



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Διευθυντής: Η Καθηγήτρια Ν.Ι. Αγγιάνη

**«Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά πρωτοπαθών
καρκινωμάτων μαστού με κατ' εξοχήν μεταστατική νόσο»**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Ι. ΚΟΡΔΕΛΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026600336945



Ag. EIG: 11043/2013





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
Διευθυντής: Η Καθηγήτρια Ν.Ι. Αγνάντη

**«Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά πρωτοπαθών
καρκινωμάτων μαστού με κατ' εξοχήν μεταστατική νόσο»**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Ι. ΚΟΡΔΕΛΛΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα
Ν. 5343/32, άρ 202, παρ 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος



Ημερομηνία αίτησης της κ. Κορδέλλα Βασιλικής: 28-11-2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 442^ο/15-5-2001

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παυλίδης Νικόλαος Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπάη Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 11-7-2001

«Ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά πρωτοπαθών καρκινωμάτων μαστού με κατ' εξοχήν μεταστατική νόσο»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 605^ο/15-5-2007

Αγνάντη Νίκη	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καναβάρος Παναγιώτης	Καθηγητής Ανατομίας που καλύπτει και την Ιστολογία-Εμβρυολογία της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παυλίδης Νικόλαος	Καθηγητής Παθολογίας –Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Στεφάνου Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάη Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπατιστάτου Άννα	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπριασούλης Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-6-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΑΙΤΗΣΗΣ:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ν. Αγνάντη,

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ

Ν. Παυλίδης,

Καθηγητής Ογκολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μ. Μπάη,

Αν Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος:

Ημερομηνία κατάθεσης της διατριβής:

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ν. Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθ. Ανατομικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μ. Μπάη, Αν Καθηγήτρια Παθ. Ανατομικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ε. Μπριασούλης, Επικ Καθηγητής Ογκολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

4

5

6

7

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής

Ευαγγελία Τσαγγαλά



Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφιερώνεται στα παιδιά μου
Παναγιώτη, Οδυσσέα, Κατερίνα

‘Άνθρωπος φύσει ορέγεται ειδέναι’ {Αριστοτέλης}



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΜΑΣΤΟΣ	1
1.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ [1,2]	1
2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ [3]	7
2.1 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ [4,5]	8
2.2 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ [6]	10
2.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	12
3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ [11]	15
3.1 ΚΥΚΛΙΝΕΣ: ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	16
3.2 ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ-ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	19
4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	27
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
4.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗΣ	28
4.3 ΕΙΔΗ ΟΣΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	31
4.3.1 ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	32
4.3.2 ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΙΚΕΣ (ΛΥΤΙΚΕΣ) ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ	33
4.4 ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ (ΕΙΚΟΝΑ 5).	35
5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	39
5.1 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	39
5.2 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	40
5.3 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	41
6 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ [87,88]	43



6.1	ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	43
6.2	ΜΕΘΟΔΟΙ	46
6.2.1	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΪΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	47
6.2.2	ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΑΒΙΔΙΝΗΣ-ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ (ABC)	49
6.2.3	ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ	49
6.2.4	ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΕΝΟΣ Η ΤΩΝ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΔΕΞΤΡΑΝΗΣ (ΕΡΟΣ Η TWO STEP METHOD- DAKO EN VISION+ DEXTRAN TECHNOLOGY)	50
7	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
7.1	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ-ΣΥΛΛΟΓΗ-ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΠΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	59
7.2	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	60
7.3	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	60
7.4	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ. ΔΕΙΚΤΕΣ	61
8	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
9	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
10	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
11	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	79
12	ABSTRACT	81
13	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91



Η παρούσα διδακτορική διατριβή, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2002-2006 Μέσα από τις επόμενες γραμμές θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν ουσιαστικά στην πραγματοποίησή και ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτή μου, κα Νίκη Αγνάντη, Διευθνή του Παθολογοανατομικού-Κυτταρολογικού Εργαστηρίου Αντιπρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και επικεφαλής της τριμελούς επιτροπής, για την ανάθεση και επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής. Εκφράζω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου για την αμέριστη ηθική υποστήριξη, το συνεχές αδιάπτωτο ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη. Επιθυμώ να επισημάνω στο σημείο αυτό ότι θεωρώ ευλογία το γεγονός ότι βρέθηκα δίπλα σε μια τόσο μεγάθυμη προσωπικότητα .

Ευχαριστώ επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτή Παθολογικής Ανατομικής, κυρία Μαρία Μπάη ,μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την ουσιαστική συμβολή της στην εκτέλεση της διδακτορικής διατριβής

Ευχαριστώ τον Καθηγήτή Ογκολογίας κύριο Νικόλαο Παυλίδη μέλος της τριμελούς επιτροπής για την προσφορά της κλινικής σειράς και την ενθάρρυνση στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγήτή κο Παναγιώτη Καναβάρο, στον Αναπληρωτή Καθηγήτή κο Δημήτριο Στεφάνου και στους Επίκουρους Καθηγητές κο Ευάγγελο Μπριασούλη και κα Άννα Μπατιστάτου για τη συμμετοχή στην επταμελή εξεταστική επιτροπή καθώς και τις εποικοδομητικές συμβουλές και τις τελικές υποδείξεις τους στην παρούσα διατριβή.

Επιθυμώ επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους τεχνολόγους (ΕΤΕΠ) του Πανεπιστημιακού Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου Ιωαννίνων κα Αντιγόνη Χριστοδούλου και Μιχάλη Αλεξίου για τη συμβολή τους στην πραγματοποίηση του τεχνικού μέρους της εργασίας .



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες, όπως καταγράφεται στις λεγόμενες Δυτικού τύπου κοινωνίες. Στις ασθενείς αυτές, οι μεταστάσεις σε απομακρυσμένες θέσεις αποτελούν την κύρια αιτία κατάληξης από τη νόσο η δε πρόγνωση διαφοροποιείται ανάλογα με τα όργανα εντόπισης και την πολλαπλότητα των μεταστάσεων.

Ένα ιδιαίτερο πρότυπο κλινικής συμπεριφοράς μεταστατικής νόσου του καρκίνου του μαστού αποτελεί η εκδήλωση μόνον οστικών εντοπίσεων και η απουσία σπλαχνικών μεταστάσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η αναγνώριση αυτού του μεταστατικού προτύπου ως κλινική οντότητα, έγινε πρόσφατα μετά από τεκμηριωμένη μελέτη σειράς ασθενών και δημοσιεύθηκε από ερευνητές της Ογκολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων[111]. Η γνώση αυτής της υποομάδας έχει βαρύνουσα κλινική σημασία τόσο αναφορικά με την πρόγνωση αυτών των ασθενών όσο και την επιλογή των κατάλληλων θεραπευτικών χειρισμών.

Ως συνέχιση αυτής της κλινικής εργασίας είχα την τιμή και την ευκαιρία να εκπονησω υπο την καθοδήγηση της Καθηγήτριας κ. Νικης Ι. Αγνάντη και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Μαρίας Μπάη, την παρούσα διδακτορική διατριβή η οποία εστιάστηκε στην αναζήτηση του ιδιάζοντος βιολογικού προφίλ των πρωτοπαθών όγκων αυτών των ασθενών. Δεδομένης της τρέχουσας ενασχόλησης του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων με τα μόρια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και την προγνωστική σημασία στον καρκίνο του μαστού πολλών από αυτά, η μελέτη αυτή εστιάστηκε στη συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων – ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου όπως οι κυκλίνες D1, D2, D3, E, A, B, των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών όπως p27, p21, καθώς και της πρωτεΐνης, p53. Ο προσδιορισμός χαρακτηριστικού βιολογικού προφίλ των πρωτοπαθών όγκων αυτών των ασθενών, που είναι εύκολα αναγνωρίσιμο με την εφαρμογή ανοσοιστοχημείας, αναμενεται να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη πιο αποδοτικών και στοχευμένων θεραπειών ώστε οι συγκεκριμένες ασθενείς να αποκομίσουν κλινικά οφέλη και ποιότητα ζωής.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



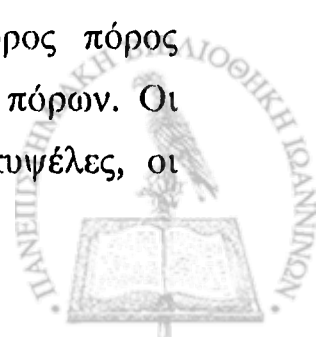
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΜΑΣΤΟΣ

1.1 Στοιχεία Ανατομικής

Ο μαζικός αδένας, περιβλημένος από ινώδη και λιπώδη ιστό, εκτείνεται από την παραστερνική μέχρι τη μέση μασχάλιαία γραμμή. Χειρουργικά, η περιοχή του οργάνου, εκτείνεται σε βάθος κάτω από το μείζονα και ελάσσονα θωρακικό μυ έως τους μεσοπλευρίους, διότι η λεμφική αποχέτευσή του καταλαμβάνει το επίπεδο αυτό. Η οπίσθια επιφάνεια του αδένου, έρχεται σε επαφή με την περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός και σε μικρή έκταση με τον πρόσθιο οδοντωτό. Συχνά σχηματίζεται προσεκβολή προς τη μασχάλη, η ουρά του μαζικού αδένου, η οποία συνήθως είναι ορατή και ψηλαφητή και μπορεί να αποτελέσει θέση αναπτύξεως νεοπλασμάτων καλοήθων και κακοήθων.

Το μέγεθος του μαστού δεν ανταποκρίνεται στην εκκριτική του ικανότητα διότι το μεγαλύτερο τμήμα της μάζας του αποτελείται από λιπώδη ιστό. Ο εκκριτικός μηχανισμός του μαστού, αποτελείται από 12 ή περισσότερους λοβούς, οι οποίοι συγκλίνουν ακτινωτά προς τη θηλή. Κάθε λοβός, καταλήγει σε εκφορητικό πόρο (γαλακτοφόρο) που εκβάλλει ανεξάρτητα στο δέρμα της θηλής, αφού προηγουμένως σχηματίσει μια ατρακτοειδή διεύρυνση κάτω από τη θηλή, στην οποία προσωρινά συλλέγονται οι παραγόμενες εκκρίσεις. Οι λοβοί, διαιρούνται από τον υποδόριο συνδετικό ιστό σε λόβια και στη συνέχεια στις τελικές εκκριτικές μονάδες, τις αδενικές κυψέλες. Ο γαλακτοφόρος πόρος σχηματίζεται από τη συμβολή των λοβιακών εκφορητικών πόρων. Οι τελικές απολήξεις των πόρων σχηματίζουν τις αδενικές κυψέλες, οι



οποίες αποτελούνται από βασική μεμβράνη λεπτή στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων και μια στιβάδα κυλινδρικών αδενικών κυττάρων. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, ανευρίσκονται σε πολλαπλάσιο αριθμό στους εκφορητικούς πόρους και στους πιο ευμεγέθεις, έχουν σπειροειδή διάταξη που συντελεί στην προώθηση του γάλακτος κατά την περίοδο της γαλουχίας. Το τελικό τμήμα των πόρων, από την ατρακτοειδή διεύρυνση έως την εκβολή τους στο δέρμα, καλύπτεται από πλακώδες επιθήλιο. Οι αδενικές κυψέλες είναι ελάχιστες κατά την περίοδο ηρεμίας του οργάνου, ενώ αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό κατά την κύηση. Ο υποδόριος ινολιπώδης ιστός, που αποτελείται από την επιπολής περιτονία, περιβάλλει το εκκριτικό παρέγχυμα και σχηματίζει προσεκβολές που διαχωρίζουν τα λόβια. Κάθε πόρος, παράλληλα, περιβάλλεται από προεκτάσεις του συνδετικού ιστού που συνέχονται με το δέρμα, γνωστές ως σύνδεσμοι. Όταν ένα καρκίνωμα αναπτύσσεται σε κάποια θέση του μαζικού αδένου, το υπερκείμενο δέρμα έλκεται στα σημεία κατάφυσης των εν λόγω συνδέσμων, διότι οι δοκίδες αυτές του συνδετικού ιστού δεν επιμηκύνονται παράλληλα με την ανάπτυξη του νεοπλασματικού αδενικού παρεγχύματος. Κατά τη γαλουχία, ο συνδετικός ιστός, ο οποίος είναι στερρός, ατροφεί και παρουσιάζει απώλεια της ελαστικότητάς του λόγω της αύξησης των αδενικών στοιχείων.

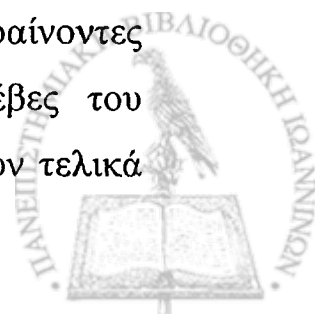
Μεταξύ του μαστού και του μείζονος θωρακικού μυός, παρεμβάλλεται το οπίσθιο πέταλο της επιπολής περιτονίας, το οποίο σε ορισμένα σημεία διατιτραίνεται από το μαζικό αδένου. Λόγω της ανατομικής αυτής συνάφειας, κατά τη μαστεκτομή, συνιστάται -από μια ισχυρή χειρουργική άποψη- να αφαιρείται και η περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός, τουλάχιστον σε νεοπλάσματα που εντοπίζονται προς την οπίσθια επιφάνεια του οργάνου.



Το δέρμα εμφανίζει τη θηλή και πέριξ αυτής τη θηλαία άλω. Η θηλή αποτελεί τροποποιημένη κωνική-ημισφαιρική προβολή, στην οποία εκβάλλουν τα στόμια των γαλακτοφόρων πόρων. Το δέρμα της θηλής είναι πολύ λεπτό και τραυματίζεται εύκολα, ιδίως κατά τη γαλουχία. Η θηλαία άλως αποτελεί κυκλική περιοχή του δέρματος, η οποία, στην επιφάνειά της παρουσιάζει υπεγέρσεις που προκαλούνται από δερματικούς αδένες. Το έκκριμα εξυπηρετεί την εφύγρανση της θηλής κατά τη γαλουχία. Το χρώμα της θηλής και της άλω σε νεαρά άτομα είναι ανοικτό κόκκινο, ενώ κατά την κύηση μετατρέπεται σε σκούρο καφέ. Η υπέρχρωση αυτή διατηρείται και μετά τον τοκετό, προοδευτικά αυξανόμενη σε κάθε μετέπειτα εγκυμοσύνη.

Οι αρτηρίες αποτελούν τρεις ομάδες. Οι διατιτραίνοντες κλάδοι της έσω μαστικής φέρονται παραστερνικά στα πρώτα έξι μεσοπλεύρια διαστήματα. Από αυτούς συνήθως μόνο δύο έως τρεις φέρονται προς τα έξω σχεδόν υποδόρια μέχρι τη θηλή, ενώ αναστομώνονται με άλλες μεσοπλεύριες και κλάδους της μασχαλιαίας και υποκλειδίου. Οι κλάδοι της μασχαλιαίας προέρχονται είτε απ ευθείας από αυτή ή από τον ακρομιοθωρακικό κλάδο της και αφού διέρχονται από τους θωρακικούς μυς πορεύονται σχεδόν κάθετα από την κλείδα προς τη θηλή. Τέλος, η τρίτη ομάδα αρτηριών προέρχεται από τον πλάγιο θωρακικό κλάδο της μασχαλιαίας αρτηρίας και φέρονται από το έξω χείλος του μείζονα θωρακικού προς το μαστό.

Οι φλέβες σχηματίζουν τις ίδιες τρεις ομάδες, οι οποίες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι όλες αποτελούν οδούς αιματογενούς μεταφοράς νεοπλασματικών εμβόλων προς τους πνεύμονες. Οι διατιτραίνοντες κλάδοι της έσω μαστικής αποτελούν τις μεγαλύτερες φλέβες του οργάνου, οι οποίες από τα μεσοπλεύρια διαστήματα καταλήγουν τελικά

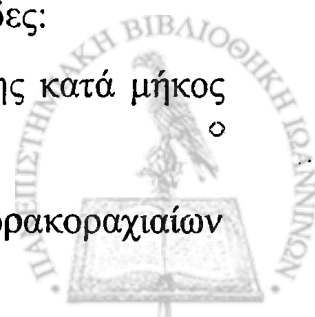


στην ανώνυμη φλέβα. Οι κλάδοι της μασχαλιαίας φλέβας, επίσης καταλήγουν στην άνω κοίλη φλέβα και κατ' επέκταση στο πνευμονικό δίκτυο, όπως και οι μεσοπλεύριες φλέβες μέσω της αζύγου. Οι μεσοπλεύριες αναστομώνονται και με τις σπονδυλικές φλέβες. Οι υποδόριες φλέβες σχηματίζουν πλούσιο δίκτυο που διατείνεται κατά την κύηση και αποχετεύει το αίμα προς την έσω μαστική.

Η γνώση της λεμφικής αποχέτευσης είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς η λεμφογενής αποτελεί τη συχνότερη οδό μετάστασης του οργάνου. Τα λεμφαγγεία του μαστού σχηματίζουν δύο κύρια απαγωγά στελέχη προς τη μασχάλη, το έξω και το έσω. Το έξω, άρχεται από το υποθηλαίο δίκτυο και από το έξω χείλος του μείζονος θωρακικού μυός καταλήγει στους ανώτερους λεμφαδένες της μασχάλης, αποχετεύοντας τη λέμφο του άνω ημιμορίου του μαστού. Το έσω, από το έσω τμήμα του δικτύου, φέρεται προς τα κάτω και πλάγια και γύρω από το έξω χείλος του μείζονα θωρακικού μυός καταλήγοντας και πάλι στους κατώτερους λεμφαδένες του μαστού. Εκτός από τις δύο κύριες οδούς, λεμφαγγεία σχηματίζονται και στην οπίσθια επιφάνεια του μαστού, τα οποία διατιτραίνουν το μείζονα θωρακικό μυ και εκβάλλουν στην υποκλείδια ομάδα των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Λεμφαδένες που ευρίσκονται στη διαδρομή αυτή μεταξύ μείζονος και ελάσσονος θωρακικού μυός αποτελούν τους λεμφαδένες, οι οποίοι είναι δυνατό να διηθηθούν σε καρκινώματα του μαστού και οι οποίοι θα πρέπει να αφαιρούνται κατά την τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή.

Οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες σχηματίζουν πέντε κύριες ομάδες:

- α) τους έξω μαστικούς, στην έσω επιφάνεια της μασχάλης κατά μήκος της πλάγιας θωρακικής φλέβας
- β) τους υποπλάτιους, κατά μήκος των υποπλάτιων και θωρακοραχιαίων



αγγείων, εκτεινόμενοι από το πλάγιο θωρακικό τοίχωμα έως τη μασχαλιαία φλέβα

γ) τους κεντρικούς, εντός του λίκους της μασχαλιαίας κοιλότητας, οι οποίοι πρώτοι συνήθως ψηλαφώνται

δ) της μασχαλιαίας φλέβας, κατά μήκος του έξω τμήματος της φλέβας και

ε) τους υποκλείδιους ή κορυφαίους, στην κορυφή της μασχάλης και στους οποίους καταλήγουν προσαγωγή λεμφαγγεία από τις υπόλοιπες ομάδες.

Οι υπερκλείδιοι λεμφαδένες είναι δυνατόν να διηθηθούν διότι τα απαγωγά λεμφαγγεία των υποκλείδιων λεμφαδένων αναστομώνονται με λεμφαγγεία που καταλήγουν σε αυτούς στη συμβολή της έσω σφαγίτιδας με την υποκλείδια φλέβα. Η διήθηση των λεμφαδένων αυτών, αποτελεί ένδειξη μη ριζικά εξαιρεσίμου νεοπλάσματος, διότι λόγω της στενής επαφής με το φλεβικό σύστημα υπάρχει συνήθως γενικευμένη διασπορά. Οι λεμφαδένες της έσω μαστικής δέχονται απαγωγά λεμφαγγεία από το κεντρικό και έσω τμήμα του μαστού, τα οποία διατιτραίνουν το μείζονα θωρακικό μυ στα μεσοπλεύρια διαστήματα. Η ομάδα αυτή απάγει τη λέμφο ή στη φλεβώδη γωνία ή και στους κατώτερους υπερκλείδιους. Λεμφαγγεία επίσης από το δέρμα του μαστού, διασταυρώνονται με αντίστοιχα του άλλου μαστού και έτσι εξηγούνται οι μεταστάσεις καρκινώματος του μαστού στους λεμφαδένες της αντίστοιχης μασχάλης. Παράλληλα, λεμφαγγεία εντοπίζονται και στην εν τω βάθει θωρακική περιτονία. [1,2]



2 Στοιχεία Εμβρυολογίας

Οι μαστικοί αδένες αποτελούν τροποποιημένους αποκρινείς αδένες, οι οποίοι εμφανίζονται κατά μήκος της μαστικής ακρολοφίας σε αμφότερες τις πλευρές του σώματος. Την 4^η εβδομάδα αναπτύσσεται ένα ζεύγος επιδερμικών παχύνσεων, που ονομάζονται μαστικές ακρολοφίες ή γραμμές κατά μήκος αμφοτέρων των πλευρών του σώματος, από την περιοχή της μελλοντικής μασχάλιαίας χώρας μέχρι τη μελλοντική βουβωνική χώρα και την έσω επιφάνεια του μηρού. Στον άνθρωπο, αυτές οι ακρολοφίες, φυσιολογικά εξαφανίζονται εκτός από τη θέση των μαστών. Την 5^η εβδομάδα, τα υπολείμματα της μαστικής ακρολοφίας παράγουν την πρωτογενή καταβολή του μαστικού αδένος. Η εν λόγω καταβολή καταδύεται στο υποκείμενο χόριο. Τη 10^η εβδομάδα, η πρωτογενής καταβολή αρχίζει να διακλαδίζεται και μέχρι τη 12^η εβδομάδα έχουν σχηματιστεί αρκετές δευτερογενείς καταβολές. Οι εν λόγω καταβολές επιμηκύνονται και διακλαδίζονται καθ' όλη την υπόλοιπη κύηση, ενώ οι προκύπτοντες πόροι αποκτούν αυλό με τη συνένωση μικρών κοιλοτήτων. Κατά τη γέννηση, οι μαστικοί αδένες αποτελούνται από 15-25 γαλακτοφόρους πόρους, που εκβάλλουν σε ένα μικρό επιφανειακό εντύπωμα, το οποίο ονομάζεται μαστικό βοθρίο. Ο πολλαπλασιασμός του υποκείμενου μεσοδέρματος μετατρέπει συνήθως αυτό το βοθρίο σε προέχουσα θηλή, εντός ολίγων εβδομάδων μετά τη γέννηση, μολονότι σε σπάνιες περιπτώσεις η θηλή παραμένει εισελκόμενη (ανεστραμμένη θηλή). Το δέρμα που περιβάλλει τη θηλή πολλαπλασιάζεται επίσης και σχηματίζει τη θηλαία άλω.

Δεν είναι εξαιρετικά ασυνήθης ο σχηματισμός μιας ή περισσότερων



υπεράριθμων θηλών (πολυθηλία) ή υπεράριθμων μαστών (πολυμαστία) κατά μήκος της γραμμής των μαστικών ακρολοφιών. Η πιο συχνή εντόπιση παρατηρείται αμέσως υπό των φυσιολογικών μαστών. Υπεράριθμες θηλές παρατηρούνται με την ίδια περίπου συχνότητα τόσο στα άρρενα όσο και στα θήλεα άτομα. Σε σπανιότερες περιπτώσεις, η έκτοπη θηλή σχηματίζεται εκτός της γραμμής της μαστικής ακρολοφίας, λόγω μετανάστευσης μαστικού ιστού. Οι υπεράριθμοι μαστοί συνήθως ανακαλύπτονται κατά την ήβη ή την εγκυμοσύνη, οπότε διογκώνονται ή εκκρίνουν γάλα, αποκρινόμενοι στις διεγείρουσες ορμόνες. [3]

2.1 Στοιχεία Ιστολογίας

Οι αδένες των μαστών χαρακτηρίζονται ως σύνθετοι σωληνοκυψελοειδείς και αποτελούνται από 15-20 λοβούς ακτινωτά διατεταγμένους πέριξ της θηλής. Οι εν λόγω αδένες χωρίζονται μεταξύ τους από λιπώδη και κολλαγόνο συνδετικό ιστό. Κάθε λοβός αποχετεύεται στο δικό του γαλακτοφόρο πόρο, ο οποίος οδηγεί στη θηλή εκβάλλοντας στην επιφάνειά της. Καθένας από αυτούς τους πόρους, πριν καταλήξει στη θηλή, διευρύνεται σχηματίζοντας γαλακτοφόρο πόρο για την αποθήκευση του γάλακτος, ενώ εν συνεχεία στενώνεται προς την απόληξή του.

Οι αδρανείς ή μη εκκρίνοντες μαστικοί αδένες των μη εγκυμονούντων γυναικών έχουν την ίδια βασική αρχιτεκτονική όπως και οι γαλουχούντες (ενεργοί), με εξαίρεση ότι είναι μικρότεροι και χωρίς ανεπτυγμένες αδενοκυψέλες, γεγονός που συμβαίνει μόνο κατά τη διάρκεια της κύησης. Κοντά στην εκβολή τους στη θηλή, οι γαλακτοφόροι πόροι επενδύονται από πολύστιβο πλακώδες (κερατινοποιημένο) επιθήλιο. Ο γαλακτοφόρος κόλπος και αντίστοιχα πόρος που οδηγεί σε αυτόν

επενδύονται από πολύστιβο κυβικό επιθήλιο, ενώ οι μικρότεροι πόροι που οδηγούν στο γαλακτοφόρο πόρο επενδύονται από μονόστιβο κυλινδρικό επιθήλιο. Τα αστεροειδή μυοεπιθηλιακά κύτταρα που εντοπίζονται μέσω του επιθηλίου και του βασικού υμένα περιελίσσονται γύρω από τις αναπτυσσόμενες αδενοκυψέλες και καθίστανται λειτουργικά κατά τη διάρκεια της κήσεως.

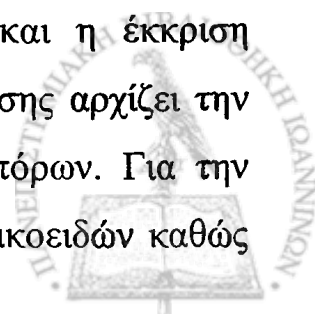
Οι αδενοκυψέλες του γαλουχούντος (ενεργού) μαζικού αδένου αποτελούνται από κυβικά κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται εν μέρει από πλέγμα μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Τα εν λόγω εκκριτικά κύτταρα διαθέτουν άφθονο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και μιτοχόνδρια, μερικά συμπλέγματα, πολλά λιποσταγονίδια, καθώς και πολυάριθμα κυστίδια, περιέχοντα καζείνες (πρωτείνες του γάλακτος) και γαλακτόζη. Δεν ανευρίσκονται όμως όλες οι περιοχές των αδενοκυψελών στο ίδιο στάδιο παραγωγής, διότι οι διάφορες αδενοκυψέλες παρουσιάζουν ποικίλα στάδια προετοιμασίας για τη σύνθεση των ουσιών αυτών. Οι εκκρίσεις των κυττάρων των αδενοκυψελών είναι δύο ειδών: λιπίδια και πρωτείνες. Τα λιπίδια αποθηκεύονται με τη μορφή σταγονιδίων εντός του κυτταροπλάσματος. Η έκκρισή τους εκ μέρους των εκκριτικών κυττάρων πιθανώς επιτελείται με αποκρινή τρόπο εξωκυττάρωσης κατά τον οποίο μικρά σταγονίδια συρρέουν σχηματίζοντας διαρκώς μεγαλύτερα, τα οποία μετακινούνται προς το κορυφαίο τμήμα του κυττάρου. Κατά την προβολή τους στον αυλό, λαμβάνουν τη μορφή κυτταροπλασματικών φυσαλίδων. Οι εν λόγω περιέχουσες λιποσταγονίδια φυσαλίδες, αποκόπτονται και καθίστανται τμήμα του εκκριτικού προϊόντος. Κάθε φυσαλίδα αποτελείται τότε από ένα κεντρικά κείμενο λιποσταγονίδιο, το οποίο περιβάλλεται από μια στενή ζώνη κυτταροπλάσματος και εντελώς εξωτερικά από κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτείνες που συντίθενται μέσα στα εκκριτικά αυτά κύτταρα εκκρίνονται μεροκρινώς στον εξωκυττάριο χώρο.



Το κυκλικό, έντονα κεχρωσμένο δέρμα στο κέντρο της επιφάνειας του μαστού αποτελεί τη θηλαία άλω. Στην παρυφή της περιέχει ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες καθώς και τους θηλαίους αδένες. Στο κέντρο της θηλαίας άλω υπάρχει η θηλή, μια προεξέχουσα δομή, η οποία καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, που περικλείει τα τελικά στόμια των γαλακτοφόρων πόρων. Το στρώμα της θηλής αποτελείται από πυκνό κολλαγόνο ιστό, με άφθονες ελαστικές ίνες συνδεδεμένες με το περιβάλλον δέρμα ή διαπλεγμένες με το συνδετικό ιστό, καθώς και από άφθονα λεία μυϊκά κύτταρα. Η ρίκνωση του δέρματος της θηλής οφείλεται στην πρόσφυση σε αυτό ελαστικών ινών. Τα άφθονα λεία μυϊκά κύτταρα είναι διατεταγμένα κατά δύο τρόπους: κυκλοτερώς περίξ της θηλής και ακτινοειδώς αποκλίνοντα από το διαμήκη άξονα της θηλής. Στη συστολή αυτών των μυϊκών κυττάρων οφείλεται η ανόρθωση της θηλής. Οι περισσότεροι των σμηγματογόνων αδένων που εντοπίζονται γύρω από τους γαλακτοφόρους πόρους εκβάλλουν στην επιφάνεια ή στα πλάγια της θηλής, αν και μερικοί καταλήγουν στους πόρους προτού αυτοί εκβάλλουν στην επιφάνεια. [4,5]

2.2 Στοιχεία Φυσιολογίας

Οι μαζικοί αδένες αναπτύσσονται κατά τον ίδιο τρόπο και παρουσιάζουν την ίδια δομή σε αμφότερα τα φύλα μέχρι την ήβη, κατά την οποία όμως οι μεταβολές των ορμονικών εκκρίσεων στο θήλυ προκαλούν περαιτέρω ανάπτυξη και δομικές μεταβολές των αδένων. Η έκκριση οιστρογόνων και προγεστερόνης από τις ωοθήκες καθώς επίσης και η έκκριση προλακτίνης από τα οξεόφιλα κύτταρα της αδενουπόφυσης αρχίζει την ανάπτυξη των λοβίων και των τελικών εκφορητικών πόρων. Για την πλήρη ανάπτυξή τους απαιτείται η παρουσία γλυκοκορτικοειδών καθώς

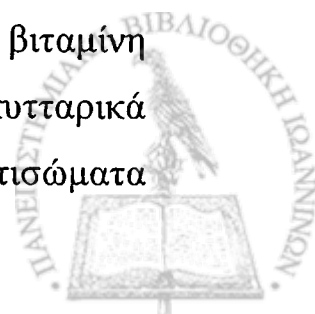


και περαιτέρω ενεργοποίηση εκ μέρους της σωματοτροπίνης.

Παράλληλα με την ορμονική αυτή δραστηριότητα, συμβαίνει αύξηση του συνδετικού και του λιπώδους ιστού μέσα στο στρώμα με αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των μαστικών αδένων. Η πλήρης ανάπτυξή τους επιτυγχάνεται κατά το εικοστό περίπου έτος της ηλικίας, με μικρές κυκλικές μεταβολές κατά τη διάρκεια κάθε εμμηνορρυσιακού κύκλου, ενώ μείζονες μεταβολές συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κήσεως και γαλουχίας. Μετά την ηλικία περίπου των σαράντα ετών, τα εκκριτικά τμήματα, μερικοί πόροι και στοιχεία του συνδετικού ιστού, αρχίζουν να ατροφούν, γεγονός που προοδευτικά εξελίσσεται έως την εμμηνόπαυση.

Οι μαστικοί αδένες ενεργοποιούνται μέσω αυξημένων ώσεων των προαναφερομένων ορμονών (οιστρογόνων και προγεστερόνης) κατά τη διάρκεια της κήσης, ώστε να καταστούν γαλουχούντες υποστηρίζοντας διατροφικά το νεογνό. Κατά την εν λόγω χρονική περίοδο τα τελικά τμήματα των πόρων διακλαδίζονται και αυξάνουν, ενώ οι αδενοκυψέλες αναπτύσσονται και ωριμάζουν. Καθώς η κήση εξελίσσεται, οι μαστοί διογκώνονται λόγω υπερτροφίας του αδενικού παρεγχύματος και διατάσεως του από το πύαρ, ένα υγρό πλούσιο σε πρωτεΐνη.

Αν και οι μαστοί είναι έτοιμοι να εκκρίνουν γάλα ακόμη και πριν τη γέννηση, υπάρχει ορμονική αποτροπή της λειτουργίας αυτής. Η αποκόλληση του πλακούντα επάγει την παραγωγή προλακτίνης από τα οξεόφιλα κύτταρα της αδενούποφυσης και σε συνδυασμό με την πτώση των επιπέδων των οιστρογόνων και προγεστερόνης, προάγεται η παραγωγή του γάλακτος εντός ολίγων ημερών. Το προαναφερόμενο πρωτεϊνούχο έκκριμα, το πύαρ, περιέχει επίσης στοιχεία όπως βιταμίνη Α, νάτριο και χλώριο, ενώ επίσης ανευρίσκονται έμμορφα κυτταρικά στοιχεία όπως λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα, καθώς και αντισώματα

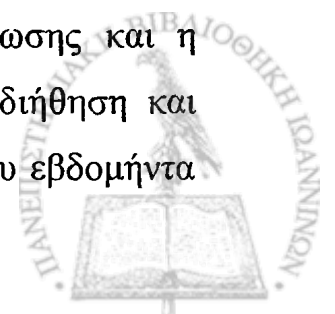


(ανοσοσφαιρίνη A), συντείνοντας τόσο στη θρεπτική όσο και προστατευτική δράση του στο νεογνό.

Το γάλα, του οποίου η παραγωγή αρχίζει συνήθως την 4^η ημέρα μετά τον τοκετό, αποτελεί υγρό πλούσιο σε πρωτεΐνες (καζεΐνες), υδατάνθρακες (γαλακτόζη), ανοσοσφαιρίνες (A), λιπίδια καθώς και σε ανόργανα συστατικά όπως ηλεκτρολύτες. Ταυτόχρονα δε με την παραγωγή της προλακτίνης, εκκρίνεται και η ωκυτοκίνη από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης, η οποία θέτει σε κίνηση το αντανακλαστικό της εκροής του γάλακτος με την πρόκληση συστολών των μυοεπιθηλιακών κυττάρων γύρω από τις κυψελίδες και τους εκφορητικούς πόρους. [6]

2.3 Στοιχεία Μοριακής Καρκινογένεσης του μαστού

Η σύγχρονη συμπυκνωμένη γνώση, απότοκος των τελευταίων 50 ετών μοριακής αναζήτησης, φωτογραφίζει την καρκινική εξαλλαγή ως μια βραχεία ή μακρά κατά περίπτωση, πολυσταδιακή διαδικασία συσσώρευσης γενετικών σφαλμάτων, έκπτωσης των μηχανισμών ελέγχου και επιδιόρθωσής τους καθώς και απορρύθμισης κριτικών μοριακών οδών για την πυρηνική και κατ' επέκταση δομική και λειτουργική ομοίωση του κυττάρου. Αυτή η γενετική αστάθεια, μεταφράζεται σε διαταραχή του κυτταρικού κύκλου μέσω ενίσχυσης της δράσης των ογκογονιδίων και απενεργοποίησης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στο τέλος αυτού του αποσυγχρονισμού επέρχεται, μέσω της απώλειας σημείων ελέγχου της ομαλής μετάβασης ανάμεσα στις διαδοχικές φάσεις, η αδυναμία ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η διαφυγή από τη διαδικασία απόπτωσης και η ανάδυση "άθανατοποιημένων" κλώνων που οδηγεί στη διήθηση και μετάσταση [8]. Άλλωστε οι διατυπωμένες στην δεκαετία του εβδομήντα



θεωρίες για τη εξήγηση της καρκινογενετικής διαδικασίας, με την περίφημη υπόθεση των δύο διαδοχικών χτυπημάτων στη απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (Rb-13q14) και με την αντίστοιχη της προοδευτικής έκπτωσης της γονιδιακής σταθερότητας, επιβεβαιώθηκαν με τα εργαλεία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας. [7,8,9,10]



3 Κυτταρικός κύκλος

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η αύξηση του αριθμού των κυττάρων επιτυγχάνεται με την κυτταρική διαίρεση. Η χρονική περίοδος μέσα στην οποία διαδραματίζονται τα διαδοχικά συμβάντα της κυτταρικής διαίρεσης καλείται κυτταρικός κύκλος και διακρίνεται στις εξής διακριτές, αλληλοδιάδοχες φάσεις:

G0: Φάση ηρεμίας

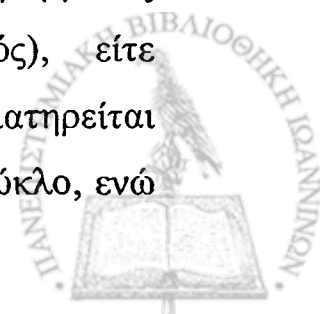
G1: Χάσμα 1. Προσυνθετική φάση

S : Φάση σύνθεσης (διπλασιασμού) DNA

G2: Χάσμα 2. Μετασυνθετική φάση

M : Μίτωση

Οι G1, S και G2 φάσεις συνιστούν τη Μεσόφαση, ενώ η M αποτελείται από τα στάδια της Πρόφασης, της Μετάφασης, της Ανάφασης και της Τελόφασης, καταλήγοντας στη δημιουργία δύο πανομοιότυπων γενετικά κυττάρων. Τα κύτταρα που πρόκειται να πολλαπλασιασθούν, αφήνουν τη φάση ηρεμίας και εισέρχονται στην προσυνθετική φάση και κατόπιν στη φάση της σύνθεσης-αντιγραφής του γενετικού υλικού. Εν συνεχεία, εισέρχονται στην επόμενη μετασυνθετική φάση με διπλασιασμένο το γενετικό υλικό και μεταπηδούν στην μιτωτική φάση. Μετά τη μίτωση, τα νεοσχηματισμένα κύτταρα, είτε πολλαπλασιάζονται εκ νέου, διατρέχοντας ξανά τον κυτταρικό κύκλο, είτε διαφοροποιούνται και εξελισσόμενα αποθνήσκουν μέσω ενεργοποίησης ενός προγράμματος γενετικά επαγόμενου θανάτου (αποπτωτικός μηχανισμός), είτε εισέρχονται σε μια φάση υποθετικής ηρεμίας. Στη φάση αυτή διατηρείται σε λανθάνουσα μορφή το δυναμικό εισόδου στον κυτταρικό κύκλο, ενώ



σε εξειδικευμένους ιστούς, όπως ο νευρικός θεωρείται το τελικό στάδιο ανάπτυξης και διαφοροποίησης των κυττάρων. [11]

3.1 Κυκλίνες: Περιγραφή και ρόλος των μορίων

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και κυρίως την εξέλιξη της G1 φάσης προς την S περιλαμβάνουν τη συμμετοχή τριών τύπων μορίων: των κυκλινών, των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών και των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Το κύτταρο, στο πρώτο σημείο ελέγχου, στη G1 φάση, έχει τη δυνατότητα να εισέλθει στο μιτωτικό στάδιο ή να εγκαταλείψει τον κυτταρικό κύκλο και να επανέλθει στη φάση ηρεμίας G₀. Η ενεργοποίηση των CDK4 από το θετικό ερέθισμα των κυκλινών-D, αποτελεί το οδηγό σημείο για να περάσει το κύτταρο, το πρώτο σημείο ελέγχου. Στο επόμενο σημείο ελέγχου-διαδικασία διπλασιασμού του DNA-προαπαιτούμενη είναι η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τη δημιουργία των συμπλεγμάτων CDK4/cyclin-D και CDK2/cyclin-E. Οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKs) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια p21, p16 και p27, αναστέλουν την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, αδρανοποιώντας τα συμπλέγματα CDK4/cyclin-D και CDK2/cyclin-E. Το κύτταρο δεν μεταβαίνει από τη φάση G1 στη φάση S. Οι αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών ενεργοποιούνται και μέσω της πρωτεΐνης που συνθέτει το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Σε καταστάσεις γονιδιακής απορρύθμισης υπερεκφράζεται η p53 με άμεση συνέπεια την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου p21(WAF1/CIP1/SD11). [12]

Η κυκλίνη A, η οποία εκφράζεται στις ύστερες φάσεις του κύκλου,



πιθανόν συνδέεται με πτωχή πρόγνωση στα αδenoκαρκινώματα του μαστού [13]. Η κυκλίνη B, επίσης εκφραζόμενη στις ίδιες με την προηγούμενη φάσεις, έχει ανιχνευθεί προοδευτικά αυξανόμενη από το φυσιολογικό επιθήλιο, στην άτυπη υπερπλασία στο καρκίνωμα *in situ* καθώς και στο διηθητικό πλέον καρκίνωμα.[14]. Σε ελάχιστες μελέτες αναφέρεται ισχυρή συσχέτιση των επιπέδων της έκφρασής της με πτωχή πρόγνωση. Αντίθετα, η κυκλίνη D1 φαίνεται να διαδραματίζει ουσιαστικό και κομβικό ρόλο στην καρκινογενετική διαδικασία του μαστού, καθώς αυξημένη δραστηριότητα σε επίπεδα m-RNA και πρωτεΐνης ανιχνεύονται συχνά στην πορογενή υπερπλασία και στο καρκίνωμα *in situ*, ειδικά σε υψηλόβαθμες αλλοιώσεις, οι οποίες συχνότερα αναζωπυρώνονται σε σχέση με τις χαμηλού βαθμού [15]. Παράλληλα, μελέτες έχουν καταδείξει ότι υπερέκφραση του μορίου παρατηρείται στην πλειονότητα των διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων, αλλά όχι στις πρόδρομα εγκατεστημένες αλλοιώσεις (λοβιακό καρκίνωμα *in situ*). Η υπερέκφραση του μορίου διαπιστώνεται σε ποσοστό 40-50% των αδenoκαρκινωμάτων του μαστού, ενώ περίπου το 50% αυτών σχετίζεται με ενίσχυση του γονιδίου (γονιδιακή θέση: 11q13) [16]. Ο συνδυασμός της γονιδιακής ενίσχυσης και της πρωτεϊνικής υπερέκφρασης σχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο και πτωχή πρόγνωση. Σε αντίθεση με την προηγούμενη συσχέτιση, κάποιες μελέτες κατέληξαν σε αδυναμία συσχετισμού της υπερέκφρασης του μορίου με το ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ δεν αποδείχθηκε επαρκής η αξιολόγησή της ως ικανού προγνωστικού της βιολογικής συμπεριφοράς παράγοντα σε μεγάλες σειρές εξεταζομένων ασθενών με σταδίου I-II αδenoκαρκίνωμα μαστού [17,18]. Καθώς η γονιδιακή ενίσχυση του μορίου της κυκλίνης D1 συνδέεται ισχυρά με την πρωτεϊνική υπερέκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων και το μόριο ενεργοποιείται από τη δραστηριότητά τους, οι υπόλοιπες των



περιπτώσεων (χωρίς το μηχανισμό της ενίσχυσης) υπερέκφρασης της χαρακτηρίζονται από μια φαινομενικά φυσιολογική έκκριση της οιστραδιόλης. Η προαναφερθείσα ισχυρή συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών εξηγεί την αναβαθμισμένη ανταπόκριση των ασθενών αυτών στην επικουρική χημειοθεραπεία [19]. Η ικανότητα της κυκλίνης αυτής να ρυθμίζει ευοδωτικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21^{WAF1} μπορεί να ερμηνεύσει πειστικά την αρνητική συσχέτισή της με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, η κυκλίνη E, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες όταν υπερεκφράζεται στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού, συσχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο και πτωχή επιβίωση [20,21].

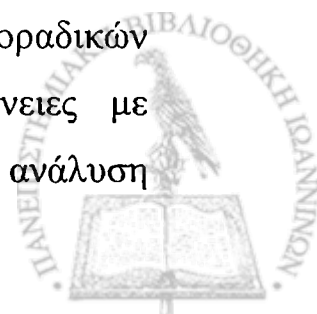
Η υπερέκφραση του μορίου της p21^{WAF1} έχει συσχετισθεί με μειωμένη περίοδο ελεύθερης νόσου, σε ορισμένες μελέτες, αν και κάποιες άλλες εμφανίζουν μη στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα [22,23]. Παραταύτα, ο συνδυασμός της υποέκφρασής της με την υπερέκφραση της p53 εμφανίζει πτωχό προσδόκιμο επιβίωσης σε ασθενείς οι οποίοι λαμβάνουν επικουρική χημειοθεραπεία. Ο πιθανός μηχανισμός αυτής της συνεργατικής εκδήλωσης των δύο πρωτεϊνών που οδηγεί σε αποτυχία της χημειοθεραπείας πιθανόν να οφείλεται σε μη ανιχνευμένες μεταλλάξεις της p53 ή στις ήδη ταυτοποιημένες που ευθύνονται για την αδυναμία ελέγχου της p21^{WAF1} και εκτέλεσης των προγραμμάτων αποπτωτικού θανάτου, όπως και στην περίπτωση της λειτουργικής έκπτωσης του ισοζυγίου των αποπτωτικών παραγόντων bcl2 και bax [24,25]. Παράλληλα, διερευνάται ο ρόλος της κυτταροπλασματικής έκφρασης της p21^{WAF1}. Παρά το γεγονός, ότι αυτή ασκεί την κύρια δράση της στον πυρηνικό χώρο, η κυτταροπλασματική της υπερέκφραση αποτελεί σχετικά συχνή εκδήλωση και φαίνεται να συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της p53, καθώς και με πτωχή πρόγνωση, αν και αυτή η παρατήρηση, όπως αποτυπώνεται σε λίγες μελέτες, αποτελεί οξύμωρο



σχήμα, καθώς η εν λόγω πρωτεΐνη αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου [26]. Επιπρόσθετα, η υποέκφραση ή η απώλεια της p27, ενός αναστολέα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, συνδέεται ισχυρά με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς επίσης και με πτωχή πρόγνωση στις περισσότερες των μελετών και ειδικά όταν συνδυάζεται με υπερέκφραση της κυκλίνης E, ενώ παραδόξως σε μία μελέτη, υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης συσχετίστηκαν με πτωχή πρόγνωση, αλλά αφορούσαν σε περιπτώσεις με αρνητικούς για μετάσταση λεμφαδένες [27]. Τέλος, όσον αφορά τους άλλους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και ειδικά την CDK4, η υπερέκφρασή της καθώς και η παρατηρούμενη γονιδιακή ενίσχυση ανευρίσκεται σε διηθητικά καρκινώματα του οργάνου, αλλά δε συσχετίζεται ισχυρά με την πρόγνωση, σύμφωνα με κάποιες μελέτες [28,29].

3.2 Ογκογονίδια-ογκοκατασταλτικά γονίδια

Οι διαταραχές του γενετικού υποστρώματος περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία συμβάντων όπως αριθμητικού ή δομικού τύπου χρωμοσωμιακές ανωμαλίες (ανευπλοειδία, ελλείμματα, διαμεταθέσεις) ή γονιδιακές τροποποιήσεις (σημειακές μεταλλάξεις, ενίσχυση, μικροδορυφορική αστάθεια, απώλεια της ετεροζυγωτίας ή ομόζυγη εξάλειψη των δύο αλληλίων). Οι παθολογικές αυτές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού φαίνεται ότι ακολουθούν μια χρονική ακολουθία δεδομένου ότι η μοριακή ανίχνευσή τους συμπίπτει με κάποιο από τα στάδια της προαναφερόμενης καρκινογενετικής διαδικασίας με οριακές αποκλίσεις κατά τη σύγκριση όμορων μελετών. Η ανακάλυψη των παθολογικών γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή ανάλυση σποραδικών περιστατικών καρκίνου αλλά και με μελέτες σε οικογένειες με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο. Ο χαρακτηρισμός και η ανάλυση

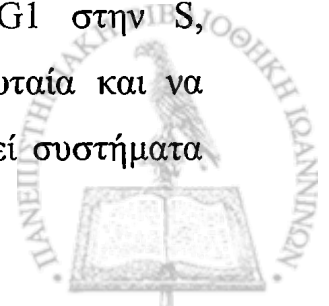


των γονιδίων αυτών ανέδειξε δύο κύριες κατηγορίες: τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια [30].

Τα ογκογονίδια προέρχονται από τροποποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και εμφανίζουν επικρατή δράση. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν ανώμαλο ανασυνδυασμό χρωμοσωμάτων, γονιδιακή ενίσχυση, αλλοιώσεις της κωδικής περιοχής (μετάλλαξη), και έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση της πρωτεΐνης ή την τροποποίηση της λειτουργικότητάς της.

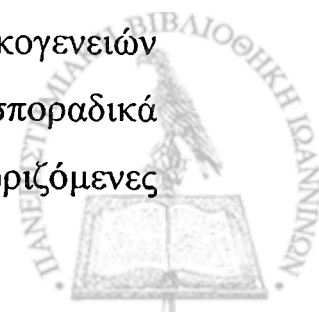
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, χαρακτηρίζονται από υπολειπόμενη δράση, η οποία οφείλεται σε έλλειψη της χρωμοσωμικής περιοχής του γονιδίου, αλλοιώσεις της ρυθμιστικής περιοχής (μεθυλίωση, μεταλλαγές), αλλοιώσεις της κωδικής περιοχής. Το αποτέλεσμα είναι η υποέκφραση της πρωτεΐνης ή η τροποποίηση της λειτουργικότητάς της. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται λειτουργικά σε εκείνα που επιδρούν άμεσα στην αύξηση των όγκων, είτε προκαλώντας αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε ενεργοποιώντας την κυτταρική απόπτωση και σε εκείνα που η αδρανοποίησή τους έχει έμμεση επίδραση στην επαγωγή όγκων μέσω επιτάχυνσης του ρυθμού μεταλλαξιγένεσης και πρόκλησης γενετικής αστάθειας.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (γονιδιακή θέση: 17p13) κωδικοποιεί πρωτεΐνη 393 αμινοξέων η οποία δρα ως ρυθμιστής της γονιδιακής μεταγραφής, επιδιορθωτικός παράγοντας του γενετικού υλικού και αποπτωτικός παράγοντας ελέγχοντας ως μοριακός διακόπτης-επόπτης τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S, αποτρέποντας έτσι τα κύτταρα να εισέλθουν στην τελευταία και να αντιγράψουν ένα παθολογικό χρωμόσωμα [31]. Δημιουργεί συστήματα



αλληλορύθμισης του μεταβολισμού και της λειτουργικότητάς της με πρωτείνες όπως η mdm2, η mdmx και η p21^{WAF1}. Σε φυσιολογικά κύτταρα παρατηρείται χαμηλή έκφραση του μορίου, ενώ όταν επισυμβούν απορυθμίσεις του γονιδίου που περιλαμβάνουν υπερμεθυλώσεις του υποκινητή ή διαταραχές της ετεροζυγωτίας, η μεταλλαγμένη πρωτείνη υπερεκφράζεται. Σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, η απενεργοποίηση του γονιδίου συμβαίνει στο πορογενές αδеноκαρκίνωμα σε ποσοστό 35-50% περίπου [32,33]. Απώλεια της ετεροζυγωτίας, με αποτέλεσμα τη λειτουργική έκπτωση της πρωτεΐνης, είναι συμβάν συχνότερο από την ομόζυγη έλλειψη των δύο αλληλίων και συνάδει με επιθετικότερο φαινότυπο (διήθηση-μετάσταση). Στις προκαρκινικές καταστάσεις, επίσης, αναγνωρίζεται επίπτωση των γονιδιακών απορρυθμίσεων, γεγονός που συνδυάζεται με την πρόιμη έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας [34].

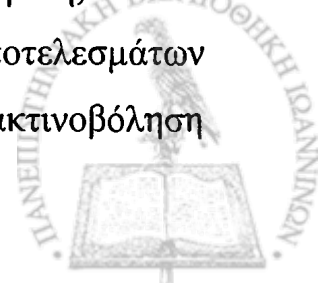
Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις του μορίου παρατηρούνται σε 15-30% των περιπτώσεων ανθρώπινου καρκίνου [35]. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη ως διαγνωστικός δείκτης για τον οικογενή καρκίνο του μαστού εξετάζεται στις περιπτώσεις εκδήλωσης του Συνδρόμου Li-Fraumeni, μια αυτοσωμική κληρονομούμενη με τον επικρατούντα χαρακτήρα διαταραχή, η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη σαρκωμάτων οστών ή/ και μαλακών μορίων, λευχαιμίας καθώς και καρκίνων των επινεφριδίων, του εγκεφάλου και μαστού. Συνήθως η μετάλλαξη του γονιδίου στο ένα αλληλίο συνοδεύεται με απώλεια του υγιούς άλλου. Η εκτιμώμενη διεισδυτικότητα της νόσου είναι 50% έως την ηλικία των 30 ετών και αγγίζει το 90% έως τα 60 έτη [36]. Οι μεταλλάξεις στο βασικό γενετικό υλικό των γαμετών ανιχνεύονται στα μέλη των οικογενειών αυτών σε ποσοστό 70%. Πάντως, στην πλειονότητα των σποραδικά εκδηλουμένων περιστατικών, οι περισσότερες αναγνωριζόμενες



μεταλλάξεις ανήκουν στην ομάδα των σιωπηλών ή των μετακινήσεων πλαισίου [37].

Διάφορες μελέτες έχουν προτείνει ότι, η κατάσταση του μορίου (όπως αποτυπώνεται ανοσοιστοχημικά αλλά και γονιδιακά) αποτελεί σημαντικό δείκτη εκτίμησης της ανταπόκρισης των πασχόντων από καρκίνο του μαστού στη χορηγούμενη αντινεοπλασματική αγωγή [38,39]. Η συστηματική ορμονική χημειοθεραπεία έχει καταλυτική επίδραση στην πορεία της νόσου και στο προσδόκιμο επιβίωσης σε συνδυασμό με τις νεότευκτες στρατηγικές συνδυασμένης στοχευμένης χημειοθεραπείας (ανθρακυκλίνες-τραστουζουμαμπη). Παραταύτα, ένα ποσοστό μόνο των ασθενών καρπώνεται οφέλη επιβίωσης και ποιότητας ζωής χωρίς παρενέργειες από τη συστηματική χορήγηση των σκευασμάτων αυτών. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς με διαταραχή του μορίου εμφανίζουν διαφόρου βαθμού ανταπόκριση (αυξημένα επίπεδα χημειοαντοχής) στη συμβατική αλλά και στη νέα (επικουρική) θεραπευτική προσέγγιση [40].

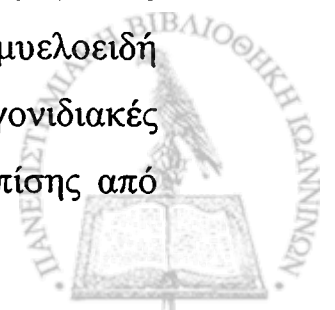
Κατά την εφαρμογή σχημάτων ορμονικής χημειοθεραπείας, ασθενείς εμφανίζοντες θετικούς λεμφαδένες (μεταστατική νόσο) με ταυτόχρονη ανιχνευμένη μετάλλαξη του μορίου παρουσιάζουν πτωχή ανταπόκριση στην ταμοξιφαίνη, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη μειωμένη λειτουργικότητα του μορίου λόγω της συσσώρευσης του μεταλλαγμένου προϊόντος στο κυτταρόπλασμα [41]. Αντίθετα, η συσχέτιση της πρωτεΐνης με την ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία εμφανίζεται περισσότερο περίπλοκη. Υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα διαφόρων μελετών κατά τα οποία άλλοτε συνάγεται το συμπέρασμα ότι η παρουσία της φυσικής-γνήσιας πρωτεΐνης p53 σχετίζεται με ανταπόκριση, άλλοτε το αντίθετο. Μία πιθανή εξήγηση της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων αποτελεί το γεγονός ότι από τα εκτειθεμένα κύτταρα στην ακτινοβόληση



και την καταστροφή που αυτή επιφέρει, εκείνα με τη γονιδιακή διαταραχή δε μπορούν να κινητοποιήσουν την p53-εξαρτώμενη επιδιορθωτική διαδικασία και να ανταποκριθούν περισσότερο στις βλάβες αυτές [42,43].

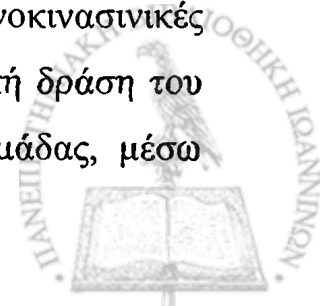
Η αξιοπιστία του μορίου, ως ανεξάρτητου προγνωστικού δείκτη για τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος και για τη χημειοανταπόκριση, φαίνεται να συσχετίζεται με το στάδιο της νόσου κατά την πρώτη διάγνωση του όγκου. Σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, ενώ η πυρηνική συσσώρευση του μεταλλαγμένου προϊόντος στα αρχικά έως μέτρια στάδια (I-II) αποκτά προγνωστική σημασία, στον τοπικά αναπτυσσόμενο καρκίνο (IIIΑ-IIIΒ) δεν εμφανίζει ίδια επίπτωση [44]. Παράλληλα, γνωρίζοντας ότι το μόριο ρυθμίζει τον αποπτωτικό μηχανισμό μέσω της επίδρασης στην έκφραση των γονιδίων *bcl2*, *bax* (ευοδωτικός και ανασταλτικός παράγοντας, αντίστοιχα), έχει παρατηρηθεί διαταραχή του ισοζυγίου του ομοιοστατικού αυτού μηχανισμού (μειωμένη έκφραση του πρώτου σε συνδυασμό με υπερέκφραση του δεύτερου) κατόπιν εφαρμογής χημειοθεραπευτικών σχημάτων [45].

Τελικά, οι απορρυθμίσεις του γονιδίου της p53 φαίνεται να επιδρούν σε ένα μεγάλο φάσμα της ιστολογικής, βιολογικής και ασφαλώς κλινικής εικόνας του καρκίνου του μαστού. Οι γενετικές αυτές τροποποιήσεις είναι κοινές στο πορογενές αδenoκαρκίνωμα, αλλά όχι τόσο στο λοβιακό και ειδικά λιγότερο ανιχνεύσιμες στα ανώτερης διαφοροποίησης καρκινώματα, σύμφωνα με κάποιες μελέτες [46,47]. Στις εξαιρέσεις συγκαταλέγονται όγκοι, όπως τα χαμηλής διαφοροποίησης μυελοειδή καρκινώματα σε μερικά εκ των οποίων ανευρίσκονται γονιδιακές αστάθειες του μορίου, αλλά και τα οποία χαρακτηρίζονται επίσης από



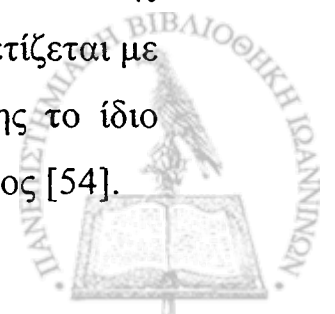
καλή πρόγνωση. Παραταύτα, οι ανωμαλίες της p53 συσχετίζονται γενικά με χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα, ανευπλοειδικούς όγκους και εκείνους οι οποίοι εμφανίζουν διευρυμένο χρονικά κλάσμα συνθετικής φάσης και ισχυρό μιτωτικό δείκτη[48]. Παρά το γεγονός ότι δεν έχει αποδειχθεί καθαρή συσχέτιση της απορύθμισης του γονιδίου με την έκταση (μέγεθος) του νεοπλάσματος, οι τροποποιήσεις του γονιδίου φαίνεται να σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, οι οποίοι συνδέονται με τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία [49].

Στη διαδικασία ανεύρεσης προγνωστικών παραγόντων της βιολογικής συμπεριφοράς του καρκίνου του μαστού συγκαταλέγονται οι προαναφερόμενοι ορμονικοί υποδοχείς, καθώς και το **ογκογονίδιο HER2/neu**. Το τελευταίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 (γονιδιακή θέση 17q12-21) και αρχικά αναγνωρίστηκε ως ενεργοποιούμενο γονίδιο στο με χημικούς παράγοντες εκδηλούμενο νευροβλάστωμα σε πειραματόζωα[50]. Με την αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ στη διαμεμβρανική περιοχή του μορίου της ογκοπρωτεΐνης neu, όπως πρωταρχικά είχε ονομασθεί, επιβεβαιώθηκε ο ογκογόνος μετασχηματισμός της. Η παραγόμενη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 185 kDa, δρα ως διαμεμβρανικός υποδοχέας τύπου 1 και ανήκει λειτουργικά στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR/HER). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 4 μέλη γνωστά ως HER1/EGFR/c-erb-B1, HER2/neu/c-erb-B2, HER3/c-erb-B3 και HER4/c-erb-B4. Η βιοχημική τους δομή περιλαμβάνει το εξωκυττάριο τμήμα σύνδεσης, πλούσιο σε κυστεΐνη, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική γέφυρα, και το ενδοκυττάριο τμήμα με τις τυροσινוקινασινικές αλληλουχίες [51]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συνεργική δράση του υποδοχέα HER2/neu/c-erb-B2 με τους υπόλοιπους της ομάδας, μέσω



σχηματισμού ετεροδιμερών, ρυθμίζει το ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Κάτω από ορισμένες συνθήκες γονιδιακής μετατροπής και αστάθειας μεταβιβάζει μιτογόνα σήματα μετά από σύνδεση με τον παράγοντα neu ή heregulin και το διμερισμό του με τον HER3, ενώ δημιουργείται ένας καταρράκτης αντιδράσεων με τη φωσφορυλίωση των τυροσινοκινασινικών αλληλουχιών. Η ενισχυμένη αυτή μεταγραφική δραστηριότητα οδηγεί τελικά στην ογκογένεση και αργότερα στη μεταστατική διαδικασία. Ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού, ενώ η υπερέκφραση του μορίου κυμαίνεται σε μέτρια ποσοστά (20-35%), η ενίσχυση του γονιδίου (85-90% των προαναφερομένων περιπτώσεων ανοσοέκφρασης) αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλασματος και ανταπόκριση σε στοχευμένες θεραπείες με μονοκλωνικά αντισώματα [52,53].

Το επίσης **ογκοκατασταλτικό γονίδιο p16** εδράζεται στο χρωμόσωμα 9 (9p21), στην περιοχή CDKN2A που φιλοξενεί και το όμορο p15. Το p16 παρεμποδίζει την προόδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της σύνδεσής του με το σύμπλοκο κυκλίνης cdk4 και εμποδίζει με τον τρόπο αυτό τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος. Η υποφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος δεσμεύει και πιθανόν απομονώνει παράγοντες της μεταγραφής που διαφορετικά θα προήγαγαν τη μετάπτωση της φάσης G1 σε S, ενώ η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb απελευθερώνει τους παράγοντες αυτούς. Ο μηχανισμός απορρύθμισης του γονιδίου –εμφανίζεται σε μικρό ποσοστό- περιλαμβάνει υπερμεθυλίωση του προαγωγέα ,απώλεια της ετεροζυγωτίας ή σημειακή μετάλλαξη, αλλά φαίνεται να μη σχετίζεται με την πρόγνωση στο αδenoκαρκίνωμα του μαστού, όπως επίσης το ίδιο συμβαίνει με την έκφραση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος [54].



4 Μοριακοί μηχανισμοί οστικών μεταστάσεων

4.1 Εισαγωγή

Οι οστικές μεταστάσεις αποτελούν συχνή επιπλοκή του καρκίνου, επισυμβαίνοντας σε ποσοστό έως 70% των ασθενών με καρκίνο του μαστού ή προστάτη, καθώς και σε ποσοστό μεταξύ 15 και 30% των πασχόντων από καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του στομάχου, της ουροδόχου κύστης, του θυρεοειδούς ή του νεφρού. Η ακριβής επίπτωση των οστικών μεταστάσεων είναι δύσκολο να αποτυπωθεί, αλλά υπολογίζεται ότι περίπου 350000 άνθρωποι καταλήγουν κάθε έτος στις ΗΠΑ. Επιπρόσθετα, όταν εκδηλωθεί η μετάσταση των όγκων στα οστά, τότε η νόσος είναι πρακτικά μη ελεγχόμενη θεραπευτικά: μόνο το 20% των πασχόντων από καρκίνο του μαστού συνεχίζουν να επιζούν πέραν της 5ετίας από την πρωτοδιάγνωση της νόσου[55]. Η επίδραση των οστικών μεταστάσεων είναι διαλυτική για την ποιότητα ζωής του πάσχοντα. Οι οστεολυτικού τύπου μεταστάσεις προκαλούν συνήθως σοβαρής έντασης άλγη, παθολογικά κατάγματα, απειλητική για τη ζωή μεταβολική διαταραχή (υπερκαλιαιμία), συμπίεση του νωτιαίου μυελού, καθώς και παρόμοια συμπτωτικά σύνδρομα νεύρων. Ασθενείς με εκδηλούμενη οστεοβλαστικού τύπου μεταστατική νόσο, εμφανίζουν επίσης οστικά άλγη και παθολογικά κατάγματα εξαιτίας της πτωχής ποιότητας και στερότητας του παραγόμενου οστίτη ιστού. Λόγω των προαναφερομένων γνωρισμάτων, οι οστικές μεταστάσεις αποτελούν μια εξαιρετικά δυσμενή παρενέργεια του καρκίνου, ιδιαίτερα σε εκείνον του μαστού [55,56].

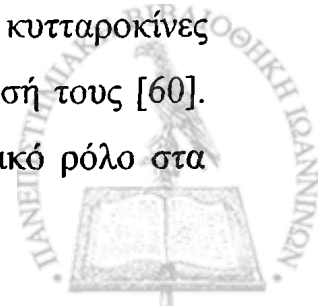
Ένα πλήθος παραγόντων συντείνουν στη γένεση των οστικών



μεταστάσεων. Η αιματική ροή παρουσιάζεται αυξημένη στον ερυθρό μυελό των οστών, ενώ παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα παράγουν μόρια προσκόλλησης με τα οποία αγκιστρώνονται στα στρωματικά κύτταρά του, καθώς και στην οστική θεμέλια ουσία. Τα συμβάντα αυτά ευοδώνουν την παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων και παράλληλα εκείνων που ευθύνονται για τη σταδιακή απορρόφηση του οστίτη ιστού, συντείνοντας στην ανάπτυξη του όγκου στο προσβληθέν οστό. Τα οστά επίσης αποτελούν μια σημαντική ανανεώσιμη πηγή για αυξητικούς παράγοντες όπως τον μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β), τους αντίστοιχους της ινσουλίνης (IGF I,II), τους ινοβλαστικούς αυξητικούς παράγοντες (FGFs), τους αιμοπεταλιακούς (PDGFs), καθώς και μορφογενετικούς οστικούς παράγοντες και ασβέστιο [58]. Αυτές οι ουσίες, οι οποίες εκλύονται και ενεργοποιούνται κατά τη διεργασία της οστικής απόρροφησης, δρουν ως υπόστρωμα των οστικών μεταστάσεων. Η υπόθεση της επιλεκτικής οστεοφιλίας των μεταστάσεων από καρκίνο μαστού διατυπώθηκε αρχικά από τον Γερμανό Fuchs και προβλήθηκε από τον S. Paget στα 1889, βασιζόμενη σε παρατηρήσεις του επί νεκροτομικού υλικού άνω των 700 γυναικών με καρκίνο μαστού [59].

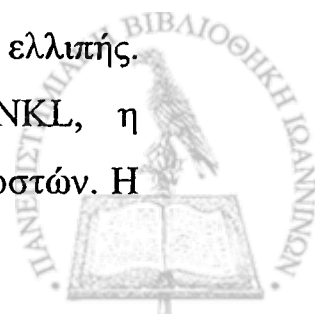
4.2 Ρύθμιση της οστικής ομοιόστασης

Η ρύθμιση της ομοιοστασίας του σκελετού επάγεται μέσω της συνεπίδρασης των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών (αναγέννηση-απορρόφηση του οστίτη ιστού). Οι οστεοκλάστες προέρχονται από τη διαφοροποίηση αρχέγονων κυττάρων (μονοκυτταρική-μακροφαγική προέλευση). Αρχικά, οι δραστηριοποιημένες οστεοκλάστες αποδομούν το οστό και προάγουν την απόπτωση. Τοπικά, παραγόμενες κυτταροκίνες και ορμόνες ρυθμίζουν το σχηματισμό και την ενεργοποίησή τους [60]. Το ιστικό μικροπεριβάλλον του οστού διαδραματίζει κριτικό ρόλο στα



προαναφερθέντα συμβάντα μέσω της παραγωγής των συμπλόκων υποδοχέων και συνδετών RANK/RANKL από τα στρωματικά κύτταρα των οστών. Ο RANKL αποτελεί μέλος της οικογένειας των παραγόντων νέκρωσης των όγκων και εκφράζεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών καθώς και των στρωματικών κυττάρων, ενώ απελευθερώνεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα [61]. Οι περισσότεροι οστεοτρόποι παράγοντες, όπως η παραθορμόνη, η 1-25 διυδροξυβιταμίνη D₃ καθώς και οι προσταγλανδίνες, ευοδώνουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών μέσω αυξημένης έκφρασης του παράγοντα RANKL στους οστεοβλάστες και στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών και όχι μέσω άμεσης ενεργοποίησης των προδρόμων οστεοκλαστών. Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος υποδοχέα-συνδέτη RANK/RANKL πραγματοποιείται στα προαναφερόμενα κύτταρα και ευοδώνει το σχηματισμό των οστεοκλαστών μέσω μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα, εμπλέκοντας τις πρωτεΐνες Factor K_b και Jun. Μία υδατοδιαλυτή μορφή του RANKL, παραγόμενη από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, έχει ήδη ταυτοποιηθεί στο αρθρικό υγρό πειραματοζώων με αναπτυγμένη αρθρίτιδα [62].

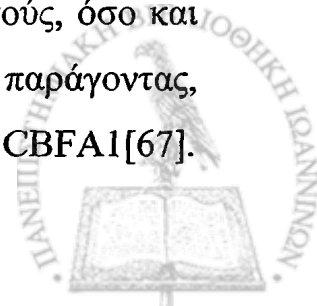
Η σημασία της επίδρασης της προαναφερόμενης πρωτεΐνης στη διαμόρφωση των οστεοκλαστών έχει αποκρυσταλλωθεί με την εφαρμογή τεχνικών ομόλογου ανασυνδυασμού κατά τις οποίες τα γονίδια RANK ή/και RANKL έχουν υποστεί διαγραφή σε πειραματόζωα (μύες) [63]. Παρατηρήθηκε ότι τα ζώα αυτά απώλεσαν τους οστεοκλάστες και ως αποτέλεσμα σοβαρού βαθμού εναπόθεση οστών (οστεοπέτρωση) αναπτύχθηκε στα οστά τους. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη των B-και T-λεμφοκυττάρων στους οργανισμούς αυτούς χαρακτηρίζεται ελλιπής. Ένας "παραπλανητικός" υποδοχέας για το συνδέτη RANKL, η οστεοπροτεγερίνη, φυσιολογικά παρουσιάζεται στο μυελό των οστών. Η



οστεοπροτεγερίνη αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των παραγόντων νέκρωσης των όγκων και αναστέλλει τη διαφοροποίηση και απορρόφηση των οστεοκλαστών *in vivo* και *in vitro* [64]. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, ο λόγος των ποσοτήτων των δύο πρωτεϊνών ρυθμίζει το σχηματισμό και τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών. Υπερπαραγωγή της δεύτερης πρωτεΐνης σε διαγονιδιακά πειραματόζωα (μύες) προκαλεί σοβαρή οστεοπέτρωση, ενώ η απουσία της οδηγεί σε σημαντική οστεοπενία. Η συμβολή του RANKL στην αποδόμηση του οστού, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανασυνδυασμένης οστεοπροτεγερίνης και αντισωμάτων κατά του αναφερόμενου παράγοντα, ως πιθανής αξίας θεραπευτικές προσεγγίσεις στην εκδήλωση οστικών μεταστάσεων [65].

Η απορροφητική δραστηριότητα των οστεοκλαστών επάγεται με την έκκριση ειδικών πρωτεασών οι οποίες διασπούν τη θεμέλια ουσία και παράγοντας οξύ το οποίο ευοδώνει την οστική διάλυση, διοχετεύοντας τα υδατοδιαλυτά προϊόντα στον εξωκυττάριο χώρο ακριβώς έξωθεν της κυτταρικής μεμβράνης των οστεοκλαστών. Η προσκόλληση αυτών στην επιφάνεια του οστού αποτελεί κριτικό συμβάν για τη διεργασία της απορρόφησης, καθώς παράγοντες που εμπλέκονται στη σύνδεση των οστεοκλαστών, αποκλείουν τη διαδικασία αυτή. Τέτοιοι παράγοντες, όπως η καθεψίνη K, μελετώνται συστηματικά και μπορεί να αποτελέσουν πιθανή θεραπεία των οστικών μεταστάσεων [66].

Οι οστεοβλάστες ευθύνονται για το σχηματισμό του οστού καθώς και για την αναδόμησή του συνεπεία καταστροφής του (παθολογική αποδόμηση). Αυτοί, αναδύονται από μεσεγχυματογενούς προέλευσης αρχέγονα κύτταρα, τα οποία διαφοροποιούνται τόσο σε αυτούς, όσο και σε λιποκύτταρα και μυϊκά κύτταρα. Ένας μεταγραφικός παράγοντας, σημαντικός για τη διαφοροποίησή τους είναι ο Runx-2 ή CBFA1[67].



Σύμφωνα με μελέτες της συμπεριφοράς του, οδηγεί στην έκφραση γονιδίων εμπλεκόμενων στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Κατά τη μορφοποιητική αυτή διαδικασία έχουν ταυτοποιηθεί πρόδρομα κύτταρα τα οποία παράγουν αλκαλική φωσφατάση και κάποια περισσότερο λειτουργικά εξειδικευμένα, τα οποία παράγουν αυξημένα ποσά οστεοκαλσίνης και ασβεστοποιημένης θεμέλιας ουσίας. Οι οστεοβλάστες ωριμάζουν ιστολογικά σε οστεοκύτταρα. Πρωτείνες υπεύθυνες για τη μορφογενετική διαδικασία ανάπτυξης των οστών αποτελούν σημαντικούς παράγοντες οι οποίοι αποκαθιστούν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Σ αυτούς περιλαμβάνονται οι πρωτείνες: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β, (TGF-β), οι αιμοπεταλιακοί (PDGFs) αλλά και ινοβλαστικοί (FGFs) [68,69].

4.3 Είδη οστικών μεταστάσεων

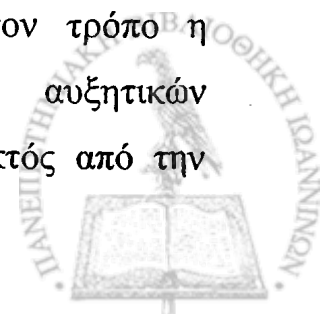
Οι οστικές μεταστάσεις, ανάλογα με την επίδρασή τους στον οστίτη ιστό διακρίνονται σε οστεολυτικού και οστεοβλαστικού τύπου. Αυτή η ταξινόμηση αντιπροσωπεύει δύο διαφορετικές μορφές απορρυθμιστικών μηχανισμών κατά τη διάρκεια της ιστολογικής αναδιάρθρωσης των οστών. Ασθενείς μπορούν να εμφανίζουν και μικτού τύπου αλλοιώσεις, δηλ να συνυπάρχουν και τα δύο είδη των μεταστάσεων. Οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο του μαστού παρουσιάζουν κυρίως οστεολυτικού τύπου μεταστάσεις, ενώ σε ποσοστό 15-20% αυτών εμφανίζουν οστεοβλαστικές [70]. Επιπρόσθετα, δευτερεύων σχηματισμός του οστού συμβαίνει ως ανταπόκριση της οστικής καταστροφής. Αυτή η αντιδραστική διαδικασία συντείνει στην ανίχνευση των οστεολυτικών αλλοιώσεων μέσω μεθόδων σάρωσης, οι οποίες διακρίνουν περιοχές ενεργού σχηματισμού οστίτη ιστού. Μόνο στη νόσο του πολλαπλού μυελώματος ανιχνεύονται αναπτύξεις γνήσιας οστεολυτικής



επεξεργασίας. Σε αντίθεση, οι οστικές αλλοιώσεις στο μεταστατικό καρκίνο του προστάτη είναι κυρίως οστεοβλαστικού τύπου [71]. Παραταύτα, συνυπάρχει επίσης αυξημένη απορρόφηση οστού στις μεταστάσεις αυτές και παράγοντες που αποκλείουν τη διαδικασία αυτή μπορούν να ελαττώσουν τα οστικά άλγη και τον κίνδυνο των παθολογικών καταγμάτων.

4.3.1 Οστεοβλαστικές Μεταστάσεις

Παρά το γεγονός ότι οι μηχανισμοί των οστεοβλαστικών μεταστάσεων δεν έχουν πλήρως διερευνηθεί, φαίνεται ότι η ενδοθηλίνη-1 εμπλέκεται σαυτούς, όπως αποδεικνύουν μελέτες στον καρκίνο του μαστού. Η πρωτεΐνη αυτή σταθεροποιεί το σχηματισμό του οστού και την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών σε καλλιέργειες οστίτη ιστού, όπως επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο του προστάτη τα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής στον ορό ανευρίσκονται αυξημένα [72]. Επιπρόσθετα, σε μοντέλα οστεοβλαστικών μεταστάσεων σε πειραματόζωα, η χορήγηση εξειδικευμένων ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης-1 μείωσε τόσο την οστεοβλαστική αντίδραση όσο και την εξάπλωση του όγκου. Καμία όμως μεταβολή δεν παρατηρήθηκε στο μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι αποκλείοντας την ενεργοποίηση της οστεοβλαστικής δραστηριότητας των καρκίνων μπορεί να μειωθεί η στις θέσεις αυτές ανάπτυξη των όγκων, όπως επίσης καταδεικνύεται ότι, ένας ελλατωματικός κύκλος συμβάντων εμπλέκεται στην παθολογική οστεοβλαστική αυτή μεταστατική δραστηριότητα καθώς οι όγκοι ευοδώνουν την οστεοβλαστικότητα και κατ' αυτόν τον τρόπο η συνεχόμενη απελευθέρωση από τους οστεοβλάστες αυξητικών παραγόντων επιτείνει την εξάπλωση του όγκου [73]. Εκτός από την

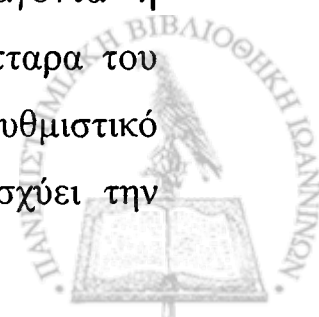


ενδοθηλίνη-1 και τούς αιμοπεταλιακούς (PDGFs) αυξητικούς παράγοντες, ένα άλλο πολυπεπτίδιο, παραγόμενο στο μικροπεριβάλλον των οστεοβλαστών, η ουροκινάση, και παράλληλα το ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA) πιθανόν να εμπλέκονται στον προαναφερόμενο κύκλο συμβάντων [74].

4.3.2 Οστεοκλαστικές (λυτικές) Μεταστάσεις

Στις μεταστάσεις αυτού του τύπου, η καταστροφή του οστού επάγεται περισσότερο μέσω των οστεοκλαστών, παρά με την άμεση συμμετοχή των καρκινικών κυττάρων. Παραταύτα, οι υπεύθυνοι παράγοντες για την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών ποικίλουν, εξαρτώμενοι από τον τύπο του νεοπλασματος. Στο πολλαπλούν μυέλωμα, οι οστεοκλάστες συσσωρεύονται μόνο στις επιφάνειες απορρόφησης του οστού πλησίον των κυττάρων του όγκου. Επιπλέον της μείωσης της οστικής μάζας, καταστέλεται και ο σχηματισμός νέου οστού στις πληγείσες περιοχές με αποτέλεσμα οι ασθενείς αυτοί να πάσχουν από καθαρή οστεολυτική νόσο [75].

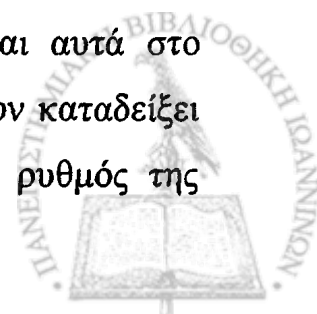
Αρκετοί οστεοκλαστογόνοι παράγοντες εμπλέκονται στη διαδικασία της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών. Οι κυριότεροι αφορούν στις ιντερλευκίνες 1,6, στην πρωτεΐνη των μακροφάγων 1α, και στο γνωστό, προαναφερόμενο παράγοντα RANKL. Η ιντερλευκίνη 1 θεωρείται πιθανός ρυθμιστικός της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών παράγοντας, αλλά τα επίπεδά της στο πολλαπλούν μυέλωμα χαρακτηρίζονται ως χαμηλά [76]. Η ιντερλευκίνη 6 αποτελεί αυξητικό παράγοντα ή τουλάχιστον, αποκλείει την απόπτωση στα προηγούμενα κύτταρα του πολλαπλού μυελώματος. Αποτελεί επίσης καθοριστικό ρυθμιστικό παράγοντα της δραστηριότητας των οστεοκλαστών και ενισχύει την



επίδραση της πρωτεΐνης παραθορμόνης στο σχηματισμό των οστεοκλαστών *in vivo*. Παραταύτα, δεν έχει αποσαφηνισθεί αν τα επίπεδα του μορίου στο μυελό των οστών σχετίζονται άμεσα με τις οστικές αλλοιώσεις. Καθώς τα κύτταρα του μυελώματος προσκολλώνται στα στρωματικά κύτταρα του μυελού, η παραγωγή της ιντερλευκίνης 1 αυξάνεται [77].

Ο παράγοντας RANKL αποτελεί ένα βασικό μόριο επαγωγής οστικών μετάστασεων στο πόλλαπλούν μυέλωμα. Αρκετές μελέτες προτείνουν ότι τα ανώτερη κύτταρα παράγουν την πρωτεΐνη, αλλά είναι αδιευκρίνιστα τα κριτικά επίπεδα του μορίου που απαιτούνται για το σχηματισμό των οστεοκλαστών. Αλλά, η πρωτεΐνη, έχει παρατηρηθεί ότι, δρα ως αναστολέας της απόπτωσης των κυττάρων αυτών. Στο οστικό μικροπεριβάλλον σε πάσχοντες από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, η παραγωγή του RANKL αυξάνεται με παράλληλη μείωση του ρυθμού παραγωγής της οστεοπροτεγερίνης. Σε πειραματικά μοντέλα (πολλαπλούν μυέλωμα αναπτυσσόμενο σε μύες) ο αποκλεισμός του υποδοχέα του RANKL και κατά συνέπεια της σύνδεσής του με την αντίστοιχη πρωτεΐνη-μέσω ενός υδατοδιαλυτού αναλόγου της- αναστέλει την καταστροφή του οστού [78].

Η πρωτεΐνη των μακροφάγων επίσης φαίνεται να αποτελεί ένα κομβικό ρυθμιστικό μόριο για την οστεόλυση στο πολλαπλούν μυέλωμα. Αυτή ασκεί ευοδατική δράση στο σχηματισμό των οστεοκλαστών μέσω τόσο του παράγοντα RANKL, όσο και της ιντερλευκίνης 6. Σε 70% περίπου των ασθενών τα κύτταρα του μυελώματος παράγουν σημαντικές ποσότητες της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται αυτά στο μυελό των οστών [79]. Σε γονιδιακό επίπεδο, μελέτες έχουν καταδείξει ότι αποκλείοντας τη γονιδιακή έκφραση καταστέλεται ο ρυθμός της

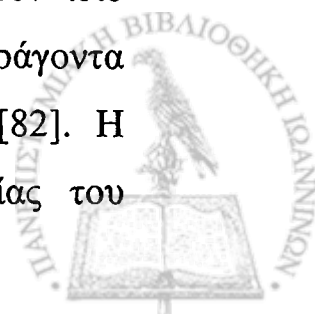


οστεολυτικής επεξεργασίας και παράλληλα σταθεροποιείται ο πρωτοπαθής όγκος. Παράλληλα, η πρωτεΐνη αυτή επάγει την προσκόλληση των στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών με τα κύτταρα του μυελώματος μέσω υπερρύθμισης της έκφρασης της βιεντεγκρίνης από τα νεοπλασματικά κύτταρα [80].

4.4 Οστικές μεταστάσεις στον καρκίνο του μαστού.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού παράγουν πρωτεΐνες οι οποίες άμεσα ή έμμεσα επάγουν το σχηματισμό των οστεοκλαστών. Αντίστροφα, η απορρόφηση του οστίτη ιστού από τους οστεοκλάστες απελευθερώνει αυξητικούς παράγοντες από τη θεμέλια ουσία οι οποίοι ρυθμίζουν ευοδωτικά την ανάπτυξη του όγκου καθώς και την οστική καταστροφή. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δημιουργείται και λειτουργεί ένας "φαύλος κύκλος" συμβάντων μεταξύ της δραστηριότητας των καρκινικών κυττάρων και της μεταστατικής, οστεολυτικής εξεργασίας [81].

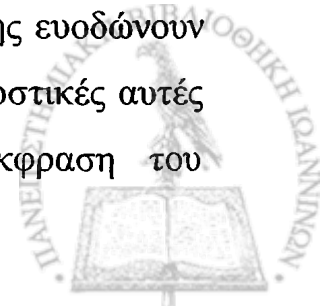
Τα οστά αποτελούν, ως γνωστόν, μια σημαντική πηγή απενεργοποιημένων αρχικά αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης και, οι οποίοι, σε δεύτερο χρόνο εντείνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στο μαστό. Ο σχηματισμός και η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών επάγεται μέσω της πρωτεΐνης-σύνδεσης με την ορμόνη παραθορμόνη στα κύτταρα αυτά, όπως συμβαίνει και σε πολλούς άλλους συμπαγείς όγκους. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες συνδέονται στον ίδιο υποδοχέα (PTHR1) και αυξάνουν την έκφραση του γνωστού παράγοντα RANKL στα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών [82]. Η παραθορμόνη αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της ομοιοστασίας του



ασβεστίου και η έτερη αναφερόμενη πρωτεΐνη παρουσιάζει παρόμοια βιολογική συμπεριφορά στα οστά. Και τα δύο πολυπεπίδια εμφανίζουν ανάλογες τρισδιάστατες στερεοδομές, ενώ στις αλληλουχίες αμινοξέων τους, 8 από τα πρώτα 13 ταυτίζονται χωροταξικά. Η παραγωγή της δεύτερης πρωτεΐνης αυξάνεται στις οστικές μεταστάσεις στον καρκίνο του μαστού. Μόνο το 50% των πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού εκφράζουν το πολυπεπίδιο αυτό, ενώ αυτό ανευρίσκεται υπερεκφρασμένο στο 92% των μεταστάσεων [83].

Κατά την εξέλιξη πειραμάτων με έγχυση καρκινικών κυττάρων σε πειραματόζωα (μύες) και αφού προκλήθηκε οστική μετάσταση, αυτά αύξησαν τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η τελευταία επίσης ευοδώνει το σχηματισμό των οστεοκλαστών και κατά συνέπεια της οστικής απορρόφησης, ενώ απελευθερώνεται ο μετατρεπτικός παράγοντας β (TGF β). Αντίστροφα, ο TGF β αυξάνει επιπρόσθετα την παραγωγή του πεπτιδίου από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Για το λόγο αυτό τελεί υπό αξιολόγηση η δράση ενός συνθετικού αντισώματος κατά της πρωτεΐνης σε ασθενείς με μεταστατική στα οστά νόσο [84].

Στα πλαίσια αυτού του "φαύλου κύκλου" συμβάντων στη μεταστατική οστική νόσο του καρκίνου του μαστού, η οστεόλυση αυξάνει τα επίπεδα του ελεύθερου ασβεστίου και ως αποτέλεσμα συντελείται αύξηση του όγκου, καθώς και παραγωγή της πρωτεΐνης-σύνδεσης με την παραθορμόνη. Τα καρκινικά κύτταρα επίσης παράγουν ή εντείνουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης 6, της προσταγλανδίνης E2, της ιντερλευκίνης 1, καθώς και των παραγόντων νέκρωσης των όγκων α (TNF α) και αυξητικού των φαγοκυττάρων, οι οποίοι επίσης ευοδώνουν το σχηματισμό και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών στις οστικές αυτές μεταστάσεις. Η προσταγλανδίνης E2 αυξάνει την έκφραση του



παράγοντα RANKL και άμεσα ενεργοποιεί τη δράση των οστεοκλαστών. Κατ' αυτόν τον τρόπο συνάγεται το συμπέρασμα ότι η προαναφερόμενη πρωτεΐνη-σύνδεσης με την παραθορμόνη αποτελεί κομβικό μόριο στο "φαύλο κύκλο" των οστεολυτικών μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού [85]. Παράλληλα, η χορήγηση ενός φαρμακευτικού παράγοντα (διφωσφορική κλοδρονάτη) συνδέθηκε με αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς εμφανίζουσες οστικές μεταστασεις ή με κίνδυνο ανάπτυξής τους [86].



The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data. The second part of the document outlines the procedures for handling discrepancies. It states that any variance between the recorded amounts and the actual amounts should be investigated immediately. The third part of the document provides a detailed breakdown of the financial data for the period covered. It includes a table showing the total revenue, expenses, and net profit for each month. The final part of the document concludes with a summary of the overall financial performance and a recommendation for future actions.

The following table provides a detailed breakdown of the financial data for the period covered. It includes a table showing the total revenue, expenses, and net profit for each month. The data is as follows:

Month	Revenue	Expenses	Net Profit
January	1200	800	400
February	1100	750	350
March	1300	900	400
April	1400	1000	400
May	1500	1100	400
June	1600	1200	400
July	1700	1300	400
August	1800	1400	400
September	1900	1500	400
October	2000	1600	400
November	2100	1700	400
December	2200	1800	400
Total	20000	14000	6000

The data shows a steady increase in revenue over the period, with a corresponding increase in expenses. The net profit remains relatively stable, indicating a consistent level of operational efficiency. The final part of the document concludes with a summary of the overall financial performance and a recommendation for future actions.

The overall financial performance for the period covered is satisfactory. The revenue has increased significantly, and the expenses have been kept under control. The net profit has remained stable, indicating a consistent level of operational efficiency. The following table provides a detailed breakdown of the financial data for the period covered. It includes a table showing the total revenue, expenses, and net profit for each month. The data is as follows:

Month	Revenue	Expenses	Net Profit
January	1200	800	400
February	1100	750	350
March	1300	900	400
April	1400	1000	400
May	1500	1100	400
June	1600	1200	400
July	1700	1300	400
August	1800	1400	400
September	1900	1500	400
October	2000	1600	400
November	2100	1700	400
December	2200	1800	400
Total	20000	14000	6000

The data shows a steady increase in revenue over the period, with a corresponding increase in expenses. The net profit remains relatively stable, indicating a consistent level of operational efficiency. The final part of the document concludes with a summary of the overall financial performance and a recommendation for future actions.



5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

5.1 Παθολογοανατομική Ταξινόμηση Διηθητικού Καρκίνου Μαστού

Το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού διακρίνεται ιστοπαθολογικά ως εξής [87]:

I. Αδενοκαρκινώματα καθορισμένης ιστογενετικής προέλευσης

I.1. Πορογενές μη διηθητικό (in situ)

- α. Θηλώδες
- β. Φαγεσωρικό (Comedo)
- γ. Ηθμοειδές
- δ. Συμπαγές

I.2. Πορογενές διηθητικό

- α. Μη ειδικός τύπος με ή χωρίς σορρώδη αντίδραση (NST)
- β. Θηλώδες
- γ. Μυελοειδές ή περίγραπτο
- δ. Βλεννώδες ή κολλειδές
- ε. Σωληνώδες
 - ζ. Αδενοειδές κυστικό
 - η. Αποκρινικό
 - θ. Νεανικό ή εκκριτικό

I.3. Λοβιακό

- α. Μη διηθητικό (in situ)
- β. Διηθητικό

I.4 . Νόσος του PAGET

II. Καρκινώματα ακαθόριστης ιστογενετικής προέλευσης



Φλεγμονώδες

Λιποεκκριτικό

Διαυγοκυτταρικό

Ιστιοκυτταροειδές

Μεταπλαστικό

α. Με πλακώδη μετάπλαση

β. Με ινώδη μετάπλαση

γ. Με χονδρογενή μετάπλαση

δ. Με οστεογενή μετάπλαση

Καρκινοειδές ή ενδοκρινικό

Καρκινοσάρκωμα

5.2 Διαφοροποίηση του καρκίνου του μαστού

Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού, όπως άλλωστε και όλοι οι άλλοι διηθητικοί όγκοι του οργάνου, διαφοροποιούνται με βάση αδρά ιστολογικά κριτήρια, που περιλαμβάνουν το σχηματισμό σωληνωδών νεόπλαστων αδενικών σχηματισμών, την πυρηνική πολυμορφία και ατυπία καθώς και το μιτωτικό δείκτη. Σε κλίμακα 1-3 βαθμονομείται ο κάθε παράγοντας.

Η αρχιτεκτονική δομή του όγκου κρίνεται με βάση την έκταση που καλύπτουν οι σχηματιζόμενοι σωληνώδεις σχηματισμοί καθώς και οι αδενοειδείς, όπου ανευρίσκεται σχηματισμένος κεντρικός αυλός.

Η πυρηνική ατυπία σχετίζεται με την κανονικότητα του σχήματος και του μεγέθους του πυρήνα, όπως επίσης και με την παρουσία ευμεγέθων διακριτών πυρηνίων.



Ο μιτωτικός δείκτης αντιπροσωπεύει τον αριθμό των παρατηρούμενων μιτώσεων ανά πεδίο και σε 10 πεδία υψηλής μεγέθυνσης.

Οι τρεις προαναφερόμενες συνιστώσες αθροιζόμενες καταλήγουν σε τελική βαθμονόμηση 3-9 και βάσει του αθροιστικού αποτελέσματος διακρίνονται τρεις βαθμοί ιστολογικής διαφοροποίησης (GRADEs):

Grade 1: υψηλή διαφοροποίηση (3-5)

Grade 2: μέση διαφοροποίηση (6-7)

Grade 3: χαμηλή διαφοροποίηση (8-9)

5.3 Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού

Η σταδιοποίηση του μαστικού καρκίνου βασίζεται στο γνωστό TNM σύστημα και για την κατάταξη των νεοπλασμάτων λαμβάνονται υπ όψιν η ανάπτυξη του πρωτοπαθούς όγκου (T) σε συνάρτηση με το μέγεθος του όγκου (στη μεγαλύτερη διάμετρό του), η μεταστατικότητα του στους εγγύς και απόμακρους λεμφαδένες της περιοχής ανάπτυξης του όγκου (N), καθώς και οι απομακρυσμένες μεταστάσεις (M).

Κλινική ομαδοποίηση σταδίων TNM

ΣΤΑΔΙΟ 0	Tis	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ I	T1	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0



ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΑ	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
ΣΤΑΔΙΟ ΙΙΒ	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
ΣΤΑΔΙΟ ΙΙC	T(0-4)	N3	M0
ΣΤΑΔΙΟ ΙV	T(0-4)	N(0-3)	M1

Η σταδιοποίηση αυτή αφορά στη συνδυασμένη ιστοπαθολογική και κλινική ταξινόμηση των μορφών καρκίνου του μαστού, ενώ η καθαρά παθολογοανατομική σταδιοποίηση (p-TNM) απαιτεί την εξέταση του πρωτοπαθούς καρκίνου στα πλαίσια του χειρουργικού παρασκευάσματος, χωρίς την ανίχνευση καρκίνου επί των ορίων του.



6 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ [87,88]

6.1 Αρχές Ανοσοϊστοχημείας. Μονοκλωνικά Αντισώματα

Η αδήριτη ανάγκη για εξεύρεση νέων μεθόδων με σκοπό την προαγωγή της διαγνωστικής διαδικασίας στην Παθολογική Ανατομική και Κυτταρολογία οδήγησε στην ανακάλυψη της ανοσοϊστοχημείας. Αυτή αποτελεί τομέα της ιστοπαθολογίας και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και ιστών. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα την έκκριση μεταλλαγμένων βιολογικών προϊόντων ειδικού ή όχι τύπου για το συγκεκριμένο είδος κυττάρων εξόρμησης του όγκου (βιολογικοί ή βιοχημικοί ή καρκινικοί δείκτες). Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των αντιγόνων-στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές, καθιστώντας κατ' αυτό τον τρόπο ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών. Αν και ο ανοσοφθορισμός –πρόδρομη τεχνική ανίχνευσης πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας σύνδεσης αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθειοκυανική φλουροσκεΐνη– υπήρξε για μεγάλο χρονικό διάστημα η μοναδική μέθοδος αναγνώρισης στους ιστούς ειδικών αντιγόνων, ανοσοσφαιρινών και διαφόρων κλασμάτων του συμπληρώματος, αναπτύχθηκαν πιο αξιόπιστες και εξειδικευμένες τεχνικές για άμεση και ορατή με συμβατική μικροσκόπηση εκτίμηση του αποτελέσματος.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη χρησιμοποίηση ενζύμων ή ενζυματικών συστημάτων που εφαρμόζονται στους ιστούς ή σε κυτταρικά επιχρίσματα μετά τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, χρωματίζοντας έντονα τις



θέσεις εντόπισης τους καθιστώντας τις έτσι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται ανοσοενζυμικές και οι πιο σημαντικές είναι οι μέθοδοι ανοσοπεροξειδάσης, αβιδίνης-βιοτίνης, στεπταβιδίνης καθώς και νέες μέθοδοι παράκαμψης της βιοτίνης με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης. Κομβικό ρόλο στην αύξηση της ευαισθησίας και ειδικότητας των προαναφερθέντων μεθόδων αποτέλεσε η παραγωγή ειδικών αντιορών, δηλ ειδικών αντισωμάτων για σύνδεση με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Αναπτύχθηκαν έτσι δύο κατηγορίες αντισωμάτων, που ανάλογα με το κριτήριο της στοχευμένης ειδικότητάς τους διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Τα πρώτα είναι λιγότερο εξειδικευμένα, επειδή στοχεύουν περισσότερους του ενός αντιγονικούς επίτοπους, ενώ αντίθετα τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένες αντιγονικές θέσεις προσδίδοντας μεγαλύτερη ειδικότητα από τα προηγούμενα.

Δομικά, τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ανοσοσφαιρίνες (Ig), που συγκροτούνται από δύο βαριές και δύο ελαφρές αλυσίδες με κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε διαφορετικούς υπότυπους (α, μ, γ, δ, ε), ενώ οι ελαφρές αλυσίδες σε δύο τύπους. Ο ισότυπος μιας ανοσοσφαιρίνης χαρακτηρίζεται από τον τύπο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης π.χ IgA, IgG, IgM. Οι τέσσερις αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία σταθερή (τμήμα Fc) και μία μεταβλητή περιοχή, ενώ κάθε βαριά από μία μεταβλητή και 3-4 σταθερές περιοχές. Οι μεταβλητές περιοχές αποτελούν τη θέση πρόσδεσης των αντιγόνων επί των ανοσοσφαιρινών και ονομάζονται τμήματα Fab.

Η παραγωγή των αντισωμάτων συσχετίζεται με την ανοσολογική



ανταπόκριση του οργανισμού. Η τελευταία σε κάθε αντιγόνο που εισάγεται στον οργανισμό είναι πολυκλωνική, δηλαδή πολλοί διαφορετικοί κλώνοι Β-λεμφοκυττάρων διεγείρονται για να παράγουν αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά έχουν διαφορετική μοριακή δομή και αναγνωρίζουν αντίστοιχα διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Για την ανοσοποίηση ζωικού οργανισμού χρησιμοποιείται καθαρό αντιγόνο, όμως ο οργανισμός αυτός παράγει ποικιλία αντισωμάτων έναντι πολύ μικρών ποσοτήτων ξένων ουσιών, που περιέχονται υποχρεωτικά στο αντιγόνο. Οι πιο ειδικοί αντιοροί περιέχουν μείγμα αντισωμάτων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιολογική συμπεριφορά. Για τους λόγους αυτούς οι ανοσολόγοι προσπαθούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων με ομοιογένεια στη συμπεριφορά του. Οι πρωτεΐνες του πολλαπλού μυελώματος είναι γνωστό ότι αποτελούν ομοιογενείς ανοσοσφαιρίνες (μονοκλωνικές), οι οποίες εμφανίζονται στην περιοχή των γ-σφαιρινών κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό συμβαίνει γιατί η νεοπλασματική εξαλλαγή πραγματοποιείται μόνο σε ένα κλώνο Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, ίδιας βιοχημικής σύστασης. Οι βιολόγοι ανέπτυξαν τη σύντηξη των κυττάρων – πειραματοζώων σε ιστικές καλλιέργειες. Τα κύτταρα αυτά με τα ιδιάζοντα γενετικά χαρακτηριστικά σχηματίζουν ένα νέο κύτταρο, το λεγόμενο υβρίδιο.

Η παραγωγή μονοκλωνικού πραγματοποιείται με την ευαισθητοποίηση του πειραματόζωου σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Μετά από καθορισμένο χρόνο γίνεται θανάτωση του πειραματόζωου και εν συνεχεία λήψη κυττάρων σπληνός από τα οποία διαχωρίζονται τα Β-λεμφοκύτταρα και γίνεται σύντηξή τους με άλλα κύτταρα πολλαπλού μυελώματος. Η σύντηξή τους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων με την ιδιότητα της συνεχούς παραγωγής κυττάρων με τα ίδια



γνωρίσματα (υβριδώματα). Ποσότητες υβριδικών κυττάρων είναι δυνατό να αποθηκευθούν σε βαθιά κατάψυξη, ενώ άλλα κύτταρα ενίοτε στην περιτοναϊκή κοιλότητα πειραματοζώων, τα οποία παράγουν ασκτικό υγρό. Το υγρό αυτό περιέχει υψηλό τίτλο αντισώματος. Τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι πολυκλωνικοί αντιοροί χρησιμοποιούνται στην ιστοπαθολογία για τη διαφορική διάγνωση νοσημάτων και κυρίως νεοπλασμάτων. Τα πλεονεκτήματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη καθαρότητα, η εφαρμογή τους είναι εύκολη και γίνεται με το συνδυασμό ανοσοενζυμικών μεθόδων ή ανοσοφθορισμού και η ευαισθησία τους εξαιρετικά μεγάλη. Το πρόβλημα των διασταυρούμενων αντιδράσεων, αν και πολύ μικρότερο σε έκταση απ αυτό των πολυκλωνικών αντισωμάτων, υπάρχει και οφείλεται στα διάφορα αντιγόνα που έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες αντιγονικές ιδιότητες.

6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ανοσοϊστοχημεία, σε αντίθεση με τις κλασσικές ιστοχημικές μεθόδους, βασίζεται σε αντιδράσεις με εξειδίκευση στην αναγνωρισιμότητα του αντιγονικού στόχου. Οι μη σημασμένες τεχνικές (ενζυματικές) βασίζονται στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφατάση και δευτερευόντως η οξειδάση της γλυκόζης. Οι κύριες μέθοδοι παρατίθενται περιληπτικά ως εξής:



6.2.1 Μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της μεθόδου αποτελεί η σύνδεση των αντισωμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, αφού προηγηθεί σειρά μη συνδεδεμένων αντισωμάτων εναντίον του αντιγόνου στόχου για την έμμεση μέθοδο. Η αναγνώριση των εναποθέσεων (αντιγόνων) με το κοινό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται τελικά με τη χρήση χρωμογόνων, συνηθέστερα με την επίθεση της διαμινιβενζιδίνης (DAB). Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και υπεροξειδίου του υδρογόνου σχηματίζοντας αδιάλυτο πολυμερές στα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος αποδίδοντας μια καφέ απόχρωση στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο. Ακριβώς αυτές οι μοριακές μεταβολές της DAB οδηγούν στο σχηματισμό σταθερού χρώματος που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Εν συνεχεία οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris, Mayer's) για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά ιστολογικά χαρακτηριστικά ή κυττάρων. Αναλυτικά:

α) Η άμεση μέθοδος είναι απλούστερη, αλλά ταυτόχρονα είναι αρκετά ευαίσθητη για την ανίχνευση κυρίως ανοσοσφαιρινών, κλασμάτων του συμπληρώματος και αρκετών αντιγόνων με τη χρήση πολυκλωνικών και μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα αντισώματα είναι συνδεδεμένα απευθείας με την υπεροξειδάση.

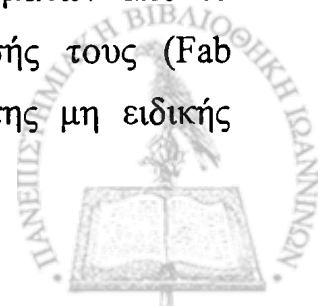
β) Η έμμεση μέθοδος (τεχνική Sandwich) είναι πιο ευαίσθητη από την προαναφερθείσα και χρησιμοποιούνται δύο σειρές αντισωμάτων. Ο πρώτος αντιορός, ο οποίος είναι και ο πρωτογενής προέρχεται συνήθως από κουνέλια (πολυκλωνικά αντισώματα) ή από ποντίκια (μονοκλωνικά αντισώματα) και δεν είναι συνδεδεμένος με υπεροξειδάση. Ο δεύτερος



αντιορός είναι συνδεδεμένος με υπεροξειδάση και προέρχεται από άλλο είδος ζώου (χοίρος) που έχει ήδη ευαισθητοποιηθεί με την IgG ανοσοσφαιρίνη του πρώτου. Έτσι, τα αντισώματα αυτά στοχεύουν τα της πρώτης σειράς που δρούν στην περίπτωση αυτή ως αντιγόνο και αποκαλύπτουν την πρωτογενή αντιγονική θέση.

γ) Η μέθοδος της "γέφυρας" (γεφυρική ανοσουπεροξειδάση) αποτελεί προέκταση της έμμεσης μεθόδου. Χρησιμοποιούνται τρεις σειρές βαντιορών και παρεμβάλλεται ένα μη συνδεδεμένο αντίσωμα μεταξύ του πρώτου και του τελευταίου αντισώματος. Αυτό, επίσης, δεν είναι συνδεδεμένο και στοχεύει την υπεροξειδάση του ζωϊκού είδους από το οποίο προέρχεται το πρωτογενές αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση των τομών με αντιορό που περιέχει ελεύθερη υπεροξειδάση, η οποία συνδέεται με το τελευταίο αντίσωμα με αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

δ) Η μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP μέθοδος) αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου της ενζυμικής γέφυρας. Η υπεροξειδάση συνδέεται πριν από την εφαρμογή της με το αντίσωμά της (αντιυπεροξειδάση) σχηματίζοντας κυκλικό σύμπλεγμα σε αναλογία 3 μορίων υπεροξειδάσης προς 2 μόρια αντιυπεροξειδάσης. Ο πρώτος και ο δεύτερος αντιορός δεν είναι συνδεδεμένος, ενώ το σύμπλεγμα υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης αποτελεί την τρίτη σειρά. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης του πρωτογενούς αντισώματος σε μεγάλη αραίωση, ελαττώνοντας έτσι το βαθμό σύνδεσής του με ανεπιθύμητα αντιγόνα των ιστών. Η μέθοδος αυτή μειώνει την πιθανότητα αποσύνδεσης των αντισωμάτων από τα αντιγόνα, επειδή όλες οι αντιγονικές θέσεις δεσμευσής τους (Fab τμήματα), είναι κορεσμένες και περιορίζει το βαθμό της μη ειδικής χρώσης (background).



6.2.2 Μέθοδος Συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης **(ABC)**

Αποτελεί ανοσοενζυμική μέθοδο, ανάλογη της PAP και θεωρείται πιο ευαίσθητη μέθοδος απ' αυτή, λόγω της ισχυρής δεσμευτικής ιανότητας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη προερχόμενη από το λευκό του αυγού και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (4 συνδετικές θέσεις ανά μόριο). Η βιοτίνη αποτελεί βιταμίνη με χαμηλό μοριακό βάρος και βρίσκεται στη λέκιθο του αυγού, συνδέεται δε με το δεύτερο αντιγόνο με τον ίδιο τρόπο που συνδέεται η υπεροξειδάση. Εν συνεχεία, ο τρίτος αντιγόρος αποτελείται από ένα σύμπλεγμα αβιδίνης και ενζύμου συνδεδεμένου με βιοτίνη, το οποίο έχει μερικές ελεύθερες θέσεις αβιδίνης για σύνδεση με τη βιοτίνη του δεύτερου αντισώματος. Παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί η αντικατάσταση της αβιδίνης από τη στρεπταβιδίνη στην προαναφερόμενη τριάδα ABC. Η στρεπταβιδίνη, η οποία παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces avidinii*, αποτελεί πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 KD και περιλαμβάνει τέσσερις όμοιες υπομονάδες, η κάθε μία εκ των οποίων έχει μια θέση σύνδεσης με τη βιοτίνη. Η χρήση της έναντι της αβιδίνης προτιμάται διότι δεν περιέχει υδατάνθρακες, οι οποίοι συνδέονται μη ειδικά με τις λεκτίνες των ιστών και επίσης διότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι ουδέτερο. Η στρεπταβιδίνη βρίσκει εφαρμογή είτε ως σύμπλεγμα με τη βιοτίνη, είτε σημασμένη με ένζυμο (labeled streptavidin).

6.2.3 Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης

Η αλκαλική φωσφατάση εφαρμόζεται είτε ως σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-αλκαλικής φωσφατάσης είτε ως σύμπλεγμα αλκαλικής



φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης. Το τελευταίο σύμπλεγμα αποτελείται από δύο μόρια αντιγόνου συνδεδεμένα με ένα μόριο αντισώματος. Η διάταξη αυτή μοιάζει με τη φυσιολογική αντίδραση σύνδεσης ενός δισθενούς αντισώματος και κατά συνέπεια το σύμπλεγμα είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

6.2.4 Μέθοδος του ενός ή των δύο σταδίων με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης (EPOS ή two step method- Dako En Vision⁺ dextran technology)

Η κύρια αρετή της μεθόδου στηρίζεται στην παράκαμψη της βιοτίνης (το πάγκρεας ανήκει στα όργανα που παράγουν μέτρια επίπεδα βιοτίνης-ενδογενής βιοτίνη). Το σύστημα βασίζεται σε ένα ενζυμικά σημασμένο υδατοδιαλυτό πολυμερές δεξτράνης, στο οποίο προσδένονται τα δευτεροταγή αντισώματα μετά την επίθεση του πρωτοταγούς αντισώματος. Σε αντίθεση με το κλασικό αυτό πρότυπο ανοσοιστοχημικής επεξεργασίας, το σύστημα του ενός σταδίου (one step method) βασίζεται στη σύνδεση του πρωτοταγούς αντισώματος με το πολυμερές δεξτράνης, αφού έχει συντελεσθεί η δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Η συνολική τεχνική επιτρέπει την ταχύτερη και πιο ευαίσθητη τελική ανοσοχρώση, καθώς συρρικνώνονται τα απαιτούμενα στάδια της ανοσοιστοχημείας και λόγω της μη διασταυρούμενης αντίδρασης με την ενδογενώς παραγόμενη βιοτίνη δε σχηματίζεται υπόστρωμα χρώσης.



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διερεύνησε με ανοσοϊστοχημική ανίχνευση την έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε πρῶτοπαθή καρκινώματα του μαστού στα οποία εκδήλωσε μεταστάσεων αφορά, κατεξοχήν μόνο, το σκελετικό σύστημα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν περιστατικά πρωτοπαθών καρκινωμάτων μαστού με κατ' εξοχήν οστική μεταστατική νόσο με σκοπό την διερεύνηση μηχανισμών παθογένεσης και προγνωστικών δεικτών. Στις προαναφερθείσες πρωτείνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου επιλέχθηκαν τα μόρια των κυκλινών (D1, D2, E, A και B) που δρουν ως ευοδατικοί παράγοντες, καθώς και οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (p27, p21, p16) -αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου-, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και BCL-2.



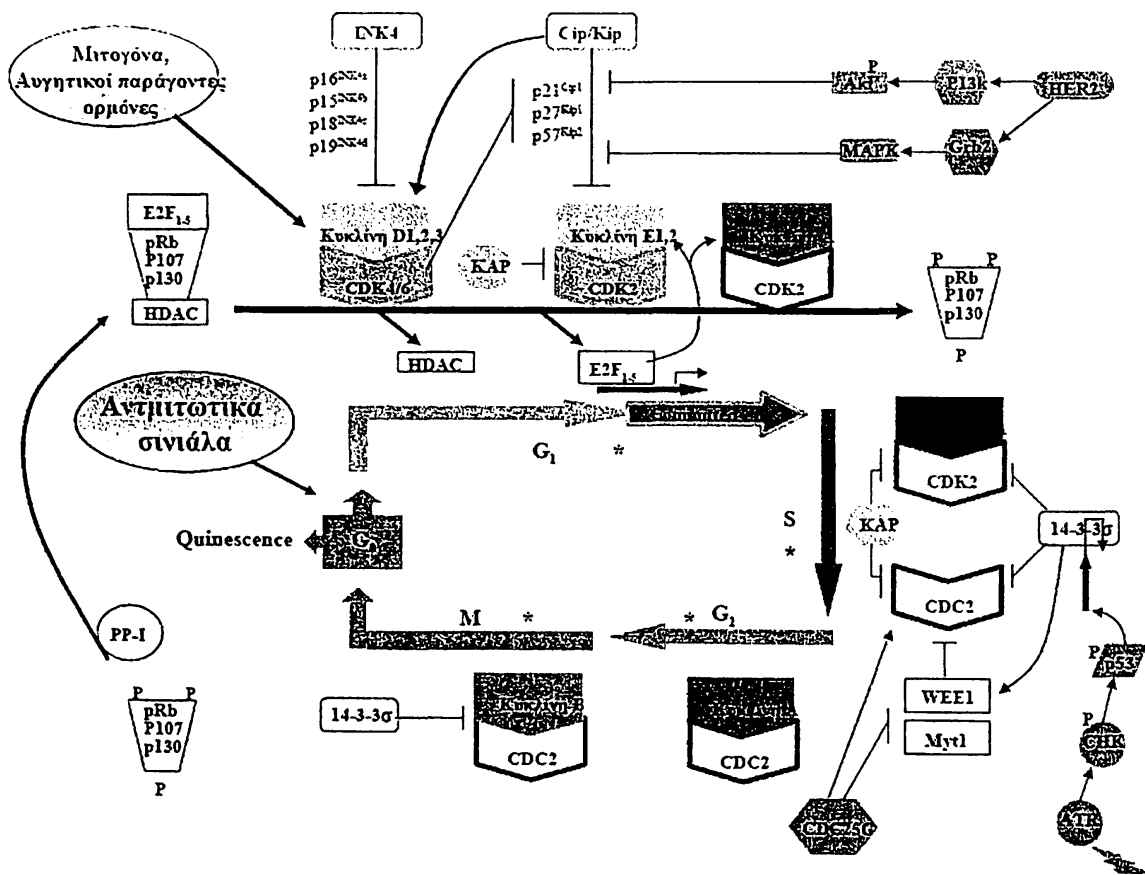
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

ΣΧΗΜΑΤΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ



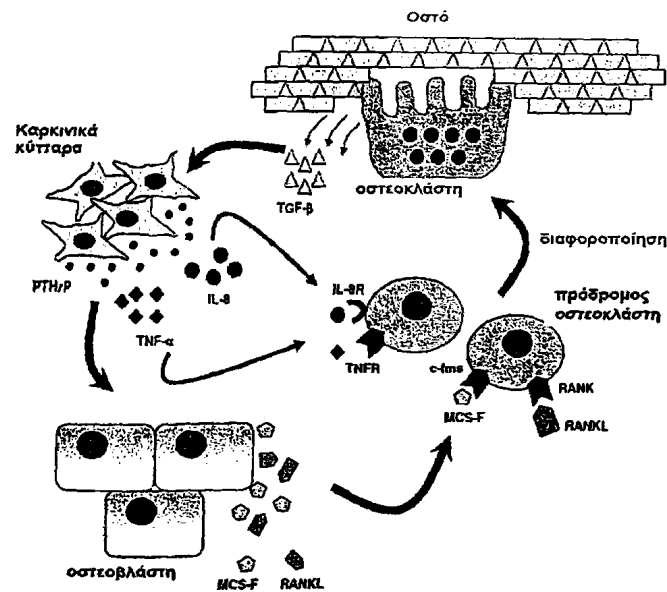
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ





Σχήμα 1. Κυτταρικός κύκλος και εμπλεκόμενα μόρια





Σχήμα 2. Πρότυπο εξέλιξης οστεολυτικών μεταστάσεων από καρκίνο μαστού καταδεικνύει τις σύνθετες βιοχημικές διεργασίες αλληλεπίδρασης καρκινικών και στρωματικών κυττάρων. [Τροποποίηση από: M. Cicek and M. J. Oursler. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer Metastasis Rev.* 25 (4):635-644, 2006]

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

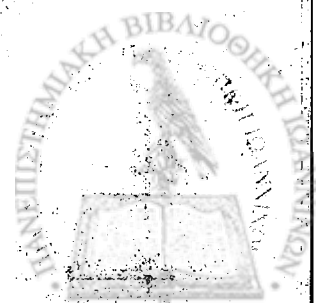
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



7 ΥΛΙΚΟ και ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 Προέλευση-Συλλογή-Διαχείριση του βιοπτικού υλικού

Το υλικό αναδύθηκε κυρίως από την αρχαιακή ιστική βάση του Παθολογοανατομικού Τμήματος του ΠΠΓΝ Ιωαννίνων και οι ασθενείς παρακολουθούνται από την Ογκολογική Κλινική του ΠΠΓΝ Ιωαννίνων. Αφορούσε δε σε κύβους παραφίνης 145 σποραδικών πρωτοπαθών πορογενών αδενοκαρκινωμάτων μαστού. Σύμφωνα με τη σταδιοποίηση κατά TNM, 80 ασθενείς ταξινομήθηκαν ως σταδίου II/III χωρίς την ανεύρεση λεμφαδενικών μεταστάσεων μετά πάροδο –κατά μέσο όρο- 4 ετών συνεχούς παρακολούθησης, 30 εμφάνισαν μεταστάσεις και επέζησαν άνω των 24 μηνών μετά την πιστοποίηση των μεταστάσεων, ενώ 35 ασθενείς παρουσίασαν οστική μεταστατική νόσο με μέσο όρο επιβίωσης 70 μηνών μετά την ιστολογική πιστοποίηση της μετάστασης.

Η ιστοχημική επεξεργασία των - μικροτομημένων σε πάχος 3μm-κύβων παραφίνης, πραγματοποιήθηκε με τη χρώση Ηωσίνη-Αιματοξυλίνη (H&E). Κατά τη μικροσκόπηση εκτιμήθηκε η διαφοροποίηση του νεοπλάσματος καθώς και η παθολογοανατομική του σταδιοποίηση.



7.2 Εργαστηριακός Αλγόριθμος Μελέτης

ΚΥΒΟΙ ΠΑΡΑΦΙΝΗΣ (ΙΣΤΟΙ)



ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ



ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ



ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

7.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού προγράμματος στατιστικής ανάλυσης SPSS. Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τρεις πληθυσμοί ασθενών $n=80$ (ασθενείς δίχως μεταστάσεις σε διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 3,5 χρόνια), $n=30$ (ασθενείς με σπλαγγχικές μεταστάσεις) και $n=35$ (ασθενείς με οστικές μόνο μεταστάσεις για διάρκεια τουλάχιστον 24 μηνών).

Οι κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν περιελάμβαναν το φύλο, το βαθμό διαφοροποίησης, το στάδιο της νόσου καθώς και την επιβίωση εκφραζόμενη σε μήνες. Οι μετρούμενες ποιοτικά μεταβλητές αφορούσαν το επίπεδο της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης σε πυρηνικό επίπεδο δηλώνοντας τον απόλυτο αριθμό των ανοσοχρωσμένων πυρήνων σε ποσοστιαία αναλογία.

Μέσα στο περιβάλλον του λογισμικού (SPSS) ορίστηκαν οι μεταβλητές ως αλφαριθμητική ή αριθμητική. Οι μεταβλητές στην αρχική (πρώτο



δείγμα) όσο και στην τελική τους μορφή (δεύτερο δείγμα) ονομαστικοποιήθηκαν και ο έλεγχος ανεξαρτησίας τους σε σχέση με τις προαναφερόμενες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του Chi-square Test (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης Pearson), του Kruskal-Wallis Test, καθώς και του ANOVA test.

Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ανωτέρω συσχετίσεων ορίστηκε $p < 0,01$.

7.4 Πρωτόκολλο Ανοσοϊστοχημικής Διερεύνησης. Δείκτες

Διερευνήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση 11 συνολικά πρωτεϊνών. Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει συνοπτικά την προέλευση, λειτουργία και τις ειδικές συνθήκες ανοσοϊστοχημικής επεξεργασίας όλων των εξεταζόμενων αντισωμάτων.

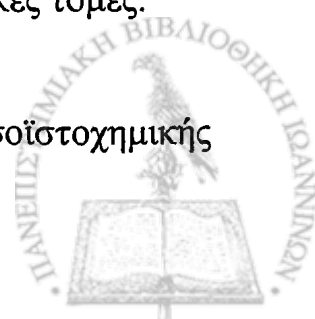


Πίνακας xx: Εξεταζόμενοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες

Γονίδιο	Πρωτεΐνη Γονιδίου	Γονιδιακή θέση	Κλώνος	Εταιρία
1	p53	7p13	BAB240	Dako
2	p21	0q25	4D10	Novocastra
3	p27	7q21	1B4	Novocastra
4	rb	3q11	1SAB	Oncogene
5	Cyclin D1	1q13	PZD1F11	Novocastra
6	Cyclin D2		M20	Santa Cruz
7	Cyclin D3		DCS-22	Novocastra
8	Cyclin E		13A3	Novocastra
9	Cyclin A		6E6	Novocastra
10	Cyclin B		7A9	Novocastra
11	BCL-2	8q21	I24	Dako

Η ανίχνευση αντιγόνων σε τομές παραφίνης καθίσταται δυνατή εφόσον προσδεθεί στο αντιγόνο το αντίστοιχο αντίσωμα και ακολούθως σε αυτό προσδεθεί ένας ιστοχημικά γνωστός δείκτης, η χρώση του οποίου αποκαλύπτει εμμέσως την παρουσία του αναζητούμενου αρχικού αντιγόνου. Στην παρούσα μελέτη η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης και τη χρήση του HRP-EnVision kit της εταιρείας (DAKO-Denmark). Τα βασικά στάδια (αντιγονική αποκάλυψη, συγκέντρωση αντισώματος, χρόνος επώασης) προτυπώθηκαν και τυποποιήθηκαν στα δείγματα με επανειλημμένες δοκιμαστικές τομές.

Αναλυτικά, τα στάδια της εφαρμοζόμενης αυτής ανοσοϊστοχημικής τεχνικής περιέλαβαν:



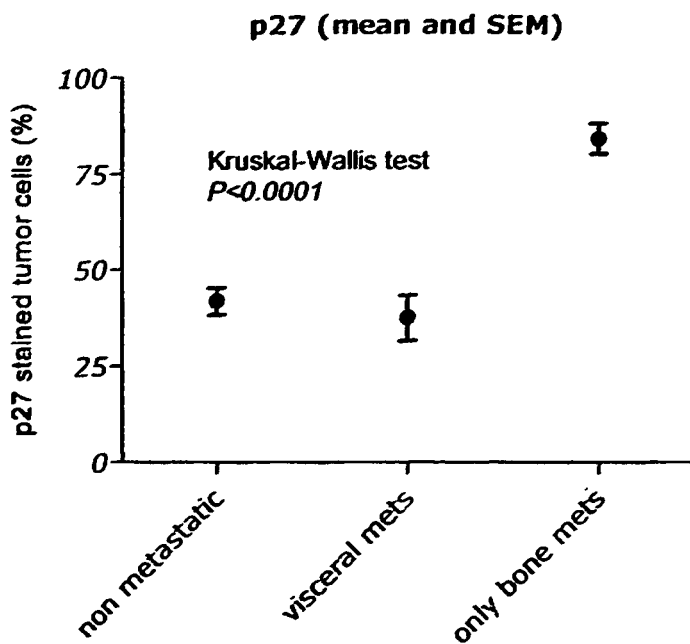
- Τοποθέτηση των πλακιδίων με τις τομές παραφίνης πάχους 4μm σε κλίβανο θερμοκρασίας 60°C για 24h , ώστε να αποξηρανθούν.
- Αποπαραφίνωση με εμβύθιση των τομών σε ξυλόλη για 20min.
- Ενυδάτωση των τομών σε διαδοχικώς αραιούμενα (κατιόντα) διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης
- Έκπλυση των τομών με αποσταγμένο νερό.
- Διαδικασία επεξεργασίας και αποκάλυψης του αναζητούμενου αντιγονικού επιτόπου, τροποποιημένη ανάλογα με το κάθε χρησιμοποιούμενο αντίσωμα.

- Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν περιελάμβαναν είτε την εμβύθιση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος και την τοποθέτησή τους σε φούρνο μικροκυμάτων στα 300 W, για δύο κύκλους των 15 min, είτε, εμβυθίστηκαν σε διάλυμα υψηλού pH και τοποθετήθηκαν εν συνεχεία σε φούρνο μικροκυμάτων στα 800 W, για δύο κύκλους των 5 min, είτε, τέλος, εναλλακτικά οι τομές επικαλύφθηκαν με διάλυμα πρωτεΐνάσης -K και επώαστηκαν για 25 min σε θάλαμο υγρασίας σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αναστολή της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης με την τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ σε απόλυτη μεθανόλη (0,01M) για 30min.
- Ξέπλυμα των τομών με ρυθμιστικό διάλυμα 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 TBS.



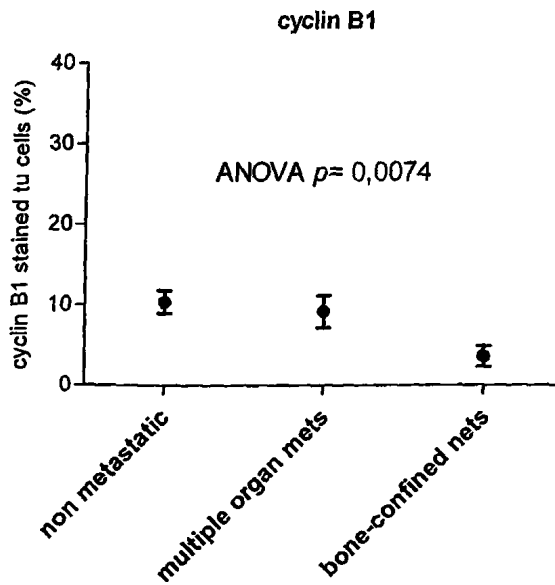
8 Αποτελέσματα

Σύμφωνα με την ποιοτική εκτίμηση του ανοσοϊστοχημικού αποτελέσματος, η μέση τιμή της έκφρασης των καρκινικών κυττάρων όσον αφορά την πρωτεΐνη p27 παρουσίασε στην ομάδα των οστικών μεταστάσεων τιμή 95/84,16%, στην ομάδα των ελεύθερων μεταστάσεων περιστατικών 40/41,9% και στην ομάδα των σπλαγγνικών μεταστάσεων 40/37,5%. Η σύγκριση των τιμών αυτών ευρέθη να χαρακτηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα ($p=0.0001$).

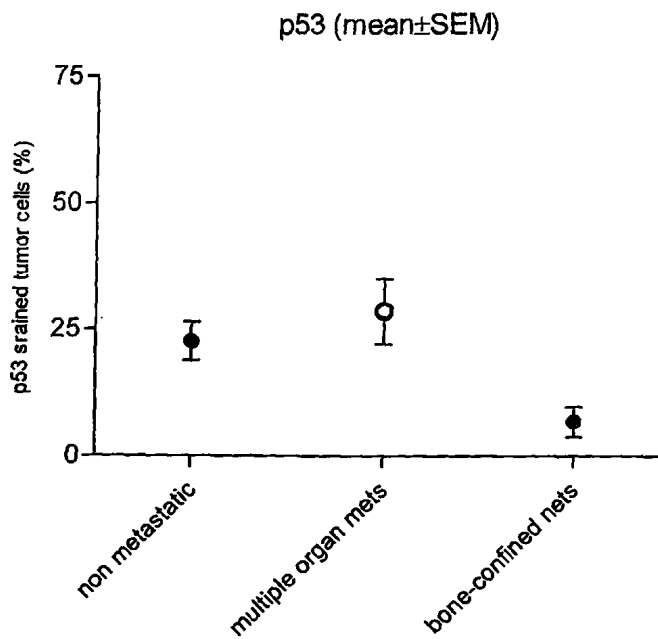


Προσεγγίζοντας τους λοιπούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, παρατηρούμε ότι, η πρωτεΐνη κυκλίνη B1 παρουσίαζε σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα των οστικών μεταστάσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες εξεταζόμενων ασθενών ($p=0.007$), η πρωτεΐνη κυκλίνη D1 παρουσίαζε μέτρια επίπεδα έκφρασης ($p=0.02$) και η πρωτεΐνη κυκλίνη E ευρέθη σε χαμηλή έκφραση στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών.





Παράλληλα τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης **p53** παρουσιάστηκαν σημαντικά χαμηλά σε σχέση με τις άλλες ομάδες ασθενών ($p=0.0007$).

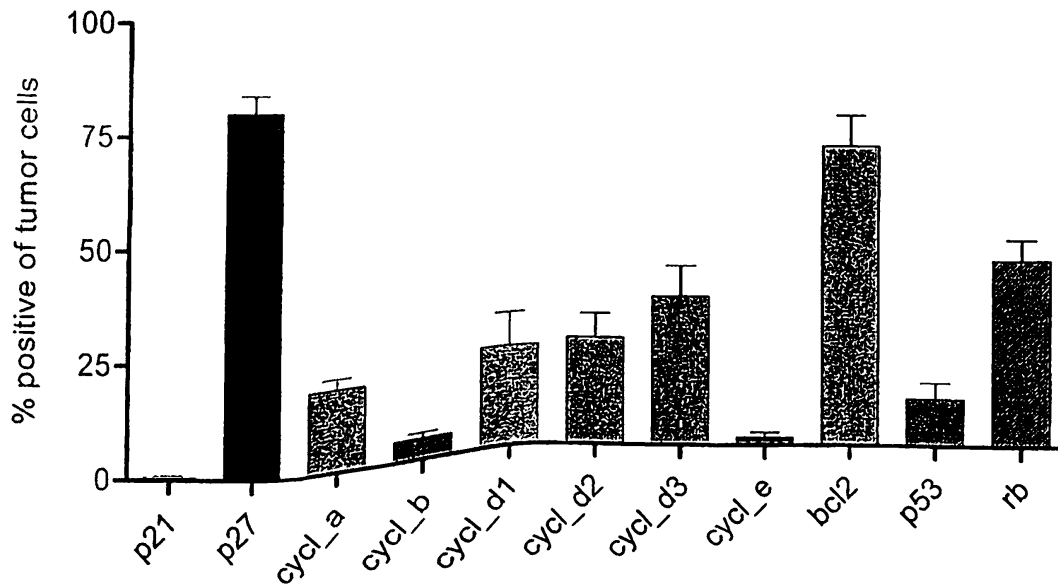


Οι κυκλίνες **D** και **E** συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με την έκφραση της πρωτεΐνης **BCL2**, ενώ, παράλληλα, η έκφραση της πρωτεΐνης κυκλίνη **D1** παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με



την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ($p=0.03$). Η συνολική εικόνα της έκφρασης των εξεταζόμενων δεικτών στην υποομάδα των ασθενών με μεταστατική οστική νόσο αποτυπώνεται στο ακόλουθο ιστόγραμμα.

expression profile of cell-cycle and apoptosis regulators
in primary breast tumors
that develop only bone metastases



9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού, αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες, όπως καταγράφεται στις λεγόμενες Δυτικού τύπου κοινωνίες. Στις ασθενείς αυτές, οι μεταστάσεις σε απομακρυσμένες θέσεις - και όχι τόσο ο πρωτοπαθής όγκος - αποτελούν την κύρια αιτία κατάληξης [90]. Με την εφαρμογή νέων αλγορίθμων διαχείρισης των περιστατικών καρκίνων μαστού, καθώς και με τη δημιουργία προγραμμάτων προληπτικού ελέγχου του γενικού πληθυσμού, οι δείκτες των μεταστάσεων και της θνητότητας εμφανίζουν προοδευτική μείωση, ως αποτέλεσμα της έγκαιρης διάγνωσης και της εισαγωγής των ασθενών σε πρωτόκολλα στοχευμένων και επικουρικών θεραπευτικών στρατηγικών. Οι τελευταίες δρουν ως καταστολείς της ενεργότητας των καρκινικών κυττάρων, τα οποία πιθανόν έχουν δημιουργήσει μεταστατικές εστίες τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης του καρκίνου [91]. Στις ασθενείς, ηλικίας μικρότερης των 50 ετών, η εφαρμοζόμενη χημειοθεραπεία αυξάνει το δείκτη του 15ετούς προσδόκιμου επιβίωσης κατά 10% περίπου, ενώ σε πιο ηλικιωμένες ασθενείς αυτός διαμορφώνεται στο 3% περίπου. Επιπρόσθετα όμως, οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα βραχυπρόθεσμων ή απώτερων ανεπιθύμητων παρενεργειών οι οποίες ουσιαστικά επηρεάζουν την ποιότητα της ζωής των ασθενών. Καθώς δεν υπάρχουν ακριβείς μηχανισμοί πρόγνωσης της εκδήλωσης μεταστάσεων στις ασθενείς αυτές, η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε 80% περίπου των περιστατικών, παρά το γεγονός ότι το 40% αυτών υποτροπιάζει και οδηγείται τελικά στην κατάληξη από τις μεταστάσεις [92].

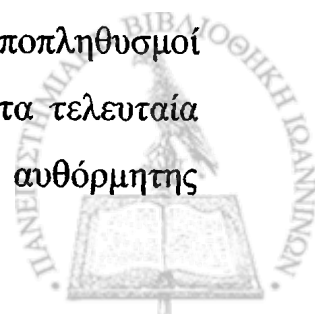
Για αυτούς τους σοβαρούς λόγους προβάλλει επιτακτική ή ανεύρεση



νέων, ικανών προγνωστικών δεικτών για την κατηγοριοποίηση των ασθενών σύμφωνα με μοριακά κριτήρια, ώστε να εξατομικεύεται η ογκολογική τους κατηγοριοποίηση (ομάδα χαμηλού ή υψηλού κινδύνου για εκδήλωση μεταστάσεων-ανταπόκριση σε συμβατικές θεραπείες) μέσω της παρακολούθησης της πορείας της νόσου και της ορθολογικότερης εφαρμογής των θεραπευτικών αυτών στρατηγικών [93]. Η λεγόμενη "γονιδιακή υπογραφή" των πρωτοπαθών όγκων μέσω της συγχρονικής ανάλυσης πολλών γονιδίων, αποτελεί την αιχμή του δόρατος στη νεώτερη μοριακή ιατρική, καθώς οι γονιδιακές συστοιχίες, όπως και οι αντίστοιχες ιστικές συσχετίζουν γονιδιακές και πρωτεϊνικές μεταβολές με τη βιολογική συμπεριφορά, των υπό εξέταση νεοπλασμάτων, συγκροτώντας το μοναδικό γενετικό μωσαϊκό κάθε ασθενούς [94,95].

Η μεταστατική διαδικασία των καρκινικών κυττάρων άρχισε να διερευνάται διεξοδικά στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και όλη την επόμενη δεκαετία μέσω της εφαρμογής και ανάλυσης πειραματικών πρωτοκόλλων μετάστασης [96]. Μελετώντας τη μεταστατική συμπεριφορά σειρών κυτταροκαλλιιεργειών μελανώματος (B16) οι οποίες είχαν ενεθεί σε μύες, ο Fidler απέδειξε ότι κύτταρα τα οποία αναδύθηκαν από έκτοπες του αρχικού πληθυσμού εστίες εμφάνιζαν μεταστατικό δυναμικό ισχυρότερο από τον αρχικό πληθυσμό. Έκτοτε, έχουν τροποποιηθεί οι υποθέσεις αλλά και τα αποτελέσματα της μελέτης των μηχανισμών μετάστασης, έτσι ώστε να έχουν διαμορφωθεί διαφορετικά πρότυπα (μοντέλα) για την εξήγηση του φαινομένου [97].

Το παραδοσιακό μοντέλο προτείνει ότι συγκεκριμένοι υποπληθυσμοί καρκινικών κυττάρων αποκτούν μεταστατική ικανότητα στα τελευταία στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας. Το μοντέλο της αυθόρμητης



μεταστατικής διεργασίας προτείνει την υπόθεση της καθολικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να μεθίστανται στους ιστούς. Το μοντέλο της δυναμικής ετερογένειας εκφράζει την υπόθεση ότι ο καθορισμός του μεταστατικού δυναμικού εξαρτάται από τη συχνότητα ανάδυσης ικανών γιαυτό το σκοπό κυττάρων του νεοπλασματικού πληθυσμού. Παράλληλα, η θεωρία της κλωνικής επικράτησης υποστηρίζει ότι, αναδυόμενοι κλώνοι εντός του νεοπλασματικού πληθυσμού, κατέχουν τέτοια μεταστατική ισχύ, ώστε να σχηματίζουν αυτόνομη καρκινική οντότητα διαφεύγοντας από τον αρχικό νεοπλασματικό πληθυσμό. Η υπόθεση της γονιδιακής μετάστασης προτείνει ότι, η μετάσταση, συμβαίνει μέσω της διαπίδυσης των καρκινικών κυττάρων σε ευαίσθητες περιοχές των απομακρυσμένων οργάνων-στόχων υπό τη επίδραση συγκεκριμένων ενεργοποιημένων ογκογονιδίων [88,89].

Ειδικά, προσεγγίζοντας τον καρκίνο του μαστού, έχουν αναπτυχθεί σύγχρονα μοντέλα κατανόησης της μεταστατικής διαδικασίας [100]. Ένα απ' αυτά υποστηρίζει –σε συνάφεια με το προαναφερθέν παραδοσιακό μοντέλο- ότι η μεταστατική ικανότητα του νεοπλάσματος πιθανόν να αποκτάται στα τελευταία στάδια της καρκινογενετικής διαδικασίας. Για τον λόγο αυτό επιχειρείται η κατηγοριοποίηση των πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού μέσω της γονιδιακής τους ανάλυσης, καθώς θεωρείται ότι, σημαντική προγνωστική αξία για την εκδήλωση της μετάστασης κατέχει η διάκριση των περιστατικών σε πτωχού και αυξημένου κινδύνου, ανάλογα με τις τροποποιήσεις συγκεκριμένων εμπλεκόμενων γονιδίων. Σύμφωνα με ένα εναλλακτικό μοντέλο εξήγησης της εν λόγω διεργασίας, η μετάσταση συμβαίνει ήδη από τα πρώτα στάδια της μαστικής ογκογένεσης και ανεξάρτητα από την αύξηση του πρωτοπαθούς όγκου [101].



Τέλος, μια πιο σύγχρονη άποψη υιοθετεί την υπόθεση της εκδήλωσης της μετάστασης στον καρκίνο του μαστού μέσω της ικανότητας αρχέγονων κυττάρων ευρισκομένων εντός της μάζας του πρωτοπαθούς όγκου να διαφεύγουν και να διασπείρονται στους ιστούς, ιδιότητα που δε χαρακτηρίζει την πλειονότητα των ήδη διαμορφωμένων καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με την αναβαθμισμένη αυτή θεωρία, ογκογόνες μεταλλάξεις συμβαίνουν στα μαστικά αρχέγονα κύτταρα τροποποιώντας τη σύστασή τους και μετατρέποντάς τα σε καρκινικά. Υπό την επίδραση των ινοβλαστών του υποστρώματος, μόνο τα αρχέγονα αυτά κύτταρα εμφανίζουν τη μεταστατική ικανότητα [102]. Πιθανότατα υπάρχει μια ποικιλία ογκοτροποποιημένων αρχέγονων κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν εκλεκτικότητα όσον αφορά τους ιστούς-στόχους της μεταστατικής διεργασίας (π.χ. πνεύμονα, οστά).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάστηκε στη συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως οι κυκλίνες D1, 2, 3, E, A, B, των ανοστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, όπως p27, p21, p16, καθώς και της πρωτεΐνης p53 (ογκοκατασταλτικό γονίδιο, ισχυρός αποπτωτικός παράγοντας) σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που εντοπίζεται μόνο στα οστά. Αποτελεί ήδη κεκτημένη γνώση ότι, ο μεταστατικός καρκίνος του μαστού στα οστά παρουσιάζει χαρακτηριστικά γνωρίσματα, ώστε να λογίζεται ως ιδιαίζουσα κλινικοπαθολογοανατομική οντότητα [103]. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι, ο αποσυγχρονισμός του κυτταρικού κύκλου στις ασθενείς αυτές περιλαμβάνει μηχανισμούς υπερενεργοποίησης των γονιδίων p27 και Cyclin D1 οδηγώντας συνεπώς σε πρωτεϊνική υπερέκφραση. Αντίθετα, χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων κυκλίνη E, B1 και p53 χαρακτηρίζουν το υποσύνολο των ασθενών με μεταστατική νόσο στα οστά. Φαίνεται



λοιπόν από τα εξαγόμενα αποτελέσματα ότι, ο συνδυασμός υπερ – υπό έκφρασης των ανωτέρω μορίων αποτελεί ιδιοσυστασιακό στοιχείο της βιολογικής συμπεριφοράς των ασθενών που εμπίπτουν στην κατηγορία αυτή.

Ο ρόλος των κυκλινών E, D1 και D3 έχει αποτυπωθεί σε σύγχρονες και παλιότερες δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Είναι γνωστό ότι, η πρόγνωση των ασθενών με πρόσφατα διαγνωσμένο καρκίνο στηρίζεται πρωταρχικά στην παρουσία ή απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Παρ' όλα αυτά, περίπου στο 30% των ασθενών αυτών με αρνητικούς λεμφαδένες η νόσος αναζωπυρώνεται, ενώ, παράλληλα, σε ένα εξίσου σημαντικό ποσοστό (20-30%) των ασθενών με διαγνωσμένους θετικούς λεμφαδένες παρατηρείται κατάσταση ελεύθερης νόσου για μια δεκαετία από την χειρουργική εξαίρεση του όγκου και το λεμφαδενικό καθαρισμό [104]. Κατά συνέπεια με βάση τα δεδομένα αυτά, απαιτείται η αποσαφήνιση ανεξάρτητων δεικτών, ικανών να αποδίδουν ασφαλή προγνωστικά δεδομένα για την εκτίμηση του προσδόκιμου επιβίωσης και την ανταπόκριση στις στοχευμένες θεραπείες και συμβατικές χημειοθεραπείες. Σε φυσιολογικές συνθήκες του κυτταρικού κύκλου, η κυκλίνη E ρυθμίζει την ομαλή μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στην S. Συνεπώς, η γονιδιακή ενίσχυση του μορίου – όπως παρατηρείται στο συγκεκριμένο νεόπλασμα - δημιουργεί επιτάχυνση της διαδικασίας αυτής, και κατ' αυτόν τον τρόπο εξηγείται η πρωτεϊνική υπερέκφρασή της στον καρκίνο του μαστού [105].

Κάποιες από τις κυτταρικές σειρές εμφάνισαν υπερέκφραση όχι μόνον όλου του μήκους της πρωτεΐνης, αλλά και των χαμηλού μοριακού βάρους ισομορφών της (34-49 kD). Οι ισομορφές, με έλλειψη του αμινοτελικού



άκρου, εμφανίζονται δραστικότερες, συγκρινόμενες με τη μεγάλου μήκους πρωτεΐνη στη φωσφορυλιωτική διαδικασία των υποστρωμάτων καθώς και στην επιτάχυνση της μετάβασης του κυττάρου από τη φάση G1 στην S. Όμως, υπάρχουν αντιφατικά δημοσιευμένα αποτελέσματα σε ότι αφορά στη συσχέτιση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μορίου με τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος. Σε μία μελέτη, η οποία περιέλαβε ως δείγμα 278 ασθενείς, η υπερέκφραση του μακρού μορίου της πρωτεΐνης συνδυάστηκε με χαμηλά επίπεδα της p27, καθώς και με πτωχή πρόγνωση στην υποομάδα των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες [106]. Αντίθετα, σε μια άλλη μελέτη με δείγμα 157 ασθενών δεν σημειώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των προαναφερομένων παραμέτρων στην πολυπαραγοντική ανάλυση [107].

Τα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της κυκλίνης E σε συνδυασμό με τα μειωμένα του αναστολέα της, της p27^{kip1}, έχουν συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα μεταλλάξεων στο αρχέγονο γενετικό υπόστρωμα του γονιδίου BRCA-1, όπως απέδειξε μια ενδιαφέρουσα μελέτη σε δείγμα 288 ασθενών της γενετικά "απομονωμένης" κοινότητας των Εβραίων Ashkenazi. Σε συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις (185delAG, 5382insC) παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης και ταυτόχρονα υποέκφραση του προαναφερθέντος αναστολέα της, ενώ στην πολυπαραγοντική ανάλυση ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης, καταδείχθηκε η κυκλίνη E [108]. Σε συνάφεια με τα προηγούμενα, μια άλλη μελέτη κατέδειξε ότι και τα επίπεδα της κυκλίνης D1 (υποέκφραση) συνδέονται με τις μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA-1 αλλά όχι και με το BRCA-2 [109]. Η συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης E, ειδικά της μικρομοριακού βάρους μορφής της, με την επιβίωση των ασθενών ισχυροποιείται και από μια άλλη δημοσιευμένη μελέτη με δείγμα 395 ατόμων. Η πολυπαραγοντική ανάλυση περιέλαβε και άλλα



κομβικά μόρια των οποίων η απορρύθμιση συνδέεται με τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος (κυκλίνη D1, HER2/neu, κυκλίνη D3) και ανέδειξε ως ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη την κυκλίνη E [110,112,113].



10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

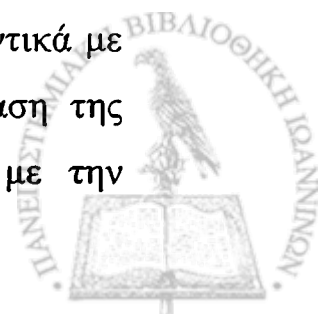
Η μελέτη μας κατέδειξε, με βάση τη συνολική εκτίμηση όλων των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων ότι, στις ασθενείς με μεταστατικό οστικό καρκίνο του μαστού ενεργοποιείται συγκεκριμένος απορρυθμιστικός μηχανισμός που διαφοροποιεί την υποομάδα αυτή από τις άλλες με την ίδια πρωτοπαθή νόσο. Ο γονιδιακός αυτός αποσυγχρονισμός οδηγεί σε διαταραχή της ομαλής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου μέσω αυξημένης έκφρασης των κυκλινών D1, D2, D3, μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης κυκλίνης E και της B1, καθώς και της φυσιολογικής υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης p27, με παράλληλη σχετική μείωση της p53. Το χαρακτηριστικό αυτό γονιδιακό υπόστρωμα εξηγεί την τάση των ασθενών αυτών να διαφοροποιούν την πρόγνωσή τους σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα αποπτωτικών παραγόντων, όπως της πρωτεΐνης BCL2, ενώ χαρακτηριστική είναι και η συσχέτιση με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Το ξεχωριστό αυτό γενετικό προφίλ μπορεί να αποτελέσει τη βάση εξόρμησης για την ανάπτυξη περισσότερο αποδοτικών στοχευμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων (αντισώματα/επικουρική χημειοθεραπεία) ώστε οι συγκεκριμένες ασθενείς να προσπορίζονται οφέλη, σε ότι αφορά στην πρόγνωση και ποιότητα της ζωής τους.



11 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή διερεύνησε τις διαταραχές στην έκφραση ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου σε μεταστατικά καρκινώματα του μαστού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν περιστατικά πρωτοπαθών καρκινωμάτων μαστού με κατ' εξοχήν οστική μεταστατική νόσο, με σκοπό την διερεύνηση μηχανισμών παθογένεσης και προγνωστικών δεικτών. Στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου επιλέχθηκαν τα μόρια των κυκλινών (D1, D2, D3, E και B1) που δρουν ως ευοδατικοί παράγοντες, καθώς και οι αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (p27, p21)-αρνητικοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου-, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων p53 και BCL-2.

Σύμφωνα με την ποιοτική εκτίμηση του ανοσοϊστοχημικού αποτελέσματος η μέση τιμή της έκφρασης των καρκινικών κυττάρων, σε ότι αφορά την πρωτεΐνη p27, παρουσίασε στην ομάδα των οστικών μεταστάσεων τιμή 95/84,16%, στην ομάδα των ελεύθερων μεταστάσεων περιστατικών 40/41,9% και στην ομάδα των σπλαγγχνικών μεταστάσεων 40/37,5%. Η σύγκριση των τιμών αυτών ευρέθη να χαρακτηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα ($p=0.0001$). Προσεγγίζοντας τους λοιπούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες παρατηρούμε ότι, η κυκλίνη B1 παρουσίαζε σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα των οστικών μεταστάσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες εξεταζόμενων ασθενών ($p=0.007$), η κυκλίνη D1 παρουσίαζε μέτρια επίπεδα έκφρασης ($p=0.02$) και η κυκλίνη E ευρέθη σε χαμηλή έκφραση στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών. Οι κυκλίνες D και E συσχετίστηκαν στατιστικά σημαντικά με την έκφραση της πρωτεΐνης BCL2, ενώ παράλληλα η έκφραση της κυκλίνης D1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την



έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ($p=0.03$). Η συνολική εικόνα της έκφρασης των εξεταζόμενων δεικτών στην υποομάδα των ασθενών με μεταστατική οστική νόσο αποτυπώνεται στο ιστόγραμμα σελ. 68.

Το χαρακτηριστικό αυτό γονιδιακό υπόστρωμα εξηγεί την τάση των ασθενών αυτών να διαφοροποιούν την πρόγνωσή τους από τις υπόλοιπες και μπορεί να αποτελέσει τη βάση εξόρμησης για την ανάπτυξη περισσότερο αποδοτικών στοχευμένων θεραπευτικών πρακτικών (αντισώματα/επικουρική χημειοθεραπεία).

12 ABSTRACT

Immunohistochemical profile of cell-cycle and apoptosis regulators in primary breast adenocarcinomas that develop bone only metastasis

Prognosis in patients with breast cancer depends on a variety of factors including metastases in lymph nodes and bones. The last represent a frequent complication of cancer occurring in up to 70% of patients with advanced breast or prostate cancer. In order to refine the role of cell-cycle regulating proteins in this subset of patients, we evaluated the protein expression levels of those markers correlating the results to biological behavior of the examined tumors.

We performed immunohistochemistry for the detection of protein expression levels for the cyclins D1,2,3,E,A,B and the cyclin-dependent kinase inhibitors p27, p21, p53 and also the apoptotic factor BCL2. For the purposes of our study, we used 145 tissue sections of paraffin-embedded primary breast cancers grouped in three subsets including 80 cases with stage II and III tumors without metastases (NM) after a 4-years median follow up, 35 cases with bone confined metastatic breast cancer (BCBC) with a 70 month median survival after the diagnosis of bony metastases and also 30 cases demonstrating visceral metastases (VM) with a survival of up to 24 months post detection of metastases. The results indicated that BCBC group was characterized by high expression levels of p27/kip1 protein. The median/mean positivity of tumor cells for p27 protein in the same group was 95/84,16% in NM 40/41,9% and in VM 40/37,5% ($p=0.0001$). Cyclin B1 had significantly lower expression in the BCBC group ($p=0.007$), Cyclin D1 was moderately higher ($p=0.02$) and protein levels of cyclin E were very low in the BCBC



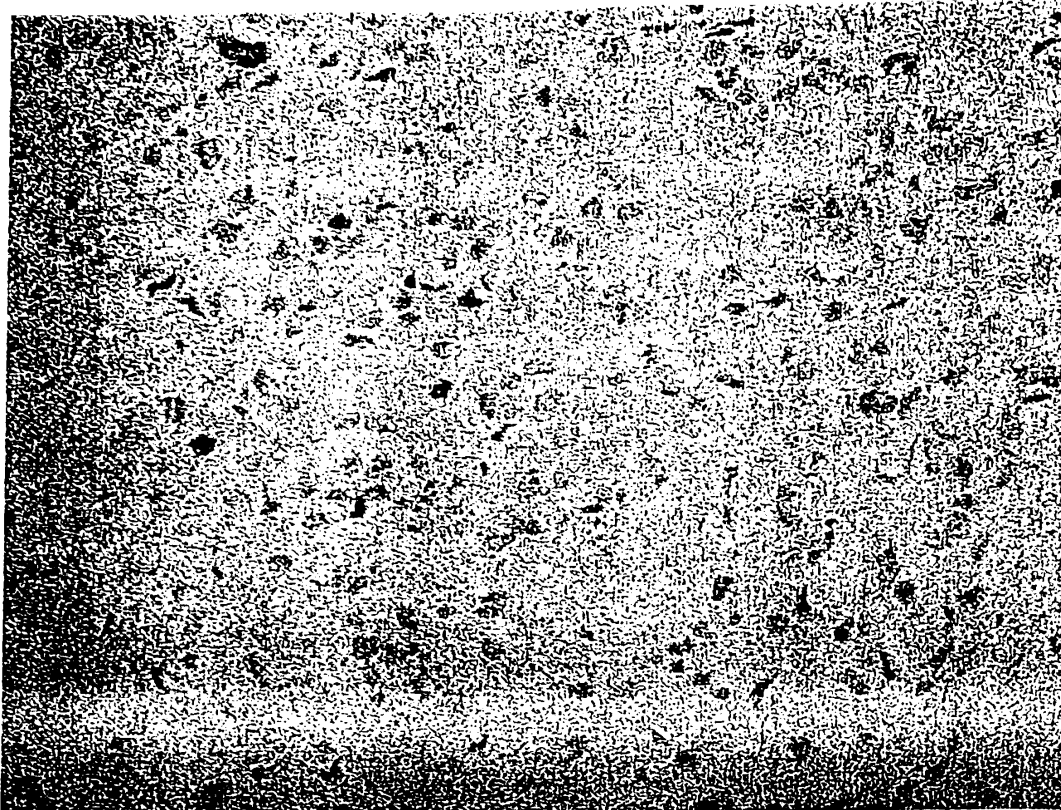
group. Among other assayed proteins, p53 aberrant expression was significantly lower in the BCBC group ($p=0.0007$). Type D and E cyclins were correlated statistically significantly to BCL2 and cyclin D1 expression was associated to estrogen receptors ($p=0.03$). Our study provides evidence that breast cancers with a propensity to remain metastasized only to bone have a favorable expression pattern of cell cycle effectors characterized by a normal high p27, increased cyclin D1, and low cyclin E protein levels which explains the indolent course of these metastatic tumors. The combined assessments of p27, cyclin E, D1 and B can serve identify this subset of breast cancer and guide therapeutic management.



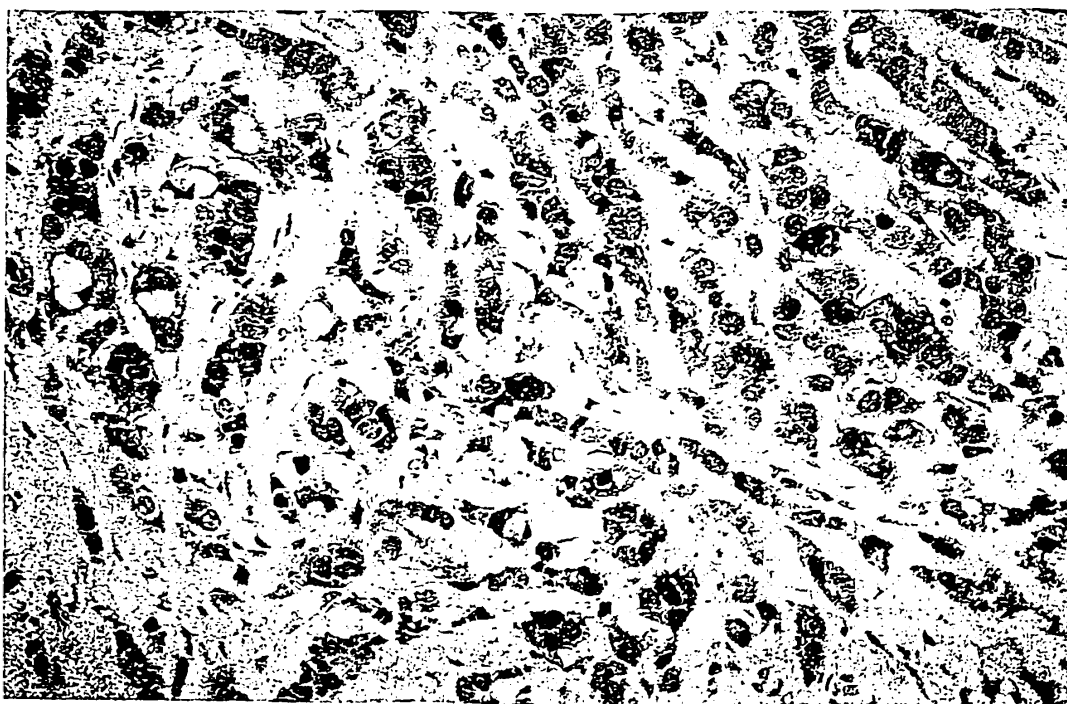
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΕΙΚΟΝΕΣ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

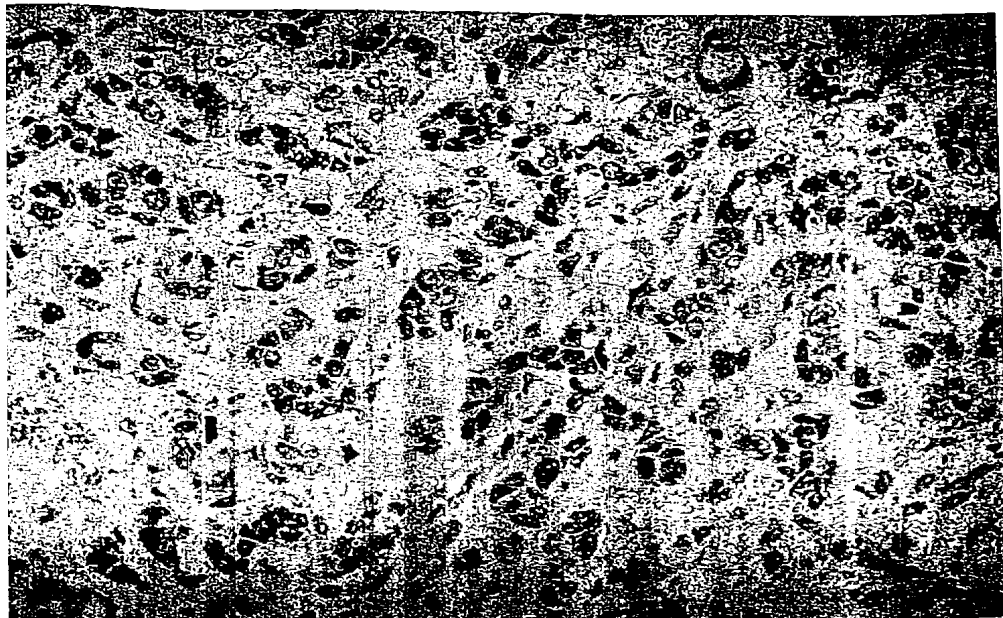




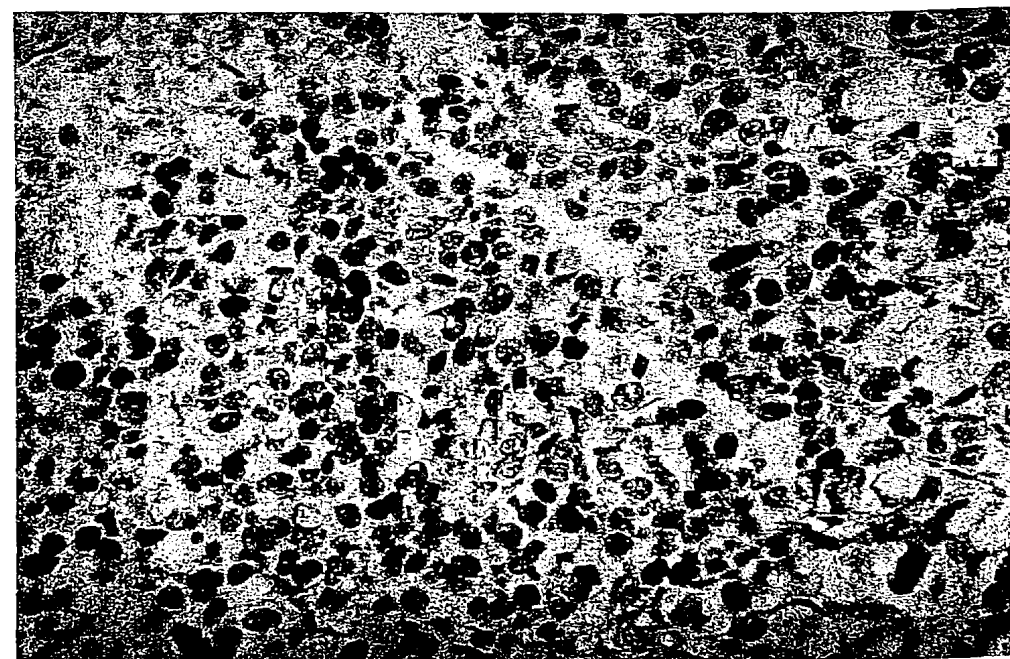
Εικόνα 1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης E σε κ
μαστό (μεγέθυνση X400).



Εικόνα 2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης P27 σε κ
μαστό (μεγέθυνση X400).



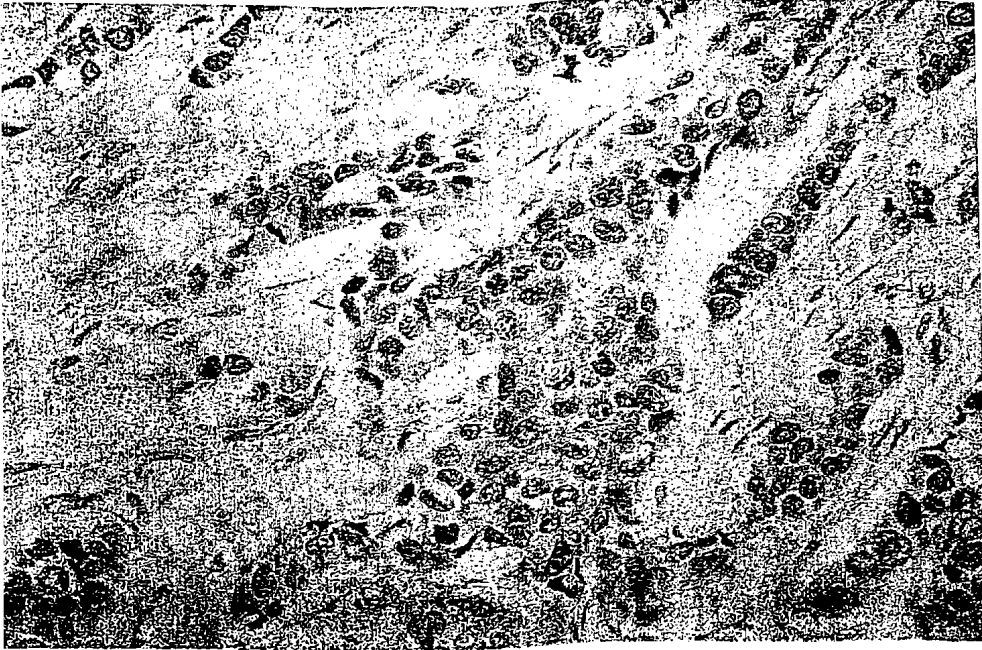
Εικόνα 3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης B1 σε καρκίνο του μαστού (μεγέθυνση X200).



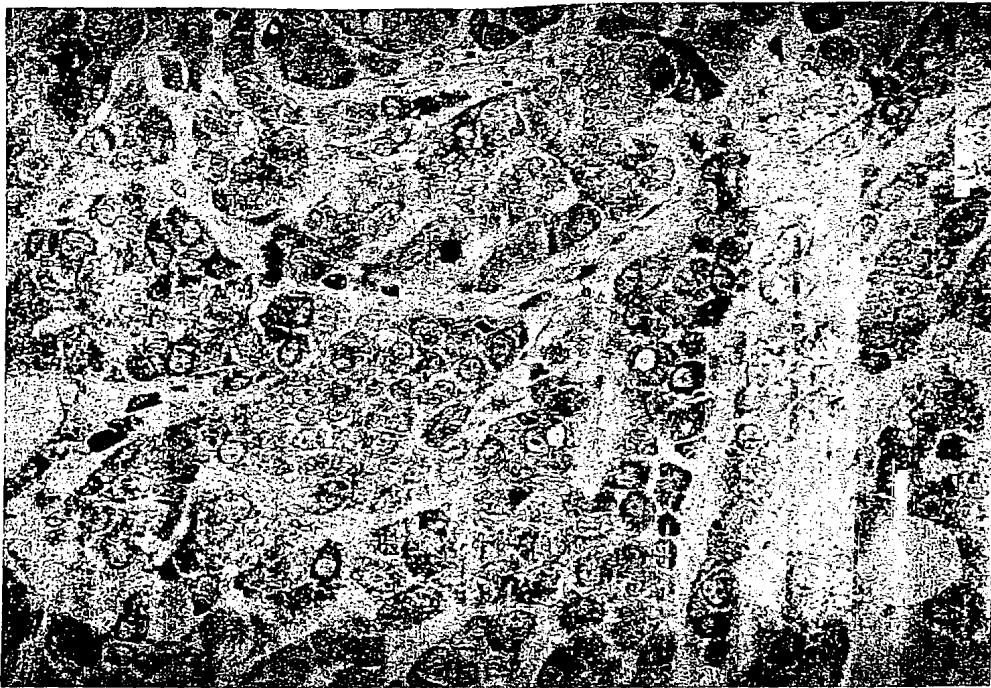
Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης P53 σε καρκίνο του μαστού (μεγέθυνση X200).

Εικόνα 5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων σε

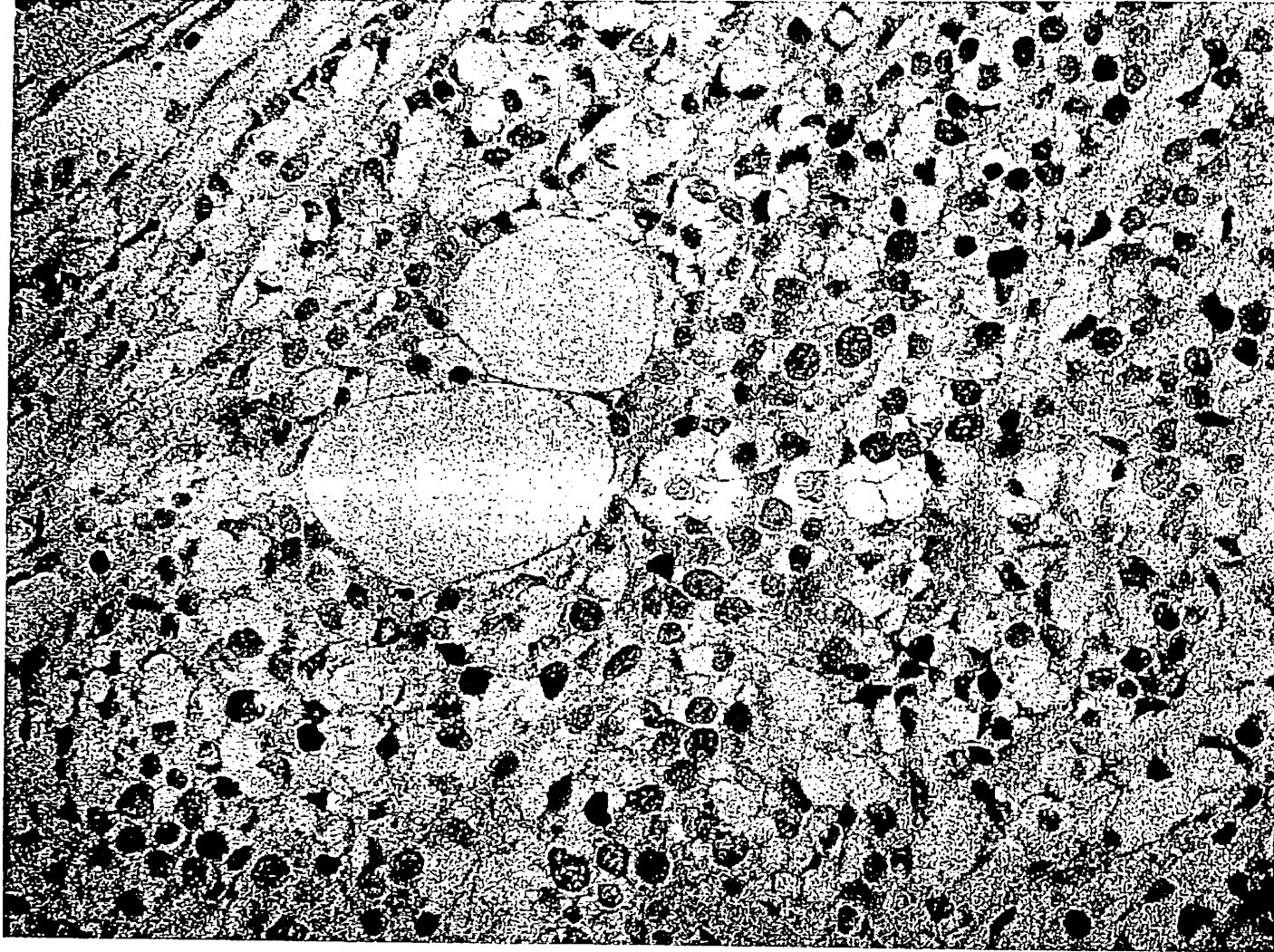




Εικόνα 6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D1 σε κα-
μαστό (μεγέθυνση X200).



Εικόνα 7. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 σε κα-
μαστό (μεγέθυνση X400).

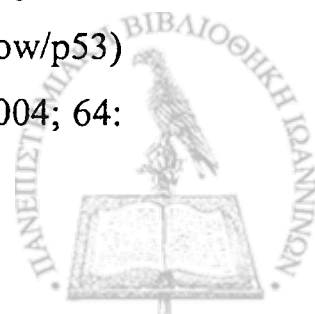


Εικόνα 8. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της κυκλίνης D2 σε καρκίνωμα μαστού (μεγέθυνση X200).

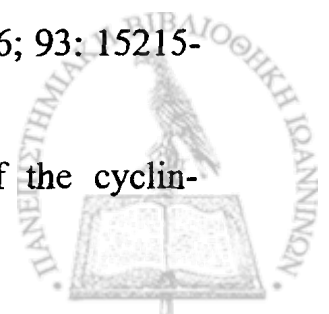


13 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

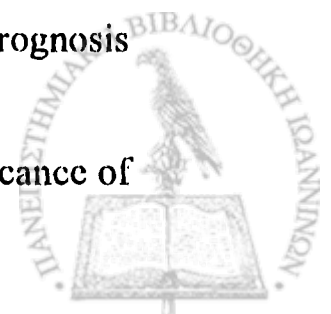
1. R. Putz, R. Pabst, Andreas H Weiglein. Sobotta Atlas of Human Anatomy, Version 1.5: 13th Edition in English (CD-ROM)
2. Καρβουνάρης Δ, +Σμπαρούνης ΧΝ. Παθήσεις Μαστού σελ 723-725, Χειρουργική Κεφ 39, 1996.
3. Larsen W. Human Embryology, pages 457-458 3rd edition (Μετ. Καθ Αντωνακόπουλος ΓΝ, Εκδ Παρισισιάνου 2004)
4. Gartner L, Hiatt J. Color textbook of Histology, pages 527-530, 2nd edition (Μετ. Καθ Αντωνακόπουλος ΓΝ, Εκδ Παρισισιάνου 2003)
5. Ross M, Romrell L, Kaye G. Histology. A text and atlas, pages 709-713, 3rd edition, 1995, Williams&Wilkins, Balt, M, USA
6. Guyton A. Textbook of Medical Physiology, 8TH edition, p 925-927. WB Saunders 1991, PA, USA
7. Kumar V, Cotran R, Robbins S. Basic Pathology, p 145-163, WB Saunders 1997, PA, USA
8. Alberston DG, Collins C, McCormick F et al. Chromosome aberrations in solid tumours. Nat Genet 2003; 34; 369-376
9. D GB Leonard. Diagnostic Molecular Pathology. WB Saunders Company, MMP 41, p 77-85 & 97-99
10. Kumar V, Cotran R, Robbins S Basic Pathology. WB Saunders Company, 6TH Edition, 1997; p 151-152
11. Kumar V, Cotran R, Robbins S Basic Pathology. WB Saunders Company, 6TH Edition, 1997; p 48-52
12. Foulkes WD, Brunet JS, Stefanson IM et al. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53) phenotype of BRCA-1 related breast cancer. Cancer Res 2004; 64: 830-835



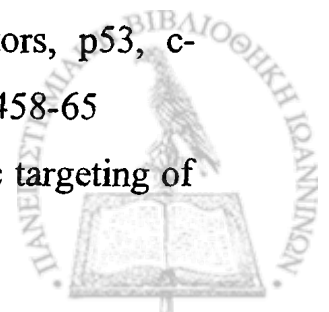
13. Dou Q-P, Levin AH, Zhao S et al. Cyclin E and cyclin A as candidates for the restriction point protein. *Cancer Res* 1993; 53: 1493-97
14. Keyomarsi K, Pardee AB. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1112-16
15. Gillet C, Fantl V, Smith R et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994; 54(7): 1812-17
16. Loden M, Stighall M, Nielsen NH et al. The cyclin D1 high and cyclin E high subgroups of breast cancer: separate pathways in tumorigenesis based on pattern of genetic aberrations and inactivation of the pRb node. *Oncogene* 2002; 21: 4680-4690
17. Reed W, Florens VA, Holm et al. Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. *Virchows Arch* 1999; 435(2): 116-24
18. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(8): 2069-76
19. Gillet C, Smith P, Gregory W et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 69(2): 92-99
20. Keykomarsi K, Tucker SL, Bedrosian I. Cyclin E is a more powerful predictor of breast cancer outcome than proliferation. *Natl Med* 2003; 9: 152
21. Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP et al. Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15215-20
22. St Croix, Florenes VA, Rak JW et al. Impact of the cyclin-



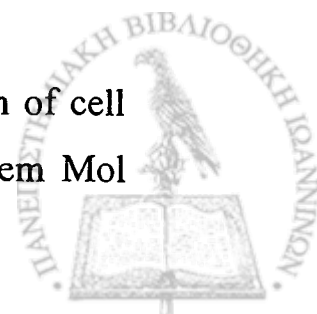
- dependent kinase inhibitor p27kip1 on resistance of tumor cells to anti-cancer agents. *Nat Med* 1996; 2: 1204-1210
23. Da Paola F, Vecci AM, Granato AM et al. p27/kip1 expression in normal epithelia, benign and neoplastic breast lesions. *J Pathol* 2002; 196(1): 26-31
24. Daidone MG, Veneroni S, Benini E et al. Biological markers as indicators of response to primary and adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 580-86
25. Gonzalez-Campora R, Galera R et al. Apoptosis in breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 2000; 196: 167-74
26. Thor AD, Liu S, Moore DH et al. p21c (WAF1/CIP1) expression in breast cancers: associations with p53 and outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 61: 33-43
27. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ et al. Expression of cell-cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young cancer patients. *Nat Med* 1997; 3: 222-5
28. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009
29. Winters ZE, Hunt NC, Bradburn MJ et al. Subcellular localization of cyclin B, Cdc2 and p21 (WAF1/CIP1) in breast cancer. Association with prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37: 2405-12
30. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 539-548
31. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 845-55
32. Andersen TI, Holm R, Nesland JM et al. Prognostic significance of



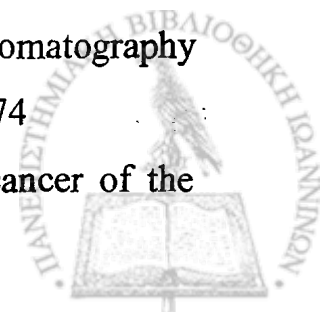
- Tp53 alterations in breast carcinoma. *Br J Cancer* 1993; 68: 540-8
33. van Slooten HJ, van de Vijver MJ, Borresen AL et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. *J Pathol* 1999; 189: 504-13
34. Thompson AM, Anderson TJ, Condie a et al. p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *Int J Cancer* 1992; 50: 528-32
35. O' Malley FP, Vnencak-Jones CL, Dunpont WD et al. p53 mutations are confined to the comedo type ductal carcinoma in situ of the breast: immunohistochemical and sequencing data. *Lab Invest* 1994; 71: 67-72
36. Aas T, Borresen AL, Geisler S et al. Specific p53 gene mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 811-14
37. Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 66: 83-92
38. Berns EM, Klijn JG, van Putten WL et al. p53 protein accumulation predicts poor response to tamoxifen therapy of patients with recurrent breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 121-27
39. Wolikowski K, Regis JT, Robey RW et al. Normal p53 status and function despite the development of drug resistance in human breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 1395-403
40. MacGrogan G, Mauriac L, Durand M et al. Primary chemotherapy in breast invasive carcinoma: predictive value of the immunohistochemical detection of hormonal receptors, p53, c-erbB-2, MIB 1, Ps2 and GST. *Br J Cancer* 1996; 74: 1458-65
41. Beaudry GA, Bertelsen AH, Sherman MI. Therapeutic targeting of



- the p53 tumor suppressor gene. *Curr Opin Biotechnol* 1996; 7: 592-600
42. Bergh J, Norberg T, Sjogren S et al. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation in adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nat Med* 1995; 1: 1029-34
43. Gudas JM, Nguyen H, Li T et al. Drug-resistance breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1417-27
44. Isola J, Visakorpi T, Holli K et al. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1109-14
45. Zhang GJ, Kimijima I, Abe R. Apoptotic index correlates to bcl2 and p53 protein expression, histological grade and prognosis in invasive breast cancers. *Anticancer Res* 1998; 18: 1998-99
46. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized trial. *Lancet* 1998; 352: 930-42
47. Janson T, Inganas M, Sjogren S et al. p53 status predicts survival in breast cancer patients treated with or without postoperative radiotherapy: a novel hypothesis based on clinical findings. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2745-51
48. Poller DN, Hutchings CE, Galea M et al. p53 protein expression in human breast carcinoma: relationship to epidermal growth factor receptor, c erbB2 protein overexpression, and oestrogen receptor. *Br J Cancer* 1992; 66: 583-8
49. Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol*



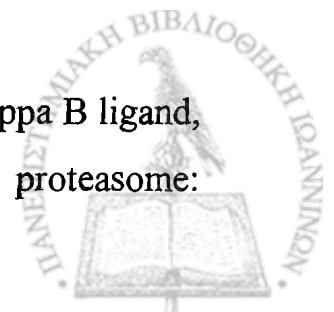
- Biol 1998; 65: 169-174
50. Downward J, Yarden Y, Mayers E et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521-7
51. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 2004; 11:689-708
52. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001; 19:2587-95
53. Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathol Int* 2001; 51:579-84
54. Dublin EA, Patel NK, Gillet et al. Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int J Cancer* 1998; 79: 71-75
55. Coleman RE, Rubens RD. The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer* 1987; 55: 61-66
56. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 584-93
57. Coleman RE. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 2001; 27: 165-176
58. Hauscha PV, Mavrakos AE, Iafrati MD et al. Growth factors in bone matrix: isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J Biol Chem* 1986; 261: 12665-74
59. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the



- breast. *Lancet* 1889; 1: 571-3
60. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176
61. Yasuda H, Shima N, Nakawaga N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-602
62. Kong YY, Feige U, Sarosi I et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999; 402: 304-9
63. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999; 13: 2412-24
64. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19
65. Min H, Morony S, Sarosi I et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19
66. Horton MA, Dorey EI, Nesbitt SA et al. Modulation of vitronectin receptor – mediated osteoclast adhesion by Arg-Gly-Asp peptide analogs: a structure – function analysis. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 239-47
67. Otto F, Thornell AP, Crompton T et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765-71
68. Mundy GR, Chen D, Zhao M et al. Growth regulatory factors and bone. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2: 105-15



69. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: development and pathological aspects. *Trends Mol Med* 2000; 8: 340-5
70. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *New Engl J Med* 350; 16: 1655-62
71. Charhon SA, Chapuy MC, Delvin EE et al. Histomorphometric analysis of sclerotic bone metastases from prostatic carcinoma special reference to osteomalacia. *Cancer* 1983; 51: 918-24
72. Guise TA, Yin JJ, Mohammad KS et al. Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases. *Cancer* 2003; 97: suppl 779-84
73. Kasperk CH, Borcsok I, Schairer HU et al. Endothelin-1 is a potent regulator of human bone cell metabolism in vitro. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 368-70
74. Rabbani SA, Desjardis J, Bell AW et al. An amino-terminal fragment of urokinase isolated from a prostate cancer cell line is mitogenic for osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 1058-64
75. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R et al. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245: 855-57
76. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vivo. *J Bone Miner Res* 1989; 4: 113-8
77. Lust JA, Donovan KA. The role of interleukin-1 beta in the pathogenesis of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1999; 13: 1117-25
78. Sezer O, Heider U, Jacob C et al. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol* 2002; 20: 353-4
79. Oyajobi BQ, Mundy GR. Receptor activator of NF-kappa B ligand, macrophage inflammatory protein-1 alpha, and the proteasome:

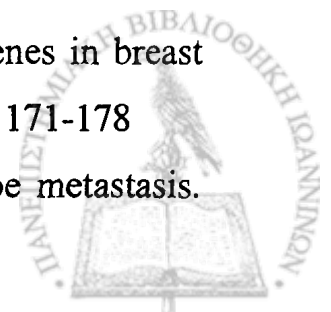


- novel therapeutic targets in myeloma. *Cancer* 2003; 97: suppl: 813-7.
80. Han JH, Choi SJ, Kuhihara N et al. Macrophage inflammatory protein 1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood* 2001; 97: 3349-53
81. Chirgwin JM, Guise TA. Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000; 10: 159-78
82. Shen X, Falzon M. PTH-related protein modulates PC-3 prostate cancer cell adhesion and integrin subunit profile. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 199: 165-77
83. Karaplis AC, Goltzman D. PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord* 2000; 1: 331-41
84. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM et al. TGF-b signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 1999; 103: 197-20
85. Wani MR, Fuller K, Kim NS et al. Prostaglandin E2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell migration, cell spreading, and fusion. *Endocrinology* 1999; 140: 1927-35
86. Buchs N, Manen D, Bonjour JP et al. Calcium stimulates parathyroid hormone-related protein production in Leydig tumor cells through a putative cation-sensing mechanism. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 500-5
87. Αγνάντη Ν, Αποστολίκας Ν. Παθολογοανατομική ταξινόμηση όγκων μαστού. Ειδική Παθολογική Ανατομική, σελ 28
88. Νακοπούλου Α. Ανοσοιστοχημεία. Μοριακοί δείκτες στη



Διαγνωστική Παθολογική Ανατομική και στην Πρόγνωση των κακοήθων νεοπλασμάτων Ιατρικές Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης. Αθήνα 1999

- 89.Vera-Roman J, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the HER2/neu oncogene status in breast cancer. Arch Pathol Lab Med 2004; 128: 627-633
- 90.Collyar DE. Breast cancer: A global perspective. J Clin Oncol 2001; 19: 101-5
- 91.Janicke F et al. Randomized adjuvant chemotherapy trial in high risk lymph node –negative breast cancer patients identified by urokinase – type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type. J Natl Cancer Inst 2001; 913-920
- 92.Baselga J. Herceptin alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trials. Oncology 2001; 61: 14-21
- 93.Ross JS et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER2/neu gene and protein. Mol Cell Proteomics 2004; 3: 379-398
- 94.van de Vijver et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. N Engl J Med 2002; 347: 1999-2009
- 95.Ma XJ et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 5974-5979
- 96.Weigelt B, Peterse J, Vant Veer LJ. Breast cancer metastasis: Markers and Models. Nature 2005; 5: 591-602
- 97.Filder I et al. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboliated with 125- 5- iodo-2-deoxyuridine. J Natl Cancer Inst 1970; 45: 773-782
- 98.Ein-Dor, Kela I, Getz G et al. Outcome signature genes in breast cancer: is there a unique set. Bioinformatics 2005; 21: 171-178
- 99.Filder I et al. Selection of successive tumor lines for metastasis.



- Nature New Biol 1973; 242: 148-149
- 100.Kang Y et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003; 3: 537-549
- 101.Hill RP, Chambers A, Ling V et al. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science* 1984; 224: 998-1001
- 102.Kerbel RS, Waghome C, Korczak B et al. Clonal dominance of primary tumors by metastatic cells: genetic analysis and biological implications. *Cancer Surv* 1988; 597-629
- 103.Briasoulis E, Agnantis NJ, Zagorianakou P et al. Near-absolute expression of the bcl-2 protein identifies a subgroup of stage II breast cancer patients with a most favorable outcome. Results of a clinicopathological study. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001 ;20(3):341-4
- 104.Resnitzky D, Gossen M, Buhard H et al. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1669-79
- 105.Spruck CH, Won KA., Reed SI. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999; 401: 297-300
- 106.Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ et al. Expression of cell-cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 1997; 3: 222-25
- 107.Dounnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R. Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications. *Hum Pathol* 2001; 32: 89-94
- 108.Foulkes WD, Wong N, Brunet JS et al. Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish



- women with breast cancer. Clin Cancer Res 1997; 3: 2465-2469
109. Chappuis PO, Donato E, Goffin JR et al. Cyclin E expression in breast cancer: predicting germline BRCA1 mutations, prognosis and response to treatment. Annals of Oncology 2005; 16: 735-742
110. Wang A, Yoshimi N, Suzui M et al. Different expression patterns of cyclins A, D1 and E in human colorectal cancer. J Cancer Res Oncol 1996; 122: 122-126
111. E. Briasoulis, V. Karavasilis, L. Kostadima, M. Ignatiadis, G. Fountzilias and N. Pavlidis. Metastatic breast carcinoma confined to bone: portrait of a clinical entity. Cancer 101(7) : 1524-1528, 2004.
112. Kanavaros P, Bai M, Stefanaki K, Poussias G, Rontogianni D, Zioga E, Gorgoulis V, and Agnantis NJ.
Immunohistochemical expression of the p53, mdm2, p21/waf-1, Rb, p16, Ki67, Cyclin A and Cyclin B1 protein and apoptotic index in T-cell lymphomas. Histol Histopathol, 16:377-386, 2001.
113. Bai M, Vlachonikolis J, Agnantis NJ, Tsanou E, Dimou S, Nicolaides C, Stefanaki S, Pavlidis N, Kanavaros P
Low expression of p27 protein combined with altered p53 and Rb/p16 expression status is associated with increased expression of cyclin A and cyclin B1 in diffuse large B-cell lymphomas. Mod Pathol, 14(11): 1105-13, 2001.



