



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ**

**«Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗΣ Α (PRO TA)**  
**ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»**

**ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΙΚΑΣ**  
Ιατρός Ψυχίατρος



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000321989



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



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Αποστολικά Απόστολου: 14-10-1999**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 395<sup>α</sup>/21-12-1999**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Κυρίτσης Αθανάσιος Καθηγητής Νευρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Πολυζωΐδης Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Νευροχειρουργικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27-3-2002**

*«Η μελέτη της Προθυμοσίνης α (Pro Ta) στο καρκίνωμα του μαστού»*

**Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 476<sup>α</sup>/27-2-2002**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

Επιβλέπουσα

Αγνάντη Νίκη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 635/15-4-2008**

<b>Αγνάντη Νίκη</b>	τ. Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Βουγιουκλάκης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Ιατροδικαστικής -Τοξικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μαλάμου –Μήτση Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σεφεριάδης Κωνσταντίνος</b>	τ. Καθηγητής βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Στεφάνου Δημήτριος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Γούσια Άννα

Λέκτορας Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 9-10-2008

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



Η Γραμματέας της Σχολής

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



στην οικογένειά μου



στην κ. Αγγάντη



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με την συνεργασία του τμήματος ραδιοανοσοχημείας του ΕΚ «Δημόκριτος» και του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας», υπό την επίβλεψη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Θα ήθελα από την θέση αυτή να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς το επιστημονικό προσωπικό του ραδιοανοσοχημικού τμήματος, του κ. Γρ. Ευαγγελάτου και την κ. Ελ. Λιβανίου για την συμβολή τους στην πραγματοποίηση αυτής της μελέτης. Ιδιαίτερως δε θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεόντιο Λεοντιάδη για την καθοριστική συμμετοχή του και τις πολύτιμες συμβουλές και παρεμβάσεις του καθόλο τον χρόνο της εκτέλεσης της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Ν. Αποστολικά, Διευθυντή του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας», χωρίς την συμμετοχή του οποίου δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η μελέτη αυτή. Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου προς την καθηγήτρια κ. Νίκη Αγνάντη, για την αποδοχή αυτής της μελέτης αλλά και για την καθοδήγησή της σε όλα τα στάδια της διαδικασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και την συμβουλευτική επιτροπή που αποτελείται από τους κ. Νίκη Αγνάντη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, κ. Βασιλική Μαλάμου – Μήτση Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, κ. Κωνσταντίνο Σεφεριάδη Καθηγητή Βιολογικής Χημείας για τις χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές ώστε να πραγματοποιηθεί και να ολοκληρωθεί το παρών πόνημα





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	σελ. 6
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	σελ. 8
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	σελ.11
2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	σελ.14
3 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	σελ.17
4 ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α (ProTα) .....	σελ.33
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ .....	σελ.40
1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	σελ.40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	σελ.45
1.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ .....	σελ.48
2 ΤΟ ΥΛΙΚΟ ΜΑΣ .....	σελ.51
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	
1 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ .....	σελ.54
2 ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ .....	σελ.70
3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ .....	σελ.78
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	σελ.99
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	σελ.105
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	σελ.121
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	σελ.122
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	σελ.124



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Το καρκίνωμα του μαστού αποτελεί παγκοσμίως την πιο συχνή αιτία θανάτου από οποιοδήποτε άλλο νεόπλασμα του ανθρώπινου σώματος.

Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης του καρκινώματος του μαστού (που ως φαίνεται βαίνει συνεχώς αυξανόμενη) και η υψηλή θνησιμότητα που το συνοδεύει, ασχέτως αν υπήρξε χειρουργική επέμβαση ριζικής μαστεκτομής, αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά θεραπευτικά προβλήματα του καρκίνου.

Πολλές μη χειρουργικές θεραπείες (ορμονοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία κ.α.) έδειξαν ότι συμβάλουν ουσιαστικά στην αύξηση της επιβίωσης των ασθενών σε συνδυασμό ή όχι με την χειρουργική θεραπεία.

Εν τούτοις, πέραν του θεραπευτικού αποτελέσματος υπάρχουν ταυτόχρονα και σημαντικές επιβαρύνσεις διαφόρων ζωτικών οργάνων που μερικές φορές μπορεί να οδηγήσουν και σε θάνατο (πχ. Μυοκαρδίτιδα). Πέραν όλων αυτών όμως, όπως φαίνεται και από στοιχεία της στατιστικής υπηρεσίας των ΗΠΑ, υπάρχει και σημαντικό οικονομικό κόστος, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία το υγειονομικό σύστημα ή και σε κατάρρευση, αν αφορά οικονομικά ασθενείς χώρες.

Για τους λόγους αυτούς είναι σημαντικό να υπάρχει η δυνατότητα περιορισμού των επικουρικών θεραπειών και η εφαρμογή τους σε επιλεγμένους ασθενείς για τους οποίους πράγματι θα αποτελούσε θεραπευτική βοήθεια.

Είναι γνωστό ότι στον στόχο αυτό ήδη συμβάλουν σημαντικά προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες, όπως είναι η σταδιοποίηση της νόσου (TNM), διάφορες ιστολογικές παράμετροι (πχ. Grade, τύπος, διήθηση αγγείων) καθώς και ένας μεγάλος αριθμός δεικτών (ορμονικοί υποδοχείς, c-erb B2, p53, καθεψίνες, δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού κ.α.) που συμβάλουν σε μια περισσότερο επιλεγμένη και στοιχειωμένη επικουρική θεραπεία.

Προσπαθώντας να συμβάλουμε και εμείς με τις δικές μας δυνατότητες προς την κατεύθυνση αυτή, με την ανα χείρας μελέτη στοχεύουμε στην ανάδειξη της προθυμοσίνης α (ProTa) ως προγνωστικού (και ενδεχομένως και θεραπευτικού στο μέλλον) παράγοντα για το καρκίνωμα του μαστού.



## ΣΚΟΠΟΣ

---

**Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να αναδείξει τον ρόλο της Προθιμοσύνης α (ProTa) ως προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνου του μαστού**



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



## 1. ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαστός εδράζεται επί του προσθίου θωρακικού τοιχώματος καταλαμβάνοντας από την 2η μέχρι και την 6η ή 7η πλευρά.

Αιματώνεται από τους κλάδους της μασχαλιαίας αρτηρίας και τους έξω πλάγιους κλάδους των μεσοπλευρίων αρτηριών.

Νευρούται από τους κλάδους του 4ου – 5ου και 6ου θωρακικού νεύρου.

Το λεμφικό σύστημα του μαστού έγινε αντικείμενο πολλών ανατομικών μελετών εξ αιτίας των συχνών λεμφικών μεταστάσεων που παρατηρούνται επί καρκινώματος του μαστού.

Στο δέρμα του μαστού υπάρχει ένα αβάλβιδο πλέγμα λεμφαγγείων υποεπιθηλιακών το οποίο καταδύεται στο βάθος μέχρι τον υποδόριο ιστό. Στο σημείο αυτό ενούται με το πλέγμα του υπολοίπου δέρματος δημιουργώντας ένα λαβυρινθώδες λεμφικό πλέγμα. Οι παραπάνω κλάδοι συνενώνονται με το υποθηλαίο λεμφικό πλέγμα το οποίο επίσης δέχεται τα λεμφικά τριχοειδή που υπάρχουν γύρω από τους πόρους και τα λόβια του μαζικού αδένα. Το υποθηλαίο σύστημα δέχεται επίσης και τα λεμφαγγεία της θηλής.

Η λεμφική αποχέτευση οδηγείται τελικώς στο έσω και έξω σύστημα λεμφαδένων (αλυσίδα). Το πρώτο αποτελούν οι λεμφαδένες κατά μήκος του στέρνου ονομαζόμενοι και έσω μαστικοί λεμφαδένες.

Το δεύτερο σύστημα αποτελείται από τρία επίπεδα λεμφαδένων: I, II και III.

Το επίπεδο I αποτελούν τέσσερις ομάδες λεμφαδένων: οι λεμφαδένες της ουράς του μαστού, οι λεμφαδένες του θωρακικού μυός, οι λεμφαδένες της ωμοπλάτης και οι πλάγιοι θωρακικοί λεμφαδένες. Το επίπεδο I των μασχαλιαίων λεμφαδένων αναφέρεται και σαν *λεμφαδένες εισόδου μασχάλης*.

Το επίπεδο II των λεμφαδένων της μασχάλης αντιστοιχεί στην κεντρική ομάδα, οι λεγόμενοι και *λεμφαδένες της κορυφής της μασχάλης*.

Τέλος το επίπεδο III αποτελούν οι υποκλείδιοι λεμφαδένες. Επίσης οι υπερκλείδιοι λεμφαδένες αποτελούν και αυτοί μέρος της λεμφικής αποχέτευσης του μαστού.



Οι λεμφικές μεταστάσεις του καρκινώματος του μαστού οδεύουν αρχικά στο επίπεδο I κατόπιν στο επίπεδο II και τέλος στο επίπεδο III.

Οι άλλες ομάδες λεμφαδένων δέχονται σπάνια μεταστάσεις και όταν αυτό συμβαίνει πρόκειται συνήθως για πολύ προχωρημένη νόσο. Η γνώση της λεμφικής παροχέτευσης του μαστού είναι απαραίτητη από τον χειρουργό σε περίπτωση που προτίθεται να πραγματοποιήσει περιορισμένη επέμβαση στη μασχάλη, όπως επί της διενέργειας ογκεκτομής ή τμηματοεκτομής και λήψης δείγματος μασχαλιαίων λεμφαδένων. Το τελευταίο αποτελεί μέρος ή ολόκληρο το επίπεδο I. Στο τελευταίο επίπεδο βεβαίως ανιχνεύεται και ο λεμφαδένας φρουρός ο οποίος ως γνωστόν ανιχνεύεται με ειδική διαδικασία. Σε περιπτώσεις μαστεκτομής μετά μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η απλή τροποποιημένη μαστεκτομή. Στην περίπτωση αυτή ο χειρουργός οφείλει να σημάνει τα επίπεδα των λεμφαδένων για να μπορεί να γίνει καλύτερα και ευκολότερα ο διαχωρισμός από την παθολογοανατόμο στο εγχειρητικό παρασκεύασμα του μαστού. Ο συνολικός μέσος αριθμός λεμφαδένων που ανευρίσκονται κατά τη ριζική μαστεκτομή κυμαίνεται περί τους είκοσι πέντε.

Ιστολογικώς ο μαστός διαχωρίζεται σε δύο μέρη: τη θηλή και τον υπόλοιπο μαζικό αδένα. Η θηλή αποτελείται από ανωμάλως τοποθετημένες δεσμίδες λείων μυϊκών ινών, ενώ ανάμεσά τους ανευρίσκονται σμηγματογόνοι και αποκρινείς αδένες. Στη θηλή καταλήγουν δεκαπέντε με είκοσι συλλεκτικοί πόροι των οποίων τα έξω πέρατα καλύπτονται από πλακώδες επιθήλιο, τη συνέχεια των συλλεκτικών πόρων (προς το αδενικό σύστημα) αποτελούν κατά σειρά, οι γαλακτοφόροι κόλποι, οι τμηματικοί πόροι, κατόπιν οι υποτμηματικοί οι οποίοι και καταλήγουν στη πορολοβιακή μονάδα του μαζικού αδένα, (terminal duct lobular unit) η οποία συνίσταται από τις κυψελίδες τον ενδολόβιο και την εξωλόβιο εκφορητικό πόρο. Ο τελευταίος εκβάλλει στον υποτμηματικό πόρο. Το λόβιο ποικίλει σε μέγεθος αποτελούμενο από 10-100 κυψελίδες.

Το επιθήλιο των κυψελίδων και των εκφορητικών πόρων του μαζικού αδένα αποτελείται από δύο στίχους κυττάρων, ο ένας βλέπει προς τον αυλό και αποτελείται από κυβοειδή ή κυλινδρικά κύτταρα και ο άλλος που επικάθεται επί της βασικής μεμβράνης αποτελούμενος από κυβικά ή επιμήκη κύτταρα. Τα τελευταία ονομάζονται μυοεπιθήλια και στις μεν κυψελίδες



αποτελούν ασυνεχή στίχο, ενώ στους πόρους συνεχή. Τα επιθηλιακά κύτταρα σημαίνονται ανοσοϊστοχημικά με πολλές κυτταροκερατίνες και την EMA, ενώ τα μυεοπιθήλια με την SMA ή τις κυτταροκερατίνες 5/6 και 5/14. Η χρήση αυτών των αντισωμάτων γίνεται σε περιπτώσεις καρκινωμάτων *in situ* ή άτυπων υπερπλασιών που δεν είναι εμφανής, ο διαχωρισμός διηθητικού καρκινώματος από το *in situ* και του τελευταίου από την απλή ή άτυπη την υπερπλασία.

Η δομή του μαζικού αδένου δεν είναι σταθερή. Έχει παρατηρηθεί ότι τα λοβίδια αντιδρούν στις φάσεις τις εμμηνου ρήσεως με την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Αλλά και σε γυναίκες που ευρίσκονται στην εμμηνόπαυση μπορεί να υπάρξουν αλλοιώσεις υποστροφής (*involution*) όπου παρατηρείται κυρίως ατροφία των λοβιδίων και αύξηση του συνδετικού ιστού. Επιπροσθέτως μπορεί να παρατηρηθούν αλλοιώσεις όπως κύστεις αποκρινική μετάπλαση ή απλή αδένωση σε μικροσκοπικές όμως εστίες οπότε και δεν αποτελούν παθολογική οντότητα.

Θα πρέπει να τονιστεί τέλος ότι η τελική πορολοβιακή μονάδα αποτελεί το κατεξοχήν ιστολογικό πεδίο στο οποίο εκδηλώνονται τόσο οι καλοήθεις όσο και οι κακοήθεις νεοπλασίες του οργάνου.<sup>(122,140,155,177)</sup>



## 2. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.

---

Το καρκίνωμα του μαστού είναι κατεξοχήν αδenoκαρκίνωμα εκτός σπανίων περιπτώσεων. Χωρίζονται ανάλογα με την ιστογενετική του προέλευση σε δύο μεγάλες κατηγορίες: το πορογενές και το λοβιακό καρκίνωμα. Το πρώτο αποτελεί και το μεγαλύτερο ποσοστό που κυμαίνεται από 90-95%. Το λοβιακό καταλαμβάνει το 5-6%. Το πορογενές καρκίνωμα προέρχεται από τους πόρους, ενώ το λοβιακό από τους τελικούς εκφορητικούς πόρους και τις κυψελίδες. Σε ένα μικρό ποσοστό υπάρχουν και μικτές μορφές των δύο αυτών τύπων.

Έχει παρατηρηθεί ότι μερικές μορφές πορογενών καρκινωμάτων έχουν καλή πορεία και μερικά μάλιστα εξ αυτών αρκεί μόνο η χειρουργική επέμβαση. Αυτά τα καρκινώματα λέγονται καλής πρόγνωσης και είναι το σωληνώδες, το θηλώδες, το μυελοειδές, το βλεννώδες, το ηθμοειδές, και το αδenoειδές κυστικό. Το ποσοστό τους στο σύνολο των πορογενών καρκινωμάτων δεν υπερβαίνει το 10%, το υπόλοιπο 90% του πορογενούς καρκινώματος, αναφέρεται ως μη ειδικός τύπος (N.S.T.)

Το λοβιακό καρκίνωμα, διακρίνεται σε διάφορους υποτύπους (κλασσικό, αναπλαστικό κ.ά.) χωρίς όμως ο διαχωρισμός αυτός να έχει την αξία του διαχωρισμού του πορογενούς καρκινώματος σε μη ειδικό και ειδικό τύπο. Αμφότερες οι κατηγορίες του καρκινώματος έχουν τις αντίστοιχες μη διηθητικές μορφές (in situ) και στο μεν λοβιακό δεν υφίστανται υποτύποι, το πορογενές διακρίνεται ανάλογα με την αρχιτεκτονική του και τον βαθμό κακοήθειας σε comedo ή non comedo κατά μια διαίρεση ή σε συμπαγές, comedo, θηλώδες, μικροθηλώδες, clinging, ηθμοειδές κ.ά. Ο διαχωρισμός τους πρέπει να γίνεται για το λόγο ότι κάθε υποτύπος έχει διαφορετική επιθετικότητα αναφορικά με την μετεξέλιξη του σε διηθητικό καρκίνωμα.

Τέλος υπάρχει ένας μικρός αριθμός καρκινωμάτων, που δεν εμπίπτει στις παραπάνω κατηγορίες, αλλά αυτά σε ποσοστό είναι ελάχιστο. Υπάρχουν ωστόσο σήμερα διάφορες κατατάξεις προερχόμενες από διάφορες σχολές και ογκολογικά κέντρα. Αυτές οι κατατάξεις συμφωνούν σε γενικές γραμμές, οι δε υπάρχουσες διαφορές εντοπίζονται κυρίως στην ύπαρξη ή μη ή και στην ονοματολογία διαφόρων σπάνιων μορφών





καρκινωμάτων.<sup>(1,2,3,32,64,105,122,139,140,155,177)</sup> Για να αποφεύγεται η σύγχυση ως προς την ύπαρξη ή το αποδεκτό ορισμένων τύπων καρκινωμάτων από σχολή σε σχολή, όπως νεοπλάσματα των άλλων οργάνων, υπάρχει η κατάταξη της παγκοσμίου, οργάνωσης υγείας (WHO), η οποία περισσότερο λειτουργεί ως σημείο αναφοράς παρά σαν χρηστικό εργαλείο για την πρόγνωση και την θεραπεία των διαφόρων τύπων καρκινωμάτων.

Η κατάταξη αυτή<sup>(178)</sup> φαίνεται στον πίνακα 1.

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1

### ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΤΑ WHO

---

1. Πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου (NOS).
  - Μικτό
  - Πλειόμορφο
  - Οστεοκλαστικού τύπου
  - Με χοριοκαρκινωμάτωση χαρακτηριστικά
  - Με μελανοκύτταρα
2. Λοβιακό
3. Σωληνώδες
4. Διηθητικό ηθμοειδές
5. Μυελοειδές
6. Βλεννώδεις και βλεννοεκκριτικοί όγκοι
  - Βλεννώδες καρκίνωμα
  - Κυσταδενοκαρκίνωμα
  - Βλενώδες καρκίνωμα από κυλινδρικά κύτταρα και καρκίνωμα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου
7. Νευροενδοκρινικοί όγκοι
  - Συμπαγές νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
  - Άτυπο καρκινοειδές
  - Μικροκυτταρικό – oat cell καρκίνωμα
  - Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
8. Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
9. Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα
10. Αποκκρινικό
11. Μεταπλαστικό
  - Επίδερμοειδές
  - Ατρακτοκυτταρικό
  - Αδενοπλάκωδες
  - Βλεννοεπίδερμοειδές
  - Μικτό μεσεγχυματικό – επιθηλιακό



12. Λιποεκκριτικό (Lipid rich)
  13. Εκκριτικό ((secretory)
  14. Ογκοκυτταρικό
  15. Αδενοειδές κυστικό
  16. Κυψελιδικό (acinic cell)
  17. Γλυκογονοπαραγωγικό (glycogen rich clear cell carcinoma)
  18. Καρκίνωμα από σμηγματογόνους αδένες (sebaceous)
  19. Φλεγμονώδες (inflammatory)
- 



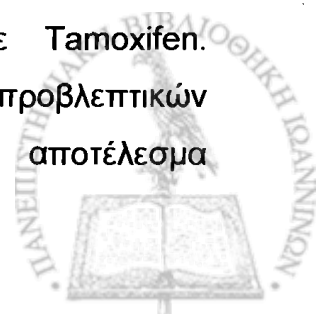
### 3. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ως προγνωστικός παράγοντας ορίζεται ο παράγοντας εκείνος ο οποίος καθορίζει σε γενικές γραμμές την καλή ή την κακή κατάληξη μιας νεοπλασίας. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το είδος του νεοπλασματος. Το καρκίνωμα π.χ. έχει κακή πρόγνωση ενώ το ινοαδένωμα καλή

Ως προβλεπτικός παράγοντας ορίζεται ο παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την εξέλιξη μιας νεοπλασίας. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ύπαρξη ορμονικών υποδοχέων στο καρκίνωμα του μαστού. Αυτό σημαίνει ότι η εφαρμογή αντιοιστρογονικής θεραπείας (Tamoxifen) θα βελτιώσει την πρόγνωση του καρκινώματος αυτού.

Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ διαγιγνώσκονται περίπου 180.000 νέες περιπτώσεις καρκινώματος του μαστού. Υπολογίζεται επίσης ότι μια στις εννέα γυναίκες που θα ζήσουν μέχρι τα 85 θα νοσήσουν από το καρκίνωμα του μαστού. Παράλληλα, η ενημέρωση του κόσμου αλλά και η χρήση της μαστογραφίας ως τακτική εξέταση στις ασυμπτωματικές γυναίκες, έχουν αυξήσει τις περιπτώσεις όπου ο καρκίνος ανακαλύπτεται όλο και σε μικρότερο μέγεθος και σε πρώιμες μορφές πριν ακόμα καταστεί ικανός να δώσει μεταστάσεις στους λεμφαδένες.

Θεωρείται δε ότι τα 2/3 των ασθενών με κλινικώς αναγνωρίσιμο καρκίνο του μαστού έχουν ακόμα αρνητικούς λεμφαδένες.<sup>(97,116,177)</sup> Επίσης αναμένεται να υπάρξει υποτροπή στο 20%-30% των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες. Στους ασθενείς αυτούς συστήνεται περισσότερο επιθετική θεραπεία.<sup>(177)</sup> Το σημαντικότερο βεβαίως είναι ότι ένα μεγάλο ποσοστό (70%) δεν χρειάζονται πλέον συμπληρωματική θεραπεία, αφού μόνη η χειρουργική επέμβαση θεωρείται θεραπευτική. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει μεταστατική νόσος, η επικουρική (adjuvant) θεραπεία μπορεί να μειώσει τα ποσοστά των θανάτων, κατά το διάστημα της πρώτης θεραπείας μετά τη διάγνωση, σε ένα ποσοστό περίπου 25-30% σε προεμμηνοεπασιακές γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία ή ωθηκεκτομή και σε ποσοστό 20-25% σε μετεμμηνοεπασιακές γυναίκες που έλαβαν θεραπεία με Tamoxifen. Επομένως η γνώση εκ των προτέρων των προγνωστικών ή προβλεπτικών παραγόντων θα μπορούσε να βελτιώσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα



επιλέγοντας την καταλληλότερη θεραπεία με στόχο τη μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών. Τους περισσότερους και τους σπουδαιότερους από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να τους καθορίσει σήμερα ο παθολογοανατόμος. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να προκύψουν μέσα από την εμπειριστατωμένη μελέτη του ιστολογικού παρασκευάσματος του καρκινώματος με την κοινή μέθοδο αιματοξιλίνης – ηωσίνης, ή από την ανοσοϊστοχημεία ή και από προωθημένες τεχνικές μοριακής βιολογίας (Flow cytometry, PCR, κ.ά.)

Οι προγνωστικοί παράγοντες του καρκινώματος μαστού χωρίζονται αδρά<sup>(177)</sup> σε εκείνους που είναι γενικώς αποδεκτοί και σε εκείνους που έχουν δυνητική προγνωστική σημασία και εν πάσει περιπτώσει όχι από όλους αποδεκτοί. (Πιν. 2)<sup>(2,3,4,5,6,8,10,51,52,53,54,63,64,65,93,94)</sup>

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ 2

---

### 1. ΓΕΝΙΚΩΣ ΑΠΟΔΕΚΤΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΡΩΓΝΩΣΗΣ

1. Κατάσταση λεμφαδένων
2. Μέγεθος καρκινώματος
3. Ιστολογικός τύπος καρκινώματος
4. Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (Grade)
5. Πολυεστιακότητα
6. Θετικά όρια εκτομής
7. Φλεγμονώδης διήθηση γύρω από τον όγκο
8. Διήθηση αγγείων του όγκου
9. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού  
μιτωτικός δείκτης  
βρωμοδειοξυοριδίνη ή <sup>3</sup>H θυμιδίνη  
Ki 67  
PCNA  
Prothymosin a
10. Flow cytometry (κυτταρομετρία ροής)
11. Κατάσταση ορμονικών υποδοχέων

### 2. ΔΥΝΗΤΙΚΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1. Βαθμός αγγειογένεσης του όγκου
2. Πρωτογονογονιδιακή έκφραση  
c-erb-b2  
CMYC  
Ras
3. Αναπτυξιακοί παράγοντες (Growth factors)  
EGFR  
C-erb-B1  
Nm 23  
TGF  
Heat Shuck Protein  
Bcl2



4. Ογκοκατασταλτικά γονίδια  
P53  
RB1
  5. Ένζυμα σχετιζόμενα με την διήθηση του όγκου.  
Αναστολείς ή ενεργοποιητές πλασμινογόνου  
Κολλαγενάσες  
Ευρωμολυσίνες  
Τενασκίνες  
Μεταλοπρωτεΐνάσες  
Καθεψίνες
  6. Μόρια κυτταρικής σύναψης  
Καντχερίνες  
Ιντεγκρίνες  
Σελεκτίνες  
CD44
  7. Κυτταρική αντίσταση στη χημειοθεραπεία  
Έκφραση βιμεντίνης  
P52  
Αρωματάσες  
Μεταλοπρωτεΐνάσες  
Αντιγόνο σχετιζόμενο με το βλεννώδες έκκριμα  
Υποδοχείς ανδρογόνων  
Αντισώματα ομάδων αίματος  
ILGF  
PSA
- 

### 1. Κατάσταση των μασχαλιαίων λεμφαδένων

Η παρατήρηση ότι καρκινώματα του μαστού τα οποία παρουσιάζουν μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες είχαν χειρότερη πρόγνωση από εκείνα με αρνητικούς λεμφαδένες, είναι πολύ παλιά, αλλά και αξιόπιστη. Το ίδιο περίπου ισχύει και για όλα τα καρκινώματα του ανθρώπινου σώματος.

Στη συνέχεια διάφορες μελέτες προσπάθησαν να συσχετίσουν τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων με την επιβίωση. Όλες αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι, όσο περισσότεροι λεμφαδένες είναι διηθημένοι τόσο μικρότερη ήταν η επιβίωση των ασθενών. Για να γίνεται καλύτερα και περισσότερο αναπαραγωγική η συσχέτιση της επιβίωσης με τον αριθμό των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων χωρίστηκαν οι τελευταίοι σε τρεις ομάδες: 1) Μασχαλιαίοι λεμφαδένες αρνητικοί. 2) 1-3 διηθημένοι μασχαλιαίοι λεμφαδένες και 3) πάνω από 4 διηθημένοι λεμφαδένες. Πέραν τούτων σημασία έχει και το μέγεθος της μετάστασης στον λεμφαδένα. Έτσι αξιολογείται εάν το μέγεθος της μετάστασης είναι μικρότερο των 2 χιλ. (μικρομετάσταση) αν είναι μεταξύ



2-20 χιλ. και αν είναι πάνω από 20 χιλιοστά. Τα μεγέθη αυτά λαμβάνονται υπόψιν για τον καθορισμό του σταδίου και το σύστημα TNM.

Ως μικρομετάσταση ορίζεται η μετάσταση της οποίας το μέγεθος δεν υπερβαίνει σε διάμετρο τα 2 χιλ. Βεβαίως οι μικρομεταστάσεις είναι δυνατόν να μην ανακαλυφθούν σε εξέταση ρουτίνας. Έχει αποδειχθεί ότι σε εξετάσεις ρουτίνας όπου οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες ήσαν αρνητικοί για μεταστάσεις, ύστερα από ειδική επεξεργασία του ίδιου υλικού (πολλαπλές τομές) βρέθηκαν μικρομεταστάσεις σε ποσοστό από 14-30%.<sup>(10,63,65,140,155,170,177,178)</sup>

Θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει πολλές φορές διαφορά στην εκτίμηση του κλινικού και του παθολογοανατομικού σταδίου της νόσου. Σε μια μελέτη οι Rosen και συν.<sup>(141)</sup> βρήκαν ότι το 48% των περιπτώσεων που κλινικώς σταδιοποιήθηκαν ως T2NO αποδείχθηκε να είναι T2N1 ενώ το 41% που κλινικά ήταν T1N1 αποδείχθηκε παθολογοανατομικά να βρίσκεται στο στάδιο T1NO. Αυτές οι περιπτώσεις χαρακτηρίστηκαν ψευδώς αρνητικές και ψευδώς θετικές, αντιστοίχως.

## 2. Το μέγεθος του όγκου

Θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους προγνωστικούς παράγοντες. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι όσο αυξάνεται το μέγεθος του όγκου τόσο ελαττώνεται και η επιβίωση των ασθενών.<sup>(134,141,142,177,178,181)</sup> Οι Roger και συν.<sup>(138)</sup> βρήκαν ότι υπήρχε σχέση μεταξύ του μεγέθους του όγκου και της πιθανότητας λεμφαδενικών μεταστάσεων. Σε μελέτη 534 ασθενών βρήκαν ότι ο όγκος σταδίου T1a (0-5 χιλ.) παρουσίαζαν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες σε ποσοστό 3%. Σε όγκους σταδίου T1b (6-10 χιλ.) υπήρχαν μεταστάσεις σε ποσοστό 10%, ενώ σε μεγέθη όγκου 11-15 χιλ. και 16-20 χιλ. βρέθηκαν μεταστάσεις σε ποσοστό 21% και 35% αντιστοίχως. Άλλες μελέτες που αφορούσαν όγκους μεγέθους 10 χιλ. διαπίστωσαν ότι υπήρχαν διηθημένοι μασχαλιαίοι λεμφαδένες σε ποσοστό 31% περίπου.<sup>(4,62)</sup> Για τον ακριβή καθορισμό του μεγέθους του όγκου απαιτείται η ακριβής μέτρηση της τομής του όγκου στο πλακίδιο της αιματοξυλίνης ηωσίνης. Μάλιστα απαιτείται ο διαχωρισμός του όγκου σε διηθητικό και μη διηθητικό στοιχείο (αν συνυπάρχουν) και η μέτρησή τους ξεχωριστά.<sup>(2,3,4,5,51,61,63,122,140,155,177,178)</sup>



### 3. Ο ιστολογικός τύπος

Έχει παρατηρηθεί ότι ανεξάρτητα από τον βαθμό κακοήθειας ή το μέγεθος του όγκου υπάρχουν ορισμένοι τύποι καρκινώματος οι οποίοι δείχνουν να έχουν καλύτερη πορεία από εκείνη των άλλων καρκινωμάτων.

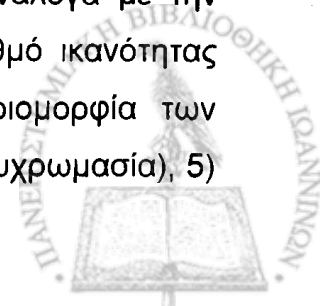
Αυτοί οι ιστολογικοί τύποι διαχωρίστηκαν από την ομάδα του πορογενούς διηθητού καρκινώματος του μαστού, είναι σπάνιοι, δεν υπερβαίνουν σε ποσοστό το 10% συνολικά και ονομάζονται ειδικοί τύποι, σε αντίθεση με το υπόλοιπο 90% του πορογενούς καρκινώματος που ονομάζεται μη ειδικός τύπος (NST). Αυτοί οι τύποι είναι το σωληνώδες το βλεννώδες, το θηλώδες το μυελοειδές και το αδενοειδές κυστικό.

Κατ' άλλους μέσα στην ομάδα των ειδικών τύπων πρέπει να συμπεριλαμβάνονται το λοβιακό καρκίνωμα (κλασικού τύπου) και το φλεγμονώδες καρκίνωμα. Το τελευταίο συγκαταλέγεται στα καρκινώματα υψηλής κακοήθειας αφού εξ ορισμού παρουσιάζει εκτεταμένες λεμφικές διηθήσεις στο δέρμα του μαστού και μεταστάσεις στους λεμφαδένες ή και αλλού όταν γίνεται κλινικώς αντιληπτό.<sup>(2,3,4,5,45,63,65,122,140,155,177,178)</sup>

### 4. Ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (grade)

Ο βαθμός κακοήθειας του νεοπλασματος θεωρείται ένας από τους περισσότερο αξιόπιστους προγνωστικούς παράγοντες.<sup>(80,122,140,155,166,177,178)</sup>

Είναι γνωστό ότι η αξιολόγηση του βαθμού κακοήθειας (grading) του καρκινώματος του μαστού, εγένετο, όπως και των άλλων οργάνων, σύμφωνα με τη μέθοδο Broder. Έκτοτε έχουν δημοσιευθεί και εφαρμοσθεί διάφορες μέθοδοι μέχρις ότου να φθάσουμε σήμερα στη μέθοδο κατά Bloom και Ritchardson που τυχαίνει γενικής αποδοχής και την οποία προτείνει και η παγκόσμια Οργάνωση Υγείας<sup>(178)</sup>. Πρώτος ο Greenough<sup>(75)</sup> επιχείρησε το 1925 ένα είδος grading του καρκινώματος του μαστού μελετώντας 73 περιπτώσεις. Ο μελετητής στην προτεινόμενη μέθοδο ξεχωρίζει τρεις βαθμούς κακοήθειας: χαμηλής, μέσης και υψηλής. Για να πραγματοποιήσει αυτήν την κλίμακα χρησιμοποίησε διάφορα ιστολογικά στοιχεία όπως: 1) τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου όπως αυτός εκτιμάται ανάλογα με την ικανότητά του να σχηματίζει ανοιχτούς σωλήνες, 2) τον βαθμό ικανότητας έκκρισης βλέννας από τα καρκινικά κύτταρα, 3) την ομοιομορφία των καρκινικών κυττάρων, 4) την χρωστικότητα των πυρήνων (βαθυχρωμασία), 5)



την διαταραχή της πυρηνικής μορφολογίας και, 6) τον αριθμό των μιτώσεων του καρκινώματος.

Τρία χρόνια αργότερα οι Patey και Scarff<sup>(129)</sup> μελετώντας 50 περιπτώσεις καρκινώματος του μαστού και χρησιμοποιώντας το σύστημα grading του Greenough, βρήκαν ότι, όλες οι περιπτώσεις καρκινώματος που είχαν αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες παρουσίαζαν πολύ καλή πρόγνωση ανεξαρτήτως του grade του όγκου, όπως επίσης και τα καρκινώματα με θετικούς λεμφαδένες είχαν φτωχή πρόγνωση και αυτά επίσης ανεξαρτήτως του grade. Αυτό έδειξε πως το σύστημα grading που πρότεινε ο Greenough δεν μπορούσε αν συσχετισθεί με την επιβίωση. Πρότειναν δε οι συγγραφείς βελτίωση της μεθόδου αυτής.

Το 1957 οι Bloom και Richardson<sup>(23)</sup> ανακοίνωσαν μελέτη 1409 καρκινωμάτων όπου χρησιμοποίησαν δικό τους σύστημα grading βασιζόμενο στις προτάσεις του Scarff. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί τρεις κυρίως ιστολογικές παραμέτρους:

1) Τον βαθμό σχηματισμού σωλήνων στο σύνολο του όγκου, 2) τον βαθμό πυρηνικής ατυπίας των καρκινικών κυττάρων και 3) τον αριθμό μιτώσεων. Η κάθε παράμετρος από αυτές βαθμολογείται με τρεις βαθμούς 1, 2, ή 3. Έτσι δημιουργείται μία εννιάβαθμος κλίμακα από 3-9 που αποτελεί άθροισμα (score) των τριών βαθμών. Ακολουθώντας τη μέθοδο Scarff, διαίρεσαν τους 9 βαθμούς σε τρία μέρη και δημιούργησαν μια κλίμακα με τρεις βαθμούς ως εξής:

3-5 σημεία = Grade I

6-7 σημεία = Grade II

και 8-9 σημεία = Grade III

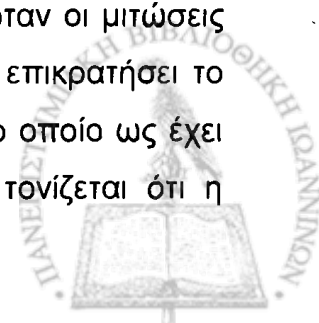
Το σύστημα αυτό του grading αναφέρεται ως Bloom-Richardson (B-P) ή και ως Scarff-Bloom-Richardson (S-B-R). Με τη μέθοδο αυτή βρέθηκε ότι το 26% (των 1409 καρκινωμάτων) είναι grade I, το 45% grade II και το 29% grade III. Διαπίστωσαν επίσης ότι η κατάσταση των μασχαλιαίων λεμφαδένων, σχετίζεται άμεσα με την επιβίωση των ασθενών, εν τούτοις, το grade μπορεί επιπροσθέτως να δώσει ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες. Διατυπώνουν δε τη γνώμη ότι το grade αντανακλά, την δυνητική κακοήθεια του καρκινώματος, υπό την έννοια ότι ενδεικνύει ποιες περιπτώσεις καρκινώματος του μαστού είναι υποψήφιος να δώσουν





απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά την περίοδο της θεραπείας. Υπάρχουν πολλές μελέτες που καταδεικνύουν την αξία του grade στην πρόγνωση της νόσου με αξιολογότερες εκείνες των Elston και Ellis<sup>(51,52,54)</sup> και Fisher.<sup>(64)</sup> Εν τούτοις υπάρχει ένα πρόβλημα αναπαραγωγιμότητας του grade σε οποιοδήποτε σύστημα και αν αυτό αναφέρεται. Η ασυμφωνία που προκύπτει στο grading, των ίδιων καρκινωμάτων, οφείλεται αφενός μεν στην υποκειμενικότητα της αντίληψης και εκτίμησης των ίδιων φαινομένων από διάφορους παρατηρητές (και εν προκειμένω τους παθολογοανατόμους) και αφετέρου στην διαφορετική εμπειρία που ενδεχομένως έχουν οι ίδιοι στο καρκίνωμα του μαστού. Έτσι η ασυμφωνία αυτή μπορεί να προκύψει σε κάποιο βαθμό και μεταξύ των παθολογοανατόμων του ίδιου εργαστηρίου, ενώ αυτή μπορεί να διερευνηθεί όταν πρόκειται για διάφορα εργαστήρια ή για τυχαίο δείγμα πολλών παθολογοανατόμων.

Σε διάφορες μελέτες οι συμφωνία μεταξύ των συστημάτων grading κυμαίνεται από 50-90%. Από τις πλέον σημαντικές μελέτες που έγιναν σχετικά με τη συμφωνία του grading είναι αυτή των Elston-Ellis<sup>(54)</sup>, οι οποίοι εκτίμησαν το grade σε 1831 ασθενείς. Προέκυψε δε ότι το 19% των καρκινωμάτων ήσαν grade I, τα 34% grade II και το 47% grade III. Η σημαντικότερη συσχέτιση με την επιβίωση ήταν στο grade I, όπου όλοι οι ασθενείς της ομάδας αυτής είχαν μακρά επιβίωση. Αντίθετα στους ασθενείς με grade II και III (81% συνολικά των περιπτώσεων), η επιβίωση είχε σημαντική διαφορά. Αυτό δείχνει όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες<sup>(100)</sup> ότι σε ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με grade II και III, ειδικά σε αυτών με αρνητικούς λεμφαδένες, δεν μπορεί να γίνει περαιτέρω διάκριση των grades II και III αναφορικά με την επιβίωση. Οι ίδιοι μελετητές προσπάθησαν να λύσουν το πρόβλημα αυτό χρησιμοποιώντας ένα τροποποιημένο σύστημα B-R-S βασισμένο κυρίως στην εκτίμηση του μιτωτικού δείκτη και την ατυπία, παρά στην αρχιτεκτονική του όγκου (δηλαδή στο ποσοστό σχηματισμού σωλήνων από το καρκίνωμα). Ειδικά δε άλλαξαν και τον τρόπο μέτρησης των μιτώσεων ως εξής: μιτωτικός δείκτης 1, όταν υπάρχει μέχρι 1 μίτωση ανά οπτικό πεδίο μεγάλης μεγέθυνσης, δείκτης 2, όταν υπάρχουν μέχρι δύο μιτώσεις, και μιτωτικός δείκτης 3, όταν οι μιτώσεις ανά οπτικό πεδίο είναι περισσότερες από δύο. Ωστόσο, έχει επικρατήσει το τροποποιημένο σύστημα των B-R-S, των Elston και Ellis<sup>(54)</sup> το οποίο ως έχει ήδη ειπωθεί προτείνει και η WHO<sup>(178)</sup>. Στο σύστημα αυτό τονίζεται ότι η



μέτρηση των μιτώσεων πρέπει να γίνεται στην περιφέρεια του όγκου και να λαμβάνεται υπόψιν το μέγεθος του οπτικού πεδίου το οποίο διαφέρει από εταιρία σε εταιρία και από τύπο σε τύπο μικροσκοπίου. Σχετικά με αυτό υπάρχουν πίνακες, οι οποίοι δείχνουν τον αναμενόμενο αριθμό μιτώσεων σε αντιστοιχία με τα διάφορα μεγέθη φακών και οπτικών πεδίων. Ορισμένοι μελετητές προσπάθησαν να συνδυάσουν τους κυριότερους προγνωστικούς δείκτες (μέγεθος όγκου, grade και λεμφαδενικές μεταστάσεις) ώστε να προκύπτει συγκεκριμένο αποτέλεσμα το οποίο να εκφράζεται με αριθμό, για να είναι απόλυτα συγκρίσιμο. Ένας από αυτούς είναι και ο ονομαζόμενος «προγνωστικός δείκτης του Nottigham» (Nottigham Prognostic Index) ο οποίος έχει ως εξής:  $0,2 \times \text{μέγεθος όγκου (σε cm)} + \text{grade (1-3)} + \text{κατάσταση λεμφαδένων (όπου: αρνητικοί λεμφαδένες = 1, 1-3 θετικός λεμφαδένας = 3 και περισσότεροι από τρεις λεμφαδένες = 3)}$ .<sup>(51,52,54)</sup>

Παρόλη την αντικειμενικότητα που προσπαθεί να προσδώσει αυτός ο δείκτης στην προγνωστικότητα του καρκινώματος του μαστού δεν έχει γίνει τουλάχιστον μέχρι σήμερα γενικά αποδεκτός.

## 5. Η πολυεστιακότητα

Η πολυεστιακότητα του καρκινώματος του μαστού έχει μελετηθεί επαρκώς και θεωρείται ένας δεύτερης γραμμής προγνωστικός δείκτης ο οποίος επηρεάζει την πορεία του καρκινώματος κυρίως με την έννοια της τοπικής υποτροπής παρά με αυτή της άμεσης επίδρασης στην επιβίωση των ασθενών. Αυτό αφορά κυρίως λοβιακά καρκινώματα τα οποία είναι πολυεστιακά και αμφοτερόπλευρα πολύ περισσότερο από ότι τα πορογενή. Μάλιστα η παρουσία λοβιακού καρκινώματος στον ένα μαστό οδηγούσε στο παρελθόν τους χειρουργούς σε λήψη βιοψίας «καθρέπτου» του άλλου μαστού ή και στην ολική αφαίρεσή του για προληπτικούς σκοπούς. Οι αντιλήψεις αυτές σήμερα δεν είναι ευρείας αποδοχής.

## 6. Θετικά όρια εκτομής

Η από πολλά χρόνια τώρα καθιέρωση της ετήσιας μαστογραφικής εξέτασης και η περιοδική ψηλάφηση των μαστών, οδήγησαν στην όλο και πιο πρώιμη ανακάλυψη του καρκινώματος του μαστού και εξ αυτού σε μικρό ή και μη ψηλαφούμενο όγκο. Το τελευταίο δεδομένο καθώς και η αλλαγή αντίληψης



ως προς το θεραπευτικό αποτέλεσμα των εκτεταμένων και ακρωτηριαστικών χειρουργικών επεμβάσεων, καθιέρωσαν ως θεραπευτική μέθοδο την ογκεκτομή με ή χωρίς λεμφαδενική εκτομή μασχάλης.

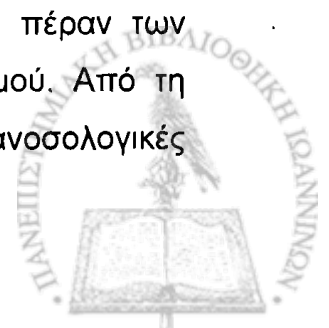
Ο κίνδυνος όμως μιας τέτοιας επέμβασης είναι η παραμονή υπολειμμάτων του όγκου στο μαστό προφανώς λόγω ανεπαρκούς εκτομής. Έχει βρεθεί ότι, η επαρκής ή μη εξαίρεση του όγκου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό σημείο. Εις ότι αφορά δε την ανεπαρκή εξαίρεση διηθητικού καρκινώματος αυτή θεωρείται ως αποτυχημένη θεραπευτική επέμβαση και βεβαίως η προγνωστική της σημασία δεν συζητείται. Η αναφορά στα υγιή όρια επικεντρώνεται αποκλειστικά σχεδόν στα μη διηθητικά (in situ) πορογενή καρκινώματα όπου η ογκεκτομή είναι η εγχείρηση εκλογής.<sup>(51,63,65,122,140,141,170)</sup>

Ως επαρκές σημείο εξαίρεσης ενός όγκου, θεωρείται η απόσταση των 10 χιλ. από τα χειρουργικά όρια εκτομής. Σε μελέτες που έγιναν έχει δείχθει ότι ένα ποσοστό 8% των in situ καρκινωμάτων που απέχουν 10 χιλ. από τα όρια εκτομής παρουσιάζουν υπολειμματική νόσο<sup>(57)</sup>. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι ακόμα και οι περιπτώσεις που εξαιρέθηκαν σε εμφανώς υγιή όρια, υποτροπίασαν σε ποσοστό 10% αν η χειρουργική επέμβαση δεν συνοδεύονταν από συμπληρωματική ακτινοθεραπεία.<sup>(90)</sup> Επίσης όσο πιο υψηλός είναι ο βαθμός κακοήθειας του όγκου τόσο η τάση υποτροπής αυξάνεται, ενώ ταυτόχρονα η πιθανότητα μετάπτωσης του in situ σε διηθητικό καρκίνωμα μεγαλώνει. Την μεγαλύτερη πιθανότητα υποτροπής παρουσιάζουν τα comedo καρκινώματα σε σχέση με τους άλλους τύπους. Ο τύπος του όγκου εν προκειμένω αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα υποτροπής άσχετο με το πυρηνικό grade του όγκου.

Μεγάλη σχέση έχει το μέγεθος του όγκου. Όσο πιο μεγάλος είναι ο όγκος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα υποτροπής και η ύπαρξη μικροδιήθησης. Η παρουσία της τελευταίας είναι σχεδόν βέβαιη όταν ο όγκος ξεπερνάει την διάμετρο των 25 χιλ.<sup>(177)</sup>

## 7. Φλεγμονώδης διήθηση γύρω από τον όγκο

Είναι γνωστό ότι στην καταπολέμηση του όγκου συμβάλει πέραν των όποιων θεραπευτικών επεμβάσεων και η άμυνα του οργανισμού. Από τη στιγμή που θα εμφανιστεί το καρκίνωμα ενεργοποιείται ο ανοσολογικός μηχανισμός με την παραγωγή κυτταροτοξικών αντισωμάτων.



Ένα τέτοιο παράδειγμα διέγερσης του μηχανισμού αυτού είναι το μυελοειδές καρκίνωμα στο οποίο παρατηρείται έντονη πλασματο-λεμφοκυτταρική αντίδραση. Και παρόλο που το καρκίνωμα αυτό είναι grade III έχει πολύ καλύτερη πρόγνωση από τα καρκινώματα μη ειδικού τύπου. Υπό την έννοια αυτή, η λεμφοκυτταρική διήθηση γύρω από τον όγκο συνιστά ανοσολογική αντίδραση, η οποία από πολλές μελέτες προκύπτει ότι είναι σημείο καλής πρόγνωσης όχι όμως τόσο ισχυρό όσο τα προαναφερθέντα. (2,3,5,51,52,65,122,140,150,170,178)

### 8. Διήθηση των αγγείων από το καρκίνωμα

Η διήθηση τριχοειδών αγγείων από κύτταρα του όγκου έχει σημαντική προγνωστική αξία. Η διάκριση αν τα διηθημένα αγγεία είναι λεμφικά ή ασθματικά δεν είναι πάντοτε εύκολη σε ιστολογικό επίπεδο γι' αυτό τις περισσότερες φορές σημειώνεται στην ιστολογική έκθεση ως «διήθηση αγγείων» χωρίς περαιτέρω διάκριση.

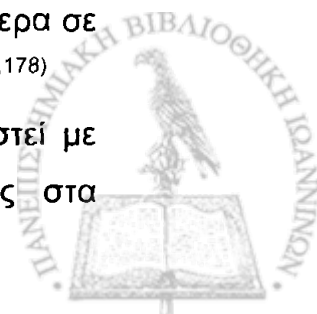
Λεμφική διήθηση γύρω από τον όγκο αναγνωρίζεται κατά μέσο όρο στα 15% των διηθητικών καρκινωμάτων. Ιδιαίτερως δε σε ασθενείς του σταδίου T1NOMO (με αρνητικούς μασχαλαίους λεμφαδένες) βρέθηκαν καρκινικά έμβολα σε λεμφαγγεία σε ποσοστό 5-10%. Ανεύρεση διηθημένων αγγείων θεωρείται κακό προγνωστικό στοιχείο. (2,3,5,30,51,63,65,122,140,141,142,170,178)

### 9. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού – κυτταρομετρίας ροής

Είναι αυτονόητο ότι όσο πιο πολλά κύτταρα του όγκου πολλαπλασιάζονται τόσο πιο επιθετικός είναι ο όγκος. Με την απλή μικροσκόπηση ρουτίνας μπορούμε να διακρίνουμε τα κύτταρα εκείνα του όγκου που βρίσκονται μέσα στον κυτταρικό κύκλο αλλά στη φάση της μίτωσης μόνο. Υπάρχουν όμως τρόποι να διακρίνουμε κύτταρα του όγκου που βρίσκονται σε άλλη πλην της μίτωσης φάση του κυτταρικού κύκλου. Η φάση αυτή είναι κυρίως η φάση S (synthesis) του κυτταρικού κύκλου.

Έχει αποδειχθεί ότι ο αριθμός των κυττάρων ενός όγκου που βρίσκονται στη φάση S (AS phase fraction) έχει σχέση με την πρόγνωση και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις καρκινώματος του μαστού. (21,51,65,93,94,102,122,140,155,170,171,176,178)

Ο υπολογισμός του κλάσματος της φάσης S μπορεί να υπολογιστεί με διάφορους τρόπους<sup>(185)</sup>, όπως με τη μέτρηση της <sup>3</sup>H-θυμιδίνης στα



κύτταρα<sup>(79)</sup> με την κυτταρομετρίας ροής (flow cytometry)<sup>(70)</sup> και την ανοσοϊστοχημεία.<sup>(176)</sup>

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός εργασιών που αφορούν στη μέτρηση της πλοειδικότητας των κυττάρων του όγκου ή στον υπολογισμό της φάσης S και σχετίζουν τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων με την έκβαση της νόσου.<sup>(70,121,171)</sup> Γενικώς η ανευπλοειδικότητα βρέθηκε να σχετίζεται περισσότερο με καρκινώματα υψηλού grade, υψηλού κλάσματος φάσης, υψηλό μιτωτικό δείκτη και αρνητικότητα στην έκφραση οιστρογονικών και ρπογεστερονικών υποδοχέων.

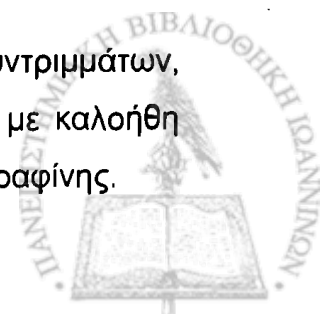
Αντιθέτως, η διπλοειδία σχετίζεται γενικώς με τους ειδικούς τύπους του καρκινώματος του μαστού που ως γνωστόν έχουν καλή πρόγνωση. Εξαιρείται το μυελιδές καρκίνωμα το οποίο, αντιθέτως παρουσιάζει ανευπλοειδικότητα και αυτό βεβαίως συνάδει με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του τα οποία παραπέμπουν σε καρκίνωμα grade III. Η διπλοειδικότητα επίσης σχετίζεται με καρκινώματα χαμηλού grade, χαμηλής φάσης S, μικρό μιτωτικό δείκτη και θετικότητα στην έκφραση των ορμονικών υποδοχέων.

Δεν υπάρχει όμως σταθερή σχέση της πλοειδικότητας ή της φάσης S με το μέγεθος του όγκου ή την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι ασθενείς με ανευπλοειδικούς όγκους, έχουν σχετικώς φτωχότερη πρόγνωση σε σύγκριση με ασθενείς που παρουσιάζουν διπλοειδικότητα. Η διαφορά όμως αυτή δεν είναι τόσο σημαντική. Αντίθετα ασθενείς με υψηλή φάση S, δείχνουν μικρότερη επιβίωση και βραχύτερο χρόνο υποτροπών.<sup>(177)</sup>

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι πολυπαραγοντικές μελέτες που συγκρίνουν την πλοειδικότητα με τους παραδοσιακούς προγνώστικούς παράγοντες (ιστολογικός τύπος, grade, μιτωτικός δείκτης κ.ά.) αυτή, δεν φαίνεται να υπερισχύει των τελευταίων. Αντίθετα η μέτρηση της φάσης S πρέπει να θεωρείται ένας αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης.<sup>(88)</sup>

Υπάρχουν ωστόσο τεχνικά προβλήματα εφαρμογής της μεθόδου που δίδουν αμφισβητήσιμα αποτελέσματα, τόσο της πλοειδικότητας όσο και της φάσης S.

Αυτά τα προβλήματα αφορούν σε παρουσία κυτταρικών συντριμμάτων, κυτταρικών συναθροίσεων ή συστάδων, επικαλύψεις κακοήθων με καλοήθη κύτταρα κ.ά. όταν η εξέταση γίνεται κυρίως σε υλικό από κύβο παραφίνης.

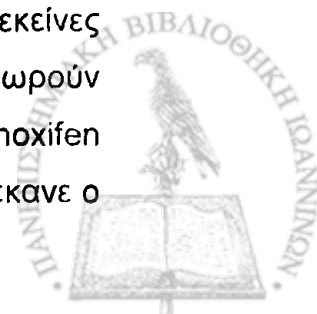


Η ASCO<sup>(12)</sup> δεν συνιστά την χρήση της πλοειδικότητας δια της κυτταρομετρίας ροής, ενώ αντίθετα προτρέπει τη χρήση της S φάσης για τον θεραπευτικό χειρισμό ή την εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου.

Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά με την BRDU, το ki 67 (MB1), το PCNA, κ.ά. Γίνεται ο υπολογισμός της επί τοις % θετικότητας των καρκινικών κυττάρων στο σύνολο των καρκινικών κυττάρων. Πολλοί θεωρούν ότι το κόστος σε χρόνο και χρήμα αυτών των εξετάσεων είναι δυσανάλογο της προσφοράς των αφού συγκρινόμενες με την μέτρηση του μιτωτικού δείκτη που γίνεται στην κλασσική ιστολογική εξέταση, δεν φαίνεται να υπερτερούν. Θεωρούν μάλιστα ότι ο μιτωτικός δείκτης είναι ένας απλός και αξιόπιστος προγνωστικός δείκτης του καρκινώματος του μαστού. Αυτό βεβαίως προϋποθέτει απόλυτη προσήλωση στον τρόπο μέτρησης των μιτώσεων, που συνίσταται προτίστως στην αναγνώρισή τους (πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση) και την επιλογή της περιοχής που θα μετρηθούν (περιφέρεια του όγκου). Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης ο υπολογισμός του εύρους του οπτικού πεδίου ανάλογα με το διαμέτρημα του φακού, καθώς επίσης και ο σωστός χειρισμός του υλικού και η έγκαιρη μονιμοποίησή του. Ως προς το τελευταίο πρέπει να σημειωθεί ότι η καθυστέρησής της μειώνει τον αριθμό των μιτώσεων σε ποσοστό 10-15% αν η καθυστέρηση αυτή διαρκέσει για 2-ώρες.<sup>(44)</sup>

### 11. Κατάσταση ορμονικών υποδοχέων

Αυτή αφορά κυρίως στην ύπαρξη ή μη υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης στα καρκινικά κύτταρα. Η ύπαρξη θετικών οιστρογονικών σχετίζεται με χαμηλής κακοήθειας (χαμηλού grade) όγκους, αλλά και με τον θεραπευτικό χειρισμό, καθότι σε αυτές τις περιπτώσεις και ιδιαίτερα σε μετεμηννοπαυσιακές γυναίκες γίνεται θεραπεία με αντιοιστρογόνα (π.χ. Tamoxifen).<sup>(5,6,51,65,93,94,122,140,141,170,177,178)</sup> Εν τούτοις, παρά την φαινομενική ευνοϊκή δράση της Tamoxifen πάνω στο καρκίνωμα έχει αποδειχθεί ότι η ελεύθερη νόσου περίοδος σε γυναίκες με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς χωρίς μεταστάσεις δεν υπερβαίνει το 8-10% συγκρινόμενη βεβαίως με εκείνες που έχουν αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς.<sup>(116)</sup> Μερικοί μάλιστα θεωρούν ότι αυτό το θεραπευτικό πλεονέκτημα που προσφέρει το Tamoxifen εξανεμίζεται μετά περίοδο 5 ετών.<sup>(136)</sup> Σε μια μελέτη 257 ασθενών που έκανε ο



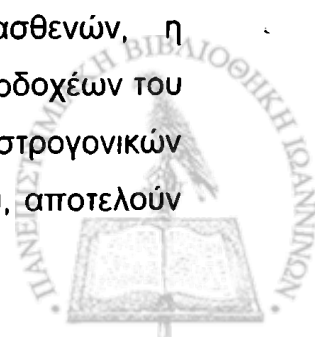
Veronesi με τους συνεργάτες του<sup>(170)</sup> έδειξε ότι, η θετικότητα σε οιστρογονικούς υποδοχείς αυτές παρουσίαζαν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπών σε σύγκριση με εκείνους που είχαν αρνητικούς υποδοχείς. Για να έχουν όμως αυτό το όφελος θα έπρεπε να έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με Tamoxifen. Αντίθετα, ασθενείς οι οποίες δεν πήραν Tamoxifen επειδή είχαν αρνητικούς λεμφαδένες ή πήραν χημειοθεραπεία λόγω λεμφαδενικών μεταστάσεων, δεν παρουσίασαν αυτή τη βελτίωση. Η σχέση όμως θετικότητας σε οιστρογονικούς υποδοχείς και λήψεως Tamoxifen δεν είναι πάντα ευθέως ανάλογη.

Έχει βρεθεί σε μελέτες<sup>(39)</sup> ότι σε ένα ποσοστό 11% των ασθενών με αρνητικούς υποδοχείς υπήρξε θετική αντίδραση του όγκου στη θεραπεία με Tamoxifen, ενώ αντίθετα, ένα ποσοστό 33% ασθενών με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς του όγκου, δεν αντέδρασαν θετικά στη θεραπεία με το ίδιο φάρμακο. Αυτό το φαινόμενο παρατηρήθηκε σε ασθενείς των οποίων η μέτρηση των ορμονικών υποδοχέων του όγκου δεν έγινε με ανοσοϊστοχημική μέθοδο, αλλά με την βιοχημική. Έτσι, είναι πιθανόν στις περιπτώσεις αυτές να υπάρχει σφάλμα στη μέθοδο ανίχνευσης ή της ερμηνείας των αποτελεσμάτων (ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα) οφειλόμενο σε μικρή περιεκτικότητα καρκινικού ιστού στο τεμαχίδιο του όγκου που αποστέλλεται για εξέταση.

Για την αποφυγή αυτού του σφάλματος, στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Ν.Α.Σ. από πολλών ετών (από το 1978), η αποστολή του ιστοτεμαχίου στο τμήμα ορμονικών υποδοχέων γίνεται από τον παθολογοανατόμο την ώρα της ταχείας βιοψίας αφού επιλεγεί και επιβεβαιωθεί ιστολογικά το καλύτερο τμήμα του όγκου.

Εις ότι αφορά την πολιτική στη χρήση των αποτελεσμάτων των ορμονικών υποδοχέων του καρκινώματος του μαστού, η ASCO συνιστά τα ακόλουθα<sup>(12)</sup>

- 1) οι ορμονικοί υποδοχείς να μετρώνται σε όλα τα πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού, ακόμη δε, και στην μεταστατική εστία αν αυτό κρίνεται αναγκαίο για τον σχεδιασμό της θεραπείας
- 2) σε περίπτωση ύπαρξης μεταστάσεων αν οι ορμονικοί υποδοχείς είναι θετικοί, να γίνεται θεραπεία με Tamoxifen.
- 3) Ανεξάρτητα από την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση των ασθενών, η αντιοιστρογονική θεραπεία σε περίπτωση θετικών ορμονικών υποδοχέων του όγκου, θα είναι ωφέλιμη για τους ασθενείς.
- 4) Τα επίπεδα των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων του καρκινώματος του μαστού, αποτελούν



σε ένα βαθμό αυτοτελείς δείκτες πρόγνωσης και για τον λόγο αυτό δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνον εάν θα πρέπει να λάβει ή ασθενής, επικουρική θεραπεία.

Η ανίχνευση των ορμονικών υποδοχέων ως γνωστόν γίνεται με δύο κυρίως τρόπους. Την ανοσοϊστοχημική και την βιοχημική μέθοδο, τα χρησιμοποιούμενα σήμερα δεύτερης γενιάς αντισώματα και η βελτιωμένη τεχνική τους επεξεργασία, τα αυτόματα μηχανήματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, έχουν βελτιώσει κατά πολύ την πιστότητα και την ευαισθησία της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου για την ανίχνευση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, σε τομές παραφίνης. Αντίθετα με την βιοχημική μέθοδο, η ανοσοϊστοχημική δεν εμπλέκεται με την ετερογένεια του όγκου και το πιθανόν ανεπαρκές ή ακατάλληλο δείγμα από τον όγκο. Συγκριτικές μελέτες έδειξαν ωστόσο αρκετά υψηλό ποσοστό ομοφωνίας των δυο μεθόδων. Σε μια τέτοια μελέτη<sup>(41)</sup> βρέθηκε ότι τα ποσοστά συμφωνίας έφθαναν σε ποσοστό 87%, τα επιμέρους όμως στοιχεία δείχνουν υπεροχή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου έναντι της βιοχημικής. Εις ότι αφορά την καθεαυτή εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης σε μικροσκοπικό επίπεδο, θα πρέπει να υπολογίζονται μόνο οι πυρήνες που εμφανίζουν καφέ χρώση.

Για να θεωρηθεί ένα καρκίνωμα θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς θα πρέπει το ποσοστό των θετικών κυττάρων του όγκου να φθάνει το ποσοστό 5-10% σύμφωνα με διάφορες μελέτες<sup>(132,179)</sup>. Η περισσότερο αποδεκτή μέθοδος σήμερα, εκτίμησης της θετικότητας των ορμονικών υποδοχέων είναι η HSCORE<sup>(95,179)</sup> που βασίζεται στον τύπο  $3 \times (\% \text{ κύτταρα με βαθιά χρώση}) + 2 \times (\% \text{ κύτταρα με μέτρια χρωστικότητα}) + 1 \times (\% \text{ κύτταρα με ελαφρά χρώση})$ . Ο τύπος αυτός δίδει τιμές θετικότητας από 0-300. Στην προκείμενη περίπτωση ως θετικά θεωρούνται τα καρκινώματα, για μεν τα οιστρογόνα όπου συγκεντρώνουν περισσότερο από 20 (είκοσι) βαθμούς, ενώ για την προγεστερόνη πάνω από 5 (πέντε) βαθμούς. Υπολογίζεται μάλιστα ότι τα επίπεδα αυτά της θετικότητας αντιστοιχούν με 10 femtomols της βιοχημικής μεθόδου, όπου ως γνωστόν είναι και η ουδός της θετικότητας της μεθόδου.

Εις ότι αφορά τους δυνητικούς προγνωστικούς παράγοντες, την πρώτη θέση κατέχουν τα πρωτοογκογονίδια ή απλώς ογκογονίδια.

Τα ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση του καρκινώματος. Σήμερα είναι γνωστά περισσότερα από

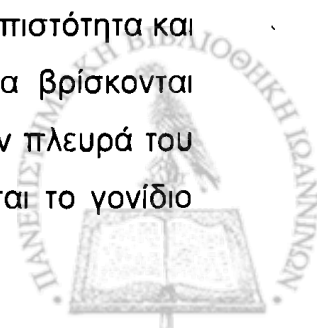




πενήντα ογκογονίδια. Η μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους είναι πολλές και μεταξύ αυτών η ανοσοϊστοχημεία, ο *in situ* υβριδισμός (FISH), τα διάφορα blotting (Southern, Northern, Western), ο καρυότυπος, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) κ.ά. Επί του παρόντος η ανίχνευση των ογκογονιδίων εστιάζεται κυρίως στην θετικότητα του όγκου στο C-erb-B2 ή HER2-neu. Η ύπαρξη της θετικότητας αυτής είναι ένδειξη για θεραπεία με trastuzumab (Herceptin) <sup>(173)</sup> Υπερέκφραση του c-erb-B2 ανευρίσκεται στα 25-30% περίπου των καρκινωμάτων. Τα καρκινώματα αυτά είναι συνήθως υψηλού grade, αρνητικά σε ορμονικούς υποδοχείς, έχουν θετικούς λεμφαδένες, είναι ανευπλοειδικά και παρουσιάζουν σχετικά υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ki 67). Η ανίχνευση των c-erb-B2 γίνεται προτίστως ανοσοϊστοχημικώς (και δευτεροευόντος με *in situ* υβριδισμό – FISH ή άλλες τεχνικές) και η έκφραση του υπολογίζεται με τους βαθμούς 0,1,2 και 3. <sup>(6,12,65,94,116,140,173,177,178)</sup>

Ο βαθμός 3 είναι και ο βαθμός θετικότητας. Σε περιπτώσεις που όγκος βαθμολογείται με 2 τότε θα πρέπει να γίνει επανέλεγχος της έκφρασης με τη μέθοδο FISH. Έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος FISH είναι η καλύτερη μέθοδος για ανίχνευση του c-erb-b2 σε υλικό από block παραφίνης. Όμως το κόστος της μεθόδου αυτής είναι πολλαπλάσιο εκείνου της ανοσοϊστοχημείας και για τον λόγο αυτό δεν ενδείκνυται για εξέταση ρουτίνας. Θεωρείται ωστόσο, ότι ο συνδυασμός της ανοσοϊστοχημείας και της FISH επιτυγχάνει τη μέγιστη ειδικότητα και ευαισθησία.

Οι Mus και συν <sup>(117)</sup> σε μια μελέτη τους 145 ασθενών με καρκίνωμα μαστού, διαπίστωσαν ότι όταν υπήρχε θετικότητα στο c-erb-B2, οι ασθενείς έδειξαν σημαντική ανταπόκριση στην επικουρική θεραπεία με υψηλές δόσεις κυκλοφωσφαμίδης δοξορουμπισίνης και ανδριαμικίνης σε αντίθεση με τις περιπτώσεις εκείνες ήσαν αρνητικές ή ελαφρώς θετικές (βαθμός 1) στο ογκογονίδιο. Η θετικότητα του όγκου στο c-erb-B2 θεωρείται σαν στοιχείο πρόβλεψης παρά πρόγνωσης της νόσου. Ως προς τα άλλα ογκογονίδια, όπως είναι το myc, το Ras, το INT2, τα αποτελέσματά τους σε διάφορες μελέτες δίδουν αντικρουόμενα συμπεράσματα και όχι με μεγάλη πιστότητα και ευαισθησία ή αναπαραγωγιμότητα <sup>(177)</sup> πολλά άλλα ογκογονίδια βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο μελετών. <sup>(7,8,93,94,130,140,177)</sup> Από την πλευρά του ογκοκατασταλτικού γονιδίου περισσότερο σε εφαρμογή βρίσκεται το γονίδιο



P53. Το γονίδιο αυτό ως γνωστόν είναι ρυθμιστικό του κύκλου (εισάγει το κύτταρο στον κυτταρικό κύκλο) συμβάλλει στη σύνθεση του DNA, συμμετέχει στην κυτταρική αναγέννηση και κυρίως ρυθμίζει την απόπτωση του κυττάρου. Για το λόγο αυτό, και ονομάζεται «αποπτωτικό γονίδιο»<sup>(86)</sup>. Μετάλλαξη ή βλάβη του P53, σημαίνει αναστολή της απόπτωσης και εξ αυτής αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των μεταλλαγμένων P53 στο καρκίνωμα του μαστού σχετίζεται με βραχύτερο χρόνο επιβίωσης του ασθενούς. Πέραν τούτων έχει μελετηθεί η σχέση και άλλων ογκογονιδίων (όπως τα c-myc, k-ras) με την βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος του μαστού <sup>(7,8,9,120)</sup>. Η ASCO ωστόσο συνιστά η ένδειξη θετικότητας του καρκινώματος στο P53 να μη θεωρείται ως ένδειξη θεραπευτικού χειρισμού, αλλά, μόνο ως προγνωστικό στοιχείο<sup>(12)</sup> αφού τα μέχρι στιγμής δεδομένα είναι ανεπαρκή για μια τέτοια εφαρμογή. Η ανίχνευση των διαφόρων αναπτυξιακών παραγόντων (growth factors) και κυρίως των EGFR δεν ενδείκνυται σήμερα για το καρκίνωμα του μαστού, αφού δεν είναι τόσο ειδικός ή σημαντικός για τη θεραπεία όσο ο αντίστοιχος για το καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Θεωρείται εντούτοις κακός προγνωστικός παράγων, αφού η ανεύρεσή του σχετίζεται με βραχύτερη επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνωμα του μαστού.

Πειραματικές και κλινικές μελέτες, έχουν δείξει ότι τα ένζυμα που σχετίζονται με την διήθηση του καρκινώματος επηρεάζουν την επιβίωση των ασθενών. Τέτοια ένζυμα είναι η καθεψίνη (cathepsin D), ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (plasminogen activator), οι μεταλλοπρωτεϊνάσες και οι κολλαγενάσες. Η παρουσία τους δεν σχετίζεται μόνο με την διήθηση αλλά και με την αγγειογένεση του όγκου. Η ύπαρξη των παραγόντων αυτών στο καρκίνωμα του μαστού (και όχι μόνον), υποσημαίνει μεγαλύτερη επιθετικότητα και ικανότητα μετάστασής του<sup>(134)</sup>. Περισσότερο όμως σε εφαρμογή στην πράξη είναι η καθεψίνη. Και για το ένζυμο αυτό όμως η ASCO<sup>(39)</sup> συνιστά η εύρεσή του να μην αποτελεί στοιχείο για το θεραπευτικό χειρισμό του καρκινώματος του μαστού.



#### 4. ΘΥΜΟΣΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΘΥΜΟΣΙΝΗ α (ProTα)

Η θυμοσίνη είναι ένας χημικός παράγοντας ο οποίος έλκει την ονομασία του από τον θύμο αδένα. Ο θύμος είναι ένα σύνθετο όργανο το οποίο συνίσταται από επιθηλιακά και λεμφοειδή κύτταρα. Παραδοσιακά κατανέμεται στα ενδοκρινή όργανα ενώ η ακριβής λειτουργία του δεν έχει ακόμα διευκρινισθεί. Προσφάτως έχει διαπιστωθεί ότι ο θύμος αποτελεί το όργανο κλειδί για την ανάπτυξη και τη διατήρηση της ανοσίας του οργανισμού υπό την έννοια της συμμετοχής του στην παραγωγή, εξέλιξη και διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων <sup>(11,27,35,36,96,104,146,153)</sup>. Συγκεκριμένα παίζει ρόλο στην εξασφάλιση του μικροπεριβάλλοντος και την δράση των διαφόρων χημικών παραγόντων για τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των T-λεμφοκυττάρων. Τα T-λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους αναδιαθετιμένες ή τροποποιημένες πρωτεΐνες σαν αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασής τους με τα επιθηλιακά κύτταρα. Η συμμετοχή του θύμου στην ανοσολογική ανταπόκριση διαπιστώθηκε και πειραματικά αφού η εξαίρεσή του σε πειραματόζωα, οδηγούσε στην μη αντίδραση του οργανισμού σε διάφορα εξωτερικά αντιγονικά ερεθίσματα.<sup>(9,11)</sup> Βρέθηκε επίσης in vivo επίδραση εκχυλισμάτων θύμου, στην λεμφοποίηση και στον ανοσολογικό μηχανισμό, καθώς επίσης μοσχεύματα θύμου (που τοποθετώνται μέσα σε ημιδιαπερατές μεμβράνες, οι οποίες δεν επιτρέπουν την διακίνηση κυττάρων), μπορούν να υποκαταστήσουν την ανοσολογική λειτουργία του θύμου σε ζώα στα οποία της έχει αφαιρεθεί ο θύμος αδένας.<sup>(92)</sup> Φαίνεται πως θυμικοί, λεμφοποιητικοί παράγοντες απαιτούνται για την λεμφοκυτταρική, ανάπτυξη και οι τελευταίοι εκκρίνονται αφού προηγηθεί επαφή μεταξύ των κυττάρων. Διάφορα πολυπεπτίδια θυμικής προέλευσης έχουν περιγραφεί: η θυμοσίνη, η θυμοπρωτεΐνη, η θυμίνη κ.ά.

Η θυμοσίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά και πήρε αυτό το όνομα από τον Goldstein το 1966. Πρόκειται για μια θερμοανθεκτική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 10.000. Αργότερα από μεγάλες ποσότητες θύμου μοσχαριού απομονώθηκε μετά από διαδοχικούς καθαρισμούς μια πρωτεϊνική ουσία, η οποία ονομάστηκε θυμοσίνη κλάσμα S. Αργότερα αυτή η ουσία ταυτίστηκε με την θυμοσίνη α1<sup>(76)</sup>.



Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί και απομονωθεί διάφορες ομάδες σχετικών με τον θύμο ουσιών και ονομάζονται α και β θυμοσίνες, θυμοποιητίνες και θυμολίνες.

Οι θυμοσίνες α είναι η εξής<sup>(157)</sup>

Θυμοσίνη α1

Θυμοσίνη δεσο (1-28) – α1

• Θυμοσίνη α11

και προθυμοσίνη α

Οι θυμοσίνες β είναι οι εξής:

Θυμοσίνη β4

• Θυμοσύνη β10<sup>(169)</sup>

Θυμοσίνη β8

Θυμοσίνη β9

και θυμοσίνη β12

#### α. Χημική δομή της προθυμοσίνης άλφα (α)

Η προθυμοσίνη α περιέχει 113 αμινοξέα με αυξημένη περιεκτικότητα σε κατάλοιπα ασπαραγινικού και γλουταμινικού οξέος τα οποία αντιστοιχούν σε ποσοστό πάνω από το 50% των συνολικών καταλοίπων.<sup>(85)</sup> Παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα σε υδρόφοβα αμινοξέα χωρίς καθόλου θειούχα αρωματικά αμινοξέα και ιστιδίνη. Ανάλυση της πρωτοπαγούς δομής της προθυμοσίνης από θύμο αδένου αρουραίου έδειξε ότι, το αμινοτελικό άκρο της 1028 αντιστοιχεί πλήρως στην ελληλουχία της θυμοσίνης α1 και είναι ακετυλιωμένο στη θέση 1. Τα 2/3 των όξινων καταλοίπων βρίσκονται στο μεσαίο τμήμα της αλληλουχίας από όπου και απουσιάζουν βασικά αμινοξέα ή δε αλληλουχία της περιοχής αυτής δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί επακριβώς.<sup>(82)</sup> Η προθυμοσίνη α απομονώθηκε επίσης και από τον άνθρωπο και προσδιορίστηκε η πρωτοπαγής δομή της.<sup>(13)</sup> Βρέθηκε λοιπόν ότι η ανθρώπινη προθυμοσίνη έχει ακετυλιωμένο το αμινοτελικό άκρο πλούσιο σε όξινα αμινοξέα, ενώ η αλληλουχία του κεντρικού τμήματός της είναι και εδώ άγνωστη.<sup>(81,126,151)</sup>

• Μια άλλη μορφή ανθρώπινης προθυμοσίνης α απομονώθηκε από καλλιέργεια κυτταρικής σειράς ανθρώπινων ινοβλαστών. Αυτή η προθυμοσίνη αποτελείται από 110 αμινοξέα με έναν επιπλέον αμινοξικό κατάλοιπο



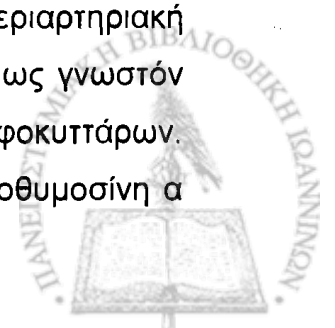
γλουταμινικού οξέος, στην θέση 39.<sup>(57)</sup> Προθυμοσίνη α, απομονώθηκε τέλος και από θύμο αδένα μοσχαριού, χοίρου, ποντικού καθώς και από σπλήνα κατσίκας.<sup>(49,72,106)</sup>

### **β. κατανομή της προθυμοσίνης α στους ιστούς των θηλαστικών και τα υγρά του σώματος**

Αν εξαιρέσουμε την επρίπτωση του σπλήνα της κατσίκας, ο πλουσιότερος ιστός σε προθυμοσίνη α είναι ο νεαρός θύμος αδένας.<sup>(71)</sup> Ακολουθεί ο σπλήνας (των άλλων ζώων πλην της κατσίκας), το ήπαρ και ο εγκέφαλος.<sup>(84)</sup> Τα επίπεδα όμως της προθυμοσίνης και διάφορους ιστούς επηρεάζονται από διάφορες βιολογικές παραμέτρους, όπως είναι το φύλο, η ηλικία, οι διαιτητικοί παράγοντες καθώς και η κατάσταση υγείας του οργανισμού.<sup>(26,37,40,46,48,58,68,71,90,103,135,148,152,154,160,161)</sup> Οι περισσότερες μετρήσεις της προθυμοσίνης α έγιναν στον ορό ή το πλάσμα του αίματος προκειμένου να βρεθεί τυχόν σχέση του επιπέδου της με διάφορες νοσολογικές καταστάσεις. Η τιμή της προθυμοσίνης α στον ορό υγιούς ατόμου κυμαίνεται στο 0,2-0,65 pmoles/ml. Η μέτρηση έγινε με ραδιοανοσοδοκιμασία και με χιαστί αντιδρών υλικό στην θυμοσίνη α και στην προθυμοσίνη α. Επίσης στο πλάσμα ή στον ορό όμφαλίου λώρου εμβρύου τα οποία μειώνονται αμέσως μετά τον τοκετό, αλλά έκτοτε παραμένουν σταθερά μέχρι την ηλικία των 15 ετών.<sup>(92,115)</sup> Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι η ικανότητα σύνθεσης ακεραίου πολυπεπτιδίου της προθυμοσίνης α από καλλιέργεια θυμοκυττάρων αρουραίου και μοσχαριού, είναι ανάλογα του κυτταρικού μεγέθους. Μεγάλα θυμοκύτταρα συνθέτουν περισσότερο προθυμοσίνη α από ότι τα αντίστοιχα μικρά.<sup>(66)</sup>

### **γ. κατανομή της προθυμοσίνης α στα κύτταρα**

Η προθυμοσίνη α ανευρίσκεται τόσο στο φλοιό όσο και στον μυελό του θύμου αδένου στον αρουραίο. Κατανέμεται όμως αυστηρά στα λεμφοκύτταρα και όχι στα επιθηλιακά κύτταρα του αδένου. Στον σπλήνα βρέθηκε στα λεμφοκύτταρα του λευκού πολφού και συγκεκριμένα στην περιαρτηριακή περιοχή και κυρίως στα κύτταρα των βλαστικών κέντρων όπου ως γνωστόν είναι η περιοχή πολλαπλασιασμού και ωρίμανσης των β-λεμφοκυττάρων. Στον ερυθρό πολφό βρέθηκαν σε μεμονωμένα κύτταρα.<sup>(143)</sup> Προθυμοσίνη α



βρέθηκε επίσης στα σπερμικά σωληνάρια του όρχεος και μάλιστα στα προ σπερματικά κύτταρα. <sup>(149)</sup>

Σε ότι αφορά την κατανομή της προθυμοσίνης α σε κυτταρικό επίπεδο υπάρχουν διάφορες απόψεις. Άλλες μελέτες θεωρούν ότι η κατανομή της προθυμοσίνης α είναι πυρηνική, άλλες ότι είναι πρωτοπλασματική και άλλες ότι είναι μικτή πυρηνική-πρωτοπλασματική. Οι Gomez και συν. <sup>(77)</sup> Βασιζόμενοι σε δομικούς και μόνον λόγους (σύγκριση πρωτοταγών δομών της προθυμοσίνης α με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες) θεωρούν ότι η θέση της προθυμοσίνης α είναι πυρηνική. Προς τούτο συμφωνούν και διάφορες πειραματικές μελέτες μετά από ένεση ραδιενεργού προθυμοσίνης α σε ώριμα κύτταρα του *Xenopus* ή και μετά από εκχύλιση διαλυτών σε υπερχλωρικό οξύ πυρηνικών πρωτεϊνών θύμου αδένα. <sup>(123,174,177)</sup>

Όμως, μελέτες με ανοσοηλεκτρονική μικροσκόπηση, ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και έμμεσο ανοσοφθορισμό σε θύμο ανθρώπου, θύμο ποντικών, και σε κύτταρα καρκινικής σειράς MCF-7 βρέθηκε η προθυμοσίνη α να είναι πρωτοπλασματική. <sup>(13,60,91,119)</sup> Το ίδιο αποδείχθηκε μετά από λύση κυττάρων καρκινικής σειράς ποντικών τύπου krebs II. Στη μελέτη αυτή, απομονώθηκε μικρό κυτταροπλασματικό RNA, συνδεδεμένο με προθυμοσίνη α, γεγονός που αποδεικνύει την κυτταροπλασματική θέση της προθυμοσίνης α. Τέλος άλλοι ερευνητές βρίσκουν ότι, η προθυμοσίνη α έχει τόσο πυρηνική όσο και πρωτοπλασματική ταυτόχρονα κατανομή. Ο Contreas <sup>(33)</sup> απομόνωσε πυρήνες από επιθηλιακά εκτερικά κύτταρα αρουραίου σειράς IEG-6 και αφού τα φυγοκέντρισε και τα έλυσε, με τη μέθοδο ELISA ενετόπισε την προθυμοσίνη α στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Το ίδιο βρήκαν και άλλοι ερευνητές <sup>(145)</sup> εξετάζοντας κύτταρα όρχεος ώριμου αρουραίου σε ιστολογικό επίπεδο με ανοσοϊστοχημική μελέτη.

#### δ. Βιολογική δράση της προθυμοσίνης α

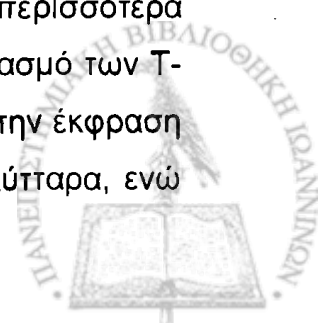
Η προθυμοσίνη α έχει διττή βιολογική δραστηριότητα. Η μία είναι ενδοκυτταρική και σχετίζεται με την αύξηση του κυττάρου, ενώ η άλλη είναι εξωκυττάρια και σχετίζεται με την ανοσία που μεσολαβεί μεταξύ των κυττάρων.

Εις ότι αφορά την δράση της προθυμοσίνης α στην κυτταρική αύξηση, έχει βρεθεί ότι στα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα όταν διεγερθούν *in vitro* με μιτογόνα



αυξάνονται τα επίπεδα της προθυμοσίνης  $\alpha$  κατά δεκαπέντε φορές<sup>(54)</sup> Αυξημένα επίσης επίπεδα θυμοσίνης συνδεδεμένης με mRNA βρέθηκαν σε αναγεννόμενο ήπαρ αρουραίου, και σε *in vivo* λευχαιμικό λεμφοκύτταρα ανθρώπου.<sup>(73)</sup> Βρέθηκε επίσης ότι όταν σε ανθρώπινα μονοκύτταρα *in vitro* αλλά και σε λεμφοκύτταρα, που έχουν διεγερθεί σε πολλαπλασιασμό με φυτοαιματογλουτίνη, προστεθεί προθυμοσίνη  $\alpha$ , τότε, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων αυτών αυξάνει και παράλληλα αυξάνεται η έκφραση των υποδοχέων της Interleukin2 των T-λεμφοκυττάρων, χωρίς όμως ταυτόχρονη αύξηση της ίδιας της λεμφοκίνης.<sup>(34)</sup> Τα επίπεδα της mRNA προθυμοσίνης  $\alpha$  βρέθηκαν πολλαπλάσια αυξημένα στον εγκέφαλο και στο ήπαρ εμβρύων ή σε ιστούς νεογεννήτων αρουραίων,<sup>(48)</sup> ενώ σε καλλιέργειες σειράς μικρών κυτάρων εντέρου αρουραίου IEC-6 βρέθηκε η προθυμοσίνη  $\alpha$  να είναι εβδομήντα φορές αυξημένη κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.<sup>(78)</sup> Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *myc* επάγει την ταχεία μεταγραφή του γονιδίου της προθυμοσίνης  $\alpha$ , ακόμη και χωρίς να υπάρχει αντίστοιχη αύξηση της σύνθεσης της ίδιας της πρωτεΐνης<sup>(50)</sup> ή ότι η προθυμοσίνη  $\alpha$  κωδικοποιείται από ολόκληρη γονιδιακή αποτελούμενη από έξι μέλη.<sup>(57)</sup>

Εις ότι αφορά τον εξωκυττάριο ρόλο της προθυμοσίνης έχει διαπιστωθεί ότι πρώτον, προστατεύει *in vivo* ευαίσθητοποιημένα και μη ποντίκια έναντι λοιμώξεων έναντι τις *Candida albicans*, περισσότερο από ότι οι άλλες θυμοσίνες  $\alpha 1$  και  $\alpha 11$ .<sup>(83)</sup> Δεύτερον, η ανθρώπινη προθυμοσίνη  $\alpha$  βρέθηκε να είναι λιγότερο δραστική από εκείνη του αρουραίου έναντι των λοιμώξεων του ίδιου παράγοντα ως άνω.<sup>(124)</sup> Τρίτον, η χορήγηση προθυμοσίνης  $\alpha$  *in vitro* σε κύτταρα περιφερικού αίματος ασθενών με ερυθματώδη λύκο ή ενεργό σκλήρυνση κατά πλάκας βρέθηκε να επαναφέρει σε φυσιολογικά επίπεδα την αυτόλογη και αλλογονική μεικτή λεμφοκυτταρική απόκριση, επιδιορθώνοντας την ελλατωματική διέγερση των μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος.<sup>(17,137)</sup> Ο μηχανισμός της ενίσχυσης της αυτόλογης μεικτής λεμφοκυτταρικής ανταπόκρισης *in vitro*, από την προθυμοσίνη  $\alpha$  πραγματοποιείται αρχικά με την διέγερση των μονοκυττάρων που απελευθερώνουν ένα ή περισσότερα ενεργά συστατικά. Τα τελευταία επάγουν άμεσα τον πολλαπλασιασμό των T-λεμφοκυττάρων, αυξάνοντας την παραγωγή της Interleukin-2 και την έκφραση των ειδικών υποδοχέων της, στα αυτοενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα, ενώ



συγχρόνως ενισχύουν τις αντιγονοπαρουσιαστικές λειτουργίες των μονοκυττάρων. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η προθυμοσίνη α επιδρά στα μονοκύτταρα ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, με αύξηση της έκφρασης των DR-αντιγόνων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MIC), ενισχύοντας την ικανότητα διέγερσής τους στην αυτόλογη μεικτή λεμφοκυτταρική ανταπόκριση. Ρυθμίζει επίσης την μέγιστη έκφραση DR-αντιγόνων του MIC σε μονοκύτταρα υγιούς ανθρώπου και ποντικού καθώς και σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. <sup>(18,19)</sup>

Τέλος χορήγηση συγκεκριμένης δόσης προθυμοσίνης α σε αρουραίους, αύξησε τόσο τη χημική όσο και την κυτταρομεσολαβητική ανοσολογική ανταπόκριση των ζώων και επιπλέον των αριθμό των CD4+ βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων, ενώ μείωσε τον αριθμό των CD8 κατασταλτικών T-λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Ο λόγος CD4/CD8 βρέθηκε διπλάσιος του κανονικού μετά τη χορήγηση της προθυμοσίνης α, ενώ παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις στον θύμο, συνιστάμενες από αύξηση του μεγέθους των περιοχών του φλοιού αλλά και του μυελού με ακόλουθο την αύξηση του βάρους του οργάνου κατά 2,4 φορές περίπου. <sup>(111)</sup> Βρέθηκε τέλος ότι in vivo χορήγηση προθυμοσίνης α σε λευχαιμικά ποντίκια επέδρασε στην αναστολή της αύξησης των λευχαιμικών κυττάρων. <sup>(128)</sup>





**ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---



# 1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

---

## 1.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Σύνθεση πεπτιδίων

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε στο τμήμα ραδιοανοσοχημείας του ΕΚ «Δημόκριτος»

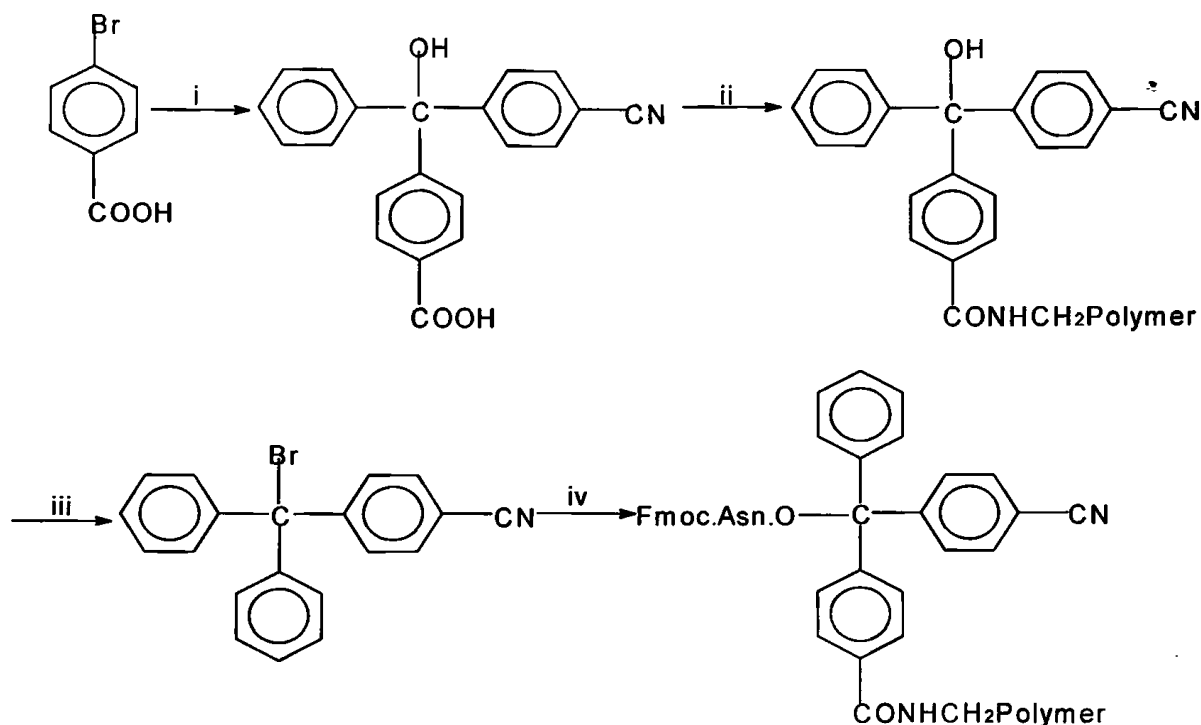
Εφαρμόστηκε μέθοδος σύνθεσης σε στερεά φάση με *in situ* ενεργοποίηση των  $Fmoc$ -αμινοξέων, όπως έχει περιγραφεί για την  $T\beta_{10}$  (Leondiadis et al, 1996). Συντέθηκαν τα παρακάτω πεπτίδια:

### ProTa[101-109]

LysLysGlnLysThrAspGluAspAspOH

Για τη σύνθεση των παραπάνω πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε π-κυανο-πολυστυρολική ρητίνη. Για την παρασκευή της ρητίνης, αρχικά γίνεται αμινομεθυλίωση του συμπολυμερούς στυρόλιο-1% 1,3-διβινυλοβενζόλιο. (Zicos and Ferderigos, 1994). Στη συνέχεια, 4-κυανο-4'-καρβοξυ-τριφαινυλομεθανόλη (Zicos and Ferderigos, 1995), προστίθεται στην αμινομεθυλιωμένη ρητίνη με τη χρήση DIPC/HOBT και η ρητίνη εστεροποιείται με το πρώτο  $Fmoc$ -αμινοξύ, που είναι το καρβοξυτελικό του πεπτιδίου που πρόκειται να συντεθεί, με τη χρήση ακετυλοβρωμιδίου και DIEA. Η πορεία της σύνθεσης της ρητίνης φαίνεται στο σχήμα 1.





- i) BuLi, 4-κυανο-βενζοφαινόνη  
 ii) HOBt, DIPc, DMF, αμινομεθυλ-πολυστυρόλιο  
 iii) CH<sub>3</sub>COBr, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
 iv) Fmoc-Asn-OH, DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Σχήμα 1:** Σύνθεση π-κυανο-τριτυλ-ρητίνης για την πεπτιδική σύνθεση

### Συνθήκες σύνθεσης επιμέρους πεπτιδίων

#### ProTα[101-109]

Για τη σύνθεσή του χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια σε περίσσεια 6 ισοδυνάμων

Το μοριακό βάρος του πεπτιδίου είναι 1105. Τα στοιχεία της σύνθεσης δίνονται στον πίνακα 3.

Υποκατάσταση ρητίνης	0.170 mmol/g ρητίνης
Ποσότητα ρητίνης	0.550 g
Ισοδύναμο αμινομάδας	0.170 x 0.550 = 0.093 mmol

Ποσότητα προστιθέμενου Fmoc-αμινοξέος	$0.093 \times 6 = 0.558 \text{ mmol}$
Ποσότητα προστιθέμενου HOBT	$0.093 \times 6 = 0.558 \text{ mmol}$
Ποσότητα προστιθέμενου DIPIC	$0.093 \times 6 = 0.558 \text{ mmol}$

### Πίνακας 3: Στοιχεία σύνθεσης του πεπτιδίου ProTα[101-109]

Μετά την προσθήκη του αμινοξέος 101, το σύμπλεγμα πεπτιδίου-ρητίνης ξηράνθηκε, ζυγίστηκε και χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το ένα μέρος ακετυλιώθηκε και αποσπάστηκε από τη ρητίνη, ενώ στο άλλο η σύνθεση συνεχίστηκε (χρησιμοποιώντας το μισό της ποσότητας των αντιδραστηρίων του παραπάνω πίνακα) μέχρι το αμινοξύ 87, ώστε να συντεθεί και το πεπτίδιο ProTα[87-109]. Το μοριακό βάρος του πεπτιδίου αυτού είναι 2679.

### Καθαρισμός συνθετικών πεπτιδίων

Ο καθαρισμός των παραπάνω συνθετικών πεπτιδίων έγινε με ημιπαρασκευαστική RP-C18 HPLC, ενώ η ανάλυσή τους έγινε με αναλυτική RP-C18 HPLC.

### Ανάλυση αμινοξέων συνθετικών πεπτιδίων

Για την ανάλυση αμινοξέων των συνθετικών πεπτιδίων εφαρμόστηκε η μέθοδος του Ebert. Αρχικά το πεπτίδιο υδρολύεται στους  $150^{\circ}\text{C}$  για 1 h, σε ατμόσφαιρα αζώτου, παρουσία 200 μl διαλύματος υδρόλυσης. Ακολουθεί ξήρανση του υδrolύματος με προσθήκη 20 μl διαλύματος ξήρανσης, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό. Τα αμινοξέα που προκύπτουν από την υδρόλυση μετατρέπονται σε παράγωγα του PITC, προσθέτοντας 20 μl διαλύματος παραγωγοποίησης. Μετά από 25 min η αντίδραση διακόπτεται σταδιακά εφαρμόζοντας κενό για 45 min. Το ξηρό υπόλειμμα που λαμβάνεται επαναδιαλύεται σε 200 μl διαλύματος ανασύστασης και χρησιμοποιείται για ανάλυση αμινοξέων σε RP-HPLC.



### **Ανάπτυξη αντισωμάτων**

Η ανάπτυξη των αντισωμάτων πραγματοποιήθηκε στο τμήμα ραδιοανοσοχημείας του ΕΚ «Δημόκριτος»

Τα πεπτίδια που συντέθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω, καθώς και φυσική ProTa απομονωμένη από ιστούς βοοειδών, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη αντισωμάτων εναντίον τους. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν συζεύγματα των πεπτιδίων με KLH (ανοσογόνα), με τα οποία ανοσοποιήθηκαν κουνέλια.

#### Παρασκευή ανοσογόνων

Παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα των πεπτιδίων σε PB περιεκτικότητας 1,5 μmol/ml. Για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων, ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες από κάθε πεπτίδιο, και διαλύονται σε 1 ml PB:

ProTa[101-109] 1,7 mg

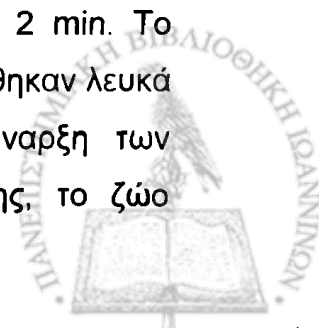
Μίγμα αποτελούμενο από 200 μl διαλύματος πεπτιδίου (1,5 μmol πεπτιδίου σε 1 ml PB), 200 μl διαλύματος KLH (10 mg σε 1 ml PB pH 7.4), 160 μl PB pH 7,4 και 40 μl διαλύματος 25% γλουταραλδεΐδης, αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 4 °C και αραίωση με διάλυμα 0,9‰ NaCl, ώστε να ληφθεί διάλυμα κατάλληλης περιεκτικότητας σε πεπτίδιο, η οποία για κάθε πεπτίδιο είναι:

ProTa[101-109] 50 μg/ml

Το τελικό διάλυμα κατανέμεται σε φιαλίδια ανά 0,5 ml, λυοφιλοποιείται και φυλάσσεται στους -35 °C. Πριν τη χρήση, γίνεται ανασύσταση με H<sub>2</sub>O του λυόφιλου προϊόντος.

#### Ανοσοποιήσεις - αιμοληψίες

Για την ανοσοποίηση, σε 0,5 ml συζεύγματος πεπτιδίου-KLH προστίθεται ίσος όγκος ανοσοενισχυτικού CFA και το μίγμα ομογενοποιείται για 2 min. Το γαλάκτωμα που λαμβάνεται χορηγείται σε κουνέλια. Χρησιμοποιήθηκαν λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, ηλικίας 2-2,5 μηνών κατά την έναρξη των ανοσοποιήσεων. Για τη χορήγηση του μίγματος ανοσοποίησης, το ζώο



ακινήτοποιείται σε ειδικό κλωβό και η ράχη του ξυρίζεται με ηλεκτρική ξυριστική μηχανή. Στη συνέχεια 1 ml του γαλακτώματος του ανοσογόνου ενίεται ενδοδερμικά σε 20-30 σημεία της ράχης με σύριγγα ινσουλίνης.

Η αιμοληψία γίνεται από τη φλέβα στο εξωτερικό του αυτιού. Η φλέβα επαλείφεται εσωτερικά με ξυλόλιο ώστε να διογκωθεί. Ακολούθως εισάγεται στη φλέβα βελόνα 22 G και το αίμα συλλέγεται σε σύριγγα των 20 ml. Μετά το τέλος της αιμοληψίας, η βελόνα απομακρύνεται και η περιοχή του αυτιού απολυμαίνεται με αιθανόλη.

Μετά την αρχική ανοσοποίηση, ακολουθούν κατά διαστήματα αναμνηστικές ανοσοποιήσεις και αιμοληψίες σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα:

Αρχική ανοσοποίηση: 1η ημέρα

1η αναμνηστική δόση: 45η ημέρα

2η αναμνηστική δόση: 75η ημέρα

3η αναμνηστική δόση: 105η ημέρα

4η αναμνηστική δόση: 135η ημέρα

5η αναμνηστική δόση: 165η ημέρα

6η αναμνηστική δόση: 195η ημέρα

1η αιμοληψία: 55η ημέρα

2η αιμοληψία: 85η ημέρα

3η αιμοληψία: 115η ημέρα

4η αιμοληψία: 145η ημέρα

5η αιμοληψία: 175η ημέρα

6η αιμοληψία: 205η ημέρα

Το αίμα που παραλαμβάνεται, μεταφέρεται από τη σύριγγα σε γυάλινους σωλήνες φυγοκέντρου, αποκολλάται με πλαστικό ραβδί από τα τοιχώματα και αφήνεται για 2-3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια κλινική φυγόκεντρο και ο ορός παραλαμβάνεται με πιππέτα pasteur. Το υπόλειμμα επαναφυγοκεντρείται αν χρειαστεί. Ο αντιορός που παραλαμβάνεται με την παραπάνω διαδικασία, κατανέμεται ανά 1 ml σε φιαλίδια και φυλάγεται στους  $-35^{\circ}\text{C}$ .

### Ανοσοαναλύσεις

Εφαρμόστηκε σύστημα ELISA για τον έλεγχο του τίτλου των αντιορών που αναπτύχθηκαν καθώς και για την ανάπτυξη ανταγωνιστικής ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ProTa. Ο τίτλος όλων των αντιορών ελέγχθηκε έναντι ProTa σε πλακίδια μικροτιλοδότησης επικαλυμμένα με ProTa.



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ

Εγινε η σύνθεση του πεπτιδίου ProTa[101-109]. Για τη σύνθεση του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε μέθοδος σύνθεσης στερεάς φάσης σε π-κυανο-τριτυλ-πολυστυρολική ρητίνη. Η α-αμινομάδα των αμινοξέων ήταν προστατευμένη με την Fmoc-ομάδα. Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων ασπαρτικό, γλουταμικό, θρεονίνη και σερίνη προστατεύτηκαν με την t-βουτυλο-ομάδα, η πλευρική αμινομάδα της λυσίνης με τη βουτυλοξυκαρβονυλ-ομάδα, ενώ η πλευρική ομάδα της αργινίνης προστατεύτηκε με πενταμεθυλοχρωμανοσουλφονυλ-ομάδα. Η ενεργοποίηση των αμινοξέων γινόταν *in situ*, με τη χρήση ισομοριακών ποσοτήτων HOBT και DIPC. Τα συνθετικά πεπτιδία μετά την απόσπασή τους από τη ρητίνη της σύνθεσης λυοφιλοποιήθηκαν και καθαρίστηκαν με ημιπαρασκευαστική HPLC, ενώ έγινε και αναλυτική HPLC πριν και μετά τον καθαρισμό. Η αναλυτική HPLC κάθε πεπτιδίου μετά τον καθαρισμό έδωσε μονή κορυφή. Τα χρωματογραφήματα της αναλυτικής HPLC κάθε πεπτιδίου πριν και μετά τον καθαρισμό δίνονται στα αντίστοιχα σχήματα. Επίσης, έγινε ανάλυση αμινοξέων των συνθετικών πεπτιδίων, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το συνθετικό προϊόν αντιστοιχεί στην επιθυμητή αμινοξική σύσταση. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους αντίστοιχους πίνακες. Η τελική απόδοση σε καθαρό προϊόν ήταν περίπου 60%.

**Πίνακας 4 :** Ανάλυση αμινοξέων ProTa[101-109]

Αμινοξύ	Θεωρητική σύσταση αμινοξέων	Πειραματική σύσταση αμινοξέων
Asx	3	2,91
Glx	2	1,97
Thr	1	1,06
Lys	3	2,88

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Ανάπτυξη αντισωμάτων Αναπτύχθηκαν αντισώματα έναντι του συνθετικού πεπτιδίου ProTa[101-109]. Όλα τα ανοσογόνα παρασκευάστηκαν με σύζευξη των πεπτιδίων στη μεγαλομοριακή πρωτεΐνη KLH, γαλακτοματοποιήθηκαν με CFA και χορηγήθηκαν σε κουνέλια όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των μεθόδων. Σε κάθε αιμοληψία που λαμβανόταν προσδιοριζόταν ο τίτλος του αντιορού με σύστημα ELISA.

Προσδιορισμός τίτλου αντιορών Ο προσδιορισμός του τίτλου κάθε αντιορού έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο των μεθόδων για κάθε αιμοληψία που λαμβανόταν. Σε κάθε περίπτωση, η αιμοληψία που παρουσίασε το μεγαλύτερο τίτλο χρησιμοποιήθηκε στα περαιτέρω πειράματα ανάπτυξης πρότυπων καμπυλών μέτρησης ProTa. Για τα αντισώματα έναντι των αμινοτελικών πεπτιδίων της ProTa, ο τίτλος των αντίστοιχων αντιορών προσδιορίστηκε και έναντι της Ta<sub>1</sub>. Τα στοιχεία των αιμοληψιών με τον υψηλότερο τίτλο για όλα τα αντισώματα φαίνονται στον πίνακα 4<sup>α</sup>, ενώ οι καμπύλες τίτλου των καλύτερων αιμοληψιών κάθε αντιορού στο σχήμα 2.

### Αξιολόγηση αντιορών έναντι ProTa

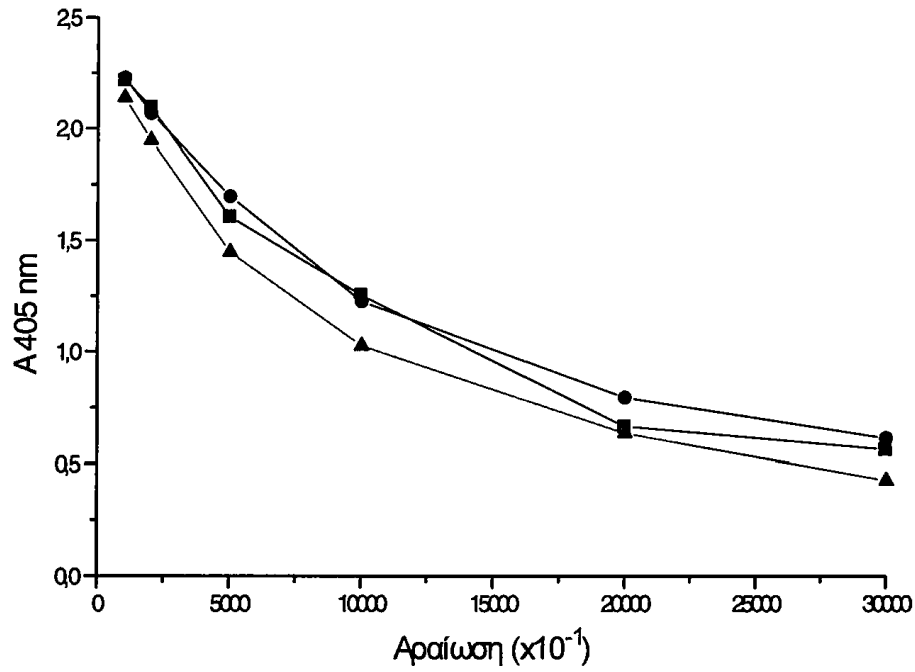
Όλα τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν αναγνώριζαν την ProTa. Τον υψηλότερο τίτλο αντισωμάτων κατά ProTa παρουσίασε ο αντιορός που αναπτύχθηκε έναντι ProTa[101-109].

**Πίνακας 4<sup>α</sup> :** Τίτλος αντισώματος αντί-ProTa[101-109]

Αντίσωμα	Αιμοληψία	Τίτλος
αντί-ProTa[101-109]	6η	1:15000







**Σχήμα 2:** Καμπύλες τίτλου για τον αντιορό έναντι ProTa[101-109]:- 4η αιμοληψία (■), 6η αιμοληψία (●), 7η αιμοληψία (▲)

## 1.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

---

Εφαρμόστηκε μέθοδος έμμεσης ανοσοϊστοχημικής χρώσης, για την ανίχνευση PrgTa σε κύτταρα καρκινικού ιστού μαστού. Τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν τομές ιστού έγκλειστου σε παραφίνη (πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες). Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ανοσοϊστοχημικής χρώσης SHANDON. Οι ειδικές υποδοχές της συσκευής δημιουργούν μια λεπτή στοιβάδα υγρού μεταξύ αντικειμενοφόρας πλάκας και καλυπτρίδας. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε ήταν η εξής:

### Απομάκρυνση της παραφίνης

- Οι πλάκες με τις έγκλειστες σε παραφίνη τομές των ιστών τοποθετούνται σε ειδικό γυάλινο δοχείο με ξυλόλιο και θερμαίνονται στους 55-60 °C για 20 min
- Το ξυλόλιο απορρίπτεται και στο δοχείο προστίθεται φρέσκο, στο οποίο οι πλάκες παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου

### Ενυδάτωση των κυττάρων του ιστού

- Οι πλάκες τοποθετούνται διαδοχικά σε δοχεία που περιέχουν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

90% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
80% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
70% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
50% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
30% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
20% αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O	2 min
Απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	5 min



PBS pH 7.4

5 min

Ανοσοϊστοχημική χρώση

- Οι πλάκες τοποθετούνται σε δοχείο που περιέχει διάλυμα 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε PBS pH 7.4 για 15 min, έτσι ώστε να αποενεργοποιηθεί η ενδογενής υπεροξειδάση των ιστών
- Ακολουθούν δύο διαδοχικές εκπλύσεις σε δοχείο με διάλυμα έκπλυσης (σε κάθε έκπλυση οι πλάκες παραμένουν στο δοχείο για 5 min). Στο σημείο αυτό οι πλάκες μεταφέρονται στις ειδικές υποδοχές του μηχανήματος SHANDON. Στο επόμενο στάδιο τα αντιδραστήρια πιπεττάρονται στις ειδικές θήκες του μηχανήματος.
- Σε κάθε δείγμα πιπεττάρονται 100 μl διαλύματος κορεσμού και παραμένουν για 15 min, έτσι ώστε να κορεστούν οι Fc-υποδοχείς των ιστών
- Ακολουθούν δυο διαδοχικές εκπλύσεις (για κάθε έκπλυση, πιπεττάρονται σε κάθε δείγμα 3 ml διαλύματος έκπλυσης)
- Σε κάθε δείγμα πιπεττάρονται 100 μl διαλύματος πρώτου αντισώματος, αντί-ProTa[101-109], και επωάζονται για 1 h.
- Ακολουθούν δυο διαδοχικές εκπλύσεις, όπως περιγράφεται παραπάνω
- Σε κάθε δείγμα πιπεττάρονται 100 μl διαλύματος δευτέρου αντισώματος, αντί-ProTa, και επωάζονται για 30 min
- Ακολουθούν δυο διαδοχικές εκπλύσεις, όπως περιγράφεται παραπάνω



- Σε κάθε δείγμα πιπτετάρονται 100 μl διαλύματος ενζυμικού υποστρώματος αβιδίνης – βιοτίνης και τα δείγματα αφήνονται στο σκοτάδι 7-10 min για να αναπτυχθεί το χρώμα
- Ακολουθεί μια έκπλυση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O
- Σε κάθε δείγμα πιπτετάρονται 100 μl διαλύματος αιματοξυλίνης και επωάζονται για 1 min
- Ακολουθεί μια έκπλυση με απεσταγμένο νερό στις ειδικές θήκες και στη συνέχεια τα δείγματα εκπλένονται για 2-3 min κάτω από τη βρύση και αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα
- Για την παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο, τα δείγματα καλύπτονται με γυάλινη καλυπτρίδα, με κόλλα επικάλυψης Entellan.



## 2. ΤΟ ΥΛΙΚΟ ΜΑΣ

---

Το υλικό μας αποτελούν εκατόν πενήντα (150) περιπτώσεις αδenoκαρκινώματος του μαστού, οι οποίες χειρουργήθηκαν στο νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας» και εξετάστηκαν ιστολογικώς στο Παθολογοανατομικό τμήμα του νοσοκομείου κατά το διάστημα 1985-2002.

Από τους 150 ασθενείς οι 140 είχαν διηθητικό καρκίνωμα και οι υπόλοιπες 10 μη διηθητικό (in situ) καρκίνωμα (πιν.1).

Η επιλογή ήταν τυχαιοποιημένη αλλά προστέθηκαν περιπτώσεις grade I και grade II καρκινωμάτων με στόχο να εξετάσουμε την συμπεριφορά της προθυμοσίνης α στα ακραία grades ουτως ώστε να αποτελέσει - ενδεχομένως- οδηγό για τα καρκινώματα grade II, όπου η συμπεριφορά τους (βιολογική και θεραπευτική) δεν είναι σαφής. Συμπεριλαμβάνονται επίσης στο υλικό μας 10 in situ καρκινώματα (πολύ χαμηλό ποσοστό σε σχέση με τα διηθητικά) με τον ίδιο περίπου στόχο.

Όλες οι περιπτώσεις επανεκτιμήθηκαν σε επίπεδο τομών αιματοξηλίνης-ηωσίνης για επιβεβαίωση ή επανακαθορισμό του grade, του τύπου ή άλλων ιστολογικών παραμέτρων.

Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 21 μέχρι 83 έτη, με μέσο όρο ηλικίας τα 49,7 έτη.

Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε ριζική τροποποιημένη μαστεκτομή, τμηματεκτομή ή ογκεκτομή, με δείγμα μασχαλιαίων λεμφαδένων ή πλήρη λεμφαδενική εκτομή.

Επίσης αρκετές περιπτώσεις υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία ή συνδυαστική θεραπεία.

Η παρακολούθηση των ασθενών ήταν δεκαπενταετής για 27 περιπτώσεις, δεκαετής για 34 περιπτώσεις και από 1 μέχρι 5 χρόνια για 70 περιπτώσεις. Δώδεκα περιπτώσεις μας χάθηκαν στο follow up και άλλες 7 πέθαναν από άλλη αιτία (πιν.5 και 6).

Η σύνθεση του πεπτιδίου της προθυμοσίνης α (ProTa) καθώς και η παραγωγή του αντισώματος έγινε στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» στο τμήμα ραδιοανοσοχημείας.



Η ανοσοιστοχημική εξεργασία των ιστολογικών τομών παραφίνης έγινε επίσης στο ίδιο εργαστήριο. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανοσοιστοχημείας έγινε στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας».

Μελετήθηκε η κατανομή και η έκφραση της PrgTa στα καρκινικά και μη κύτταρα και κυρίως η πυρηνική ή η κυτταροπλασματική της έκφραση, παρά ο βαθμός έντασης της χρώσης (που κατανέμονταν σε μικρή και κυρίως σε μέτρια και μεγάλη) και τούτο διότι στατιστικώς, η διασπορά αυτή θα οδηγούσε σε στατιστικώς μη σημαντικά αποτελέσματα λόγω διασποράς του υλικού.

**Πίνακας 5:** Σύνολο υλικού ανά τύπο καρκινώματος.

Τύποι καρκινώματος	Αριθμός περιπτώσεων
Πορογενή μη ειδικού τύπου	114
Πορογενή ειδικού τύπου	16
1. σωληνώδη	8
2. ηθμοειδή	1
3. βλεννώδη	2
4. θηλώδη	1
5. μυελοειδή	4
Λοβιακά	10
In situ πορογενή	10

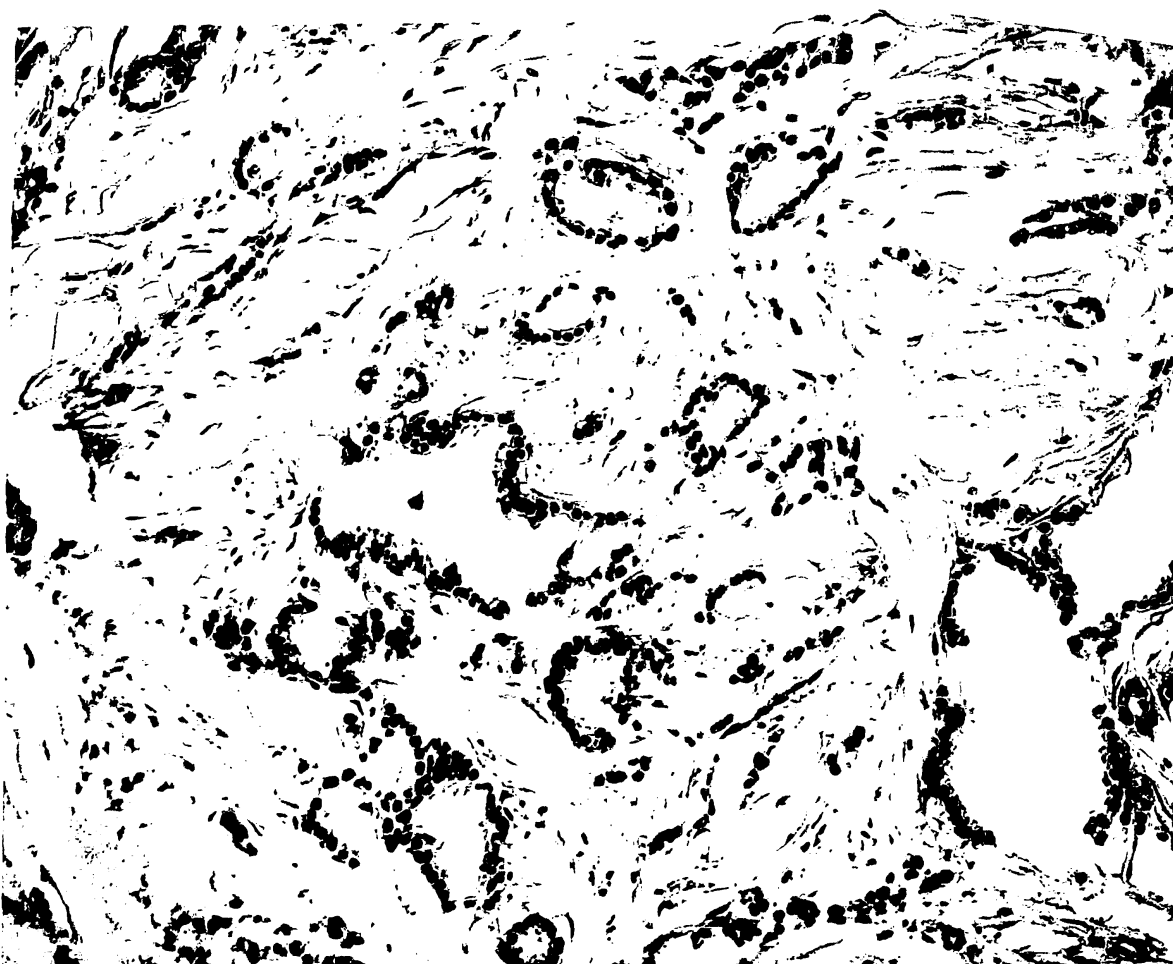


**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

---



## 1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

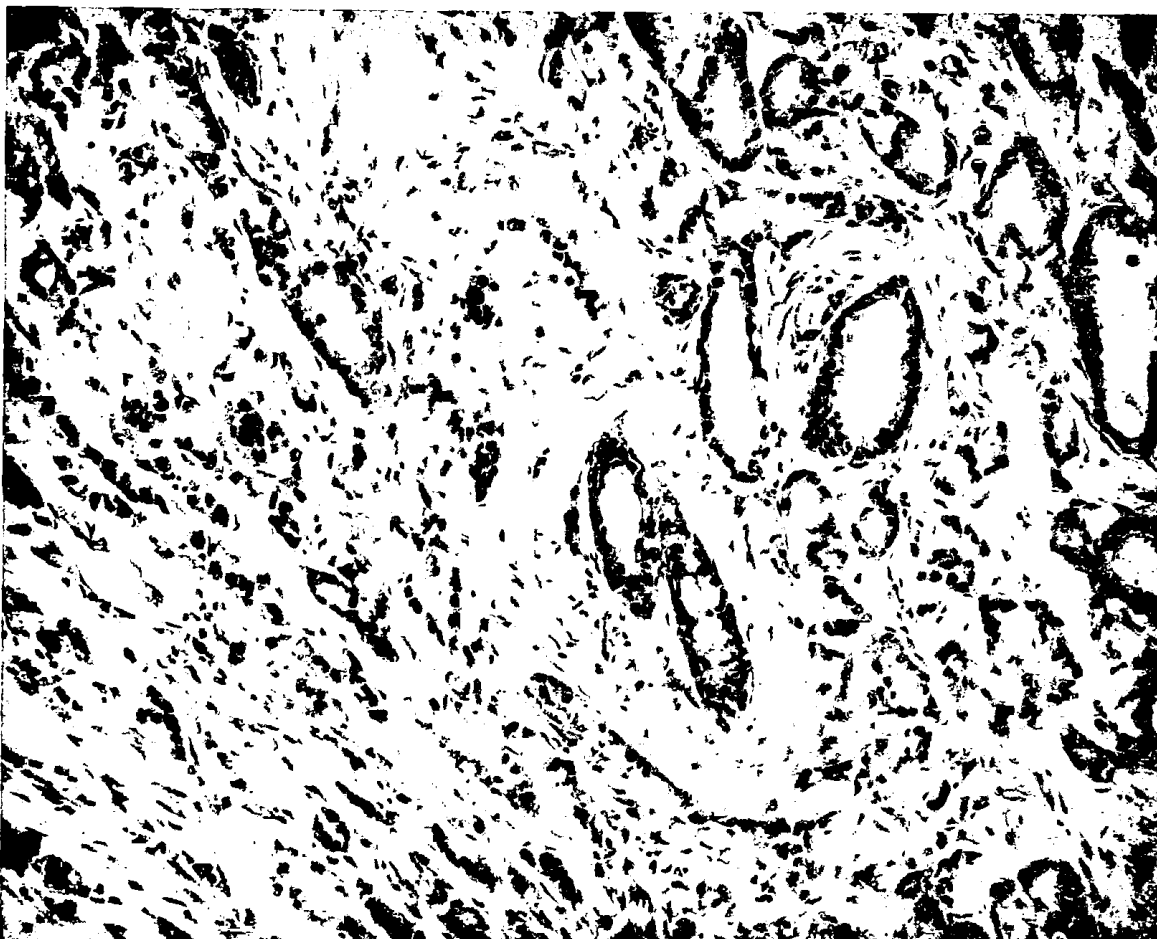


Εικόνα 1:

Πορογενές διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού σωληνώδους τύπου.

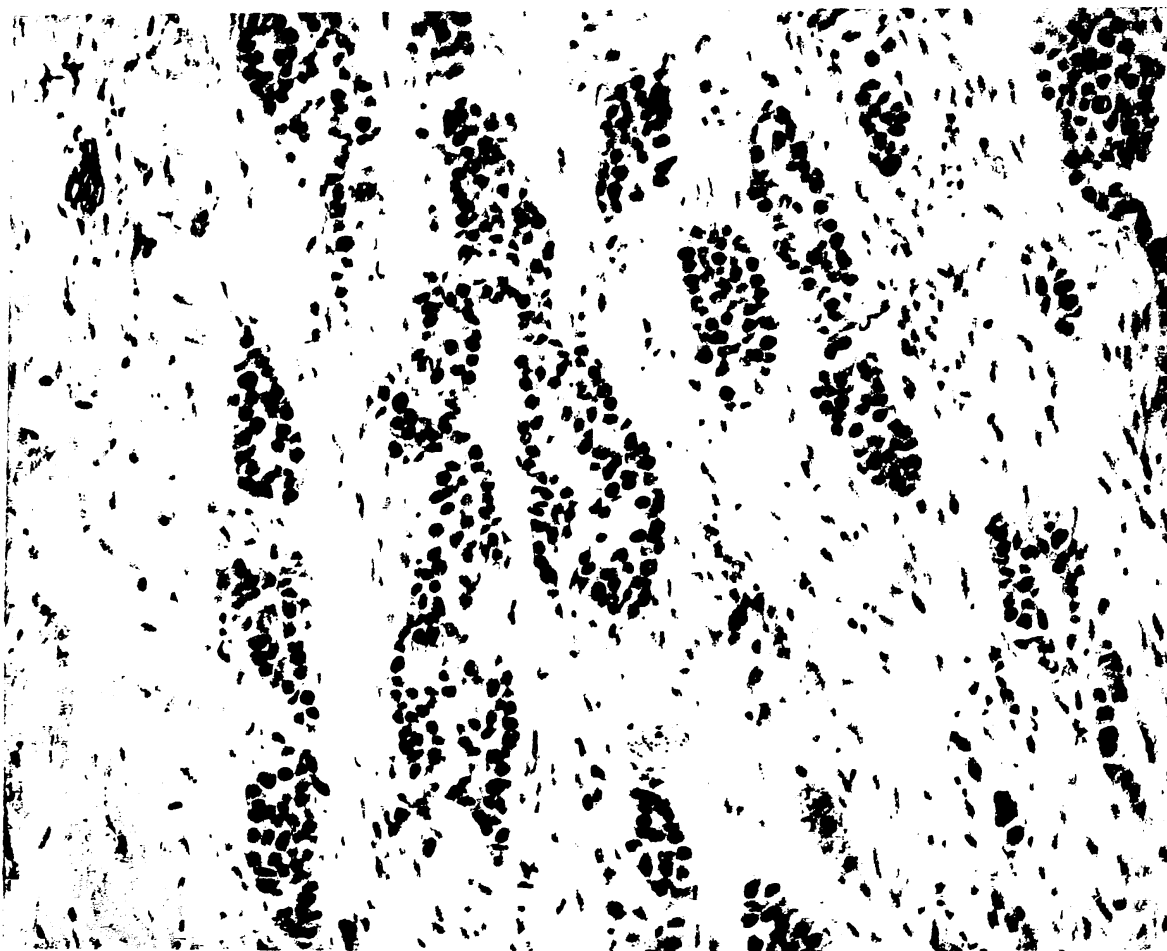
Όλα σχεδόν τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν έντονη πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.





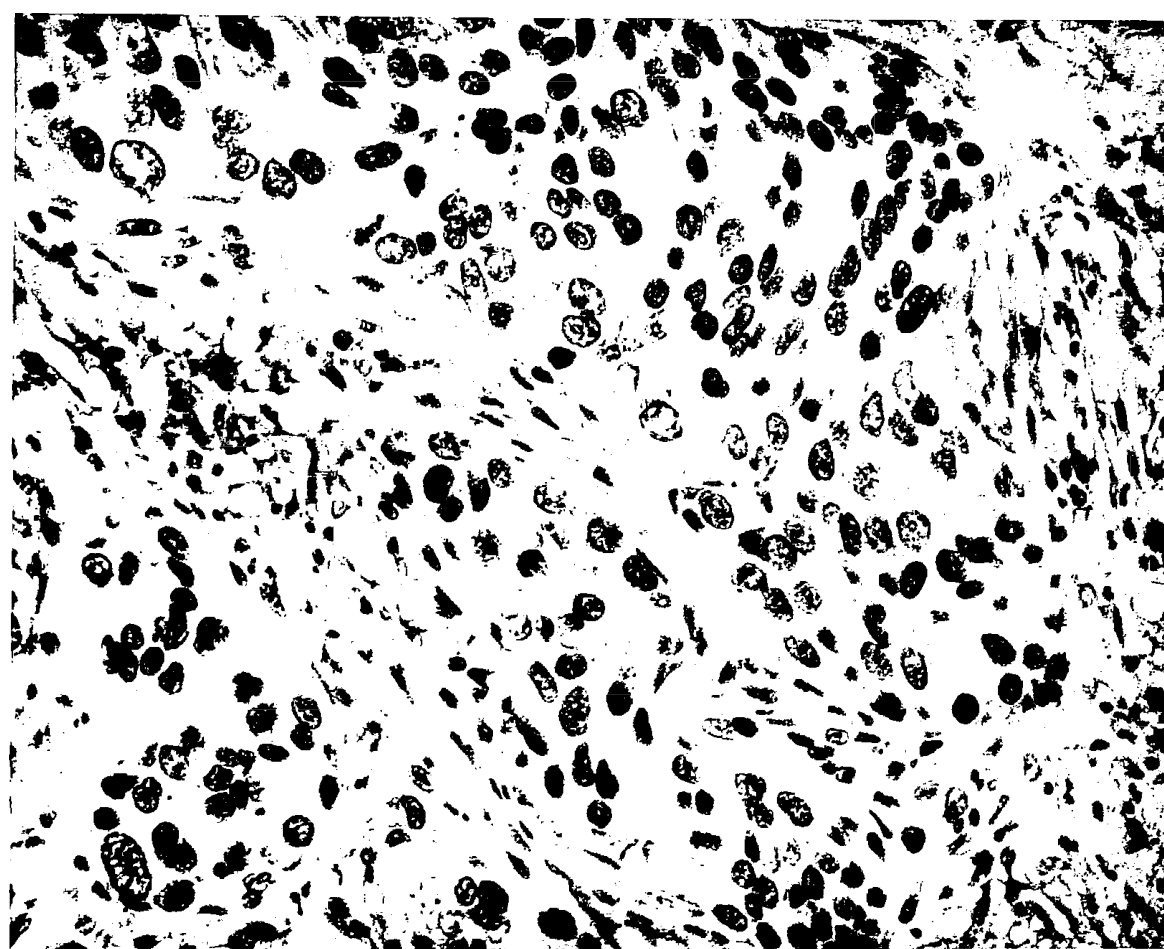
Εικόνα 2:

Πορογενές διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade I.  
Τα περισσότερα από τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν έντονα την πυρηνική εντόπιση της προθυμόσινης-α.



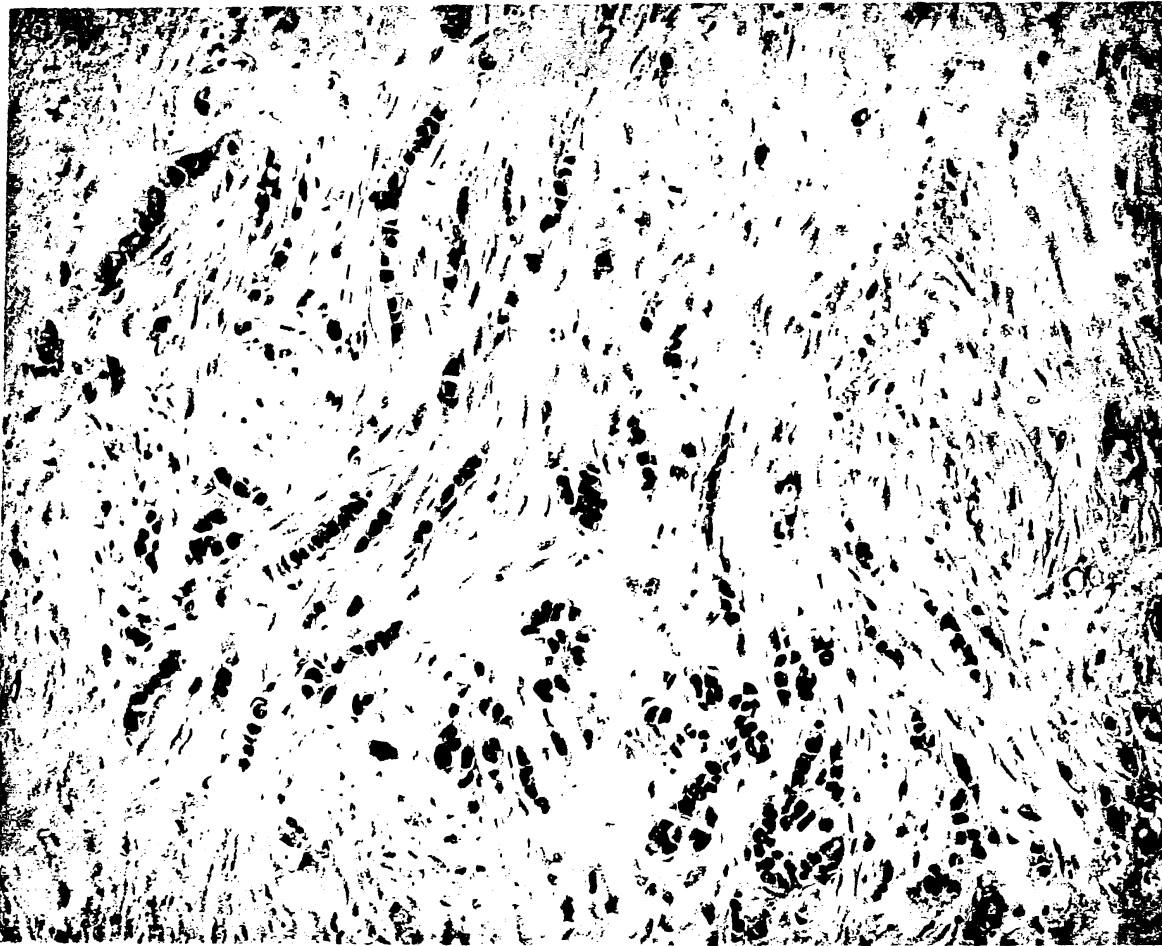
Εικόνα 3:

Πορογενές διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade II. Παρατηρείται εκτεταμένη και έντονη πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α στα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 4:

Πορογενές διηθητικό αδenoκαρκίνωμα μαστού μη ειδικού τύπου grade III (με πυρηνική ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα, στο δεξιό άνω μισό της εικόνας). Όλα σχεδόν τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν έντονη πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 5:

Καλά διαφοροποιημένο λοβιακό διηθητικό αδενοκαρκίνωμα grade I.

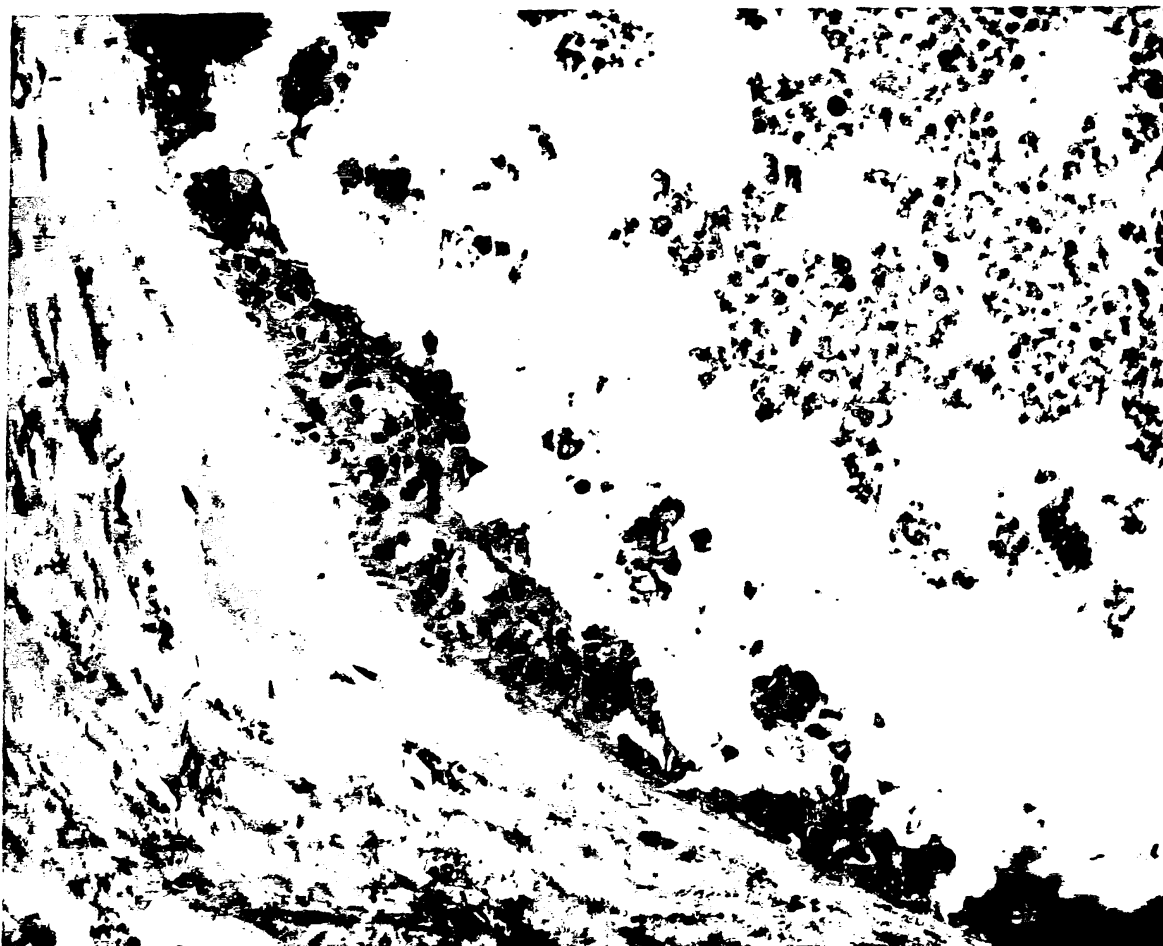
Η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων παρουσιάζει έντονη πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 6:

Πορογενές μη διηθητικό (in situ) αδenoκαρκίνωμα, ηθμοειδούς τύπου, χωρίς κυτταρική ατυπία (grade I).

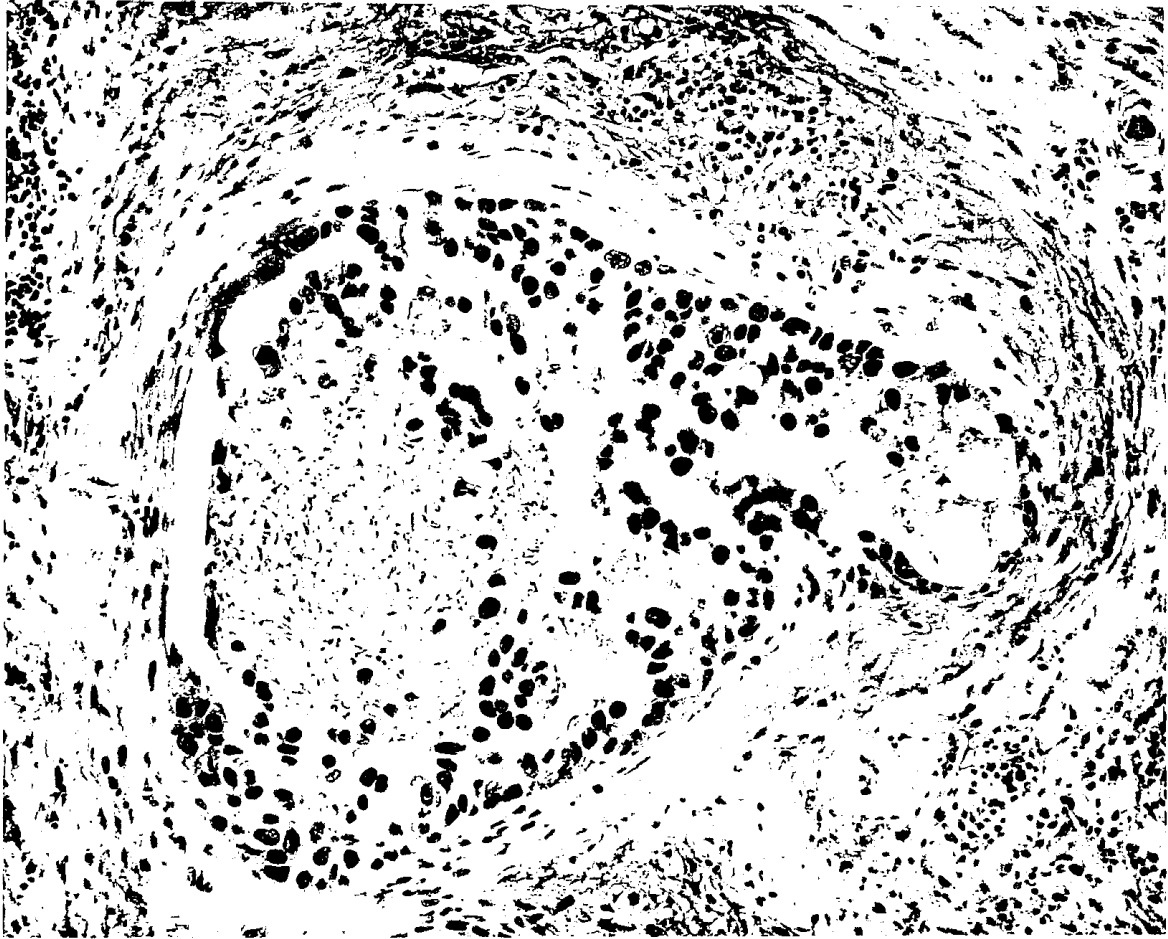
Το νεόπλασμα αυτό παρουσιάζει πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 7:

Πορογενές μη διηθητικό (in situ) αδenoκαρκίνωμα του μαστού, μικροθηλώδους τύπου, με πηρυνική ατυπία (grade II) και κεντρική νέκρωση (comedo).

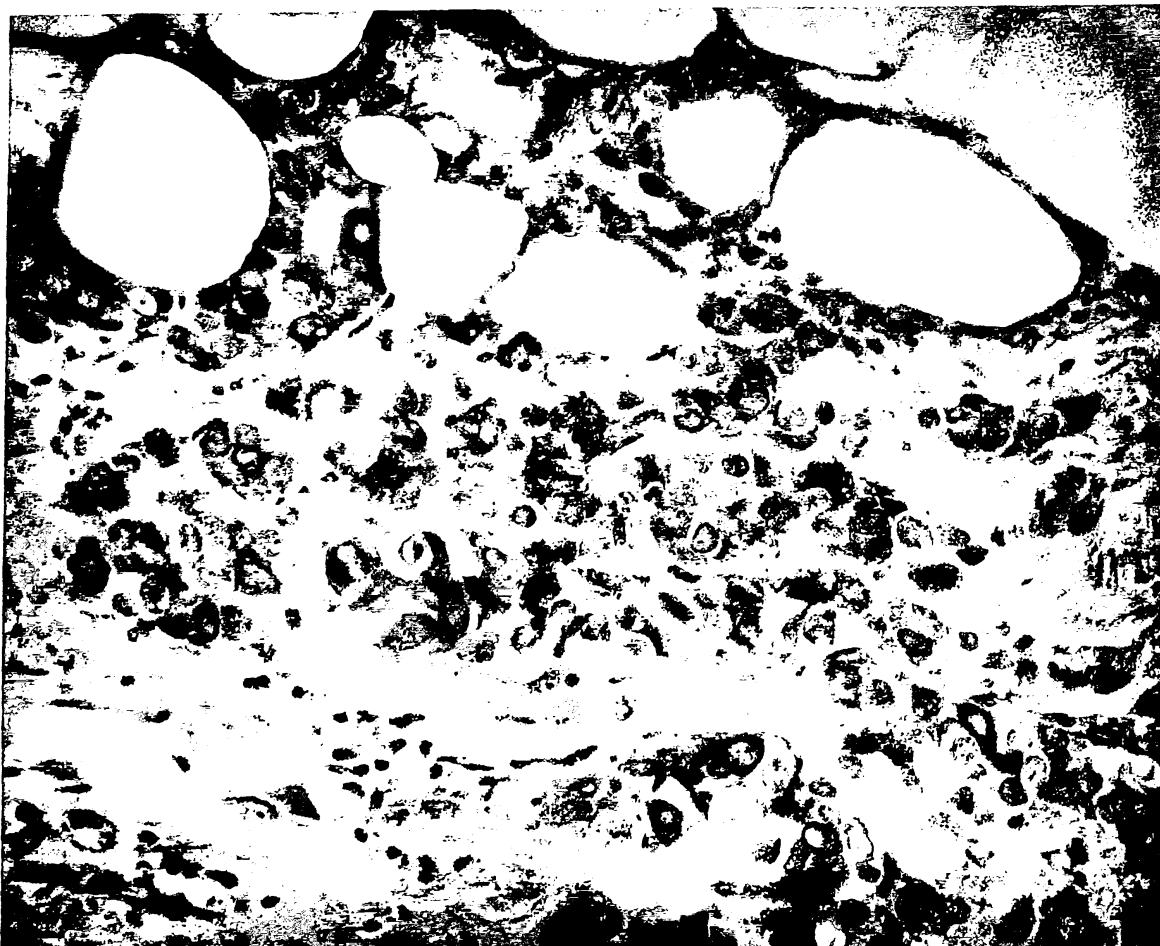
Τα κύτταρα του καρκινώματος παρουσιάζουν έντονη πηρυνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 8:

Πορογενές μη διηθητικό (in situ) αδenoκαρκίνωμα του μαστού, με κεντρική νέκρωση και κυτταρική ατυπία (comedo-grade III).

Το καρκίνωμα αυτό παρουσιάζει επίσης πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α. Μερικά από τα λεμφοκύτταρα που περιβάλλουν τον πόρο φαίνονται και αυτά να εκφράζουν την προθυμοσίνη-α στον πυρήνα τους.



Εικόνα 9:

Πορογενές διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade II. Τα κύτταρα του νεοπλάσματος φαίνεται πως παρουσιάζουν πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης-α.

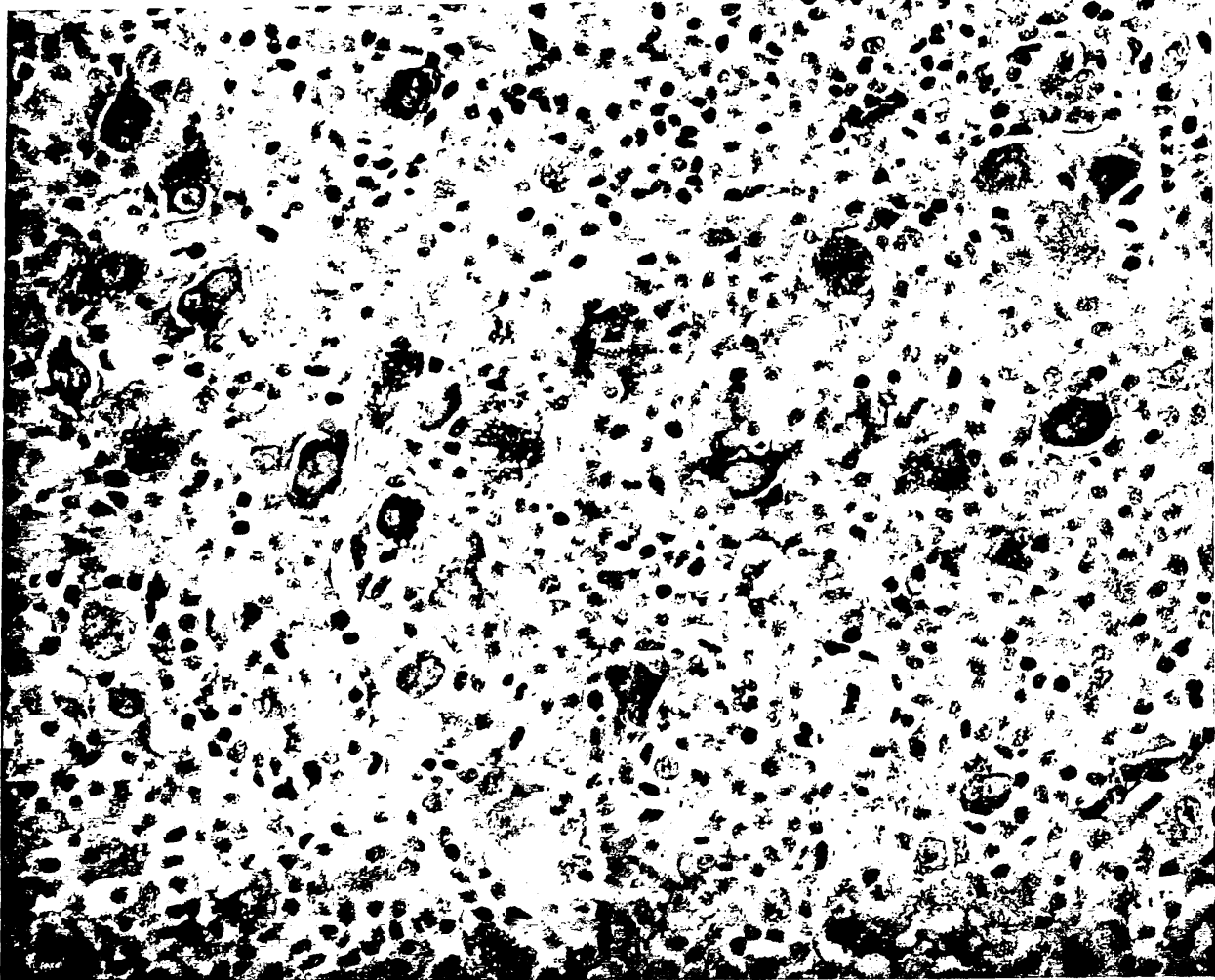




Εικόνα 10:

Πορογενές διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade II.

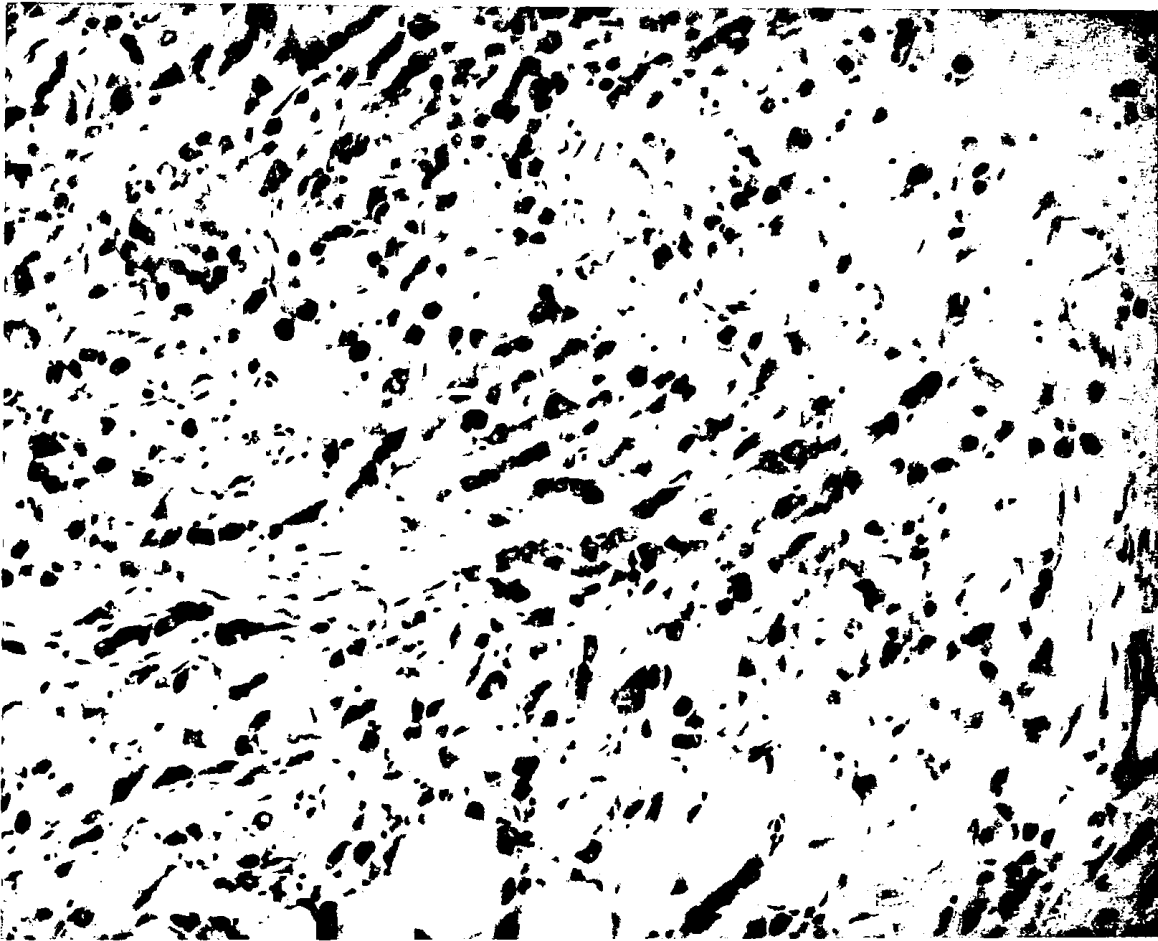
Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης-α, ενώ τα περισσότερα από τα επιθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού πόρου που φαίνεται στο κέντρο της εικόνας παρουσιάζουν πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 11:

Διάσπαρτα μεταστατικά κύτταρα σε λεμφαδένα από ένα πορογενές διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade III.

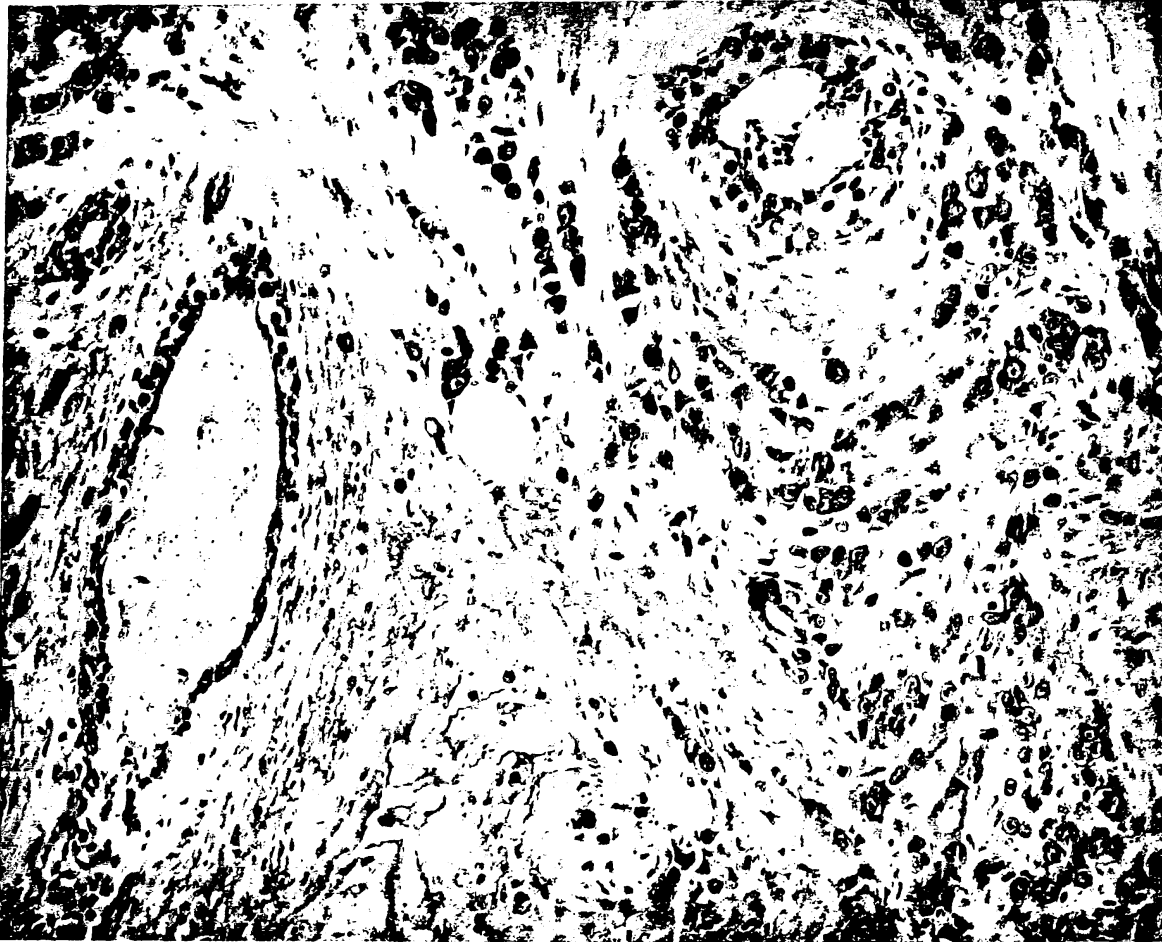
Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 12:

Λοβιακό διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού grade II.

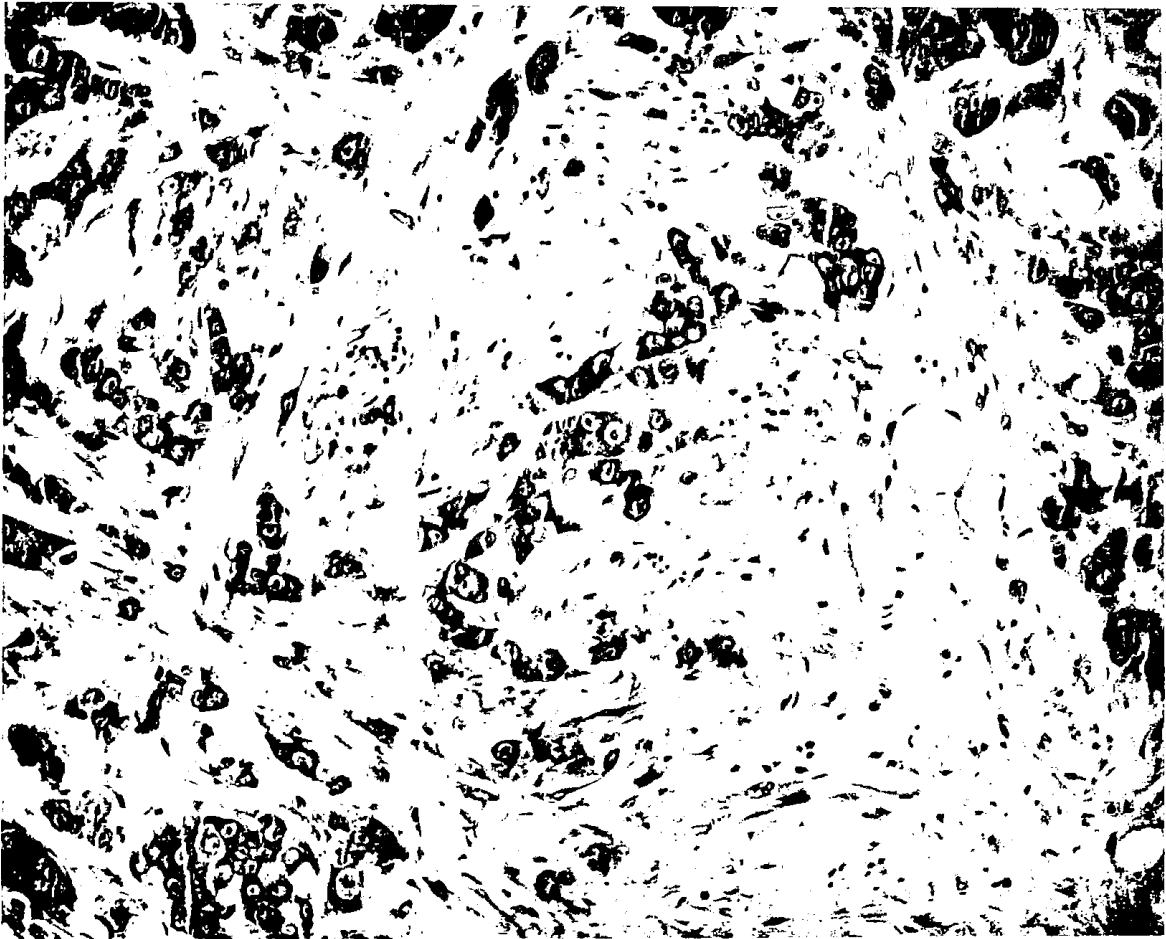
Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μετρίου βαθμού έκφραση της προθυμοσίνης-α στο πρωτόπλασμα της.



Εικόνα 13:

Λοβιακό διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού grade II.

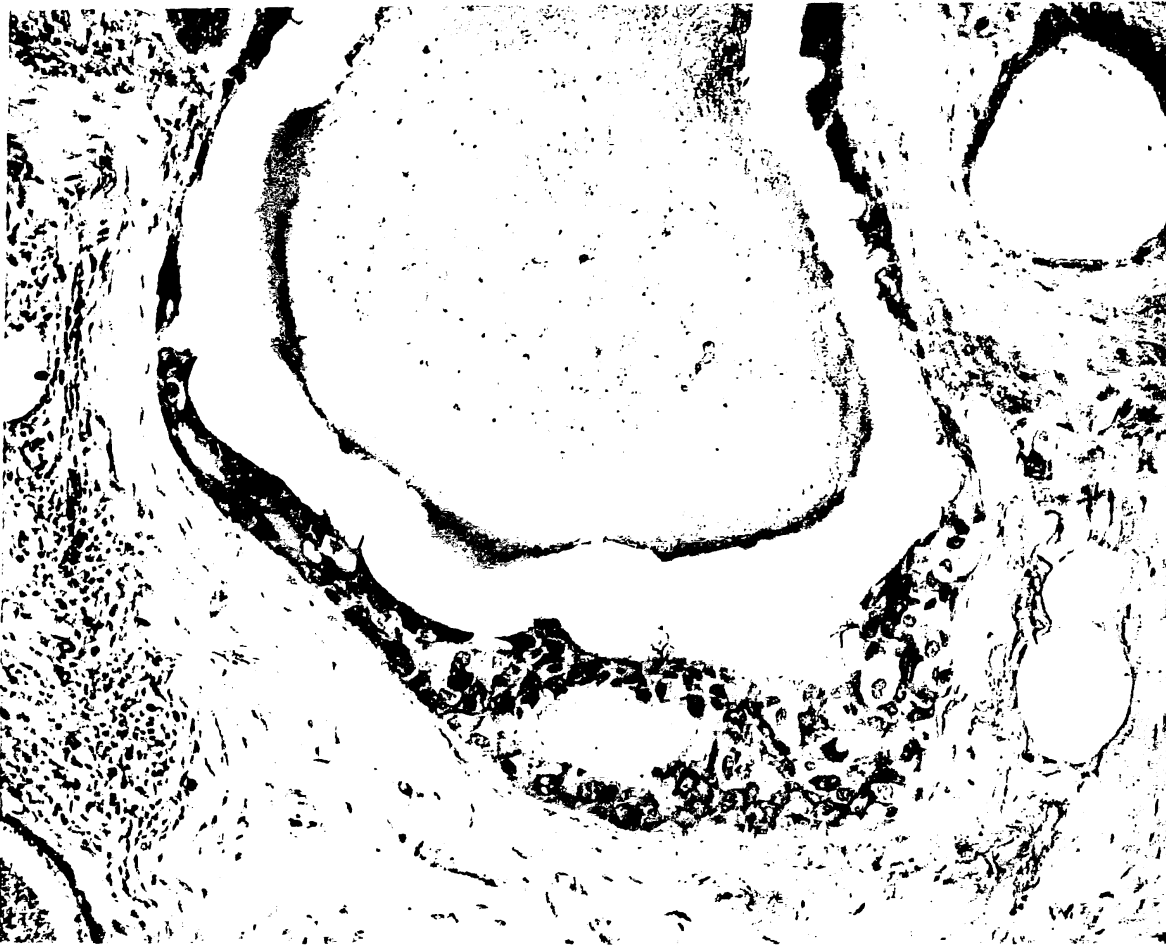
Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μέτρια πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης-α, ενώ ο φυσιολογικός πόρος που φαίνεται αριστερά της εικόνας παρουσιάζει πυρηνική έκφραση των κύτταρων του.



Εικόνα 14:

Αναπλαστικό λοβιακό διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού grade III.

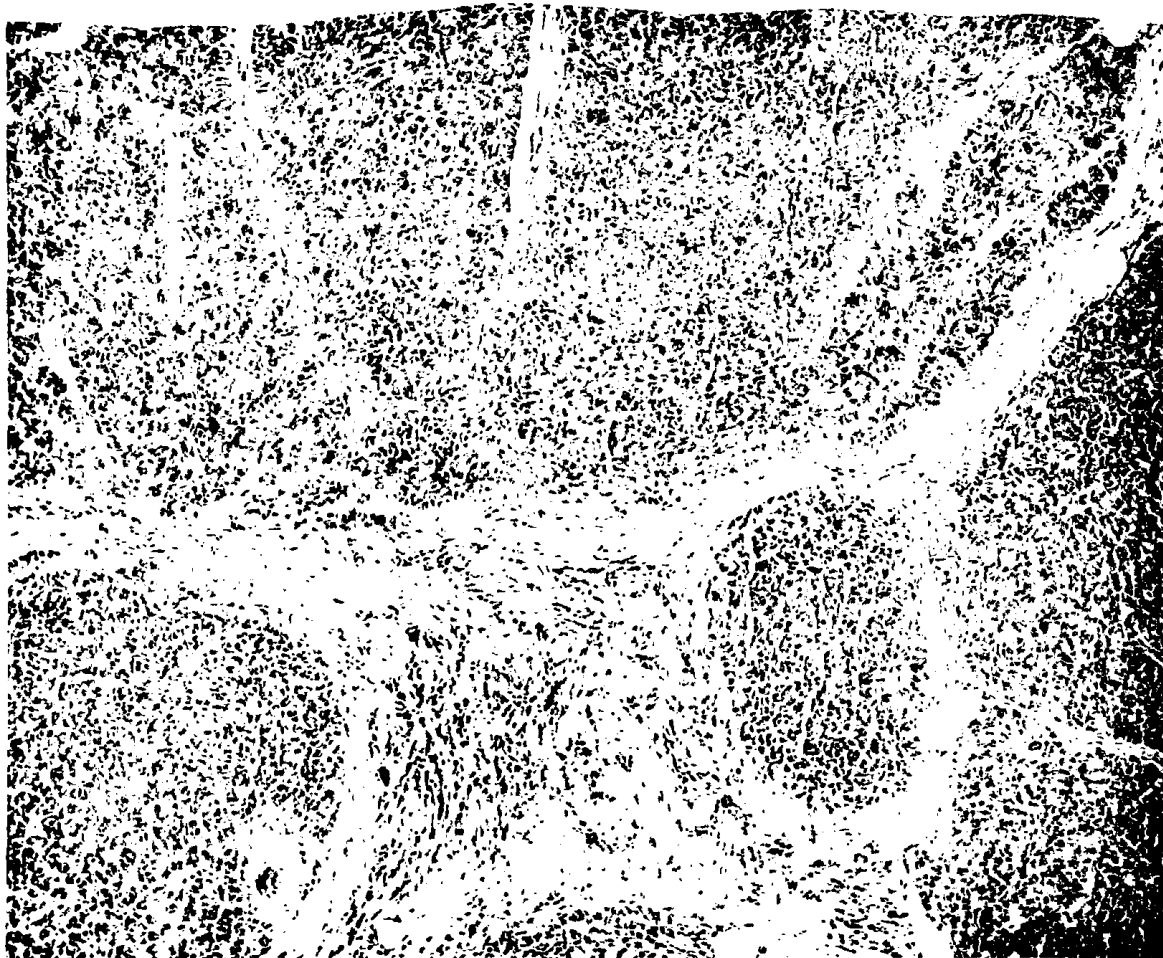
Τα κύτταρα του νεοπλάσματος εκφράζουν έντονα την κυτταροπλασματική χρώση της προθυμοσίνης-α.



Εικόνα 15:

Πορογενές μη διηθητικό (in situ) αδενοκαρκίνωμα του μαστού τύπου comedo (grade III).

Τα κύτταρα του καρκινώματος παρουσιάζουν πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης-α, ενώ τα κύτταρα των φυσιολογικών πόρων (άνω δεξιά- κάτω αριστερά) παρουσιάζουν πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης-α όσο και μερικά από τα λεμφοκύτταρα στο αριστερό άκρο της εικόνας.



Εικόνα 16:

Πορογενές διηθητικό αδenoκαρκίνωμα του μαστού μη ειδικού τύπου grade III. Όλα σχεδόν τα κύτταρα του όγκου είναι αρνητικά σε οποιασδήποτε εντόπιση έκφραση της προθυμοσίνης-α. Σποραδικά μόνο κύτταρα εκφράζουν πρωτοπλασματική έκφραση, σε αντίθεση με την σαφή έκφραση της προθυμοσίνης-α στα φλεγμονώδη κύτταρα (ιστιοκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα, λεμφοκύτταρα) στο κέντρο της εικόνας.

## 2. ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Πίνακας 6: Σύνολο υλικού ανα grade και τύπο

Grade και τύπος	Αριθμός περιπτώσεων
Grade I	33
1. μη ειδικού τύπου	20
2. ειδικού τύπου	10
α. σωληνώδη	8
β. ηθμοειδή	1
γ. θηλώδη	1
3. λοβιακά	3
Grade II	56
1. πορογενή μη ειδικού τύπου	48
2. πορογενή ειδικού τύπου (βλεννώδη)	2
3. λοβιακά	6
Grade III	51
1. πορογενή μη ειδικού τύπου	46
2. πορογενή ειδικού τύπου (μυελοειδή)	4
3. λοβιακά	1
In situ	10
1. πορογενή	10
α. comedo	5
β. non comedo	5

Πίνακας 7: Συσχέτιση διαμέτρου (T) και λεμφαδενικών μεταστάσεων (N):

Διάμετρος (T)	Αρ. Λεμφαδένων (N)	Αρ. περιπτώσεων
≤2cm 65 περιπτώσεις	0	44
	1-3	12
	≥4	9
>2cm 75 περιπτώσεις	0	21
	1-3	32
	≥4	22





**Πίνακας 8:** Συσχέτιση βαθμού κακοήθειας (grade) με τη διάμετρο (T) του όγκου:

Grade	Αρ. περιπτώσεων	<=2	>2
I	33	28	5
II	56	27	29
III	51	10	41

**Πίνακας 9:** Παρακολούθηση ( follow up):

Grade	Περιπτώσεις	Υποτροπές	θάνατοι	Χρόνια παρακολούθησης
Grade I	33	5 (11 χρόνια)	0	1-15 χρόνια
Grade II	56	6 (5 χρόνια)	2	1-10 χρόνια
Grade III	51	12 (5 χρόνια)	5	1-15 χρόνια
In situ	10	1 (τοπική)	0	5-6 χρόνια

**Πίνακας 10:**

Υποτροπές ανά Grade		
	Τοπικές	Άλλα όργανα
Grade I	2 + λεμφαδένες μασχάλης	3 (οστά, ήπαρ, σύνθετη)
Grade II	1	5 (οστά, ήπαρ, ωθήκη, σύνθετη)
Grade III	3	9 (οστά, ήπαρ, πνεύμονας, εγκέφαλος, ωθήκη, σύνθετη)

**Πίνακας 11:** Κατανομή χρώσης και grade.

Grade και κατανομή	Αριθμός περιπτώσεων
Grade I	33
1. πυρηνική	24
2. περιπυρηνική	1
3. κυτταροπλασματική	5
4. μικτή	2
5. αρνητική	1
Grade II	56
1. πυρηνική	28
2. περιπυρηνική	5
3. κυτταροπλασματική	18
4. μικτή	2



5. αρνητική	3
Grāde III	51
1. πυρηνική	10
2. περιπυρηνική	4
3. κυτταροπλασματική	28
4. μικτή	6
• 5. αρνητική	3
In situ	10
1. πυρηνική	5
2. περιπυρηνική	0
3. κυτταροπλασματική	4
4. μικτή	1
5. αρνητική	0

**Πίνακας 12:** Δεν περιλαμβάνονται 21 περιπτώσεις με μικτή ή πυρηνική χρώση:

Κατανομή Προθυμοσίνης		
Τύπος Καρκινώματος	Πυρηνική	Πρωτοπλασματική
Πορογενή NST	44	43
Πορογενή ειδικού τύπου:		
Σωληνώδη	8	0
Ηθμοειδή	1	0
Βλεννώδη	1	1
Θηλώδη	1	0
Μυελοειδή	0	3
Λοβιακά	6	4
In situ Πορογενή	5	4
Σύνολο:	66	55

**Πίνακας 13 :**

Θυμοσίνη Σύνολο 121	Θυμοσίνη και οιστρογόνα	Θυμοσίνη και οιστογόνα/Grade
Πυρηνική: 66	Πυρηνική: 35	Grade I: 17 Grade II: 18 Grade III: 0
Πρωτοπλασματική: 55	Πρωτοπλασματική: 18	Grade I: 3 Grade II: 8 Grade III: 7



ΠΙΝΑΚΑΣ 14: ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΈΡΕΥΝΑΣ: ΣΥΝΟΛΟ ΠΑΛΗΘΗΣΜΟΥ (N=150)

Ιστοτύπος	μ.δ. Όγκου	Grade	Λεμφαδένες	ER	PT	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ
Πορογενή	<2 70 (46,7%)	I 33 (22%)	0 75 (50%)	Όχι 83 (55,3%)	Πυρηνική χρώση	Τοπική 6
Λοβιακά	>2 80 (53,3%)	II 56 (37,3%)	1- 44 (29,3%)	Ναι 66 (44%)	Πρωτοπλασματική χρώση	Υποτροπή (4,7%) Μετάσταση (11,3%)
Καλής πρόγνωσης In Situ	16 (10,7%)	III 51 (34%)	>4 31 (20,7%)	χ.κ. 1 (0,7%)	Άλλη χρώση	Θάνατος (4,7%)
	10 (6,7%)	χ.κ. 10 (6,7%)			χ.κ.	χ.κ. 120 (80%)

ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΈΡΕΥΝΑΣ: ΕΞΑΙΡΕΣΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ (N=37)

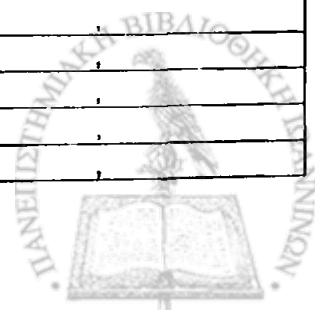
Ιστοτύπος	μ.δ. Όγκου	Grade	Λεμφαδένες	ER	PT	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ
Πορογενή	<2 16 (43,2%)	I 4 (10,8%)	0 23 (62,2%)	Όχι 23 (62,2%)	Πυρηνική χρώση	Τοπική 3 (8,1%)
Λοβιακά	>2 21 (56,8%)	II 10 (27%)	1- 7 (18,9%)	Ναι 13 (35,1%)	Πρωτοπλασματική χρώση	Υποτροπή (2,7%) Μετάσταση (2,7%)
Καλής πρόγνωσης In Situ	1 (2,7%)	III 13 (35,1%)	>4 7 (18,9%)	χ.κ. 1 (2,7%)	Άλλη χρώση	Θάνατος (10,8%)
	10 (27%)	χ.κ. 10 (27%)			χ.κ.	χ.κ. 33 (89,2%)

ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΈΡΕΥΝΑΣ: ΤΕΛΙΚΟΣ ΠΑΛΗΘΗΣΜΟΣ ΈΡΕΥΝΑΣ (N=113)

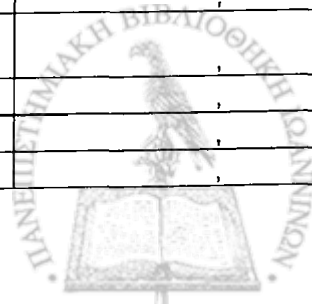
Ιστοτύπος	μ.δ. Όγκου	Grade	Λεμφαδένες	ER	PT	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ
Πορογενή	<2 54 (47,8%)	I 29 (25,7%)	0 52 (46%)	Όχι 60 (53,1%)	Πυρηνική χρώση	Τοπική 3 (2,7%)
Λοβιακά	>2 59 (52,2%)	II 46 (40,7%)	1- 37 (32,7%)	Ναι 53 (46,9%)	Πρωτοπλασματική χρώση	Υποτροπή (2,7%) Μετάσταση (14,2%)
Καλής πρόγνωσης	15 (13,3%)	III 38 (33,6%)	>4 31 (21,2%)			Θάνατος (6,2%)
						χ.κ. 87 (77%)

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

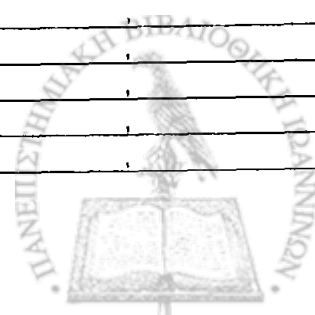
Α/Α	Ιστίοτυπος	μδ	grade	μεταστάσεις	ER	PT	ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ
1	NST	<2	II	1-3	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
2	NST	>2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
3	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
4	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
5	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
6	NST	>2	III	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΗ
7	IN SITU ΠΟΡΩΝ	>2	,	0	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
8	NST	<2	II	>4	ΟΧΙ	ΑΛΛΟ	,
9	NST	>2	III	0	ΝΑΙ	,	,
10	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	III	1-3	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
11	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
12	NST	>2	III	0	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΗ
13	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	,
14	ΛΟΒΙΑΚΟ	<2	I	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
15	NST	>2	III	1-3	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
16	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	>2	II	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
17	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
18	NST	>2	II	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
19	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
20	IN SITU ΠΟΡΩΝ	<2	,	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
21	NST	>2	III	>4	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
22	NST	>2	I	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
23	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
24	NST	>2	III	1-3	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
25	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
26	NST	>2	III	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
27	ΛΟΒΙΑΚΟ	<2	II	0	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
28	NST	>2	III	1-3	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
29	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
30	IN SITU ΠΟΡΩΝ	>2	,	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
31	NST	<2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
32	NST	<2	III	>4	ΟΧΙ	,	,
33	NST	>2	III	0	ΟΧΙ	ΑΛΛΟ	,
34	NST	>2	III	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
35	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
36	IN SITU ΠΟΡΩΝ	>2	,	0	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	,
37	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
38	NST	<2	III	1-3	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
39	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	>2	III	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
40	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
41	NST	>2	III	1-3	ΝΑΙ	,	,
42	ΛΟΒΙΑΚΟ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
43	NST	>2	III	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	,
44	IN SITU ΠΟΡΩΝ	<2	,	0	ΟΧΙ	ΑΛΛΟ	,



45	NST	<2	II	1-3	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
46	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
47	NST	>2	I	0	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
48	NST	<2	I	0	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
49	NST	>2	III	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
50	NST	>2	II	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
51	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
52	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
53	ΛΟΒΙΑΚΟ	<2	II	>4	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
54	NST	>2	II	1-3	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
55	IN SITU ΠΟΡΩΝ	<2	,	0	OXI	ΑΛΛΟ	
56	NST	<2	I	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
57	NST	>2	III	1-3	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
58	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
59	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
60	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	
61	NST	>2	II	1-3	OXI	ΑΛΛΟ	
62	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
63	NST	<2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
64	IN SITU ΠΟΡΩΝ	>2	,	0	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
65	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	I	1-3	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΠΗ
66	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
67	NST	>2	II	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
68	NST	<2	III	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
69	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	>2	III	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
70	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
71	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
72	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
73	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	II	1-3	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
74	NST	<2	III	>4	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
75	IN SITU ΠΟΡΩΝ	<2	,	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
76	NST	<2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
77	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΘΑΝΑΤΟΣ
78	NST	<2	I	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
79	NST	>2	II	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
80	NST	>2	II	>4	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
81	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	III	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
82	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
83	NST	<2	I	0	ΝΑΙ		
84	IN SITU ΠΟΡΩΝ	>2	,	0	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
85	NST	>2	III	>4	OXI	ΑΛΛΟ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΠΗ
86	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
87	NST	>2	III	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
88	NST	<2	I	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
89	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	>2	II	>4	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
90	NST	>2	III	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
91	IN SITU ΠΟΡΩΝ	<2	,	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
92	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	



93	NST	<2	III	>4	OXI	ΑΛΛΟ	
94	NST	>2	III	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
95	NST	<2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
96	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	II	1-3	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
97	NST	>2	III	>4	OXI	ΑΛΛΟ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
98	NST	<2	II	0	OXI		
99	NST	>2	I	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
100	NST	>2	III	0	OXI	ΑΛΛΟ	
101	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
102	•NST	<2	III	0		ΑΛΛΟ	
103	NST	>2	III	>4	ΝΑΙ		
104	NST	<2	II	1-3	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΗ
105	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
106	NST	>2	III	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
107	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	>2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
108	NST	>2	III	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
109	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	
110	NST	>2	III	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
111	GOOD PROGNOSIS	>2	III	0	OXI	ΑΛΛΟ	
112	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
113	ΛΟΒΙΑΚΟ	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
114	NST	>2	III	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
115	NST	>2	II	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
116	NST	<2	I	1-3	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	ΤΟΠΙΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΗ
117	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
118	NST	<2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
119	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
120	NST	>2	III	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
121	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
122	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
123	NST	>2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
124	ΚΑΛΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΗΣ	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
125	NST	>2	II	>4	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
126	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	
127	NST	>2	II	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
128	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
129	NST	>2	III	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
130	NST	<2	I	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
131	NST	<2	II	1-3	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
132	NST	>2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
133	NST	<2	III	>4	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
134	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
135	NST	>2	II	1-3	OXI	ΑΛΛΟ	
136	NST	<2	II	0	OXI	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
137	NST	>2	III	0	OXI	ΑΛΛΟ	
138	NST	>2	II	0	OXI		
139	NST	<2	II	>4	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	
140	NST	>2	III	0	OXI	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	



141	NST	>2	II	1-3	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ
142	NST	<2	I	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
143	NST	>2	III	0	ΝΑΙ		
144	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
145	NST	<2	II	0	ΟΧΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
146	NST	>2	II	1-3	ΝΑΙ	ΑΛΛΟ	
147	NST	>2	II	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
148	NST	<2	II	0	ΝΑΙ	ΠΥΡΗΝΙΚΗ	
149	NST	>2	II	1-3	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	
150	NST	<2	III	>4	ΟΧΙ	ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ	

: Περιπτώσεις που εξαιρέθηκαν



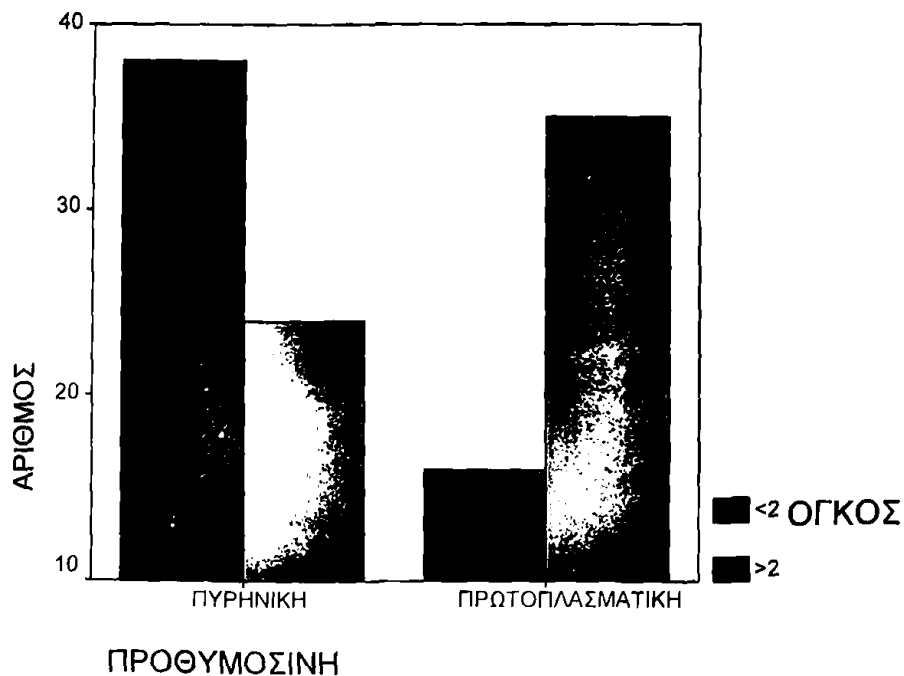
### 3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

#### ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΡΤ ΣΤΙΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΟΓΚΟΥ, GRADE, ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ, ΕΡ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ (N=113)

##### 1. Επίδραση προθυμοσίης στην μ.δ. όγκου

Η πρωτοπλασματική χρώση εμφανίζει μεγαλύτερη μ.δ. όγκου σε σύγκριση με την πυρηνική χρώση. Με μέτρηση κατεύθυνσης Somer's d διαπιστώθηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση του είδους χρώσης και της μ.δ. του όγκου (Approx.  $T=3,329$ , std. error=0,089,  $p<.01$ )

Γράφημα 1: Επίδραση προθυμοσίης στη μ.δ. όγκου

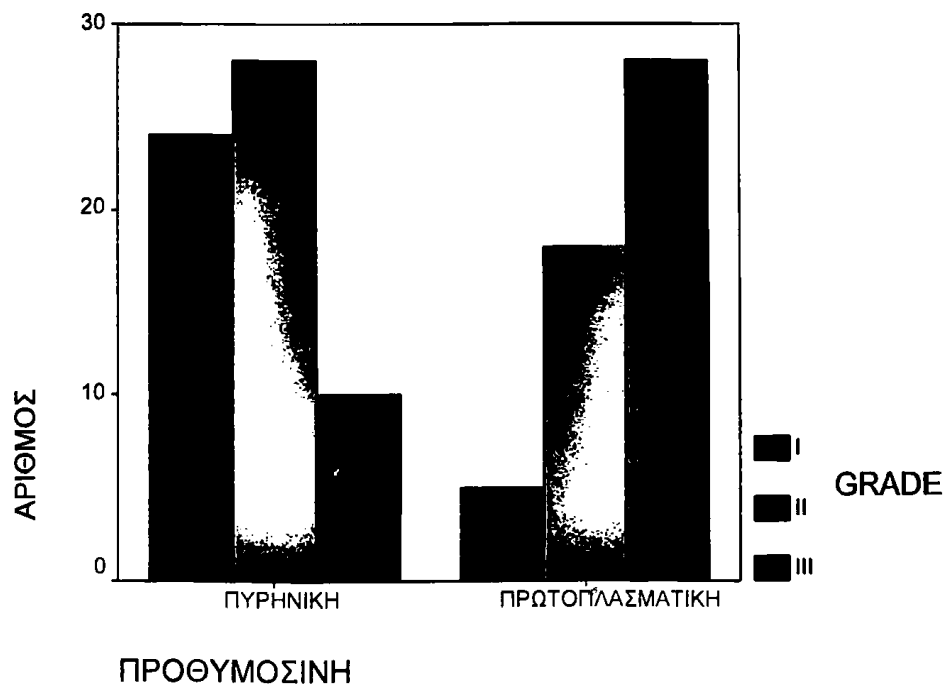




## 2. Επίδραση προθυμοσίης στο επίπεδο Grade

Η πρωτοπλασματική χρώση εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα όσο αυξάνει το Grade και ιδιαίτερα στο Grade III, ενώ η πυρηνική χρώση έχει μεγαλύτερη συχνότητα στο Grade I και II. Με μέτρηση κατεύθυνσης Somer's d διαπιστώθηκε ότι το είδος χρώσης συσχετίζεται με στατιστικά σημαντικό τρόπο με το επίπεδο του Grade (Approx.  $T=5,514$ , std. error=0,087,  $p<.001$ )

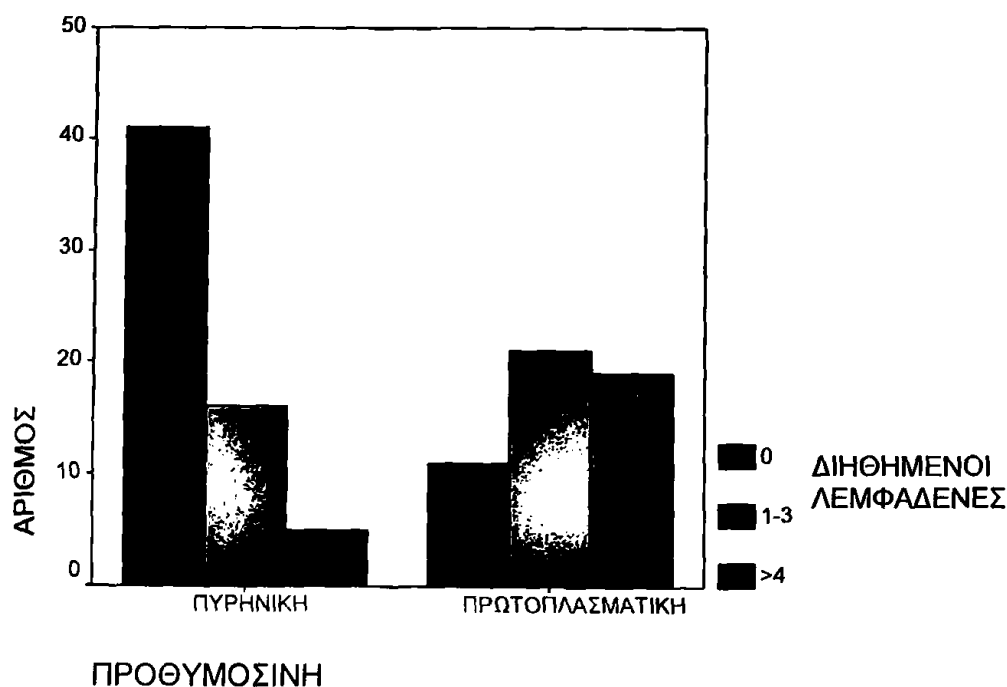
Γράφημα 2: Επίδραση προθυμοσίης στο επίπεδο Grade



### 3. Επίδραση προθυμοσίνης στον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων

Οι μη διηθημένοι λεμφαδένες χαρακτηρίζονται κατά κύριο λόγο από πυρηνική χρώση, ενώ αντίθετα ο αυξημένος αριθμός διηθημένων λεμφαδένων σχετίζεται με την ύπαρξη πρωτοπλασματικής χρώσης. Με μέτρηση κατεύθυνσης Somer's d διαπιστώθηκε ότι το είδος χρώσης συσχετίζεται κατά στατιστικά σημαντικό τρόπο με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων (Approx.  $T=5,911$ , std. error=0,086,  $p<.001$ )

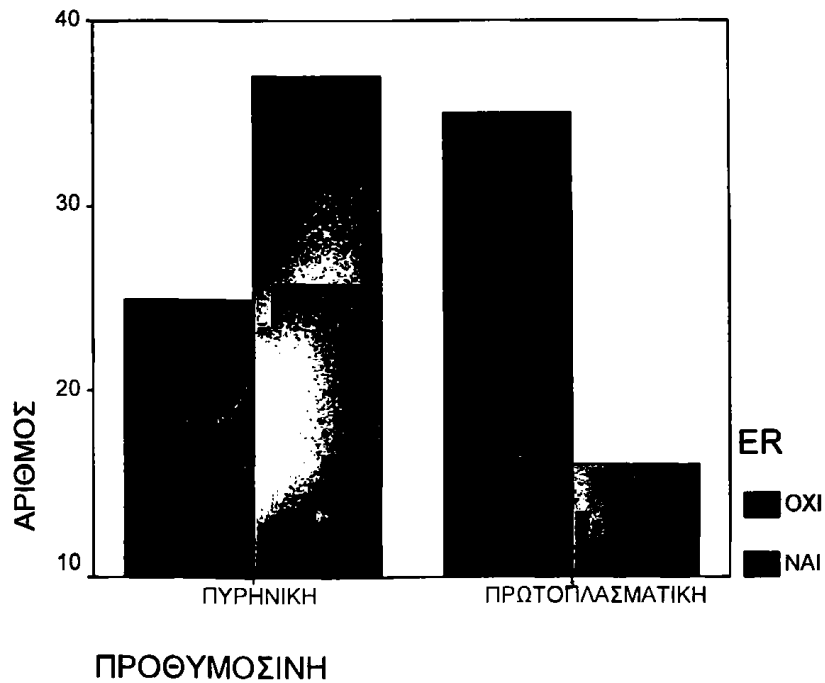
Γράφημα 3: Επίδραση προθυμοσίνης στον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων



#### 4. Επίδραση προθυμοσίης στην ύπαρξη οιστρογόνων (ER)

Η πρωτοπλασματική χρώση χαρακτηρίζεται από έλλειψη οιστρογόνων, ενώ η πυρηνική χρώση εμφανίζεται συχνότερα στις περιπτώσεις ύπαρξης οιστρογόνων. Στατιστική ανάλυση  $\chi^2$  καταδεικνύει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ πυρηνικής και πρωτοπλασματικής χρώσης ως προς την ύπαρξη ή όχι οιστρογόνων ( $\chi^2(1)=9,002, p<.005$ )

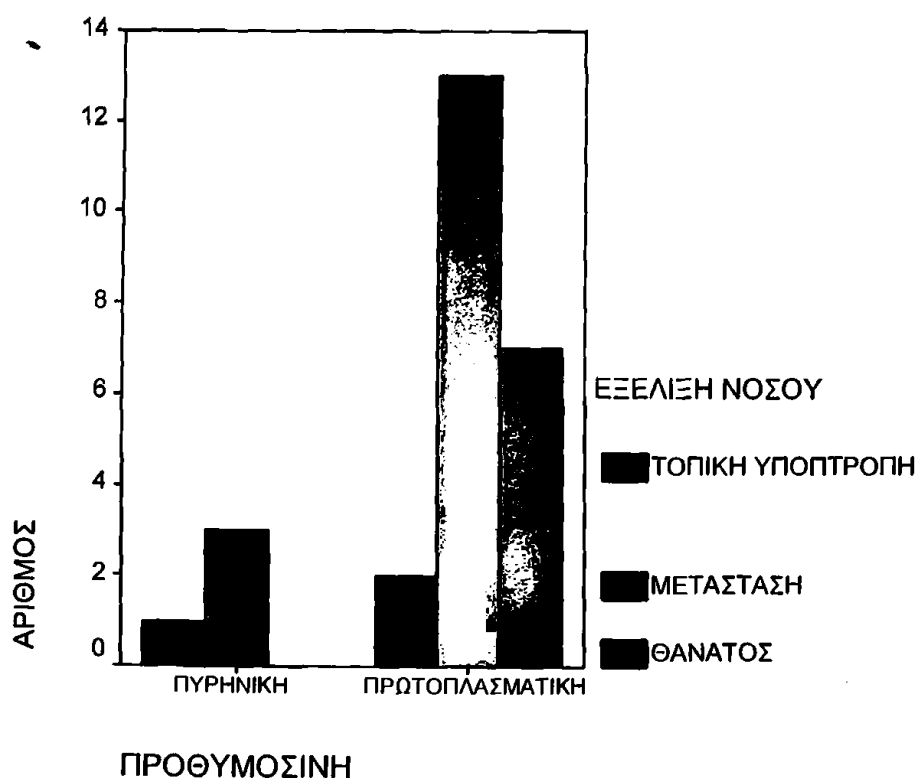
Γράφημα 4: Επίδραση προθυμοσίης στην ύπαρξη οιστρογόνων (ER)



### 5. Επίδραση προθυμοσίνης στην εξέλιξη της νόσου (Παρακολούθηση)

Όπως φαίνεται και στο γράφημα όλες οι περιπτώσεις θανάτου αναφέρονται στην πρωτοπλασματική χρώση, ενώ υπάρχει και σαφής αύξηση του αριθμού των μεταστάσεων σε αυτό το είδος χρώση. Η στατιστική ανάλυση (Συσχέτιση κατεύθυνσης με το κριτήριο Somer's d) ωστόσο δεν μας έδωσε στατιστικά σημαντικές επιδράσεις (Αprox. T=1,689, std. error=0,123,  $p=\mu.σ.σ^1$ ), πιθανότατα λόγω του μικρού αριθμού των αντίστοιχων καταγραφών στο δείγμα [26 περιπτώσεις στο σύνολο των 137 (23%)]

Γράφημα 5: Επίδραση προθυμοσίνης στην εξέλιξη της νόσου (Παρακολούθηση)



<sup>1</sup> μ.σ.σ.=μη στατιστικά σημαντικό

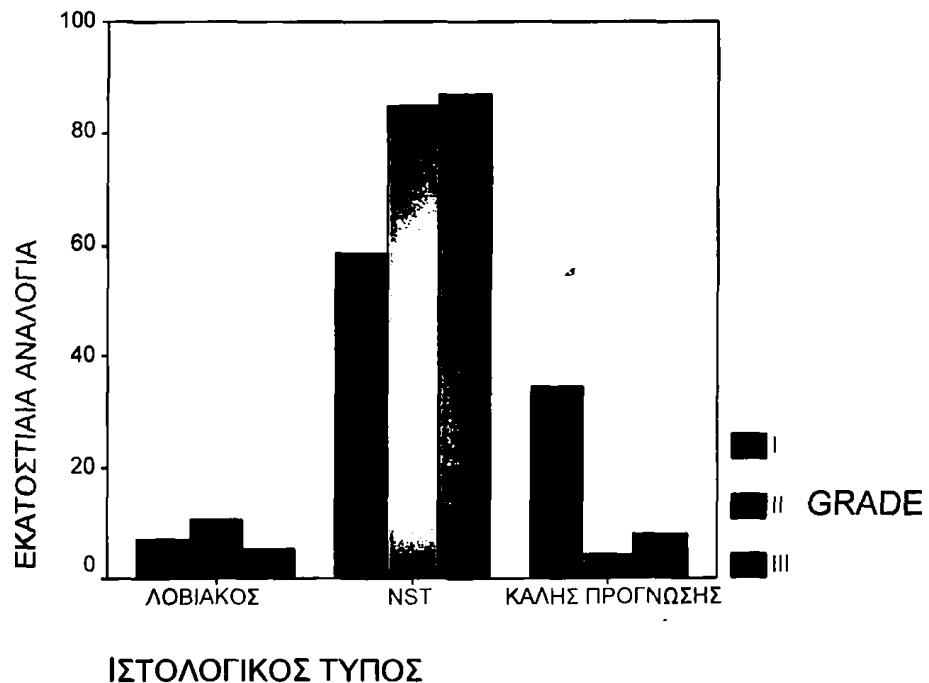


## ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΥΠΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

### 1. Σύγκριση μεταξύ των ιστοτύπων

Όσον αφορά τους ιστοτύπους, είμαστε ιδιαίτερα επιφυλακτικοί όσον αφορά τη μεταξύ τους στατιστική σύγκριση καθώς υπάρχουν πολύ λίγες περιπτώσεις στους ιστοτύπους καλής πρόγνωσης (N=14) και λοβιακό (N=8) και αναλογικά πολύ λιγότερες σε σύγκριση με την ομάδα NST (88). Παρόλα αυτά αναφέρουμε με επιφύλαξη τη μοναδική στατιστικά σημαντική διαφορά που βρέθηκε μεταξύ των ιστοτύπων, ως προς το Grade [F(2,110)=4.904,  $p < 0,01$ ]. Όπως φαίνεται στο γράφημα 1, οι ιστοτύποι με καλή πρόγνωση εμφανίζουν μικρότερο Grade σε σύγκριση με το λοβιακό και πορογενή ιστοτύπο.

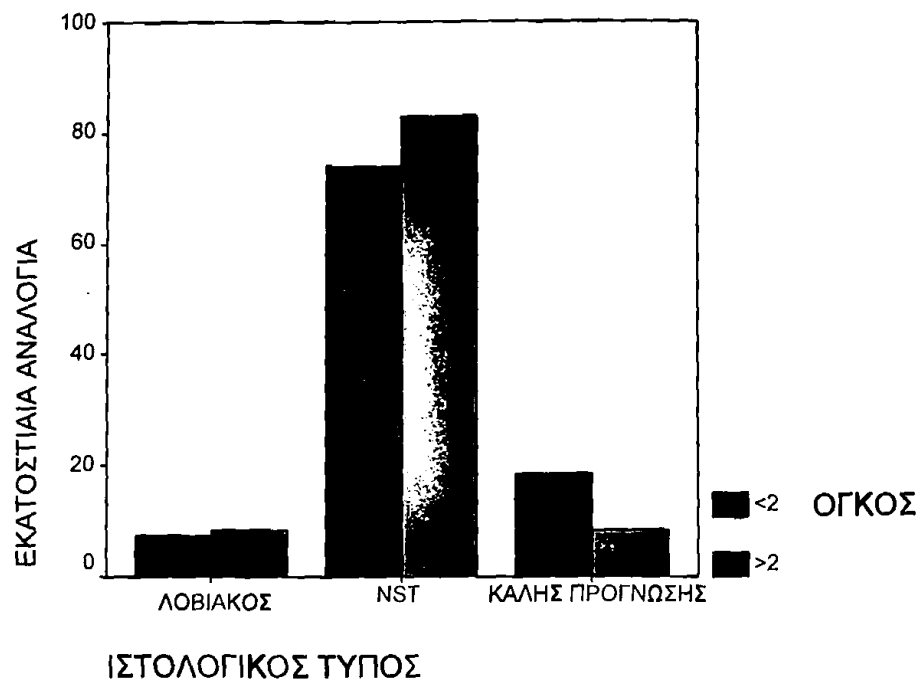
Γράφημα 6: Grade ως προς το είδος ιστοτύπου



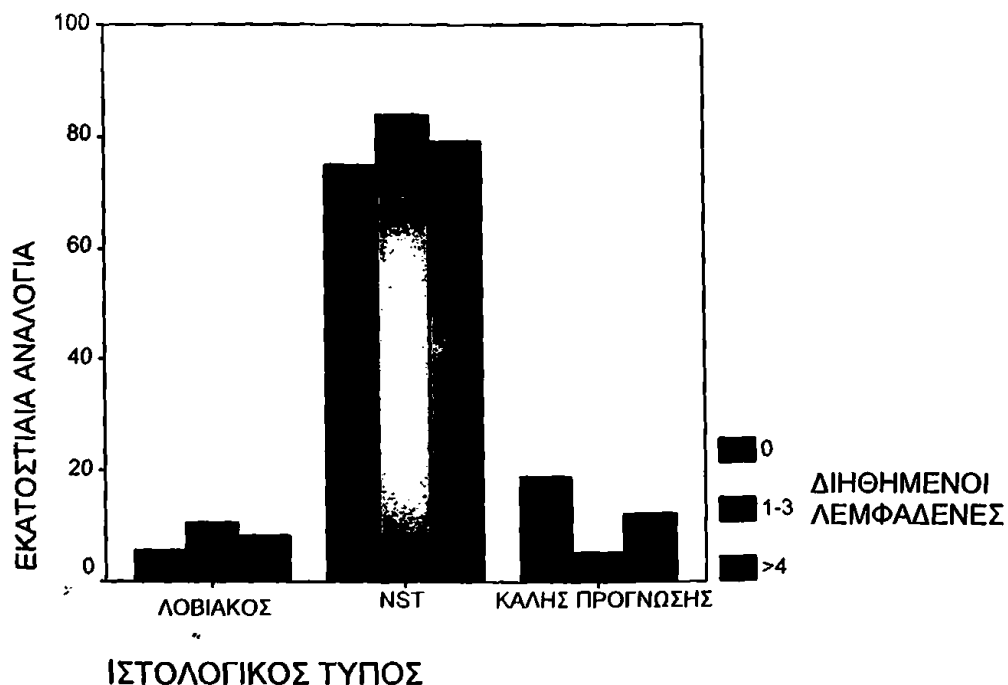
Επίσης οι ιστοτύποι καλής πρόγνωσης έχουν μικρότερη μ.δ. όγκου (γράφημα 2) [F(2,110)=1.230,  $p = \mu.σ.σ.$ ] και μικρότερο αριθμό διηθημένων λεμφαδένων [F(2,110)=0,754,  $p = \mu.σ.σ.$ ] (γράφημα 3) σε σύγκριση με τους ιστοτύπους λοβιακό και NST όπου υπάρχουν περισσότερες –έστω και ανεπαίσθητα- περιπτώσεις με μεγαλύτερη μ.δ. όγκου και αριθμό διηθημένων λεμφαδένων αντίστοιχα.



Γράφημα 7: Μ.δ. όγκου κατά ιστοτύπο



Γράφημα 8: Διηθημένοι λεμφαδένες κατά ιστοτύπο

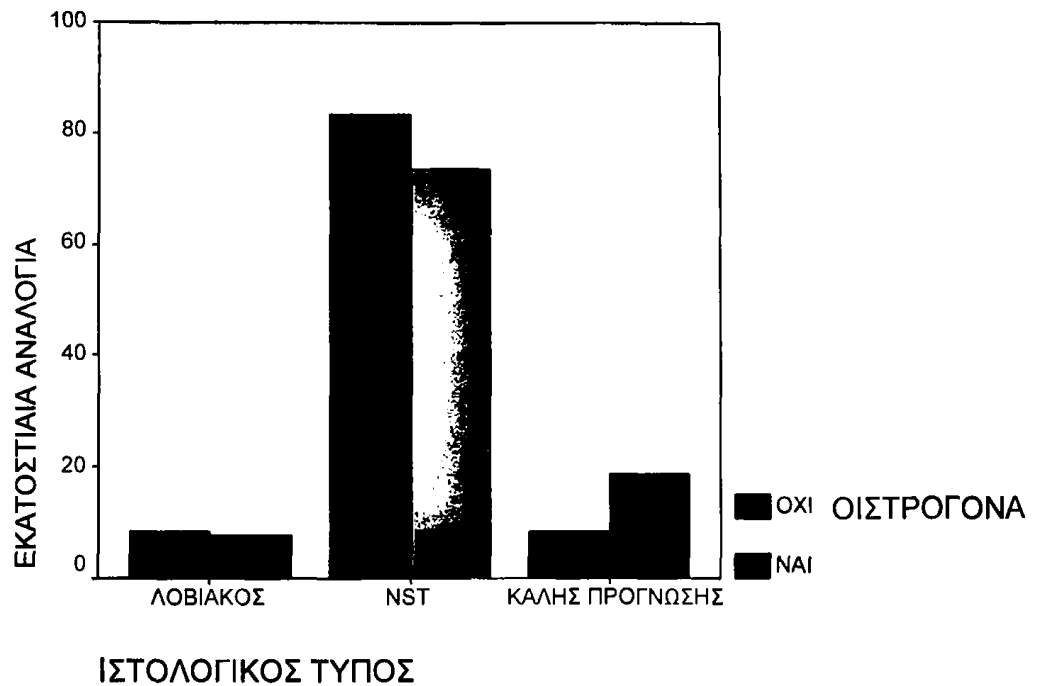


Όσον αφορά την ύπαρξη ή μη οιστρογόνων και πάλι οι περιπτώσεις καλής πρόγνωσης φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό θετικών μετρήσεων σε σύγκριση με τους ιστοτύπους NST και λοβιακό, όπου αν και όχι



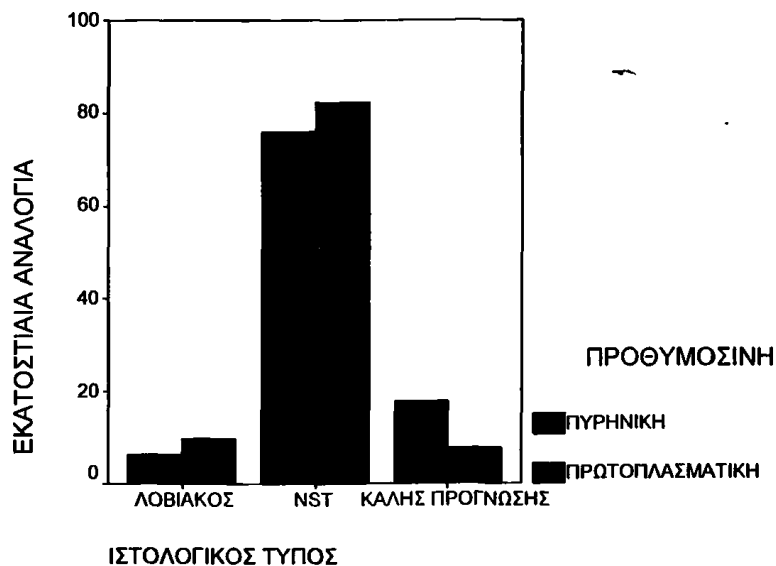
με μεγάλη διαφορά [ $F(2,110)=1,354$ ,  $p=\mu.σ.σ$ ] οι περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται να μη διαθέτουν οιστρογόνα (γράφημα 4).

Γράφημα 9: Ύπαρξη οιστρογόνων κατά ιστοτύπο



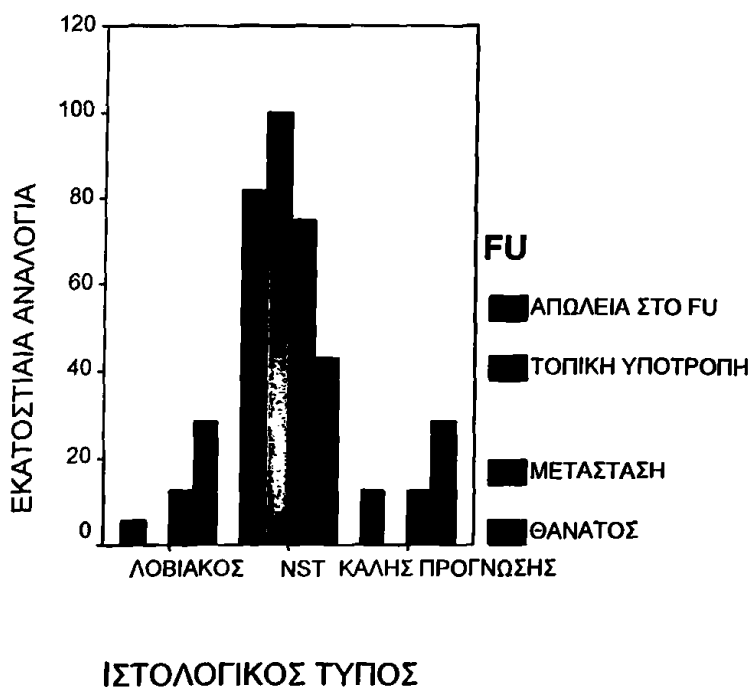
Ανάλογα στις περιπτώσεις καλής πρόγνωσης υπερτερούν οι περιπτώσεις πυρηνικής χρώσης και πάλι σε αντίθεση με τους δύο άλλους ιστοτύπους, όπου υπερτερεί –αν και με μικρή διαφορά– η πρωτοπλασματική χρώση [ $F(2,110)=1,302$ ,  $p=\mu.σ.σ$ ] (γράφημα 5).

Γράφημα 10: Είδος χρώσης κατά ιστοτύπο



Τέλος, όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου, αν και τα δεδομένα που διαθέτουμε είναι ελάχιστα, παρόλα αυτά δε φαίνεται να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ιστοτύπων [ $F(2,110)=1,990$ ,  $p=\mu.σ.σ$ ], αν εξαιρέσουμε ότι οι τοπικές υποτροπές περιορίζονται αποκλειστικά στον πορογενή ιστοτύπο, αν και πάλι αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα του μικρού αριθμού των αντίστοιχων μετρήσεων (γράφημα 6).

Γράφημα 11: Εξέλιξη της νόσου κατά ιστοτύπο





## 2. Σύγκριση εντός των ιστοτύπων

Όσον αφορά τη σύγκριση εντός των ιστοτύπων, διατηρώντας πάντα επιφυλάξεις για την εγκυρότητα των μετρήσεων λόγω του μικρού αριθμού δείγματος στο λοβιακό και στους ιστοτύπους καλής πρόγνωσης, η μόνη οριακά στατιστικά σημαντική επίδραση του είδους χρώσης για το λοβιακό ιστοτύπο αφορά το Grade [ $F(1,7)=5.727$ ,  $p<0.05$ ], όπου η πρωτοπλασματική χρώση αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για υψηλότερο Grade, σε σύγκριση με την πυρηνική χρώση όπου υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός περιπτώσεων με μικρό Grade.

Γράφημα 12: Grade κατά Είδος Χρώσης στον Λοβιακό Ιστότυπο

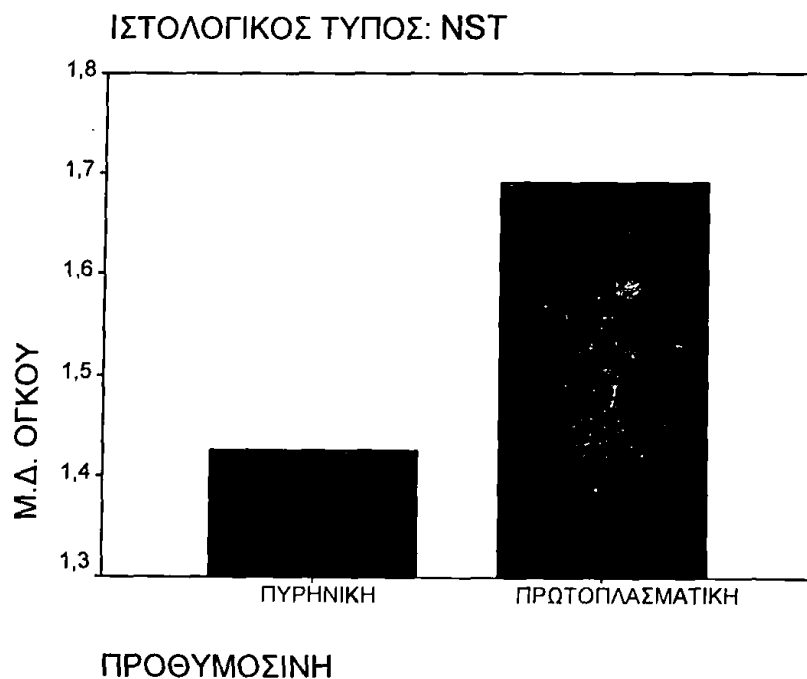


Για τους υπόλοιπους παράγοντες, μ.δ. όγκου [ $F(1,7)=0.071$ ], αριθμό διηθημένων λεμφαδένων [ $F(1,7)=2.006$ ], οιστρογόνα [ $F(1,7)=0.977$ ] και εξέλιξη νόσου [ $F(1,7)=0.0001$ ], οι διαφορές μεταξύ των ειδών χρώσης δεν είναι στατιστικά σημαντικές [ $p=\mu.σ.σ$ ]

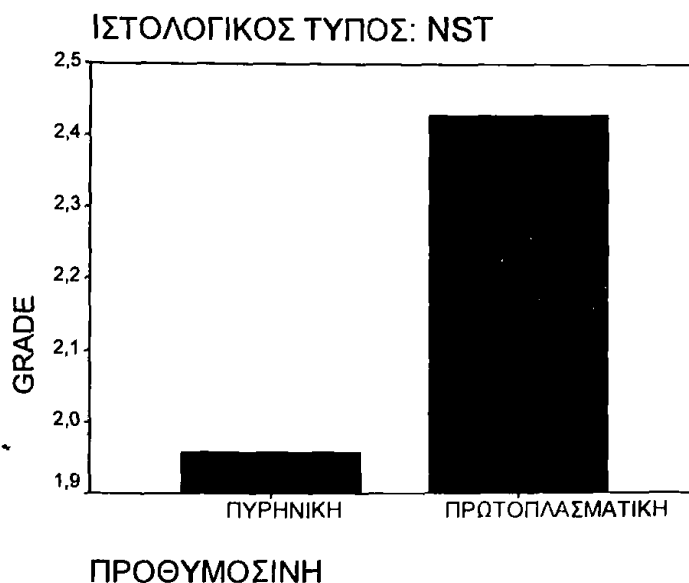
Για τον Πορογενή Ιστότυπο οι επίδραση του είδους χρώσης είναι στατιστικά σημαντική για όλους τους παράγοντες, πλην της εξέλιξης της νόσου [ $F(1,87)=0.906$ ,  $p=\mu.σ.σ.$ ] (γράφημα 12). Συγκεκριμένα η πρωτοπλασματική χρώση συνεπάγεται μεγαλύτερη μ.δ. όγκου [ $F(1,87)=6.619$ ,  $p<0,05.$ ] (γράφημα 8), μεγαλύτερο επίπεδο Grade [ $F(1,87)=10.149$ ,  $p<0,005$ ] (γράφημα 9), μεγαλύτερο αριθμό διηθημένων λεμφαδένων [ $F(1,87)=18.539$ ,

$p < 0,001$ ] (γράφημα 10) και λιγότερες περιπτώσεις με θετικά οιστρογόνα [ $F(1,87) = 5.564, p < 0,05$ ] (γράφημα 11).

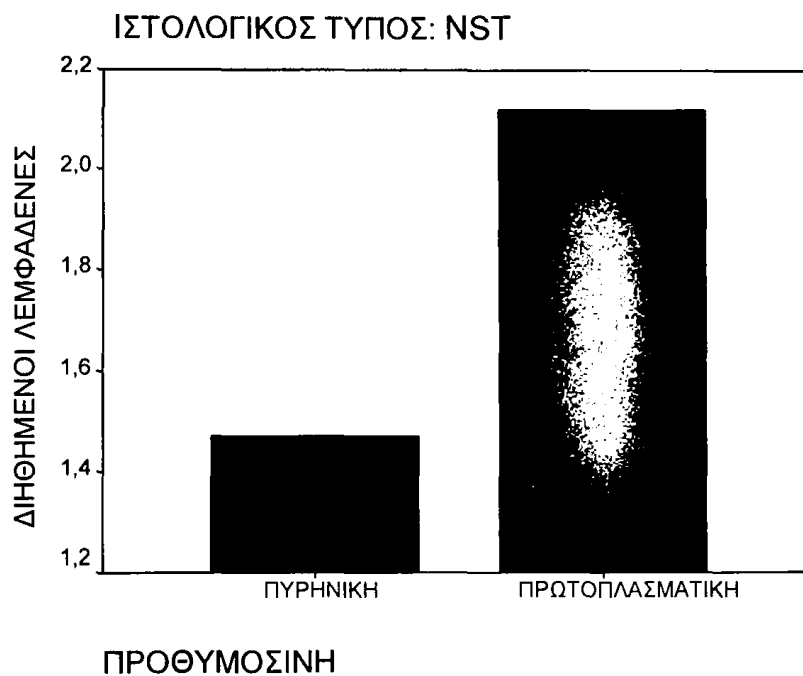
Γράφημα 13: Μ.δ. όγκου κατά Είδος Χρώσης στον Πορογενή Ιστότυπο



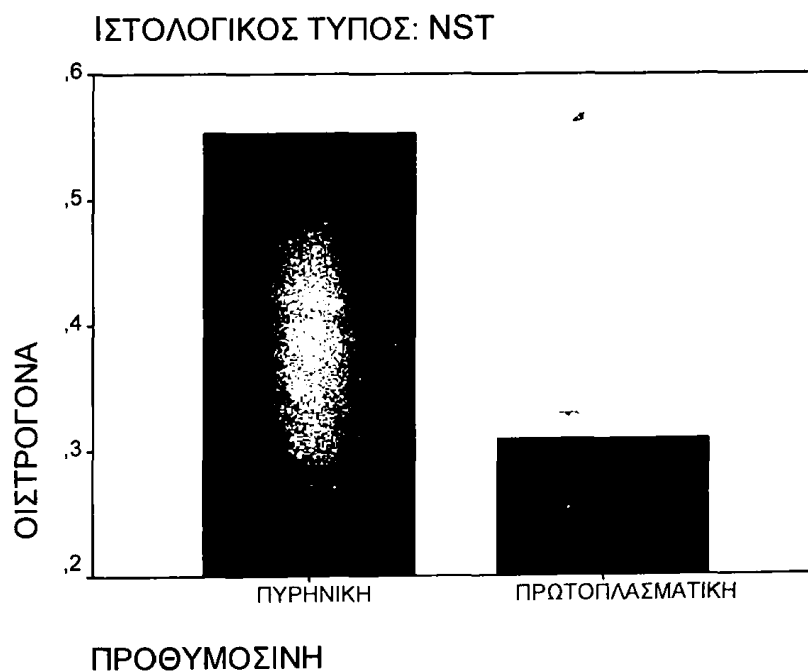
Γράφημα 14: Grade κατά Είδος Χρώσης στον Πορογενή Ιστότυπο



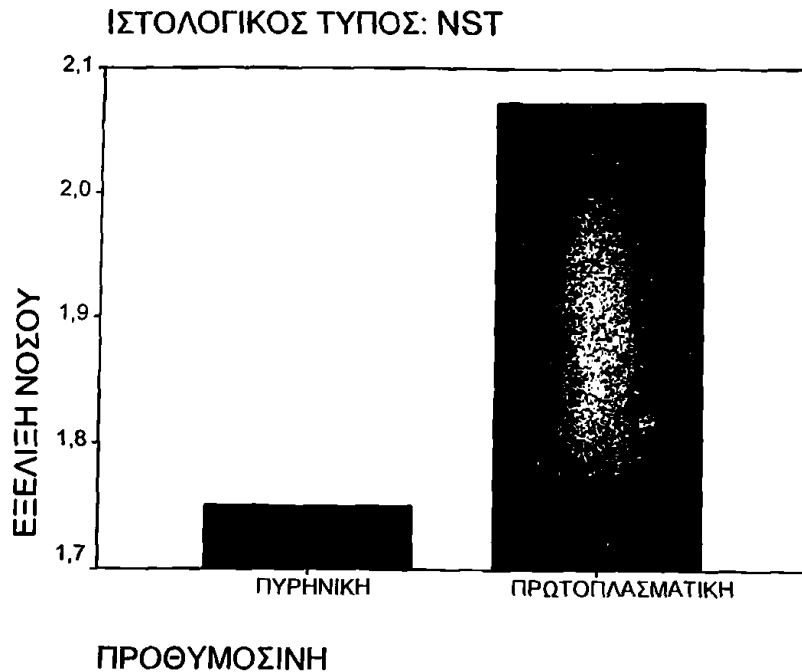
Γράφημα 15: Διηθημένοι Λεμφαδένες κατά Είδος Χρώσης στον Πορογενή Ιστότυπο



Γράφημα 16: Οιστρογόνα κατά Είδος Χρώσης στον Πορογενή Ιστότυπο

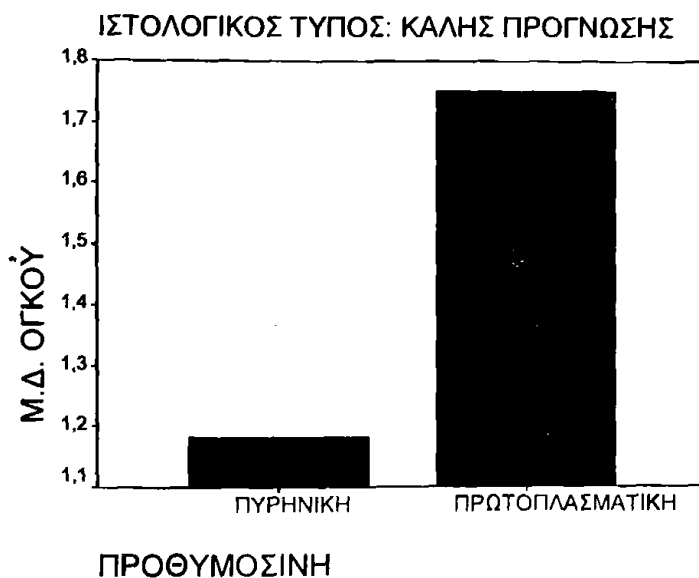


Γράφημα 17: Εξέλιξη νόσου κατά Είδος Χρώσης στον Πορογενή Ιστότυπο



Τέλος, για τους ιστότυπους καλής πρόγνωσης υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών χρώσης για όλους τους παράγοντες. Η πρωτοπλασματική χρώση έχει μεγαλύτερη μ.δ. όγκου [ $F(1,13)= 5.159$ ,  $p<0,05$ ] (γράφημα 13), μεγαλύτερο επίπεδο Grade [ $F(1,13)=63.267$ ,  $p<0,001$ ] (γράφημα 14) και μεγαλύτερο αριθμό λεμφαδένων [ $F(1,13)=14.292$ ,  $p<0,005$ ] (γράφημα 15) σε σύγκριση με την πυρηνική χρώση.

Γράφημα 18: Μ.δ. όγκου κατά Είδος Χρώσης στους Ιστότυπους Καλής Πρόγνωσης



**Γράφημα 19: Grade κατά Είδος Χρώσης στους Ιστούτυπους Καλής Πρόγνωσης**



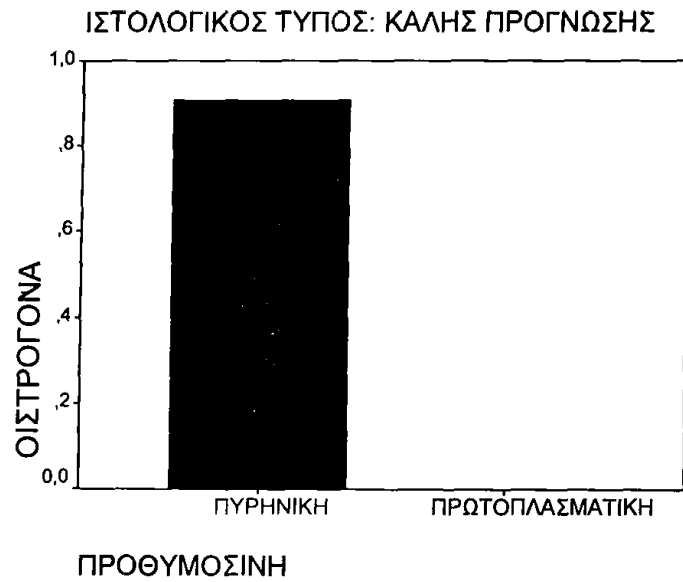
**Γράφημα 20: Διηθημένοι Λεμφαδένες κατά Είδος Χρώσης στους Ιστούτυπους Καλής Πρόγνωσης**



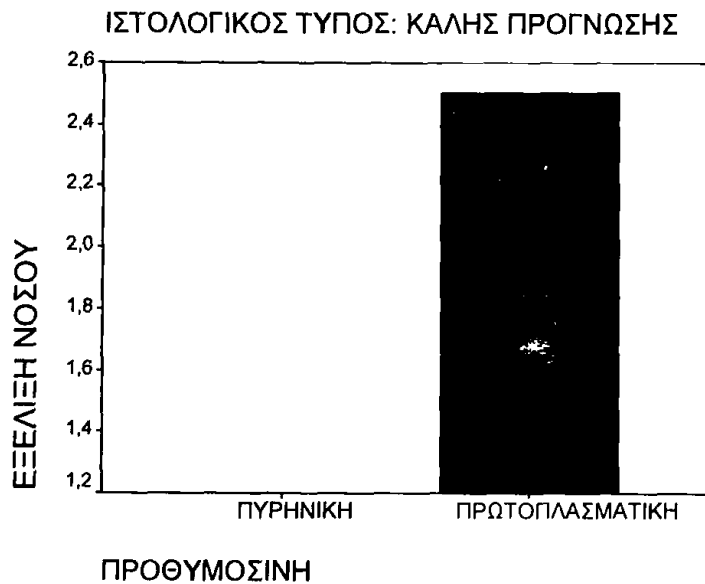
Όσον αφορά τα οιστρογόνα η πυρηνική χρώση είναι η μόνη που διαθέτει περιπτώσεις με θετικά οιστρογόνα [ $F(1,13)=34.667$ ,  $p<0,001$ ] (γράφημα 16), ενώ για την εξέλιξη της νόσου τα δεδομένα που είχαμε αφορούσαν αποκλειστικά την πρωτοπλασματική χρώση και άρα οι διαφορές δεν θα μπορούσαν να είναι στατιστικά σημαντικές (γράφημα 16) [ $F(1,13)=0.000$ ,  $p=\mu.σ.σ$ ] σε σύγκριση με την πυρηνική χρώση.



Γράφημα 21: Οιστρογόνα κατά Είδος Χρώσης στους Ιστούτυπους Καλής Πρόγνωσης



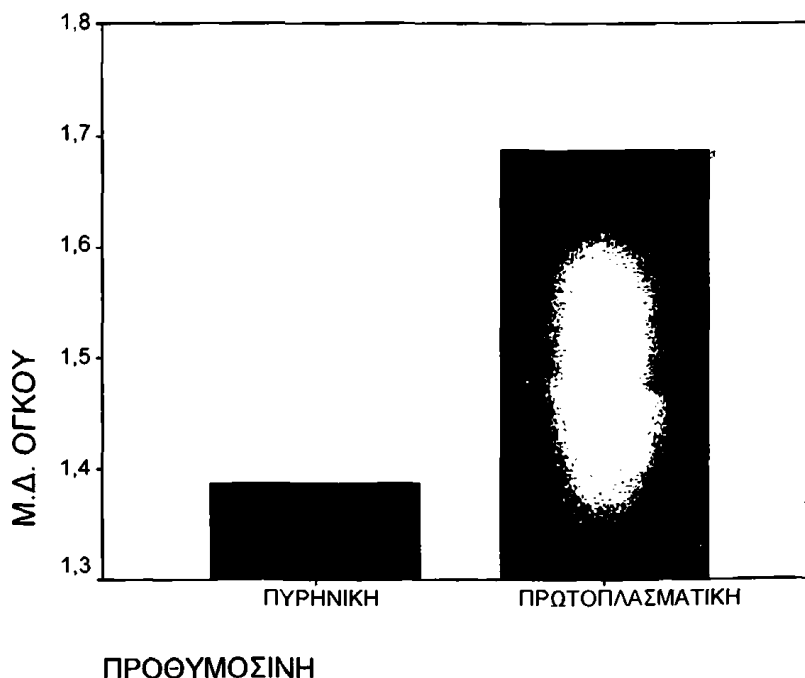
Γράφημα 22: Εξέλιξη νόσου κατά Είδος Χρώσης στους Ιστούτυπους Καλής Πρόγνωσης



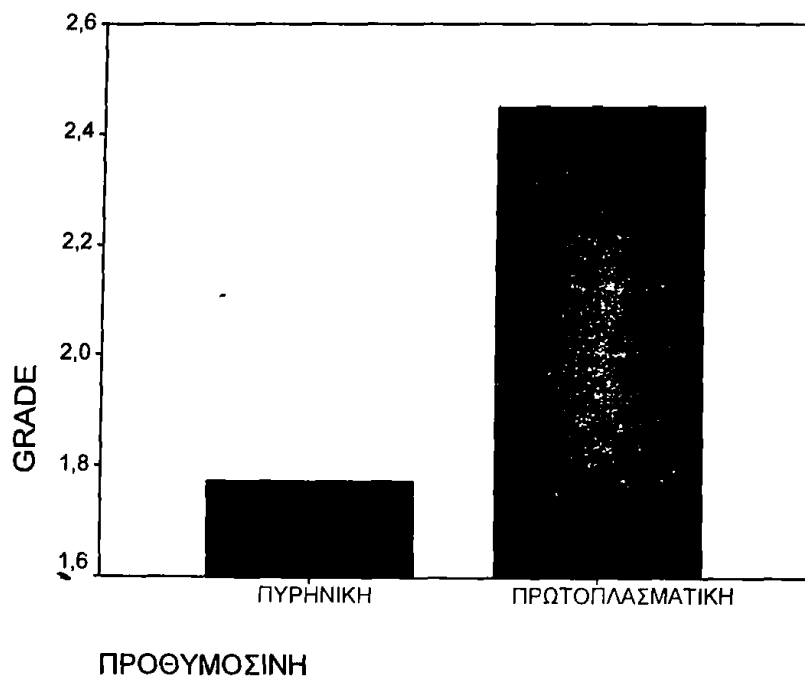
### ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

Μετατρέποντας τις κατηγορικές μεταβλητές σε μεταβλητές ιεραρχικής κλίμακας, μπορέσαμε να συγκρίνουμε τους μέσους όρους των μεταβλητών αυτών. Έτσι, τα αποτελέσματα που ήδη παρουσιάστηκαν και η στατιστική τους σημαντικότητα κατά  $\chi^2$  επιβεβαιώνεται και από το ισχυρότερο στατιστικό εργαλείο της Ανάλυσης Διακύμανσης. Συγκεκριμένα επιβεβαιώνεται η επίδραση του είδους της χρώσης στη μ.δ. του όγκου [ $F(1,111)=10.822$ ,  $p<0,005$ ] (γράφημα12), στο επίπεδο του Grade [ $F(1,111)=26.609$ ,  $p<0,001$ ] (γράφημα13), στον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων [ $F(1,111)=31.378$ ,  $p<0,005$ ] (γράφημα14) και στην ύπαρξη οιστρογόνων [ $F(1,111)=9.608$ ,  $p<0,002$ ] (γράφημα15). Και με αυτό το είδος ανάλυσης δεν καταδεικνύεται στατιστικά σημαντική η επίδραση του είδους χρώσης στην εξέλιξη της νόσου [ $F(1,24)=2.148$ ,  $p=\mu.σ.σ.$ ] (γράφημα16), φαινόμενο που και πάλι φαίνεται να σχετίζεται με τον μικρό αριθμό καταγραφών για αυτή τη μεταβλητή.

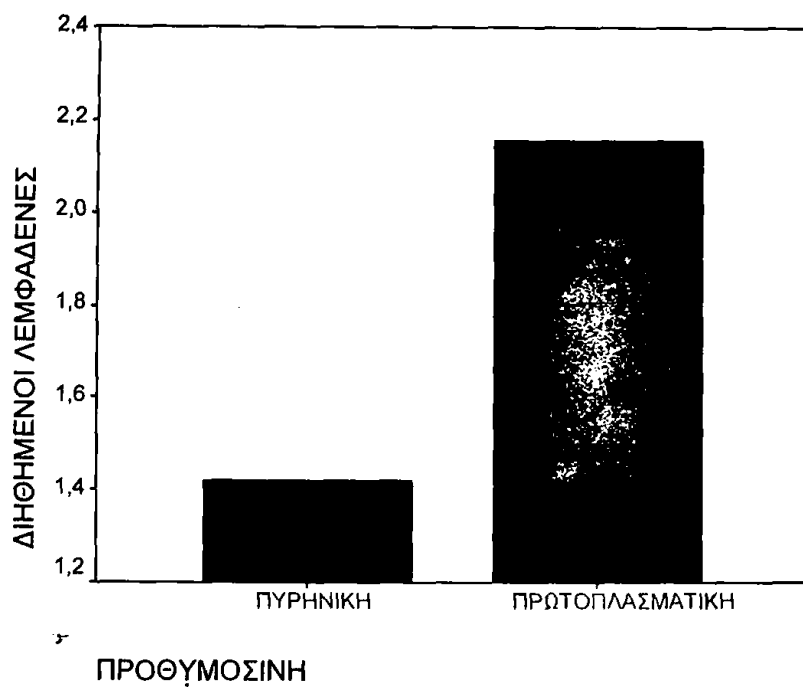
Γράφημα 23: Μ.δ. όγκου κατά είδος χρώσης



Γράφημα 24: Επίπεδο Grade κατά είδος χρώσης

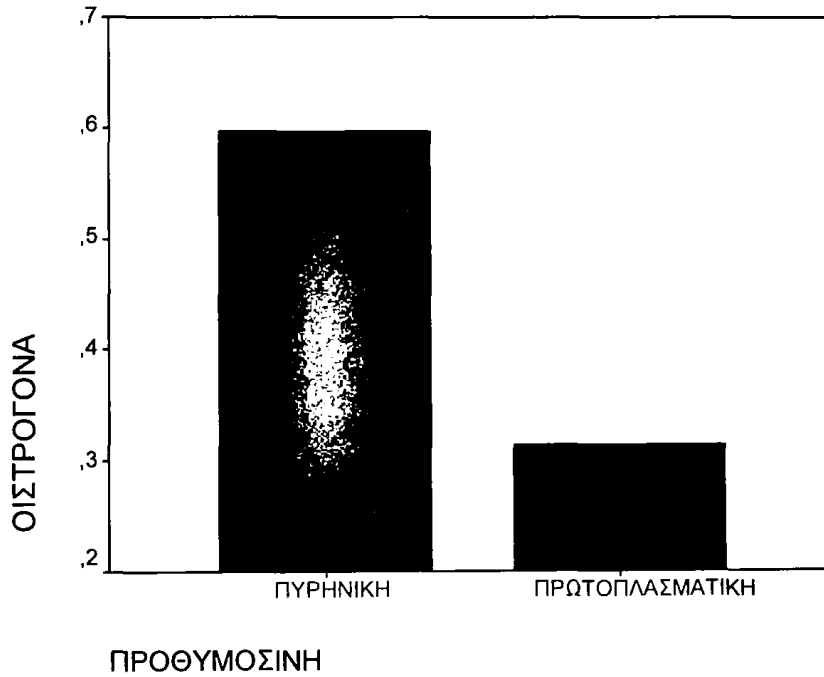


Γράφημα 25: Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων κατά είδος χρώσης

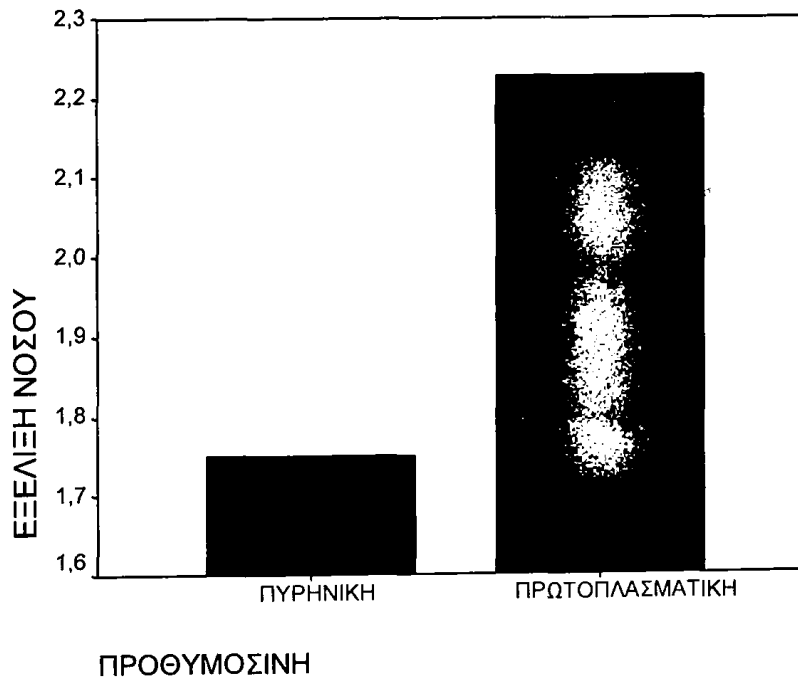




Γράφημα 26: Ύπαρξη οιστρογόνων κατά είδος χρώσης



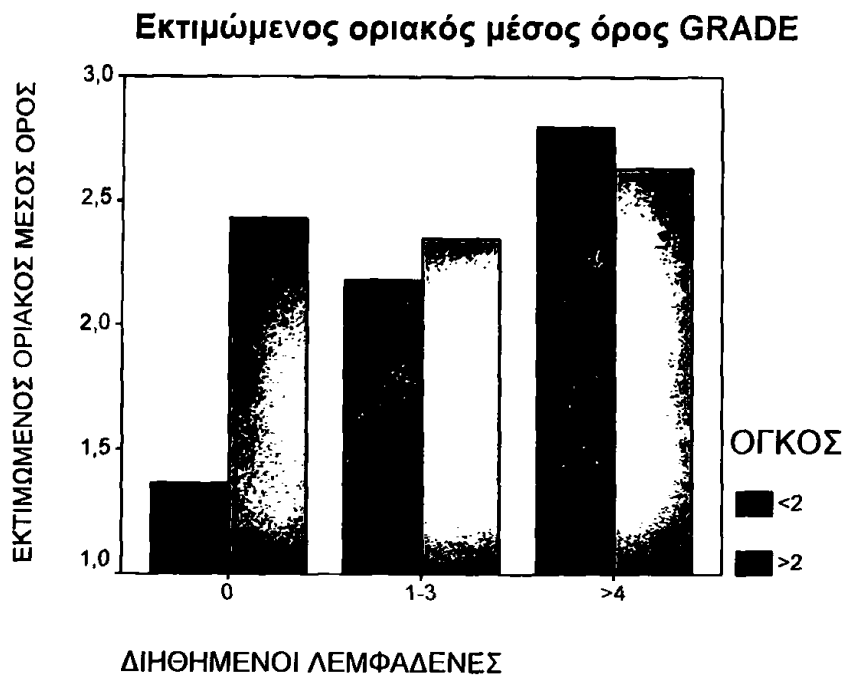
Γράφημα 27: Εξέλιξη νόσου κατά είδος χρώσης



## ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ ΜΟΝΗΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗΣ

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση παραγόντων, με Ανάλυση Διακύμανσης Μονής Κατεύθυνσης στατιστικά σημαντική βρέθηκε η επίδραση της μ.δ. όγκου με και του αριθμού διηθημένων λεμφαδένων στο Grade [ $F(2, 107)=8,921, p<0.001$ ]. Στο γράφημα 17 καταδεικνύεται πως η μικρή μ.δ. προβλέπει μικρό Grade για τις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων δεν υπερβαίνει τους 3. Η αναλογία ωστόσο αυτή ανατρέπεται στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των λεμφαδένων είναι μεγαλύτερος από τέσσερις, όπου και η μ.δ. του όγκου προβλέπει μεγαλύτερο Grade σε σύγκριση με τη μ.δ. όγκου που υπερβαίνει τα 2cm.

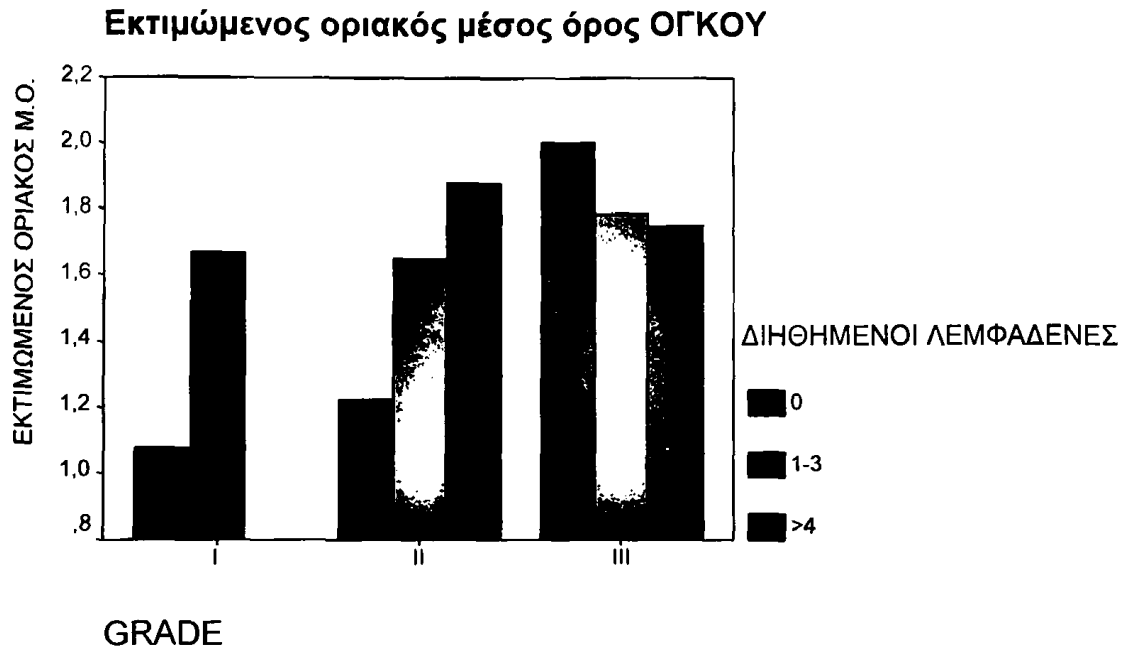
Γράφημα 28: Επίδραση της μ.δ. όγκου και του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων στο Grade



Στατιστικά σημαντική βρέθηκε επίσης η επίδραση του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων και του Grade στη μ.δ. του όγκου [ $F(3, 105)=5.789, p<0.005$ ]. Όπως φαίνεται στο γράφημα 18, για το Grade I και II η μ.δ. του όγκου αυξάνει ανάλογα με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων, πράγμα που δεν συμβαίνει στο Grade III, όπου η αύξηση της μ.δ. του όγκου είναι αντιστρόφως ανάλογη της αύξησης του αριθμού των λεμφαδένων



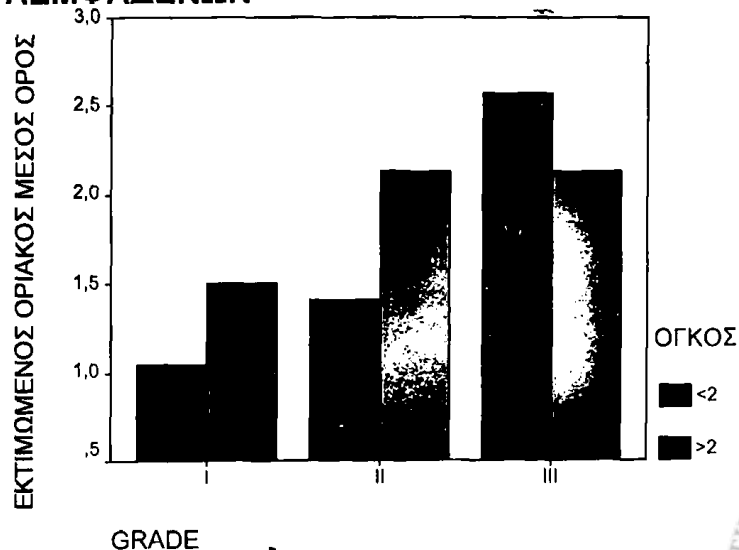
**Γράφημα 29: Επίδραση του Grade και του αριθμού διηθημένων λεμφαδένων στη μ.δ. του όγκου**



Αντίστοιχα στατιστικά σημαντική υπήρξε και η επίδραση της μ.δ. όγκου και του Grade στον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων [ $F(2, 107)=6,722$ ,  $p<0.005$ ]. Στο Grade III όσο μικρότερη είναι η μ.δ. του όγκου, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός διηθημένων λεμφαδένων, σε αντίθεση με το Grade I και II, όπου η μ.δ. και ο αριθμός των λεμφαδένων αυξάνουν ανάλογα (γράφημα 19).

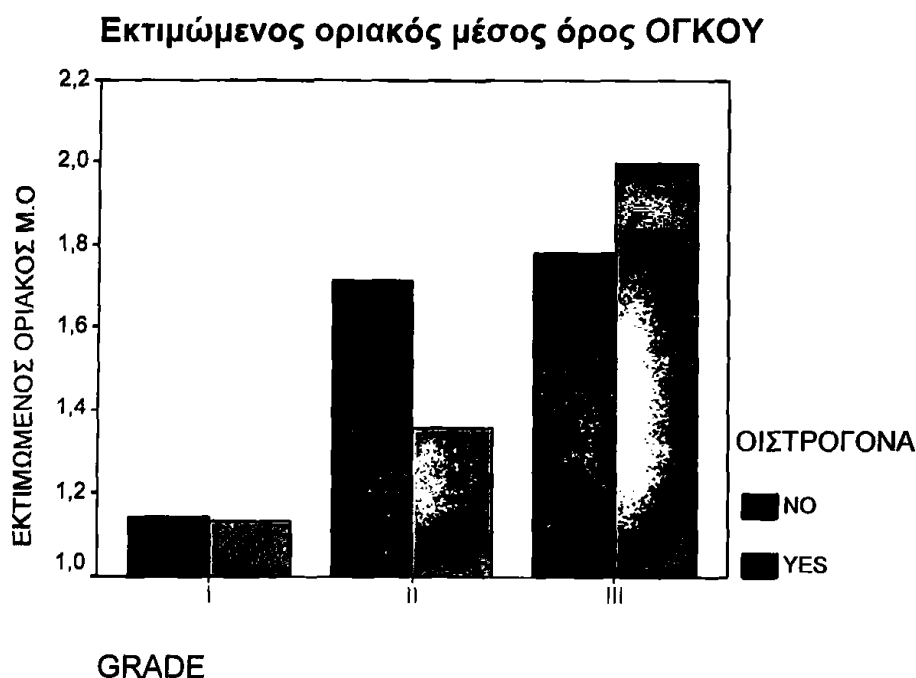
**Γράφημα 30: Επίδραση του Grade και της μ.δ. του όγκου στον αριθμό διηθημένων λεμφαδένων**

**Εκτιμώμενος οριακός μέσος όρος ΔΙΗΘΗΜΕΝΩΝ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ**



Μια ακόμη αλληλεπίδραση παραγόντων που βρέθηκε οριακά στατιστικά σημαντική, αφορά την επίδραση μεταξύ του Grade και της ύπαρξης οιστρογόνων για τον καθορισμό της μ.δ. του όγκου [ $F(2, 107)=3.580, p<0.05$ ]. Όπως φαίνεται στο γράφημα 19, στο Grade III η ύπαρξη οιστρογόνων σημαίνει και περισσότερες περιπτώσεις με μεγαλύτερη μ.δ. όγκου, πράγμα που δεν ισχύει για τα Grade I και II, όπου η ύπαρξη οιστρογόνων σημαίνει και μικρότερη μ.δ. όγκου.

Γράφημα 31: Επίδραση του Grade και της ύπαρξης οιστρογόνων στη μ.δ. του όγκου



Οι επιδράσεις που βρέθηκαν καταδεικνύουν ότι στο Grade III υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των παραγόντων της μ.δ. του όγκου και του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων, όπως και μεταξύ της μ.δ. του όγκου και της ύπαρξης οιστρογόνων.

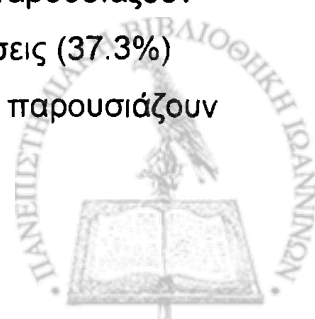
#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 150 ασθενείς που έχουμε στο υλικό μας οι 114 (76%) είχαν πορογενές διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μη ειδικού τύπου (NST), (πιν. 5,14), οι 16 (10.7%) είχαν πορογενές, διηθητικό καρκίνωμα ειδικού τύπου (καλής πρόγνωσης) ήτοι σωληνώδες, θηλώδες, βλεννώδες, μυελοειδές, 10 ασθενείς (6.7%) είχαν λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα και οι υπόλοιποι 10 (6.7%) πορογενές μη διηθητικό (in situ) καρκίνωμα του μαστού (πιν. 3,10). Παρά τον αποκλεισμό από τη στατιστική μελέτη 37 περιπτώσεων για διάφορους λόγους, η αναλογία μεταξύ των διαφόρων τύπων του καρκινώματος στις 113 περιπτώσεις, που απέμειναν, δεν διαταράχθηκε ουσιωδώς, έτσι ο τελικός πληθυσμός αποτελείτο από 89 (78.8%) πορογενή διηθητικά, 9 λοβιακά (8%) και 15 καλής πρόγνωσης καρκινώματα (13.3%), (πιν. 14).

Τα in situ (10) καρκινώματα για στατιστικούς λόγους αποκλείστηκαν από τη στατιστική μελέτη, εν τούτοις, στους τύπους αυτούς μελετήθηκε η συμπεριφορά (έκφραση) της προθυμοσίνης α. Οι τύποι καλής πρόγνωσης όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση εμφανίζουν γενικώς μικρότερο grade απ'ότι τα αντίστοιχα μη ειδικού τύπου καρκινώματα (γράφημα 6), φαίνεται να μεθίστανται σε λιγότερους λεμφαδένες (γράφημα 8), όπως επίσης έχουν μικρότερη μέση διάμετρο όγκου (γράφημα 7). Επίσης τα περισσότερα από αυτά συγκρινόμενα πάντοτε με τα πορογενή μη ειδικού τύπου καρκινώματα, παρουσιάζουν θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (γράφημα 9).

Ως προς την εξέλιξη της νόσου δεν φαίνεται να προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων των διηθητικών καρκινωμάτων, μόνο ήπιες διαφορές μπορούν να επισημανθούν, που αφορούν όμως τις υποτροπές όπου τα πορογενή καρκινώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη τάση (γράφημα 11).

Από το σύνολο του υλικού, οι 33 περιπτώσεις μας (22%) παρουσιάζουν καλής διαφοροποίησης καρκινώματα (grade I), οι 56 περιπτώσεις (37.3%) μέσης διαφοροποίησης (grade II) και οι 51 περιπτώσεις (34%) παρουσιάζουν χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα (grade III), (πιν.6, 14).



Ο τελικός πληθυσμός, όπως διαμορφώνεται στην στατιστική μελέτη, αφορούσε 29 περιπτώσεις (25.7%) grade I καρκινώματα, 46 περιπτώσεις grade II (40.7%) και 38 περιπτώσεις grade III (33.6%) καρκινώματα.

Στο σύνολο του υλικού (πιν. 14) 70 περιπτώσεις είχαν όγκο μεγίστης διαμέτρου <2εκ. (T1) (ποσοστό 46.7%), ενώ οι υπόλοιπες 80 (ποσοστό 53.3%) είχαν όγκοι μ.δ.>2εκ. (T2 και T3).

• Στον τελικό πληθυσμό (113 περιπτώσεις) της στατιστικής ανάλυσης (πιν. 11) τα μεγέθη αυτά διαμορφώνονται ως εξής: 54 περιπτώσεις παρουσιάζουν όγκο σταδίου T1 (47.8%) και 59 περιπτώσεις όγκο σταδίου T2 και T3 (52.2%).

Οι μισές από τις περιπτώσεις μας (75, ποσοστό 50%) δεν παρουσίαζαν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες ( στο ποσοστό αυτό συμπεριλαμβάνονται και οι 10 περιπτώσεις με πορογενές μη διηθητικό αδenoκαρκίνωμα), ενώ 44 περιπτώσεις παρουσίαζαν μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες της μασχάλης (στάδιο PN1bi). Οι υπόλοιπες 31 περιπτώσεις (ποσοστό 20.7%) παρουσίαζαν επίσης μεταστάσεις στους λεμφαδένες πλέον όμως τριών (>4)(στάδιο PN1bii), (πιν. 7,14).

Στον συνολικό πληθυσμό έρευνας (πιν. 14) από τις 113 περιπτώσεις, οι 52 (46%) βρίσκονται στο στάδιο NO (χωρίς μεταστάσεις), οι 37 (32.7%) στο στάδιο PN1bi (1-3 διηθημένοι λεμφαδένες) και οι υπόλοιπες 31 περιπτώσεις (21.2%) βρίσκονται στο στάδιο PN1bii (>4 διηθημένοι λεμφαδένες). Αν εξαιρεθούν τα 10 in situ καρκινώματα από το σύνολο του πληθυσμού, τότε, από τις 65 περιπτώσεις του σταδίου T1, οι 44 ήταν χωρίς μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (στάδιο N0), οι 12 ήταν στο στάδιο PN1bi και οι υπόλοιπες 9 στο στάδιο PN1bii (πιν. 7,14). Από τις 75 περιπτώσεις του σταδίου T2 οι 21 ήταν χωρίς μεταστάσεις (N0), οι 32 ήταν στο στάδιο PN1bi και οι υπόλοιπες 22 ήταν στο στάδιο PN1bii (πιν. 7,14).

• Από τις 33 περιπτώσεις που είχαν grade I καρκινώματα, οι 28 ήταν στο στάδιο T1, ενώ από τους 56 ασθενείς με grade II καρκινώματα, οι 27 ήταν στο στάδιο T1 και οι υπόλοιπες 29 στα στάδια T2 και T3. Από τα 51 καρκινώματα με grade III τα περισσότερα (46) ήταν στα στάδια T2 και T3 (πιν. 8). Δυο από τις 33 περιπτώσεις με grade I καρκίνωμα παρουσίαζαν τοπικές υποτροπές ή και μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ενώ τρεις άλλες περιπτώσεις της ίδιας ομάδας παρουσίαζαν μεταστάσεις σε άλλα



όργανα (πιν. 9,10,14). Ωστόσο κανείς θάνατος δεν υπήρξε στα 15 χρόνια παρακολούθησης.

Από τις 56 περιπτώσεις με όγκους grade II υπήρξαν 6 υποτροπές και 2 θάνατοι στα 10 χρόνια παρακολούθησης. Από τους ασθενείς με καρκινώματα grade III υπήρξαν 12 υποτροπές, ενώ 5 ασθενείς κατέληξαν μέσα στο χρονικό διάστημα των 15 χρόνων παρακολούθησης (πιν.9,10,14).

Από τα 10 in situ πορογενή καρκινώματα του μαστού είχαμε μία υποτροπή, όπως φαίνεται από τη στατιστική μελέτη αλληλοεπίδραση στατιστικά σημαντική βρέθηκε μεταξύ βαθμού κακοήθειας του όγκου (grade), της θετικότητας του όγκου σε οιστρογονικούς υποδοχείς και της μ. διαμέτρου του όγκου (γράφημα 31).

Στις περιπτώσεις με καρκίνωμα grade III, οι περισσότεροι όγκοι είχαν μεγάλη μέση διάμετρο (T2,T3) πράγμα που δεν ισχύει για τους όγκους grade I και II, όπου αφενός μεν οι όγκοι έχουν μικρότερη διάμετρο (T1) και αφετέρου συνδυάζονται με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς.

Επιπροσθέτως στα grade III καρκινώματα υπάρχει μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των παραγόντων της Tα του όγκου και του σταδίου N, όπως και μεταξύ σταδίου Tα του όγκου και της ύπαρξης θετικών οιστρογονικών υποδοχέων. Τα 83 καρκινώματα στο σύνολο του πληθυσμού (55.3%) παρουσίαζαν αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, ενώ στις 66 (44%) οι οιστρογονικοί υποδοχείς βρέθηκαν θετικοί. Μόλις μία περίπτωση από τα 10 in situ καρκινώματα παρουσίαζε οιστρογονικούς υποδοχείς (0.7%) (πιν. 14).

Στον τελικό πληθυσμό της στατιστικής έρευνας (πιν. 14) οι αριθμοί και τα ποσοστά της ορμονικής κατάστασης του όγκου αντιστοιχούσαν σε 60 (53.1%) περιπτώσεις με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς και σε 53 (46.9%) περιπτώσεις με θετικότητα του καρκινώματος σε οιστρογονικούς υποδοχείς. Η στατιστική μελέτη στην ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης έδειξε επίδραση της μ. διαμέτρου (T) του όγκου και του αριθμού των διηθημένων λεμφαδένων (PN1b), στο χαμηλό grade (grade I) (γράφημα 28-29). Όγκοι με υψηλό grade (III) δίνουν περισσότερους μεταστατικούς λεμφαδένες απ'ότι οι όγκοι με χαμηλό grade (I), ακόμα και αν ο όγκος έχει μικρή μέση διάμετρο (T1) (γράφημα 19). Επίσης όγκος με μικρή μέση διάμετρο (T1) συνδυάζεται με μικρό grade (I) και μεταστάσεις σε μασχालιαίους λεμφαδένες που όμως δεν

υπερβαίνουν τους τρεις (PN1bi). Αυτή η σχέση ανατρέπεται σε όγκους που έχουν μεγάλη μέση διάμετρο (T2, T3), μεγάλο grade (III), ή μεταστάσεις σε 4 ή περισσότερους λεμφαδένες της μασχάλης (PN1bii) (γράφημα 8,29). Φαίνεται επίσης ότι για τα καρκινώματα grade I, II η μέγιστη διάμετρος (T) αυξάνει ανάλογα με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων, όπως κατά μέγιστο λόγο συμβαίνει και για τους όγκους grade III.

• Η κατανομή της προθυμοσίνης α στα κύτταρα των νεοπλασματικών και μη ιστών, οι οποίοι συμπεριλαμβάνονται στο βιοπτικό υλικό ποικίλει. Εις ότι αφορά το κυτταρικό είδος είναι σαφές ότι η προθυμοσίνη α εκφράζεται πρωτίστως στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (φωτ. 1-17). Πέραν αυτών όμως υπήρξαν και μη νεοπλασματικά κύτταρα των πόρων και των λοβίων του μαζικού αδένου. Προθυμοσίνη α φαίνεται να εκφράζουν τα επιθηλιακά κύτταρα στην επιδερμίδα και δη αυτά που βρίσκονται στις ανώτερες στιβάδες (ώριμα κύτταρα), τα ιστιοκύτταρα, λεμφοκύτταρα ή πολυμορφοπύρρηνα στις περιοχές όπου συνυπήρξε φλεγμονή στην τομή της βιοψίας.

Άλλοι επιθηλιακοί ή μεσεγχυματικοί ιστοί δεν φαίνεται να εκφράζουν την προθυμοσίνη α. Από άποψη εντόπισης στο ίδιο το κύτταρο η προθυμοσίνη α εντοπίζεται πυρηνικά και πρωτοπλασματικά. Περιπτώσεις όπου η προθυμοσίνη α παρουσιάζει μικτή, ή περιπυρηνική εντόπιση, αλλά και περιπτώσεις όπου η εντόπιση της χρώσης ήταν ελαφριά, αποκλείστηκαν από την στατιστική μελέτη. (φωτ. 1-17, πιν. 11,14).

Η κατανομή της προθυμοσίνης α στο σύνολο του υλικού ήταν: πυρηνική σε 66 περιπτώσεις (44%) και πρωτοπλασματική σε 55 περιπτώσεις (36.7%) καρκινώματος (πιν. 14). Συγκεκριμένα και σε σχέση με το grade όπως φαίνεται και στους πίνακες 11,12,14 από τα 33 καρκινώματα με grade I παρουσίαζαν πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης α, ενώ μόλις σε 5 περιπτώσεις η έκφραση της προθυμοσίνης α ήταν πρωτοπλασματική (πιν. 12). Από τα καρκινώματα grade II, τα 28 παρουσίαζαν πυρηνική χρώση (έκφραση) και 18 πρωτοπλασματική. Αντίστροφα σχεδόν είναι τα αποτελέσματα στην έκφραση της προθυμοσίνης για τα grade III καρκινώματα, όπου υπερτερεί κατά πολύ η πρωτοπλασματική χρώση (28 περιπτώσεις) και ακολουθεί μακράν η πυρηνική (10 περιπτώσεις). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα grade I καρκινώματα συμπεριλαμβάνονται και τα σωληνώδη (καλής πρόγνωσης). Εις ότι αφορά στα μη διηθητικά (in situ) πορογενή καρκινώματα,





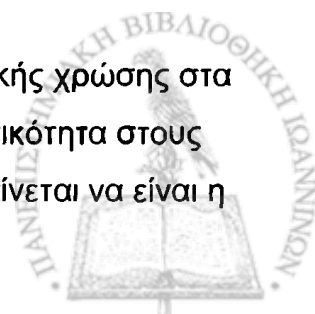
η έκφραση της προθυμοσίνης α φαίνεται να είναι μοιρασμένη (5 πυρηνική και 4 πρωτοπλασματική). Τα περισσότερα εκ των τελευταίων καρκινωμάτων είναι comedo.

Στον πίνακα 11 φαίνεται αναλυτικά η ανά ιστολογικό τύπο κατανομή της προθυμοσίνης α. Παρατηρούμε ότι η πυρηνική και η πρωτοπλασματική χρώση είναι σχεδόν μοιρασμένη στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου, ενώ στα σωληνώδη η πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης α είναι καθολική (8%), ενώ γενικότερα η πυρηνική έκφραση υπερέχει στα καλής πρόγνωσης καρκινώματα (11/12). Εξαίρεση αποτελούν τα μυελοειδή όπου η χρώση είναι αποκλειστικά πρωτοπλασματική (3/3). Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα φαίνεται να υπερτερεί ελαφρώς η πυρηνική χρώση. Όταν όμως γίνει επιμερισμός ανά υπότυπο λοβιακού φαίνεται πως η πυρηνική χρώση αφορά τα κλασικού τύπου (grade I) λοβιακά, ενώ η πρωτοπλασματική χρώση τα αναπλαστικού τύπου λοβιακά καρκινώματα (εικόνες 1-16).

Στον τελικό πληθυσμό (πιν. 14) που χρησιμοποιήθηκε στην στατιστική μελέτη φαίνεται πως υπερέχει επίσης η πυρηνική χρώση και ακολουθεί η πρωτοπλασματική (62-54.9% και σε 51 περιπτώσεις -45.1% αντιστοίχως).

Η σχέση της κατανομής της έκφρασης της προθυμοσίνης α και της θετικότητας σε οιστρογονικούς υποδοχείς των καρκινωμάτων καταγράφεται στον πίνακα 9. Από το σύνολο των 121 περιπτώσεων εξέφραζαν θετικότητα στην προθυμοσίνη α οι 53 από αυτές. Πιο συγκεκριμένα οι 35 από αυτές παρουσίαζαν πυρηνική χρώση και οι υπόλοιπες 18 πρωτοπλασματική. Η πυρηνική έκφραση αφορούσε κυρίως grade I καρκινώματα (17 περιπτώσεις), ενώ απουσίαζε στα grade III. Αντίθετα η πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης α υπερείχε στα grade III καρκινώματα (πιν.13) (7 περιπτώσεις grade III και 3 περιπτώσεις grade I). Το ίδιο καταγράφεται και στο γράφημα 14 της στατιστικής μελέτης, όπου φαίνεται ότι η πρωτοπλασματική χρώση (γράφημα 24) εμφανίζεται περισσότερο στα υψηλά grade του πορογενούς καρκινώματος μη ειδικού τύπου, ενώ η πυρηνική στα χαμηλότερα. Το τελευταίο ισχύει και για τα λοβιακά και τα καλής πρόγνωσης καρκινώματα (γράφημα 12,19).

Στατιστικώς σημαντική είναι επίσης η υπεροχή της πυρηνικής χρώσης στα καρκινώματα μη ειδικού τύπου όταν αυτά συνδυάζονται με θετικότητα στους οιστρογονικούς υποδοχείς (γράφημα 16). Επίσης καθολική φαίνεται να είναι η



υπεροχή της πυρηνικής χρώσης στα καλής πρόγνωσης καρκινώματα όταν επίσης αυτά συνδυάζονται (τα περισσότερα) με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (γράφημα 21).

Στατιστικά σημαντική επίσης φαίνεται να είναι η υπεροχή της πρωτοπλασματικής χρώσης στους όγκους με μεγάλη διάμετρο τόσο στους μη ειδικούς τύπους του καρκινώματος καλής πρόγνωσης (γράφημα 13,18).

• Στα γραφήματα 10, 15 και 20 φαίνεται πως η πρωτοπλασματική χρώση έχει μεγαλύτερη συχνότητα μεταστάσεων στους λεμφαδένες απ'ότι η πυρηνική σε ότι αφορά τα πορογενή καρκινώματα, τόσο του μη ειδικού τύπου, όσο και τα καλής πρόγνωσης.

Ενώ στο σύνολο του πληθυσμού φαίνεται (ως και προηγουμένως αναφέρθηκε) η πρωτοπλασματική και η πυρηνική έκφραση της προθυμοσίνης α διαμοιράζεται σχεδόν εξ ίσου στα πορογενή μη ειδικού τύπου καρκινώματα και στα λοβιακά, η στατιστική μελέτη δείχνει (γράφημα 10) μια ελαφρά υπεροχή της πρωτοπλασματικής χρώσης για τους ίδιους τύπους καρκινώματος. Αντίθετα στα καλής πρόγνωσης καρκινώματα υπάρχει απόλυτη συμφωνία για την υπεροχή της πυρηνικής έκφρασης.

Στατιστικά φαίνεται να υπάρχει σχέση (γράφημα 2,24) μεταξύ αύξησης του grade στα καρκινώματα μη ειδικού τύπου και στη συχνότητα εμφάνισης της πρωτοπλασματικής χρώσης. Αντίθετα η πυρηνική χρώση εμφανίζεται στα καρκινώματα grade I. Επίσης η πυρηνική χρώση εμφανίζει μεγάλη συχνότητα (γράφημα 4,26) σε όγκους με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς και σε όγκους με μικρή μέση διάμετρο (γράφημα 23, 28).

Το ίδιο συμβαίνει και για τις περιπτώσεις όπου συνδυάζονται με μη διηθημένους λεμφαδένες, ενώ αντιθέτως τα μεταστατικά καρκινώματα εμφανίζουν περισσότερο πρωτοπλασματική έκφραση της προθυμοσίνης α (γράφημα 2, 25).

Τέλος εις ότι αφορά την πρόγνωση της νόσου (γράφημα 5,27) τα καρκινώματα με πρωτοπλασματική έκφραση της θυμοσίνης παρουσιάζουν περισσότερη τάση μετάστασης στους λεμφαδένες και σε άλλα όργανα, ενώ όλες οι περιπτώσεις θανάτων αναφέρονται σε πρωτοπλασματική χρώση.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Έχει υπολογιστεί ότι μία στις εννιά γυναίκες που θα ζήσουν μέχρι τα 85 χρόνια, θα αναπτύξουν κάποια στιγμή στη ζωή τους, καρκίνωμα του μαστού. Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ παρουσιάζονται 182.000 νέες περιπτώσεις καρκινώματος του μαστού. Ωστόσο, με την σωστή ενημέρωση εκ μέρους της πολιτείας και την χρήση της μαστογραφίας ως εξέταση ρουτίνας (όπως και στις περισσότερες χώρες του κόσμου), ο αριθμός των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνωμα του μαστού, ο οποίος να έχει ήδη μετασταθεί στη μασχάλη είναι πολύ μικρότερος από εκείνον του παρελθόντος <sup>(140,177)</sup>. Μερικοί συγγραφείς θεωρούν ότι τα 2/3 των γυναικών που διαγιγνώσκονται για πρώτη φορά πάσχουσες από καρκίνωμα του μαστού δεν παρουσιάζουν λεμφικές μεταστάσεις <sup>(97,115)</sup>. Από τις γυναίκες αυτές (με τους αρνητικούς λεμφαδένες), το 20-30% θα παρουσιάσουν υποτροπή και θα χρειασθούν μια περισσότερο επιθετική θεραπεία (χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία) διότι θεωρείται ότι κινδυνεύουν να καταλήξουν από την νόσο. Επομένως ένα ποσοστό γυναικών 70-80% με καρκίνωμα του μαστού δεν χρειάζεται περαιτέρω θεραπευτική αγωγή καθότι η χειρουργική θεραπεία στην οποία έχουν υποβληθεί θεωρείται επαρκής. Έτσι οι ασθενείς αυτές δεν χρειάζονται επικουρικές θεραπείες, οι οποίες πέραν των ανεπιθύμητων σωματικών και ψυχικών επιδράσεων που υφίστανται από τις επικουρικές θεραπείες, το μεγάλο κόστος της θεραπείας, δημιουργεί μεγάλα προβλήματα στο σύστημα υγείας κάθε χώρας, το οποίο καλείται να καλύψει οικονομικά όλες αυτές τις περιπτώσεις. Το κόστος αυτό στις ΗΠΑ ανέρχεται στο ποσό των 500 εκατομμυρίων δολαρίων το χρόνο <sup>(177)</sup>.

Η παθολογοανατομική εξέταση είναι σε θέση να καταδείξει παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκινώματος του μαστού και επιπλέον να δώσει χρήσιμες πληροφορίες στον παθολόγο-ογκολόγο, που αφορούν στον καλύτερο θεραπευτικό χειρισμό της νόσου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια την αύξηση της δεκαετούς επιβίωσης των ασθενών με μεταστάσεις (που θα υποβληθούν σε χημειοθεραπεία κατά 20-30% <sup>(25,30,53,54,74,140,177)</sup>).

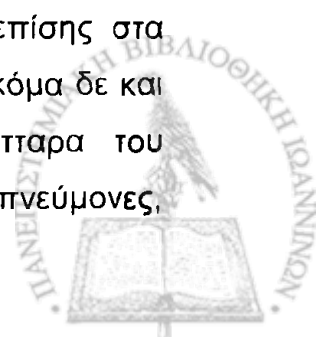


Υπάρχουν ιστολογικές παράμετροι, οι οποίες προκύπτουν από την απλή ιστολογική εξέταση του όγκου (σε τομές αιματοξυλίνης-ηωσίνης), οι οποίες είναι σε θέση να καθορίσουν την βιολογική συμπεριφορά του όγκου και αποτελούν χρήσιμες προγνωστικές παραμέτρους. Οι σπουδαιότερες από αυτές είναι το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοήθειας (grade), η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων και δευτερευόντως, ο τύπος του καρκινώματος, η ύπαρξη νέκρωσης, η λεμφοκυτταρική ή η σκιρρώδης αντίδραση, η διήθηση αγγείων και η ύπαρξη ή μη *in situ* καρκινώματος. Ασφαλώς μεγάλη βοήθεια προσφέρει η ανοσοιστοχημική μελέτη των δεικτών ή του ορμονικού status του νεοπλασματος.

Παρόλα αυτά όλες οι παραπάνω ιστολογικές παράμετροι και οι βιολογικοί δείκτες, δεν αποτελούν ένα έκαστο ανεξάρτητους παράγοντες που μπορούν να προδικάσουν την βιολογική συμπεριφορά ενός όγκου. Για τον λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια καταβάλλεται μεγάλη προσπάθεια για την ανακάλυψη και καθιέρωση βιολογικών δεικτών ικανών να προσφέρουν περισσότερες πληροφορίες για την πρόβλεψη και την πρόγνωση του καρκινώματος του μαστού.

Μεγάλη συζήτηση γίνεται τα τελευταία χρόνια για την προθυμοσίνη-α (ProTa) ως βιολογικού και προγνωστικού δείκτη σε διάφορα καρκινώματα και πρωτίστως στο καρκίνωμα του μαστού. Η προθυμοσίνη α είναι ένα βιολογικώς ενεργό πεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από 109 αμινοξέα<sup>(98)</sup>. Είναι όξινο πολυπεπτίδιο 12,5kDa<sup>(14)</sup>. Περιέχει ένα καρβοξυλικό και ένα αμινοτελικό άκρο. Στο τελευταίο περιέχεται και η θυμοσίνη α1 (Ta1)<sup>(66)</sup>, που αποτελεί τμήμα της αλληλουχίας 1-28<sup>(98)</sup>.

Η προθυμοσίνη α (ProTa) ανευρίσκεται στα κύτταρα των περισσότερων θηλαστικών<sup>(22)</sup> κυρίως δε στα λεμφοκυττογόνα όργανα, όπως είναι ο θύμος, ο σπλήνας, οι λεμφαδένες και οι αμυγδαλές. Συγκεκριμένα ανευρίσκεται τόσο στον φλοιό<sup>(66)</sup> όσο και στον μυελό του θύμου αδένος<sup>(14,16,84,143)</sup>, στον λευκό πολφό του σπλήνα<sup>(66,71,143)</sup>, στα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων και των αμυγδαλών<sup>(73)</sup>, στα περιφερικά κύτταρα του αίματος<sup>(20)</sup>, στα μονοκύτταρα (όπου παρατηρούνται δύο θέσεις πρόσδεσης της ProTa)<sup>(32)</sup>, επίσης στα λεμφοκύτταρα<sup>(66,133)</sup> και ιδίως στα CD3, CD4 και CD8<sup>(20,32,174)</sup>, ακόμα δε και στα πολυμορφοπύρρηνα<sup>(89)</sup>. Η ProTa ανευρίσκεται στα κύτταρα του ωοθηλακίου (θήκης και κοκκιοκύτταρα)<sup>(16,144)</sup>, στο ήπαρ, στους πνεύμονες,



στους νεφρούς και τον εγκέφαλο <sup>(31,48,84)</sup>, στους όρχεις <sup>(48)</sup>, στην κοκκώδη στιβάδα του φλοιού των επινεφριδίων <sup>(75)</sup>, σε εμβρυικά κύτταρα του μεσοδέρματος <sup>(47,67)</sup>, ακόμα δε και σε καρκινώματα, όπως του παχέος εντέρου <sup>(74, 147)</sup>, του θυρεοειδούς <sup>(101)</sup>, της ουροδόχου κύστεως <sup>(154,161)</sup>, του ήπατος <sup>(180)</sup> αλλά και του προστάτη <sup>(147)</sup>. Σε ό,τι αφορά τον προστάτη, παρατηρήθηκε μια κλιμακούμενη ποσοτικά παρουσία της ProTa στην υπερπλασία, τον βαθμό της ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (PIN) και του διηθητικού καρκινώματος <sup>(147)</sup>.

Ιδιαίτερως έχει μελετηθεί η παρουσία της ProTa τόσο στον φυσιολογικό μαστό <sup>(24,38,69,98)</sup>, όσο και στον καρκίνο του μαστού <sup>(38,43,98)</sup> με διάφορες μεθόδους. Μάλιστα, με ανοσοενζυματική μέθοδο, μετρήθηκε στον ορό του αίματος η ProTa τόσο σε υγιή όσο και σε άτομα πάσχοντα από καρκίνωμα του μαστού και οι ανευρεθείσες τιμές ήταν 1,02mg/ml και 1,27mg/ml αντιστοίχως <sup>(38)</sup>. Είναι γνωστό ότι στην ProTa αποδίδονται πολλές και διάφορες πολύπλοκες βιολογικές ιδιότητες και δραστηριότητες που σχετίζονται με διάφορες πυρηνικές και κυτταρικές ενγένηι λειτουργίες, που όμως η ακριβής εμπλοκή σε αυτές και η σαφής δράση της ProTa παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη <sup>(42,55)</sup>. Θεωρείται ότι η έκφραση της ProTa ρυθμίζεται από το αντίστοιχο γονίδιο (ProTa gene), το οποίο βρέθηκε τόσο σε εμβρυικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα διαφόρων ώριμων ιστών <sup>(22,24,67,163)</sup>, ενώ η ίδια βρέθηκε να είναι πολλαπλώς συνδεδεμένη με το tRNA καθώς και με διάφορες ιστόνες <sup>(69,127)</sup> όπως είναι η H1 και H2A και η H3.

Όλοι σχεδόν οι ερευνητές τονίζουν τον ουσιαστικό ρόλο της ProTa στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό <sup>(14,15,22,24,29,42,43,47,48,55,98,101,107, 110,125,131,156,164,167)</sup>, τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα νεοπλασματικά κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται είτε άμεσα δια του μεταβολισμού του DNA και της ρύθμισης του κύκλου <sup>(69)</sup>, είτε έμμεσα, δια της εμπλοκής της ProTa στην διαδικασία της απόπτωσης. Θεωρείται δηλαδή ότι η ProTa προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση και το αντιοξειδωτικό stress <sup>(59)</sup> καθότι και η ProTa σχηματίζει συμπλέγματα με την πρωτεΐνη P8 (small stress P8), η οποία ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση <sup>(109,150)</sup>.

Παράλληλα, η ProTa λειτουργεί και σαν ογκογονίδιο δεσμεύοντας την δράση της Κασπάσης 1 με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης <sup>(125)</sup>.

Άλλοι δε θεωρούν <sup>(101)</sup> ότι η εμπλοκή της ProTa στην διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης γίνεται δια μέσου της ενεργοποίησης του

αντιαποπτωτικού ογκογονιδίου bcl 2. Θεωρείται επίσης ότι η ProTa έχει ρόλο και στην κυτταρική διαφοροποίηση<sup>(47,48,164)</sup>.

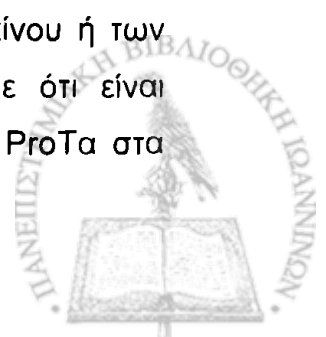
Πολύ μεγάλος λόγος γίνεται για την συμμετοχή της ProTa στην ανοσολογική αντίδραση και την αντινεοπλασματική δράση που εκφράζεται με την παρουσία της σε διάφορα κύτταρα του οργανισμού.

Θεωρείται ότι η ProTa λαμβάνει μέρος στην ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού στα της ενεργοποίησης των CD4+ και CD8+ T λεμφοκυττάρων<sup>(20,96,111,146)</sup>. Αυξάνει την δραστηριότητα των NK κυττάρων<sup>(20,104,151)</sup> δια της σύνθεσης της ιντερλευκίνη 2. Αυτή η συνέργεια της ProTa με την ιντερλευκίνη 2 έχει αποδειχθεί σε διάφορα νεοπλάσματα<sup>(172)</sup>. Τονίζεται επίσης η αντινεοπλασματική δράση της ProTa που επιτελείται με την φαγοκύτωση και την παραγωγή κυττοκινών<sup>(74)</sup> ή με αύξηση της κυτταροτοξικότητας των CD4+ Τα λεμφοκυττάρων<sup>(172)</sup>. Η επίδραση της ProTa στην αύξηση της κυτταροτοξικότητας έχει μελετηθεί σε διάφορα νεοπλάσματα όπως είναι το μελάνωμα, το καρκίνωμα του παχέος εντέρου και το καρκίνωμα του μαστού<sup>(89)</sup>. Αποδείχθηκε επίσης ότι η ProTa προκαλεί αύξηση του Παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF) που παράγεται από τα περιφερικά κύτταρα του αίματος σε περίπτωση νεοπλασίας<sup>(69)</sup>. Το ίδιο έχει τεκμηριωθεί και πειραματικώς, όταν ενίεται ενδοπεριτοναϊκώς ProTa προστατεύει τα ποντίκια από τη δράση των L1210 σειράς λευχαιμικών κυττάρων μέσω της πρόκλησης TNF<sup>(20)</sup>.

Άλλοι ερευνητές τέλος βρήκαν ότι η ProTa σχετίζεται με τη δράση του ογκογονιδίου c-myc<sup>(105)</sup>.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την έκφραση της ProTa στο καρκίνωμα του μαστού και την συσχετίσαμε με διάφορες ιστολογικές και κλινικές παραμέτρους, όπως είναι ο τύπος του καρκινώματος, το μέγεθος (T), τον βαθμό κακοήθειας-grade (G), η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων (N), οι μεταστάσεις σε άλλα όργανα (M), με την έκφραση των οιστρογόνων στα καρκινικά κύτταρα και τέλος με τη βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος (υποτροπές, επιβίωση).

Σε ότι αφορά την κατανομή της ProTa στα κύτταρα του καρκίνου ή των υγιών ιστών που συμπεριλαμβάνονται στη βιοψία, θα λέγαμε ότι είναι εμφανής η προέχουσα σε ποσότητα και ένταση η έκφραση της ProTa στα κύτταρα του καρκίνου.



Δευτερευόντως και με μικρότερη θετικότητα και έκταση η ProTa εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα των πόρων και των λοβίων εστιακά, στα λεμφοκύτταρα, τα πλασματοκύτταρα και ιστιοκύτταρα που βρέθηκαν να συνυπάρχουν στο βιοπτικό υλικό με το καρκίνωμα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η ProTa φαίνεται από διάφορες μελέτες να εκφράζεται σε μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων, διαφόρων οργάνων και μέσα σε αυτά, στα καλοήθη και κακοήθη κύτταρα του μαζικού αδένα<sup>(24,38,98)</sup>.

Μεγάλη συζήτηση γίνεται στη βιβλιογραφία αναφορικά με την εντόπιση και την έκφραση της ProTa στο κύτταρο και ιδιαίτερος αν αυτή είναι πυρηνική ή πρωτοπλασματική.

Ένας μεγάλος αριθμός ερευνητών<sup>(16,29,43,72,112,156,157,175)</sup> θεωρούν ότι η ProTa εντοπίζεται στον πυρήνα, όχι όμως στον πυρηνίσκο<sup>(75,164)</sup>. Ορισμένοι μάλιστα<sup>(165)</sup> θέλουν την ProTa να εντοπίζεται στην πυρηνική άτρακτο κατά τη διάρκεια της μιτωτικής διαδικασίας.

Πολλοί ερευνητές αντίθετα, θεωρούν ότι η εντόπιση της ProTa είναι πρωτοπλασματική<sup>(13,55,56,85,108)</sup>, βρήκαν μάλιστα ότι είναι συνδεδεμένη με μικρό κυτταροπλασματικό RNA<sup>(162,167,168)</sup>.

Τέλος άλλη μερίδα ερευνητών θεωρούν ότι η έκφραση της ProTa είναι μικτή, δηλαδή και πυρηνική και πρωτοπλασματική<sup>(22,31,55,174)</sup>.

Εμείς στη δική μας μελέτη βρήκαμε ότι η ProTa εκφράζεται άλλοτε στον πυρήνα (66 περιπτώσεις- πίνακας 11) και άλλοτε στο πρωτόπλασμα (55 περιπτώσεις). Σπανιότερα η έκφραση της ProTa ήταν μικτή (πυρήνας και πρωτόπλασμα) και τις λίγες αυτές περιπτώσεις όπως αναφέρθηκε στο «υλικό και μέθοδοι» για στατιστικούς καθαρά λόγους δεν τις συμπεριλάβαμε στη μελέτη. Θα πρέπει να τονίσουμε εδώ ότι ασυμφωνία μεταξύ των διαφόρων ερευνητών και ημών σε ότι αφορά την έκφραση της ProTa σε κυτταρικό επίπεδο (πυρήνας ή πρωτόπλασμα), οφείλεται πρωτίστως στους διαφορετικούς τρόπους (μεθόδους) ανίχνευσης της ProTa (βιολογικοί, ανοσολογικοί, ραδιολογικοί κ.α.) που έγιναν κυρίως σε τμήματα καρκινικών ιστών στην συντριπτική τους πλειονότητα και όχι με ανοσοϊστοχημική μέθοδο σε τομές παραφίνης (όπως η δική μας μελέτη) την οποία ακολούθησαν ελάχιστοι ερευνητές. Το σημαντικότερο όμως απ'όλα, θεωρούμε ότι είναι ο τρόπος παρασκευής του αντισώματος της ProTa. Ενώ κατά παράδοση οι

περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποίησαν αντίσωμα παρασκευασμένο από το αμινοτελικό άκρο (NH<sub>2</sub>-terminal) της ProTa<sup>(158)</sup>, το δικό μας αντίσωμα κατασκευάστηκε (βλέπε «υλικό και μέθοδοι») με βάση το καρβοξυλικό άκρο (-COOH-terminal) της ProTa, αντίσωμα δηλαδή που θεωρείται ότι έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα<sup>(98)</sup>.

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών παγκοσμίως, οι οποίες αναφέρονται στην προέλευση, τη χημική σύσταση και δομή της ProTa, την βιολογική της δράση και τη σχέση της με διάφορες νεοπλασίες στις οποίες έχουμε ήδη εκτενώς αναφερθεί. Όλες όμως αυτές οι μελέτες, βασίζονται σε διάφορες βιοχημικές, βιολογικές ή ραδιοανοσολογικές μεθόδους. Οι περισσότερες από αυτές επίσης πραγματοποιήθηκαν *in vitro* και λιγότερες *in vivo* σε πειραματόζωα ή ανθρώπινο βιολογικό υλικό (ορός αίματος, όργανα, ιστούς). Ελάχιστες αναφέρονται σε μελέτες που έγιναν στο καρκίνωμα του μαστού<sup>(22,43,89,98,108,156,159)</sup>. Οι πλέον αξιόλογες εξ αυτών<sup>(43,98,108,159)</sup> μπορούν να αποτελέσουν σημείο συζήτησης με τα ευρήματα της δικής μας μελέτης. Εν τούτοις όμως δεν είναι δυνατόν να γίνει παράλληλη σύγκριση με τα δικά μας αποτελέσματα επειδή οι μελέτες έχουν μεν παρόμοιους στόχους (πχ. Την ProTa ως προγνωστικό παράγοντα) όμως ξεκινούν από διαφορετική αφετηρία και έχουν διαφορετικά σημεία αναφοράς. Η σημαντικότερη διαφορά είναι ότι οι μελέτες αυτές έγιναν με την ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA), ενώ η δική μας πραγματοποιήθηκε με βάση την ανοσοϊστοχημική μέθοδο.

Οι Dominguez και συν<sup>(43)</sup> μελετώντας τα επίπεδα της ProTa στον καρκινικό ιστό 71 ασθενών με όριο τα 124 ng/1gr πρωτεΐνης βρήκαν ότι, ασθενείς με επίπεδα ProTa κάτω από αυτό το όριο παρουσιάζουν αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες σε μεγάλο ποσοστό (57%) και μόνο το 18% από αυτούς παρουσίαζαν μεταστάσεις σε πάνω από 4 μασχαλιαίους λεμφαδένες (N<sub>2</sub>). Επίσης (το 51%) οι μισοί από τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ProTa δεν παρουσίασαν υποτροπές, ενώ κανείς από αυτούς δεν είχε μεταστάσεις (M<sub>0</sub>) σε άλλο όργανο. Αντιθέτως τα 82,6% των ασθενών με επίπεδα ProTa μεγαλύτερα των 124ng, είχαν πορογενή καρκινώματα grade III και όλοι παρουσίαζαν μεταστατική νόσο (M).

Σε νεώτερη μελέτη οι ίδιοι συγγραφείς<sup>(108)</sup> μελέτησαν πάλι με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) την τιμή της ProTa σε 200 ασθενείς με πορογενές καρκίνωμα του μαστού. Όρισαν τα επίπεδα της ProTa σε μικρό (0-





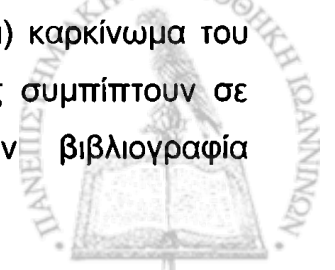
20ng ProTa/1gr πρωτεΐνης) σε μέτριο (20-100ng) και υψηλό (πάνω από 100ng), όπου αντιστοιχούσαν σε 34, 122 και 54 ασθενείς αντιστοίχως, κατέληξαν στα εξής συμπεράσματα:

1. Δεν σχετίζονται τα επίπεδα της ProTa στον καρκινικό ιστό με στατιστικώς σημαντική διαφορά όταν συγκριθούν με τη μέγιστη διάμετρο του όγκου που ορίσθηκε ως  $\leq 2$  εκ. ή  $> 2$  εκ.
2. Μόνο τέσσερις ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ProTa (4/67) παρουσίαζαν μεταστάσεις σε πάνω από 4 μασχαλαίους λεμφαδένες (N2).
3. Μόνο 5 περιπτώσεις (5/10) των grade I καρκινωμάτων παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο ProTa
4. Μόνο 6 ασθενείς (6/19) με grade III καρκινώματα παρουσίαζαν χαμηλό επίπεδο ProTa
5. Μόνο ένα καρκίνωμα με διπλό ειδικό DNA είχε υψηλά επίπεδα ProTa
6. Αντιθέτως μόνο πέντε καρκινώματα (5/56) με χαμηλά επίπεδα ProTa ήταν ανευπλοειδικά.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο (RIA) οι Tsitsilonis και συν.<sup>(159)</sup> κατέληξαν στα ίδια αποτελέσματα, υπό την έννοια ότι τα υψηλά επίπεδα της Προθυμοσίνης α στον καρκινικό ιστό σχετίζονται με υψηλό grade του καρκινώματος καθώς επίσης με μικρότερο χρόνο επιβίωσης των ασθενών.

Η Κωστοπούλου και συν.<sup>(98)</sup> τέλος βρήκαν πως ο καρκινικός ιστός περιέχει 12πλάσια επίπεδα ProTa συγκρινόμενος με τον πέριξ του καρκίνου φυσιολογικό μαζικό αδένα. Στην ίδια μελέτη γίνεται και προσπάθεια ανοσοϊστοχημικής εκτίμησης της ProTa στα καρκινικά κύτταρα, που όμως λόγω του ελάχιστου υλικού (10 περιπτώσεις) δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

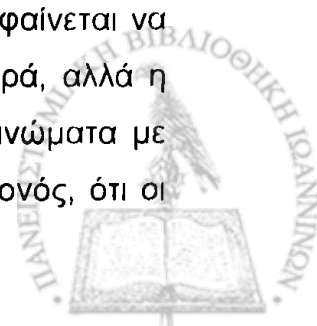
Από τους 150 ασθενείς που περιλαμβάνονται στη μελέτη μας, οι 114 (ποσοστό 76%) αφορούν σε πορογενές διηθητικό μη ειδικού τύπου (NST) πορογενές καρκίνωμα μαστού, οι 16 (ποσοστό 10,7%) σε ειδικού τύπου πορογενές καρκίνωμα, οι 10 (ποσοστό 6,7%) σε λοβιακό καρκίνωμα και τέλος οι υπόλοιπες 10 (6,7%) σε πορογενές μη διηθητικό (in situ) καρκίνωμα του μαστού. Αν και τα ποσοστά του διηθητικού καρκινώματος συμπίπτουν σε γενικές γραμμές με εκείνα που αναφέρονται στην βιβλιογραφία



(2,122,140,155,177,178), (παρόλο που το υλικό μας, όπως αναφέρεται στο «υλικό και μέθοδοι» δεν είναι απολύτως τυχαίοποιημένο) τα ποσοστά του *in situ* πορογενούς καρκινώματος βρίσκονται σε αρκετά χαμηλό επίπεδο (6,7%) από δική μας επιλογή (πίνακας δεδομένων, πίνακας 5).

Είναι γεγονός ότι το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοήθειας και η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων είναι εκείνα που καθορίζουν πρωτίστως την βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος του μαστού και όχι μόνον αυτού. Εξίσου σημαντικός όμως είναι και ο τύπος του καρκινώματος για την πρόγνωση του καρκινώματος υπό την έννοια του ειδικού ή μη ειδικού (NST) τύπου του πορογενούς καρκινώματος. Οι περισσότεροι ειδικοί τύποι που ονομάζονται και τύποι καλής πρόγνωσης, συνδυάζονται τις περισσότερες φορές με άριστη βιολογική συμπεριφορά (2,23,25,51,62,116,122,129,139,140,155,177,178).

Από τα 16 ειδικού τύπου πορογενή καρκινώματα του υλικού μας, τα 11 έδειξαν πυρηνική έκφραση της ProTa, ενώ τα 4 πρωτοπλασματική. Από τα τελευταία τα 3 αφορούσαν σε μυελοειδή καρκινώματα που εξ ορισμού παρουσιάζουν υψηλό βαθμό κακοήθειας (grade III). Επίσης τα περισσότερα από τα ειδικού τύπου πορογενή καρκινώματα παρουσίαζαν αυξημένη θετικότητα σε οιστρογονικούς υποδοχείς (διάγραμμα 9, πίνακας δεδομένων), τα περισσότερα επίσης είχαν μικρότερη μ.δ. από τα υπόλοιπα καρκινώματα (διάγραμμα 11,14, πίνακας δεδομένων), ενώ ταυτόχρονα παρουσίαζαν λιγότερη τάση μετάστασης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες απ' ότι τα άλλα καρκινώματα (πίνακας δεδομένων 14, διάγραμμα 8). Αντιστρόφως, τα καρκινώματα με πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa έδειχναν να έχουν μεγαλύτερη μ.δ. (πίνακας 7), μεγαλύτερο grade (διάγραμμα 14) και αυξημένο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων (διάγραμμα 15). Όλα τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα πέραν της έκφρασης της ProTa που δεν αναφέρεται ειδικώς για τα καρκινώματα αυτού του τύπου στην προσιτή σε μας βιβλιογραφία (5,12,25,41,122,132,136,140,156,177,179,180). Παρά το γεγονός ότι τόσο βιβλιογραφικά όσο και από το δικό μας υλικό φαίνεται (Π.Δ.) ότι τα καλής πρόγνωσης καρκινώματα παρουσιάζουν καλύτερη βιολογική συμπεριφορά, εν τούτοις η στατιστική μελέτη (διάγραμμα 11) δε φαίνεται να δείχνει στατιστικώς σημαντική διαφορά στη βιολογική συμπεριφορά, αλλά η μοναδική στατιστική ένδειξη είναι ότι τα καλής πρόγνωσης καρκινώματα με χαμηλό grade (διάγραμμα 6). Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός, ότι οι



περιπτώσεις που πληρούσαν όλα τα δεδομένα για στατιστική αξιοποίηση ήταν ελάχιστες στο σύνολο του υλικού (Π.Δ.).

Από τους μη ειδικούς τύπους του πορογενούς διηθητικού καρκινώματος, έκφραση της Προθυμοσίνης α φαίνεται να είναι στατιστικώς σημαντική για όλους τους εξεταζόμενους παράγοντες εκτός της πορείας της νόσου (παρακολούθηση) (γράφημα 12). Από τα 77 πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου (NST) τα 44 έδειξαν πυρηνική και τα 43 πρωτοπλασματική έκφραση της Προθυμοσίνης α. Όπως προκύπτει από διάφορους πίνακες και την στατιστική μελέτη, πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa συνδέεται με μεγάλη μ.δ. του όγκου (διάγραμμα 8), με υψηλό βαθμό κακοήθειας (διάγραμμα 9), με αυξημένο αριθμό μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (διάγραμμα 10), καθώς επίσης συνοδεύεται και από χαμηλό βαθμό έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων του όγκου (διάγραμμα 11).

Και στα λοβιακά καρκινώματα, όπου η πυρηνική και η πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa ήταν σε 6 και 4 αντιστοίχως περιπτώσεις, η βιολογική συμπεριφορά του όγκου δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά, ενώ αντίθετα η πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa ακολουθείται από αυξημένο grade του καρκινώματος (διάγραμμα 12). Εκ των λοιπών παραγόντων, όπως είναι η μέγιστη διάμετρος (μ.δ.) του όγκου, η θετικότητα σε οιστρογονικούς υποδοχείς και ο αριθμός των θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων, δε φαίνεται να δίνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Από τις λοιπές ιστοπαθολογικές παραμέτρους, σημαντική προγνωστική αξία παρουσιάζει ο βαθμός κακοήθειας του όγκου (grade). Στο δικό μας υλικό από τα 140 διηθητικά καρκινώματα, τα 33 (ποσοστό 22%) ήταν grade I, τα 56 (37,3%) ήταν grade II και τα υπόλοιπα 51 (34%) ήταν grade III (πίνακας 2). Για την εξυπηρέτηση της στατιστικής μελέτης τα ποσοστά αυτά διαμορφώθηκαν σε 25,7%, 40,7% και 33,6% αντιστοίχως (πίνακας δεδομένων, τελικός πληθυσμός). Για την εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας, εμείς χρησιμοποιήσαμε την τροποποιημένη μέθοδο των Bloom και Richardson που ακολουθεί και η παγκόσμια οργάνωση υγείας και τα περισσότερα κέντρα στον κόσμο <sup>(122,140,177,178)</sup>. Το σύστημα αυτό βασίζεται σε τρεις άξονες:

- a. Την αρχιτεκτονική του όγκου
- b. Την κυτταρική ατυπία



c. Τον αριθμό των μιτώσεων .

Παρά το ότι το σύστημα αυτό φαίνεται να είναι αντικειμενικό και αναπαραγωγίμο, εν τούτοις, σε πολλές μελέτες αποδείχθηκε ότι υπάρχει από μικρή έως σημαντική ασυμφωνία στα ποσοστά ανάμεσα στους τρεις βαθμούς κακοήθειας. Έτσι για το grade I η συμφωνία κυμαίνεται από 3-33%, για το grade II από 23-52% και για το grade III από 25-67%<sup>(140,155,177,178)</sup>. Χαρακτηριστικώς οι πρώτοι διδάξαντες (Bloom και Richardson) κατένειμαν τα grade I, II, III σε 25%,45%,29%, αντιστοίχως, μελετώντας έναν μεγάλο αριθμό καρκινωμάτων.

Στη συνέχεια οι Elston και Ellis χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα ελαφρώς τροποποιημένο δίνουν ποσοστά 19%, 34% και 47% αντίστοιχα. Είναι φανερό ότι η αντικειμενικότητα και η αναπαραγωγικότητα του grade αυξάνει, όσο ο εξετάζων Παθολογοανατόμος είναι έμπειρος και όσο το Τμήμα είναι περισσότερο εξειδικευμένο στο καρκίνωμα του μαστού. Υπάρχει μια αντιστοιχία μεταξύ ιστολογικού βαθμού κακοήθειας (grade) του καρκινώματος και της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου. Όλες οι μελέτες δείχνουν ότι, όσο πιο ψηλό είναι το grade του καρκινώματος τόσο μικρότερη είναι η επιβίωση των ασθενών<sup>(122,140,155,177,178)</sup>. Αυτό φαίνεται και από τη δική μας μελέτη, όπου από τα 33 καρκινώματα grade I, είχαμε μόνο 5 υποτροπές και κανένα θάνατο στα 15 χρόνια παρακολούθησης. Αντίθετα στα grade III καρκινώματα είχαμε 5 θανάτους και 12 υποτροπές (πίνακας 5-6 και πίνακας δεδομένων).

Επίσης όπως φαίνεται από τον πίνακα 4 και τον πίνακα δεδομένων της στατιστικής ανάλυσης, μόλις 5 από τα 33 grade I καρκινώματα είχαν μ.δ. μεγαλύτερη από 2εκ., ενώ αντίθετως μόλις 10 καρκινώματα grade III είχαν διάμετρο μικρότερη από 2εκ. Όπως φαίνεται επίσης από στατιστική μελέτη (γράφημα 7), υπάρχει μια σχέση στατιστικής σημαντική μεταξύ χαμηλού grade καρκινώματος και μικρής μεγίστης διαμέτρου του όγκου.

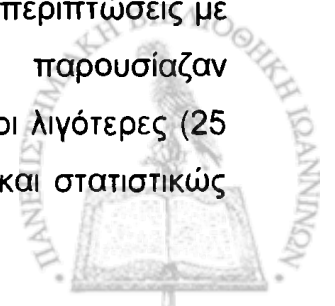
Επίσης με την ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης της στατιστικής μελέτης φαίνεται πως στα καρκινώματα grade I και II η μ.δ. του όγκου αυξάνεται αναλόγως με τον αριθμό διηθημένων λεμφαδένων της μασχάλης, πράγμα που δεν συμβαίνει στα καρκινώματα που παρουσιάζουν ιστολογικό βαθμό κακοήθειας III. Επίσης η ίδια ανάλυση δείχνει πως καρκινώματα με υψηλό grade και μεγάλη μ.δ. συνδυάζονται με μεγαλύτερη τάση μετάστασης



(N), κυρίως όμως παρουσιάζουν περισσότερες περιπτώσεις με περισσότερους από 3 μεταστατικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες (N2).

Από τα 113 καρκινώματα του τελικού πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση τα 62 παρουσίαζαν πυρηνική έκφραση της ProTa και τα 51 πρωτοπλασματική. Παρατηρούμε επίσης ότι υπάρχει μια στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ grade III καρκινωμάτων και πρωτοπλασματικής έκφρασης της ProTa, ενώ αντίθετα η πυρηνική έκφραση της ProTa συνδυάζεται με καρκινώματα grade I. Αυτό φαίνεται καθαρά και από την μελέτη του πίνακα 8 και του πίνακα δεδομένων, όπου βρίσκουμε ότι μόνο 5 από τα 24 καρκινώματα grade I είχαν πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa και επίσης 10 από τα 28 καρκινώματα grade III έδειχναν να έχουν πυρηνική έκφραση.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την πρόγνωση του καρκινώματος του μαστού είναι η μέγιστη διάμετρος (μ.δ.) του όγκου. Η μέγιστη διάμετρος μετριέται με ακρίβεια σε χιλιοστά επί του πλακιδίου της αιματοξυλίνης-ηωσίνης, και αν είναι δυνατόν να μετριέται χωριστά το διηθητικό στοιχείο και χωριστά το *in situ* εάν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των δύο συστατικών, αλλιώς εφόσον υπάρχει ανάμιξη γίνεται μια μέτρηση, η οποία ονομάζεται και «μικτή» διάμετρος. Είναι γεγονός ότι η μ.δ. του όγκου, που καθορίζει και το στάδιο (T) του όγκου δεν μπορεί να αποτελεί από μόνη της ανεξάρτητο παράγοντα πρόγνωσης. Ωστόσο όπως φαίνεται και από τον προγνωστικό δείκτη του Nottingham που επινόησαν οι Elston και Ellis <sup>(51,52,54)</sup> βαθμολογείται με μεγάλο συντελεστή. Όλοι θεωρούν ότι ο όγκος με μεγάλη μ.δ. παρουσιάζουν και χειρίστη βιολογική συμπεριφορά καθώς και κακή πρόγνωση <sup>(5,12,25,51,87,116,140,155,177,178)</sup>. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στη δική μας μελέτη, όγκοι με μεγάλη διάμετρο συνοδεύονταν και από αυξημένο αριθμό λεμφαδενικών μεταστάσεων, ενώ οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν και αυξημένο grade. Σε ότι αφορά την έκφραση της ProTa, οι περισσότεροι όγκοι με μικρή διάμετρο 41 περιπτώσεις παρουσίαζαν πυρηνική έκφραση, ενώ λιγότεροι (16 περιπτώσεις) παρουσίαζαν πρωτοπλασματική εντόπιση. Αντιθέτως από τις περιπτώσεις με μεγάλη μέγιστη διάμετρο του όγκου, οι περισσότερες παρουσίαζαν πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa (40\_περιπτώσεις) και οι λιγότερες (25 περιπτώσεις) πυρηνική (πίνακας δεδομένων). Αυτό φαίνεται και στατιστικώς

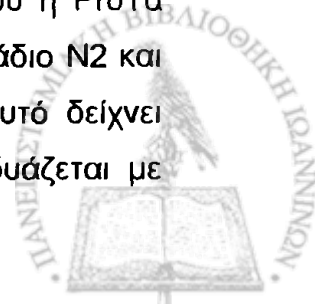


(γράφημα 1,12), όπου η πρωτοπλασματική χρώση παρουσιάζει μια στατιστικώς σημαντική σχέση με την αυξημένη μεγίστη διάμετρο του όγκου.

Ο τέταρτος και σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την πρόγνωση του καρκινώματος του μαστού είναι η ύπαρξη ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων συνήθως στην περιοχή της μασχάλης. Εδώ και πολλά χρόνια έχει δειχθεί ότι η ύπαρξη μασχαλιαίων μεταστάσεων αποτελεί δυσμενές στοιχείο στην επιβίωση των ασθενών. Όπως είναι γνωστό η σταδιοποίηση των μασχαλιαίων μεταστάσεων διακρίνεται σε N0 (χωρίς μεταστάσεις), N1 (1-3 μεταστατικοί λεμφαδένες), N2 (4-14 μεταστατικοί λεμφαδένες) και N3 (περισσότεροι από 14 μεταστατικοί λεμφαδένες). Εμείς για λόγους στατιστικής διευκόλυνσης χρησιμοποιήσαμε τα τρία πρώτα στάδια, επειδή το N3 ήταν σπανιότατο. Οι περισσότερες περιπτώσεις (65 ασθενείς) βρίσκονταν στο N0 στάδιο, λιγότεροι στο N1 (44 ασθενείς) και ακόμα πιο λίγοι στο στάδιο N2 (31 ασθενείς). Η πιθανότητα ύπαρξης μεταστάσεων και ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων σχετίζονται άμεσα με το μέγεθος του όγκου και του βαθμού ιστολογικής κακοήθειας (grade).

Από την στατιστική μελέτη και την ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης, αποδείχθηκε πράγματι και στο δικό μας υλικό ότι οι δύο προαναφερθέντες παράγοντες σχετίζονται με τη μεταστατικότητα του όγκου. Πράγματι βλέπουμε (γράφημα 18) ότι όσο πιο μεγάλη είναι η διάμετρος του όγκου ή όσο πιο μεγάλο είναι το grade του καρκινώματος, τόσο αυξάνονται οι περιπτώσεις με μετάσταση στους λεμφαδένες. Έδειξε επίσης ότι ο συνδυασμός μεγίστης διαμέτρου και grade αντιστοιχεί σε ασθενείς με μασχαλιαίες μεταστάσεις που βρίσκονται στο στάδιο N2 (>4 διηθημένοι λεμφαδένες).

Συσχετίζοντας την έκφραση της ProTa με την ύπαρξη ή μη μασχαλιαίων μεταστάσεων παρατηρούμε ότι (όπως προκύπτει από τον πίνακα δεδομένων και το γράφημα 3) η πλειονότητα των ασθενών χωρίς μεταστάσεις (59 ασθενείς) παρουσιάζουν πυρηνική έκφραση της ProTa (N0), ενώ μόνο σε 5 από αυτούς (με πυρηνική έκφραση) βρέθηκε να έχουν μασχαλιαίες μεταστάσεις σταδίου N2. Αντιθέτως οι περισσότεροι ασθενείς που η ProTa είχε πρωτοπλασματική έκφραση (19 ασθενείς) βρίσκονταν στο στάδιο N2 και μόνο 14 ασθενείς δεν παρουσιάζουν μεταστατική νόσο (N0). Αυτό δείχνει ευθέως (γράφημα 3) ότι η πυρηνική έκφραση της ProTa συνδυάζεται με

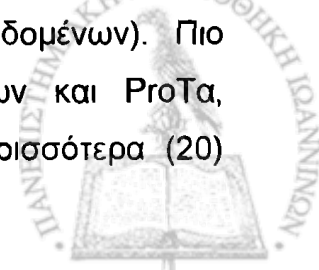


αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, ενώ αντιθέτως η πρωτοπλασματική συνδυάζεται με αυξημένο αριθμό μασχαλιαίων μεταστάσεων.

Εξετάζοντας τέλος την Προθυμοσίνη α ως ανεξάρτητο παράγοντα σε σχέση με την πορεία των ασθενών (Παρακολούθηση) παρατηρούμε ότι: όλοι οι ασθενείς που κατέληξαν από την νόσο (7 στο σύνολο του πληθυσμού) είχαν, εκτός των άλλων, καρκινώματα των οποίων τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την ProTa στο πρωτόπλασματά τους. Επίσης οι 12 από τις 14 περιπτώσεις με μεταστατική νόσο παρουσίαζαν επίσης πρωτοπλασματική έκφραση της Προθυμοσίνης α. Και ενώ αυτή η διαφορά μεταξύ πρωτοπλασματικής έκφρασης της θυμοσίνης και θανάτου ή μεταστάσεων είναι εμφανή στους πίνακες ταυτότητας έρευνα και σύνολο του πληθυσμού, εντούτοις, στην στατιστική ανάλυση με το κριτήριο Somers, λόγω του μικρού αριθμού καταγραφών στο σύνολο του πληθυσμού, δεν μας δίνει στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

Θεωρήσαμε σκόπιμο να αφήσουμε τελευταίο για συζήτηση τη σχέση μεταξύ οιστρογόνων και ProTa που προκύπτει από την μελέτη του υλικού μας. Έχει βρεθεί ότι η ProTa επηρεάζει την δράση των οιστρογόνων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο καρκίνωμα του μαστού <sup>(113,156)</sup>. Η δράση αυτή της Προθυμοσίνης α προκύπτει αφενός μεν με την κωδικοποίηση του ProTa mRNA, το οποίο αυξάνει έξη φορές περισσότερο την ποσότητα της ProTa στο καρκινικό κύτταρο, το οποίο παρουσιάζει θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων και αφετέρου με τη ρύθμιση της REA (Repressor of Estrogen Receptor Activity), η οποία με την σειρά της αυξάνει τη δράση των οιστρογόνων στο καρκινικό κύτταρο <sup>(112,114)</sup>. Αντιστρόφως τα οιστρογόνα θεωρείται ότι ρυθμίζουν την αντιγραφική δραστηριότητα (Transcription Activity) του γονιδίου της Προθυμοσίνης α<sup>(22)</sup>. Από τις 140 περιπτώσεις καρκινωμάτων του υλικού μας, οι 66 (ποσοστό 47%) παρουσιάζουν θετικότητα στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Το ποσοστό αυτό της θετικότητας συμπίπτει με εκείνα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία <sup>(5,21,41,95,129,132,136,156,178,179)</sup>.

Επίσης ένα μεγάλο ποσοστό των καρκινωμάτων (80%) με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (54 από τις 66 περιπτώσεις) παρουσιάζουν θετικότητα στην Προθυμοσίνη α (πίνακας 9, πίνακας δεδομένων). Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τη σχέση grade, οιστρογόνων και ProTa, παρατηρούμε ότι από τα 24 grade I καρκινώματα, τα περισσότερα (20)



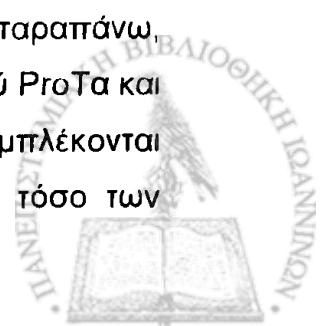
παρουσιάζουν θετικότητα στους οιστρογονικούς υποδοχείς και από αυτά η συντριπτική πλειονότητα (17/20) παρουσίαζαν πυρηνική έκφραση της Προθουμοσίνης α. Επίσης από τα 7 καρκινώματα με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, κανένα δεν έδειξε πυρηνική έκφραση της ProTa, αλλά όλα πρωτοπλασματική. Από τη στατιστική μελέτη (μελέτη  $\chi^2$ , γράφημα 4 και 16) προκύπτει με στατιστικώς σημαντική διαφορά ότι τα καρκινώματα με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς εκφράζουν την ProTa στον πυρήνα, ενώ η απουσία οιστρογονικών υποδοχέων συνδυάζεται με πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa. Αυτό συμφωνεί απόλυτα και με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η παρουσία οιστρογόνων στο καρκινικό κύτταρο συνεπάγεται αυξημένη πυρηνική και ελαττωμένη πρωτοπλασματική παρουσία της Προθουμοσίνης α<sup>(22)</sup>.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε εδώ ένα εύρημα που προκύπτει από τη μελέτη μας, το οποίο συνίσταται στην «παράλληλη» θα λέγαμε έκφραση της Προθουμοσίνης α και της έκφρασης των οιστρογόνων στο φυσιολογικό και στο καρκινικό κύτταρο.

Κατ' αρχάς η ProTa, εκφράζεται ελαφρά αλλά όχι πάντα στον πυρήνα του φυσιολογικού κυττάρου των πόρων και των λοβίων. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με την έκφραση των οιστρογόνων. Παρατηρούμε επίσης ότι η ProTa εκφράζεται κυρίως πυρηνικά στα καλής διαφοροποίησης πορογενή, διηθητικά μη ειδικού τύπου καρκινώματα και κυρίως στα ειδικού τύπου, αλλά και στα κλασσικά πορογενή grade I καρκινώματα. Το ίδιο συμβαίνει και με την έκφραση των οιστρογόνων στα καρκινώματα αυτά.

Αντίθετα, στα επιθετικά καρκινώματα (υψηλού grade πορογενή και λοβιακά) η ProTa εκφράζεται κυρίως πρωτοπλασματικά, ενώ τα οιστρογόνα εκφράζονται ελάχιστα στα αντίστοιχα καρκινώματα.

Η ίδια αντιστοιχία παρατηρείται και στα *in situ* πορογενή καρκινώματα στο υλικό μας, όπου η ProTa εκφράζεται πυρηνικά στα μη φαγεσωρικού και πρωτοπλασματικά στα φαγεσωρικού τύπου. Βεβαίως τα οιστρογόνα εκφράζονται στα non comedo αλλά σε σημαντικό ποσοστό η έκφρασή τους αφορά και στα comedo *in situ* πορογενή καρκινώματα. Από τα παραπάνω φαίνεται πως υπάρχει ένας βαθμός «συνέργειας» θα λέγαμε μεταξύ ProTa και οιστρογόνων αφού και οι δύο αυτές ουσίες έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και στην διαφοροποίηση τόσο των



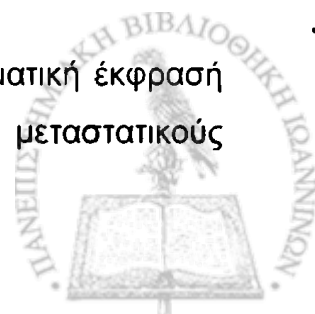


φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων οποιασδήποτε προέλευσης. Εν τούτοις, όπως αναφέρεται και από τους περισσότερους συγγραφείς, η ακριβής δράση της Προθυμοσίνης α δεν μας είναι ακόμη γνωστή.

Ελπίζουμε στο μέλλον τα σκοτεινά αυτά σημεία της δράσης της ProTa να φωτιστούν και αυτό πιστεύουμε θα αποτελέσει σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση της πρόγνωσης και της θεραπείας του καρκινώματος του μαστού και όχι μόνο αυτό. Όλοι οι ερευνητές αλλά και εμείς με την δική μας μελέτη, συμφωνούμε ότι τα επίπεδα της ProTa στα καρκινικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα από εκείνα των φυσιολογικών κυττάρων του μαζικού αδένα. Θα πρέπει να τονίσουμε και πάλι εδώ ότι, οι συγκρίσεις μεταξύ των δικών μας αποτελεσμάτων και των αντίστοιχων των άλλων ερευνητών <sup>(43,98,108,159)</sup> είναι συμβατικές καθόσον η δική μας μελέτη δίδει ποιοτικά αποτελέσματα ενώ των άλλων ερευνητών (που οι μελέτες γίνονται με την μέθοδο RIA) δίδουν ποσοτικά. Εν τούτοις στο υλικό μας γίνεται ακροθιγής ένας ημιποσοτικός προσδιορισμός της ProTa στα καρκινικά και μη κύτταρα (βλέπε «υλικό και μέθοδοι») υπό την έννοια της έντασης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης κλιμακούμενης σε μικρή, μέτρια και μεγάλη. Έτσι όπως φαίνεται στο υλικό μας (φωτογραφία 10) η ProTa εκφράζεται ελαφρώς στον πυρήνα των φυσιολογικών πόρων και λοβίων, ενώ στα καρκινικά κύτταρα αυτή ήταν περισσότερο εμφανής είτε αυτή αφορούσε τον πυρήνα είτε το πρωτόπλασμα. Είναι φανερό όπως προκύπτει από τη δική μας αλλά και από τις άλλες μελέτες <sup>(43,108)</sup> ότι υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ της παρουσίας της ProTa στο καρκινικό κύτταρο και της επιθετικότητας του νεοπλάσματος.

Η σχέση αυτή εκφράζεται με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα της ProTa στον καρκινικό ιστό (με την μέθοδο RIA) ή με την παρουσία της ProTa στον πυρήνα ή το πρωτόπλασμα (με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο, όπως και η δική μας). Παρατηρούμε δηλαδή ότι όταν τα επίπεδα της ProTa στον καρκινικό ιστό είναι υψηλά (μετρούμενα σε ng), τότε η έκφραση της ProTa ανοσοϊστοχημικά φαίνεται να είναι κυρίως πρωτοπλασματική και αντιστρόφως τα χαμηλά επίπεδα ProTa στον καρκινικό ιστό αντιστοιχούν με πυρηνική έκφραση της Προθυμοσίνης α.

Πιο συγκεκριμένα υψηλά επίπεδα ProTa και πρωτοπλασματική έκφρασή της παρατηρείται σε μεταστατικά καρκινώματα με πολλούς μεταστατικούς



λεμφαδένες και γενικώς συνδυάζεται με καρκινώματα του μαστού με μεγαλύτερη επιθετικότητα και κακή βιολογική συμπεριφορά.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

1. Η Προθυμοσίνη α εκφράζεται κυρίως και σε υψηλά επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.
2. Υπάρχει τόσο πυρηνική όσο και πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa σχετιζόμενη με επιθετικότητα του καρκινώματος.
3. Η πυρηνική έκφραση της ProTa συνδυάζεται με χαμηλού grade καρκινώματα και γενικώς καρκινώματα καλής βιολογικής συμπεριφοράς.
4. Η πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa συνδυάζεται με επιθετικά καρκινώματα και κακή έκβαση της νόσου.
5. Παρατηρείται ένα είδος «συνέργειας» και συνέκφρασης της Προθυμοσίνης α και των οιστρογόνων στα καρκινώματα μαστού και
6. Η Προθυμοσίνη α αποτελεί έναν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για το καρκίνωμα μαστού.



## Περίληψη

---

Η Προθυμοσίνη α (ProTa) είναι μέλος της μεγάλης οικογένειας των θυμοσινών, οι οποίες πρωτίστως παράγονται από τα κύτταρα του θύμου και ενέχεται σε πολλές λειτουργίες ανθρωπίνου οργανισμού. Ειδικά, η Προθυμοσίνη α, μεταξύ άλλων, απεδείχθη ότι συμβάλλει στην ανοσολογική λειτουργία, παρεμβαίνει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τόσο του καλοήθους όσο και του καρκινικού κυττάρου ενώ επηρεάζει την δράση των οιστρογόνων πάνω στο κύτταρο.

Η παρούσα μελέτη αφορά στην διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της Προθυμοσίνης α στο καρκίνωμα του μαστού και η σχέση της με την πρόγνωση και τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου.

Μελετήθηκαν 150 περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού που χειρουργήθηκαν στο Νοσοκομείο «Ο Άγιος Σάββας» και εξετάστηκαν από το αντίστοιχο Παθολογοανατομικό εργαστήριο. Από αυτά τα 114 (76%) ήταν πορογενή διηθητικά αδenoκαρκινώματα του μαστού μη ειδικού τύπου (N.S.T.), τα 16 (10,7%) αφορούσαν σε ειδικό τύπο πορογενούς καρκινώματος, τα 10 (6,7%) σε λοβιακό καρκίνωμα και τέλος τα υπόλοιπα 10 (6,7%) σε μη διηθητικό (in situ) καρκίνωμα.

Σε ανοσοϊστοχημικό επίπεδο η ProTa εκφράστηκε τόσο στον πυρήνα (54,9% των περιπτώσεων) όσο και στο πρωτόπλασμα (45,1% των περιπτώσεων). Βρέθηκε επίσης ότι μερικά φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαζικού αδένου παρουσιάζουν ήπια έκφραση της Προθυμοσίνης στον πυρήνα της. Ειδικότερα βρέθηκε ότι η ProTa εκφράζεται κυρίως πυρηνικά σε καρκινώματα χαμηλού grade και καρκινώματα ειδικού τύπου, ενώ πρωτοπλασματική έκφραση της ProTa βρέθηκε πρωτίστως σε καρκινώματα υψηλού grade και κακής πρόγνωσης. Παρατηρήθηκε επίσης ένα είδος συνέκφρασης μεταξύ της παρουσίας της ProTa και της θετικότητας του όγκου σε οιστρογονικούς υποδοχείς.



## Summary

---

**Subject:** The role of Prothymosine  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) in breast carcinoma

**Author:** Apostolos K. Apostolikas, Psychiatrist

Prothymosine  $\alpha$  (ProT $\alpha$ ) is a member of the large Thymosine family which is mainly produced by thymous cells and is implicated in many functions of the human body. More specifically, ProT $\alpha$ , among others, has been proven to contribute to the immunologic mechanism, interfere to the cellular proliferation of the benign as well as the malignant cells, while it also influences the Estrogen action upon the cells.

The aim of the present study is to investigate the immunohistochemical expression of ProT $\alpha$  in breast cancer and its relation to the prognosis and the tumor biological behavior.

We studied 150 breast cancers cases, which were operated in the "St. Savvas" Hospital and were examined from the respective Pathology department. From these 114 (76%) were Invasive Ductal Adenocarcinomas of the breast Non-Otherwise specified (NOS), 16 cases (10.7%) were specific type of Ductal carcinoma, 10 cases (6.7%) were Invasive Lobular carcinomas and finally 10 cases (6.7%) were non-invasive (in situ) carcinomas.

Under the immunohistochemical point of view, ProT $\alpha$  showed nuclear (54.9%) as well as cytoplasmic (45.1%) expression. We also found that some normal epithelial cells from the breast parenchyma showed moderate nuclear expression of ProT $\alpha$ .

More specifically we found that ProT $\alpha$  has mainly nuclear expression in low grade and specific type carcinomas, while cytoplasmic expression was found mainly in high grade carcinomas with poor prognosis. We also noted a special coexpression between ProT $\alpha$  presence and positivity of the tumor to estrogenic receptors



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Αγνάντη Ν. και Ν. Αποστολίκας  
Κατάταξη του καρκινώματος του μαστού από ιστογενετικής κυρίως απόψεως και η περιγραφή των σπανίων τύπων αυτού. Ελληνική Ογκολογία 15, 2:31, 1979.
2. Αγνάντη Ν., Αποστολίκας Ν., Σφήκας Κ., και Β. Νανοπούλου  
Συγκριτική μελέτη των τύπων του καρκίνου του μαστού που καθορίζουν το θεραπευτικό χειρισμό και τη βιολογική συμπεριφορά του όγκου. (ανάλυση 1.000 περιπτώσεων). Ελληνική Ογκολογία 17, 2: 97, 1981.
3. Αγνάντη Ν., Αποστολίκας Ν., Μαχαίρα Ε.  
Παθολογοανατομικά ευρήματα στον καρκίνο του μαστού που καθορίζουν το θεραπευτικό χειρισμό και την βιολογική συμπεριφορά του όγκου. Τόμος προς τιμήν του καθηγητή Ν.Ξ. Παπαχαλαράμπους, Αθήνα 1992.
4. Agnantis N., Apostolikas N., Zioga C., Doussis I., Karatzia D., Sficas C.  
Relation of Axillary Lymph Node Metastases (ALNM) with other prognostic factors in breast cancer patients. The Breast Journal.
5. Agnantis N.  
The significance of prognostic markers in the pathogenesis of Breast cancer. Data on 11.199 biopsies. Bull. Cons. Med. Labs 8,1,3, 1990
6. Agnantis N., and Petrakis C.  
Hormonal Receptors and other Tumor Parameters in Breast Cancer. New frontiers in Mammary Pathology Eds. K.H. Holmann and J.M. Verl, Publ. Martinus Nijhoff, 231, 1986.
7. Agnantis N.  
Immunohistochemical analysis of Ras and C-myc oncoproteins in breast lesions. In Senology. Elsevier Science publ. BV, Amsterdam, Excerpta Medicine: pp. 407-410, 1992.
8. Agnantis N., Parissi P., Anagnostakis D., and Spandidos P.  
Comparative study of Harvey ras oncogene expression with conventional clinicopathologic parameters of breast cancer. Oncology 43: 36, 1986.
9. Aisenberg AC. And Wilkes



- Partial immunological restoration of neonatally thymetomized rats with thymous-containing diffusion chambers. *Nature* 205, 716-717, 1965.
10. Apostolikas N., Petraki N., Agnantis N.  
The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. *Pathol. Res. and Pract.* 184 (1)Q 35-38 1988.
  11. Archer O. and Pierce J.  
Role of thymus in development of the immune response. *Fed. Proc.* 20, 26 (Abstract) 1961.
  12. American Society of Clinical Oncology Tumor Marker Expert Panel:  
Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 4Q 2843-77, 1996.
  13. Auger C., Stahli C., Fabien N. and Moniers  
Intracellular localization of thymosin alpha 1 by immunoelectron microscopy using a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem* 35, 1840-187, 1987.
  14. Barcia M., Castro J., Jullien C., Gonzales C., Freire M.  
Prothymosin alpha is phosphorylated by casein kinase-2 *FEBS Lett.*, 9, 312: 152-156, 1992.
  15. Barcia M., Castro J., Jullien C., Gonzales C., Freire M.  
Prothymosin alpha is phosphorylated in proliferating stimulated cells. *J. Biol. Chem.* 5, 268: 4704-708, 1993.
  16. Barisone G., Vega F., Dominique F., Cabada M.  
Detection of prothymosin alpha in oocytes and embryos of buto arenavum, *Zygote* 6(4): 347-50, 1998.
  17. Baxevanis C., Reclos G., Papamichail M. and Tsokos G.  
Prothymosin a restores the depressed autologous and allogeneic mixed lymphocyte responses in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacol, Immunotoxicog.* 9, 492-440, 1987.
  18. Baxevanis C., Anastasopoulos E., Reclos G. and Papamichail M.  
Prothymosin a enhances HLA-DR antigen expression on monocytes from patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunology* 27; 141-147, 1990.
  19. Baxevanis C., Thanos D., Reclos G., Anastasopoulos E., Tsokos G., Papamatheakis J., and Papamichail M.

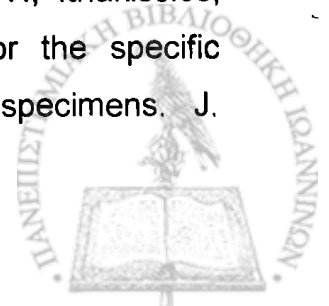


- Prothymosin  $\alpha$  enhances human and murine MHC class II surface antigen expression and messenger RNA accumulation. *J. Immunology* 148, 1979-84, 1992.
20. Baxevanis CN, Gritzapis AD, Dedousis GY, Papadopoulos NG, Tsolas, Papamichail M. Induction of lymphokine-activated killer activity in mice by Prothymosin  $\alpha$ . *Cancer Immunol. Immunother.* 38(4):281, 1994
  21. Benner S.E., Clark G., McGuire W.  
Steroid receptors, cellular kinetics and lymph node status as prognostic factors in breast cancer. *Am. J. Med. Sci.* 296: 59-66, 1988.
  22. Bianco N., Montano M.  
Regulation of prothymosin  $\alpha$  by estrogen receptor  $\alpha$ : molecular mechanisms and relevance in estrogen – mediated breast cell growth. *Oncogene* 21 (34): 5233-44.
  23. Bloom H., Richardson W.  
Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 11: 357-377, 1957.
  24. Boan F, Vinas A, Buceta M, Dominguez F, Sanchez L, Gomez-Marques. Prothymosin  $\alpha$ , a mammalian c-myc-regulated acidic nucleoprotein provokes the decondensation of human chromosome in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.* 93(3-4):171, 2001
  25. Bonadona Gianni  
Textbook Guide to therapy. Martin Dunitz Ltd 1997-2001 (second edition)
  26. Brand I., Jeinickel A., and Soling H.  
Localization of a 11,5 De Zn<sup>2</sup>  $\pm$  binding protein (prothymosin) in different ret tissues. Cell type-specific distribution between cytosolic and nuclear compartment. *Eur. J. Cell. Biol.* 54, 157-166, 1991.
  27. Bustelo X., Otero A., Gomez-Marquez J. and Freire M.  
Expression of the rat prothymosin  $\alpha$  gene during T lymphocyte proliferation and liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 266, 1443-47, 1991.
  28. Calderella J., Goodall G., Felix A., Heiner E., Solvin S., and Horecker B.  
Thymosin  $\alpha$ 11: a peptide related to thymosin as isolated from calf thymosin fraction 5. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80, 7424-27, 1983.
  29. Castro J., Barcia M.





- Localization of prothymosin alpha in the nucleus. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 5, 224 (1): 140-6, 1996.
30. Clemende C., Boracchi P., Andreolus et al.  
Perimural lymphatic invasion in patients with node negative mammary duct carcinoma. *Cancer* 69: 1396-1403, 1992.
  31. Clinton M., Frangou-Lazaridis M., Paneerselcam C., Horecker BL.  
Prothymosin alpha and parathymosin : mRNA and polypeptide layers in rodent tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 269(1), 256-63, 1998.
  32. Cordero O., Sarandeses C., Mogueira M.,  
Binding of 125I-prothymosin alpha to lymphoblasts through the non thymosin alpha 1 sequence. *Life Sci* 58 (20): 1575-70, 1996.
  33. Cordero O., Sarandeses C., Lopeze, Cancio G., Reguero B., and Mogueira M.  
Prothymosin a enhances interleukin 2 receptor expression in normal human T lymphocytes. *Int. J. Immunopharmacology* 13, 1059-65, 1991.
  34. Cordero O., Sarandeses C., Nogueira M.  
Phytohemagglutinin-stimulated human T Cell: prothymosin a as an accessory signal. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 4, 7-12, 1990.
  35. Contreas C., Mutchnick M., Palmer K., Weller F., Luck G., Naylor P., Erdos M., Goldstein A., Panrearselan C., Horecker B.  
Cellular levels of thymosin immunoreactive peptides are linked to Proliferative events: Evidence for a nuclear site of action. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 87, 3269-73, 1990.
  36. Cordero O., Sarandeses C., Nogueira M.  
Prothymosin alpha receptors on lymphocytes. *J. Interferon Cytocine Res.* 15 (8): 731-7, 1995.
  37. Costopoulos D., Leondiadis L., C... Ferderigos N., Ithakissios D., Livaniou E., Evangeletos G.  
Direct ELISA method for the specific determination of prothymosin alpha in human specimens. *J. Immunoassay* 19(4): 295-316, 1998.
  38. Costopoulou D, Leondiadis L, Garnecki J, Ferderigos N, Ithakissios, Livaniou E, Evagelatos GP. Direct ELISA method for the specific determination of the Prothymosin alpha in human specimens. *J. Immunoassay*, 19(4):295,1998



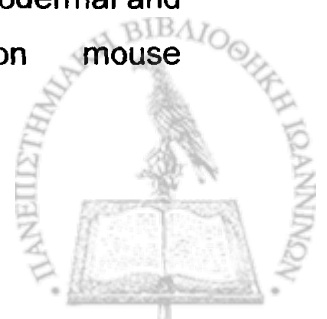
39. Courdi A., Hery M., Dahan E., et al.  
Factors affecting relapse in node-negative breast cancer. A multivariate analysis including labelling index. *Eur. J. Clin. Oncol.* 25: 351-56, 1984.
40. Dalakas M., Engel W., McClure J., Goldstein A., and Askanas V.  
Identification of human thymic epithelial cells with antibodies to thymosin  $\alpha$  in Myasthenic Gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 377, 477-84, 1981.
41. De mascarel I., Soubeyran I., McGrogan G., et al.  
Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 938 breast carcinoma concordance with biochemical assay and prognostic significance. *Apple immunohistochem*, 3: 222-31, 1995.
42. Diaz – Jullien C., Perez – Estevez A., Covelo G., Freire M.  
Prothymosin  $\alpha$  binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochem. Biophys. Acta* 1296(5): 219-27, 1996.
43. Dominquez F., Magdalena C., Cancio E., Roson E., Paredes J., Loidi L., Xalvide J., Fraga M., Fortera J., Regueiro B., and Puente J.  
Tissue concentrations of prothymosin  $\alpha$ : A novel proliferation index of primary breast cancer. *Eur. J. Cancer* 29A (6): 893-97, 1993.
44. Donhuijsen K., Schmidt U., et al. Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation. *Humm. Pathol.* 21: 709-714, 1990.
45. Done S., Eskendarions S., Bulls S., Redstoin M. et al.  
P53 missense mutations in microdissected high grade ductal carcinoma in situ of the breast. *J. Natl. Cancer. Inst.* 700-4, 2001.
46. Dosa S., Phillips T., Abraham A., Krammer N., McLure J., Molony P., and Thompson A.  
Thymic functions in uremic rats. Evidence for thymosin  $\alpha$  deficiency. *Nephron* 39, 365-70, 1985.
47. Dosil M., Alvarez – Fernandez L., Gomez-Marguez J.  
Differentiation – linked expression of prothymosin  $\alpha$  gene in human myeloid leukemic cells. *Exp. Cell. Res.* 204 (1): 94-101, 1993.
48. Disil M., Freire M., Gomez – Marquez J.  
Tissue-specific differential expression of prothymosin  $\alpha$  gene at rat development *FEBS*, 269 (2) : 373-76, 1990.
49. Economou M., Papadopoulou G., Seferiades K., Heimer E., Felix A., and Tsola O.



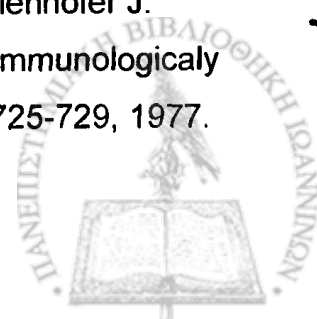
- A sensitive and specific competition microFLISA for the immunoactive polypeptide parathymosin and detection of this peptide in procrin tissues. , J. Immunolog. Meth. 148, 87-92, 1992.
50. Eilers M., Schrim S., and Bishop J.  
The myc protein activates transcription of the a-prothymosin gene. EMBO J. 10, 133-41, 1991.
  51. Ellis I., Galea M., Broughton M. et all.  
Pathological prognostic factors in breast cancer II. Histologic type relationship with survival in a large study with long-term follow-up. Histopathology 20: 479-89, 1992.
  52. Elston C.  
Grading of invasive carcinoma of the breast in Page D.I., Hunderson I. (eds)  
Dragnostic Histopathology of the Breast. New York Churchill Livingstone, 300-331, 1997.
  53. Elston C., Gresham G., Rao G. et al.  
The cancer research compaign (kings / Cambridge) trial for early breast Cancer. Clinico-pathological aspects. Br. J. Cancer 45: 655-69, 1982.
  54. Elston C., Ellis I.  
Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with logn-term follow-up. Histopathology 19: 405-404, 1991.
  55. Enkenan S., Payur K., Ryazanov A., Bergers S.  
Does prothymosin alpha effect the phophorylation of elergation factors? J. Biol. Chem. 274 (26): 18644-50, 1999.
  56. Enkemann S., Word R., Beyer S.  
Mobility within the nucleus and neighboring cytosol is a key feature of the prothymosin – alpha. J. Histochem. Cytochem. 48 (10) 1341-55.
  57. Eschenfeldt W., and Bergers  
The human prothymosin a gene is polymorphic and induced upon growth stimulation: Evidence using a cloned cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9403-07, 1986.
  58. Evstafieva H., Chichkova M., Makarova T., Vartopation A., Vasilenko A., Abromov Y., Bogdonov A.



- Overproduction in *Escherichia Coli*, purification and properties of human prothymosin alpha. *Eur. J. Biochem.* 231(3): 639-43, 1995.
59. Evstafieva H, Karapetian RN, Rubstor I, Filonov E, Abaera IS, Fateera TV, Melnikov SV, Chichkova NV, Vartapetian AB. Novel functions of the well-known protein- Prothymosin alpha is involved in protection of cells against apoptosis and oxidative stress. *Mol. Biol.* 39(5):729,2005
  60. Fabien N., Auger C., and Monier J.  
Immunolocalization of thymosin alpha 1, thymoprotein and thymulin in mouse thymic epithelial cells at different stages of culture: a light and electron microscopic study. *Immunol.* 63, 721-27, 1988.
  61. Farerly D., Burgers L., Bult P., Holland  
Three dimensional imaging of memory ductal carcinoma in situ: Clinical implications. *Semin. Diagnost. Pathol.* 11: 193-98, 1994.
  62. Fentiman I., Hyland D., Chandary M. et al.  
Prognosis of patients with breast cancers up to 1 cm in diameters. *Eur. J. Cancer* 32 A: 417-20, 1996.
  63. Fisher E., Gregorio R., Fisher B. et al.  
The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from finding of the National Surgical Adjuvant breast project (pr. No 4), *Cancer* 36: 1-85, 1975.
  64. Fisher F., Sass R., Fisher B.  
Histological grading of breast cancer. *Pathol. Annu.* 15: 239-51, 1980.
  65. Fletchers C.  
Diagnostic histopathology of tumors, 2<sup>nd</sup> edition. Churchill-Livingstone 2000.
  66. Franco F., Diaz C., Barcia M., Arias P., Gomez-Marquez J., Sofiano F., Mendez E., Freire M.  
Synthesis and apparent secretion of prothymosin alpha by different subpopulation of call and rat thymocytes. *Immunology* 67(2): 263-68.
  67. Franco del Amo F, Freire M.  
The Prothymosin Alpha gene is specifically expressed in ectodermal and mesodermal regions during early postimplantation mouse embryogenesis. *FEBS Lett.* 359(1) :15,1995



68. Frago M., Carcia – Caballero T., Dominquer F., Perez-Becerra G., Beires-Forteza J.  
Immunohistochemical Location of prothymosin alpha in regenerating human hepatocytes and hepatocellular carcinomas. *Virchows Arch.* 423 (6): 449-52, 1993.
69. Freire J., Cobelo G., Sarandeses C., Diaz – Jullien C., Freire M.  
Identification of nuclear-import and cell-cycle regulatory proteins that binds prothymosin alpha. *Biochem. Cell. Biol.* 79(2): 123-31, 2001.
70. Friesson H.  
The need for improvement in flow cytometric analysis of ploidy and s-pase fraction (editorial). *Am J. Clin. Pathol.* 95: 439-41, 1991.
71. Frillingos S., Tsolas O.  
Age and sex related differences in the content of prothymosin alpha in rat tissues. *Experientia* 15:48(3)236,1992
72. Frillingos S., Frangon-Hazaridus M., Seferiades K., Hulme J., Pan Y., and Tsolas O.  
Isolation and partial sequence of goat spleen prothymosin a. *Mol. Cell. Biochem.* 1008, 85-94, 1991.
73. Galego R., Roson E., Garcia-Caballero T., Frága M., Fortera J.  
Prothymosin alpha expression in lymph nodes and tonsils an optical and ultrastructural study. *Acta anatomical* 143(3): 219-22, 1992.
74. Garbin F., Eckert K., Immenschuh P., Ureuser E., Haurer H. Prothymosin alpha 1 effects, in vitro, on the antitumor activity and cytoproduction of blood nonocytes from colorectal tumor patients. *Int. J. Immunopharmacol* 19 (6): 323-32, 1997.
75. Garcia – Caballero T., Dominguer F., Roson G., Gallego R., Zaluide J., Fortera J. Beiras A.  
Distribution of prothymosin alpha in rat and human adrenal cortex. *Anat Rec* 239 (1): 88-94, 1994.
76. Goldstein A., Low T., McAdoo M., McClure J., Thurman G., Rossio J., Lai C., Chang D., Wang S., Harvey C., Ramel A., and Meienhofer J.  
Thymosin a1: Isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptides. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 74, 725-729, 1977.
77. Gomez-Marquez J and Segade F.



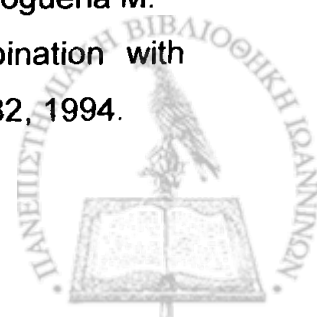
- Prothymosin a si a nuclear protein. FEBS Let. 226, 217-19, 1988.
78. Gomez- Marquez J., Segaude F., Dosil M., Pichel J., Bustelo X., and Freire M.  
The expression of prothymosin a gene in T Lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. J. Biol. Chem. 264, 8451-54, 1989.
79. Goodson W., Ljung B., Waldman F., et al.  
In vivo measurement of breast cancer growth role. Arch. Surg. 126: 1220-24, 199.
80. Geenough R.  
Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. J. Cancer Res. 9: 452-63, 1925.
81. Haritos A., Caldarella J., Horecker B.  
Simultaneous isolation and determination of pro-thymosin alpha, parathymosin alpha, thymosin B4, and thymosin B10. Anal Biochem 144 (2) 436-40, 1985.
82. Haritos A., Blacher R., Stein S., Calderrella J., Horecker B.  
Primary structure of rat thymus prothymosin alpa. Proc. Natl. Acad. Sci USA 82(2): 243-46, 1985.
83. Haritos A., Goodal G., Horecker B.  
Prothymosin alpha and alpha 1 - like peptides. Methods. Enzymol 116: 255-65, 1985.
84. Haritos A., Tsolaso and Horecker B.  
Distribution of prothymosin a in rat tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1391-93, 1984.
85. Haritos A., Goodall G., Horecker B.  
Prothosin Alpha: isolation and properties of the major immunoreactive of thymosin alpha A in rat thymus. Proc. Natl. Acad USA 81(4): 1008-11, 1984.
86. Harris C., Hollstein M.  
Clinical implication of the p53, tumor-suppressor gene. N. Engl. J. Med. 329: 1318-27, 1993.



87. Hederson B, Ross R, Pike M. Toward the primary prevention of cancer. *Science* 254:1131,1991
88. Hedley D., Clark G., Cornelisse D., et al.  
Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Cytometry* 14: 482-85, 1993.
89. Heideke H, Eckert K, Schulze-Forster K, Maker H. Prothymosin alpha-1 effects in vitro on chemotaxis cytotoxicity and oxidative response of neutrophils from melanoma, colorectal and breast tumor patients. *Int. J. Immunopharmacol.* 19(8):413,1997
90. Hirokuwa K., McClure J., and Goldstein A.  
Age related changes in localization of thymosin in human thymus. *Thymus* 4, 19-29, 1982.
91. Hooper J., McDaniel M., Thurman G., Gohen G., Schulot R., and Goldstein A.  
Purification properties of bovine thymosine. *Ann N.Y. Acad Sci.* 249, 125-144, 1975.
92. Hsia J., Sztein M., Naylor P., Simon G., Goldstein A. and Hayden F.,  
Nodulation of thymosin a and thymosin B4, levels and peripheral blood mononuclear cell subsets during experiment rhinovirus colds. *Immunolo Res* 383-91, 1998.
93. Ioachim E., Kaminas S., Athanassiadou S., and Agnantis N.  
The prognostic significance of epidermiol growth factor receptor (EGFR) C-erbB-2, Ki67, and PCNA *Anticancer Res.* 16: 3141-48, 1996.
94. Ioachim E., Kaminas S., Athanassiadou S., and Agnantis N.  
Glycoprotein CD44 expression in human breast cancer: An immunohistochemical study including correlation with clothespin D., type IV Collagen, laninin fibronectin, EGFR, c-erbB-B2, oncoprotein P53, steroid receptor status and prolitrative indices. *The breast Journal* 3(3): 112-19, 1997.
95. Kinsel L., Szabo E., Greene G., et al.  
Immunohistochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients, comparison with quantitative biochemical methods. *Cancer Res.* 49: 1052-56, 1989.

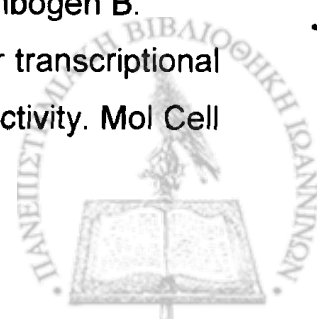


96. Klimentzou P, Paravatou-Petsotas M, Zikos C, Beck A, Skopeliti M, Czamecki J, Tsitsilonis O, Voelter W, Livaniou E, Evangelatos GP. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide Prothymosin alpha. *Peptides* 27(10):183,2006
97. Kruntz J.  
Factors influencing the risk of local recurrence in the breast. *Eur. J. Cancer* 28: 660-66, 1992.
98. Κωστοπούλου Δ, Λεοντιάδης Λ, Αποστολίκας Ν, Λιβανίου Ε, Ευαγγελάτος Γ, Ιθακήσιως Δ. Ανάπτυξη ανοσοϊστοχημικών τεχνικών εξειδικευμένων για τον προσδιορισμό της Pro Ta. Διερεύνηση της διαγνωστικής της αξίας ως καρκινικού δείκτη για τον καρκίνο του μαστού. 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Φαρμακευτικό Συνέδριο, Αθήνα 1998. Βιβλίο Εργασιών.
99. Lagios M., Margolin F., Westahl et al.  
Mammographically detected duct carcinoma in situ. Frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer* 63, 618-24, 1989.
100. Le Doussou X., Tubiana-Hulin M., Friedman S. et al. Prognostic Value of histologic grade nuclear components of Scarrt-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 64: 1914-21, 1984.
101. Letsas KP, Frangou-Lazaridis M, Skyras A, Tsatsoulis A, Malamou-Mitsi V. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol. Int.* 55(11):694,2005
102. Linden M., Torres F., Kubus J. Zarbo R  
Clinical application of morphologic and immunocytochemical essements of cell proliferation. *Am. K. Clin. Pathol.* 97: 4-13, 1992.
103. Loidi L, Videl A, Zalvide J, Puente J, Reyes F, Dominguez F. Development of ELISA to estimate thymosin alpha 1, the terminus of prothymosin alpha, in human tumors. *Clin. Chem.* 43 (1):59,1997.
104. Lopez-Rodriguez J. Cordoro O., Sarndeses C., Vinuela J., Noguera M. Interleukin - 2 Killer Cells in vitro evaluation of combination with prothymosin alpha. *Lymphokine Cytokine Res.* 13 (3): 175-82, 1994.

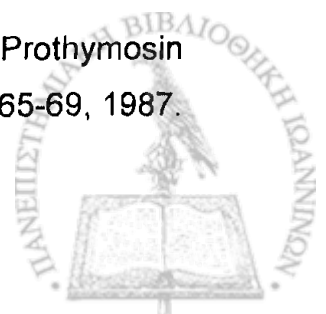




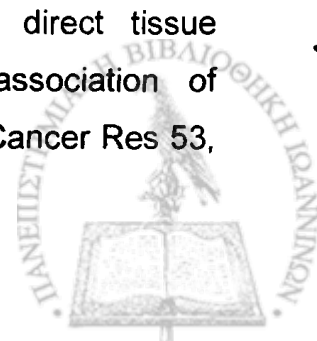
105. Lucas FY, Perez-Mesa C. Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 41:1595,1978
106. Low T., Pan T. and Lin  
Depression of prothymosin- $\alpha$  production in murine thymus correlates with staphylococcal enterotoxin B induced immunosuppression. *FEBS Lett* 273, 1-5, 1990.
107. Lukashet D., Chichkova M., Vatrapietion A.  
Multiple tRNA attachment sites in prothymosin  $\alpha$ . *FEBS Lett.* 451 (2): 118-24.
108. Magndalene C., Dominguez F., Loidi L., Puente J.  
Tumor prothymosin  $\alpha$  content, a potential diagnostic marker for primory brest cancer. *Br. J. Cancer* 82 (3): 548-90, 200.
109. Malicet C, Giroux V, Vasseur S, Dagorn J, Neira J, Iovanna J. Regulation of apoptosis by the P8/Prothymosin ( $\alpha$ ) complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006
110. Malinda K, SIndhu G, Banaudh K, Gaddipati J, Maheshwari, Goldstein A, Kleineman H. Thymosin  $\alpha$  1 stimulates endothelial cell migration, angiogenesis and wound healing. *The Journal of Immunology* 160:1001,1998
111. Maric D., Viljic J., Ranin J., Jankovic B.  
In vivo effect of prothymosin -  $\alpha$  1 on humorab and cell-mediated immune responces in the young rat. *Int Neurosci* 39(1-3): 135-42, 1991.
112. Martini P., Katzenellenbogen B.  
Modulation of estrogen receptor acivity by selective coregulators. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 85 (2-5) 117-22, 2003.
113. Martini P., Katzenellenbogen B.  
Regulation of prothymosin  $\alpha$  gene expression by estrogen in estrogen receptor containing breast cancer cells via upstream half-palindromic estrogen response element motifs. *Endocrinology* (142(8): 3493-561, 2001.
114. Martini P., Delage – Mouroux R., Kraichely D., Katzenellenbogen B.  
Prothymosin  $\alpha$  selectivity enhances estrogen receptor transcriptional activity by intracting with a receptor or estrogen receptor activity. *Mol Cell Biol* 20(17): 6224-32, 2000.



115. Mc Glure J., Lameris N., Wara D., Golstein A.,  
Immunohistochemical studies on thymosin: radio-immunoassay of  
thymosin 1. *J. Immunol* 128 (1): 368-75, 1982.
116. Mc Guire W., Clark G.  
Prognostic factors and treatment decision in axillary node-negative  
breast cancer. *M. Engl. J. Med* 326: 1756-61, 1992.
117. Muss H., Thor A., Berry D., et al.  
C-erbB2 expression and response to adjuvant therapy in women with  
node-positive early stage breast cancer. *N. Engl. Med.* 330: 1260-66,  
1994.
118. Naylor P., Smith M., Mutchnick M., Maylor C., Doseskus J., Skunca M.,  
Moshier J.  
Thymosin alpha 1 does not promote growth or oncogenic transformation.  
*Int. J. Immunopharmac* 18 (5): 321-27, 1996.
119. Oates K. and Coss  
Biochemical and immunohistological identification of thymosin alpha-1 in  
MCF07 breast cancer cells *thymus* 17, 147-54, 1991.
120. Ohuchi N., Thor A., Cage D. et al.  
Expression of the 21000 molecular weight vas protein in a spectrum of  
benign and malignant human mammary tissue. *Cancer Res.* 46: 2511-  
19, 1986.
121. O' Reilly S., Richards M.  
Is DNA flow cytometry a useful investigation in breast cancer? (feature  
article). *Eur. J. Cancer.* 28: 504-507, 1992.
122. Page D., Anderson T.  
Diagnostic histopathology of the breast Churchill Livingstone. Endiburg,  
London, Melbourne, New York, 1987.
123. Pan L., Haritos A., Mideman, Komiyama T., Chang M., Sten S., Salvin S.  
and Horecker B.  
Human prothymosin a: Amino acid sequence and immunological  
properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 250 (1) 197-201, 1986.
124. Pancerselvan C., Haritos A., Caldarella J., Horecker B. Prothymosin  
alpha in human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(13): 4465-69, 1987.



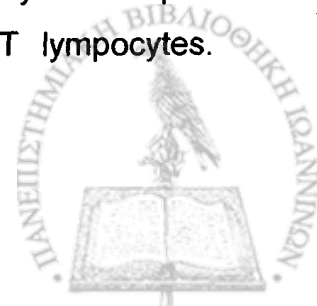
125. Piacentini M, Evangelisti C, Mastroberardino P, Nardacci R, Kroemer G.  
Does Prothymosin- $\alpha$  act as molecular switch between apoptosis and autophagy? *Cell Death and Differentiation* 10:937,2003
126. Paluino J. and Linnala – Kankkunen A.  
Identification of a low-mr acidic nuclear protein as prothymosine FEBS Lett 277, 257-260, 1990.
127. Papamaraki T., Tsolas O.  
Prothymosin alpha binds to histone H1 in vitro. *FEBS Lett.* 345 (1): 71-5.
128. Papanastasiou M., Baxevas C., and Papamichail M.  
Promotion of murine antitumour activity by prothymosin a treatment: 1. Induction of tumoricidal peritoneal cells producing high levels of tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Cancer Immunol. Immunother.* 35, 145-150, 1992.
129. Patey D., Scarff R.  
The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1: 801-804. 1928.
130. Pauletti G., Godolphin W., Press M., Salmon D. Detection and quantification of HER2-neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluoroscopic in situ hybridization. *Oncogene.* 13:63,1996.
131. Perez – Estevez A., Freire J., Sarandeses C., Covelo G., Diaz-Jullien XC., Freire M.  
Properties of the protein kinase that phosphorylates prothymosin alpha. *Mol Cell. Biochem* 208 (1-2), 111-8, 2000.
132. Pertschuk L. Kim D., Nayer K. et al.  
Immunocytochemical estrogen and progesterone receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 66: 166-70, 1990.
133. Pineiro A., Begona Bugia M., Pilar Arias M., Cordero O., Nogueira M.  
Identification of receptors for prothymosin alpha on human lymphocytes. *Biol. Chem.* 382(10): 1473-82.
134. Press M., Pike M., Chazin V., et al.  
Her/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res* 53, 1960-70, 1992.



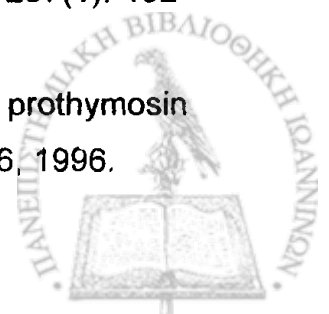
135. Rascoe J, Naylor P, Diaz L, Loabib R, Patel H, Goldstein A, Sampaio S, Annalt G. Elevated thymosin en levels in brasilian pemphigus toliacem. *British J Dermatol.* 115:147,1986.
136. Reamarkers J., Beex L., Koenders A., et al.  
Disease – free interval and estrogen receptor acrivty in tumor tssue of patients with primary breast cancer: analysis alter long-term follow-up. *Breast Cancer Res. Treat,* 6: 123-130, 1985.
137. Reclos G., Baxevanis C., Stagos C., Papageorgakis C., Tsokos G., and Papamichail M.  
Multiples sclerosis: ll effects of prothymosin a on the autologous and allogenic MLR in patients with multiple sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 70, 336-344, 1987.
138. Roger Y., Beito G., Jolly P.  
Factors affecting the incidence of lymph node metastases in small cancers of the bresta. *Am J. Jurg. Pathol.* 157: 501-502, 1989.
139. Rosen PP. The pathological classification of human mammary carcinoma. Past, present and future. *Ann. Clin. Lab.Sci.* 9:144,1079
140. Rosen P.P.  
Rosen's Breast Pathology. Lippincot Williams and Wilkin 2<sup>nd</sup> edition 2001.
141. Rosen P., Saigo P., Braun D. et al.  
Predictors of vecrerrence in stage I (T1NoMo) breast carcinoma. *Ann. Surg.* 193: 15-25, 1981.
142. Roses D., Bell D., Flotte T., et al.  
Pathologic predictors of recurence in stage 1 (T1NoMo) breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 78: 817-20, 1982.
143. Roson E., Garcia-Caballero G., Heimer E., Felix A., Dominguez F.,  
Cellular distribution of prothymosin elpha and parathymosin in rat thymus and spleen. *J. Histochem. Cytahem.* 38(12): 1889-94, 1990.
144. Roson E., Gallego R., Carcia – Caballero T., Fraga M., Dominguez F.  
Evolution of prothymosin alpha and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity through the development of rat ovarian follicle. *Histochem J.* 25(7): 497-501, 1993.



145. Roson E., Gallego R., Garcia-Caballero T., Heimer E., Felix A. and Dominguez F.  
Prathymocin alpha expression is associated to Cell division in rat testis. *Histochem* 94, 597-99, 1990.
146. Ryo A, Suzuki Y, Arai M, Kondoh N, Wakatsuki T. Hada A, Shuda M, Tanaka K, Sato C, Yamamoto M, Yamamoto N. Identification and characterization of differentially expressed mRNAs in HIV type 1-infected human T cells *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1:16(10):995,2000.
147. Sasaki H, Nonaka K, Fujii Y, Yamakawa Y, Fukai I, Kiriya M, Sasaki M. Expression of the prothymosin- $\alpha$  gene as a prognostic factor in lung cancer. *Surg. Today* 31(10):936,2001.
148. Suvino W. and Dardanne M.  
Thymic hormone-containing Cells. VI Immunohistology evidence for the simultaneous presence of thymulin thymoprotein and thymosin a1 in normal and pathological human thymuses. *Eur. J. Immunol.* 14, 987-91, 1984.
149. Sburlati A., Manrow R. and Barger S.  
Prothymosin antisense oligomers inhibit myeloma cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88, 253-57.
150. Segada F, Gomez-Marquez J. Prothymosin Alpha. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 31(11):1243,1999
151. Skopeliti M, Voutsas I, Klimentzou P, Tsiatas M, Beck A, Bamias A, Moraki M, Livaniou E, Neagu M, Voelter W, Tsitsilionis O. The immunologically active site of prothymosin- $\alpha$  is located at the carboxy-terminus of the polypeptide. Evaluation of its in vitro effects in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunotherap.* 2:1,2006.
152. Suzuki S, Takahasi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T, Nishiyama N, Fujita T, Okamura T, Shirai T. Expression of prothymosin alpha in correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate* 13(5):463,2005.
153. Srabo P., Ehleiter D., Ehittington E. and Weksler M. Prothymosin alpha expression occurs during G1 in proliferating B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 185, 953-59, 1992.
154. Shian Al., Lin Pr., Chang M., Wu C.



- Retrovirus-mediated transfer of prothymosin gene inhibits tumor Growth and Prolongs survival in murine bladder cancer. *Gene Ther.* 8 (21) 1609-17, 2001.
155. Tavassoli F.  
Pathology of the breast. Appleton and Lange, 2<sup>nd</sup> edition. Stanford Connecticut 1999.
156. Trauh F., Jost M., Hess K., Schron K., Mauzel C., Budd P., Schulz – Knappe P., Lamping N., Pich A., Kreipe H., Tammen H.  
Peptidomic analysis of breast cancer reveals a putative surrogate marker of estrogen receptor-negative carcinomas. *Hab invest* 86(3): 246-53, 2006.
157. Τσιτσιλόνη (δ).  
Συμβολή στη μελέτη της προθυμοσίνης α και της παραθυμοσίνης α στον άνθρωπο. Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 1993, Πανεπιστήμιο Αθηνών.
158. Tsitsilonis O., Yialouris P., Sekeri-Pataryas K. Haritus A., Prothymosin alpha is not a nuclear – polypeptide. *Experimentia* 45(4): 1989.
159. Tsitsilonis O., Bebris E., Voutsas I., Baxevanis C., Markopoulos C., Papadopoulou S., Kontroglou K., Slova S., Gagas Y., Voelter W., Papamichail M.  
The prognostic value of alpha-thymosins in breast cancer. *Anticancer Res.* 18(3A): 1501-8, 1998.
160. Tsitsiloni O., Stiakakis J., Koutselinis A., Gogas J., Markopoulos C., Yialouris P., Bekris S., Panoussopoulos D., Kiortsis Y., Voelter W. et al. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 90(20): 9504-7, 1993.
161. Tzai T, Tsai Y, Shiau A, Wu C, Shieh G, Tsai H. Urine prothymosin alpha as novel tumor marker for detection and follow-up bladder cancer. *Urology.* 67(2) :294,2006.
162. Vareli K., Frangou-Lazaridis M., van der Kraan T., Tsolaso, van Driel K.  
Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replications. *Exp. Cell. Res.* 257(1): 152-61, 2000.
163. Vareli K., Tsolas O., Frangou - Lazaridis M. Regulation of prothymosin alpha during the cell cycle. *Eur. J. Biochem* 238 (3): 799-806, 1996.



164. Vareli K., Frangou – Zazaridis M., Tsolas O.  
Prothymosin alpha mRNA levels vary with c-myc expression during the proliferation, viral infection and heat shock. *FEBS Lett* 371(3): 337-40, 1995.
165. Vareli K, Frangou-Lazaridis M. Prothymosin alpha is localized in mitotic spindle during mitosis. *Biol. Cell.* 96(6):421,2004.
166. Van Diest  
Quantitative cyto-end histoprognois in breast cancer. VU University Press, Amsterdam 1990.
167. Vartapetian A., Lukashev D., Lyakhov I., Belyaeva A., Chichkova N., Bogdanov A.  
Mamalian prothymosin alpha links to tRNA. In *Escherichia Coli Cells RNA.* 3(10) 1173-81, 1997.
168. Vartapetian A., Makarova J., Koomin E., Agol V. and Bogdanov A.  
Small cytoplasmic RNA from mouse cells covalently linked to a protein. *FEBS Lett* 232, 35-38, 1988.
169. Verghese S., Apostolikas N., Evangelatos N., Ithakissios G.  
Primary findings of the expression of thymosin beta-10 in human breast cancer. *Br. J. Cancer.*
170. Veronese S., Barbareschi M., Morelli et al.  
Predictive value of ERID5 antibody immunostaining in breast cancer. A paraffin-based retrospective study of 257 cases. *Appl. Immunohistochem*, 3:58-90 1995.
171. Visscher D., Sarkar F., Crissman J.  
Clinical significance of pathologic, cytometric and molecular parameters in carcinoma of the breast. *Adv. Pathol. Lab. Med* 5: 123-61, 1992.
172. Voutsas I., Baxevanis C., Gritsapis A., Missitzis I., Stathopoulos G. Archodakis G., Banis C., Voelter W., Papamichail M.  
Synergy between interleukin-2 and prothymosin alpha fort he increased generation of cytotoxic T lymphocytes against autologous human carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* 49(8): 449-58, 2000.
173. Walker R.  
The erbB.HER type 1 tyrosine kinase receptor family. *J. Pathol.* 185:234-35, 1998.



174. Watts J., Cary P., Saultiere P., Crane-Robinson C. Thymosins: both nuclear and cytoplasmatic protein. *Eur. J. Biochem* 192(3): 643-51, 1990.
175. Watts J. Carry P., and Crane-Robinson C., Prothymosin a is a nuclear protein. *FEBS Lett* 245: 1720, 1989.
176. Weinberg D.  
Proliferation indices in solid tumors. *Ady. Pathol. Lab. Med. J.:* 163-91, 1992.
177. Weidner, Cote, Suster, Weiss.  
Modern surgical Pathology. 1<sup>st</sup> edition, Saunders 2003.
178. World Health Organization. (WHO)  
Classification tumours of the breast and female genital organs. IARC Press. 2003.
179. Wilbur D., Willis J., Mooney R., et al.  
Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin embedded tissue from breast carcinomas: a comparison of immunohistochemistry with dextran-coated charcoal assay. *Mod. Pathol.* 5: 79-84, 1992.
180. Wu C., Habib N., Mitry R., Reitsma P., van Deventor D. and Chamnleau R.  
Overexpression of hepatic prothymosin alpha, a novel marker for human hepatocellular carcinoma. *Br. J. of Cancer* 76, 1199-204, 1997.
181. Yoshimoto M., Sakamoto G., Ohashi Y.  
Time dependency of the influence of prognostic factors on relaps in breast cancer. *Cancer* 72: 2993-3001, 1993.

