απώλεια των hMLH1-hMSH6, 22 (ποσοστό 17,75%) των hMLH1-hMSH2 και 18 (ποσοστό 14,5%) των hMSH2-hMSH6.



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση των πρωτεϊνών MLH1 και MSH2.

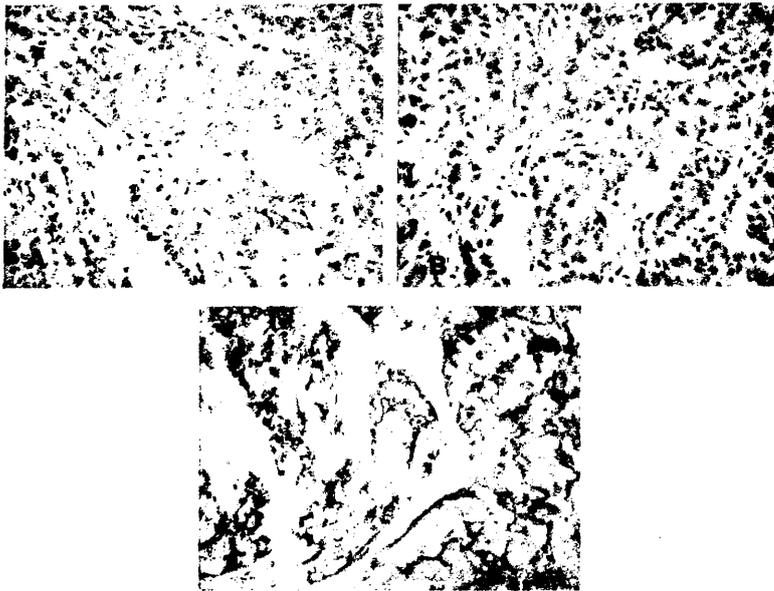
Τα αποτελέσματα τα οποία παρατηρήθηκαν για κάθε έναν από τους εξεταζόμενους δείκτες είναι τα εξής:

1. **hMLH1.** Σχετικά με την απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με την ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου και την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Αντίθετα, παρατηρήθηκε ισχυρή στατιστική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (χ^2 $p=0.045$) και τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Συγκεκριμένα,



μείωση/απώλεια της hMLH1 παρατηρήθηκε σε καρκινώματα υψηλού ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (grade) και σε όγκους με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (χ^2 $p=0.045$) (Εικόνα 9 Α,Β). Δε σημειώθηκε η ίδια συσχέτιση με τους προγεστερονικούς υποδοχείς και την έκφραση του c-erbB-2 (Εικόνα 9 Γ). Αν και δεν ήταν απολύτως στατιστικά σημαντικό, τα καρκινώματα λοβιακού τύπου διατηρούσαν σε μεγαλύτερο ποσοστό τη φυσιολογική έκφραση της πρωτεΐνης hMLH1 (χ^2 $p=0.094$) σε σχέση με τα καρκινώματα πορογενούς τύπου.

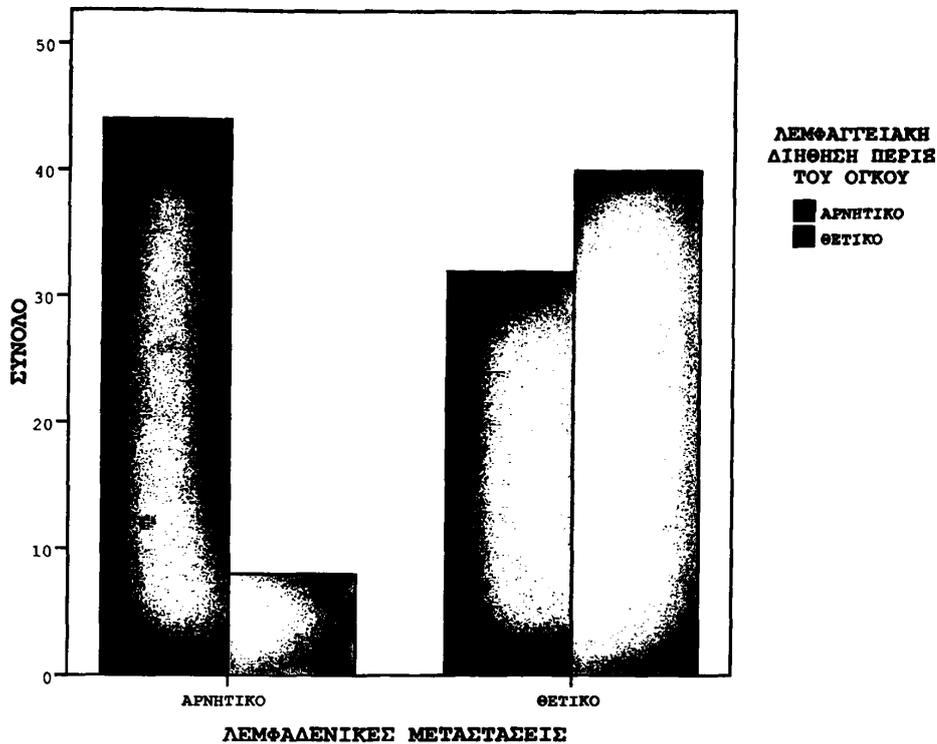


Εικόνα 9. Απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 σε πορογενές καρκίνωμα βαθμού κακοηθείας (grade) III (Α) με παράλληλη απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (Β). Το score της έκφρασης του c-erbB-2 είναι 3+ (πλήρης μεμβρανική χρώση) (Γ). (x 400)

Οι λεμφαγγειακοί δείκτες δεν φάνηκε να συσχετίζονται με την απώλεια ή μη της hMLH1, όπως παρατηρήθηκε στα περιστατικά οικογενούς καρκίνου, πλην της λεμφαγγειακής διήθησης εντός του όγκου (ILI). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι ο στατιστικός έλεγχος έδειξε ότι στο σποραδικό καρκίνο του μαστού, η εμφάνιση λεμφαδενικών μεταστάσεων συσχετίζεται θετικά με την αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα πέριξ και εντός του όγκου (χ^2 $p=0.001$ και χ^2 $p=0.014$, αντίστοιχα) και τη



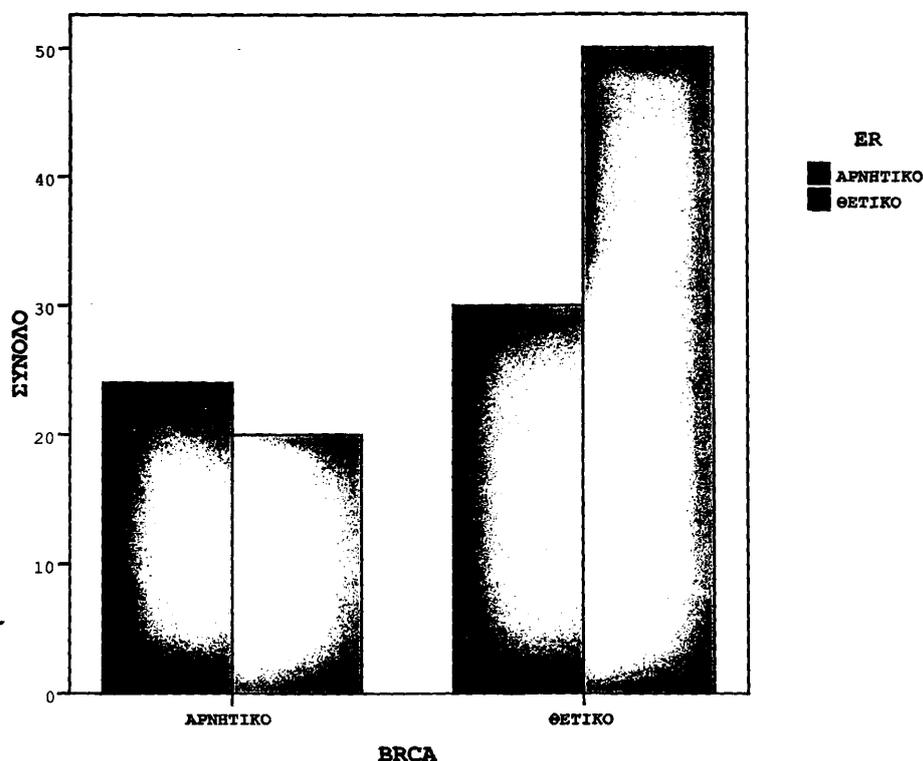
διήθηση λεμφαγγείων στην περιφέρεια του όγκου, αλλά όχι και εντός αυτού (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Σχέση της λεμφαγγειακής διήθησης στην περιφέρεια του όγκου με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Τέλος, θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε και μεταξύ των πρωτεϊνών hMLH1 και BRCA1 (χ^2 $p=0.022$). Απώλεια της πρωτεΐνης BRCA1 παρουσίασαν 44 καρκινώματα (ποσοστό 35,5%) των περιστατικών που εξετάστηκαν. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των αποτελεσμάτων του οικογενούς καρκίνου του μαστού, απώλεια/μείωση της BRCA1 παρατηρήθηκε κυρίως σε περιστατικά με απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (χ^2 $p=0.01$) (Διάγραμμα 6) και παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (χ^2 $p=0.003$), δηλαδή σε επιθετικότερους όγκους. Σε αντίθεση όμως με την προηγούμενη κατηγορία, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με την έκφραση του c-erbB-2, ενώ φαίνεται ότι οι νεότερες

ασθενείς έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκινώματα με απώλεια/ μείωση έκφρασης της πρωτεΐνης BRCA1 (χ^2 $p=0.05$).



Διάγραμμα 6. Σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης BRCA1 με τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER)

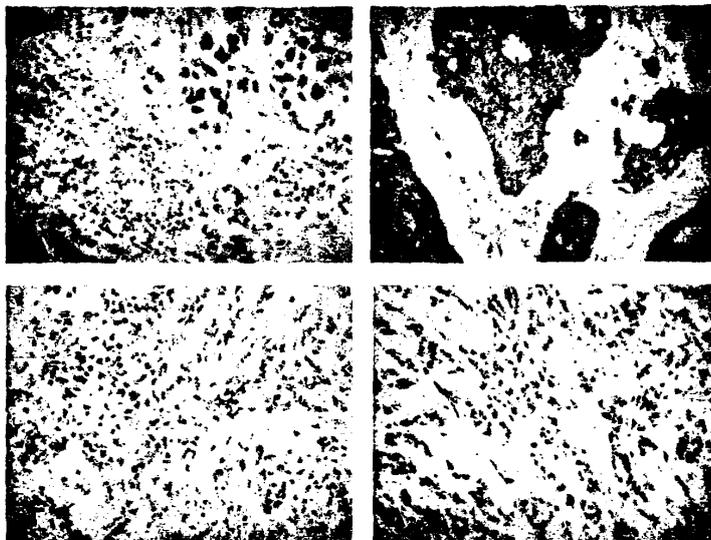
2. hMSH2. Η έκφραση της πρωτεΐνης hMSH2 δεν εμφάνισε διαφορές μεταξύ των διαφόρων ηλικιακών ομάδων, το μέγεθος και τον ιστολογικό τύπο του όγκου, καθώς και το στάδιο της νόσου.

Όπως και με την πρωτεΐνη hMLH1, παρατηρήθηκε ισχυρή στατιστική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (grade), με τους οιστρογονικούς υποδοχείς και με την έκφραση της πρωτεΐνης BRCA1 (χ^2 $p=0.001$) (Εικόνα 10). Σε αντίθεση, υπήρξε αρνητική συσχέτιση με την έκφραση του c-erbB-2 ($r=-0.077$, $p=0.001$).

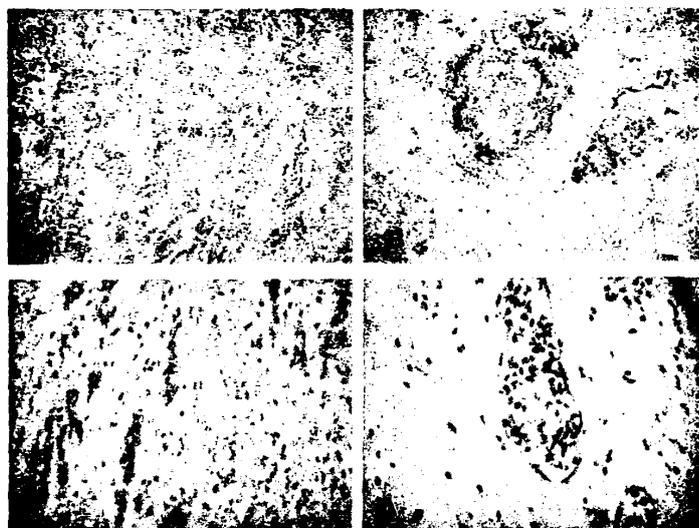
Επιπλέον, η μείωση της έκφρασης της hMSH2 συσχετίστηκε με αυξημένη παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (χ^2 $p=0.004$), καθώς και με την αύξηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας εντός και εκτός του όγκου (χ^2 $p=0.012$ και χ^2 $p=0.001$, αντίστοιχα) και την



παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων στην περιφέρεια του καρκινώματος (χ^2 $p=0.001$)
(Εικόνα 11).



Εικόνα 10. Καρκίνωμα που διατηρεί την έκφραση των πρωτεϊνών hMSH2 και BRCA1 (A, B).
Καρκίνωμα με παράλληλη απώλεια των hMSH2 και BRCA1 (Γ,Δ) (x 400).



Εικόνα 11. Πορογενές καρκίνωμα μαστού που εμφανίζει απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης hMSH2 (A) και αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα περιφερικά του όγκου (B) (x 100). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας εντός του όγκου (Γ), καθώς και νεοπλασματικά έμβολα σε λεμφαγγεία εκτός αυτού (Δ) (x 400).

3. hMSH6. Η έκφραση της τρίτης αυτής πρωτεΐνης εμφάνισε τις λιγότερες συγκριτικά με τις προηγούμενες συσχετίσεις. Έτσι, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία, το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό τύπο, την παρουσία ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων, την έκφραση της BRCA1 πρωτεΐνης και το στάδιο της νόσου. Επιπλέον, η μέτρηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας δεν έδειξε ουσιώδη αύξηση εκτός και εντός του όγκου.

Αντίθετα, παρατηρήθηκε ισχυρή στατιστική συσχέτιση μεταξύ της μείωσης/απώλειας της hMSH6 με την απουσία οιστρογονικών υποδοχέων (χ^2 $p=0.004$), την υπερέκφραση του c-erbB-2 (χ^2 $p=0.036$) και την εμφάνιση καρκινωμάτων υψηλότερου βαθμού κακοηθείας.

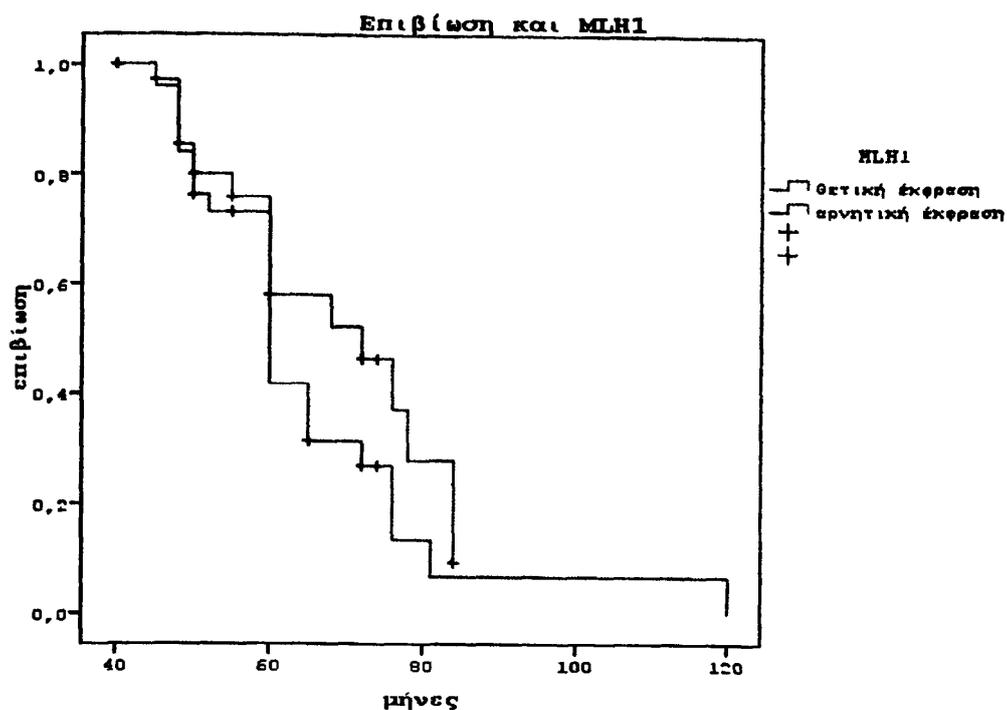
Τέλος, έγιναν οι καμπύλες Kaplan-Meier για τους διάφορους δείκτες. Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι οι παράγοντες που σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση είναι:

- η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων
- η υπερέκφραση του c-erbB-2
- η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης hMLH1 (Διάγραμμα 7)
- η απώλεια της BRCA1 πρωτεΐνης (Διάγραμμα 8)
- η αυξημένη λεμφαγγειακή πυκνότητα στην περιφέρεια του όγκου (PLD)
- το προχωρημένο στάδιο της νόσου

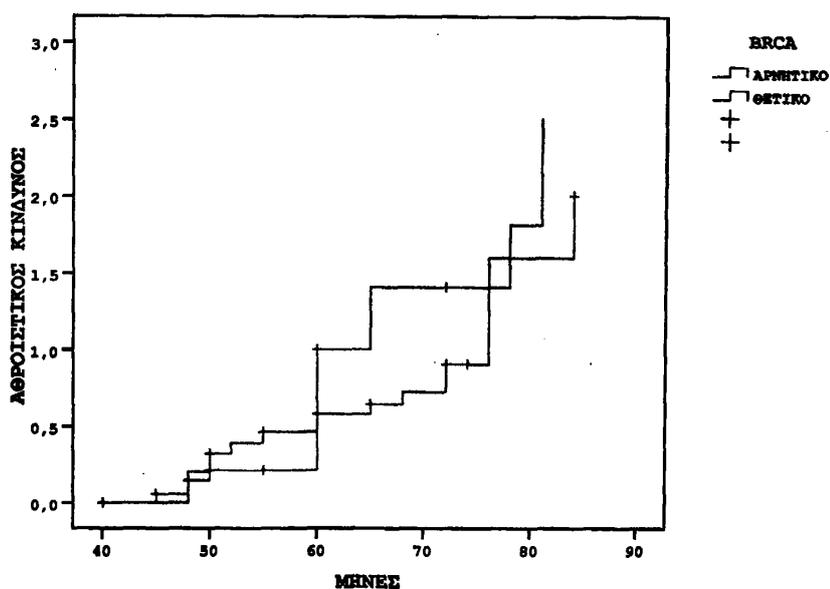
(σε όλες τις περιπτώσεις, log rank $p<0.05$)

Πολυπαραγοντική ανάλυση με το μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης κατά Cox έδειξε ότι ο μόνος ανεξάρτητος στατιστικά προγνωστικός παράγοντας είναι το στάδιο της νόσου (Cox $p=0.001$).





Διάγραμμα 7. Καμπύλη Kaplan-Meier για την επιβίωση των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της hMLH1.



Διάγραμμα 8. Καμπύλη Kaplan-Meier για τον αθροιστικό κίνδυνο των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της BRCA1.



Συμπερασματικά, η απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στο σποραδικό καρκίνο του μαστού σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας, αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπερέκφραση του c-erbB-2, αύξηση της εμφάνισης μεταστάσεων στους μασχालιαίους λεμφαδένες, αύξηση των νεοπλασματικών εμβόλων και απώλεια της BRCA1 πρωτεΐνης, η οποία χαρακτηρίζει επιθετικότερους όγκους και σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα αποτελεί αρνητικό παράγοντα για την συνολική επιβίωση. Τα στοιχεία αυτά επηρεάζουν την πρόγνωση, καθώς και τον τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας των ασθενών.

Επιπλέον, η μείωση της πρωτεΐνης hMLH1 φαίνεται ότι επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση των ασθενών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Μικροδορυφορική αστάθεια

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή διαδικασία και το κάθε βήμα αντικατοπτρίζει συγκεκριμένες γενετικές μεταβολές, οι οποίες οδηγούν στην προοδευτική μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά κύτταρα υψηλής κακοηθείας. Η συχνότητα μεταλλάξεων των σωματικών κυττάρων είναι πολύ χαμηλή για να συνυπολογιστεί στον αριθμό των μεταλλάξεων που απαιτούνται για να μετατραπεί σε καρκινικό. Έτσι, η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας αποτελεί ένα κριτικό βήμα της διαδικασίας της καρκινογένεσης [152].

Η γενετική αστάθεια, η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό των περισσότερων συμπαγών όγκων, ταξινομείται στη μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability, MSI) και τη χρωμοσωμική αστάθεια (chromosome instability, CIN). Η χρωμοσωμική αστάθεια είναι το κύριο χαρακτηριστικό των ανευπλοειδικών όγκων και συχνά σχετίζεται με ενεργοποίηση ογκογονιδίων και/ή απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων [162-164].

Η μικροδορυφορική αστάθεια οδηγεί σε θετικό φαινότυπο αντιγραφικού σφάλματος (replication error, RER+), ο οποίος χαρακτηρίζεται από αστάθεια και επακόλουθες μεταλλάξεις σε μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται



διασκορπισμένες στο ανθρώπινο γονιδίωμα τόσο σε κωδικοποιούμενες όσο και σε μη κωδικοποιούμενες αλληλουχίες. Τέτοιου είδους σφάλματα που επισυμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA παραμένουν μη ανιχνεύσιμες λόγω του συστήματος επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (mismatch repair genes, MMR) [164,165]. Η ταυτοποίηση των ανθρώπινων αναλόγων των γονιδίων αυτών, τα hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1 και hPMS2 προσέφερε νέο ενδιαφέρον στο πεδίο αυτό. Μεταλλάξεις στα γονίδια hMLH1, hMSH2 και hMSH6 εμπλέκονται στην παθογένεια της πλειοψηφίας του κληρονομικού μη-πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου [166].

Ο θετικός φαινότυπος αντιγραφικού σφάλματος (RER+) σχετίζεται με ελαττώματα σε τρεις ενδοκυττάριους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA: η επιδιόρθωση αφαίρεσης νουκλεοτιδίων, η επιδιόρθωση αφαίρεσης βάσεων και το MMR σύστημα [162-164]. Πλην του κληρονομικού μη-πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου, μεταλλάξεις στο σύστημα MMR ευθύνονται για μία ποικιλία συνδρόμων καρκίνου με οικογενή προδιάθεση, όπως το σύνδρομο Bloom, το σύνδρομο αταξίας-τηλεαγγειεκτασίας και την αναιμία Fanconi. Επιπλέον, ο φαινότυπος RER+ έχει περιγραφεί και σε καρκινώματα της ωοθήκης, του τραχήλου της μήτρας, του πνεύμονα, του προστάτη και του δέρματος [162].

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια που προσβάλλει τις γυναίκες του Δυτικού κόσμου και συνεπώς αποτελεί πεδίο συνεχούς και εντατικής έρευνας, προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέοι προληπτικοί και προγνωστικοί γενετικοί δείκτες. Η μικροδορυφορική αστάθεια φαίνεται ότι είναι μία από τις διάφορες γενετικές μεταβολές που ανευρίσκονται στα καρκινώματα του μαστού, εντούτοις τα αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά στις μελέτες τόσο για τον οικογενή όσο και για τον σποραδικό καρκίνο. Μικροδορυφορική αστάθεια έχει ανιχνευθεί σε ποσοστό 0-30% των σποραδικών καρκινωμάτων και σε ποσοστό 0-83% των οικογενών. Η αστάθεια αυτή φαίνεται ότι διαφέρει από την αστάθεια που παρατηρείται στον κληρονομικό μη-πολυποδιασικό ορθοκολικό καρκίνο και σχετίζεται με πτωχότερη πρόγνωση [167-184].



2. Ρόλος των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) και του γονιδίου BRCA1 στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού

Ο μηχανισμός της καρκινογένεσης των οικογενών όγκων είναι περίπλοκος και σε αυτόν συμμετέχουν περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες. Είναι ευρέως γνωστό ότι και οι τρεις μεγάλες κατηγορίες γονιδίων συμμετέχουν στο μηχανισμό αυτό: τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA [185-189].

Συγκεκριμένα, στον οικογενή καρκίνο του μαστού εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό το γονίδιο BRCA1 και λιγότερο το γονίδιο BRCA2. Η ακριβής βιολογική λειτουργία των γονιδίων αυτών και ο τρόπος με τον οποίο προάγουν την προδιάθεση για καρκίνο δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως ακόμη, αν και είναι γνωστό ότι οι BRCA πρωτεΐνες συμμετέχουν σε αρκετές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο έλεγχος της ακεραιότητας του γονιδιώματος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση [190-196]. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποδεικνύουν ότι το BRCA1 γονίδιο σχετίζεται άμεσα με τη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA. Συγκεκριμένα, τα προϊόντα του BRCA1, δηλαδή οι πρωτεΐνες του, αλληλεπιδρούν με άλλες διαφορετικές πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται επίσης στο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA. Τα ευρήματα αυτά είναι σημαντικά όχι μόνο για να εκτενέστερη έρευνα των μηχανισμών καρκινογένεσης του BRCA1, αλλά και για την προαγωγή νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων του καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με οικογενή προδιάθεση, στηριζόμενες στη γενετική βάση [197-200]. Η απώλεια των BRCA1 πρωτεϊνών στον οικογενή, αλλά και στο σποραδικό καρκίνο, οδηγεί σε εμφάνιση όγκων υψηλού βαθμού κακοηθείας, με υψηλό μιτωτικό δείκτη, υψηλή συχνότητα ανευπλοειδίας και απουσία οιστρογονικών υποδοχέων [201-211].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν κάποιες πρόσφατες σχετικά έρευνες, οι οποίες καθορίζουν ακριβώς το παθογενετικό μονοπάτι μεταξύ BRCA1 και MMR πρωτεϊνών. Σύμφωνα με αυτές, πειραματικά μοντέλα δείχνουν ότι το γονίδιο BRCA1 ενεργοποιεί ένα σημείο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G₂-M, κατόπιν βλάβης του συστήματος MMR και μάλιστα απαιτούνται τουλάχιστον δύο MMR πρωτεΐνες (οι MLH1 και MSH2) για την ενεργοποίηση αυτή. Ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να είναι άμεσος και να ακολουθεί την αλληλουχία MLH1/MSH2-BRCA1. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι το να σταματήσει ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G₂ [212-217].



Σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι σε περιπτώσεις στις οποίες παρατηρήθηκε υπερμεθυλίωση του ενισχυτή του MLH1, ανιχνεύθηκε παράλληλη υπερμεθυλίωση και του BRCA1 ενισχυτή [218].

Συνεχίζοντας τη συζήτηση για τους παθογενετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στον οικογενή και σποραδικό καρκίνο του μαστού, πρέπει να αναφέρουμε ότι, ενώ η μικροδορυφορική αστάθεια αποδίδεται κλασσικά σε γενετικά ελαττώματα, υπάρχουν επίσης και οι επιγενετικοί παράγοντες, οι οποίοι θεωρείται ότι συμμετέχουν ισότιμα στην πρόκληση βλαβών του DNA [219-221]. Παραδείγματος χάρη, έχει παρατηρηθεί ότι η υπερμεθυλίωση περιοχών του ενισχυτή των MMR γονιδίων και του BRCA1 γονιδίου αποτελεί έναν επιγενετικό μηχανισμό που συμβάλλει στην καρκινογένεση. Η επιγενετική αφορά τη μεταφορά πληροφοριών μέσω του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων, σε αντίθεση με τη γενετική η οποία αφορά τη μεταφορά πληροφοριών μέσω των γενετικών αλληλουχιών. Ιστορικά, πρέπει να αναφέρουμε ότι το BRCA1 είναι από τα πρώτα γονίδια στα οποία μελετήθηκαν οι επιγενετικές μεταβολές: ενώ η συμμετοχή του στον οικογενή καρκίνο του μαστού διευκρινίστηκε σχετικά γρήγορα, δεν ήταν δυνατόν να εντοπίσουν μεταλλάξεις του στον αληθή σποραδικό καρκίνο. Έτσι, ο ρόλος του BRCA1 ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο άρχισε να αμφισβητείται. Εντούτοις, η απώλεια της πρωτεΐνης του αποτελεί συχνό φαινόμενο στην ομάδα αυτή καρκίνου του μαστού. Επακόλουθα, διάφορες ομάδες ερευνητών αναφέρουν ότι το γονίδιο BRCA1 εμφανίζει επιγενετική μεταβολή μέσω της υπερμεθυλίωσης του ενισχυτή του [222-232].

Με αντίστοιχο τρόπο λύθηκε και το "αίνιγμα" των μικροδορυφορικά ασταθών σποραδικών καρκινωμάτων. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί και πάλι ο κληρονομικός μη-πολυποδιασικός ορθοκολικός καρκίνος, στον οποίο ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά οι μεταλλάξεις του MMR συστήματος. Η εμφάνιση μικροδορυφορικής αστάθειας και σε περιστατικά σποραδικού ορθοκολικού καρκίνου οδήγησε στο συμπέρασμα ότι και στις περιπτώσεις αυτές ευθύνονται μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης. Εντούτοις, αυτές παρατηρήθηκαν σε ποσοστό <10% των μικροδορυφορικά ασταθών καρκινωμάτων και ο κύριος λόγος της έλλειψης γενετικών μεταλλάξεων είναι ότι η μικροδορυφορική αστάθεια στους όγκους αυτούς οφείλεται στην απενεργοποίηση των MMR γονιδίων μέσω της υπερμεθυλίωσης του ενισχυτή τους. Η υπερμεθυλίωση αυτή καταδεικνύεται με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης



πολυμεράσης (PCR) και οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης των γονιδίων σε πρωτεϊνικό επίπεδο [233-235].

Συμπερασματικά, οι ερευνητές καταλήγουν ότι ο καρκίνος είναι βέβαια μία πολυγενετική νόσος, αλλά επιπλέον και μία πολυεπιγενετική νόσος, όπου γονίδια που εμπλέκονται σε πολλαπλούς παθογενετικούς μηχανισμούς απενεργοποιούνται μέσω της υπερμεθυλίωσης του ενισχυτή τους. Τα πρότυπα των επιγενετικών αλλαγών είναι ειδικά για κάθε τύπο καρκίνου. Η γνώση τους μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στον έλεγχο των ασθενών και στο σχεδιασμό θεραπευτικών προσεγγίσεων. Ανακεφαλαιώνοντας, όταν η μεθυλίωση διακόπτει την έκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης, όπως το BRCA1 και τα MMR, το κυτταρικό DNA μένει απροστάτευτο απέναντι σε εξωγενείς και ενδογενείς βλαπτικούς παράγοντες [236-245].

3. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των MMR πρωτεϊνών

Το 1996 δημιουργήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της MSH2 πρωτεΐνης και από τότε μια σειρά μελετών ασχολήθηκε με τη χρησιμότητα της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR). Στις πρώτες μελέτες υπήρξαν μεγάλες διαφωνίες σχετικά με την εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, αλλά κατόπιν επιβεβαιώθηκε ότι η ασθενής ή ετερογενής αντίδραση σχετίζεται σε αρκετές περιπτώσεις με γενετικά και επιγενετικά ελαττώματα. Αν και υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί λόγω διαφόρων βιολογικών και τεχνικών παραγόντων, η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας αποτελεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο, λαμβάνοντας υπόψιν και το γεγονός ότι είναι απλή και ευρύτατα διαθέσιμη τεχνική. Χρησιμεύει ως συμπληρωματική εξέταση, η οποία μειώνει τον αριθμό των ασθενών που πρέπει να ελεγχθούν για μικροδορυφορική αστάθεια. Αν και προς το παρόν ο ρόλος της ανοσοϊστοχημείας περιορίζεται σε ερευνητικά πρωτόκολλα και δοκιμές, αρχίζει να γίνεται φανερό ότι όταν διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος των MMR στην πρόγνωση και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και όταν δημιουργηθούν νέα εξειδικευμένα φάρμακα προσαρμοσμένα στο φαινότυπο των μικροδορυφορικά ασταθών όγκων, η ανοσοϊστοχημεία θα αποτελέσει έλεγχο ρουτίνας στη καθημερινή πρακτική [246-253].

Οι ήδη υπάρχουσες ελάχιστες μελέτες που ασχολούνται με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) στο μαστό



παρουσιάζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ουσιαστικά, χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτές που υποστηρίζουν ότι δεν παρατηρούνται μεταβολές στην έκφραση και σε αυτές που υποστηρίζουν ακριβώς το αντίθετο, κάτι με το οποίο συμφωνούν και τα δικά μας αποτελέσματα.

Αναλυτικότερα, η πρώτη ομάδα υποστηρίζει ότι η μικροδορυφορική αστάθεια δεν αποτελεί κριτικό σημείο στο μηχανισμό της καρκινογένεσης στο μαστό. Οι ερευνητές εξέτασαν 30 περιστατικά οικογενούς και 40 σποραδικού καρκίνου του μαστού και αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε απώλεια της πρωτεΐνης hMSH2 σε καμία περίπτωση. Επιπλέον, ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι δεν παρατήρησαν μικροδορυφορική αστάθεια σε κανένα από τα εξετασθέντα περιστατικά [254,255]. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι βλάβες στο σύστημα DNA MMR αποτελούν εξαιρετικά σπάνια συμβάματα στο σποραδικό και οικογενή καρκίνου του μαστού. Μία άλλη ομάδα συγγραφέων ερεύνησε 32 περιστατικά σποραδικού καρκίνου για την ύπαρξη μικροδορυφορικής αστάθειας, την παρουσία πιθανόν γενετικών και επιγενετικών αλλαγών, καθώς και για την έκφραση των πρωτεϊνών hMLH1 και hMSH2. Μικροδορυφορική αστάθεια ανιχνεύτηκε σε 15 περιπτώσεις. Επιπρόσθετα, ταυτοποίησαν τις γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες όμως δεν προκαλούσαν μεταβολές στην έκφραση των πρωτεϊνών. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στα καρκινώματα του μαστού το προφίλ της μικροδορυφορικής αστάθειας μπορεί να υποεκτιμηθεί με τις ανοσοϊστοχημικές μεθόδους λόγω της έκφρασης μη λειτουργικών πρωτεϊνών [158].

Στον αντίποδα, η δεύτερη υποστηρίζει ότι εμφανίζονται βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA και ότι απώλεια των MMR πρωτεϊνών υφίσταται στον καρκίνο του μαστού [160,161]. Συγκεκριμένα, δύο μελέτες αναφέρουν ότι παρατηρείται απώλεια της έκφρασης της hMSH2 σε ποσοστό 47% και 34% αντίστοιχα και επιπλέον ότι η hMSH2 μειώνεται κατά τη πρόοδο από μη διηθητικό σε διηθητικό καρκίνωμα. Στις μελέτες αυτές όμως, εντύπωση προκαλεί ότι οι συγγραφείς αναφέρουν πως η αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας και δείκτη πολλαπλασιασμού, καθώς και αύξηση των λεμφαδενικών μεταστάσεων [256-260].

Σε πιο πρόσφατες μελέτες, η απώλεια/μείωση της έκφρασης των πρωτεϊνών MMR στον καρκίνο του μαστού κυμαίνεται σε ποσοστά 28-88%. Τα μεγαλύτερα ποσοστά



παρατηρούνται για την MSH6. Οι περιπτώσεις που εμφανίζουν διαταραχή των πρωτεϊνών MMR είναι όλες μικροδορυφορικά ασταθείς, ενώ οι μικροδορυφορικά σταθεροί όγκοι διατηρούν τη φυσιολογική έκφραση των MLH1, MSH2 και MSH6. Αν και ανιχνεύτηκαν γενετικές μεταλλάξεις, ο κύριος μηχανισμός φαίνεται ότι είναι η υπερμεθυλίωση του ενισχυτή. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι η μικροδορυφορική αστάθεια στον καρκίνο του μαστού δεν είναι τόσο σπάνιο φαινόμενο, όπως πίστευαν παλιότερα, και συνδέεται άμεσα με τη δυσλειτουργία του συστήματος MMR και την καρκινογένεση [261].

4. Συσχέτιση των MMR πρωτεϊνών με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Διάφορες ομάδες ερευνητών έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την απώλεια των πρωτεϊνών αυτών με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Και εδώ τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Οι περισσότεροι συγγραφείς συμφωνούν ότι το ορμονικό προφίλ παίζει ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των MMR πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα το γονίδιο MSH2 φαίνεται ότι αποτελεί συνενεργοποιητή του οιστρογονικού υποδοχέα-α μέσω επιγενετικών μηχανισμών και συνεπώς, η απώλεια της πρωτεΐνης MSH2 σχετίζεται με απουσία οιστρογονικών υποδοχέων, κάτι το οποίο καταδεικνύεται και στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, αναφέρεται συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών MLH1, MSH2 και MSH6 [262].

Επίσης, η πλειοψηφία των μελετών συμφωνεί ότι παρατηρείται θετική στατιστική συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (grade), ο οποίος αποτελεί κλασσικό προγνωστικό παράγοντα του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, η δυσλειτουργία του MMR συστήματος οδηγεί στην εμφάνιση καρκινωμάτων υψηλότερου βαθμού κακοηθείας επιδρώντας με τον τρόπο αυτό στη πρόγνωση [263].

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα σχετικά με την ηλικία, τον ιστολογικό τύπο, το μέγεθος του όγκου, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και το κλινικό στάδιο της νόσου με τους ερευνητές να χωρίζονται σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα ισχυρίζεται ότι δεν παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ της απώλειας των πρωτεϊνών και της ηλικίας, του τύπου (πορογενές ή λοβιακό), της εμφάνισης λεμφαδενικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων, καθώς και της αύξησης του μεγέθους του όγκου, ενώ η δεύτερη ισχυρίζεται ακριβώς το αντίθετο. Επιπρόσθετα, οι τελευταίοι αναφέρουν ότι η υπερμεθυλίωση του hMLH1



ενισχυτή εμφανίζει ιδιαίτερα σημαντική συσχέτιση με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, καθώς και ότι απώλεια των MMR πρωτεϊνών παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς προχωρημένου κλινικού σταδίου. Το τελικό συμπέρασμα της ομάδας αυτής είναι ότι η ανεπάρκεια του συστήματος MMR προάγει τον καρκίνο του μαστού σε πιο προχωρημένο κλινικό στάδιο και ότι πρέπει να θεωρείται ως παράγοντας πτωχής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [264,265].

Μία εντελώς πρόσφατη μελέτη συνδέει τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA με την παρουσία νεοπλασματικών εμβόλων σε αγγεία και λεμφαγγεία [265]. Με το πεδίο αυτό ασχολείται και η παρούσα εργασία θεωρώντας ότι η λεμφαγγειογένεση και η λεμφαγγειακή διήθηση έχει άμεση σχέση με την εξέλιξη κάποιων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανόμενου και του καρκίνου του μαστού, στηριζόμενοι σε δημοσιευμένες μελέτες. Η ποδοπλανίνη που χρησιμοποιήσαμε θεωρείται ο πλέον ειδικός λεμφαγγειακός δείκτης και σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας η λεμφαγγειογένεση και η λεμφαγγειακή διήθηση σχετίζονται με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, αποτελούν παράγοντες πτωχής πρόγνωσης τόσο στον οικογενή όσο και στο σποραδικό καρκίνο του μαστού και επιπλέον, επηρεάζονται από την απώλεια των MMR πρωτεϊνών [266-274].

Όσον αφορά, την έκφραση του γονιδίου c-erbB-2 και την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σχέση με την απώλεια των MMR πρωτεϊνών, οι μελέτες είναι ελάχιστες και τα αποτελέσματα δεν παρέχουν ιδιαίτερες πληροφορίες [263-265]. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε ότι στον κύριο όγκο των μελετών, ο αριθμός των εξεταζομένων περιστατικών σπανίως ξεπερνούσε τα πενήντα, γεγονός που δυσχεραίνει τη στατιστική αξιολόγηση και την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων σχετικά με την επιβίωση.

5. Συσχέτιση των MMR πρωτεϊνών με την ανταπόκριση στα θεραπευτικά σχήματα

Σήμερα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση των γονιδίων επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (MMR) με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Εισαγωγικά, πρέπει να αναφέρουμε ότι στον ορθοκολικό καρκίνο η μικροδορυφορική αστάθεια φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα καλύτερης πρόγνωσης, μειωμένης πιθανότητας εμφάνισης λεμφαδενικών μεταστάσεων και μεγαλύτερης επιβίωσης κατόπιν συμπληρωματικής θεραπείας με σκευάσματα φθοριοουρακίλης. Αντίθετα, μελέτες πάνω



στον καρκίνο του μαστού αναφέρουν ότι η μικροδορυφορική αστάθεια χειροτερεύει την πρόγνωση. Συνεχώς, αυξάνονται οι αποδείξεις ότι η μικροδορυφορική αστάθεια στο μαστό αντιπροσωπεύει έναν τύπο γενετικής αστάθειας διαφορετικό από αυτόν που παρατηρείται στον ορθοκολικό καρκίνο [275-277].

Επιπλέον, μία σειρά μελετών *in vitro* αναφέρουν ότι τα κύτταρα που εμφανίζουν βλάβη του συστήματος MMR είναι ανθεκτικά σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, όπως οι μεθυλιωτικοί (προκαρβαζίνη), οι αλκυλιωτικοί (busulfan), οι περιέχοντες πλατίνη (σισπλατίνη, καρβοπλατίνη), οι αντιμεταβολίτες (6-θειογουανίνη) και οι αναστολείς της τοποϊσομεράσης II (ετοποσίδη, δοξορουμπικίνη). Εντούτοις, οι μελέτες που περιγράφουν τη σημασία της έκφρασης των MMR πρωτεϊνών στον καρκίνο του μαστού σε σχέση με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία είναι ελάχιστες. Αν επιβεβαιωθεί και *in vivo* ότι η απώλεια των MMR πρωτεϊνών εμπλέκεται στο μηχανισμό της αντίστασης στη χημειοθεραπεία, το εύρημα αυτό μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο τόσο στην κατανόηση της ανταπόκρισης στα θεραπευτικά σχήματα όσο και στην ανάπτυξη νέων παράγοντων που θα ενεργοποιούν τα MMR-ανεπαρκή κύτταρα, θα βελτιώνουν ή ακόμη και θα αντιστρέφουν την αντίσταση στα φάρμακα [278-284].

Πράγματι, οι πρώτες μελέτες δείχνουν ότι η απώλεια των πρωτεϊνών MMR σχετίζεται με πτωχή ανταπόκριση στο σχήμα CMF (κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, 5-φθοριοουρακίλη), στην ετοποσίδη και τη δοξορουμπικίνη, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με το σχήμα CAF (κυκλοφωσφαμίδη, αδριαμυκίνη, 5-φθοριοουρακίλη) [285-290].

Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι το σύστημα MMR και η μικροδορυφορική αστάθεια εμπλέκονται στην ανταπόκριση των ασθενών προχωρημένου κλινικού σταδίου κατόπιν χορήγησης υψηλής χημειοθεραπευτικής δόσης και μεταμόσχευσης αυτόλογων αρχέγονων κυττάρων και μειώνουν την επιβίωση [291].

Όλοι οι συγγραφείς όμως επισημαίνουν ότι απαιτούνται αρκετές ακόμη μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι πρώτες αυτές παρατηρήσεις.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μας οδηγούν στα κάτωθι συμπεράσματα και παράλληλα σε νέα ερωτήματα και προοπτικές:

1. Τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA (mismatch repair genes) με τα προϊόντα τους, δηλαδή τις πρωτεΐνες τους, δε φαίνεται να εμπλέκονται στις καλοήθεις παθήσεις του μαστού, ακόμη και στην εξέλιξη της απλής επιθηλιακής υπερπλασίας σε άτυπη.
2. Το ίδιο ισχύει και για τα μη διηθητικά καρκινώματα (in situ), όπου δεν παρατηρήθηκε μείωση ή/και απώλεια των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2 και hMSH6 στα περιστατικά που εξετάστηκαν και στα οποία συμπεριλήφθησαν δείγματα σχεδόν όλων των ιστολογικών τύπων και ιστολογικής διαβάθμισης.
3. Στα περιστατικά οικογενούς καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε ποσοστό 43,3%, 16,7% και 46,7% αντίστοιχα. Η απώλεια αυτή σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας, απουσία έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων, υπερέκφραση του ογκογονιδίου c-erbB-2 και αύξηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας. Επιπλέον, η απώλεια της hMSH2 συνδέεται με αυξημένη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων και μείωση της πρωτεΐνης BRCA1, η οποία χαρακτηρίζει επιθετικότερους κλινικά όγκους.
4. Η απώλεια των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2, hMSH6 και BRCA1, αν και σχετίζεται με αρκετές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που θεωρούνται ότι επηρεάζουν αρνητικά την πρόγνωση, δε φαίνεται να επηρεάζει τη συνολική επιβίωση των ασθενών με οικογενή καρκίνο του μαστού.
5. Στα περιστατικά σποραδικού καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε ποσοστό 40,3%, 26% και 51,6% αντίστοιχα. Η απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στο σποραδικό καρκίνο του μαστού σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας,



αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπερέκφραση του c-erbB-2, αύξηση της εμφάνισης μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, αύξηση των νεοπλασματικών εμβόλων και απώλεια της BRCA1 πρωτεΐνης.

6. Επιπλέον, η μείωση των πρωτεϊνών hMLH1 και BRCA1 στο σποραδικό καρκίνο του μαστού φαίνεται ότι επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση των ασθενών.
7. Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης του μαστού, αλλά όχι σε πρώιμο στάδιο. Η διαταραχή του συστήματος αυτού εμφανίζεται κατά την εξέλιξη του *in situ* σε διηθητικό καρκίνωμα, τόσο στην οικογενή μορφή όσο και στη σποραδική.
8. Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR επηρεάζει την πρόγνωση, και επακόλουθα τον τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας των ασθενών.
9. Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR σχετίζεται με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, τουλάχιστον σε μελέτες *in vitro*. Αν αυτό αποδειχθεί ότι ισχύει και *in vivo*, ένα νέο πεδίο ανοίγει σχετικά με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων που θα αποκαθιστούν ή/και θα ενεργοποιούν το σύστημα αυτό, προσφέροντας επιπλέον επιλογές στη θεραπεία ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στα ήδη υπάρχοντα θεραπευτικά σχήματα.
10. Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των βλαβών του συστήματος MMR ίσως να αποτελέσει μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την εντόπιση των ασθενών στους οποίους εμφανίζεται αυτή η γενετική ή επιγενετική διαταραχή.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μαστός αποτελεί ένα όργανο στο οποίο αναπτύσσεται μεγάλος αριθμός παθήσεων, καλοήθων και κακοήθων. Πολλές από τις παθήσεις αυτές εμφανίζονται λόγω γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών. Σημαντικούς μηχανισμούς αποτελούν η γενετική αστάθεια και τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, hMLH1, hMSH2 και hMSH6, καθώς και της πρωτεΐνης BRCA1, η οποία εμπλέκεται επίσης στον ίδιο μηχανισμό, σε καλοήθειες και προκαρκινικές αλλοιώσεις, καθώς και σε δείγματα οικογενή και σποραδικού καρκίνου του μαστού με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην έκφραση των πρωτεϊνών από τα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα και οι μεταβολές που παρατηρούνται, καθώς και στη διερεύνηση της προγνωστικής αξίας των δεικτών αυτών και τη συσχέτισή τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Εξετάστηκαν 190 περιστατικά καλοήθων παθήσεων, 60 μη διηθητικού καρκινώματος, 124 σποραδικού καρκίνου και 30 οικογενή καρκίνου.

Δεν παρατηρήθηκε μείωση ή/και απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA hMLH1, hMSH2 και hMSH6 στις καλοήθειες παθήσεις του μαστού και τα μη διηθητικά καρκινώματα (in situ) που εξετάστηκαν και στα οποία συμπεριλήφθησαν σχεδόν όλοι οι ιστολογικοί τύποι.

Στα περιστατικά οικογενούς καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε ποσοστό 43,3%, 16,7% και 46,7% αντίστοιχα. Η απώλεια αυτή σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας, απουσία έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων, υπερέκφραση του ογκογονιδίου c-erbB-2 και αύξηση της λεμφαγγειακής πυκνότητας. Επιπλέον, η απώλεια της hMSH2 συνδέεται με αυξημένη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων και μείωση της πρωτεΐνης BRCA1, η οποία χαρακτηρίζει επιθετικότερους κλινικά όγκους. Η απώλεια των πρωτεϊνών hMLH1, hMSH2, hMSH6 και BRCA1, αν και σχετίζεται με αρκετές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους που θεωρούνται ότι επηρεάζουν αρνητικά την πρόγνωση, δε φαίνεται να επηρεάζει τη συνολική επιβίωση των ασθενών με οικογενή καρκίνο του μαστού.



Στα περιστατικά σποραδικού καρκίνου του μαστού παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης των hMLH1, hMSH2 και hMSH6 σε ποσοστό 40,3%, 26% και 51,6% αντίστοιχα. Η απώλεια των πρωτεϊνών επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA στο σποραδικό καρκίνο του μαστού σχετίζεται με υψηλότερο βαθμό κακοηθείας, αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπερέκφραση του c-erbB-2, αύξηση της εμφάνισης μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, αύξηση των νεοπλασματικών εμβόλων και απώλεια της BRCA1 πρωτεΐνης. Επιπλέον, η μείωση των πρωτεϊνών hMLH1 και BRCA1 στο σποραδικό καρκίνο του μαστού φαίνεται ότι επηρεάζει αρνητικά την επιβίωση των ασθενών.

Οι υπάρχουσες μελέτες που ασχολούνται με το MMR σύστημα και την επίδρασή του στην παθολογία του μαστού είναι ελάχιστες και τα αποτελέσματα ποικίλουν και είναι επιπλέον και αντικρουόμενα. Πρόσφατες μελέτες εξαιρούν την αξία της ανοσοϊστοχημικής ανίχνευσης των βλαβών του συστήματος MMR θεωρώντας τη ως μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο για την εντόπιση των ασθενών στους οποίους εμφανίζεται αυτή η γενετική ή/και επιγενετική διαταραχή.

Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι τα γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA εμπλέκονται στους παθογενετικούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης του μαστού, αλλά όχι σε πρώιμο στάδιο. Η διαταραχή του συστήματος αυτού εμφανίζεται κατά την εξέλιξη του *in situ* σε διηθητικό καρκίνωμα, τόσο στην οικογενή μορφή όσο και στη σποραδική. Η ανεπάρκεια του συστήματος MMR επηρεάζει την πρόγνωση, και επακόλουθα τον τρόπο αντιμετώπισης και θεραπείας των ασθενών.



STUDY OF THE EXPRESSION OF MISMATCH REPAIR GENES (MMR) IN BREAST DISEASES. CORRELATION WITH PROGNOSTIC MARKERS.

EVDOKIA D. ARKOUMANI

ABSTRACT

The pathology of the breast consists a great chapter in pathology of the women. Both benign and malignant lesions are thought to develop due to genetic and/or epigenetic defects. One of the mechanisms involved is genetic instability and the DNA repair system.

The purpose of the present study was to investigate the expression of three of proteins encoded by the DNA mismatch repair genes, namely hMLH1, hMSH2 and hMSH6 and also the expression of BRCA1 gene product that is also involved in the DNA repair system in benign breast lesions, in situ carcinomas and invasive carcinomas of the breast, familial and sporadic.

The expression of these proteins was monitored immunohistochemically in 190 benign breast lesions (adenomas, fibroadenomas, radial scars, papillomas, fibrocystic disease with or without epithelial hyperplasia etc), 60 in situ carcinomas, 30 familial invasive carcinomas and 124 invasive sporadic carcinomas of various types and grades.

We did not detect any loss of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 expression in the material that included the benign lesions and the in situ carcinomas.

Concerning invasive carcinomas, we detected loss of the mismatch repair proteins in 43,3% (MLH1), 16,7% (MSH2) and 46,7% (MSH6) in familial cases and 40,3% (MLH1), 26% (MSH2) 51,6% (MSH6) in sporadic cases examined. The reduced or absent expression of these proteins was correlated with higher histological grade, negative estrogen receptor status, overexpression of the c-erbB-2 oncogene and higher lymphatic density, peritumoral and intratumoral. Especially, loss of MSH2 protein was strongly statistically correlated with increased frequency of lymph node metastases and



loss of BRCA1 protein. BRCA1 reduction in breast carcinomas usually characterizes highly malignant tumors.

In addition, loss or reduction of hMLH1 and BRCA1 protein was associated with worse overall survival in the group of sporadic carcinomas, but it had no effect on the survival curves in the familial cases examined.

The published data concerning the mismatch repair protein expression and its relationship with breast pathology are few and the reports are variable and controversial.

Recent studies have shown that there is a high correlation between MMR-deficiency and loss of expression of the related proteins. Additionally, immunohistochemistry is a rapid and simple technique and it can be used in everyday practice in order to detect the patients that carry these genetic/epigenetic disorder.

Our results suggest that the DNA mismatch repair system is involved in breast carcinogenesis, in both familial and sporadic cases, but it is not an early event. Defects in the DNA mismatch repair system seem to occur during progression from in situ to invasive carcinoma. The MMR-deficiency affects prognosis and therefore the management and therapeutic procedures of the patients.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Azzopardi LG: Problems in breast pathology. In Bennington JL, consulting ed: Major problems in Pathology, vol 11, Philadelphia, 1979, WB Saunders Co.
2. Ackerman's Surgical Pathology, by Juan Rosai, 8th edition, pages: 1565-7.
3. Cunha GR: Role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and abnormal development of the mammary gland and prostate. *Cancer* 74: 1030-44, 1994.
4. Cowan DF, Herbert TA: Involution of the breast in women aged 50 to 104 years. An histological study of 102 cases. *Surg Pathol* 2: 323-334, 1989.
5. Toker C: Clear cells in the nipple epidermis. *Cancer* 25:601-610, 1972.
6. Smith DM, Peters TG, Donegan WL: Montgomery's areolar tubercle. A light microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 106: 60-63, 1982.
7. Connolly JL, Schnitt SJ: Benign breast disease. Resolved and unresolved issues. *Cancer* 71: 1187-1189, 1993.
8. Tavassoli FA, Majeste RM, Snyder RC: Intranuclear helioid inclusions in mammary intraductal hyperplasias. *Ultrastruct Pathol* 15: 267-279, 1991.
9. Raju U, Crissman JD, Zarbo RJ, Gottlieb C: Epitheliosis of the breast. An proliferations of the breast. *Am J Surg Pathol* 14: 939-947, 1990.
10. Fitzgibbons PL, Henson DE, Hutter RV: Benign breast changes and the risk of subsequent breast cancer: an update of the 1885 Consensus statement. Cncer Committee of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 124, 966-978, 1998.
11. Palazzo J, Hyslop T: Hyperplastic ductal and lobular lesions and carcinoma in situ of the breast: Reproducibility of current diagnostic criteria among community and academic based pathologists. *Breast J* 4:230-237, 1998.
12. Palli D, Galli M, Bianchi S, Bussolati G, Di Palma S, Eusebi V, Gambacorta M, Rosselli DT: Reproducibility of histological diagnosis of breast lesions: results of a panel in Italy. *Eur J Cancer* 32A: 603-607, 1996.
13. ConsensusMeeting, Oct 3 to 5, 1985, New York, Cancer Committee of the College of American Pthologists: Is fibrocystic disease of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med* 110: 171-173, 1986.
14. Sloane JP, Mayers MM: Carcinoma and atypical hyperplasia in radial scars and complex sclerosing lesions. Importance of lesion size and patient age. *Histopathology* 23: 225-231, 1993.
15. Kuijper A, Mommers EC, van der Wall E, van Diest PJ: Histopathology of fibroadenoma of the breast. *Am J Clin Pathol* 115:736-742, 2001.
16. Diaz NM, Palmer JO, McDivitt RW: Carcinoma arising within fibroadenomas of the breast. A clinicopathologic study of 105 patients. *Am J Clin Pathol* 95: 614-622, 1991.
17. Azzopardi JG, Salm R: Ductal adenoma of the breast. A lesion which can mimic carcinoma. *J Pathol* 144: 14-23, 1984.
18. Rosen PP. Benign papillary tumors. In: Breast Pathology. PP Rosen (ed.), 1st ed., Lippincott-Raven: Philadelphia/ New York.
19. Adami HO, Signorello LB Trichopoulos D: Increasing survival trend after cancer diagnosis in Sweden.. *J Natl Cancer Inst* 82: 1640-1647, 1989.



20. Balzi D, Buiatti E, Geddes M et al: Summary of the results by site. IN: Cancer in Italian Migrant Populations, IARC Scientific Publication No 123, International Agency for Research on cancer: Lyon, 193-292, 1993.
21. Chu KC, Tarone RE, Kessler LG et al: Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival and mortality rates. *J Natl Cancer Inst* 88: 1571-1579, 1996.
22. Kliewer EV, Smith KR: Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87: 1154-1161, 1995.
23. Kelsey JL, Gammon MD, Lohn EM: Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15: 36-47, 1993.
24. Ssali JC, Gakwaya A, Katongole F: Risk factors for breast cancer in Ugandan women: a case control study. *East Central Afr J Surg* 1: 9-13, 1995.
25. International Agency for Research on cancer. Post-menopausal estrogen-progestogen therapy. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Vol 72. IARC Press: Lyon, 531-628.
26. Smith-Warner SA, Spiegelman S, Yaun SS et al: Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279: 535-540, 1998.
27. Baron JA: Smoking and estrogen-related disease. *Am J Epidemiol* 119:9-22, 1984.
28. International Agency for Research on cancer. IARC Handbooks of cancer prevention Vol 6: Weight control and physical activity. IARC Press: Lyon.
29. Tokunaga M, Land CE, Yamamoto T et al: Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivor, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1980. *Radiat Res* 112: 243-272, 1987.
30. Key TJ: Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocr Relat Cancer* 6: 175-180, 1999.
31. Key TJ, Pike MC: The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Clin Oncol* 24: 29-43, 1988.
32. Kaaks R: Nutrition, hormones and breast cancer: is insulin the missing link? *Cancer Causes Control* 7: 605-625, 1996.
33. Kaaks R, Lundin E, Manjer J et al: Prospective study of IGF-I, IGF-binding proteins and breast cancer risk, in northern and southern Sweden. *Cancer Causes Control* 13: 307-316, 2002.
34. Haagensen CD. Diseases of the breast. 3rd ed. WB Saunders: Philadelphia, 1986.
35. Dawson PJ, Backley PA, Clark RA: Mechanisms of multifocal breast cancer. An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 26: 965-969, 1995.
36. Hutter RVP, Kim DU: The problem of multiple lesions of the breast. *Cancer* 28: 1591-1601, 1971.
37. Kollias J, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW: Prognostic significance of synchronous and metachronous bilateral breast cancer. *World J Surg* 25: 1117-1124, 2001.
38. McLelland R: Screening mammography. *Cancer* 67: 1129-1131, 1991.
39. Grant CS, Goellner JR, Welch JS, Martin JK: Fine-needle aspiration of the breast. *Mayo Clin Proc* 61: 377-381, 1986.
40. Fentiman IS, Millis RR, Hayward JL: Value of needle biopsy in outpatient diagnosis of breast cancer. *Arch Surg* 115: 652-653, 1980.



41. Fechner RE: Frozen section examination of breast biopsies. Practice parameter. *Am J Clin Pathol* 103: 6-7,1995.
42. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and Genetics. Tumors of the breast and female genital organs. 1th ed, 2003, Lyon.
43. Allred DC, Bustamante MA, Daniel VO et al: Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg* 125: 1070-113, 1990.
44. Pertschuk LP, Kim DS, Nayer K et al: Immunohistochemical estrogen and progesterin receptors assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer* 66: 1663-1670, 1990.
45. Cifuentes N, Pickren JW; Metastases from carcinoma of mammary gland: an autopsy study. *J Surg Oncol* 11: 193-295, 1979.
46. Fisher ER, Swamidoss S, Lee CH et al: Detection and significance of occult axillary node metastases in patients with invasive breast cancer. *Cancer* 42: 2025-2031, 1978.
47. Fisher B, Montague E, Redmond C et al: Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results from a prospective randomized clinical trial. *Cancer* 39: 2827-2839, 1977.
48. Goldrich A, Wood WC, Senn HJ et al: Meeting highlights. International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1441-1445, 1995.
49. Mansfield CM, Krishnan L, Komarnicky LT et al: A review of the role of radiation therapy in the treatment of patients with breast cancer. *Semin Oncol* 18: 525-535, 1991.
50. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C et al: Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer with chemotherapy and/or endocrine therapy. *Semin Oncol* 18: 515-524, 1991.
51. Wong K, Henderson IC: Management of metastatic breast cancer. *World J Surg* 18: 98-111, 1994.
52. Carter CL, Allen C, Henson DE: Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63:181-187, 1989.
53. Garner JP, Aspegren K, Linell F et al: Primary prognostic factors in invasive breast cancer with special reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade. *Cancer* 73: 1438-1448, 1994.
54. Pinder SE, Ellis IO, Galea M et al; Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion. Relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 24: 41-47, 1994.
55. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ et al: Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 24: 469-476, 1993.
56. Baak JP, Chin D, Van Diest PJ et al: Comparative long-term prognostic value of quantitative HER-1/neu protein expression, DNA ploidy and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. *Lab Invest* 64: 215-223, 1991.



57. Mitelman F, Johansson B, Mertens F: Mitelman database of chromosome aberrations in cancer. On-line <http://cgap.nci.nih.gov>
58. Nagasaki K, Maass N, Manabe T et al: Identification of a novel gene, DAM 1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 140: 219-226, 1999.
59. Adnane J, Gaudray P, Dionne CA et al: BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* 6: 659-663, 1991.
60. Berns EM, Klijn JG, Van Putten WL et al: c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 52: 1107-1113, 1992.
61. Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaaker R et al: CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88: 415-415, 1997.
62. Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K et al: Frequent overexpression of the cyclinD1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 58:2876-2880, 1998.
63. Tsuda HH: Prognostic and predictive value of c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification in human breast cancer. *Breast Cancer* 8: 38-44, 2001.
64. Monni O, Barlund M, Mousses S et al: Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5711-5716, 2001.
65. Brinkmann U: CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis and cancer. *Am J Hum Genet* 62: 509-513, 1998.
66. Ananda S, Penrhyn-Lowe S et al: AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3: 51-62, 2003.
67. Bieche I, Lidereau R: Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 14:227-251, 1995.
68. Hankins GR, De Souza AT, Bentley RC et al: M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 12:2003-2009, 1996.
69. Brown VL, Proby CM, Barnes DM, Kelsell DP: Lack of mutations within ST7 gene in tumor-derived cell lines and primary epithelial tumors. *Br J Cancer* 87: 208-211, 2002.
70. Chano T, Kontani K, Teramoto K et al: Truncating mutations of RB1CC1 in human breast cancer. *Nat Genet* 31: 285-288.
71. Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K et al: E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancer by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 13: 1919-1925, 1996.
72. Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264: 56-66, 2001.
73. Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E: Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res* 5: 839-844, 1999.
74. Gruberger S, Ringner M, Chen Y et al: Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res* 61: 5979-5984, 2001.



75. Van Veer LJ, Dai H, Van de Vijver MJ et al: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536, 2002.
76. West M, Blanchette C, Dressman H et al: Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11462-11467, 2001.
77. Lakhani S: The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 187: 272-278, 1999.
78. Mincey BA: Genetics and the management of women at high risk for breast cancer. *The Oncologist* 8: 466-472, 2003.
79. Peto J Collins N, Barfoot R et al: Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 943-949, 1999.
80. Cui J, Antoniou AC, Dite S et al: After BRCA1 and BRCA2- what next? Multifactorial segregation analyses of three generation, population-based Australian families affected by female breast cancer. *Am J Hum Genet* 68: 420-431, 2001.
81. Antoniou AC, Pharoah PD, McMulla J et al: Evidence for further cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol* 21: 1-18, 2001.
82. Sevara OM, Mazoyer S, Puget N et al: Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer- susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 60: 486-495, 1997.
83. Lynch HT, Lynch JF: Breast cancer genetics: family history, heterogeneity, molecular genetic diagnosis and genetic counseling. *Curr Probl Cancer* 1: 55-85, 1997.
84. Lopez-Touza A, Cameselle-Teijeiro JF, Senra-Varela A: Familial breast cancer: proposal of new criteria. *The Breast Journal*, 1:70-71, 2001.
85. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA et al: Systemic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 86: 1600-1608, 1994.
86. Lichtenstein RA, Holm NV, Verkasalo PK et al: Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 343: 78-85, 2000.
87. Nelson CL, Sellers TA, Rich SS et al: Familial clustering of colon, breast, uterine and ovarian cancers as assessed by family history. *Genet Epidemiol* 10:235-244, 1993.
88. Anderson DE, Badzioch MD: Familial effects of prostate and other cancers on lifetime breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 28: 107-113, 1993.
89. Parazzini F, Franchesi S, La Vecchia C, Fassoli M: The epidemiology of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 43: 9-23, 1991.
90. Hopper JL, Carlin JB: Familial aggregation of a disease consequent upon correlation between relatives in a risk factor measured on a continuous scale. *Am J Epidemiol* 136: 1138-1147, 1992.
91. Ford D, Easton DF, Peto J: Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet* 57: 1457-1462, 1995.



92. Warner F, Foulkes W, Goodwin P et al: Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 1241-1247, 1999.
93. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Barusch R et al: Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet* 62: 1381-1388, 1998.
94. Eeles RA: Screening for hereditary cancer and genetic testing, epitomized by breast cancer. *Eur J Cancer* 35: 1954-1962, 1999.
95. Anon. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations and sporadic cases. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 349: 1505-1510, 1997.
96. Thompson D, Easton D: Variation in BRCA1 cancer risk by mutation position. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 329-336, 2002.
97. Lakhani SR, O'Hare MJ, Monaghan P et al: The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20: 2310-2318, 2002.
98. Goffin J, Chappuis PO, Wong N, Foulkes WD: Re: Magnetic resonance imaging and mammography in women with a hereditary risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 93:1754-1755, 2001.
99. Lynch HT, Albano W, Heieck JJ et al: Genetics, biomarkers, and control of breast cancer: a review. *Cancer Genet Cytogenet* 13: 43-92, 1984.
100. Lagios MD, Rose MR, Margolin FR: Tubular carcinoma of the breast: association with multicentricity, bilaterality and family history of mammary carcinoma. *Am J Clin Pathol* 73: 25-30, 1980.
101. Eisinger F, Jacquemier J, Charpin C et al: Mutations at BRCA1: the medullary breast revisited. *Cancer Res* 58: 1588-15992, 1998.
102. Rosen PP, Lesser ML, Senie RT, Kinne WD: Epidemiology of breast carcinoma III: relationship of family history to tumor type. *Cancer* 50: 171-179, 1982.
103. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP et al: Multifactorial analyses of differences between sporadic breast cancer and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 90:1138-1145, 1998.
104. Eisinger F, Jacquemier J, Nogues C et al: Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* 85: 2291-12295, 1999.
105. Johannsson OT, Idvall I, Anderson C et al: Tumor biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 33: 362-371, 1997.
106. Crook T, Brooks LA, Crossland S et al: p53 mutation with frequent novel condons but not a mutator phenotype in breast cancer. *Oncogene* 17: 1681-1689, 1998.
107. Crook T, Crossland S, Cropmpton MR et al: p53 mutations in BRCA-1 associated familial breast cancer. *Lancet* 350: 638-639, 1997.
108. Eisinger F, Jacquemier J, Guinebretiere JM et al: p53 involvement in BRCA-1 associated breast cancer. *Lancet* 350:1101, 1997.
109. Osin P, Gusterson BA, Philp E et al: Predicted anti-oestrogen resistance in BRCA-1 associated familial breast cancers. *Eur J Cancer* 34: 1683-1686, 1998.



110. Cappuis PO, Rosenblatt J, Foulkes WD: The influence of familial and hereditary factors on the prognosis of breast cancer. *Ann Oncol* 10: 1163-1170, 1999.
111. Boyd J, Sonoda Y, Federici MG et al: Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 283: 2260-2265, 2000.
112. Lund B, Thomsen HK, Olsen J: Reproducibility of histopathological evaluation in epithelial ovarian cancer. *APMIS* 99: 353-358, 1991.
113. Werness BA, Ramus SJ, Whittmore AS et al: Histopathology of ovarian tumors in women from families with and without germline BRCA1 mutations. *Hum Pathol* 31:1420-1424, 2000.
114. Yaziji H, Gown AM: Immunohistochemical analysis of familial gynecologic tumors. *Int J Gynecol Pathol* 20: 64-78, 2001.
115. Bannatyne P, Russell P: Early adenocarcinoma of the fallopian tubes A case for multifocal carcinogenesis. *Diagn Gynecol Obstet* 3:49-60, 1981.
116. Kaspersen P, Buhl L, Moller BR: Fallopian tube papilloma in a patient with primary sterility. *Acta Obstet Gynecol Scand* 67: 93-93, 1988.
117. Ford D, Easton DF, Bishop DT et al: Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 343: 696-695, 1994.
118. Hall JM, Lee MK, Newman B et al: Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250: 1684-1689, 1990.
119. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71, 1994.
120. Thakur S, Zhang HB, Peng Y et al: Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 17: 444-452, 1997.
121. Wang Y, Cortez D, Yazdi P et al: BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939, 2000.
122. Russell PA, Pharoah PD, DeFoy K et al: Frequent loss of BRCA mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int J Cancer* 87:317-324, 2000.
123. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR et al: Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 21: 236-240, 1999.
124. Cornelis RS, Devilee P, van Vliet M et al: Allele loss patterns on chromosome 17q in 109 breast carcinomas indicate at least two distinct target regions. *Oncogene* 8: 781-785, 1993.
125. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E: Methylation of BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18: 1957-1965, 1996.
126. Bork P, Hofman K, Bucher P et al: A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J* 11:68-76, 1997.
127. Kerr P, Ashworth A: New complexities for BRCA1 and BRCA2. *Curr Biol* 11:R668-R676, 2001.
128. Anon: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Lancet* 351: 1451-1467, 1008.



129. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al: Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant *Am J Hum Genet* 70:26-37, 2002.
130. Vasen HF, Wijnen JT, Menko JF et al: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110: 1020-1027, 1996.
131. Wijnen JT, de Leeuw W, Vasen H et al: Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 23:142-144, 1999.
132. Ichikawa Y, Lemon SJ, Wang S et al: Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet* 112:2-8, 1999.
133. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R et al: Immunohistochemistry for MHL1 and MSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 23:1248-1255, 1999.
134. Park YR, Halling KC, Burgart LJ et al: Microsatellite instability expression and MLH1/MSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: association with family history and histopathology.
135. Planck M, Rambech E, Moslein G et al: Microsatellite instability and loss of mismatch repair protein expression in patients with double primary tumors in the endometrium and colorectum. *Cancer* 94:2501-2510, 2002.
136. Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A et al: Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 3607-3613, 2000.
137. Staebler A, Lax SF, Ellenson LH: Altered expression of hMLH1 and hMSH2 protein in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* 31: 354-358, 2000.
138. Lach FS, Polyak K, Burrell M et al: Expression of mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 56:235-240, 1996. Berends MJ, Hollema H, Wu Y et al: MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int J Cancer* 92: 398-403.
139. Ichikawa Y, Tsunoda H, Takano K et al: Microsatellite instability and immunohistochemical analysis of MLH1 and MSH2 in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial cancer from a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient. *Jpn J Clin Oncol* 32:110-112, 2002.
140. Kolodner RD, Mrisichky GT: Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9:89-96, 1999.
141. Fishel R. The selection for mismatch repair defects hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 61:7369-7374, 2001.
142. De Wind N, Dekker M, van Rossum A et al: Mouse models for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 248-255, 1998.
143. Peltomaki P, Vasen HF: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database of a collaborative study. The International Group on



- Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 113: 1146-1158, 1997.
144. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248-5257, 1998.
 145. De Leeuw WJ, Dierssen J, Vasen HF et al: Prediction of a mismatch repair defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumors from HNPCC patients. *J Pathol* 192: 328-335, 2000.
 146. Salovaara R, Loukola A, Kristo P et al: Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2193-2200, 2000.
 147. Hayatt MA: *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Volume 2.* Elsevier Academic Press 2005.
 148. Neter J, Wasserman W, Kunter MH: *Applied statistical models: Regression, analysis of variance and experimental designs.* 2nd edition. Homewood, IL: Irwin, 1985.
 149. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *JASA* 54:457-481, 1958.
 150. Chan AW, Hrobjartsson A, Haahr M et al: Empirical evidence for selective reporting of outcomes in randomized trials: comparison of protocols to published articles. *JAMA* 291:2457-2465, 2004.
 151. Altman DG, Lausen B, Sauerbrei W et al: Dangers of using 'optimal' cutpoints in the evaluation of prognostic factors. *J Natl Cancer Inst* 86:829-835, 1994.
 152. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
 153. Moinfar F, Man YG, Brathauer GL et al: Genetic abnormalities in mammary ductal intraepithelial neoplasia-flat type. *Cancer* 88:2072-2081, 2000.
 154. Thibodeau SN, French AJ, Rosche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein GM, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ: Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 56: 4836-4840, 1996.
 155. Marcus VA, Maldensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, Temple LK, Hsieh E, Hiruki T, Narod S: Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 23: 1248-1255, 1999.
 156. Walsh T, Chappell SA, Shaw JA, Walker R: Microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 185: 18-24, 1998.
 157. Adem C, Soderberg CL, Cunningham JM, Reynolds C, Sebo TJ, Thibodeau SN, Hartmann LC, Jenkins RB: Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers. *Int J Cancer* 107: 580-582, 2003.
 158. Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM: Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 21: 5696-5703, 2002.
 159. Stone JC, Coleman G, Gusterson B, Marossy A, Lakhani SR, Ward A, McKinna A, A'Hern R, Stratton MR, Houlston RS: Contribution of germline MLH1 and MSH2 mutations to lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 167: 171-174, 2001.



160. Yang Q, Nakamura Y, Nakamura M, Yoshimura G, Suzuma T, Umemura T, Mori I, Sakurai T, Kakudo K: Loss of MSH2 is not associated with FHIT deletion in breast carcinomas. *Anticancer Res* 22: 2591-2595, 2002.
161. Bock N, Meden H, Regenbrecht M, Junemann B, Wangerin J, Marx D: Expression of the mismatch repair protein hMSH2 in carcinoma in situ and invasive cancer of the breast. *Anticancer Res* 20: 119-124, 2000.
162. Charames GS, Bapat B: Genomic instability and cancer. *BJU Int* 93: 19-24, 2004.
163. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396: 643-649, 1998.
164. Modrich P: Mismatch repair, genetic instability and cancer. *Science* 166: 1959-1960, 1994.
165. Karran P: Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Semin Cancer Biol* 7: 15-24, 1996.
166. Peltomaki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21: 1174-1179, 2003.
167. Chapgar A, Magliocci A, Kerviche A, Tan L, Walley B, DeCoteau JF: The replication error phenotype is associated with the development of distant metastases in hormonally treated patients with breast carcinoma. *Cancer* 100: 913-919, 2001.
168. Bock N, Meden H, Regenbrecht M, Junemann B, Wangerin J, Marx D: Expression of the mismatch repair protein hMSH2 in carcinoma in situ and invasive cancer of the breast. *Anticancer Res* 20: 119-124, 2000.
169. Murata H, Khattar NH, Kang Y, Gu L, Li GM: Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 21: 5696-5703, 2002.
170. Laqmani YA, Mathew M, Lobo S: Frequent microsatellite alterations in a predominantly younger age of onset breast cancer population. *Int J Mol Med* 11: 117-124, 2003.
171. Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM: Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 56: 4021-4026, 1996.
172. Rush EB, Calvano JE, Van Zee KJ, Zelenetz AD, Borgen PI: Microsatellite instability in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 4: 310-315, 1997.
173. Sourvinos G, Kiaris H, Tsikkinis A, Vassilaros S, Spandidos DA: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in primary breast cancers. *Tumor Biol* 18: 157-166, 1997.
174. Contegiacomo A, Palmirotta R, DeMarchis L, Pizzi C, Mastranzo P, Delrio P, Patrella F: Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer* 64: 264-268, 1995.
175. Aldaz CM, Chen T, Sahin A, Cunningham J, Bondy M: Comparative allotype of in situ and invasive human breast cancer: high frequency of microsatellite instability in lobular breast cancer. *Cancer Res* 55: 3976-3981, 1995.
176. DeMarchis L, Contegiacomo A, D'Amico C, Palmirotta R, Pizzi C, Ottini L, Mastranzo P, Patrella F, Amanti C: Microsatellite instability is correlated with lymph node positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 3: 241-248, 1997.



177. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res* 54: 1641-1644, 1994.
178. Tokunaga E, Oki E, Oda S, Kataoka A, Kitamura K, Olni S, Maehara Y, Sugimachi K: Frequency of microsatellite instability in breast cancer determined by high resolution microsatellite analysis. *Oncology* 59: 44-49, 2000.
179. Ando Y, Iwase H, Ishihara S, Toyoshima S, Nakamura T, Yamashita H, Toyama T, Omoto Y, Karamatsu S, Mitsuyama S: Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer Lett* 156: 207-214, 2000.
180. Ozer E, Yuksel E, Kizildag S, Sercan O, Ozen E, Canda T, Sakilzi M: Microsatellite instability in early onset breast cancer. *Pathol Res Pract* 198: 525-530, 2002.
181. Benachenhou N, Guiral S, Gorska-Flipot I, Labuta D, Sinnott D: Frequent loss of heterozygosity at the DNA mismatch repair loci hMLH1 and hMSH3 in sporadic breast cancer. *Br J Cancer* 79: 1012-1017, 1999.
182. Jonsson M, Johansson O, Borg A: Infrequent occurrence of microsatellite instability in sporadic and familial breast cancer. *Eur J Cancer* 31A: 2330-2334, 1995.
183. Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Iwata H, Yamashita T, Ito K, Hara Y, Suchi M, Kato T: Microsatellite instability in sporadic human breast cancers. *Int J Cancer* 68: 447-451, 1996.
184. Tomita S, Deguchi S, Miyaguni T, Muto Y, Tamamoto T, Toda T: Analyses of microsatellite instability and the transforming factor- β receptor type II gene mutations in sporadic breast cancer and their correlation with clinicopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 53: 33-39, 1999.
185. Tamura K, Utsunomiya J, Iwama T, Furuyama J, Takagawa T, Takeda N, Fukuda Y, Matsumaoto T, Nishigami T, Kusuhara K, Saagayama K, Nakagawa K, Yamamura T: Mechanism of carcinogenesis in familial tumors. *Int J Clin Oncol* 9: 232-245, 2004.
186. Knudson AG: Hereditary cancer, oncogene and antioncogene. *Cancer Res* 45: 1437-1443, 1985.
187. Prolla TA, Pang Q, Alani E: MLH1, PMSH1 and MSH2 interactions during the initiations of DNA mismatch repair in yeast. *Science* 265: 1091-1093, 1994.
188. Kinzler K, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996.
189. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819, 1993.
190. Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, Bruno M, Lombardi G, Schitulli F, Sensi E, Tancredi M, Bevilacqua G, Caligo MA: Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Ann Oncol* 15 (Suppl): i7-i13, 2004.
191. Starita LM, Parvin JD: The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 15: 345-350, 2003.
192. Venkitaraman AR: Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171-182, 2002.



193. Kubista M, Rosner M, Milolosa A et al: BRCA1 and differentiation. *Mutat Res* 512: 165-172, 2002.
194. Thompson D, Szabo CL, Mangion J et al: Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 827-831, 2002.
195. Zheng L, Li S, Boyer TG, Lee WH: Lessons learned from BRCA1 and BRCA2. *Oncogene* 19: 6159-6175, 2000.
196. Welch PL, Lee MK, Gonzalez-Hernandez RM, Black DJ et al: BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7560-7565, 2002.
197. Perez R, Dubner D, Michelin S et al: Telomeres and genomic damage repair. Their implication in human pathology. *Medicina* 62: 593-603, 2002.
198. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier et al: The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20: 2310-2318, 2002.
199. Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller bh, Leadon SA: BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science* 281: 1009-1012, 1998.
200. Parvin JD: BRCA1 at the branch point. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5952-5954, 2001.
201. Daniel D: Highlight: BRCA1 and BRCA2 proteins in breast cancer. *Microscopy Research and Technique* 59: 68-83, 2002.
202. Fraser JA, Reeves JR, Stanton PD et al: A role for BRCA1 in sporadic breast cancer.
203. Al-Mulla F, Abdulrahman M, Varadharaj G et al: BRCA1 gene expression in breast cancer: a correlative study between real-time PCR and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 53: 621-629, 2005.
204. Lakhani SR, Van de Vijver MJ, Jacquemier J et al: The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20: 2310-2318, 2002.
205. Welch PL, King MC: BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10: 705-713, 2001.
206. Schofield AC, Payne S, Ross VG et al: Immunohistochemical detection of a germ line mutation in a breast and ovarian cancer family. *The Breast* 9: 286-291, 2000.
207. Frank S, Deffenbaugh AM, Rei JE et al: Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2 : analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 20: 1480-1490, 2002.
208. Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R et al: Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer* 88:28-36, 2000.



209. Beger C, Ramadani M, Meyer S et al: Down-regulation of BRCA1 in chronic pancreatitis and sporadic pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 3780-3887, 2004.
210. Chamboa M, Nirde P, Gleizes M et al: Localization of BRCA1 protein in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 79: 107-119, 2003.
211. Wang C, Horiuchi A, Imai T et al: Expression of BRCA1 protein in benign, borderline and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol* 202: 215-223, 2004.
212. Yamane K, Schupp JE, Kinsella TJ: BRCA1 activates a G2-M cell cycle checkpoint following 6-thioguanine-induced DNA mismatch damage. *Cancer Res* 67: 6286-6292, 2007.
213. Zhou BB, Elledge SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439, 2000.
214. McGowan CH, Russell P: The DNA damage response: sensing and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 16: 629-633, 2004.
215. Yamane K, Taylor K, Kinsella TJ: Mismatch repair mediated G2/M arrest by 6-thioguanine involves the ATR-Chk1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 297-302, 2004.
216. Yan T, Desai AB, Jacobberger JW et al: CHK1 and CHK2 are differentially involved in mismatch repair-mediated 6-thioguanine-induced cell cycle checkpoint responses. *Mol Cancer Ther* 3: 1-11, 2004.
217. Jacob S, Aguado M, Fallik D, Praz FL: The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer lines. *Cancer Res* 61: 6555-6562, 2001.
218. Osin P, Lu YJ, Stone J, Crook T, Houlston RS, Gasso M, Gusterson-Shipley J: Distinct genetic and epigenetic changes in medullary breast cancer. *Int J Surg Pathol* 11: 153-158, 2003.
219. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57: 808-811, 1997.
220. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Park Y, Burgart LJ, Hlilling KC, McDonnell SK, Schaid DJ, Walsh Vockley C: The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. *Am J Hum Genet* 69: 780-790, 2001.
221. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham BA, Young JP, Barker MA: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 20: 1043-1048, 2002.
222. Jacinto F, Esteller MI: Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis* 22: 247-253, 2007.
223. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens et al: A strong candidate for the breast and ovarian susceptibility gene BRCA1 and BRCA2. *Science* 266: 66-71, 1994.
224. Friedman LS, Ostemeyer EA, Szabo CL, Dowd P et al: Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8: 387-391, 1994.



225. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR et al: Mutations in the BRCA1 gene in families with early onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 8: 387-391, 1994.
226. King M, Marks JH, Mandell JB: Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302: 643-646, 2003.
227. Merajver SD, Pham TM, Caduff RF et al: Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. *Nat Genet* 9: 439-443, 1995.
228. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS et al: Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet* 9: 444-450, 1995.
229. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR et al: Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. *Nat Genet* 21: 236-240, 1999.
230. Esteller M, Silva J, Dominguez G et al: Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 564-569, 2000.
231. Dobrovic A, Simpfendorfer D: Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 57: 3347-3350, 1997.
232. Catteau A, Harris WH, Xu CF, Solomon E: Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18: 1957-1965, 1999.
233. Thomas DC, Umar A, Kunkel TA: Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. *Mutat Res* 350: 201-205, 1996.
234. Jiricny J: The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 335-346, 2006.
235. Aaltonen LA, Peltomaki P, Schaid D: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816, 1993.
236. Esteller M: Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 36: 2294-2300, 2000.
237. Bocker T, Ruschoff J, Fishel R: Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects. *Biochim Biophys Acta* 1423 O1-O10, 1999.
238. Kane MF, Loda m, Gaida GM et al: Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57: 808-811, 1997.
239. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG: MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17: 2413-2417, 1998.
240. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X et al: hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 155: 1767-1772, 1999.
241. Baylin SB, Herman JG: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16: 168-274, 2000.



242. Herman JG: Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 9: 359-367, 1999.
243. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R et al: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients.
244. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K et al: Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res* 5: 2450-2454, 1999.
245. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH et al: Molecular detection of tumor cells in bronchioalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 332-339, 1999.
246. Shia J, Ellis N, Klimstra D: The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene products. *Virchows Arch* 445: 431-441, 2004.
247. Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C et al: Immunohistochemical pattern of hMSH2/hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences. *Virchows Arch* 438: 39-48, 2001.
248. Debniak T, Kurzawski G, Gorski B, Kladny J et al: Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer* 36: 49-54, 2000.
249. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al: Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 20: 1043-1048, 2002.
250. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R et al: Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 23: 1248-1255, 1999.
251. Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R et al: The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) – results of an international collaborative study. *Fam Cancer* 1: 87-92, 2001.
252. Salahshor S, Koelble K, Rubio C, Lindblom A: Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest* 81: 535-541, 2001.
253. Ward R, Meagher A, Tomlinson I et al: Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48: 821-829, 2001.
254. Walsh T, Chappell SA, Shaw JA, Walker R: Microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 185: 18-24, 1998.
255. Adem C, Soderberg CL, Cunningham JM, Reynolds C, Sebo TJ, Thibodeau SN, Hartmann LC, Jenkins RB: Microsatellite instability in hereditary and sporadic breast cancers. *Int J Cancer* 107: 580-582, 2003.
256. Loach FS, Polyak K, Burrell M et al: Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 56: 235-240, 1996.
257. Parsons R, Li GM, Longley M et al: Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 75: 1227-1235, 1993.



258. Eshleman JR, Markowitz SD: Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol* 7: 83-89, 1995.
259. Sato T, Akiyama F, Sakamoto G et al: Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. *Cancer Res* 51: 5794-5799, 1996.
260. Friedrich M, Meyberg R, Villena-Heinsen C et al: Immunohistochemical analysis of DNA mismatch repair enzyme hMSH2 and Ki-67 in breast carcinomas. *Anticancer Res* 19: 3349-3354, 1999.
261. Murata H, Khattar N, Kang Y, Gu L, Li GM: Genetic and epigenetic mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 21: 5695-5703, 2002.
262. Wada-Hiraike O, Yano T, Nei T et al: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor-alpha. *Br J Cancer* 92: 2286-91, 2005.
263. Murata H, Khattar N, Kang Y, Gu L, Li GM: Roles of mismatch repair proteins hMSH2 and hMLH1 in the development of sporadic breast cancer. *Cancer Lett* 223: 143-150, 2005.
264. Karihtala P, Winqvist R, Syvaaja JE, Kinnuka VL, Soini Y: Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 42:2653-2659, 2006.
265. Fischer D, Horn AK, Diedrich K, Friedrich M: Immunohistochemistry of proteins for DNA mismatch repair in correlation to prognostic factors of mammary cancer. *Oncol Rep* 17: 1223-1227, 2007.
266. Saad RS, Liu YL, Nathan G et al: Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol* 17: 197-203, 2004.
267. Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P et al: Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. *Curr Cancer Drug Targets* 3: 427-432, 2003.
268. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R et al: Podoplanin: a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma. *Verh Deutsch Ges Pathol* 83: 270-275, 1999.
269. Birner P, Schindl M, Obermair A et al: Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 20: 2981-2985, 2000.
270. Schoppman SE, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S: Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 21: 2351-2355, 2001.
271. Schoppman SE, Bayer G, Aumayar K et al: Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg* 240: 306-312, 2004.
272. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE: Lymphangiogenesis quantification using quantitative PCR and breast cancer as a model. *Biochem Biophys Commun* 288: 1043-1046, 2001.
273. Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE: Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol* 17: 863-870, 2002.



274. Morabito A, Sarmiento R, Bonginelli P, Gasparini G: Antiangiogenic strategies, compounds and early clinical results in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 91-107, 2004.
275. Zekri A, Bahnassi A, Bove B et al: Allelic instability as a predictor of survival in Egyptian breast cancer patients. *Int J Oncol* 15: 757-767, 1999.
276. Paulson TG, Wright FA, Parker BA et al: Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res* 56: 4021-4026, 1996.
277. Tomita S, Deguchi S, Miyagumi T et al: Analyses of microsatellite instability and the transforming growth factor- β receptor type II gene mutation in sporadic breast cancer and their correlation with clinicopathological features. *Breast Cancer Res Treat* 53: 33-39, 1999.
278. Byung HS, Sei HA, Chang AK et al: Significance of mismatch repair protein expression in the chemotherapeutic response of sporadic invasive ductal carcinoma of the breast. *The Breast Journal* 10: 20-27, 2004.
279. Brown R, Hirst GL, Gallagher WM et al: hMLH1 expression and cellular response of ovarian tumor cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* 15: 45-52, 1997.
280. Drummond JT, Anthony A, Brown R, Modrich P: Cisplatin and adriamycin resistance are associated with mutLa and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem* 271: 645-648, 1996.
281. Strathdee G, MacKean M, Illand M, Brown R: A role for methylation of the hMLH1 promoter on loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer. *Oncogene* 18: 133501341, 1999.
282. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4: 1-6, 1998.
283. Friedman HS, Johnson SP, Dong Q et al: Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. *Cancer Res* 57: 2933-2936, 1997.
284. Liu L, Markowitz S, Gerson SL: Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis (2-chloroethyl) nitrosurea. *Cancer Res* 56: 5375-5379, 1996.
285. Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R et al: Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res* 56: 3087-3090, 1996.
286. Fink D, Nebel S, Aebi S et al: The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56: 4881-4886, 1995.
287. Swann PF, Waters TR, Moulton DC et al: Role of postreplication DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 273: 1109-1111, 1996.
288. Aebi S, Fink D, Gordon R et al: Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 3: 1763-1767, 1997.
289. Chaves P, Cruz C, Lage P et al: Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with mutator phenotype. *J Pathol* 191: 355-360, 2000.



290. Mackay HJ, Cameron D, Rahilly M et al: Reduced MLH1 expression in breast tumors after primary chemotherapy predicts disease-free survival. *J Clin Oncol* 18: 87-93, 2000.
291. Wild P, Reichle A, Andreesen R et al: Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem -cell transplantation. *Clin Cancer Res* 10: 5560-564, 2004.

