



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ

«ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» Γ.Ν.Α

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΤΗΣ ΚΑΣΠΑΣΗΣ-9,
ΤΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-1
ΚΑΙ ΤΗΣ Ε-ΣΕΛΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Της

Παναγιώτας Ν. Κοντογιάννη

Ειδικευόμενης Ιατρού Γενικής Χειρουργικής

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2014

Στους γονείς μου, Νίκο και Μαίρη,

Με ευγνωμοσύνη

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΟΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΡΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΡ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΪΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ' ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 14/11/2007

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 18/02/2008

Ημερομηνία υποβολής πρώτης προόδου: 20/02/2009

Ημερομηνία υποβολής δεύτερης προόδου: 19/02/2010

Ημερομηνία υποβολής τρίτης προόδου: 17/02/2014

Η τριμελής επιτροπή

Μπράμης Ιωάννης: Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κ. Ζωγράφος: Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Θεοδωρόπουλος Γεώργιος: Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Η επταμελής επιτροπή

Μπράμης Ιωάννης: Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κ. Ζωγράφος: Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Μανουράς Ανδρέας: Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Κόντζογλου Κωνσταντίνος: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Λυμπέρη Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πειραματικής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Γαζούλη Μαρία: Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Θεοδωρόπουλος Γεώργιος: Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής υπό τής Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέως (Οργανισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρον 202, παρ. 2, νόμος 5343)

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα

Όνοματεπώνυμο: Παναγιώτα Ν. Κοντογιάννη

Ημερομηνία γέννησεως: 12 Ιανουαρίου 1980

Τόπος γεννήσεως: Αθήνα

Όλα τα έτη της πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης φοίτησα στα «Εκπαιδευτήρια Ζηρίδη», από όπου αποφοίτησα το 1997.

Το Μάιο του 2006 ορκίστηκα, λαμβάνοντας το πτυχίο μου από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό «Λίαν Καλώς».

Τον Ιανουάριο του 2009 ξεκίνησα την ειδίκευση μου στη Γενική Χειρουργική στην Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, η οποία εδράζεται στο Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο». Η ειδίκευσή μου συνεχίζεται μέχρι και σήμερα.

Τον Ιούνιο του 2014 συμμετείχα στο διεθνές εκπαιδευτικό πρόγραμμα για το υπερηχογράφημα στον καρκίνο του μαστού «International Breast Ultrasound Course-IBUS».

Είμαι μέλος της φιλανθρωπικής, αστικής μη κερδοσκοπικής εταιρίας Ε.Μ.Ε.Ι.Σ. (Επιστημονική Μαστολογική Εταιρία, Ίαση-Στήριξη).

Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις:

1. Kontogianni P, Zambirinis CP, Theodoropoulos G, Gazouli M, Michalopoulos NV, Flessas J, Liberi M, Zografos GC. The impact of the stromal cell-derived factor-1-3'A and E-selectin S128R polymorphisms on breast cancer. *Mol Biol Rep.* 2013 Jan;40(1):43-50.
2. Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Pantou MP, Kontogianni P, Gazouli M, Karantanos T, Lymperi M, Zografos GC. Caspase 9 promoter polymorphisms confer increased susceptibility to breast cancer. *Cancer Genet.* 2012 Oct;205(10):508-12.
3. Theodoropoulos GE, Saridakis V, Karantanos T, Michalopoulos NV, Zagouri F, Kontogianni P, Lymperi M, Gazouli M, Zografos GC. Toll-like receptors gene polymorphisms may confer increased susceptibility to breast cancer development. *Breast.* 2012 Aug;21(4):534-8.

4. Lagoudianakis E, Pappas A, Koronakis N, Tsekouras D, Dalianoudis J, Kontogianni P, Papanikolaou D, Chrysikos J, Karavitis G, Markogiannakis H, Filis K, Manouras A. Lymph node harvesting in colorectal carcinoma specimens. *Tumori*. 2011 Jan-Feb;97(1):74-8.
5. Zografos GC, Sergentanis TN, Zagouri F, Papadimitriou CA, Domeyer P, Kontogianni PN, Nonni A, Tsigris C, Patsouris E. Breast self-examination and adherence to mammographic follow-up: an intriguing diptych after benign breast biopsy. *Eur J Cancer Prev*. 2010 Jan;19(1):71-2.
6. Zografos GC, Zagouri F, Sergentanis TN, Nonni A, Michalopoulos NV, Kontogianni P, Koulocheri D, Dimitriadis IE, Bramis J, Patsouris E. Diagnosing papillary lesions using vacuum-assisted breast biopsy: should conservative or surgical management follow? *Onkologie*. 2008 Dec;31(12):653-6.

ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Στην αρχή αυτής της διδακτορικής διατριβής αντί για μια ανακύκλωση αυτών που θα αναφερθούν σε βάθος στις γραμμές της θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που επέτρεψαν σε εμένα να είμαι αυτή την ώρα στη θέση να τη συντάσσω. Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου χωρίς την αδιάλειπτη παρουσία των οποίων στο πλευρό μου δε θα είχα τη δυνατότητα να εκπληρώσω τους στόχους μου. Ήταν εκείνοι που με βοήθησαν να θέσω τις βάσεις της εκπαίδευσής μου, του χαρακτήρα μου, την προσωπικότητα και το ήθος μου. Εκείνοι που παραμέρισαν το εγώ τους για το δικό μου καλό, εκείνοι που με έμαθαν να κυνηγάω τα όνειρά μου και να μη σταματώ χωρίς να τα εκπληρώσω.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνθρωπο που αποτέλεσε πρότυπο για εμένα στην ιατρική μου καριέρα πριν ακόμα την ξεκινήσω. Το θείο μου, ομότιμο καθηγητή Χειρουργικής Ιωάννη Μπράμη. Από τα εφηβικά μου χρόνια θυμάμαι ότι και σαν άνθρωπος αλλά και σαν χειρουργός φάνταζε στα μάτια μου ως ο άνθρωπος που θα ήθελα στο ελάχιστο να πλησιάσω την πορεία του. Με αυτόν έκανα δειλά τα πρώτα μου βήματα στην Ιατρική Σχολή, με εκείνον τα πρώτα μου βήματα στην ειδικότητα της Χειρουργικής, αφού υπήρξε ο πρώτος Διευθυντής μου.

Θα ήθελα, όμως, να ευχαριστήσω και τον επόμενο και σημερινό μου διευθυντή, τον καθηγητή Γεώργιο Ζωγράφο. Πριν ακόμα τελειώσω την Ιατρική Σχολή είχα αποφασίσει ότι θα ασχοληθώ με τη Χειρουργική. Σαν γυναίκα, με ευαισθησία όπως είναι φυσιολογικό στο συγκεκριμένο τομέα, έκανα και το επόμενο βήμα στην απόφασή μου, την απόφαση μελλοντικά να εξειδικευτώ στη διάγνωση και τη θεραπεία των νόσων του Μαστού. Δε θα μπορούσα να φανταστώ πιο κατάλληλο άνθρωπο να με εισάγει στο μαγικό κόσμο αυτού του οργάνου από τον κ. Ζωγράφο, ο οποίος επί πολλά χρόνια προσφέρει την πολύτιμη γνώση και εμπειρία του στο συγκεκριμένο κομμάτι της Χειρουργικής. Ένας λόγος παραπάνω να τον ευχαριστήσω γιατί μου έκανε την τιμή να είναι επιβλέπον μέλος στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Δύο ακόμα δάσκαλοι για μένα στη Χειρουργική, ο καθηγητής κύριος Ανδρέας Μανουράς και ο επίκουρος καθηγητής κύριος Γεώργιος Θεοδωρόπουλος είναι οι επόμενοι που χρωστώ ευγνωμοσύνη. Ο πρώτος με την τεράστια εμπειρία του με έχει μάθει αρκετά από τα μυστικά της κλινικής προσέγγισης του αρρώστου και της εγχειρητικής τεχνικής. Ο δεύτερος με πιο άμεσο τρόπο πάντα ήταν πρόθυμος να λύνει τις απορίες μου και βήμα-βήμα να με καθοδηγεί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια μοριακής Βιολογίας κυρία Μαρία Γαζούλη χωρίς την αρωγή της οποίας η εκτέλεση των εργαστηριακών κομματιών της διατριβής δε θα ήταν εφικτή. Με αρκετή υπομονή και ψυχραιμία, με έβαλε σε έναν εντελώς καινούργιο κόσμο για μένα, εκείνον των πολυμορφισμών του γενετικού υλικού και με καθοδήγησε μαεστρικά μέσα στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

	Σελίδα
Καρκίνος του μαστού	11
Εισαγωγή	11
Επιδημιολογία	12
Αιτιο-παθογένεια καρκίνου του μαστού	14
Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού	20
Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού	23
Προσυμπτωματικός έλεγχος και διάγνωση	27
Αντιμετώπιση καρκίνου του μαστού	35
Πολυμορφισμοί ενός μόνο νουκλεοτιδίου	39
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	41
Ανάλυση πολυμορφισμού του μήκους θραυσμάτων από περιορισμό (RFLP)	43
Κασπάσες	44
Η χημειοκίνη «προερχόμενος από το στρωματικό κύτταρο παράγοντας-1» (stromal cell-derived factor-1/SDF-1)	46
Ε-σελεκτίνη	48

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης	52
Υλικό και μέθοδος	56
Αποτελέσματα	64
Συζήτηση	75
Συμπεράσματα	83
Πίνακες μελέτης	86
Περίληψη-Abstract	95
Βιβλιογραφία	97

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καρκίνος του μαστού

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας κακοήθης όγκος, ο οποίος ξεκινάει από τα κύτταρα του μαστού. Κακοήθης όγκος είναι μια ομάδα καρκινικών κυττάρων που μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντες ιστούς ή να επεκταθούν (μετάσταση) σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος. Η συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα συμβαίνει σχεδόν αποκλειστικά στις γυναίκες, αν και μπορεί να προσβάλλει και άνδρες.

Ο φυσιολογικός μαστός

Ο μαστός του θήλεος σχηματίζεται κυρίως από τα λοβίδια (γαλακτο-παραγωγοί αδένες), τους πόρους (μικροσκοπικοί σωλήνες που μεταφέρουν το γάλα από τα λοβίδια στη θηλή) και το στρώμα (λιπώδης ιστός και συνδετικός ιστός που περιβάλλουν τους πόρους και τα λοβίδια, τα αιμοφόρα αγγεία και τα λεμφαγγεία). Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού ξεκινούν στα κύτταρα που επενδύουν τους πόρους (πορογενείς καρκίνοι). Μερικοί ξεκινούν στα κύτταρα που επενδύουν τα λοβίδια (λοβιακοί καρκίνοι), ενώ ένας μικρός αριθμός ξεκινά σε άλλους ιστούς. Το λεμφικό σύστημα είναι σημαντικό, καθώς αποτελεί έναν από τους τρόπους εξάπλωσης των καρκίνων του μαστού. Οι λεμφαδένες είναι μικρά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που συνδέονται μεταξύ τους μέσω των λεμφαγγείων, τα οποία ομοιάζουν με μικρές φλέβες με τη διαφορά πως αντί για αίμα μεταφέρουν λέμφο. Η λέμφος περιέχει υγρά από τους ιστούς και άχρηστα προϊόντα, καθώς και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού μπορούν να εισέλθουν στα λεμφαγγεία και να ξεκινήσουν να αναπτύσσονται εντός των λεμφαδένων. Τα περισσότερα λεμφαγγεία στο μαστό επικοινωνούν με λεμφαδένες κάτω από το χέρι (μασχαλιαίοι λεμφαδένες), μερικά επικοινωνούν με λεμφαδένες εντός του θώρακα (έσω μαστικοί λεμφαδένες) και κάποια με λεμφαδένες άνωθεν ή κάτωθεν της κλείδας (υπερκλείδιοι ή υποκλείδιοι λεμφαδένες αντίστοιχα). Στην περίπτωση που καρκινικά κύτταρα έχουν επεκταθεί στους λεμφαδένες, υπάρχει υψηλότερη πιθανότητα τα κύτταρα αυτά να έχουν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος και να έχουν μετασταθεί σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος. Όσο περισσότεροι είναι οι λεμφαδένες με καρκινικά κύτταρα, τόσο υψηλότερη είναι η πιθανότητα αυτή. Παρόλα αυτά, δεν αναπτύσσουν μετάσταση όλες οι γυναίκες με διηθημένους λεμφαδένες, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που αναπτύσσουν μετάσταση χωρίς κανένα διηθημένο λεμφαδένα.

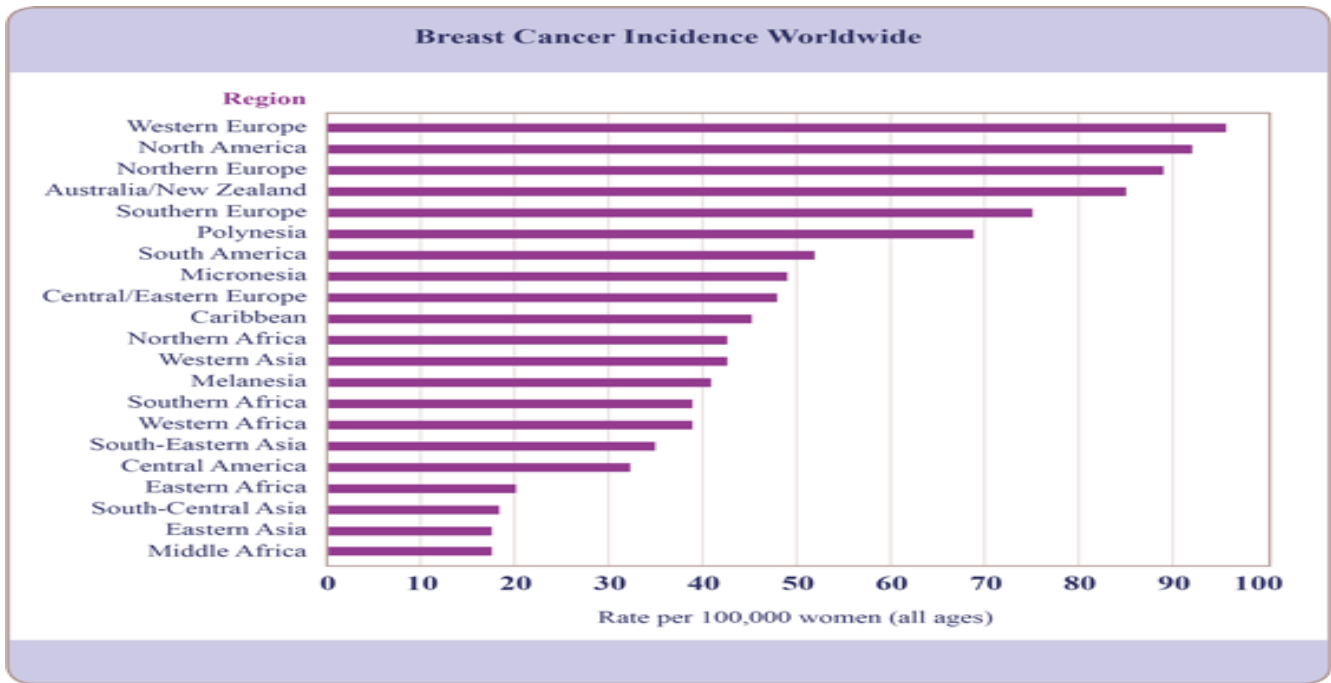
Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός καρκίνος ανάμεσα στις γυναίκες παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι περισσότερες από 1.7 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού εμφανίστηκαν ανά τον κόσμο το 2012 ¹. Οι δείκτες του καρκίνου του μαστού παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στις διάφορες χώρες του κόσμου. Γενικά, οι ανεπτυγμένες χώρες (όπως οι ΗΠΑ, η Αγγλία και η Αυστραλία) έχουν υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τις αναπτυσσόμενες χώρες (όπως για παράδειγμα το Νεπάλ και η Ρουάντα). Τις τελευταίες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα, παρατηρήθηκε μια αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού στο Δυτικό κόσμο. Οι λόγοι για αυτήν την τάση συνοψίστηκαν στην εισαγωγή της προληπτικής μαστογραφίας. Αλλαγές στις αναπαραγωγικές συνήθειες- ιδιαίτερα ο μειωμένος αριθμός των γεννήσεων σε συνδυασμό με την αύξηση της ηλικίας απόκτησης του πρώτου παιδιού ¹²- φαίνεται ότι επίσης έπαιξαν ένα ρόλο, όπως επίσης και παράγοντες που σχετίζονται με το σύγχρονο τρόπο ζωής. Στους τελευταίους περιλαμβάνονται οι δυτικές διαιτητικές συνήθειες, η περιορισμένη φυσική δραστηριότητα, οι αυξανόμενοι δείκτες της παχυσαρκίας, καθώς και η πιο διαδεδομένη χρήση εξωγενών ορμονών για αντισύλληψη και θεραπεία εμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων ^{5,10,11}.

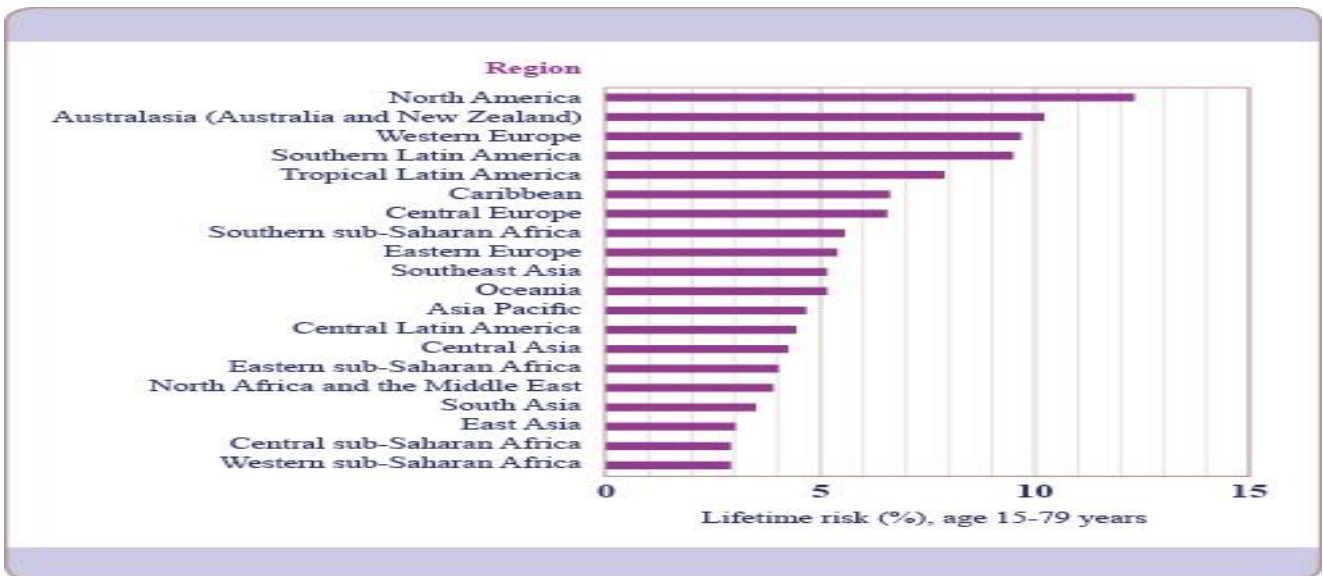
Η έναρξη του 21^{ου} αιώνα συνδυάστηκε με μια δραματική μείωση στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού σε κάποιες δυτικές χώρες (όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γαλλία και η Αυστραλία). Οι μειώσεις αυτές παρατηρήθηκαν παράλληλα και στις ΗΠΑ και αντικατόπτριζαν τις παρόμοιες πρακτικές στη χρήση του μαστογραφικού προσυμπτωματικού ελέγχου καθώς και τη μειωμένη χρήση συνδυασμών ορμονικής υποκατάστασης ². Το 2008, η επίπτωση του καρκίνου του μαστού παρουσίαζε μια διακύμανση από 19.3 περιστατικά ανά 100000 στην Ανατολική Αφρική μέχρι 89.9 περιστατικά ανά 100000 στη Δυτική Ευρώπη ². Με την έγκαιρη διάγνωση και τις σημαντικές εξελίξεις στο πεδίο της αντιμετώπισης, τα ποσοστά θανάτων από τον καρκίνο του μαστού έχουν μειωθεί τα τελευταία 25 χρόνια στη Βόρειο Αμερική και σε μερικές περιοχές της Ευρώπης ^{5,6,7}. Σε αρκετές Αφρικανικές και Ασιατικές χώρες (όπως η Ουγκάντα, η Νότιος Κορέα και η Ινδία), ωστόσο, τα ποσοστά θανάτων από καρκίνο του μαστού αυξάνονται ^{2,8,9}.

Ο δείκτης της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού αυξάνεται με την ηλικία και κυμαίνεται από 1.5 περιπτώσεις ανά 100000 γυναίκες στην ηλικία των 20-24 ετών σε ένα μέγιστο των 421.3 περιπτώσεων ανά 100000 σε γυναίκες 75-79 ετών. Το 95% των νέων περιπτώσεων καρκίνου του

μαστού εμφανίζεται σε γυναίκες ηλικίας 40 ετών ή μεγαλύτερες. Η μέση ηλικία των γυναικών τη στιγμή της διάγνωσης του καρκίνου του μαστού είναι τα 61 έτη³.



Εικόνα 1. Επίπτωση του καρκίνου του μαστού (αριθμός νέων περιστατικών ανά 100000 γυναίκες) σε διάφορες περιοχές του πλανήτη¹



Εικόνα 2. Κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού εκφρασμένος σε ποσοστό % στη διάρκεια της ζωής μιας γυναίκας σε διάφορες περιοχές του κόσμου⁴

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσθείς καρκίνος και η πρωταρχική αιτία θανάτου σχετιζόμενου με καρκίνο στις γυναίκες ανά τον κόσμο, απαριθμώντας το 23% (1.38 εκατομμύρια) των νέων περιστατικών καρκίνου και το 14% (458400) του συνολικού αριθμού των θανάτων από καρκίνο το 2008. Περίπου οι μισές νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και το 60% των θανάτων υπολογίζεται ότι συμβαίνουν σε οικονομικά αναπτυσσόμενες χώρες. Γενικά, οι δείκτες επίπτωσης είναι υψηλοί στη Βόρεια Ευρώπη, την Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία και τη Βόρεια Αμερική. Οι ίδιοι δείκτες βρίσκονται σε μέτρια επίπεδα στη Νότιο Αμερική, την Καραϊβική και τη Βόρειο Αφρική, ενώ βρίσκονται χαμηλοί στην υποσαχάρια Αφρική και την Ασία. Εκτός από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω και η κατανάλωση αλκοόλ έχει ενοχοποιηθεί για τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού^{13,14}.

Αιτιο-παθογένεια καρκίνου του μαστού

Αιτιολογικοί παράγοντες

Γεωγραφική θέση

Όπως φάνηκε και από την ανάλυση της επιδημιολογίας της νόσου η γεωγραφική θέση παίζει πολύ μεγάλο ρόλο. Περισσότερες από τις μισές νέες περιπτώσεις εμφανίζονται στο Δυτικό κόσμο¹⁵. Ο καρκίνος του μαστού απαριθμεί το 3-5% των συνολικών θανάτων στη Δύση, το 1-3% στις αναπτυσσόμενες χώρες ενώ πιστεύεται πως είναι σπάνιος στην Ιαπωνία.

Ηλικία

Οι Russell και συνεργάτες παρατήρησαν ότι ο καρκίνος του μαστού είναι πολύ σπάνιος πριν από την ηλικία των 20 ετών, αλλά ότι η επίπτωση αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία και ότι μέχρι την ηλικία των 90 ετών το ένα πέμπτο των γυναικών έχει ήδη προσβληθεί¹⁶. Επιπρόσθετα, οι Dumitrescu και Cotarla ανέφεραν ότι λιγότερες από 10 νέες περιπτώσεις ανά 100000 γυναίκες εμφανίζονται σε ηλικίες κάτω των 25 ετών και ότι το ίδιο νούμερο αυξάνεται κατά 100 φορές πριν από την ηλικία των 45 ετών. Αυτό υποδεικνύει ότι οι αναπαραγωγικές ορμόνες που παράγονται από τις ωοθήκες και τα επινεφρίδια εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού αφού οι καρκίνοι που δεν ανταποκρίνονται σε ορμόνες δεν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη διαφορά της επίπτωσης κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου¹⁷.

Επιπλέον, πιστεύεται ότι η ηλικία της εμμηναρχής και της εμμηνόπαυσης συμβάλλει στη διάρκεια έκθεσης στην καρκινογόνο επίδραση των ορμονών του φύλου¹⁸. Προς υποστήριξη του γεγονότος αυτού, οι Aguas και συνεργάτες παρατήρησαν ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού μειώνεται κατά 15-20% για κάθε χρόνο που καθυστερεί η εμμηναρχή και ότι η καθυστερημένη εμμηνόπαυση σε ηλικία 55 ετών ή παραπάνω αυξάνει τη διάρκεια της έκθεσης της γυναίκας σε οιστρογόνα, αλλά δεν έχει καμία σχέση με γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού¹⁸.

Φύλο

Λιγότερο από το 1% των ασθενών με καρκίνο του μαστού είναι άνδρες¹⁶. Όπως και νά 'χει, οι διαφορές θεωρούνται ότι είναι ορμονικές, αφού ακόμα και ο ανδρικός καρκίνος του μαστού έχει δείχθει ότι εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνου, προγεστερόνης και ανδρογόνων. Επίσης, οι άνδρες με σύνδρομο Klinefelter έχει παρατηρηθεί ότι έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού¹⁹.

Γενετικοί παράγοντες

Ο καρκίνος του μαστού είναι πιο κοινός σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Οι Russell και συνεργάτες παρατήρησαν ότι μόνο το 5% των καρκίνων του μαστού σχετίζεται με συγκεκριμένη μετάλλαξη. Ακόμα, μια μετα-ανάλυση 52 ξεχωριστών επιδημιολογικών μελετών αποκάλυψε ότι το 12% των γυναικών με τη συγκεκριμένη νόσο έχουν ένα ακόμα προσβεβλημένο μέλος στην οικογένειά τους και ότι το 1% των ασθενών έχουν έναν ή περισσότερους συγγενείς προσβεβλημένους. Η έρευνα κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι γυναίκες με έναν ή περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με εκείνες που δεν έχουν.

Διατροφή και αλκοόλ

Αυτά τα δύο φαίνεται ότι παίζουν ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού και υπάρχει μια σύνδεση ανάμεσα στη διατροφή τη χαμηλή σε φυτο-οιστρογόνα και τη συγκεκριμένη νόσο, καθώς και με την υψηλή κατανάλωση αλκοόλ. Σύμφωνα με τους Dumitrescu και Cotarla ο κίνδυνος αυξάνεται προοδευτικά με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο της κατανάλωσης αλκοόλ των 60 g (2-5 ποτά) την ημέρα, εξαρτώμενο από το πόσο ισχυρό είναι το ποτό και για κάθε ημερήσια υπέρβαση κατά 10 g, ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 9%.

Επιπρόσθετα, το καλοψημένο κρέας και δίαιτες πλούσιες σε λιπαρά σχετίζονται με αυξημένη επίπτωση καρκίνου του μαστού και έχει συγκεκριμένα παρατηρηθεί ότι μια διατροφή που περιέχει 35-40% λίπος όπως συμβαίνει με τις δίαιτες στο Δυτικό κόσμο έχει επίδραση στην ογκογόνο διαφοροποίηση του μαστού. Αυτό συμβαίνει γιατί οι δίαιτες αυτές είναι πλούσιες σε χοληστερόλη που προάγει τη σύνθεση οιστρογόνων και άλλων στεροειδών ορμονών.

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η πρόσληψη φυτικών ινών αναστέλλει τα οιστρογόνα και αυτή η προστατευτική τους δράση είναι υψηλότερη με μια ημερήσια πρόσληψη 35-45 g φυτικών ινών την ημέρα. Αυτός μάλλον είναι και ο λόγος που ο καρκίνος του μαστού δεν είναι κοινός στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η κατανάλωση φυτικών ινών είναι πολύ υψηλή (Αφρική, Ασία και Νότιος Αμερική). Άλλοι διαιτητικοί παράγοντες όπως τα φασόλια σόγιας και οι βιταμίνες επίσης θεωρούνται ότι μειώνουν την επίπτωση της νόσου, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα πλήρως αποκαλυφθεί.

Φυσική δραστηριότητα και παχυσαρκία

Μαζί με τη διατροφή, η άσκηση μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα επίπεδα των ορμονών στο πλάσμα, κάτι το οποίο μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Οι Aguas και συνεργάτες παρατήρησαν ότι οι δύο αυτοί παράγοντες ξεχωριστά και σε συνδυασμό επηρεάζουν το σωματικό βάρος και ότι η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι Dumitrescu και Cotarla υποστήριξαν την παρατήρηση αυτή και επεσήμαναν ότι ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού είναι ιδιαίτερα έκδηλος ανάμεσα στις παχύσαρκες γυναίκες που δε χρησιμοποιούν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης και ότι για κάθε 5 kg σωματικού βάρους, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται κατά 8%. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το λίπος είναι σημαντική πηγή οιστρογόνων που συντίθενται από χοληστερόλη.

Ενδοκρινικοί παράγοντες

Ενδογενείς

Ο καρκίνος αυτός παρατηρείται πιο συχνά σε μη γόνιμες γυναίκες καθώς και σε εκείνες που δε θηλάζουν τα μωρά τους. Πρώτη εγκυμοσύνη σε μικρή ηλικία, ειδικά όταν συνδυάζεται με καθυστερημένη εμμηναρχή και πρόωρη εμμηνόπαυση έχει βρεθεί ότι δρουν προστατευτικά. Αυτό συμβαίνει γιατί τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι χαμηλότερα στην εγκυμοσύνη και σε γυναίκες με λίγα παιδιά.

Εξωγενείς παράγοντες

Μια μεγάλη μετα-ανάλυση έδειξε ότι μακροχρόνια χρήση θεραπείας υποκατάστασης ορμονών είναι υπεύθυνη για την επέκταση των όγκων του μαστού πάνω από το αναμενόμενο σε γυναίκες ηλικίας μεταξύ 50 και 70 ετών. Οι Aguas και συνεργάτες ανακοίνωσαν ότι η θεραπεία υποκατάστασης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού (σχετικός κίνδυνος 1.21-1.40), ειδικά ανάμεσα στις γυναίκες που λαμβάνουν οιστρογόνα μαζί με προγεστίνη για 5 χρόνια ή περισσότερο. Το ίδιο είναι αληθές και για από του στόματος αντισυλληπτικά καθώς η έρευνα έδειξε μια μέτρια αύξηση του κινδύνου της τάξης του 1.24 σε μια μετα-ανάλυση 54 μελετών που συμπεριελάμβανε 150000 γυναίκες. Ο κίνδυνος θεωρείται ότι είναι μεγαλύτερος σε γυναίκες που ξεκίνησαν την αντισύλληψη πριν τα 20 χρόνια. Οι Dumitrescu και Cotarla έδειξαν και συσχέτιση ανάμεσα στον καρκίνο του μαστού και τα από του στόματος αντισυλληπτικά ανεξάρτητα από τη δοσολογία, την ηλικία πρώτης χρήσης, τη διάρκεια της χρήσης, την ηλικία της διάγνωσης και την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού. Ο κίνδυνος αποδόθηκε στο οιστρογονικό περιεχόμενο των αντισυλληπτικών. Παρόλα αυτά, η θεραπεία ορμονική υποκατάστασης έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα, στα οποία περιλαμβάνονται η ανακούφιση από την κολπική ξηρότητα και ο κνησμός, ο μειωμένος κίνδυνος ανάπτυξης οστεοπόρωσης και παθολογικών καταγμάτων, καθώς επίσης και εξασφαλίζει γενικότερα του «ευ ζην» των ατόμων²⁰.

Πυκνότητα μαζικού αδένα

Πρόκειται για καλά τεκμηριωμένο παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του μαστού και κατά τη διάρκεια και μετά από την αναπαραγωγική ηλικία. Έρευνες έχουν δείξει ότι γυναίκες με >75% αυξημένη μαζική πυκνότητα στη μαστογραφία έχουν 5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με εκείνες με <5% αύξηση της μαζικής πυκνότητας. Οι Aiello και συνεργάτες πραγματοποίησαν μια μελέτη 546 γυναικών που είχαν διαγνωστεί με διηθητικό καρκίνο του μαστού και βρήκαν ότι γυναίκες με μέγεθος όγκου >1 cm ήταν πιο πιθανό να έχουν πυκνούς μαζικούς αδένες σε σύγκριση με εκείνες με μέγεθος όγκου <1 cm. Επίσης, βρήκαν ότι η κατάσταση των λεμφαδένων, η λεμφαδενική και/ή αγγειακή διήθηση σχετίζονταν θετικά με τη μαζική πυκνότητα²¹.

Καλοήθης νόσος του μαστού

Προηγούμενο ιστορικό καλοήθους νόσου του μαστού, όπως η ινοκυστική νόσος και το ινοαδένωμα είναι γνωστό ότι αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού. Η ινοαδένωση με σοβαρού

βαθμού δυσπλασία και η επιθηλίωση θεωρούνται πως είναι προκαρκινωματώδεις καταστάσεις αν και δεν εξελίσσονται πάντα σε καρκίνο.

Μοριακή γενετική και καρκίνος του μαστού

25% όλων των καρκίνων του μαστού εκκινούν από μεταλλάξεις των υψηλής διεισδυτικότητας γονιδίων BRCA1, BRCA2, p53 και PTEN. Το γονίδιο BRCA1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και το γονίδιο BRCA2 στο χρωμόσωμα 13. Ασθενείς με θετικό γονίδιο έχουν 80% κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, ειδικά αν βρίσκονται σε προεμμηνοπαυσιακή ηλικία. Επιπρόσθετα, οι Russell και συνεργάτες συμφώνησαν στη συσχέτιση καρκίνου του μαστού και πολυμορφισμών σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας σε συνδυασμό με εξωγενείς παράγοντες όπως η διατροφή, το αλκοόλ, η περιβαλλοντική μόλυνση, αλλά και ενδογενείς παράγοντες όπως η έκθεση σε οιστρογόνα και προγεστερόνη.

Οι Aguas και συνεργάτες παρατήρησαν ότι τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 προδιαθέτουν μια γυναίκα σε καρκίνο του μαστού μόλις σε ποσοστό 5-10% του συνολικού αριθμού των καρκίνων του μαστού και πιστεύουν κι ότι ακόμα και στην περίπτωση του οικογενειακού ιστορικού, εκτός από τα γονίδια που μοιράζονται τα μέλη μια οικογένειας, μοιράζονται και τους ίδιους επιδρώντες περιβαλλοντικούς παράγοντες²².

Ο ρόλος του αντιγόνου HER-2/NEU

Πρόκειται για μια πρωτεΐνη- υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που υπερεκφράζεται σε διαφορετικούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, της ωοθήκης, του πνεύμονα, του στομάχου και του στόματος²³. Το 1987, το πρωτο-ογκογονίδιο HER-2/neu αποκαλύφθηκε ότι υπερεκφράζεται στο 20-30% των διηθητικών καρκίνων του μαστού και επίσης συσχετίστηκε με φτωχότερη πρόγνωση²⁴. Επιπρόσθετα, η θετικότητα για το HER-2/neu θεωρείται προγνωστικός παράγοντας για την πιθανότητα αντίστασης ή ευαस्थσίας σε μερικές συμβατικές ορμονικές θεραπείες, όπως η ταμοξιφαίνη. Το Herceptin (τραστουζουμάμπη), ένα ανασυνδυασμένο αντι-HER-2/neu μονοκλωνικό αντίσωμα έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την έκβαση σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, είτε όταν χρησιμοποιείται μόνο του ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία²⁵.

Τριπλά αρνητικός καρκίνος τους μαστού

Πρόκειται για τον καρκίνο που είναι αρνητικός για υποδοχείς οιστρογόνου, προγεστερόνης και HER-2/neu και έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει σε συγκεκριμένες κατηγορίες ασθενών που κυρίως προέρχονται από κατώτερες κοινωνικο-οικονομικές ομάδες²⁶. Αποτελεί το 20% όλων των καρκίνων του μαστού και μέχρι τώρα δεν έχει κάποια τυπική θεραπεία²⁷. Ο συγκεκριμένος τύπος έχει ενοχοποιηθεί για υψηλά ποσοστά υποτροπής, γρηγορότερη ανάπτυξη και φτωχότερη πρόγνωση και είναι ευαίσθητος μόνο στη χημειοθεραπεία²⁸. Επιπλέον, συσχετίζεται με αδρανοποίηση του BRCA1 και υπερέκφραση του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR, γεγονός που τον καθιστά ευαίσθητο σε θεραπείες αντι-EGFR²⁹. Στην παρούσα χρονική περίοδο πολλές δοκιμαστικές μελέτες βρίσκονται υπό εξέλιξη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα έχουν ως στόχο τους το μοριακό επίπεδο³⁰. Παρόλα αυτά έχει περιγραφεί και χημειο-ανθεκτικός καρκίνος κι επομένως πρέπει να κατευθυνθούμε προς την ενεργοποίηση ανδρογόνων και στόχευση αρχέγονων καρκινικών κυττάρων για την αντιμετώπισή του³¹.

Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς τους

Στεροειδείς ορμόνες

Αυτές περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και τα ανδρογόνα. Οι ορμόνες αυτές παράγονται από ένα κοινό μόριο, όπως είναι η χοληστερόλη, μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από αρκετά ένζυμα για να παράγει μια ευρεία ποικιλία ορμονών για διαφορετικούς ιστούς και όργανα. Η διαδικασία αυτή είναι επαρκώς ελεγχόμενη και η απελευθέρωση αυτών των παραγόντων στο αίμα ακολουθείται από είσοδό τους στα κύτταρα-στόχους, μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με τη χρησιμοποίηση πρωτεϊνών-υποδοχέων υψηλής συνάφειας, οι οποίοι είναι γνωστοί ως υποδοχείς στεροειδών ορμονών³².

Τα οιστρογόνα έχουν σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργικότητα πολλών ιστών, όπως ο μαστός, η μήτρα, το καρδιαγγειακό σύστημα, ο εγκέφαλος και το ουρογεννητικό σύστημα τόσο των ανδρών όσο και των γυναικών. Σε πλήρη συμφωνία με αυτό, οι Kato και συνεργάτες υποστήριξαν ότι η ανάπτυξη όγκων των αναπαραγωγικών οργάνων όπως είναι ο μαστός ή ο προστάτης εξαρτάται από τη δράση των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων.

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα στρωματικά κύτταρα του μαστού μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη των φυσιολογικών και των νεοπλαστικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και μπορούν να εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες αφού πρώτα διεγερθούν από ενδογενείς ορμόνες. Ο λιπώδης ιστός περιέχει το ένζυμο αρωματάση, που παράγει οιστραδιόλη από την κυκλοφορούσα χοληστερόλη. Εξαιτίας της υψηλότερης αναλογίας των κυττάρων αυτών στους μαστούς των μεγαλύτερων σε ηλικία γυναικών, τα επίπεδα της οιστραδιόλης στους μαζικούς ιστούς των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι κατά πολύ υψηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδά τους στο πλάσμα³³. Αυτό πιθανότατα εξηγεί και την αυξανόμενη επίπτωση του καρκίνου του μαστού με την πάροδο της ηλικίας, ενώ υποστηρίζει και το ρόλο των στεροειδών ορμονών στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού.

Υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Πρόκειται για δομικά συγγενείς ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τις στεροειδείς ορμόνες, όπως είναι τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, και αναμεταδίδουν τα σήματά τους οδηγώντας στη γονιδιακή έκφραση. Οι καρκίνοι που εξαρτώνται από στεροειδείς ορμόνες είναι του μαστού, του προστάτη, των όρχεων, της ωοθήκης και του ενδομητρίου, οι οποίοι είναι προϊόν της απορρύθμισης της έκκρισης ορμονών, της σηματοδότησης και της δράσης των υποδοχέων. Το σενάριο του σημαντικού ρόλου που παίζουν οι στεροειδείς ορμόνες στην καρκινογένεση αποδείχθηκε για πρώτη φορά με τη χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών, η οποία ακολουθήθηκε από τη μείωση των επιπέδων των κυκλοφορούντων ορμονών καθώς και από αξιοσημείωτη βελτίωση των γυναικών με καρκίνο του μαστού³⁴.

Τα οιστρογόνα πιστεύεται ότι προάγουν τις ποικίλες λειτουργίες τους μέσω δύο συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών υποδοχέων, του υποδοχέα-α και -β των οιστρογόνων (ER-α και ER-β), που παράγονται από διαφορετικά γονίδια και λειτουργούν σαν παράγοντες μεταγραφής που ενεργοποιούνται από τους συνδέτες. Αυτοί, σε συνδυασμό με τα ανδρογόνα είναι μέλη της μεγάλης ομάδας των υποδοχέων των πυρηνικών ορμονών, που σχηματίζουν ομοδιμερή και συνδέονται με συγκεκριμένα στοιχεία του DNA, που αποκαλούνται στοιχεία αποκρινόμενα στις ορμόνες (HRE) στα στόχους-γονίδια υποκινητές³⁵.

Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού

Σε αντίθεση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ο καθορισμός της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού δεν έχει καταστεί πιθανός εξαιτίας της έλλειψης δεικτών που ορίζουν την υπερπλασία (τυπική

ή άτυπη), το καρκίνωμα in situ και το διηθητικό καρκίνο³⁶. Όπως και νά 'χει ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί αδρά σε in situ και διηθητικό καρκίνωμα. Το καρκίνωμα του μαστού in situ ταξινομείται περαιτέρω σαν πορογενές ή λοβιακό. Το πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS) είναι αισθητά πιο κοινό σε σύγκριση με το λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS) και συνιστά μια ετερογενή ομάδα όγκων. Παραδοσιακά το DCIS διακρίνεται σε υποτύπους ανάλογα με τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά του όγκου. Η ταξινόμηση αυτή έδωσε ζωή σε πέντε επιπλέον καλά αναγνωρισμένους υποτύπους. Οι υπότυποι αυτοί είναι: ο καρκίνος φαγεσωρικού τύπου (comedo), ο διάτρητος, ο μικροθηλώδης, ο θηλώδης και ο συμπαγής³⁷. Αν και η ταξινόμηση αυτή έχει υπάρξει ένα χρήσιμο εργαλείο για αρκετές δεκαετίες, στηρίζεται αποκλειστικά και μόνο στην ιστολογία χωρίς να λαμβάνει υπόψη της νεότερους μοριακούς δείκτες που έχουν αποδεδειγμένη προγνωστική σημασία.

Με την αποκάλυψη χειρουργικών εξελίξεων που οδήγησε σε θεραπείες με διατήρηση του μαστού, έχει πλέον καταστεί αναγκαία η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση το σχετικό κίνδυνο που έχουν για υποτροπή. Οι απαιτήσεις αυτές έχουν οδηγήσει στη γέννηση μερικών νέων συστημάτων ταξινόμησης που εμπερικλείουν μοριακούς δείκτες όπως ο ER, ο ErbB2 (Her2/neu) και ο p53^{38,39,40,41}. Αν και η χρήση των δεικτών αυτών για το DCIS δεν έχει καθιερωθεί ως πρακτική ρουτίνας από την παγκόσμια ιατρική κοινότητα, είναι αξιοσημείωτο ότι το National Comprehensive Cancer Network έχει συμπεριλάβει τον καθορισμό της κατάστασης των υποδοχέων οιστρογόνου σαν τμήμα της διερεύνησης του DCIS⁴².

Παρόμοια με τα καρκινώματα in situ, τα διηθητικά καρκινώματα συνιστούν μια ετερογενή ομάδα όγκων που διαφοροποιούνται σε ιστολογικούς υποτύπους. Οι κυριότεροι τύποι διηθητικού καρκίνου περιλαμβάνουν το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, το διηθητικό λοβιακό, τη μίξη πορογενούς/λοβιακού, το βλεννώδες (κολλοειδές), το σωληνώδες, το μυελοειδές και το θηλώδες καρκίνωμα. Από τα καρκινώματα αυτά το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (IDC) είναι, με διαφορά, ο πιο κοινός υποτύπος, αφού αποτελεί το 70-80% όλων των διηθητικών βλαβών⁴³. Το IDC υποκατηγοριοποιείται περαιτέρω είτε ως καλώς διαφοροποιημένο (σταδίου 1-grade 1), μετρίως διαφοροποιημένο (σταδίου 2-grade 2) ή φτωχά διαφοροποιημένο (σταδίου 3-grade 3) με βάση τα επίπεδα του πυρηνικού πλειομορφισμού, το σχηματισμό αδενίων και σωληνίσκων και το μιτωτικό δείκτη⁴⁴.

Σε αντίθεση με το DCIS, όπου η χρησιμοποίηση των μοριακών δεικτών εξακολουθεί να αμφισβητείται, δε συμβαίνει το ίδιο με τον IDC, όπου η χρήση του ER, PR και HER-2/neu, είναι

καθολικά αποδεκτή και συστήνεται η κατάστασή τους να καθορίζεται σε όλα τα διηθητικά καρκινώματα ^{42,45}. Επιπρόσθετα, το Κολλέγιο των Αμερικανών Παθολογοανατόμων, αναγνωρίζει, αλλά δεν απαιτεί ή συστήνει τη χρήση άλλων επικουρικών δοκιμασιών (όπως είναι ο καθορισμός του προφίλ των μικροσυστοιχιών των γονιδίων ή η ανοσοϊστοχημική χρώση για άλλους δείκτες από τον ER, τον PR και τον HER-2/neu) με την προϋπόθεση ότι υπάρχει διαθέσιμος επαρκής ιστός. Η χρήση του προσδιορισμού του ER, του PR και του HER-2/neu τονίζει την προοπτική που έχουν οι μοριακοί δείκτες στο να κατευθύνουν τις κλινικές επιλογές ⁴⁶. Ήδη η κατάσταση των δεικτών αυτών βοηθά στον καθορισμό των ασθενών που είναι πιθανό να ανταποκριθούν σε στοχευμένες θεραπείες (όπως είναι η ταμοξιφαίνη ή οι αναστολείς της αρωματάσης για ER⁺/PR⁺ ασθενείς και η τραστουζουμάμπη ή η λαπατινίμπη για HER2/neu ασθενείς) ^{47,48}.

Συνολικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού είναι η ακόλουθη:

Μη διηθητικοί επιθηλιακοί καρκίνοι

1. Λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS)
2. Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS): θηλώδες, ηθμοειδές, συμπαγές και φαγεσωρικού τύπου

Διηθητικοί επιθηλιακοί καρκίνοι (ποσοστό επί του συνόλου)

1. Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (10-15%)
2. Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, το οποίο διακρίνεται σε
 - Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, Not Otherwise Specified (NOS) (50-70%)
 - Σωληνώδες καρκίνωμα (2-3%)
 - Βλεννώδες ή κολλοειδές καρκίνωμα (2-3%)
 - Μυελοειδές καρκίνωμα (5%)
 - Διηθητικό ηθμοειδές (1-3%)
 - Διηθητικό θηλώδες (1-2%)
 - Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα (1%)
 - Μεταπλαστικό καρκίνωμα (1%)
 - Νόσος Paget (<1%)

Μεικτοί Συνδετικοί και Επιθηλιακοί όγκοι

1. Φυλλοειδείς όγκοι, καλοήθεις ή κακοήθεις
2. Καρκινοσάρκωμα
3. Αγγειοσάρκωμα

Η νόσος Paget του μαστού είναι μια σπάνια εκδήλωση του καρκίνου του μαστού που χαρακτηρίζεται από νεοπλαστικά κύτταρα στην επιδερμίδα του συμπλέγματος θηλή-θηλαία άλω. Στην πιο κοινή μορφή της εκδηλώνεται με έκζεμα στη θηλαία άλω, αιμορραγία, εξέλκωση και κνησμό στη θηλή^{49,50,51,52}. Η διάγνωση συνήθως καθυστερεί εξαιτίας της σπάνιας φύσης της νοσολογικής αυτής οντότητας και της σύγχυσης που δημιουργείται με άλλες δερματολογικές διαταραχές^{53,54,55,56,57}. Λόγω του γεγονότος αυτού, προτείνεται οποιαδήποτε εξελκωμένη ή ερεθισμένη βλάβη στο σύμπλεγμα θηλή-θηλαία άλω να υποβάλλεται σε βιοψία υπό τοπική αναισθησία. Έχει βρεθεί ότι σε τέτοιες περιπτώσεις συνυπάρχει ένας συσχετιζόμενος καρκίνος σε κάποιο άλλο σημείο του μαστού στο 80% των περιπτώσεων^{58,59,60}.

Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού⁶¹

Η Αμερικανική Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer-AJCC) κατατάσσει τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε τέσσερα στάδια, σύμφωνα με το σύστημα TNM, το οποίο βασίζεται στο μέγεθος του όγκου (T), την κατάσταση των λεμφαδένων (N) και τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (M).

Στάδιο	Μέγεθος Όγκου	Λεμφαδένες	Μεταστάσεις
Στάδιο 0	Tis	N0	M0
Στάδιο I	T1	N0	M0
Στάδιο IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Στάδιο IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Στάδιο IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
Στάδιο IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Στάδιο IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
Σταδιο IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 1. Σύστημα σταδιοποίησης TNM για τον καρκίνο του μαστού

Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Καμία ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
Tis	DCIS
	LCIS
	Νόσος Paget της θηλής χωρίς όγκο (η νόσος Paget που σχετίζεται με όγκο ταξινομείται σύμφωνα με το μέγεθος του όγκου)
T1	Όγκος ≤ 2 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1mic	Μικροδιήθηση ≤ 0.1 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1a	Όγκος > 0.1 αλλά όχι > 0.5 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1b	Όγκος > 0.5 αλλά όχι > 1 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1c	Όγκος > 1 cm αλλά όχι > 2 cm στη μέγιστη διάμετρο
T2	Όγκος > 2 cm αλλά όχι > 5 cm στη μέγιστη διάμετρο
T3	Όγκος > 5 cm στη μέγιστη διάμετρο
T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους, με άμεση επέκταση σε (a) το θωρακικό τοίχωμα ή (b) το δέρμα μόνο, όπως περιγράφεται παρακάτω
T4a	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα, χωρίς συμμετοχή του μείζονος θωρακικού μυός
T4b	Οίδημα (περιλαμβανομένου και του peau d' orange) ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφόρα οζίδια περιορισμένα στον ίδιο μαστό
T4c	T4a και T4b μαζί
T4d	Φλεγμονώδης νόσος

Πίνακας 2. Πρωτοπαθής όγκος (T)

Mx	Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να εκτιμηθούν
M0	Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Υπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 3. Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

Nx	Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Δεν υπάρχουν μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες που να αναγνωρίζονται ιστολογικά
N0 (I)	Καμία ιστολογική μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες. Αρνητική ITC
N0 (I+)	Κακοήθη κύτταρα στους επιχώριους λεμφαδένες όχι μεγαλύτερα από 0.2 mm
N0 (mol-)	Καμία ιστολογική μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες. Αρνητικά ευρήματα σε μοριακό επίπεδο (RT-PCR)
N0 (mol+)	Θετικά ευρήματα σε μοριακό επίπεδο (RT-PCR), αλλά καμία μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες δε διαγνώστηκε ιστολογικά ή μέσω IHC
N1	Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και/ή έσω μαστικοί λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο που ανευρίσκεται μετά από παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς να είναι κλινικά εμφανής
N1mi	Μικρομετάσταση > 0.2 mm και/ή περισσότερα από 200 κύτταρα, αλλά < 2 mm
N1a	Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες, τουλάχιστον μία μετάσταση > 2 mm
N1b	Μεταστάσεις στους έσω μαστικούς λεμφαδένες με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύονται με βιοψία του φρουρού λεμφαδένα, αλλά δεν είναι κλινικά εμφανείς
N1c	Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και στους έσω μαστικούς λεμφαδένες με μικρομεταστάσεις και μακρομεταστάσεις που ανιχνεύονται με βιοψία του φρουρού λεμφαδένα χωρίς να είναι κλινικά εμφανείς
N2	Μεταστάσεις σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε ανιχνευμένους κλινικά έσω μαστικούς λεμφαδένες εν τη απουσία των μεταστάσεων των μασχαλιαίων λεμφαδένων
N2a	Μεταστάσεις σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες
N2b	Μεταστάσεις σε έσω μαστικούς λεμφαδένες που ανιχνεύονται κλινικά. Απουσία μετάστασης μασχαλιαίων λεμφαδένων
N3	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε υποκλειδίους λεμφαδένες ή στους κλινικά εμφανείς σύστοιχους έσω μαστικούς λεμφαδένες με παρουσία 1 έως 4 θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή στους σύστοιχους υπερκλειδίους λεμφαδένες
N3a	Μεταστάσεις σε τουλάχιστον 10 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή στους υποκλειδίους λεμφαδένες
N3b	Μεταστάσεις στους κλινικά εμφανείς σύστοιχους έσω μαστικούς λεμφαδένες επί παρουσίας ενός ή περισσότερων θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και σε έσω μαστικούς λεμφαδένες με μικροσκοπική νόσο που ανευρίσκονται με την παρασκευή του φρουρού λεμφαδένα, χωρίς όμως να είναι κλινικά εμφανείς
N3c	Μεταστάσεις στους σύστοιχους υπερκλειδίους λεμφαδένες

Πίνακας 4. Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

Λήψη ιστορικού

Αρκετοί πρώιμοι καρκίνοι του μαστού είναι ασυμπτωματικοί, ειδικά όταν έχουν ανακαλυφθεί στα πλαίσια ενός προγράμματος προληπτικού ελέγχου του καρκίνου του μαστού. Οι μεγαλύτεροι όγκοι μπορεί να εκδηλωθούν ως μια ανώδυνη μάζα. Ο πόνος και ένα αίσθημα ενόχλησης συνήθως δεν αποτελούν συμπτώματα του καρκίνου του μαστού. Μόλις ένα ποσοστό της τάξης του 5% των ασθενών με κακοήγη μάζα εμφανίζονται με πόνο στο μαστό. Τις περισσότερες φορές, ο σκοπός της λήψης του ιστορικού δεν είναι η διάγνωση, αλλά η εκτίμηση του κινδύνου. Ένα οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού σε συγγενή πρώτου βαθμού είναι πιο ευρέως αναγνωρισμένος παράγοντας κινδύνου. Η Αμερικανική Ομάδα Δράσης για τις Υπηρεσίες Πρόληψης (US Preventive Services Task Force-USPSTF) ανανέωσε τις κατευθυντήριες οδηγίες της το 2005 πάνω στην εκτίμηση του κινδύνου, τη γενετική συμβουλευτική και τη γενετική δοκιμασία για τις γυναίκες τις σχετιζόμενες με BRCA-καρκίνο. Οι κατευθυντήριες αυτές οδηγίες προτείνουν τα ακόλουθα^{62,63}:

- Γυναίκες που έχουν μέλη στην οικογένειά τους με καρκίνο του μαστού, της ωοθήκης ή του περιτοναίου θα πρέπει να ελεγχθούν προκειμένου να εκτιμηθεί το οικογενειακό ιστορικό που μπορεί να συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για μεταλλάξεις στα γονίδια ευπάθειας για καρκίνο του μαστού BRCA1 και BRCA2
- Γυναίκες που έχουν θετικά αποτελέσματα ελέγχου θα πρέπει να λάβουν γενετική συμβουλευτική και κατόπιν να υποβληθούν σε δοκιμασία για BRCA
- Γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό που να σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού δεν πρέπει να λαμβάνουν γενετική συμβουλευτική ή δοκιμασία για BRCA ως πρακτική ρουτίνας

Φυσική εξέταση

Αν ο ασθενής δεν έχει διαπιστώσει ένα ογκίδιο στο μαστό, τότε τα σημεία και τα συμπτώματα που υποδεικνύουν την πιθανή παρουσία καρκίνου του μαστού μπορεί να περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Αλλαγή στο μέγεθος του μαστού ή το σχήμα του
- Πτύχωση δέρματος ή δερματικές αλλαγές (όπως πάχυνση, οίδημα ή ερυθρότητα)

- Πρόσφατη εισολκή θηλής ή δερματική αλλαγή ή άλλες ανωμαλίες της θηλής (όπως εξέλκωση ή ξαφνική εκροή αίματος)
- Μασχαλιαία μάζα

Προκειμένου να εντοπιστούν ακόμα και δυσδιάκριτες αλλαγές στη μορφή και το σχήμα του μαστού και πτυχώσεις του δέρματος, η εξέταση πρέπει να περιλαμβάνει εκτίμηση των μαστών με τον ασθενή όρθιο και τα χέρια σηκωμένα ψηλά. Τα ακόλουθα ευρήματα πρέπει να εγείρουν ανησυχία:

- Εξόγκωμα ή αλλαγή του σχήματος
- Πτύχωση δέρματος
- Εισολκή θηλής
- Διογκωμένες φλέβες
- Εξέλκωση
- Νόσος Paget του μαστού
- Οίδημα ή εικόνα φλοιού πορτοκαλιού (peau d' orange)

Η φύση των ψηλαφητών μαζών είναι συχνά δύσκολο να προσδιοριστεί κλινικά, αλλά τα ακόλουθα χαρακτηριστικά θα πρέπει να μας ανησυχίσουν:

- Σκληρία
- Ασυμμετρία
- Εστιακή οζώδης πυκνότητα
- Ασυμμετρία με τον άλλο μαστό
- Καθήλωση στο δέρμα ή στο μυ (εκτίμηση της καθήλωσης στο μυ με τη μετακίνηση του όγκου κατά μήκος των ινών του θωρακικού μυός με τον ασθενή να στηρίζει τα χέρια του στους γοφούς του)

Μια πλήρης εξέταση περιλαμβάνει εκτίμηση του μασχαλιαίου και του υπερκλείδιου βόθρου, εξέταση του θώρακα και εντόπιση σημείων σκελετικού πόνου και εξέταση κοιλίας και νευρικού συστήματος. Ο κλινικός γιατρός θα πρέπει να είναι σε εγρήγορση για να διακρίνει συμπτώματα μεταστατικής εξάπλωσης, όπως είναι τα παρακάτω:

- Δυσκολίες στην αναπνοή
- Οστικός πόνος

- Συμπτώματα υπερασβεστιαμίας
- Κοιλιακή διάταση
- Ίκτερος
- Τοπικά νευρολογικά σημεία
- Τροποποιημένη νοητική λειτουργία
- Κεφαλαλγία

Ένω η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού έχει υπερθεματιστεί ως πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην ανάπτυξη του απειλητικού για τη ζωή καρκίνου του μαστού, αρκετές ενστάσεις έχουν διατυπωθεί στο παρελθόν ως προς την ηλικία που πρέπει να ξεκινά ο προληπτικός έλεγχος, το πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου που πρέπει να ακολουθείται, το μεσοδιάστημα ανάμεσα στις εξετάσεις προληπτικού ελέγχου, το κατά πόσο είναι δόκιμο να ελέγχονται προληπτικά μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες, ακόμα και για το αν έχει κάποια επίδραση πάνω στους σχετιζόμενους με τον καρκίνο του μαστού θανάτους. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί πολλές φορές ότι υπάρχει ένα πλεονέκτημα στην επιβίωση, όταν η μαστογραφία χρησιμοποιείται ως μέσο προληπτικού ελέγχου^{64,65}.

Το Δεκέμβριο του 2013 η US Food and Drug Administration (FDA) έθεσε στο δημόσιο διάλογο μια προειδοποίηση σχετικά με τις δοκιμασίες αναρρόφησης δείγματος από τη θηλή και υποστήριξε ότι η χρησιμοποίησή τους δεν πρέπει να γίνεται στη θέση της μαστογραφίας, άλλων δοκιμασιών απεικόνισης ή της βιοψίας είτε πρόκειται για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού είτε για άλλα νοσήματα του μαστού. Η ένσταση που εγέρθηκε είχε να κάνει με το γεγονός ότι όταν η ανάλυση του υγρού χρησιμοποιείται μόνη της μπορεί να οδηγήσει σε πολλά ψευδώς θετικά ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα⁶⁶.

Μαστογραφία

Η μαστογραφία είναι μια μέθοδος με την οποία χρησιμοποιούμε ακτίνες-χ χαμηλής δόσης προκειμένου να απεικονίσουμε το μαστό. Προς το παρόν, πρόκειται για την καλύτερη διαθέσιμη μέθοδο για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο^{65,67,68}. Η μαστογραφία εφαρμόζεται τόσο για τον προληπτικό έλεγχο του καρκίνου του μαστού όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς. Μαστογραφία για προληπτικό έλεγχο διενεργείται σε ασυμπτωματικές γυναίκες, ενώ διαγνωστική μαστογραφία σε συμπτωματικές γυναίκες (όπως για παράδειγμα σε γυναίκες με ψηλαφητή μάζα του μαστού, με εκροή υγρού από τη θηλή ή όταν μια βλάβη ανευρίσκεται στη μαστογραφία προληπτικού ελέγχου).

Η μαστογραφία είναι ευαίσθητη σε μικροαποτιτανώσεις που αναπτύσσονται εντός των όγκων του μαστού με την ευαισθησία να κυμαίνεται σε ένα επίπεδο μικρότερο των 100 μm. Η μαστογραφία συχνά ανιχνεύει μια βλάβη πριν αυτή γίνει ψηλαφητή στην κλινική εξέταση και, κατά μέσο όρο, 1 έως 2 χρόνια πριν να γίνει αντιληπτή με την αυτο-εξέταση του μαστού. Πρόσφατες εξελίξεις στη

μαστογραφία περιλαμβάνουν την ανάπτυξη της ψηφιακής μαστογραφίας και την αυξημένη χρήση του υποβοηθούμενου από ηλεκτρονικό υπολογιστή διαγνωστικού συστήματος (computer-aided diagnosis-CAD) ⁶⁹. Τα συστήματα CAD αναπτύχθηκαν για να βοηθήσουν τους ακτινολόγους να αναγνωρίσουν τις μαστογραφικές ανωμαλίες.

Η ψηφιακή μαστογραφία μάς επιτρέπει να καταγράψουμε και να αποθηκεύσουμε την παραχθείσα εικόνα. Με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών, οι εικόνες από ψηφιακές μαστογραφίες μπορούν να μεγεθυνθούν και με την κατάλληλη προσαρμογή της εικόνας να βελτιώσουμε την εκτίμηση συγκεκριμένων περιοχών που φαίνονται ύποπτες. Οι ψηφιακές εικόνες μπορούν να μεταφερθούν ηλεκτρονικά, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο το χρόνο που απαιτείται για να λάβουμε μια δεύτερη γνώμη, χωρίς τον κίνδυνο απώλειας των φιλμ.

Σε μια προοπτική μελέτη γυναικών ηλικίας 50-74 ετών, που χρησιμοποίησε δεδομένα από το πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου του Οντάριο, φάνηκε ότι η ηλεκτρονική ακτινογραφία ήταν 21% λιγότερο αποδοτική σε σύγκριση με την άμεση ψηφιακή ακτινογραφία για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού. Παρά την παρατήρηση αυτή, φάνηκε ότι η ψηφιακή μαστογραφία ήταν παρόμοιας αξίας με την παραδοσιακή μαστογραφία με τη χρήση φιλμ ^{70,71}. Η USPSTF εκτιμά ότι το όφελος από τη μαστογραφία σε γυναίκες ηλικίας 50-74 ετών είναι μια μείωση του κινδύνου θανάτου από τον καρκίνο του μαστού της τάξης του 30%. Για γυναίκες ηλικίας 40-49 ετών, ο κίνδυνος θανάτου μειώνεται κατά 17% ⁷².

Μαστογραφία για προληπτικό έλεγχο

Παρά το γεγονός ότι οι κατευθυντήριες οδηγίες της μαστογραφίας υφίστανται πάνω από 30 χρόνια, 20-30% των γυναικών ακόμα δεν υποβάλλονται σε προληπτικό έλεγχο όπου αυτό ενδείκνυται. Μη λευκές γυναίκες και εκείνες από χαμηλότερη κοινωνικο-οικονομική τάξη παραμένουν λιγότερο πιθανό να υποβληθούν σε μαστογραφία και αντίστοιχα είναι πιο πιθανό να εμφανιστούν με προχωρημένη, απειλητική για τη ζωή νόσο ^{73,74}. Οι πιο ευρέως αποδεκτές συστάσεις είναι εκείνες που προτείνουν ετήσια μαστογραφία, εκκινώντας από την ηλικία των 40 ετών, κλινική εξέταση του μαστού κάθε 3 χρόνια για γυναίκες στη δεκαετία των 20 και των 30 και κάθε χρόνο για γυναίκες μεγαλύτερες των 40 ετών ⁷⁵.

Στον αντίποδα, η USPSTF συνιστά μαστογραφία προληπτικού ελέγχου σε γυναίκες ηλικίας 50-74 ετών 2 φορές το χρόνο και απορρίπτει τον ετήσιο μαστογραφικό έλεγχο για γυναίκες ηλικίας 40-49 ετών λόγω των υψηλών ποσοστών ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Αντί για αυτό, η USPSTF προτείνει οι κλινικοί γιατροί να επιλέγουν με βάση συγκεκριμένα κριτήρια ποιες γυναίκες 40-49 ετών θα υποβληθούν σε προληπτικό έλεγχο. Τέλος, η USPSTF είναι αντίθετη με την εκπαίδευση για αυτο-εξέταση του μαστού και καταλήγει ότι τα σύγχρονα δεδομένα δεν είναι επαρκή για να εκτιμηθούν τα οφέλη της κλινικής εξέτασης του μαστού σε γυναίκες ηλικίας 40 ετών, και της προληπτικής μαστογραφίας σε γυναίκες μεγαλύτερες των 75 ετών.

Διαγνωστική μαστογραφία

Η διαγνωστική μαστογραφία είναι πιο ακριβή από τη μαστογραφία για προληπτικό έλεγχο. Χρησιμοποιείται προκειμένου να καθοριστεί το ακριβές μέγεθος και η εντόπιση των ανωμαλιών του μαστού και να απεικονίσει τον περιβάλλοντα ιστό και τους λεμφαδένες. Γυναίκες με εμφυτεύματα στήθους ή ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού μπορεί να χρειάζονται τις επιπρόσθετες λήψεις της διαγνωστικής μαστογραφίας ακόμα και στον προληπτικό έλεγχο ρουτίνας.

Υπερηχογράφημα⁷⁶⁻⁸⁵

Το υπερηχογράφημα είναι πλέον ένα ευρέως διαθέσιμο και χρήσιμο συμπλήρωμα της μαστογραφίας. Γενικώς χρησιμοποιείται για να υποβοηθήσει την κλινική εξέταση μια ύποπτης βλάβης που ανιχνεύεται στη μαστογραφία ή στη φυσική εξέταση. Σαν εργαλείο προληπτικού ελέγχου, το υπερηχογράφημα περιορίζεται από μια σειρά παραγόντων και κυρίως από την αδυναμία του να ανιχνεύσει μικροαποτιτανώσεις σε συνδυασμό με τη χαμηλή ειδικότητά του (34%). Αρχικά, το υπερηχογράφημα, χρησιμοποιήθηκε σαν μια σχετικά φθηνή και αποτελεσματική μέθοδος διάκρισης των κυστικών μαζών του μαστού, που δεν χρειάζονταν λήψη δείγματος, από τις συμπαγείς μάζες, που συνήθως εξετάζονταν με βιοψία. Σε πολλές περιπτώσεις τα αποτελέσματα των βιοψιών αυτών ήταν καλοήγη. Όπως και νά 'χει, είναι σήμερα επαρκώς διαπιστωμένο το γεγονός ότι το υπερηχογράφημα προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για τη φύση και την έκταση των συμπαγών μαζών και των άλλων βλαβών του μαστού και συχνά μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες προς την κατεύθυνση της σταδιοποίησης της μασχάλης. Η συγκεκριμένη απεικονιστική τεχνική είναι επίσης επικουρική στην καθοδήγηση των βιοψιών και των θεραπευτικών διαδικασιών. Τέλος, είναι ακόμα υπό έρευνα η εκτίμηση του ρόλου της στον προληπτικό έλεγχο του καρκίνου.

Μαγνητική τομογραφία⁸⁶⁻⁹⁵

Σε μια απόπειρα υπερπήδησης των περιορισμών της μαστογραφία και του υπερηχογραφήματος, διερευνήθηκε η χρήση της MRI σαν μεθόδου ανίχνευσης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες υψηλού κινδύνου και σε νεαρότερες γυναίκες. Ένας συνδυασμός T1, T2 και 3-D τεχνικών MRI έχει βρεθεί ότι αποδίδει υψηλή ευαισθησία (περίπου 86-100% σε συνδυασμό με μαστογραφία και κλινική εξέταση του μαστού) για κακοήθεις εξαλλαγές του μαστού.

Το υψηλό κόστος και η περιορισμένη διαθεσιμότητα της MRI, καθώς επίσης και οι εγγενείς δυσκολίες εκτέλεσης και ερμηνείας των αποτελεσμάτων με υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, καθιστούν αναγκαία τη θέσπιση ενδείξεων και αντενδείξεων για τη χρησιμοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου. Στις ενδείξεις περιλαμβάνονται οι ακόλουθες:

- Απεικόνιση μιας μετρίου βαθμού βλάβης μετά από πλήρη εκτίμηση με φυσική εξέταση, μαστογραφία και υπερηχογράφημα
- Ανίχνευση σύστοιχου καρκινώματος του μαστού σε ασθενή με καρκίνωμα σε ένα μασχαλιαίο λεμφαδένα
- Εκτίμηση ενός ύποπτου πολυεστιακού ή αμφοτερόπλευρου όγκου
- Εκτίμηση διηθητικού λοβιακού καρκινώματος με υψηλή επίπτωση πολυεστιακής νόσου

- Εκτίμηση ύποπτου εκτεταμένου υψηλής διαφοροποίησης πορογενούς καρκινώματος
- Ανίχνευση σύστοιχου πρωτοπαθούς καρκινώματος του μαστού επί παρουσίας μεταστατικού αδενοκαρκινώματος άγνωστης προέλευσης
- Απεικόνιση της ανταπόκρισης στη νεοεπικουρική θεραπεία
- Ανίχνευση υποτροπιάζοντος καρκίνου του μαστού

Στις αντενδείξεις πειλαμβάνονται οι παρακάτω:

- Αλλεργία στο γαδολίνιο ή εγκυμοσύνη
- Αδυναμία του ασθενούς να ξαπλώσει σε πρηνή θέση
- Εκτεταμένη κύφωση ή κυφοσκολίωση
- Εκτεταμένη παχυσαρκία
- Υπερβολικά μεγάλο μέγεθος μαστών
- Σοβαρή κλειστοφοβία

Επίσης, υπάρχουν και σχετικές αντενδείξεις, οι οποίες εδράζονται στην υψηλή ευαισθησία αλλά περιορισμένη ειδικότητα της εν λόγω τεχνικής. Έτσι, η MRI μπορεί να μην είναι χρήσιμη στις εξής περιπτώσεις:

- Καρκινο-φοβικούς ασθενείς με μέτριο ή χαμηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, εξαιτίας του ψυχολογικού στρες που συσχετίζεται με τα ψευδώς θετικά ευρήματα
- Εκτίμηση των μαστογραφικά ανιχνευμένων μικροαποτιτανώσεων

Σπινθηρομαστογραφία

Η σπινθηρομαστογραφία δεν ενδείκνυται σαν διαδικασία προληπτικού ελέγχου για την ανίχνευση καρκίνου του μαστού. Παρόλα αυτά, μπορεί να παίζει ρόλο σε ποικίλες συγκεκριμένες κλινικές ενδείξεις, όπως στην περίπτωση μη διαγνωστικών ή δύσκολων μαστογραφιών και στην εκτίμηση των ασθενών υψηλού κινδύνου. Επίσης, στην εκτίμηση της ανταπόκρισης του όγκου στη χημειοθεραπεία και της μεταστατικής εμπλοκή των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Σε μερικές προοπτικές μελέτες, η συνολική ευαισθησία της σπινθηρομαστογραφίας με ^{99m}Tc-sestamibi ⁹⁶στην ανίχνευση καρκίνου του μαστού ήταν 85%, η ειδικότητα 89% και οι θετικοί και αρνητικοί προγνωστικοί δείκτες 89% και 84% αντίστοιχα. Παρόμοιες τιμές έχουν βρεθεί και για τη σπινθηρομαστογραφία με ^{99m}Tc-tetrofosmin και με ^{99m}Tc-MDP.

Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων

Χρησιμοποιώντας μια ευρεία γκάμα σημασμένων μεταβολιτών, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) μπορεί να ανιχνεύσει μεταβολές στη μεταβολική δραστηριότητα, την κατανάλωση οξυγόνου, την κατάσταση των υποδοχέων του όγκου και την αγγειακή κατάσταση. Όταν η PET συνδυάζεται με την αξονική τομογραφία προκειμένου να επικουρήσει την ανατομική εντόπιση, η εν λόγω εξέταση μπορεί να αναγνωρίσει μασχαλιαίες και μη μασχαλιαίες (όπως έσω μαστικές ή υπερκλείδιες) μεταστάσεις λεμφαδένων. Κάτι τέτοιο εξυπηρετεί τις ανάγκες της σταδιοποίησης του τοπικά επεκταμένου και φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού πριν την εισαγωγή νεοεπικουρικής

θεραπείας και της επανασταδιοποίησης ασθενών υψηλού κινδύνου για τοπική και απομακρυσμένη υποτροπή.

Τεχνική	Ευαισθησία	Ειδικότητα	Θετική προγνωστική αξία	Ενδείξεις
Μαστογραφία	63-95% (>95% σε ψηλαφητές, 50% σε μη ψηλαφητές, 83-92% σε γυναίκες μεγαλύτερες των 50 ετών; μειώνεται σε 35% σε πυκνούς μαστούς	14-90% (90% σε ψηλαφητές)	10-50% (94% σε ψηλαφητές)	Αρχική διερεύνηση για συμπτωματικούς μαστούς σε γυναίκες μεγαλύτερες των 35 ετών και για προληπτικό έλεγχο; εξέταση εκλογής για μικροαποτιτανώσεις
Υπερηχογράφημα	68-97% σε ψηλαφητές	74-94% σε ψηλαφητές	92% (σε ψηλαφητές)	Αρχική διερεύνηση για ψηλαφητές αλλοιώσεις σε γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 35 ετών
MRI	86-100%	21-97% (<40% σε πρωτοπαθή καρκίνο	52%	Ουλώδης μαστός, εμφυτεύματα, πολυεστιακές βλάβες, μεθοριακές βλάβες για διατήρηση του μαστού; μπορεί να είναι χρήσιμη στον προληπτικό έλεγχο γυναικών υψηλού κινδύνου
Σπινθηρομαστογραφία	76-95% σε ψηλαφητές, 52-91% σε μη ψηλαφητές	62-94% (94% σε μη ψηλαφητές)	70-83% (83% σε ψηλαφητές, 79% σε μη ψηλαφητές)	Βλάβες > 1 cm και εκτίμηση της μασχάλης; μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη της αντίστασης στη φαρμακευτική αγωγή
PET	96% (90% σε μασχάλιαιες μεταστάσεις)	100%		Εκτίμηση της μασχάλης, ουλώδης μαστός και πολυεστιακές βλάβες

Πίνακας 5. Αποτύπωση της ακρίβειας των τεχνικών απεικόνισης του μαστού

Βιοψία του μαστού⁹⁷⁻¹⁰³

Η συνιστώμενη διαγνωστική προσέγγιση για νεοδιαγνωσθέντες καρκίνους του μαστού είναι η διαδερμική βιοψία κενού με ευρύστομη βελόνα με την καθοδήγηση απεικόνισης (vacuum-assisted large-gauge core-needle biopsy/ VACNB). Οι βιοψίες μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την ανάγκη για χειρουργική παρέμβαση (και τη συνεπακόλουθη δημιουργία ουλών), ενώ παρέχουν επαρκή ιστολογική διάγνωση για την κατάλληλη αντιμετώπιση. Η βιοψία με εκτομή, ως αρχική χειρουργική προσέγγιση, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει το ποσοστό των θετικών ορίων. Η ανοικτή βιοψία εκτομής προορίζεται για βλάβες, όπου η διάγνωση παραμένει αμφίβολη -παρά την επαρκή απεικόνιση και την εκτίμηση της βιοψίας με βελόνα- ή για καλοήθεις βλάβες που ο ίδιος ο ασθενής επιλέγει να αφαιρέσει. Εξαιτίας του γεγονότος ότι ο ευρύς καθαρισμός της βλάβης δεν αποτελεί το ζητούμενο στις διαγνωστικές βιοψίες, άσκοπη αλλοίωση του μαστού με αυτόν τον τρόπο πρέπει να αποφεύγεται. Συνεχής προσπάθεια απαιτείται προς την κατεύθυνση της μείωσης της υπέρβασης του λόγου καλοήθους-προς κακοήθους βιοψία.

Επιπρόσθετες εξετάσεις

Οι κατευθυντήριες οδηγίες που εξέδωσε η NCCN το 2014 συνιστούν την πραγματοποίηση γενικής αίματος και ελέγχου της ηπατικής λειτουργίας σε συνδυασμό με προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης για όλες τις ασυμπτωματικές γυναίκες με Σταδίου I και II καρκίνο του μαστού. Επίσης, εξετάσεις απεικόνισης (όπως η ακτινογραφία θώρακα, η αξονική τομογραφία θώρακα ή αξονική τομογραφία κοιλίας και πύελου) μπορούν να τεθούν σαν σκέψη για γυναίκες σταδίου III ή συμπτωματική νόσο. Καρκινικοί δείκτες (καρκινοεμβρυικό αντιγόνο [CEA] και CA 15.3 ή CA 27.29) μπορούν επίσης να μετρηθούν σε τέτοιους ασθενείς^{104,105}.

Εξέταση HER2

Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι εξέτασης του HER2, περίπου το 20% των εξετάσεων αυτών μπορεί να είναι ανακριβείς. Τα δείγματα του καρκίνου του μαστού θα πρέπει αρχικά να υποβάλλονται σε εξέταση του HER2 μέσω μιας έκθεσης ανοσοϊστοχημείας για την πρωτεϊνική έκφραση του HER2¹⁰⁶. Η μέθοδος βαθμολόγησης για την έκφραση του HER2 βασίζεται στη χρώση της κυτταρικής μεμβράνης και είναι η ακόλουθη:

- 3+ - Θετική για έκφραση του HER2; Ομοιόμορφη χρώση της μεμβράνης σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% των διηθητικών κυττάρων του όγκου
- 2+ - Ασαφής για έκφραση του HER2; Πλήρης χρώση της μεμβράνης που είναι είτε ανομοιόμορφη ή ασθενής αλλά έχει περιμετρική κατανομή σε τουλάχιστον 10% των κυττάρων είτε ομοιόμορφη χρώση σε ποσοστό μικρότερο του 30% των κυττάρων του όγκου
- 1+ - Ασθενής ή μερική χρώση της μεμβράνης σε οποιοδήποτε κύτταρο του όγκου
- 0 – Αρνητική για πρωτεϊνική έκφραση του HER2; Καθόλου χρώση

Δείγματα καρκίνου του μαστού με ασαφή αποτελέσματα IHC θα πρέπει να υποβάλλονται σε επιβεβαίωση με μια μέθοδο ενίσχυσης του γονιδίου του HER2, όπως είναι η φθορίζουσα παραλλαγή του in situ υβριδισμού (FISH). Περισσότερα κέντρα στηρίζονται στην εξέταση FISH αποκλειστικά για

τον προσδιορισμό της κατάστασης του HER2. Γενικά, η δοκιμασία FISH θεωρείται πιο αξιόπιστη σε σύγκριση με την IHC, αλλά συνάμα είναι και πιο ακριβή. Ασαφή αποτελέσματα IHC ανευρίσκονται σε ποσοστό 15% των διηθητικών καρκίνων του μαστού, ενώ ασαφή αποτελέσματα HER2 FISH ανευρίσκονται σε ποσοστό μικρότερο του 3% των δειγμάτων του καρκίνου του μαστού και σε εκείνα που προηγούμενα είχαν θεωρηθεί θετικά για τον HER2. Αναντιστοιχία στα αποτελέσματα (IHC 3+/αρνητική FISH ή IHC< 3+/θετική FISH) έχει παρατηρηθεί σε περίπου 4% των παρασκευασμάτων. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν τον αποκλεισμό της ομάδας αυτής από τη θεραπεία με τραστοζουμάμπη. Έχουν αναπτυχθεί και νεότερες μεθοδολογίες για τον προσδιορισμό της κατάστασης HER2, συμπεριλαμβανομένων της ανάστροφης τρανσκριπτάσης- αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) και του χρωμογόνου in situ υβριδισμού. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας HER2 FISH (αναλογία του HER2 στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 17 [HER2/CEP17] και αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου) είναι η ακόλουθη:

- Θετική ενίσχυση του HER2- Αναλογία HER2:CEP17> 2.2 ή αντίγραφα του γονιδίου HER2 είναι περισσότερα από 6.0
- Ασαφής ενίσχυση του HER2- Αναλογία HER2:CEP17 μεταξύ του 1.8 και του 2.2 ή αντίγραφα του γονιδίου HER2 μεταξύ 4.0 και 6.0
- Αρνητική ενίσχυση του HER2- Αναλογία HER2:CEP17 μικρότερη από 1.8 ή αντίγραφα του γονιδίου HER2 λιγότερα από 4.0

Αντιμετώπιση καρκίνου του μαστού

Η κύρια μορφή θεραπείας στον καρκίνο του μαστού παραμένει η χειρουργική θεραπεία όταν ο όγκος είναι εντοπισμένος και ακολουθείται από τη χημειοθεραπεία (όπου υπάρχει ένδειξη), την ακτινοθεραπεία και για όγκους θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων από επικουρική ορμονοθεραπεία (με ταμοξιφαίνη ή έναν αναστολέα αρωματάσης).

Χειρουργική θεραπεία

Ανάλογα με τη σταδιοποίηση και τον τύπο του καρκίνου του μαστού, η ογκεκτομή από μόνη μπορεί να είναι αρκετή ή μπορεί να απαιτείται εκτόμη μεγαλύτερου τμήματος μαζικού ιστού. Η χειρουργική εκτομή ολόκληρου του μαστού καλείται μαστεκτομή. Οι τεχνικές ογκεκτομής χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην εγχειρητική του καρκίνου που σαν στόχο της έχει τη διατήρηση του μαστού. Οι έρευνες υποδεικνύουν ότι για ασθενείς με μέγεθος όγκου μικρότερο από 4 cm, η ογκεκτομή μπορεί να είναι το ίδιο αποτελεσματική με τη μαστεκτομή¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Πριν από τη διενέργεια της ογκεκτομής απαιτείται εντοπισμός της θέσης του όγκου με την τοποθέτηση ενός σύρματος οδηγού. Η τοποθέτηση του οδηγού πραγματοποιείται είτε από ακτινολόγο όταν η ανίχνευση της περιοχής που πρόκειται να εξαιρεθεί γίνεται με μαστογραφία ή υπερηχογράφημα και μερικές φορές από χειρουργό όταν η βλάβη μπορεί να ψηλαφηθεί. Μερικές από τις ενδείξεις της μαστεκτομής είναι

- ο πολυεστιακός καρκίνος
- η προηγούμενη εφαρμογή ακτινοθεραπείας στο μαστό

- μέγεθος όγκου αρκετά μεγάλο σε σύγκριση με το συνολικό μέγεθος του μαστού
- ο ασθενής έχει σκληρόδερμα ή άλλη νόσο του συνδετικού ιστού, που μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές στην ακτινοθεραπεία
- ο ασθενής κατοικεί σε περιοχή που δεν είναι διαθέσιμη η ακτινοθεραπεία
- ο ασθενής είναι ιδιαίτερα ανήσυχος σε σχέση με τον κίνδυνο τοπικής υποτροπής μετά από ογκεκτομή.

Η συνήθης πρακτική επιβάλλει ο χειρουργός να εξασφαλίσει το γεγονός ότι ο ιστός που αφαιρείται έχει καθαρά όρια εκτομής. Στην περίπτωση που τα χειρουργικά όρια δεν είναι ελεύθερα νόσου μπορεί να χρειαστεί συμπληρωματική αφαίρεση τμήματος του μείζονος θωρακικού, ο οποίος είναι ο κύριος μυς του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος.

Κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, μια άλλη παράμετρος που εξετάζεται είναι η χειρουργική αφαίρεση των λεμφαδένων της μασχάλης ^{110,111}. Στο παρελθόν, οι χειρουργικές επεμβάσεις περιελάμβαναν την αφαίρεση 10 ως 40 λεμφαδένων για να διερευνήσουν την επέκταση ή μη του καρκίνου. Αυτό είχε συχνά σαν αποτέλεσμα την πρόκληση λεμφοιδήματος στο σύστοιχο χέρι, καθώς η αφαίρεση της μεγάλης αυτής ποσότητας λεμφαδένων επηρέαζε τη λεμφική παροχέτευση. Πρόσφατα, η τεχνική της αφαίρεσης του φρουρού λεμφαδένα έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής, καθώς απαιτεί την αφαίρεση πολύ λιγότερων λεμφαδένων, προκαλώντας λιγότερες παρενέργειες ¹¹²⁻¹²¹. Ο φρουρός λεμφαδένας είναι ο πρώτος λεμφαδένας που παροχετεύει τον όγκο και η εφαρμογή της τεχνικής του φρουρού λεμφαδένα μπορεί να αποτρέψει την ολική αφαίρεση των μασχαλιαίων λεμφαδένων σε ποσοστό 65-70% των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Τα τελευταία 10 χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική εξέλιξη στην ανίχνευση του φρουρού λεμφαδένα, επιτρέποντας την αύξηση του ποσοστού επιτυχίας από το 80% στο 92-98%. Η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα ενδείκνυται σε ασθενείς με βλάβες T1 και T2 (<5 cm).

Ακτινοθεραπεία ¹²²⁻¹³¹

Η ακτινοθεραπεία είναι επικουρική θεραπεία για τις περισσότερες γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε ογκεκτομή και για μερικές γυναίκες μετά μαστεκτομή. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ακτινοθεραπεία έχει σαν σκοπό της τη μείωση της πιθανότητας υποτροπής του καρκίνου. Η ακτινοθεραπεία περιλαμβάνει τη χρησιμοποίηση ακτίνων χ υψηλής ενέργειας ή ακτίνων γάμα που στοχεύουν τον όγκο ή το πεδίο μετά χειρουργική επέμβαση για τον όγκο. Αυτή η ακτινοβολία μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματική για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων που έχουν παραμείνει μετά τη χειρουργική επέμβαση ή για την αντιμετώπιση των υποτροπών. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί είτε εξωτερικά είτε με τη χρήση της βραχυθεραπείας εσωτερικά. Η ακτινοθεραπεία είναι ένας πολύτιμος αρωγός των επεμβάσεων που στόχο έχουν τη διατήρηση του μαστού.

Η ακτινοβολία επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο τα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας διαταραχές και στο φυσιολογικό ιστό που περιέβαλε τον όγκο. Ο φυσιολογικός ιστός έχει την ικανότητα να αποκαθιστά της βλάβες μόνος του, μια ικανότητα που λείπει από τα καρκινικά κύτταρα. Αυτός είναι και ο λόγος που η ακτινοβολία εφαρμόζεται σε μια εκτεταμένη χρονική περίοδο δίνοντας τη δυνατότητα στο φυσιολογικό ιστό να επανορθώσει τις βλάβες του. Η εξωτερική

ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται τυπικά για πέντε έως επτά εβδομάδες, πέντε ημέρες κάθε εβδομάδα. Πρόσφατες μεγάλες μελέτες επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι μικρότερες χρονικές περιόδους ακτινοθεραπείας, τυπικά τριών έως τεσσάρων εβδομάδων, έχουν σαν αποτέλεσμα ισοδύναμο καρκινικό έλεγχο και αντίστοιχες παρενέργειες. Κάθε θεραπεία διαρκεί περίπου 15 λεπτά. Μια νεότερη προσέγγιση, η επονομαζόμενη επιταχυνόμενη μερική ακτινοβολία του μαστού (APBI), χρησιμοποιεί τη βραχυθεραπεία για να μεταφέρει την ακτινοβολία σε πολύ συντομότερο χρονικό διάστημα. Η APBI μεταφέρει την ακτινοβολία μόνο στην άμεση περιοχή που περιβάλλει τον όγκο και μπορεί τυπικά να ολοκληρωθεί σε χρονικό διάστημα μιας εβδομάδας.

Η ακτινοθεραπεία είναι κυρίως αποτελεσματική στη μείωση του κινδύνου τοπικής υποτροπής. Κατά συνέπεια, συστήνεται στις περισσότερες περιπτώσεις επεμβάσεων για διατήρηση του μαστού και λιγότερο συχνά μετά μαστεκτομή. Οι ασθενείς στην Ευρώπη στο παρελθόν ήταν πιο πιθανό να υποβληθούν σε επικουρική ακτινοθεραπεία μετά χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τους ασθενείς στη Βόρειο Αμερική. Η ακτινοθεραπεία συνήθως συστήνεται σε όλους τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ογκεκτομή ή τεταρτεκτομή. Η ακτινοθεραπεία συνήθως δε συστήνεται σε ασθενείς με προχωρημένου σταδίου (στάδιο IV) νόσο, με εξαίρεση την παρηγορητική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων όπως είναι ο οστικός πόνος. Γενικά οι ενδείξεις της ακτινοθεραπείας συνοψίζονται στις παρακάτω:

- Ως μέρος της θεραπείας με σκοπό τη διατήρηση του μαστού
- Μετά μαστεκτομή σε ασθενείς υψηλού κινδύνου για υποτροπή
- Όγκος πολύ κοντά ή πάνω στα όρια του χειρουργικού παρασκευάσματος
- Πολλαπλές εστίες της νόσου
- Μικροσκοπική διήθηση λεμφικών και αγγειακών ιστών
- Μικροσκοπική διήθηση του δέρματος, της θηλής/θηλαίας άλω ή του υποκείμενου μείζονος θωρακικού μυός
- Ανεπαρκής αριθμός εξαιρεθέντων μασχαλιαίων λεμφαδένων

*Χημειοθεραπεία*¹³²⁻¹⁴⁴

Υπάρχουν τρεις τύποι χημειοθεραπείας:

- Νεοεπικουρική χημειοθεραπεία: Πριν από το χειρουργείο για να μειωθεί το μέγεθος του όγκου
- Επικουρική χημειοθεραπεία: Μετά το χειρουργείο για να μειωθεί ο κίνδυνος υποτροπής
- Παρηγορητική χημειοθεραπεία: Εφαρμόζεται για να ελέγξει (όχι να θεραπεύσει) τον καρκίνο που έχει επεκταθεί σε θέσεις εκτός του μαστού και των επιχώριων λεμφαδένων.

Για την επικουρική χημειοθεραπεία χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα σχήματα:

- CMF: κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη και 5-φλουουρακίλη κάθε 4 εβδομάδες σε 6 κύκλους
- FAC (ή CAF): 5-φλουουρακίλη, δοξορουμπικίνη και κυκλοφωσφαμίδη κάθε 3 εβδομάδες σε 6 κύκλους

- AC (ή CA): αδριαμυκίνη (δοξορουμπικίνη) και κυκλοφωσφαμίδη κάθε 3 εβδομάδες σε 4 κύκλους
- AC- Taxol: AC κάθε 3 εβδομάδες σε 4 κύκλους ακολουθούμενο από πακλιταξέλη κάθε 3 εβδομάδες για 4 κύκλους ή εβδομαδιαία (σε μικρότερη δόση) για 12 εβδομάδες
- TAC: Taxotere (δοσεταξέλη), αδριαμυκίνη (δοξορουμπικίνη) και κυκλοφωσφαμίδη κάθε 3 εβδομάδες για 6 κύκλους
- FEC: 5-φλουουρακίλη, επιρουμπικίνη και κυκλοφωσφαμίδη κάθε 3 εβδομάδες για 6 κύκλους
- FECD: FEC κάθε 3 εβδομάδες για 3 κύκλους ακολουθούμενο από δοσεταξέλη κάθε 3 εβδομάδες για 3 κύκλους
- TC: Taxotere (δοσεταξέλη) και κυκλοφωσφαμίδη κάθε 3 εβδομάδες για 4 έως κύκλους
- Κάποια από τα παραπάνω σχήματα μπορούν να δοθούν σε συντομότερο χρονικό διάστημα (για παράδειγμα κάθε 2 αντί για κάθε 3 εβδομάδες)
- Σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία, η τραστοζουμάμη μπορεί να προστεθεί σε κάποιο σχήμα ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του όγκου (όπως η κατάσταση του HER2/neu) και τον κίνδυνο υποτροπής. Συνήθως χορηγείται είτε κάθε 3 εβδομάδες ή εβδομαδιαία για συνολική διάρκεια 1 έτους.

Αφού η χημειοθεραπεία επηρεάζει την παραγωγή λευκοκυττάρων, ο παράγοντας διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων χορηγείται μαζί με τη χημειοθεραπεία. Το γεγονός αυτό έχει φανεί ότι μειώνει, αν και δεν αποτρέπει τελείως, το δείκτη της φλεγμονής. Τα περισσότερα επικουρικά χημειοθεραπευτικά σχήματα για τον καρκίνο του μαστού συνήθως δεν απαιτούν την υποστήριξη του αυξητικού παράγοντα εκτός από εκείνα που συσχετίζονται με υψηλή επίπτωση καταστολής του μυελού των οστών και φλεγμονής. Αυτά μπορούν να περιλαμβάνουν χημειοθεραπεία που χορηγείται σε σύντομο χρονικό διάστημα (κάθε 2 εβδομάδες αντί για κάθε 3 εβδομάδες).

Σε μια μετα-ανάλυση που περιελάμβανε τέσσερις μεγάλες δοκιμές για τον καρκίνο του μαστού και η οποία αφορούσε 3000 ασθενείς, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι μια ανωμαλία στο χρωμόσωμα 17, το οποίο ονομάζεται CEP17, συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς, αλλά και ότι η ύπαρξή της συσχετίζεται με την ύπαρξη όγκου που ανταποκρίνεται καλύτερα στις ανθρακυκλίνες.

Ορμονοθεραπεία¹⁴⁵⁻¹⁵⁴

Ασθενείς με όγκους θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνου τυπικά θα λάβουν ορμονοθεραπεία μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. Οι συνήθειες ορμονοθεραπείες περιλαμβάνουν τα εξής:

- Ταμοξιφαίνη για προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προς αναστολή των υποδοχέων οιστρογόνου
- Αναστολείς αρωματάσης για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προς μείωση του ποσού των οιστρογόνων στον οργανισμό τους
- Ανάλογα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) για προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προς καταστολή των ωοθηκών

Στοχευμένη θεραπεία

Σε ασθενείς των οποίων ο καρκίνος εκφράζει μια υπεραφθονία της πρωτεΐνης HER2, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα γνωστό ως τραστουζουμάμπη (Herceptin) χρησιμοποιείται προκειμένου να αποκλείσει τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης HER2 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, καθυστερώντας με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξή τους. Σε προχωρημένου σταδίου καρκίνο, η τραστουζουμάμπη σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη του καρκίνου αλλά και να βελτιώσει την επιβίωση των ασθενών. Πρόσφατα, αρκετές κλινικές μελέτες επιβεβαίωσαν το γεγονός ότι στα πλαίσια της επικουρικής θεραπείας, όπως μετά από χειρουργείο για καρκίνο του μαστού, η χρήση της τραστουζουμάμπης για μέχρι ένα έτος καθυστερεί την υποτροπή του καρκίνου του μαστού και βελτιώνει την επιβίωση.

Άλλοι τύποι στοχευμένης θεραπείας είναι:

- Αναστολείς της αγγειογένεσης. Αντισώματα που αποτρέπουν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων, αποκόπτοντας την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στα καρκινικά κύτταρα
- Αναστολείς μετάδοσης σημάτων. Τα αντισώματα αυτά αποκλείουν σήματα μέσα στα καρκινικά κύτταρα που προάγουν την κυτταρική διαίρεση, αποκόπτοντας την ανάπτυξη του καρκίνου
- Αντισώματα/ ανταγωνιστές για άλλες ορμόνες/ υποδοχείς όπως είναι οι υποδοχείς ανδρογόνων και οι υποδοχείς προλακτίνης, που είναι παρόντες σε μεγάλη αναλογία στον καρκίνο του μαστού
- Άλλος πιθανός στόχος είναι η κυκλίνη D1. Άλλα πιθανά φάρμακα το PV-10, η ορμόνη προγεστίνη και το p53.

Πολυμορφισμοί ενός μόνο νουκλεοτιδίου

Πολυμορφισμός ενός μόνο νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) είναι θέσεις ενός μόνο ζεύγους βάσεων στο γονιδιωματικό DNA, στις οποίες υπάρχουν διαφορετικές παραλλαγές της αλληλουχίας (αλληλόμορφα) στα φυσιολογικά άτομα ενός πληθυσμού και όπου το λιγότερο συχνό αλληλόμορφο εκπροσωπείται στον πληθυσμό αυτό με ένα ποσοστό της τάξης τουλάχιστον του 1%. Από τον παραπάνω ορισμό προκύπτει ότι οι παραλλαγές παρουσίας/απουσίας μιας μόνο βάσης (indels) δεν μπορούν να θεωρηθούν πως είναι SNP¹⁵⁵. Παρόλα αυτά, μια σειρά ιδιοτήτων που αποδίδονται στους SNP, ανταποκρίνονται στις παραλλαγές παρουσίας ή απουσίας (insertion or deletion). Ο ορισμός, επίσης, αυτός περιορίζεται από τις πρακτικές προκλήσεις της προσέγγισης και της έρευνας αντιπροσωπευτικών δειγμάτων του παγκόσμιου πληθυσμού. Με απλά λόγια, SNP είναι ένας πολυμορφισμός που συμβαίνει μεταξύ δειγμάτων του DNA σε σχέση με μία βάση. Οι SNP συνιστούν τους μοριακούς δείκτες του γονιδιώματος με τη μεγαλύτερη αφθονία. Η διεθνής ομάδα εργασίας για την κατάρτιση του χάρτη SNP έχει προετοιμάσει το χάρτη των παραλλαγών της

ακολουθίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, ο οποίος περιλαμβάνει 1.42 εκατομμύρια SNP, δηλαδή έναν SNP για κάθε 1.9 χιλιάδες βάσης¹⁵⁶. Στα φυτά επίσης έχουν βρεθεί ότι είναι παρόντες σε υψηλή πυκνότητα κατά μήκος του γονιδιώματος. Στο γονιδίωμα του καλαμποκιού έχει ανιχνευτεί ένας SNP ανά 70 ζευγάρια βάσης και στο σιτάρι σε κάποιες περιοχές έχει βρεθεί ένας SNP ανά 20 ζευγάρια βάσης¹⁵⁷.

Οι SNP έχουν εξελιχθεί σε δείκτες εκλογής. Εξαιτίας της αφθονίας τους στο γονιδίωμα, είναι εξαιρετικά χρήσιμοι στη δημιουργία γενετικού χάρτη υψηλής πυκνότητας. Η υψηλή αυτή πυκνότητα δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί με άλλες τάξεις γενετικών δεικτών. Εξαιτίας της αφθονίας αυτής, οι SNP έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν τη βάση μιας ανώτερης και υψηλά πληροφοριακής γονοτυπικής ανάλυσης. Οι SNP στις περιοχές κωδικοποίησης (cSNP) μπορεί να έχουν λειτουργική σημασία στην περίπτωση που οι επακόλουθες αλλαγές στα αμινοξέα προκαλούν αλλαγές και στο φαινότυπο. Οι δείκτες SNP που συσχετίζονται με φαινοτυπικές μεταβολές υποδεικνύουν ένα λειτουργικό πολυμορφισμό. Φαίνεται ότι συνιστούν τη μεγαλύτερη τάξη των λειτουργικών πολυμορφισμών.

Σε μια συγκεκριμένη περιοχή του μορίου του DNA θεωρητικά εμπλέκονται τέσσερα πιθανά νουκλεοτίδια αλλά στην πραγματικότητα μόνο δύο από τις τέσσερις αυτές πιθανότητες έχουν παρατηρηθεί στις συγκεκριμένες περιοχές σε έναν πληθυσμό. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι SNP είναι σε μεγάλο ποσοστό διαλληλικοί στη φύση. Αν και η διαλληλική φύση των SNP τα καθιστά λιγότερο πληροφοριακά ανά εξεταζόμενη περιοχή σε σύγκριση με πολυαλληλικούς δείκτες, η δυσκολία αυτή μπορεί να υπερκεραστεί από την αφθονία τους, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση περισσότερων περιοχών¹⁵⁸. Ο Kruglyak υποστήριξε την άποψη ότι ένας χάρτης 4 cM από 750 δείκτες βασισμένους σε SNP ήταν ισότιμος στο πληροφοριακό περιεχόμενό του με ένα χάρτη 10 cM από 300 δείκτες μικροδορυφόρων¹⁵⁹.

Οι SNP είναι λιγότερο μεταλλάξιμοι σε σύγκριση με άλλους δείκτες, ειδικά σε σύγκριση με τους μικροδορυφόρους. Τα χαμηλά ποσοστά των υποτροπιαζουσών μεταλλάξεων τους καθιστά εξελικτικά σταθερούς. Είναι εξαιρετικοί μοριακοί δείκτες για τη μελέτη πολύπλοκων γενετικών χαρακτηριστικών και για την κατανόηση της γονιδιωματικής εξέλιξης. Το γεγονός αυτό τους καθιστά επίσης κατάλληλους και ευκολότερους να ακολουθηθούν σε πληθυσμιακές μελέτες.

Οι SNP που δεν βρίσκονται σε περιοχές κωδικοποίησης πρωτεϊνών μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη γονιδιακή σύζευξη, τη σύνδεση των μεταγραφικών παραγόντων, την αποδόμηση του αγγελιαφόρου RNA ή την ακολουθία του μη-κωδικοποιούντος RNA. Η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται από αυτόν τον τύπο SNP και μπορεί να είναι προς την κατεύθυνση της φυσιολογικής λειτουργίας του γονιδίου ή προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Οι παραλλαγές στις ακολουθίες του DNA του ανθρώπου μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων νόσων και τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός αποκρίνεται σε παθογόνα, χημικά, φάρμακα, εμβόλια και άλλους παράγοντες. Όπως και νά 'χει η μεγαλύτερη σπουδαιότητά τους στη βιοϊατρική έρευνα έγκειται στη σύγκριση περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος ανάμεσα σε ομάδες (όπως στην περίπτωση των ομάδων με ή χωρίς μία νόσο) σε μελέτες συσχέτισης του

γονιδιώματος. Για πολύπλοκες νόσους, οι SNP συνήθως δε λειτουργούν εξατομικευμένα, αλλά σε συνεργασία με άλλους SNP για να εκδηλώσουν τη συγκεκριμένη νόσο, όπως έχει για παράδειγμα παρατηρηθεί στην περίπτωση της οστεοπόρωσης.

Η γνώση των πολυμορφισμών μας βοηθά στην κατανόηση της φαρμακοκινητικής ή φαρμακοδυναμικής, δηλαδή στην κατανόηση της δράσης των φαρμάκων σε άτομα με διαφορετικές γενετικές παραλλαγές. Μια ευρεία γκάμα ανθρώπινων νοσημάτων, όπως η β-θαλασσαιμία και η κυστική ίνωση προκαλούνται από SNP. Νοσήματα με διαφορετικούς SNP μπορούν να γίνουν σχετική φαρμακογενομικοί στόχοι για φαρμακευτική θεραπεία. Κάποιοι SNP συσχετίζονται με το μεταβολισμό διαφορετικών φαρμάκων. SNP χωρίς κάποια αξιοσημείωτη επίδραση επάνω στο φαινότυπο, μπορούν να είναι χρήσιμοι σαν γενετικοί δείκτες σε μελέτες γονιδιώματος, εξαιτίας της ποσότητας και της σταθερής κληρονομικότητάς τους από γενιά σε γενιά.

Μέθοδοι για την ανακάλυψη νέων SNP και ανίχνευση γνωστών SNP είναι οι ακόλουθοι:

- Αλληλούχιση DNA
- Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
- Φασματομετρία μαζών
- Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας
- Ηλεκτροχημική ανάλυση
- Ανάλυση υβριδισμού
- Πολυμορφισμός του μήκους θραυσμάτων από περιορισμό (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))

Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) ¹⁶⁰

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR, amplification) είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε το 1985 από τους Mullis και Silverstein και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως το 1987 με τη χρήση θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών. Με τη μέθοδο αυτή συντίθεται μεγάλος αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μια ενζυματική αντίδραση *in vitro*. Η ευαισθησία και ταχύτητα της μεθόδου αυτής έχει επιφέρει επανάσταση στη Μοριακή Γενετική δίνοντας καινούργιες προοπτικές για τη μελέτη και ανάλυση γονιδίων.

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές -ολιγονουκλεοτίδια (primers). Η αλληλουχία του κάθε εκκινητού είναι συμπληρωματική προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA-εκμαγείου.

Η αντίδραση περιλαμβάνει 25-35 επαναλαμβανόμενους κύκλους. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του μητρικού DNA (denaturation of DNA template). Συνήθεις συνθήκες: 94°C- 96°C, 20"-60"
2. Πρόσδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές προς αυτούς ακολουθίες (primer annealing). Συνήθεις συνθήκες: 37°C-65°C, 20"-60".
3. Επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3' (elongation). Συνήθεις συνθήκες: 72°C, 0.5 - 2 min.

Το προϊόν επιμήκυνσης του κάθε εκκινητού από τον πρώτο κύκλο της αντίδρασης αποτελεί εκμαγείο για τον άλλο εκκινητή στον επόμενο κύκλο. Μετά από n κύκλους το προϊόν PCR περιέχει 2n δίκλινα μόρια DNA που είναι αντίγραφα της αλληλουχίας που ορίζεται από τους εκκινητές. Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται συνήθως σε όγκους 25 -100 μl σε ένα σωληνάριο eppendorf και περιλαμβάνει :

- εκμαγείο DNA (0.1-1 μg ανθρώπινου γονιδιώματος)
- 1x ρυθμιστικό διάλυμα (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 0.01% ζελατίνη)
- 1.5 mM - 2.5mM MgCl₂
- 10 -100 pmol από κάθε εκκινητή
- ίση ποσότητα (200μM) από κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) (συνήθως 2.5 μονάδες)

Ανάλογα με τον θερμικό κυκλοποιητή, το μίγμα καλύπτεται από 2-3 σταγόνες παραφινέλαιο για να εμποδίζεται η εξάτμιση των αντιδραστηρίων κατά το στάδιο της αποδιάταξης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές (thermal cycler) που εναλλάσσουν τη θερμοκρασία βάσει προγραμματισμού. Η επιτυχία της αντίδρασης πιστοποιείται μετά από ηλεκτροφόρηση ενός μικρού κλάσματος προϊόντος της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Στη συνέχεια τις περισσότερες φορές ακολουθεί είτε μεταφορά του DNA σε μεμβράνη και υβριδισμός με σημασμένα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (ανιχνευτές) είτε ανάλυση της αλληλουχίας του προϊόντος PCR με ανάλυση αλληλουχίας βάσεων (sequencing) είτε ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλουχιών με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Οι παράμετροι που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (PCR) είναι:

- Η συγκέντρωση των εκκινητών πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε η σύνδεσή τους με την αντίστοιχη μονόκλινη αλυσίδα να γίνεται γρήγορα και κατά την εξέλιξη της αντίδρασης η σύνδεση αυτή να είναι γρηγορότερη από την επανασύνδεση εκμαγείου- εκμαγείου.

- Η εκλογή κατάλληλης θερμοκρασίας και χρόνου σε κάθε στάδιο της αντίδρασης βοηθά την ειδικότητα της αντίδρασης.

- Η ειδικότητα και απόδοση της μεθόδου αυξήθηκε με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, αφού χρησιμοποιούνται υψηλότερες θερμοκρασίες στα στάδια σύνδεσης και επιμήκυνσης.

Στην αρχή, ως ένζυμο της PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τμήμα του μορίου της DNA πολυμεράσης της *E. coli*, το "τμήμα Klenow" (Klenow fragment). Η αδρανοποίηση του ενζύμου αυτού σε υψηλές θερμοκρασίες απαιτούσε την προσθήκη ενζύμου μετά το στάδιο αποδιάταξης σε κάθε κύκλο. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την ανακάλυψη και χρήση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, Taq πολυμεράσης, που απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση έχει μοριακό βάρος 94 kDa και ειδική ενεργότητα 200.000 μονάδες/mg ενζύμου. Το ένζυμο αυτό διαθέτει μόνο 5'→3' και όχι 3'→5' εξωνουκλεοτιδική δράση. Η καλύτερη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου (temperature optimum) είναι 75-80°C και ο ρυθμός επιμήκυνσης είναι >60 νουκλεοτίδια /sec στους 70°C χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το DNA του M13 φάγου. Η πιστότητα (fidelity) του ενζύμου, δηλαδή η σύνθεση DNA απόλυτα συμπληρωματικού προς το εκμαγείο, εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων στην αντίδραση, από τη συγκέντρωση Mg²⁺, το μήκος του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, τον αριθμό των κύκλων της PCR και τη θερμοκρασία σύνδεσης εκκινητή-μήτρας. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι: (α) παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα, (β) η αντίδραση μπορεί να γίνει με τη χρήση ελάχιστης ποσότητας γενωμικού DNA καθώς και DNA πολύ κακής ποιότητας (σπασμένου ή ακάθαρτου). Παράδειγμα αποτελεί η χρησιμοποίηση υλικού για PCR του DNA κυττάρων που προέρχονται από τη στοματική κοιλότητα, από μια τρίχα ή ακόμα και από ένα μόνο σπερματοζώαριο ή λεμφοκύτταρο (single-cell PCR).

Ανάλυση πολυμορφισμού του μήκους θραυσμάτων από περιορισμό (RFLP)

Στη μοριακή βιολογία, ο όρος RFLP είναι μια τεχνική που ανακαλύπτει παραλλαγές σε ομόλογες ακολουθίες του DNA. Αναφέρεται σε διαφορές ανάμεσα σε δείγματα ομόλογων μορίων του DNA που προέρχονται από διαφοροποιημένες θέσεις των περιοχών των περιοριστικών ενζύμων και σε μια σχετική εργαστηριακή τεχνική μέσω της οποίας αυτές οι παραλλάγες μπορούν να απεικονιστούν. Στην ανάλυση RFLP το δείγμα του DNA διασπάται σε κομμάτια (πέπτεται) από τη δράση των περιοριστικών ενζύμων και τα παραγόμενα θραύσματα εκ περιορισμού διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα. Η ανάλυση RFLP ήταν η πρώτη τεχνική ανάλυσης του προφίλ του DNA, η οποία λόγω του χαμηλού της κόστους γνώρισε ευρύτατη εφαρμογή. Σε συνδυασμό με τη γονοτυπική αποτύπωση, η ανάλυση RFLP ήταν ένα πολύ χρήσιμο

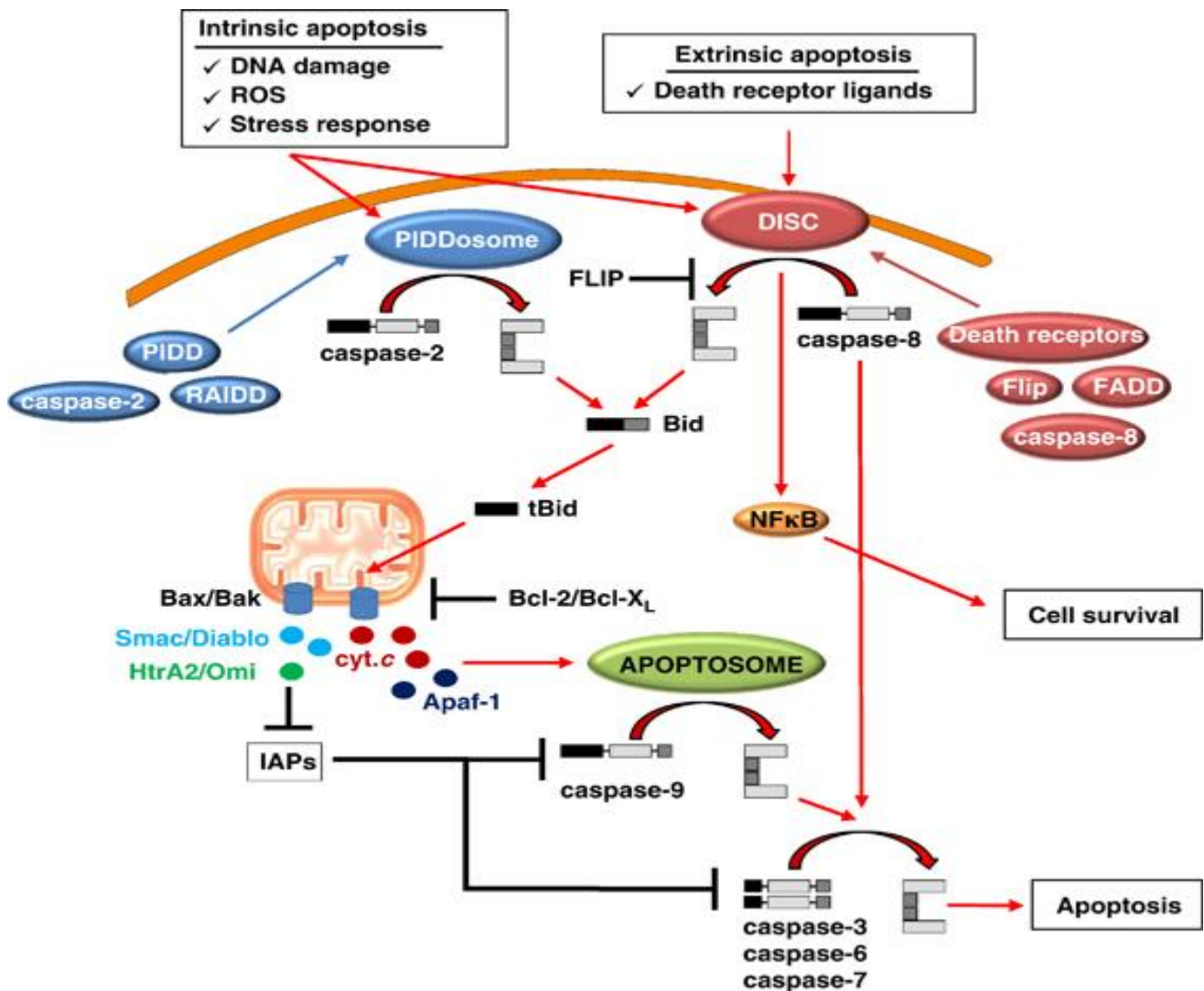
εργαλείο στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος, τον εντοπισμό της θέσης των γονιδίων για διερεύνηση γενετικών διαταραχών, τον προσδιορισμό του κινδύνου ανάπτυξης συγκεκριμένης νόσου και τον έλεγχο της πατρότητας.

Η βασική τεχνική για την ανίχνευση RFLP περιλαμβάνει τη θραύση ενός τμήματος του DNA από ένα περιοριστικό ένζυμο, το οποίο μπορεί να αναγνωρίσει και να διασπάσει το DNA οπουδήποτε παρατηρείται μια συγκεκριμένη σύντομη ακολουθία του DNA. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως περιοριστική πέψη. Τα παραγόμενα θραύσματα του DNA διαχωρίζονται σύμφωνα με το μήκος τους μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μια μεμβράνη μέσω της διαδικασίας Southern blot. Υβριδισμός της μεμβράνης σε ένα σημασμένο τμήμα του DNA στη συνέχεια καθορίζει το μήκος των θραυσμάτων που είναι συμπληρωματικά στο συγκεκριμένο τμήμα. Ένας RFLP συμβαίνει όταν το μήκος ενός ανιχνευμένου θραύσματος ποικίλλει ανάμεσα στα άτομα. Κάθε μήκος θραύσματος θεωρείται ένα αλληλόμορφο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γενετική ανάλυση.

Κασπάσες

Η ταξινόμηση των ανθρώπινων κασπασών βασίζεται είτε στη λειτουργία τους, το μέγεθος του προκατόχου τους ή την ειδικότητά τους στην κατάτμηση. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα κριτήρια, η κασπάση- 1, -4 και -5 ανήκουν στις κασπάσες ομάδας I (φλεγμονώδης) που εμπλέκονται στην ωρίμανση της κυτοκίνης. Αυτές οι πρωτεάσες σχετίζονται κυρίως με την εγγενή ανοσία έναντι παθογόνων και, ως εκ τούτου, δεν εμπίπτουν στο πεδίο έρευνας της εν λόγω διατριβής. Η ρύθμιση της απόπτωσης, από την άλλη πλευρά, ελέγχεται από τις κασπάσες της ομάδας II, οι οποίες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: κασπάσες- εκκινητές (κασπάση-2, -8, -9 και -10) και κασπάσες- εκτελεστές (κασπάση -3, -6 και 7). Οι κασπάσες- εκτελεστές αρχικά παράγονται σε κύτταρα ως διμερή και απαιτείται πρωτεολυτική επεξεργασία από ένα ένζυμο- εκκινητή για να ενεργοποιήσει τη δραστηριότητά τους. Όντας ενεργές, οι κασπάσες- εκτελεστές στοχεύουν σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών πρωτεϊνών, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Σε αντίθεση με τις κασπάσες- εκτελεστές, οι κασπάσες- εκκινητές μεταφράζονται ως μονομερή ζυμογόνα. Ο σχηματισμός των σύμπλοκων πολλαπλών συστατικών ενεργοποιεί το διμερισμό της κασπάσης- εκκινητή, ο οποίος είναι αρκετός για την ενεργοποίησή τους¹⁶¹. Το επάγον το θάνατο σηματοδοτικό σύμπλοκο (Death Inducing Signaling Complex- DISC), το αποπτώσωμα και η διεγερόμενη από το p53 πρωτεΐνη με ένα ώσωμα περιοχής θανάτου (PIDD) είναι πλατφόρμες συναρμολόγησης πρωτεϊνών που μπορούν να στρατολογήσουν τις κασπάσες -8, -10, -9 και -2, αντιστοίχως. Τα δύο κύρια μονοπάτια της απόπτωσης είναι το εξωτερικό για το οποίο μεσολαβούν υποδοχείς και το εσωτερικό μιτοχονδριακό μονοπάτι. Στην πρώτο μονοπάτι, εξωκυτταρικοί συνδέτες διεγείρουν τον ολιγομερισμό του υποδοχέα και τη συναρμολόγηση του DISC, ενώ στο τελικό μονοπάτι, οι πρωτεΐνες από την οικογένεια Bcl-2 ελέγχουν την απελευθέρωση των παραγόντων που εμπλέκονται στο σχηματισμό αποπτωσώματος μέσω διατήρησης ή διατάραξης της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα της ώριμης κασπάσης-9 και -3 αναστέλλεται από τον αναστολέα των πρωτεϊνών της απόπτωσης (Inhibitor of Apoptosis Proteins-IAP). Με τη σειρά τους, οι πρωτεΐνες της απόπτωσης απενεργοποιούνται και η

δραστηριότητα των κασπασών αποκαθίσταται από πρωτεΐνες, όπως η SMAC / Diablo ή η HtrA2 / Omi, που απελευθερώνονται από τα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 3. Συνολική εικόνα του καταρράκτη των κασπασών και των αναστολέων τους

Η κασπάση-9 είναι ένας εξέχων εκφραστής των κασπασών- εκκινήτων του εσωτερικού μονοπατιού, μιας από τις δύο διακριτές αλλά συγκλίνουσες οδούς της απόπτωσης, η οποία ξεκινάει από την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Το γεγονός αυτό είναι απόκριση σε μια ποικιλία κυτταροτοξικών σημάτων. Το κυτόχρωμα c τότε επάγει τον ολιγομερισμό του Apaf-1 που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κασπάσες- εκτελεστές -3 και -7¹⁶²⁻¹⁶⁴. Ο πολυμορφισμός του γονιδίου της κασπάσης-9 έχει πρόσφατα αναφερθεί ότι συνδέεται με την ευαισθησία στον καρκίνο¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. Μεταξύ των προηγουμένως μελετηθέντων πολυμορφισμών του γονιδίου της κασπάσης-9, λίγοι μόνο (rs1052576, rs1052571 και rs2308950) βρίσκονται στην περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Σε μια πρόσφατη έκθεσή

τους, οι Ulyyina και συνεργάτες υποστήριξαν ότι οι αποπτωτικοί γενετικοί πολυμορφισμοί της περιοχής κωδικοποίησης δε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προδιάθεση για καρκίνο του μαστού.

Στον αντίποδα, φαίνεται ότι οι περισσότεροι από τους μελετηθέντες πολυμορφισμούς του γονιδίου της κασπάσης-9 ανταποκρίνονται στις περιοχές της μη-κωδικοποίησης. Αρκετοί από αυτούς (όπως ο rs4661636, ο rs6685648 και ο rs2020902) εντοπίζονται στις εσωνικές περιοχές του γονιδίου, όπου σε λειτουργικό επίπεδο θα μπορούσαν θεωρητικά να τροποποιήσουν την ωρίμανση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA) της κασπάσης-9¹⁷²⁻¹⁷³. Η εναλλακτική ωρίμανση της κασπάσης-9 έχει προταθεί ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην καρκινογόνο ικανότητα των μη-μικροκυτταρικών καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα¹⁷⁴, αφού το γονίδιο της κασπάσης-9 παράγει δύο ισομορφές ανταγωνιστών πρωτεϊνών, την προαποπτωτική κασπάση 9α και την προεπιβιωτική κασπάση 9β μέσω της συμπερίληψης/ αποκλεισμού της κασπέτας εξωνίων 3, 4, 5, 6. Η κασπάση 9β παράγεται μέσω του αποκλεισμού της κασπέτας εξωνίων και στερείται καταλυτικής δραστηριότητας αλλά διατηρεί βασικά διαδραστικά χαρακτηριστικά (όπως το χαρακτηριστικό της στρατολόγησης κασπασών και την περιοχή του αποπτωσώματος του σχετιζόμενου με πρωτεΐνη παράγοντα-1). Παρόλα αυτά, οι πολυμορφισμοί της κασπάσης-9 που έχουν μελετηθεί σε βάθος και συσχετίζονται με διάφορους τύπους καρκίνου είναι εκείνοι που εντοπίζονται στην περιοχή υποκίνησης του γονιδίου (όπως ο rs4645978 και ο rs4645981), ένα εύρημα που τονίζει τη σημασία της ρύθμισης της μεταγραφής^{175,176}. Από αυτής της άποψης, μια εργαστηριακή μελέτη έχει δείξει ότι οι πολυμορφισμοί -1263 A>G (rs4645978) και 712 C>T (rs4645981) επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου. Συγκεκριμένα, ο απλότυπος -1263G/-712C παρουσίασε μια σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα από τους απλότυπους -1263G/-712T και -1263A/-712C.

Η χημοκίνη «προερχόμενος από στρωματικό κύτταρο παράγοντας-1» (stromal cell-derived factor-1/ SDF-1)

Η χημοκίνη SDF-1 ή CXCL12 αρχικά δημιουργήθηκε από τους Tashiro και συνεργάτες και αργότερα αναγνωρίστηκε σαν αυξητικός παράγοντας για τα Β κύτταρα, σαν χημειοτακτικός παράγοντας για τα Τ κύτταρα και τα μονοκύτταρα και στη λεμφοποίηση των Β κυττάρων και τη μυελοποίηση του μυελού των οστών¹⁷⁷. Η CXCL12 είναι μια μικρή κυττοκίνη 68 αμινοξέων που ανήκει στην οικογένεια χημοκινών CXC. Η CXCL12 εκφράζεται σε δύο ισομορφές, τον SDF-1a και τον SDF-1b, από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί δύο ώριμες παραλλαγές. Οι δύο κωδικοποιημένες πρωτεΐνες είναι σχεδόν πανομοιότυπες, εκτός από τα τέσσερα τελευταία αμινοξέα του SDF-1b, που απουσιάζουν από τον SDF-1a. Το γονίδιο CXCL12 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 10¹⁷⁸. Για μεγάλο χρονικό διάστημα επικρατούσε η άποψη ότι ο CXCR4 είναι ο μοναδικός υποδοχέας του CXCL12. Παρόλα αυτά, στο τέλος του 2005 αναγνωρίστηκε και ο CXCR7 σαν άλλος ένας υποδοχέας του CXCL12¹⁷⁹.

Ο CXCL12 αρχικά δημιουργήθηκε από στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Επίσης, εκφράζεται σε διάφορα όργανα όπως η καρδιά, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο νεφρός, ο σκελετικός μυς και

τα λεμφικά όργανα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, οι στρωματικοί ινοβλάστες και οι οστεοβλάστες είναι οι κύριες πηγές CXCL12 σε αυτά τα όργανα¹⁸⁰⁻¹⁸⁴. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι έχουν βρεθεί υψηλά επίπεδα λειτουργικού SDF-1 στον ανθρώπινο καρκίνο των ωοθηκών¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, ενώ η έκφρασή του έχει συσχετιστεί με τη μετάσταση στο μυελό των οστών και τους λεμφαδένες τόσο στον καρκίνο του μαστού όσο και στον καρκίνο του προστάτη^{188,189}. Εκτός από τον καρκίνο των ωοθηκών, έκφραση του CXCL12 αναφέρεται στον καρκίνο του μαστού^{190,191}, το γλοιοβλάτωμα^{192,193}, τον καρκίνο του παγκρέατος^{194,195}, τον καρκίνο του προστάτη^{196,197}, τον καρκίνο του θυρεοειδούς¹⁹⁸ και άλλους καρκίνους. Το στρώμα του όγκου είναι ένα ενεργό στοιχείο του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι στον καρκίνο του μαστού, ενεργοποιημένοι στρωματικοί ινοβλάστες παράγουν CXCL12 και συμβάλλουν στην αγγείωση του όγκου μέσω της προσέλκυσης των ενδοθηλιακών αρχέγονων κυττάρων^{199,200}. Επίσης, έχει προταθεί η θεωρία ότι ο SDF-1 εμπλέκεται στην καρκινική εξαλλαγή του προστάτη μέσω της φθοράς των ινοβλαστών²⁰¹.

Υπάρχει ένα πλήθος δεδομένων που υποστηρίζουν το γεγονός ότι η υποξία είναι μια κοινή κατάσταση η οποία προάγει την έκφραση του SDF-1²⁰²⁻²⁰⁶. Συνολικά, ο SDF-1 εκφράζεται ευρέως σε διάφορους τύπους ανθρώπινου καρκίνου. Η έκφραση του SDF-1 θα μπορούσαμε να πούμε ότι ρυθμίζεται από την υποξία και το μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιείται από ορμόνες.

Ο ρόλος του SDF-1 στον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου και την επιβίωση έχει αποδειχθεί σε πολλά εργαστηριακά μοντέλα. Παρόλα αυτά, σε πολλές περιπτώσεις, οι παρατηρήσεις του εργαστηρίου δεν υποστηρίζονται πλήρως στα πειραματικά δεδομένα της φύσης. Για παράδειγμα, τα κύτταρα του γλοιώματος πολλαπλασιάζονται στο εργαστήριο σαν απόκριση στον SDF-1. Στη φύση, ωστόσο, πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από τον SDF-1. Επιπρόσθετα, τα καρκινικά κύτταρα εκδηλώνουν χαμηλό πολλαπλασιασμό στους ιστούς του γλοιοβλαστώματος, όπου παρατηρούνται υψηλά επίπεδα έκφρασης SDF-1. Τέλος, έχει αποκαλυφθεί μια συσχέτιση τόσο του SDF-1 όσο και του CXCR4 με περιοχές της νέκρωσης και της αγγειογένεσης, υποστηρίζοντας το ρόλο του CXCL12 στην αγγειογένεση εργαστηριακά.

Η μετανάστευση, η εξάπλωση και η επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων σχηματίζουν το αναγκαίο δίκτυο για την αγγειογένεση. Η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων εξαρτάται ισχυρά από τον SDF-1. Η υποξία επίσης διεγείρει την έκφραση CXCR4 και την παραγωγή SDF-1. Με τον τρόπο αυτό είναι λογικό η υποξία να προάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων προς το CXCL12 και να επάγει την αγγείωση του όγκου με έναν τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από τον SDF-1.

Στο παρελθόν είχε αναπτυχθεί η θεωρία ότι οι χημοκίνες και οι υποδοχείς των χημοκίνων, συμπεριλαμβανομένου του CXCL12/CXCR4 μπορεί να λειτουργούν σαν μεσολαβητές που προάγουν τη μετάσταση σε συγκεκριμένα όργανα. Το 2001, είχαμε την πρώτη ένδειξη ότι κάτι τέτοιο μπορεί να ισχύει στην περίπτωση της μετάστασης του καρκίνου του μαστού. Αποκλεισμός στο εργαστήριο του CXCR4 με τη χρήση ενός συγκεκριμένου αντισώματος ή επιλεκτικού συνθετικού πολυπεπτιδίου είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αναστολή της μετάστασης του καρκίνου του μαστού σε επιχώριους λεμφαδένες καθώς επίσης και στον πνεύμονα. Επί της παρουσίας των ουδετεροποιητικών

αντισωμάτων του CXCL12, μεταστάσεις του όγκου NSCLC επίσης περιορίστηκαν σημαντικά. Ο αποκλεισμός της έκφρασης του CXCR4 στην κυτταρική επιφάνεια μείωσε αρκετά την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου να μεθίστανται στο ήπαρ και τους πνεύμονες.

Επιπρόσθετα, η αδρανοποίηση του CXCR4 βρέθηκε να περιορίζει τις οστικές μεταστάσεις στον καρκίνο του προστάτη. Επαγωγή της έκφρασης του CXCR4 είχε σαν συνέπεια τη δραματική αύξηση των πνευμονικών μεταστάσεων των κυττάρων του μελανώματος, μια κατάσταση που μπορούσε να αποφευχθεί με τη χρησιμοποίηση των αναστολέων του CXCR4. Σε περαιτέρω υποστήριξη του ρόλου του CXCL12 στη μετάσταση του όγκου, υψηλά επίπεδα CXCL12 συχνά ανευρίσκονται σε λεμφαδένες, στον πνεύμονα, το ήπαρ και το μυελό των οστών όπου συχνά μεθίστανται οι όγκοι. Όπως και να έχει, αν και οι μοριακοί μηχανισμοί δράσης δεν έχουν ακόμα πλήρως διερευνηθεί, οι μελέτες αυτές δείχνουν έναν κυριαρχικό ρόλο του CXCL12/CXCR4 στη διαδικασία της μετάστασης.

Η υποξία επάγει την έκφραση του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα, κάτι το οποίο ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα σε σήματα του CXCL12 και προάγουν τη μετάσταση. Παρόλα αυτά η υποξία την ίδια στιγμή ενεργοποιεί τόσο την έκφραση του CXCR4 όσο και του CXCL12. Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα στο νευροβλάστωμα, το γλοιοβλάστωμα, τις ωοθήκες, το μαστό, το παχύ έντερο, το πάγκρεας και τον προστάτη εκφράζουν τον CXCL12. Είναι λογικό ότι ο ενδογενής CXCL12, μαζί με τον CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα, διατηρεί τα καρκινικά κύτταρα μέσα στο περιβάλλον του πρωτοπαθούς όγκου, παρά διευκολύνει τη μετάστασή τους σε απομακρυσμένες θέσεις. Οι επιδράσεις του CXCL12/CXCR4, όμως, στη μετάσταση μπορούν να εξηγηθούν με πολλαπλούς παράγοντες του περιβάλλοντος του όγκου.

E-σελεκτίνη

Οι σελεκτίνες είναι αγγειακά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που εμπλέκονται στις διαδραστικές διαδικασίες προσκόλλησης των λευκοκυττάρων, των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου εντός της κυκλοφορίας του αίματος. Υπάρχουν τρία μέλη της ομάδας των σελεκτινών: η P-σελεκτίνη, η E-σελεκτίνη και η L-σελεκτίνη. Η P-σελεκτίνη είναι παρούσα στην αποθήκευση των κοκκίων των αιμοπεταλίων (α-κοκκία) και των ενδοθηλιακών κυττάρων (σωμάτια Weibel-Palade). Με τον τρόπο αυτό, ενεργοποιούν τη ραγδαία μετατόπιση στις κυτταρικές μεμβράνες²⁰⁷. Στον αντίποδα, η ενδοθηλιακή έκφραση της E-σελεκτίνης απαιτεί εξαρχής μεταγραφή, οδηγώντας στην έκφραση επί ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυτταρικών μεμβρανών αρκετές ώρες μετά τη διέγερση. Η L-σελεκτίνη εκφράζεται θεμελιωδώς στις κυτταρικές επιφάνειες σχεδόν όλων των λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών. Οι φυσιολογικές λειτουργίες των σελεκτινών περιγράφονται επαρκώς στις διαδικασίες της φλεγμονής, της ανοσολογικής απόκρισης, της αποκατάστασης των τραυμάτων και της αιμόστασης²⁰⁸. Ενώ η L-σελεκτίνη μεσολαβεί για την πραγματοποίηση της κύλισης των λευκοκυττάρων επάνω στο ενδοθήλιο, οι P- και E- σελεκτίνες υποστηρίζουν την κύλιση σε χαμηλότερες ταχύτητες. Τα αρχικά στάσια στην πρόσδεση και την κύλιση των λευκοκυττάρων επάνω

στο ενδοθήλιο υποστηρίζονται από ραγδαίες και αντιστρεπτές διαδραστικές διαδικασίες των σελεκτινών με τους υδατανθρακικούς συνδέτες τους.

Η πλειοψηφία των συνδετών των σελεκτινών αποτελούνται από ξεχωριστές γλυκανικές δομές που φέρουν έναν τελικό κορμό τετρασακχαριδικής δομής sialyl Lewis^{x/a} (sLe^x/sLe^a) επάνω σε έναν πρωτεϊνικό σκελετό^{209,210}. Οι σελεκτίνες συνδέονται με διάφορες τάξεις μορίων (μουκίνες, θειικά γλυκολιπίδια, γλυκοζαμινογλυκάνες) και τα περισσότερα από τα μόρια αυτά έχει φανεί στο εργαστήριο πως είναι λειτουργικοί συνδέτες των σελεκτινών. Η αποδοτική σύνδεση των σελεκτινών σε υδατάνθρακες συνήθως απαιτεί ένα κατάλληλο γλυκοπρωτεϊνικό υπόβαθρο που να παρουσιάζει μερικούς συνδέτες σελεκτινών σε συμπλέγμα και με τον τρόπο αυτό να ενισχύει την ένταση της διαδραστικής διαδικασίας.

Η αιματογενής μετάσταση είναι η πιο κοινή οδός για την επέκταση του καρκίνου στην περίπτωση των επιθηλιακών καρκίνων-καρκινωμάτων. Στην φυσιολογική κατάσταση, τα επιθηλιακά κύτταρα επενδύουν τον αυλό των κοίλων οργάνων και καλύπτονται από μουκίνες που βρίσκονται προσδεσμένες είτε στην κυτταρική μεμβράνη ή σχηματίζουν διαλυτά στρώματα που καλύπτουν το επιθήλιο. Οι μουκίνες είναι μόρια υψηλού μοριακού βάρους με υψηλή αναλογία Ο-συνδεδεμένων γλυκανών που είναι συνδεδεμένες με έναν πρωτεϊνικό σκελετό. Κατά τη διάρκεια της κακοήθους εξαλλαγής, οι γλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης υφίστανται δραματικές αλλαγές. Οι κυριότερες μεταβολές των γλυκανών στα καρκινικά κύτταρα σχετίζονται με την ενισχυμένη έκφραση του sLe^x ή του ισομερούς του sLe^a, του Tn και των sialyl-Tn αντιγονικών δομών^{211,212}. Η ενισχυμένη έκφραση του sLe^x και του sLe^a έχει συχνά συσχετιστεί με την ανάπτυξη και τη φτωχή πρόγνωση σε διάφορους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου, του γαστρικού καρκίνου, του καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του νεφρού, του καρκίνου του μαστού, του μελανώματος και άλλων²¹³. Αρκετές εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει πως τουλάχιστον μία σελεκτίνη (η P-, η E- ή η L-) είναι ικανή να συνδεθεί σε οποιοδήποτε ανθρώπινο καρκίνωμα^{214,215}, κάτι το οποίο δίνει έμφαση στην προοπτική των σελεκτινών να προάγουν συνδέσεις με καρκινικά κύτταρα εντός του αγγειακού δικτύου. Το γεγονός ότι, κατά τη διάρκεια της αιματογενούς φάσης της μετάστασης, τα καρκινικά κύτταρα που φέρουν τους συνδέτες της σελεκτίνης μπορούν να εκληφθούν ως σελεκτίνες τα ίδια και με τον τρόπο αυτό να είναι παρόντα σε όλα τα συστατικά της κυκλοφορίας του αίματος (λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια και ενδοθήλιο), υποστήριξε την αντίληψη της εμπλοκής των σελεκτινών στη μεταστατική διαδικασία^{216,217}. Η υπόθεση αυτή εκτιμήθηκε σε διάφορες εργαστηριακές έρευνες και τα πρόσφατα ευρήματα μετά τη χρησιμοποίηση ποντικών που τους λείπει μία ή περισσότερες σελεκτίνες συνηγορούν υπέρ της ανάμειξης της P-, L- και E- σελεκτίνης στη μετάσταση²¹⁸⁻²²².

Η E-σελεκτίνη έχει διερευνηθεί ως διαμεσολαβητής της μετάστασης σε περιοχές όπου έχει βρεθεί ότι δεσμεύονται τα καρκινικά κύτταρα στη μικροκυκλοφορία^{223,224}. E-σελεκτίνη που έχει εκφραστεί επάνω σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια του μεταστατικού εποικισμού του ήπατος. Αναστολή της E-σελεκτίνης ή υποβάθμιση της έκφρασης της E-σελεκτίνης είχε σαν αποτέλεσμα την εξασθένηση της μετάστασης στο ήπαρ σε πειραματικό επίπεδο. Στον αντίποδα, η υπερέκφραση της E-σελεκτίνης στο ήπαρ ανακατεύθυνε τη μετάσταση προς το συγκεκριμένο όργανο και με τον τρόπο αυτό επιβεβαίωσε το ρόλο της E-σελεκτίνης στη διαδικασία

αυτή. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε πειραματικό επίπεδο η μετάσταση των κυττάρων του καρκινώματος του κόλου στον πνεύμονα μειώθηκε στα ποντίκια με ανεπάρκεια E-σελεκτίνης, υποδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εμπλοκή της E-σελεκτίνης στη διαδικασία της μετάστασης στον πνεύμονα ²²⁵. Διαφορές που αφορούν συγκεκριμένα όργανα μπορούν να συνεισφέρουν στη διαδικασία εποικισμού και διαφορετικές απαιτήσεις για τις διαδραστικές διαδικασίες που διενεργούνται με τη μεσολάβηση της E-σελεκτίνης μπορεί να εξαρτώνται από τον πρωτοπαθή όγκο και το όργανο στο οποίο γίνεται η μετάσταση. Αν και οι σελεκτίνες αναγνωρίστηκαν ως πιθανοί διαμεσολαβητές της μετάστασης, δεν έχουν δειρευνηθεί σαν φαρμακολογικοί στόχοι για τη θεραπεία της εξέλιξης των καρκίνων.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μελέτης

Ο καρκίνος του μαστού παραμένει ένα μείζον υγεινομικό πρόβλημα ανά τον κόσμο, καθώς στο σύνολο των καρκίνων ένα ποσοστό μόλις κάτω του 30% αφορά σε καρκίνους του μαστού. Ο συγκεκριμένος καρκίνος αποτελεί την πιο κοινή αιτία καρκίνου στις γυναίκες. Επίσης, πρόκειται για την πρωταρχική αιτία θανάτων των σχετιζόμενων με τον καρκίνο ανάμεσα στις γυναίκες. Όπως οι περισσότεροι καρκίνοι, έτσι και ο καρκίνος του μαστού εμφανίζει σε πολύ μεγάλο ποσοστό οικογενή κατανομή. Η οικογενής κατανομή είναι η συγκέντρωση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, συμπεριφορών και διαταραχών μέσα σε μια συγκεκριμένη οικογένεια. Η συνάθροιση αυτών των χαρακτηριστικών προκύπτει κυρίως από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γεγονός αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην κληρονομούμενη ευαισθησία, η οποία καθιστά κάθε γενιά που υφίσταται τη δράση της πιο επιρρεπή στην εν λόγω κακοήθεια και λιγότερο ικανή στο να την αντιμετωπίσει.

Οι μεταλλάξεις των γονιδίων υψηλής διεισδυτικότητας BRCA1 και BRCA2 ευθύνονται σχεδόν για το 25% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού^{226,227}. Διεισδυτικότητα στην ιατρική γενετική ονομάζουμε το ποσοστό των ατόμων που εκδηλώνει κλινικά συμπτώματα λόγω μιας δυνητικά νοσογόνου μετάλλαξης που φέρει. Το υπόλοιπο 75% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού μπορεί να αποδοθεί σε συνδυασμούς παραλλαγών σε γονίδια χαμηλής διεισδυτικότητας. Τα BRCA1 και BRCA2 είναι ανθρώπινα γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες καταστολής των όγκων.

Τα προαναφερθέντα γονίδια είναι κομβικής σημασίας στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, καθώς παίρνουν μέρος σε ένα πολύπλοκο δίκτυο μονοπατιών σηματοδότησης, που ανιχνεύει και επιδιορθώνει ρήξεις στη συνέχεια του DNA. Όταν οποιοδήποτε από τα δύο αυτά γονίδια μεταλλάσσεται ή τροποποιείται, η πρωτεΐνη του είτε δεν παράγεται καθόλου είτε δε λειτουργεί κανονικά. Αυτό έχει τελικά σαν αποτέλεσμα την απόπτωση, όταν η βλάβη του DNA ξεπερνά το όριο της επιδιόρθωσής του. Από αυτής της άποψης, η απόπτωση θεωρείται ως ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς ασφαλείας για την ακεραιότητα του κυττάρου, καθώς αποκλείει τους μη φυσιολογικούς κλώνους, ενώ η ελαττωματική διαδικασία της απόπτωσης σε συνδυασμό με τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της καρκινικής εξαλλαγής²²⁸.

Οι κασπάσες, ή πρωτεάσες κυστεΐνης-ασπαρτικού οξέος ή εξαρτώμενες από την κυστεΐνη και καθοδηγούμενες από το ασπαρτικό οξύ πρωτεάσες, ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεασών της κυστεΐνης. Πρωτεάσες ονομάζονται τα ένζυμα που ρόλος τους είναι η εκτέλεση της πρωτεόλυσης, δηλαδή της διαδικασίας του πρωτεϊνικού καταβολισμού μέσω της υδρόλυσης των πεπτιδικών δεσμών που συνδέουν τα αμινοξέα μεταξύ τους. Οι κασπάσες είναι απαραίτητες στα κύτταρα λόγω του ρόλου που παίζουν στην απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), στη νέκρωση και τη φλεγμονή. Οι κασπάσες λειτουργούν ως εκκινητές ή εκτελεστές του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε διάφορους οργανισμούς. Οι κασπάσες-εκκινητές ενεργοποιούν τις κασπάσες-εκτελεστές, οι οποίες στη συνέχεια διασπών τα πρωτεϊνικά υποστρώματα που ευθύνονται για μια πλειάδα μορφολογικών και βιοχημικών αλλοιώσεων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Η κασπάση-9 είναι μια κασπάση-εκκινητής.

Ανάμεσα στους πολυμορφισμούς της κασπάσης-9 που έχουν μελετηθεί κατά το παρελθόν, μόνο ορισμένοι (rs1052576, rs1052571 και rs2308950) εντοπίζονται στην περιοχή κωδικοποίησης του γονιδίου (coding region). Η περιοχή κωδικοποίησης ενός γονιδίου είναι μια ακολουθία ζευγαριών βάσεων του DNA που γεννούν το ώριμο αγγελιαφόρο RNA, το οποίο με τη σειρά του θα μεταφραστεί σε συγκεκριμένα αμινοξέα του πρωτεϊνικού προϊόντος. Ωστόσο, οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της κασπάσης-9 που έχουν μελετηθεί περισσότερο σε βάθος και οι οποίοι έχουν παρουσιάσει αρνητική ή θετική συσχέτιση με διάφορους τύπους καρκίνου είναι εκείνοι που εντοπίζονται στην περιοχή υποκίνησης του γονιδίου (promoter region). Η περιοχή υποκίνησης ενός γονιδίου είναι εκείνη η περιοχή του DNA από την οποία ξεκινάει η διαδικασία της μεταγραφής του συγκεκριμένου γονιδίου. Πρόκειται για τους ίδιους πολυμορφισμούς που μελετήσαμε κι εμείς στην παρούσα διδακτορική διατριβή (rs4645978 και rs4645981). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ιδιαίτερη σημασία που παίζει η ρύθμιση της διαδικασίας της μεταγραφής του γονιδίου. Σκοπός ενός μέρους της μελέτης ήταν η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των δύο αυτών πολυμορφισμών του γονιδίου της κασπάσης-9 με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

Ένας επιπλέον παράγοντας που παίζει ρόλο στην αύξηση και εξάπλωση του καρκίνου του μαστού είναι η μεγάλη ετερογένεια της συγκεκριμένης νόσου. Η ετερογένεια αυτή καθιστά απαραίτητη την κατηγοριοποίηση σε υποτύπους και την εξατομικευμένη αντιμετώπιση των διαφόρων περιστατικών. Επίσης, εξηγεί σε ένα βαθμό και την επιθετικότητα διαφόρων υποτύπων καθώς και τη μεγαλύτερη τάση τους προς μετάσταση ακόμα και από τα πολύ αρχικά στάδια της νόσου^{229,230}.

Η μετάσταση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης, την αυξημένη κινητικότητα, τη νεοαγγειογένεση και τη διείσδυση σε αιμοφόρα αγγεία (ενδαγγείωση)²³¹. Τα καρκινικά κύτταρα εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, μετακινούνται σε διάφορα σημεία του σώματος, εξέρχονται των αγγείων και αποικίζουν τα νέα αυτά σημεία. Κατόπιν, τροποποιούν το μικροπεριβάλλον της καινούργιας εστίας διαμορφώνοντας ένα βιώσιμο για αυτά μεταστατικό περιβάλλον. Σε όλες αυτές τις διαδικασίες συμμετέχει μια πλειάδα μικρότερων ή μεγαλύτερων μορίων. Όπως εύκολα μπορεί να γίνει αντιληπτό οποιαδήποτε διαφοροποίηση στη λειτουργία των μορίων αυτών εξαιτίας πολυμορφισμών μπορεί να τροποποιήσει και τη μεταστατική προοπτική του συγκεκριμένου όγκου.

Ο προερχόμενος από στρωματικό κύτταρο παράγοντας-1 (SDF-1) ή αλλιώς CXCL12 είναι μια χημοκίνη τύπου CXC²³². Μία από τις κύριες φυσιολογικές λειτουργίες του SDF-1 είναι η ρύθμιση της μετανάστευσης και της κυκλοφορίας των CD34⁺ αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων²³³. Η διαδικασία αυτή έχει κατά καιρούς προταθεί ως ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς της μετάστασης. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τον άξονα SDF-1-CXCR4 προκειμένου να διαφύγουν από την πρωτοπαθή εστία και να μετακινηθούν σε καινούργιες εστίες²³⁴.

Ένας κοινός πολυμορφισμός του SDF-1 είναι η μετάβαση G→A στη θέση 801 της μη μεταφρασμένης-3' περιοχής. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός κωδικοποιείται με την ονομασία SDF-1-3'-A και πρωτοπαρητήθηκε σε ασθενείς με AIDS²³⁵. Η σχέση του με την εξέλιξη του καρκίνου πηγάζει από την επιρροή που μπορεί να έχει στα λειτουργικά επίπεδα του SDF-1, που είναι δυνατό να επηρεάσει τη συμπεριφορά του όγκου. Συγκεκριμένα, οι ομοζυγώτες AA θεωρούνται ότι παράγουν υψηλότερα επίπεδα SDF-1 σε σύγκριση με τους GG ομοζυγώτες και τους ετεροζυγώτες. Σε μια παλιότερη μελέτη είχε φανεί ότι οι φορείς του A αλληλόμορφου έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του παγκρέατος, καθώς και ότι όταν αναπτύσσουν το συγκεκριμένο νόσημα, το εκδηλώνουν με πιο επιθετικά χαρακτηριστικά²³⁶. Έτσι, υποθέσαμε πως κάτι αντίστοιχο είναι πιθανό να συμβαίνει και με τον καρκίνο του μαστού και αποφασίσαμε ότι είναι άξιο περαιτέρω διερεύνησης.

Μια άλλη ομάδα μορίων με μεγάλη σημασία στη μεταστατική διαδικασία είναι η οικογένεια των σελεκτινών²³⁷. Οι σελεκτίνες είναι ασβεστιο-εξαρτώμενα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης παρόντα σε διάφορους τύπους κυττάρων, τα οποία για πρώτη φορά αναγνωρίστηκαν για το ρόλο που παίζουν στην κυκλοφορία των λευκοκυττάρων^{238,239}. Οι συνδέτες των σελεκτινών συγκροτούν μια

ετερογενή ομάδα γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, που όλες φέρουν το τετρασακχαρίδιο sialyl-Lewis^x (sL^x) ή το ισομερές του sialyl-Lewis^a (sL^a)²⁴⁰.

Η E-σελεκτίνη έχει έναν πρωταρχικό ρόλο στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, καθώς επίσης και στην αναστολή της ενεργοποίησής τους όταν τα αρχικά γεγονότα αρχίζουν να υποχωρούν. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα μεταστατικά κύτταρα χρησιμοποιούν το μηχανισμό αυτό προκειμένου να εξέλθουν από τη μικροκυκλοφορία και να αποικίσουν απομακρυσμένες εστίες. Αυτό το επιτυγχάνουν μέσω της έκφρασης των φυσικών συνδετών της E-σελεκτίνης στην επιφάνειά τους. Εκτός από τη συμβολή στην προαγωγή της μετάστασης, η έκφραση των συνδετών της E-σελεκτίνης μπορεί να προσφέρει επιπρόθετη ευεργεσία στα καρκινικά κύτταρα μέσα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK, το οποίο μεταδίδει σήματα ανάπτυξης και επιβίωσης²⁴¹.

Ένας από τους πιο κοινούς πολυμορφισμούς του γονιδίου της E-σελεκτίνης είναι η μετάβαση A→C στη θέση 561 του εξωνίου 4²⁴². Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της σερίνης 128 από ένα υπόλειμμα αργινίνης (S128R) στην ώριμη πρωτεΐνη, κάτι που καταλήγει στην παραγωγή ενός προϊόντος με μεγαλύτερη συνάφεια προς τους συνδέτες της E-σελεκτίνης²⁴³. Κατά συνέπεια, τα άτομα που φέρουν το συγκεκριμένο S128R πολυμορφισμό θεωρούνται ότι είναι πιο ευαίσθητα στην ανάπτυξη καρκίνου και μετάστασης.

Μέχρι σήμερα, έχουμε ελάχιστα δεδομένα για το ρόλο που παίζουν οι προαναφερθέντες πολυμορφισμοί στον καρκίνο του μαστού. Θεωρήσαμε, λοιπόν, ότι υπάρχει μεγάλο πεδίο ενδιαφέροντος στη διερεύνηση της συσχέτισής τους με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού καθώς επίσης και στην επίδρασή τους πάνω στην επιβίωση των συγκεκριμένων ασθενών.

Υλικό και μέθοδος

Υλικό

Για την παρούσα διδακτορική διατριβή διενεργήθηκε μια μελέτη ασθενών- μαρτύρων (case-control study). Μελέτη ασθενών- μαρτύρων ονομάζουμε μια μελέτη, της οποίας ο σκοπός είναι να συγκρίνει ασθενείς που έχουν εκδηλώσει ένα νόσημα που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε με άτομα- μάρτυρες που δεν έχουν εκδηλώσει το συγκεκριμένο νόσημα και, ανατρέχοντας αναδρομικά στο παρελθόν να συγκρίνει το κατά πόσο συχνή είναι η έκθεση σε έναν συγκεκριμένο παράγοντα κινδύνου σε κάθεμία από τις δύο ομάδες που μελετούμε. Με τον τρόπο αυτό, η μελέτη ασθενών- μαρτύρων καταλήγει στη συσχέτιση ή μη ενός συγκεκριμένου παράγοντα κινδύνου με ένα νόσημα. Στην προκειμένη περίπτωση το υπό μελέτη νόσημα ενδιαφέροντος ήταν ο καρκίνος του μαστού και οι παράγοντες κινδύνου που ερευνήθηκαν ήταν κάποιοι γενετικοί πολυμορφισμοί της κασπάσης- 9, της E- σελεκτίνης και του SDF- 1.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε επί συνόλου μια σειράς 261 θηλέων ασθενών, για τις οποίες υπήρχαν επαρκή δεδομένα και οι οποίες είχε ιστολογικά επιβεβαιωθεί ότι πάσχουν από καρκίνο του μαστού. Οι γυναίκες αυτές είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του μαστού στην Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, η οποία εδράζεται στο ΓΝΑ «Ιπποκράτειο». Το χρονικό διάστημα κατά το οποίο έλαβαν χώρα οι συγκεκριμένες χειρουργικές επεμβάσεις ήταν από τον Ιανουάριο του 2007 έως τον Ιανουάριο του 2011. Στα κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών περιλαμβάνονταν τα ακόλουθα:

- Μεταστατική νόσος ή αμφοτερόπλευρος καρκίνος του μαστού κατά τη χρονική στιγμή της πρώτης εκδήλωσης της νόσου
- Προηγούμενο ατομικό ιστορικό κακοήθειας
- Χρήση νεοεπικουρικής θεραπείας (neoadjuvant therapy) και
- Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 61,67 έτη με τυπικό σφάλμα ή απόκλιση της μέσης τιμής (SEM) τα 13,48 έτη. Οι ηλικίες κυμαίνονταν μεταξύ του κάτωτατου ορίου των 30 και του ανώτατου των 90 ετών. Η μέση περίοδος μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών ήταν οι 40,03 μήνες με σταθερή απόκλιση τους 14,77 μήνες. Η διακύμανση των τιμών της χρονικής περιόδου

μετεγχειρητικής παρακολούθησης ήταν από 10 έως 100 μήνες. Μόνο οι ασθενείς με επαρκή δεδομένα μετεγχειρητικής παρακολούθησης συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Η επάρκεια των δεδομένων αυτών εξασφαλίστηκε μέσω των συχνών επισκέψεων των ασθενών στη Μονάδα Μαστού του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο» (υπό τη διεύθυνση του καθηγητού κ. Γεωργίου Ζωγράφου) και μέσω άμεσης τηλεφωνικής επικοινωνίας με τις ασθενείς. Όσες ασθενείς διαπιστώθηκαν αποθανούσες κατά τη χρονική περίοδο της μετεγχειρητικής παρακολούθησης απεβίωσαν λόγω της υποκείμενης νόσου τους (καρκίνος του μαστού) και ο θάνατος λογίστηκε ως έκβαση της παρούσας μελέτης. Η σταδιοποίηση των ασθενών έγινε σύμφωνα με το πλέον πρόσφατο AJCC TNM σύστημα για τον καρκίνο του μαστού

244

Η ομάδα ελέγχου των υγιών ατόμων συγκροτήθηκε κατά την ίδια περίοδο που έλαβαν χώρα και οι χειρουργικές επεμβάσεις των ασθενών (Ιανουάριος 2007 μέχρι Ιανουάριος 2011). Τα άτομα της ομάδας ελέγχου επιλέχθηκαν μέσα από μια δεξαμενή 950 εθελοντριών που προέρχονταν από τη βάση δεδομένων DNA της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς επίσης και από γυναίκες που συμμετείχαν στον Ετήσιο Εθνικό Μαστογραφικό Προληπτικό Έλεγχο. Από τη δεξαμενή των 950 εθελοντριών τελικά επελέγησαν 480 υγιείς γυναίκες και δημιούργησαν ζεύγη με τις ασθενείς με βάση την ηλικία (+/- 5 έτη). Η μέση ηλικία των ατόμων της ομάδας ελέγχου ήταν τα 60,77 έτη με σταθερό σφάλμα μέσης τιμής τα 13,44 έτη. Όλες οι εθελόντριες ήταν ελληνικής προέλευσης και κατά την περίοδο του ελέγχου δεν παρουσίαζαν κάποια ένδειξη κακοήθειας ή αυτοάνοσου νοσήματος. Η διενέργεια της μελέτης εγκρίθηκε από την ειδική επιτροπή του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο» και κατόπιν πλήρους και εμπειριστατωμένης ενημέρωσης σχετικά με το σκοπό και το περιεχόμενό της όλες οι συμμετέχουσες σε αυτήν έδωσαν τη γραπτή τους συγκατάθεση.









































Μέθοδος

Γονοτύπηση

Για τη γονοτύπηση των πολυμορφισμών της κασπάσης-9, απομονώθηκε περιφερικό αίμα με χρήση του NucleoSpin blood kit (Macherey-Nagel, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας. Το πρωτόκολλο για την απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) στο εγχειρίδιο χρήσης του κατασκευαστή αποτυπώνεται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα:

Genomic DNA from blood

Protocol-at-a-glance (Rev. 13)

	Mini	Midi	Maxi	Mini
	NucleoSpin® Blood	NucleoSpin® Blood L	NucleoSpin® Blood XL	NucleoSpin® Blood QuickPure
1 Lyse blood samples	 200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL B3 Mix  70 °C, 10–15 min	 2 mL blood 150 µL Pro.K 2 mL BQ1 Mix  56 °C, 10–15 min	 10 mL blood 500 µL Pro.K 10 mL BQ1 Mix  56 °C, 10–15 min	 200 µL blood 25 µL Pro.K 200 µL BQ1 Mix  70 °C, 10–15 min
2 Adjust DNA binding conditions	210 µL ethanol	2 mL ethanol	10 mL ethanol	200 µL ethanol
3 Bind DNA	 Load all  11,000 x g, 1 min	 Load 3 mL  4,500 x g, 3 min	 Load 15 mL  4,000 x g, 3 min	 Load all  11,000 x g, 1 min
	—	 Load 3 mL of residue  4,500 x g, 5 min	 Load 15 mL of residue  4,000 x g, 3 min	—
4 Wash silica membrane	 500 µL BW 600 µL B5 1st wash  11,000 x g, 1 min 2nd wash  11,000 x g, 1 min	 2 mL BQ2 2 mL BQ2 1st wash  4,500 x g, 2 min 2nd wash  4,500 x g, 10 min	 7.5 mL BQ2 7.5 mL BQ2 1st wash  4,000 x g, 2 min 2nd wash  4,000 x g, 10 min	 350 µL BQ2 1st wash  11,000 x g, 3 min 2nd wash —
5 Dry silica membrane	 11,000 x g, 1 min	Drying is performed during centrifuga- tion of the last washing step	Drying is performed during centrifuga- tion of the last washing step	Drying is performed during centrifuga- tion of the last washing step
6 Elute highly pure DNA	 100 µL BE, (70 °C) RT, 1 min  11,000 x g 1 min	 200 µL BE (70 °C), RT, 2 min  4,500 x g, 2 min	 500 µL– 2000 µL BE (70 °C) RT, 2 min  4,000 x g, 2 min	 50 µL BE (70 °C) RT, 1 min  11,000 x g, 1 min

Εικόνα 4. Απεικόνιση των διαδικασιών που ακολουθούνται για την απομόνωση του γενετικού υλικού σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης του NucleoSpin Blood Kit

Για τον καθαρισμό του γονιδιωματικού DNA η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Απομονώθηκαν 200 μl αίματος και αναδεύτηκαν με 25 μl πρωτεϊνάσης K. Μια από τις ιδιότητες της πρωτεϊνάσης K είναι ότι έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί την πέψη των πρωτεϊνών του αίματος. Επίσης, απομακρύνει τις ακαθαρσίες του νουκλεϊκού οξέος, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στον καθαρισμό του DNA.
2. Προστέθηκαν 200 μl λυτικού διαλύματος BQ1. Το λυτικό διάλυμα BQ1 έχει την ικανότητα να διαλύει την κυτταρική και την πυρηνική μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει στην απελευθέρωση του DNA.
3. Κατόπιν ακολούθησε γρήγορη ανάδευση (vortex).
4. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 70 °C για 10- 15 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται ενίσχυση της δράσης των διαλυμάτων, καθώς επίσης παρατηρείται και σταδιακή αλλαγή στο χρωματισμό τους.
5. Αφού παρήλθε το προαναφερθέν χρονικό διάστημα των 10- 15 λεπτών, τα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά 200 μl αιθανόλης. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί το ξετύλιγμα και η κατακρήμνιση του DNA.
6. Γρήγορη ανάδευση (vortex).
7. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε ειδικές κολώνες που περιείχαν μια ειδική μεμβράνη πυριτίου.
8. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 rpm.
9. Τοποθετήθηκε ένα καινούργιο συλλεκτικό σωληνάκι σε κάθε κολώνα και προστέθηκαν 350 μl αλκοολούχου διαλύματος BQ2. Το αλκοολούχο διάλυμα BQ2 ξεπλένει τη μεμβράνη πυριτίου. Το DNA δεσμεύεται με τα ιόντα του πυριτίου στη μεμβράνη και το διάλυμα BQ2 ξεπλένει τη μεμβράνη από τις προσμίξεις που μπορεί να υπάρχουν στο DNA.
10. Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 11000 rpm.
11. Τοποθετήθηκε η μεμβράνη σε καινούργιο σωληνάκι τύπου erpendorf και προθερμάνθηκε στους 70°C.
12. Στο κέντρο της μεμβράνης προστέθηκαν 50 μl διαλύματος BE.
13. Τα δείγματα επώστηκαν για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
14. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11000 rpm.

15. Το διάλυμα BE έχει την ιδιότητα μέσω των χαμηλής συγκέντρωσης αλάτων που περιέχει να απελευθερώνει το DNA που έχει δεσμευτεί στη μεμβράνη πυριτίου. Με τον τρόπο αυτό το τελικό προϊόν DNA που συλλέγεται στο σωληνάκι τύπου erpendorf είναι καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20 °C για περαιτέρω χρήση.

Προς επιβεβαίωση της ακεραιότητας του DNA, αρχικά, πολλαπλασιάστηκε μια ακολουθία 430 ζευγών βάσης του ανθρώπινου γονιδίου της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου της κασπάσης-9 (rs4645978 και rs4645981) πολλαπλασιάστηκαν με επιτυχία σε όλες τις περιπτώσεις τόσο των ασθενών με καρκίνο του μαστού όσο και των ατόμων της ομάδας ελέγχου. Ο πολυμορφισμός rs4645978 της κασπάσης-9 αναλύθηκε μέσω της χρησιμοποίησης της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και ανάλυσης πολυμορφισμού μήκους θραυσμάτων εκ περιορισμού (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms ή εν συντομία PCR-RFLP)²⁴⁵. Για τον πολυμορφισμό rs4645978 του γονιδίου της κασπάσης-9 χρησιμοποιήθηκε ο εξής συνδυασμός εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: 5-GGGAATACTTTCCTGGCAGG-3 (πρόσθιο) και 5-GTCTTCCATTCCTCTCCG(C!G)TC-3 (οπίσθιο). Ο πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει συνοπτικά τα παρακάτω στάδια:

- Αρχικό στάδιο αποδιάταξης DNA διάρκειας 5 λεπτών στους 94°C
- 35 κύκλοι μετουσίωσης στους 94°C για 30 δευτερόλεπτα
- Επαναδιάταξη DNA στους 59°C για 90 δευτερόλεπτα
- Επιμήκυνση DNA στους 72°C για 90 δευτερόλεπτα ακολουθούμενο από
- Ένα βήμα στους 72°C για 5 λεπτά

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υπέστησαν τη διαδικασία της πέψης κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 37 °C με τη δράση του περιοριστικού ενζύμου BsmAI (New England BioLabs). Τα πεφθέντα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης διαλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% και βάφτηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο προκειμένου να επισκοπηθούν υπό υπεριώδες φως. Το αλληλόμορφο G αποκόπτεται από το ένζυμο, αποδίδοντας δύο θραύσματα (με 209 και 25 ζεύγη βάσης) ενώ το αλληλόμορφο A δεν υφίσταται την πέψη (234 ζεύγη βάσης).

Για τον πολυμορφισμό rs4645981 της κασπάσης-9 χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος συνδυασμός εκκινητών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: 5'-AGT CGC GGA GGT GCC GCC TT-3'

(πρόσθιο) και 5'-AGG GCT AGC CTC GTG CCA GC-3' (οπίσθιο). Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης υφίστανται τη διαδικασία της πέψης κατά τη διάρκεια της νύχτας με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου HaeII (New England Biolabs, Ipswich, MA) στους 37°C. Τα πεφθέντα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης διαλύονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 6% και βάφονται με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου για επισκόπηση υπό υπεριώδες φως. Το rs4645981 μη-μεταλλαγμένο C αλληλόμορφο γονίδιο αποδίδει ένα προϊόν με 194 ζευγάρια βάσης ενώ το πολυμορφικό rs4645981 T αλληλόμορφο γονίδιο αποδίδει προϊόντα με 174 και 20 ζευγάρια βάσης.

Η γονοτυπική ανάλυση και των πολυμορφισμών SDF-1-3'A του SDF-1 και S128R της E-σελεκτίνης διενεργήθηκε με τη βοήθεια της PCR-RFLP. Το γονιδιακό DNA απομονώθηκε από ιστούς ασθενών εμποτισμένους σε παραφίνη καθώς και από περιφερικό αίμα της ομάδας των μαρτύρων με τη χρησιμοποίηση του NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, GmbH&Co., KG, Düren, Germany), σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες χρήσης του εν λόγω κατασκευαστή. Για την ενίσχυση του νουκλεϊκού οξέος μέσω PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

- Για την E-σελεκτίνη, 5'-AAA ATC AAA GGC ACT CAG TAT AAG CA-3' (πρόσθιο) και 5'-GAA CGT GAG ATG GTG CTA CCA-3' (οπίσθιο)
- Για τον SDF-1, 5'-CAC AGT CAA CCC AAC CCA ACC CAA CCC AAC CTG GGC AAA CAA ACA AAC AAA GCC CC-3' (πρόσθιο) και 5'-CCT GAG AGT CCT TTT GCG GG-3' (οπίσθιο).

Για τη γονοτυπική ανάλυση της E-σελεκτίνης και του SDF-1 χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού PstI και HpaII αντίστοιχα. Τα προϊόντα της διαδικασίας του περιορισμού αναλύθηκαν μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και επισκόπησης σε υπεριώδες φως μετά χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Ο έλεγχος της ποιότητας των αποτελεσμάτων της RFLP πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας την άμεση ανάλυση των αλληλουχιών του DNA σε τυχαία επιλεγμένα δείγματα.

Στατιστική ανάλυση

Στην περίπτωση της μελέτης των πολυμορφισμών της κασπάσης-9, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των γονοτύπων που περιείχαν πολυμορφισμό και των φυσιολογικών γονοτύπων μέσω της δοκιμασίας χ^2 2 X 3 κατά Pearson (τρεις γονότυποι για τις δύο συμμετέχουσες στην έρευνα ομάδες) και μιας ξεχωριστής δοκιμασίας χ^2 2 X 2 κατά Pearson (φυσιολογικός γονότυπος και γονότυπος που περιέχει πολυμορφισμό για τις δύο ξεχωριστές ομάδες). Η δοκιμασία chi-squared (χ^2) κατά Pearson είναι μια στατιστική δοκιμασία που εφαρμόζεται πάνω σε ομάδες κατηγορικών δεδομένων. Στόχος της είναι να εκτιμήσει την πιθανότητα που υπάρχει οποιαδήποτε παρατηρούμενη διαφορά ανάμεσα στα δεδομένα να έχει προκύψει τυχαία. Πρόκειται για μια στατιστική δοκιμασία κατάλληλη στην περίπτωση που θέλουμε να συγκρίνουμε αταίριαστα δεδομένα από ένα μεγάλο δείγμα. Από τις δοκιμασίες chi-squared είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη. Ομοίως πραγματοποιήθηκε και σύγκριση της συχνότητας των αλληλόμορφων γονιδίων (φυσιολογικών αλληλόμορφων έναντι αλληλόμορφων που περιείχαν τον πολυμορφισμό για τις δύο ομάδες).

Προκειμένου να γίνει σύγκριση των ποιοτικών παραμέτρων ανάμεσα σε ομάδες ασθενών με διαφορετικό προφίλ αλληλόμορφων γονιδίων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διασποράς κατά μία κατεύθυνση (one-way analysis of variation), η οποία ακολουθήθηκε από δοκιμασία post hoc κατά Fischer. Στη στατιστική, η ανάλυση διασποράς είναι μια τεχνική, η οποία έχει σαν στόχο της να αναλύσει τον τρόπο με τον οποίο η τιμή μιας μεταβλητής επηρεάζεται από διαφορετικούς τύπους και συνδυασμούς άλλων παραγόντων. Η ανάλυση διασποράς κατά μία κατεύθυνση είναι η πιο απλή μορφή αυτής της τεχνικής. Όταν μια ανάλυση διασποράς δίνει ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα, αυτό υποδεικνύει ότι τουλάχιστον μια ομάδα διαφέρει από μια άλλη ομάδα. Όμως, δεν καταδεικνύει ποια ομάδα είναι εκείνη που διαφέρει. Προκειμένου να διερευνηθεί η μορφή της διαφοράς αυτής, πολύ συχνά η ανάλυση διασποράς ακολουθείται από μια σύγκριση των τιμών κατά ζεύγη, που είναι η σύγκριση τιμών που χρησιμοποιείται πιο συχνά. Η πρώτη τεχνική για τη σύγκριση τιμών κατά ζεύγη που προτάθηκε στη Στατιστική ήταν η δοκιμασία post hoc κατά Fisher.

Για να ελεγχθεί η επίδραση των πιθανών συγχυτικών παραγόντων (όπως η ηλικία) πάνω σε μεταβλητές των χαρακτηριστικών του όγκου (όπως επίπεδο T, επίπεδο λεμφαδένων, επίπεδο υποδοχέων οιστρογόνων/προγεστερόνης, βαθμός διαφοροποίησης) πραγματοποιήθηκε σταδιακή ανάστροφη ανάλυση παλινδρόμησης (backward stepwise regression analysis), κατά την οποία η ηλικία λογίστηκε σαν ανεξάρτητη μεταβλητή και τα χαρακτηριστικά του όγκου σαν εξαρτημένες μεταβλητές.

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad v. 3.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του p που ήταν κάτω από 0.05.

Για τη σύγκριση των συχνοτήτων και των ευπαθειών των μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 . Οι λόγοι σχετικών πιθανοτήτων (odds ratios, OR's), καθώς και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (95% Confidence Intervals, CIs) υπολογίστηκαν με τις αντίστοιχες δοκιμασίες κατανομής χ^2 . Στη στατιστική, ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων είναι ένας από τους τρεις κύριους τρόπους να προσδιορίσουμε πόσο ισχυρά σχετίζεται η παρουσία ή απουσία μιας ιδιότητας «Α» με την παρουσία ή την απουσία μιας ιδιότητας «Β» σε ένα δεδομένο πληθυσμό. Η αρχή Hardy-Weinberg είναι εκείνη η αρχή που υποστηρίζει ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονοτύπων σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό παραμένουν σταθερές από γενιά σε γενιά με την προϋπόθεση ότι δεν υπεισέρχεται σε αυτές καμία εξελικτική επιρροή. Επειδή στους πραγματικούς πληθυσμούς πάντα υφίστανται ένας ή περισσότεροι από τους παράγοντες της εξέλιξης, η αρχή Hardy-Weinberg περιγράφει μια ιδανική κατάσταση σύμφωνα με την οποία οι επιδράσεις των παραγόντων αυτών μπορούν να αναλυθούν και να εκτιμηθούν. Το ισοζύγιο Hardy-Weinberg εκτιμήθηκε υπολογίζοντας τις αναμενόμενες συχνότητες και αξίες και δοκιμάστηκε ξεχωριστά σε ασθενείς και μάρτυρες με τον έλεγχο καλής προσαρμογής χ^2 (goodness-of-fit test). Ο έλεγχος καλής προσαρμογής ενός στατιστικού μοντέλου περιγράφει το πόσο καλά το στατιστικό αυτό μοντέλο προσαρμόζει τις παρατηρούμενες τιμές. Στην πραγματικότητα, οι μετρήσεις της καλής προσαρμογής συνοψίζουν την απόσταση που υπάρχει ανάμεσα στις παρατηρούμενες τιμές μιας μελέτης και στις αναμενόμενες τιμές του μοντέλου υπό διερεύνηση.

Σε ό,τι αφορά στη στατιστική ανάλυση των πολυμορφισμών της E-σελεκτίνης και του SDF-1, αυτή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού για τα Windows SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL). Οι συχνότητες και οι ευαισθησίες των μεταλλάξεων συγκρίθηκαν με τη δοκιμασία Chi-squared (χ^2). Οι λόγοι σχετικών πιθανοτήτων (Ors) και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (95%) CIs υπολογίστηκαν με την αντίστοιχη δοκιμασία κατανομής Chi-squared. Η χρονική διάρκεια της επιβίωσης ξεκίνησε να μετρά από την ημέρα της χειρουργικής επέμβασης έως την ημέρα θανάτου ή την ημέρα της τελευταίας συνάντησης για μετεγχειρητική παρακολούθηση ή την ημέρα της τελευταίας τηλεφωνικής επικοινωνίας. Σχηματίστηκαν καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και για την εκτίμηση της επιβίωσης με τους υπό μελέτη γονοτύπους χρησιμοποιήθηκε μελέτη log-rank.

Αποτελέσματα

Στον πίνακα 6 αποτυπώνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς επίσης και τα χαρακτηριστικά του όγκου από τον οποίο πάσχουν οι υπό μελέτη ασθενείς. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών προκύπτουν τα ακόλουθα:

1. Ο συνολικός αριθμός των ασθενών που τελικά συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη ανήλθε στους 261.
2. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 61.67 έτη.
3. Σε ό,τι αφορά στην κατηγοριοποίηση των όγκων των ασθενών με βάση το μέγεθός τους (Tumor Status) οι μετρήσεις μας έδωσαν την παρακάτω εικόνα:
 - Με όγκο T0 βρέθηκαν 4 ασθενείς ή ποσοστό 1.5% των ασθενών
 - Με όγκο T1 βρέθηκαν 19 ασθενείς ή ποσοστό 7.3% των ασθενών
 - Με όγκο T2 βρέθηκαν 120 ασθενείς ή ποσοστό 46.0% των ασθενών
 - Με όγκο T3 βρέθηκαν 118 ασθενείς ή ποσοστό 45.2% των ασθενών.
4. Σε ό,τι αφορά στη διήθηση των γειτονικών λεμφαδένων (Lymph nodes) από τον καρκίνο του μαστού προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:
 - Θετικοί γειτονικοί λεμφαδένες εντοπίστηκαν σε 101 ασθενείς ή ποσοστό 38.7% των ασθενών
 - Αρνητικοί γειτονικοί λεμφαδένες βρέθηκαν σε 160 ασθενείς ή ποσοστό 61.3% των ασθενών.
5. Σε ό,τι αφορά στην ύπαρξη ή μη υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen-receptor status) βρέθηκαν τα παρακάτω:
 - Αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων βρέθηκαν 138 ασθενείς ή ποσοστό 52.9% των ασθενών
 - Θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων βρέθηκαν 25 ασθενείς ή ποσοστό 9.6% των ασθενών
 - Διπλά θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων βρέθηκαν 43 ασθενείς ή ποσοστό 16.5% των ασθενών
 - Τριπλά θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων βρέθηκαν 55 ασθενείς ή ποσοστό 21.0% των ασθενών.

6. Σε ό,τι αφορά στην ύπαρξη ή μη υποδοχέων της προγεστερόνης (Progesterone-receptor status) αποτυπώθηκε η ακόλουθη εικόνα:
- Αρνητικοί για υποδοχείς προγεστερόνης βρέθηκαν 143 ασθενείς ή ποσοστό 54.8% των ασθενών
 - Θετικοί για υποδοχείς προγεστερόνης βρέθηκαν 27 ασθενείς ή ποσοστό 10.3% των ασθενών
 - Διπλά θετικοί για υποδοχείς προγεστερόνης βρέθηκαν 31 ασθενείς ή ποσοστό 11.9% των ασθενών
 - Τριπλά θετικοί για υποδοχείς προγεστερόνης βρέθηκαν 60 ασθενείς ή ποσοστό 23.0% των ασθενών.
7. Σε ό,τι αφορά στο βαθμό διαφοροποίησης των όγκων τους (Tumor grade) για τους ασθενείς προέκυψε η παρακάτω κατηγοριοποίηση:
- Επίπεδου I ή χαμηλού επιπέδου (υψηλά διαφοροποιημένο) βρέθηκαν να είναι οι όγκοι 18 ασθενών ή ποσοστού 6.9% των ασθενών
 - Επίπεδου II ή ενδιάμεσου/ μετρίου επιπέδου (μέτρια/ ενδιάμεσα διαφοροποιημένο) βρέθηκαν να είναι οι όγκοι 151 ασθενών ή ποσοστού 57.9% των ασθενών
 - Επίπεδου III ή υψηλού επιπέδου (χαμηλά διαφοροποιημένο) βρέθηκαν να είναι οι όγκοι 92 ασθενών ή ποσοστού 35,2% των ασθενών.
8. Σε ό,τι αφορά στην εφαρμογή ή μη χημειοθεραπείας (chemotherapy) η στατιστική ανάλυση των παρατηρήσεων απέδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:
- 225 ασθενείς ή ποσοστό 86.2% των ασθενών υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία
 - 36 ασθενείς ή ποσοστό 13.8% των ασθενών δεν υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία.
9. Σε ό,τι αφορά στην εφαρμογή ή μη ακτινοθεραπείας (Radiotherapy) τα αντίστοιχα αποτελέσματα ήταν τα παρακάτω:
- 58 ασθενείς ή ποσοστό 22.2% των ασθενών υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία
 - 203 ασθενείς ή ποσοστό 77.78% των ασθενών δεν υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία
10. Τέλος, σε ό,τι αφορά στην ανάλυση της επιβίωσης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής παρακολούθησης (Survival over the follow-up) των ασθενών προέκυψαν τα εξής:
- 242 ασθενείς ή ποσοστό 92.7% των ασθενών επέζησαν κατά το χρονικό διάστημα της μετεγχειρητικής παρακολούθησης ενώ

- 19 ασθενείς ή ποσοστό 7.3% των ασθενών απεβίωσαν κατά το χρονικό διάστημα που διήρκεσε η μετεγχειρητική τους παρακολούθηση.

Πολυμορφισμοί κασπάσης-9

Στον πίνακα 7 έχει καταγραφεί συνολικά η κατανομή των γονοτύπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού rs4645978 της κασπάσης-9 τόσο στις περιπτώσεις των ασθενών όσο και στις περιπτώσεις της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων.

1. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των γονοτύπων αποτυπώθηκε η παρακάτω εικόνα:
 - Γονότυπο AA είχαν 41 ασθενείς ή ποσοστό 15.71% των ασθενών καθώς και 110 μάρτυρες ή ποσοστό 22.92% της ομάδας των μαρτύρων. Ο λόγος των σχετικών πιθανοτήτων ήταν $OR=1.00$ και οι τιμές του συγκεκριμένου γονοτύπου τέθηκαν ως τιμές αναφοράς για τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (95% CI).
 - Γονότυπο ετερόζυγο για τον υπό μελέτη πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυπο AG, είχαν 111 ασθενείς ή ποσοστό 42.53% των ασθενών και 240 μάρτυρες ή ποσοστό 50.00% της ομάδας των μαρτύρων. Η τιμή του p υπολογίστηκε σε $p=0.342$, η τιμή $OR=1.24$ και $95\% CI=0.81-1.89$.
 - Γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυπο GG, είχαν 109 ασθενείς ή ποσοστό 41.76% των ασθενών και 130 μάρτυρες ή ποσοστό 27.08% της ομάδας των μαρτύρων. Η τιμή του p υπολογίστηκε σε $p=0.0003$ και οι τιμές $OR=2.25$ και $95\% CI=1.45-3.49$.
 - Το άθροισμα των γονοτύπων που έφεραν τον πολυμορφισμό, δηλαδή άτομα με γονότυπο AG αθροιζόμενα με τα άτομα με γονότυπο GG, ήταν 220 ασθενείς ή ποσοστό 84.29% των ασθενών και 370 μάρτυρες ή ποσοστό 77.08% της ομάδας των μαρτύρων. Στην περίπτωση αυτή είχαμε $p=0.022$, $OR=1.59$ και $95\% CI=1.07-2.37$.
 - Το σύνολο των γονοτύπων για τους ασθενείς ήταν 261 και το αντίστοιχο σύνολο για την ομάδα ελέγχου των μαρτύρων ήταν 480 γονότυποι.
2. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των αλληλόμορφων βρέθηκαν τα παρακάτω:
 - Το A αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε 193 περιπτώσεις της ομάδας των ασθενών ή σε ποσοστό 36.97% του συνόλου των αλληλόμορφων «A+G» της ομάδας των ασθενών. Το ίδιο αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε 460 περιπτώσεις της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων ή σε

ποσοστό 47.92% του ίδιου συνόλου της ομάδας των μαρτύρων. Εδώ OR=1.00 και τιμή αναφοράς για τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας (CI).

- Το G αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε 329 περιπτώσεις της ομάδας των ασθενών ή σε ποσοστό 63.03% του συνόλου των αλληλόμορφων της ομάδας των ασθενών. Το ίδιο αλληλόμορφο εντοπίστηκε 500 φορές στην ομάδα των μαρτύρων ή σε ποσοστό 52.08% του ίδιου συνόλου της ομάδας των μαρτύρων. Οι μετρούμενες τιμές ήταν $p < 0.0001$, OR=1.57 και 95% CI=1.26-1.95.
- Το σύνολο των αλληλόμορφων «A+G» στην ομάδα των ασθενών ήταν 522 αλληλόμορφα, ενώ το αντίστοιχο σύνολο στην ομάδα των μαρτύρων ελέγχου ήταν τα 960 αλληλόμορφα.

Συνοπτικά, αν θέλαμε να κάνουμε μια παρατήρηση πάνω στα αξιοσημείωτα που προκύπτουν από τις παραπάνω παρατηρήσεις θα λέγαμε ότι η συχνότητα του rs4645978 G αλληλόμορφου της κασπάσης-9 ήταν χαμηλότερη στην ομάδα των μαρτύρων σε σύγκριση με την ομάδα των ασθενών. Τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 52.08% και 63.03%, ενώ οι τιμές του $p < 0.0001$. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι οι φορείς του αλληλόμορφου G, δηλαδή εκείνοι που είχαν γονότυπο AG και GG, εμφάνισαν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τα άτομα με άλλους γονοτύπους (OR 1.59, 95% CI 1.07-2.37, $p = 0.022$). Ο γονότυπος GG συσχετίστηκε με τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (OR 2.25, 95% CI 1.45-3.49, $p = 0.0003$).

Στον πίνακα 8 έχει καταγραφεί συνολικά η συχνότητα των γονοτύπων και των αλληλόμορφων τόσο στην ομάδα των ασθενών όσο και στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων σε ό,τι αφορά στον πολυμορφισμό rs4645981 της κασπάσης-9.

1. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των γονοτύπων παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

- Γονότυπο CC, δηλαδή γονότυπο χωρίς πολυμορφισμό, είχαν 137 ασθενείς ή ποσοστό 52.49% της ομάδας των ασθενών και 361 μάρτυρες ή ποσοστό 75.21% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. Οι μετρηθείσες τιμές ήταν $p < 0.0001$, OR=1.00 και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας CI είχαν αυτή ως τιμή αναφοράς τους.
- Γονότυπο ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυπο CT, είχαν 112 ασθενείς ή ποσοστό 42.91% της ομάδας των ασθενών και 111 μάρτυρες ή 23.12% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. Εδώ, είχαμε $p = 0.004$, OR=2.66 και 95% CI=1.91-3.69.

- Γονότυπο ομόζυγο για τον πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυπο TT, είχαν 12 ασθενείς ή 4.60% της ομάδας των ασθενών και 8 μάρτυρες ή ποσοστό 1.67% της ομάδας των μαρτύρων. Οι τιμές: $p < 0.0001$, $OR = 3.95$, 95% $CI = 1.58-9.88$.
- Το άθροισμα των ατόμων με γονότυπο που έφεραν τον πολυμορφισμό, δηλαδή άτομα με γονότυπο CT αθροιζόμενα με τα άτομα με γονότυπο TT, ήταν 124 ή ποσοστό 47.51% από την ομάδα των ασθενών και 119 ή ποσοστό 24.79% από την ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. Τιμές $OR = 2.75$, 95% $CI = 1.99-3.78$.

2. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των αλληλόμορφων, έγιναν οι εξής μετρήσεις:

- Το C αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε 386 περιπτώσεις ή σε ποσοστό 73.95% του συνόλου των αλληλόμορφων «C+T» της ομάδας των ασθενών. Το ίδιο αλληλόμορφο ανευρέθηκε 833 φορές ή σε ποσοστό 86.77% του ίδιου συνόλου της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. $P < 0.0001$, $OR = 1.00$ και τιμή αναφοράς για τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας CI .
- Το T αλληλόμορφο εντοπίστηκε σε 136 περιπτώσεις ή σε ποσοστό 26.05% του συνόλου των αλληλόμορφων «C+T» της ομάδας των ασθενών. Το ίδιο αλληλόμορφο βρέθηκε 127 φορές ή σε ποσοστό 13.23% του ίδιου συνόλου της ομάδας των μαρτύρων. $OR = 2.31$, 95% $CI = 1.74-3.03$.
- Το σύνολο των αλληλόμορφων «C+T» στην ομάδα των ασθενών μετρήθηκε 522, ενώ το ίδιο σύνολο στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων ήταν 960.

Ο δεύτερος υπό μελέτη πολυμορφισμός της κασπάσης-9, δηλαδή ο rs4645981, εκδήλωσε ακόμα πιο ισχυρή συσχέτιση με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Τα άτομα με τουλάχιστον ένα rs4645981 T αλληλόμορφο, δηλαδή εκείνα που είχαν γονότυπο CT και TT, εμφάνισαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με εκείνα τα άτομα που έφεραν το γονότυπο CC ($OR = 2.75$, 95% $CI = 1.99-3.78$, $p < 0.0001$). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνονταν τα rs4645981 T αλληλόμορφα, τόσο αυξανόταν και ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, για το γονότυπο CT ο OR ήταν 2.66 και τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας 1.91-3.69 με τιμή $p < 0.0001$, ενώ για το γονότυπο TT οι αντίστοιχες τιμές ήταν $OR = 3.95$, 95% $CI = 1.59-9.88$, $p = 0.004$. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στους απλότυπους των ασθενών και των υγιών ατόμων.

Κατόπιν, προχωρήσαμε σε ανάλυση των χαρακτηριστικών του όγκου και δεν παρατηρήσαμε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις συχνότητες των αλληλόμορφων, των γονοτύπων και των απλοτύπων της κασπάσης-9 και των υπό εξέταση παραμέτρων στον πίνακα 6. Δε διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση της ηλικίας, όταν αυτή λογίστηκε ως ανεξάρτητη

μεταβλητή, πάνω στα χαρακτηριστικά του όγκου όταν εφαρμόστηκε η μέθοδος της ανάστροφης σταδιακής ανάλυσης παλινδρόμησης.

Πολυμορφισμός του SDF-1, SDF-1-3' A

Στον πίνακα 9 φαίνονται οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλόμορφων τόσο στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού όσο και στην ομάδα των υγιών ατόμων της ομάδας ελέγχου σε ό,τι αφορά στον πολυμορφισμό SDF-1-3' A του SDF-1. Από την ανάλυση των παρατηρήσεων αυτών προκύπτουν τα ακόλουθα:

1. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των γονοτύπων:

- Φυσιολογικό για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο GG, είχαν 114 ασθενείς ή ποσοστό 43.7% της ομάδας των ασθενών και 247 μάρτυρες ή ποσοστό 51.5% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. Ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ίσος με 1.00 και η τιμή των 95% διαστημάτων αξιοπιστίας CI τέθηκε ως τιμή αναφοράς.
- Ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο GA, είχαν 118 ασθενείς ή ποσοστό 45.2% της ομάδας των ασθενών και 198 μάρτυρες ή ποσοστό 41.3% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.12$, $OR=1.29$ και $95\% CI=0.94-1.78$.
- Ομόζυγο για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο AA, είχαν 29 ασθενείς ή ποσοστό 11.1% της ομάδας των ασθενών και 35 μάρτυρες ή ποσοστό 7.3% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.03$, $OR=1.80$ και $95\% CI=1.05-3.08$.
- Το άθροισμα των γονοτύπων που έφεραν τον πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυποι GA αθροιζόμενοι με τους γονοτύπους AA, ήταν 147 ή ποσοστό 56.3% στην ομάδα των ασθενών και 233 ή ποσοστό 48.5% στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.04$, $OR=1.37$ και $95\%CI=1.01-1.85$.

2. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των αλληλόμορφων, οι αντίστοιχες μετρήσεις απέδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:

- Το αλληλόμορφο G εμφανίστηκε 346 φορές ή σε ποσοστό 66.3% του συνόλου των αλληλόμορφων στην ομάδα των ασθενών και 692 φορές ή σε ποσοστό 72.1% του ίδιου συνόλου στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $OR=1.00$ και τιμή αναφοράς για τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας CI.

- Το αλληλόμορφο A εμφανίστηκε 176 φορές ή σε ποσοστό 33.7% του συνόλου των αλληλόμορφων στην ομάδα των ασθενών και 268 φορές ή σε ποσοστό 27.9% του ίδιου συνόλου στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.02$, $OR=1.31$ και $95\% CI=1.04-1.65$.

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε μια υπερέκφραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού σε σχέση με τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου. Αυτό φαίνεται αν παραθέσουμε και το λόγο σχετικών πιθανοτήτων για τη συγκεκριμένη σύγκριση $OR=1.31$ με τιμή $p=0.020$. Αν γίνουμε ακόμα πιο συγκεκριμένοι, θα λέγαμε ότι ο γονότυπος AA συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντικό λόγο σχετικών πιθανοτήτων για την εκδήλωση καρκίνου του μαστού, ο οποίος κυμαίνεται στην τάξη του 1.80 με τιμή $p=0.032$.

Παρά το γεγονός ότι, παρατηρώντας τις στατιστικές μετρήσεις που αφορούν στο γονότυπο GA δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του συγκεκριμένου γονοτύπου με υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, ωστόσο αν αθροίσουμε τις ίδιες μετρήσεις για το συνδυασμό του γονοτύπου GA με το γονότυπο AA προκύπτει στατιστικά σημαντικός λόγος πιθανοτήτων της τάξης του 1.37 με τιμή $p=0.043$. Η αντίστοιχη τιμή, όταν μετρήθηκαν μόνο τα περιστατικά με γονότυπο GA ήταν $OR=1.29$ και τιμή $p=0.115$.

Ανεξαρτήτως, πάντως, των συσχετίσεων ή μη που αναφέρθηκαν, καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δε διαπιστώθηκε ανάμεσα στους υπό εξέταση γονοτύπους του SDF-1 και στις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους που παρατίθενται στον πίνακα 11. Σύμφωνα με τον πίνακα αυτό προκύπτουν τα ακόλουθα:

1. Υπήρχαν στη μελέτη μας 83 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι είχαν ηλικία μεγαλύτερη από τα 70 έτη. Από αυτούς 39 ή ποσοστό 46.9% είχαν γονότυπο GG, 36 η ποσοστό 43.3% είχαν γονότυπο GA και 8 ή ποσοστό 9% είχαν γονότυπο AA. Από τους υπόλοιπους 178 ασθενείς που ήταν ηλικίας μικρότερης των 70 ετών, 75 ή ποσοστό 42.1% είχαν γονότυπο GG, 82 ή ποσοστό 46% είχαν γονότυπο GA και 21 ή ποσοστό 11.7% είχαν γονότυπο AA. Η τιμή του p στην περίπτωση αυτή μετρήθηκε $p=0.423$.
2. Από τους 4 ασθενείς με όγκο T0, 2 ή ποσοστό 50% είχαν γονότυπο GG, άλλοι 2 ή ποσοστό 50% είχαν γονότυπο GA, ενώ κανείς δε βρέθηκε με γονότυπο AA. Από τους 19 ασθενείς με όγκο T1, 10 ή ποσοστό 52.6% είχαν γονότυπο GG, 5 ή ποσοστό 26.3% είχαν γονότυπο GA και 4 ή ποσοστό 21% είχαν γονότυπο AA. Από τους 120 ασθενείς με όγκο T2, 57 ή ποσοστό 47.5% είχαν γονότυπο GG, 52 ή ποσοστό 43.3% είχαν γονότυπο GA και 11 ή ποσοστό 9.1% είχαν γονότυπο AA. Τέλος, από τους 118 ασθενείς με όγκο T3, 45 ασθενείς ή ποσοστό 38.1%

- είχαν γονότυπο GG, 59 ή ποσοστό 50% είχαν γονότυπο GA και 14 ή ποσοστό 11.8% είχαν γονότυπο AA. Εδώ η τιμή του p μετρήθηκε $p=0.559$.
3. Από τους 161 ασθενείς χωρίς διηθημένους γειτονικούς λεμφαδένες, 71 ή ποσοστό 44% είχαν γονότυπο GG, 78 ή ποσοστό 48.4% είχαν γονότυπο GA και 12 ή ποσοστό 7.4% είχαν γονότυπο AA. Από τους 100 ασθενείς με διηθημένους γειτονικούς λεμφαδένες, 43 ή ποσοστό 43% είχαν γονότυπο GG, 40 ή ποσοστό 40% είχαν γονότυπο GA και 17 ή ποσοστό 17% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.963$.
 4. Από τους 18 ασθενείς με υψηλή διαφοροποίηση, 8 ή ποσοστό 44.4% είχαν γονότυπο GG, 7 ή ποσοστό 38.8% είχαν γονότυπο GA και 3 ή ποσοστό 16.6% είχαν γονότυπο AA. Από τους 151 ασθενείς με μέτρια διαφοροποίηση, 65 ή ποσοστό 43% είχαν γονότυπο GG, 68 ή ποσοστό 45% είχαν γονότυπο GA και 18 ή ποσοστό 12% είχαν γονότυπο AA. Από τους 92 ασθενείς με χαμηλή διαφοροποίηση, 41 ή ποσοστό 44.5% είχαν γονότυπο GG, 43 ή ποσοστό 46.7% είχαν γονότυπο GA και 8 ή ποσοστό 8.6% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.9342$.
 5. Από τους 138 ασθενείς τους αρνητικούς για υποδοχείς οιστρογόνων, 62 ή ποσοστό 44.9% είχαν γονότυπο GG, 65 ή ποσοστό 47.1% είχαν γονότυπο GA και 11 ή ποσοστό 7.9% είχαν γονότυπο AA. Από τους 25 θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων ασθενείς, 13 ή ποσοστό 52% είχαν γονότυπο GG, 9 ή ποσοστό 36% είχαν γονότυπο GA και 3 ή ποσοστό 12% είχαν γονότυπο AA. Από τους 43 ασθενείς τους διπλά θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων, 19 ή ποσοστό 44.1% είχαν γονότυπο GG, 17 ή ποσοστό 39.5% είχαν γονότυπο GA και 7 ή ποσοστό 16.2% είχαν γονότυπο AA. Από τους 55 τριπλά θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων ασθενείς, 20 ή ποσοστό 36.3% είχαν γονότυπο GG, 27 ή ποσοστό 49.2% είχαν γονότυπο GA και 8 ή ποσοστό 14.5% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.759$.
 6. Από τους 143 αρνητικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, 60 ή ποσοστό 41.9% είχαν γονότυπο GG, 70 ή ποσοστό 48.9% είχαν γονότυπο GA και 13 ή ποσοστό 9% είχαν γονότυπο AA. Από τους 27 ασθενείς τους θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης, 12 ή ποσοστό 44.4% είχαν γονότυπο GG, 10 ή ποσοστό 37% είχαν γονότυπο GA και 5 ή ποσοστό 18.6% είχαν γονότυπο AA. Από τους 31 διπλά θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, 18 ή ποσοστό 58% είχαν γονότυπο GG, 9 ή ποσοστό 29% είχαν γονότυπο GA και 4 ή ποσοστό 13% είχαν γονότυπο AA. Τέλος, από τους 60 τριπλά θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, 24 ή ποσοστό 40% είχαν γονότυπο GG, 29 ή ποσοστό 48.3% είχαν γονότυπο GA και 7 ή ποσοστό 11.7% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.623$.

7. Από τους 225 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία, 97 ή ποσοστό 43.1% είχαν γονότυπο GG, 102 ή ποσοστό 48.9% είχαν γονότυπο GA και 26 ή ποσοστό 11.5% είχαν γονότυπο AA. Από τους 36 ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία, 17 ή ποσοστό 47.2% είχαν γονότυπο GG, 16 ή ποσοστό 44.4% είχαν γονότυπο GA και τέλος 3 ή ποσοστό 8.4% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.587$.
8. Τέλος, από τους 58 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία, 26 ή ποσοστό 44.8% είχαν γονότυπο GG, 27 ή ποσοστό 46.5% είχαν γονότυπο GA και 5 ή ποσοστό 8.7% είχαν γονότυπο AA. Από τους 203 ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία, 88 ή ποσοστό 43.3% είχαν γονότυπο GG, 91 ή ποσοστό 44.8% είχαν γονότυπο GA και 24 ή ποσοστό 11.9% είχαν γονότυπο AA. Τιμή $p=0.8813$.

Σε μια προσεκτική ανάλυση της καμπύλης επιβίωσης Kaplan-Meier για τους γονοτύπους τους φυσιολογικούς και τους φέροντες τον πολυμορφισμό προκύπτει ότι ο γονότυπος ο ετερόζυγος για τον πολυμορφισμό, δηλαδή ο GA, προκαλεί ελάχιστη επίδραση στη συνολική επιβίωση. Φαίνεται τα άτομα αυτά να εμφανίζουν μια πτώση της τάξης του 10% τους πρώτους 50 μήνες μετεγχειρητικής παρακολούθησης και 20% τους υπόλοιπους μήνες. Ο γονότυπος ο ομόζυγος για τον πολυμορφισμό, δηλαδή ο γονότυπος AA, προκαλεί απειροελάχιστη πτώση της επιβίωσης της τάξης του 10-15% τους πρώτους 70 μήνες και κατακόρυφη πτώση στο μισό σχεδόν τους υπόλοιπους μήνες.

Πολυμορφισμός S128R της E-σελεκτίνης

Στον πίνακα 10 φαίνονται οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλόμορφων τόσο στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού όσο και στην ομάδα των υγιών ατόμων της ομάδας ελέγχου σε ό,τι αφορά στον πολυμορφισμό S128R της E-σελεκτίνης. Από την ανάλυση των παρατηρήσεων αυτών προκύπτουν τα ακόλουθα:

1. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των γονοτύπων:
 - Φυσιολογικό για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο AA, είχαν 153 ασθενείς ή ποσοστό 58.6% της ομάδας των ασθενών και 311 μάρτυρες ή ποσοστό 64.8% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. Ο λόγος σχετικών πιθανοτήτων ίσος με 1.00 και η τιμή των 95% διαστημάτων αξιοπιστίας CI τέθηκε ως τιμή αναφοράς.

- Ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο AC, είχαν 100 ασθενείς ή ποσοστό 38.3% της ομάδας των ασθενών και 151 μάρτυρες ή ποσοστό 31.4% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.07$, $OR=1.35$ και $95\% CI=0.98-1.85$.
 - Ομόζυγο για τον πολυμορφισμό γονότυπο, δηλαδή γονότυπο CC, είχαν 8 ασθενείς ή ποσοστό 3.1% της ομάδας των ασθενών και 18 μάρτυρες ή ποσοστό 3.8% της ομάδας ελέγχου των μαρτύρων. $p=1.00$, $OR=0.90$ και $95\% CI=0.95-1.77$.
 - Το άθροισμα των γονοτύπων που έφεραν τον πολυμορφισμό, δηλαδή γονότυποι AC αθροιζόμενοι με τους γονοτύπους CC, ήταν 108 ή ποσοστό 41.4% στην ομάδα των ασθενών και 169 ή ποσοστό 35.2% στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.11$, $OR=1.30$ και $95\% CI=0.95-1.77$.
2. Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των αλληλόμορφων, οι αντίστοιχες μετρήσεις απέδωσαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:
- Το αλληλόμορφο A εμφανίστηκε 406 φορές ή σε ποσοστό 77.8% του συνόλου των αλληλόμορφων στην ομάδα των ασθενών και 773 φορές ή σε ποσοστό 80.5% του ίδιου συνόλου στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $OR=1.00$ και τιμή αναφοράς για τα 95% διαστήματα αξιοπιστίας CI.
 - Το αλληλόμορφο C εμφανίστηκε 116 φορές ή σε ποσοστό 22.2% του συνόλου των αλληλόμορφων στην ομάδα των ασθενών και 187 φορές ή σε ποσοστό 19.5% του ίδιου συνόλου στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων. $p=0.21$, $OR=1.18$ και $95\% CI=0.91-1.53$.

Σε σχέση με τον εν λόγω πολυμορφισμό η ανάλυση των αποτελεσμάτων κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι παρά το γεγονός ότι η διαφορά συχνότητας του γονοτύπου AC ήταν πιο έκδηλη με λόγο σχετικών πιθανοτήτων $OR=1.35$ με τιμή $p=0.067$, ωστόσο καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ασθενείς και στα άτομα της ομάδας ελέγχου. Η διαπίστωση δε αυτή καλύπτει τόσο την περίπτωση της συχνότητας των αλληλόμορφων όσο και την περίπτωση της συχνότητας των γονοτύπων.

Στην ανάλυση επιβίωσης, που ακολούθησε, βρέθηκε ότι ο γονότυπος CC συσχετίζεται με χαμηλότερη συνολικά επιβίωση. Η παρατήρηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική όταν ο συγκεκριμένος γονότυπος συγκρίθηκε και με ομόζυγα μη-πολυμορφικά άτομα, δηλαδή με γονότυπο AA, όπου η τιμή του p ήταν ίση με 0.008, όσο και με ετερόζυγα AC άτομα ($p=0.002$).

Παρόλα αυτά και στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό, όπως και στον SDF-1-3' A, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στους γονότυπους του πολυμορφισμού και τις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους.

1. Από τους 83 ασθενείς με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι είχαν ηλικία μεγαλύτερη από τα 70 έτη, 46 ή ποσοστό 55.4% είχαν γονότυπο AA, 35 ή ποσοστό 42.1% είχαν γονότυπο AC και 2 ή ποσοστό 2.4% είχαν γονότυπο CC. Από τους υπόλοιπους 178 ασθενείς που ήταν ηλικίας μικρότερης των 70 ετών, 107 ή ποσοστό 60.1% είχαν γονότυπο AA, 65 ή ποσοστό 36.5% είχαν γονότυπο AC και 6 ή ποσοστό 3.3% είχαν γονότυπο CC. Η τιμή του p στην περίπτωση αυτή μετρήθηκε $p=0.501$.
2. Από τους 4 ασθενείς με όγκο T0, 3 ή ποσοστό 75% είχαν γονότυπο AA, άλλος 1 ή ποσοστό 25% είχε γονότυπο AC, ενώ κανείς δε βρέθηκε με γονότυπο CC. Από τους 19 ασθενείς με όγκο T1, 11 ή ποσοστό 57.8% είχαν γονότυπο AA, 6 ή ποσοστό 31.5% είχαν γονότυπο AC και 2 ή ποσοστό 10.5% είχαν γονότυπο CC. Από τους 120 ασθενείς με όγκο T2, 70 ή ποσοστό 58.3% είχαν γονότυπο AA, 48 ή ποσοστό 40% είχαν γονότυπο AC και 2 ή ποσοστό 1.6% είχαν γονότυπο CC. Τέλος, από τους 118 ασθενείς με όγκο T3, 69 ασθενείς ή ποσοστό 58.4% είχαν γονότυπο AA, 45 ή ποσοστό 38.1% είχαν γονότυπο AC και 4 ή ποσοστό 3.3% είχαν γονότυπο CC. Εδώ η τιμή του p μετρήθηκε $p=0.965$.
3. Από τους 161 ασθενείς χωρίς διηθημένους γειτονικούς λεμφαδένες, 91 ή ποσοστό 56.5% είχαν γονότυπο AA, 67 ή ποσοστό 41.6% είχαν γονότυπο AC και 3 ή ποσοστό 1.8% είχαν γονότυπο CC. Από τους 100 ασθενείς με διηθημένους γειτονικούς λεμφαδένες, 62 ή ποσοστό 62% είχαν γονότυπο AA, 33 ή ποσοστό 33% είχαν γονότυπο AC και 5 ή ποσοστό 5% είχαν γονότυπο CC. Τιμή $p=0.456$.
4. Από τους 18 ασθενείς με υψηλή διαφοροποίηση, 8 ή ποσοστό 44.4% είχαν γονότυπο AA, 9 ή ποσοστό 50% είχαν γονότυπο AC και 1 ή ποσοστό 5.6% είχε γονότυπο CC. Από τους 151 ασθενείς με μέτρια διαφοροποίηση, 90 ή ποσοστό 59.6% είχαν γονότυπο AA, 56 ή ποσοστό 37.1% είχαν γονότυπο AC και 5 ή ποσοστό 3.3% είχαν γονότυπο CC. Από τους 92 ασθενείς με χαμηλή διαφοροποίηση, 55 ή ποσοστό 59.7% είχαν γονότυπο AA, 34 ή ποσοστό 36.9% είχαν γονότυπο AC και 3 ή ποσοστό 3.2% είχαν γονότυπο CC. Τιμή $p=0.881$.
5. Από τους 138 ασθενείς τους αρνητικούς για υποδοχείς οιστρογόνων, 78 ή ποσοστό 56.5% είχαν γονότυπο AA, 55 ή ποσοστό 39.8% είχαν γονότυπο AC και 5 ή ποσοστό 3.6% είχαν γονότυπο CC. Από τους 25 θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων ασθενείς, 19 ή ποσοστό 76% είχαν γονότυπο AA, 4 ή ποσοστό 16% είχαν γονότυπο AC και 2 ή ποσοστό 8% είχαν γονότυπο CC.

Από τους 43 ασθενείς τους διπλά θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων, 25 ή ποσοστό 58.1% είχαν γονότυπο AA, 17 ή ποσοστό 39.5% είχαν γονότυπο AC και 1 ή ποσοστό 2.3% είχε γονότυπο CC. Από τους 55 τριπλά θετικούς για υποδοχείς οιστρογόνων ασθενείς, 31 ή ποσοστό 56.3% είχαν γονότυπο AA, 24 ή ποσοστό 43.7% είχαν γονότυπο AC και κανείς δεν είχε γονότυπο AA. Τιμή $p=0.546$.

6. Από τους 143 αρνητικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, 79 ή ποσοστό 55.2% είχαν γονότυπο AA, 61 ή ποσοστό 42.7% είχαν γονότυπο AC και 3 ή ποσοστό 2.1% είχαν γονότυπο CC. Από τους 27 ασθενείς τους θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης, 20 ή ποσοστό 74% είχαν γονότυπο AA, 6 ή ποσοστό 22.2% είχαν γονότυπο AC και 1 ή ποσοστό 3.8% είχε γονότυπο CC. Από τους 31 διπλά θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, 16 ή ποσοστό 51.6% είχαν γονότυπο AA, 12 ή ποσοστό 38.7% είχαν γονότυπο AC και 3 ή ποσοστό 9.6% είχαν γονότυπο CC. Τέλος, από τους 60 τριπλά θετικούς για υποδοχείς προγεστερόνης ασθενείς, οι ή ποσοστό 63.3% είχαν γονότυπο AA, 21 ή ποσοστό 35% είχαν γονότυπο AC και 1 ή ποσοστό 1.67% είχαν γονότυπο CC. Τιμή $p=0.238$.
7. Από τους 225 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία, 133 ή ποσοστό 59.1% είχαν γονότυπο AA, 84 ή ποσοστό 37.3% είχαν γονότυπο AC και 8 ή ποσοστό 3.6% είχαν γονότυπο CC. Από τους 36 ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπεία, 20 ή ποσοστό 55.5% είχαν γονότυπο AA, 16 ή ποσοστό 44.4% είχαν γονότυπο AC και τέλος κανείς δεν είχε γονότυπο CC. Τιμή $p=0.717$.
8. Τέλος, από τους 58 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία, 28 ή ποσοστό 48.2% είχαν γονότυπο AA, 29 ή ποσοστό 50% είχαν γονότυπο AC και 1 ή ποσοστό 1.8% είχαν γονότυπο CC. Από τους 203 ασθενείς που δεν υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία, 125 ή ποσοστό 61.6% είχαν γονότυπο AA, 71 ή ποσοστό 34.9% είχαν γονότυπο AC και 7 ή ποσοστό 3.5% είχαν γονότυπο CC. Τιμή $p=0.095$.

Συζήτηση

Ένα μέρος του σκοπού της παρούσας μελέτης υπήρξε η διερεύνηση της συσχέτισης ανάμεσα στους πολυμορφισμούς rs4645978 και rs4645981 της κασπάσης-9 και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Όσον αφορά τον πολυμορφισμό rs4645978, φάνηκε ότι οι φορείς του αλληλόμορφου G, δηλαδή τα άτομα με γονοτύπους AG και GG, βρίσκονταν σε υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού σε σχέση με τα άτομα με διαφορετικούς γονοτύπους. Το εύρημα αυτό αποτέλεσε

έκπληξη για εμάς καθώς από τις μελέτες που είχαμε παρακολουθήσει πριν από τη διενέργεια της δικής μας, υπήρχε αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη του G αλληλόμορφου και την ανάπτυξη όγκων σε διάφορα όργανα.

Πραγματικά, στη μελέτη Λιαμαρκόπουλου και συνεργατών το 2011, σκοπός της ήταν η διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών CASP8 -652 6 Nins/del της κασπάσης-8 και CASP9 -1263 A>G της κασπάσης-9 με την προδιάθεση στην ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου. Προς τούτο οι ερευνητές μελέτησαν 88 περιπτώσεις ασθενών με γαστρικό καρκίνο και 480 άτομα ελέγχου. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο πολυμορφισμός CASP8 -652 6 Nins/del της κασπάσης-8 και ο γονότυπος CASP9 -1263 GG συσχετιζόνταν σημαντικά με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου. Οι δύο πολυμορφισμοί μπορεί να μην είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα χαρακτηριστικά του όγκου, ωστόσο φαίνεται ότι συνέβαλαν στην αυξημένη συνολική επιβίωση στους ασθενείς με γαστρικό καρκίνο. Σε μια άλλη μελέτη ινδικής προέλευσης, συνέκριναν 175 περιπτώσεις ιστολογικά επιβεβαιωμένου καρκίνου του προστάτη με 198 υγιείς μάρτυρες. Τα αποτελέσματά τους ανέδειξαν το γεγονός ότι η ύπαρξη του CASP9-1263 G αλληλόμορφου συνοδευόταν με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη (λόγος σχετικών πιθανοτήτων OR=2.28, 95% CI 1.14-4.53, p=0.02). Η ίδια, βέβαια, έρευνα επεσήμανε την παρατήρηση ότι η παρουσία του ίδιου αλληλόμορφου αυξάνει την πιθανότητα οστικής μετάστασης του καρκίνου του προστάτη. Σε μια άλλη μελέτη το 2009, επίσης ινδικής προέλευσης, με 212 ασθενείς με καρκίνο ουροδόχου κύστεως και 250 μάρτυρες ελέγχου, ο γονότυπος CASP9-1263 GG ήταν σε μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστεως (OR=0.487, p=0.010).

Ο προστατευτικός αυτός ρόλος έχει αποδοθεί στην ενισχυμένη ικανότητα μεταγραφής του γονιδίου, καθώς εργαστηριακές εκθέσεις έχουν δείξει ότι οι γονότυποι GG ήταν μεγαλύτεροι παραγωγοί αγγελιαφόρου RNA σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο γονότυπο ²⁴⁶. Το 2011 οι Θεοδωρόπουλος και συνεργάτες μελέτησαν 402 ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο και τους συνέκριναν με 480 υγιείς μάρτυρες. Το CASP9-1263 G αλληλόμορφο συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ορθοκολικού καρκίνου και ο γονότυπος CASP9-1263 GG είχε συνολικά μεγαλύτερη χρονική διάρκεια επιβίωσης. Επίσης, στην ίδια μελέτη μετρήθηκε ότι οι ομοζυγώτες για το 1263 GG CASP9 γονότυπο και οι ετεροζυγώτες για το 1263 AG γονότυπο εξέφρασαν αντίστοιχα 6.64 και 3.69 φορές υψηλότερα επίπεδα αγγελιαφόρου RNA κασπάσης-9 σε σχέση με τις περιπτώσεις του γονότυπου 1263 AA.

Μια εξήγηση από λειτουργικής απόψεως μπορεί να εδράζεται στο γεγονός ότι η rs4645978 A-σε-G μετάβαση οδηγεί στη δημιουργία μιας επιπλέον θέσης πρόσδεσης μεταγραφικού παράγοντα. Στη

δική μας μελέτη, αυτή η επιπλέον θέση φαίνεται ότι έχει αντίθετη επίδραση σε σχέση με προηγούμενες μελέτες για καρκίνους σε άλλα όργανα πλην του μαστού. Άλλη μελέτη του 2006 είχε ως σκοπό να διερευνήσει τη συσχέτιση πολυμορφισμών της κασπάσης-9 με τον καρκίνο του πνεύμονα σε κορεατικό πληθυσμό. Ο γονότυπος 1263 GG βρέθηκε ότι είχε μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα συγκρινόμενος με το γονότυπο 1263 AA ή το συνδυασμό των γονοτύπων AA+AG (προσαρμοσμένες τιμές OR=0.64, 95% CI 0.42-0.98, p=0.04 και OR=0.67, 95% CI=0.46-0.97, p=0.01 αντίστοιχα).

Το 2012, οι Wang YX και συνεργάτες μελέτησαν 118 ασθενείς και 213 άτομα ελέγχου σε πληθυσμό της Κίνας και βρήκαν ότι τα άτομα με CASP9 rs4645978 GG γονότυπο ήταν πιο επιρρεπή σε ανάπτυξη θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς (OR=1.12, p=0.045). Ομοίως, στη δική μας μελέτη, ο GG γονότυπος ήταν ο γονότυπος με τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (OR=2.25, 95% CI=1.45-3.49, p=0.0003). Κατά την άποψή μας, αυτή η αναντιστοιχία θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφόρων ιστών. Η παρουσία ενός μεταγραφικού παράγοντα ειδικού για το συγκεκριμένο ιστό, ο οποίος μπορεί να προσδεθεί σε μια ειδική θέση και να δράσει σαν καταστολέας της διαδικασίας της μεταγραφής ή ακόμα, υποθετικά μιλώντας, ειδικές για κάθε ιστό παραλλαγές του μεταγραφικού παράγοντα θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν τη συνάφεια του με τη θέση πρόσδεσης ή με άλλους αλληλεπιδρώντες μεταγραφικούς παράγοντες, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο αλλαγή στην ισορροπία του βασικού συστήματος της μεταγραφής προς την κατεύθυνση της μειωμένης μεταγραφής.

Ο δεύτερος πολυμορφισμός (rs4645981) της κασπάσης-9 που μελετήσαμε έδειξε ισχυρή συσχέτιση με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ο συγκεκριμένος κίνδυνος φάνηκε ότι αυξάνεται με την αύξηση των αριθμών των rs4645981 T αλληλόμορφων (OR=2.66, 95% CI 1.91-3.69, p<0.0001 για το γονότυπο CT και OR=3.95, 95% CI 1.58-9.88, p=0.004 για το γονότυπο TT αντίστοιχα). Αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις που υποστήριζαν τη συσχέτιση του αλληλόμορφου T με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα σε Κορεάτες ασθενείς. Συγκεκριμένα, οι Lee SY και συνεργάτες το 2010 μελέτησαν 720 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και τους αντιπάρεβαν με 720 υγιείς μάρτυρες. Στα αποτελέσματα που παρουσίασαν, μεταξύ άλλων, φάνηκε ότι ο πολυμορφισμός της κασπάσης-9 rs4645981 C>T αύξανε τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα κατά 1.28 φορές. Στην άλλη μελέτη σε Κορεατικό πληθυσμό που αναφέρθηκε και παραπάνω, οι Park JY και συνεργάτες, μελετώντας 432 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 432 μάρτυρες, διαπίστωσαν ότι για τον πολυμορφισμό 712C>T της κασπάσης-9, τα άτομα με τουλάχιστον ένα 712 T αλληλόμορφο γονίδιο διέτρεχαν σημαντικά πιο αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του

πνεύμονα, συγκρινόμενα με τα άτομα που έφεραν τον 712 CC γονότυπο (προσαρμοσμένος OR=1.42, 95% CI=1.06-1.89, p=0.02).

Όπως και ο πολυμορφισμός rs4645978, έτσι και το rs4645981 T αλληλόμορφο γονίδιο της κασπάσης-9 έχει συσχετιστεί με μειωμένη δραστηριότητα υποκινητή. Θα μπορούσε, επομένως, να ισχυριστεί κανείς ότι το rs4645981 T αλληλόμορφο γονίδιο της κασπάσης-9, μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη παραγωγή κασπάσης-9, κάτι που έχει σαν συνεπακόλουθο τη μειωμένη αποπτωτική ικανότητα και, κατά συνέπεια την προαγωγή της καρκινογένεσης.

Το συμπέρασμα αυτού του κομματιού της μελέτης είναι ότι αυτή ήταν η πρώτη επιδημιολογική μελέτη σε μοριακό επίπεδο που υπερασπίστηκε τη συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς rs4645978 και rs4645981 της κασπάσης-9 και την προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε έναν ομογενοποιημένο πληθυσμό της Μεσογείου. Απαιτούνται επιπρόσθετες έρευνες προκειμένου να εκτιμηθεί η γονοτυπική και φαινοτυπική συσχέτιση σε μεγάλους πληθυσμούς διαφόρων εθνικοτήτων, καθώς είναι γνωστό πως οι γενετικοί πολυμορφισμοί συχνά ποικίλλουν στις διάφορες εθνικότητες. Ένα άλλο στοιχείο που πρέπει να επισημανθεί και να στρέψουμε την προσοχή μας είναι η περαιτέρω έρευνα στο επίπεδο της λειτουργικής συνάφειας και του δυνητικού ρόλου των πολυμορφισμών στο μεταγραφικό έλεγχο της κασπάσης-9, όπως γίνεται και σε άλλους τύπους καρκίνου εκτός του καρκίνου του μαστού, καθώς η κατανόηση αυτή θα εμπλούτιζε σε σημαντικό βαθμό τη σύγχρονη γνώση μας πάνω στους ενεργούς μηχανισμούς που διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, αποπειραθήκαμε να διερευνήσουμε τις πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα σε κοινές γενετικές παραλλαγές του SDF-1 και της E-σελεκτίνης με τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού και την επιθετικότητα της συγκεκριμένης νόσου στον ίδιο πληθυσμό με ελληνική καταγωγή. Αν και οι πολυμορφισμοί των δύο αυτών γονιδίων έχουν μελετηθεί σε αρκετές νόσους και σε διάφορους τύπους καρκίνου, λίγα δεδομένα είναι διαθέσιμα σχετικά με τη σημασία τους στον καρκίνο του μαστού. Ο SDF-1 και η E-σελεκτίνη αναδεικνύονται σε σημαντικούς διαμεσολαβητές της μεταστατικής διαδικασίας σε αρκετούς τύπους καρκίνου, όπως έχει αποκαλυφθεί τόσο σε εργαστηριακές όσο και σε κλινικές μελέτες^{247,248}.

Η σύγχρονη θεωρία που έχει αναπτυχθεί υποστηρίζει ότι ο SDF-1 που παράγεται από διάφορους ιστούς δρα σαν χημειοτακτικός παράγοντας για τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα του, τον CXCR4. Ο CXCR4 έχει πλέον αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Οι στρωματικοί ινοβλάστες του διηθητικού καρκίνου του μαστού έχει βρεθεί ότι εκκρίνουν SDF-1, ο οποίος με τη

σειρά του δρα πάνω στα καρκινικά κύτταρα για να προάγει απευθείας την ανάπτυξη του όγκου²⁴⁹. Ο SDF-1 δύνата να ενεργοποιήσει το HER2/neu μονοπάτι σηματοδότησης (signaling pathway), το οποίο μπορεί εν μέρει να είναι υπεύθυνο για την προαναφερθείσα επίδραση του SDF-1²⁵⁰. Ο υποδοχέας CXCR4 μπορεί να ενισχυθεί στα κακοήθη κύτταρα σαν απόκριση στην υποξία, μέσω της δράσης των HIF-1α και VEGF^{251,252}. Ένας φαινότυπος σαν κι αυτόν μπορεί να είναι τελικά ο μηχανισμός που προάγει την έξοδο των καρκινικών κυττάρων από το αφιλόξενο μικροπεριβάλλον της πρωτοπαθούς εστίας και την εγκατάστασή τους σε απομακρυσμένες θέσεις που παράγουν SDF-1, όπως είναι ο μυελός των οστών²⁵³.

Μέχρι σήμερα, μόνο ελάχιστες μελέτες είχαν σαν αντικείμενό τους τη σημασία του πολυμορφισμού SDF-1-3' A στον καρκίνο του μαστού²⁵⁴⁻²⁵⁶. Δύο από τις μελέτες αυτές βρήκαν συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό SDF-1-3' A και τον αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, κατί που είναι σε πλήρη αρμονία με τη δική μας μελέτη. Στη δική τους μελέτη ασθενών-μαρτύρων η οποία επίσης προέρχεται από την Ελλάδα, οι Ζαφειρόπουλος και συνεργάτες εστίασαν την προσοχή τους στους πολυμορφισμούς των χημοκινών και συγκρίνοντας τους ασθενείς με καρκίνο του μαστού με την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στην ομάδα των ασθενών με καρκίνο στις συχνότητες των αλληλόμορφων (τιμή $p=0.036$). Σε ό,τι αφορά στις συχνότητες των γονοτύπων τα αποτελέσματα δεν ήταν οριακά στατιστικά σημαντικά (τιμή $p=0.067$). Η στατιστική εκτίμηση, ωστόσο, μετά την ομαδοποίηση των γονοτύπων έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά, όταν οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού και τα υγιή άτομα ελέγχου συγκρίθηκαν για την παρουσία (AA ή AC) ή την απουσία (CC) του αλληλόμορφου (τιμή $p=0.02$). Σε απόλυτη αντιστοίχιση με τα δικά μας αποτελέσματα πάνω σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού της ίδιας εθνικότητας, τα δεδομένα της έρευνας τους κατέδειξαν τη σημαντική συσχέτιση στη συχνότητα των αλληλομόρφων του SDF-1-3' A (CXCL12) πολυμορφισμού με τον καρκίνο του μαστού. Μαζί με άλλες χημοκίνες της ίδιας ομάδας που εξέτασαν, οι ερευνητές τόνισαν τη σημαντική εμπλοκή του συστήματος των χημοκινών στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και προχώρησαν στη διατύπωση της υπόθεσης ότι η ελάχιστη δυσλειτουργία που υφίσταται το σύστημα των χημοκινών λόγω των πολυμορφισμών, αν και όχι κρίσιμο για την επιβίωση, μπορεί να αποβεί μοιραία για την ανοσολογική επαγρύπνηση και την καταστροφή των μεταλλαγμένων κυττάρων που εμφανίζονται ραγδαία.

Οι Razmkhah και συνεργάτες παρουσίασαν τα αποτελέσματα της ερευνάς τους το 2005, σύμφωνα με τα οποία η συχνότητα των AA και AG γονοτύπων ήταν υψηλότερη ανάμεσα στους Ιρανούς ασθενείς με καρκίνο του μαστού, οι οποίοι ήταν πιο πιθανό να φέρουν το SDF-1-3' A αλληλόμορφο, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα ελέγχου. Έτσι, οι γονότυποι AA και AG, μπορούν να

θεωρηθούν παράγοντες που αυξάνουν την ευαισθησία των Ιρανών γυναικών στον καρκίνο του μαστού. Στηριζόμενοι στις παρατηρήσεις τους, οι συγγραφείς της συγκεκριμένης έρευνας υπέθεσαν ότι η πιθανή αύξηση του SDF-1 στα άτομα με γονοτύπους AA και AG είναι ικανή να διαταράξει τη ρυθμιστική του ικανότητα πάνω στον κυτταρικό κύκλο, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε κυτταρική διαφοροποίηση και επακόλουθα στο σχηματισμό όγκου.

Σε αντιστοιχία με τα ευρήματα της δικής μας έρευνας, οι Hassan και συνεργάτες το 2008 δεν βρήκαν συσχέτιση ανάμεσα στον πολυμορφισμό SDF-1-3' A και στις κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους. Παρόλα αυτά, στη δική τους μελέτη, οι ασθενείς με πολυμορφισμό SDF-1-3' A είχαν χειρότερη πρόγνωση και μικρότερη επιβίωση συνολικά όσο και ελεύθερο νόσου χρονικό διάστημα. Ωστόσο, σκοπός της μελέτης τους βασικά ήταν να ερευνήσουν την αξία του SDF-1 ως έναν προγνωστικό αιματολογικό δείκτη για απομακρυσμένες μεταστάσεις σε καρκίνο του μαστού, μαζί με έναν κοινό πολυμορφισμό του, τον SDF-1-3' A. Για το σκοπό αυτό, συνέλεξαν προοπτικά δείγματα πλάσματος από 270 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού με μια μέση διάρκεια μετεγχειρητικής παρακολούθησης τα 3.3 χρόνια. Οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα SDF-1 εμφάνισαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης απομακρυσμένης μετάστασης (σχετικός κίνδυνος=1.94, τιμή $p=0.02$), καθώς επίσης και μικρότερη επιβίωση (σταθμισμένη αναλογία κινδύνου AHR=3.92, $p=0.007$). Ασθενείς που είχαν ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα SDF-1 στο πλάσμα και τον πολυμορφισμό SDF-1-3' A εμφάνισαν χειρότερη πρόγνωση (AHR=3.98, $p=0.001$) και χειρότερη επιβίωση ελεύθερη νόσου (AHR=2.88, $p=0.003$). Κατά συνέπεια, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα υψηλά επίπεδα SDF-1 στο πλάσμα προστατεύουν από την ανάπτυξη μετάστασης διατηρώντας τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα στο αγγειακό σύστημα και αποτρέποντάς τα από τον εποικισμό απομακρυσμένων θέσεων.

Η E-σελεκτίνη φαίνεται ότι παίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο στη μεταστατική διαδικασία. Σύγχρονες ενδείξεις προτείνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν συνδέτες της E-σελεκτίνης είναι ικανά να προσδεθούν σε επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από διάφορα ερεθίσματα, κι εκκινούν με αυτόν τον τρόπο τη διαδικασία της διενδοθηλιακής μετανάστευσης. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με την κύλιση των λευκοκυττάρων και τη διαπίδυση²⁵⁷. Επιπρόσθετα, μερικοί συνδέτες της E-σελεκτίνης μπορούν να ενεργοποιήσουν μονοπάτια σηματοδότησης ευεργετικά για τα καρκινικά κύτταρα, όπως η πρωτεΐνη MUC1, που διασυνδέεται με τη σηματοδότηση EGFR και την προάγει²⁵⁸. Έκφραση των sLe^x και sLe^a, που είναι οι φυσικοί συνδέτες της E-σελεκτίνης, έχει αποδειχτεί ότι βρίσκεται αυξημένη στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού που δεν τα εκφράζουν^{259,260}.

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε το ενδεχόμενο κάποιος που είναι φορέας του πολυμορφισμού S128R της E-σελεκτίνης να έχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού καθώς και το ρόλο που παίζει το χαρακτηριστικό αυτό στην επιθετική συμπεριφορά της συγκεκριμένης νόσου. Κάτι τέτοιο, άλλωστε είχε στο παρελθόν αποδειχτεί για άλλους τύπους καρκίνου ²⁶¹.

Το 2010, σε έρευνα υπό την καθοδήγηση του καθηγητή κ. Ζωγράφου, μελετήθηκε η επίδραση του πολυμορφισμού S128R της E-σελεκτίνης στον καρκίνο του παγκρέατος. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν 80 ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος και 160 υγιείς μάρτυρες ελέγχου ως προς τις συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού S128R. Η ομάδα των ατόμων που ήταν φορείς του C αλληλομόρφου (CA+CC γονότυποι) και το C αλληλόμορφο υπερεκπροσωπήθηκαν ανάμεσα στις περιπτώσεις με καρκίνο του παγκρέατος ($p=0.012$ και $p=0.096$ αντίστοιχα). Το προχωρημένο στάδιο T, η ύπαρξη λεμφαδένων και άλλα δυσμενή χαρακτηριστικά δε συσχετίστηκαν σημαντικά ούτε με τη γονοτυπική ομάδα ασθενών «CA+CC» ούτε με την παρουσία του C αλληλόμορφου. Έτσι, το συμπέρασμα που εξήχθη ήταν ότι ο πολυμορφισμός S128R της E-σελεκτίνης μπορεί να συνεισφέρει στην αυξημένη ευαισθησία για ανάπτυξη καρκίνου του παγκρέατος, αλλά δε φαίνεται να συσχετίζεται με τα επιθετικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης νόσου.

Εν τέλει, δε βρήκαμε καμία συσχέτιση ανάμεσα είτε στους ομόζυγους ή ετερόζυγους φορείς του συγκεκριμένου πολυμορφισμού και την παρουσία καρκίνου του μαστού. Παρόλα αυτά, υπήρχε μια υπερεκπροσώπηση των AC ετεροζυγωτών ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού και αντίστοιχα μια υποεκπροσώπηση των CC ομοζυγωτών στην ίδια ομάδα πληθυσμού. Όπως και να 'χει, ο απόλυτος αριθμός των φορέων με γονότυπο CC ήταν εξαιρετικά περιορισμένος στο δείγμα μας (8 άτομα από την ομάδα των ασθενών και 18 άτομα από την ομάδα ελέγχου-μάρτυρες). Το γεγονός αυτό μπορεί να είναι υπεύθυνο για τα απρόσμενα αποτελέσματα στις συχνότητες των ατόμων με γονότυπο CC. Παρά την υποεκπροσώπηση ανάμεσα στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, οι ομοζυγώτες για τον πολυμορφισμό S128R του γονιδίου της E-σελεκτίνης είχαν φτωχότερη συνολική επιβίωση σε σχέση με τους ετεροζυγώτες και τα άτομα με φυσιολογικό γονότυπο. Αυτή η τελευταία παρατήρηση καταδεικνύει τη μεγάλη σημασία της E-σελεκτίνης στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού καθώς επίσης και την προγνωστική αξία του πολυμορφισμού S128R του γονιδίου της.

Μέχρι σήμερα, μόνο μία παρόμοια με τη δική μας μελέτη έχει ασχοληθεί με την επίδραση του πολυμορφισμού S128R του γονιδίου της E-σελεκτίνης σε μια ομάδα ασθενών με καρκίνο του μαστού Μαλαισιανής καταγωγής ²⁶². Συγκεκριμένα, το 2011 οι Naidu R και συνεργάτες μελέτησαν τους γονοτύπους 387 γυναικών ασθενών με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με 252 υγιείς γυναίκες χωρίς κανένα ιστορικό κακοήθειας. Το ποσοστό των ομοζυγωτών ήταν συγκριτικά χαμηλό και στις δύο

έρευνες. Η δική μας έρευνα χαρακτηριζόταν από ένα πολύ υψηλό ποσοστό ετεροζυγωτών (38,3% έναντι 17.3%) καθώς επίσης και από ένα χαμηλότερο ποσοστό ασθενών με φυσιολογικό γονότυπο (58.6% έναντι 78.6%). Οι δύο μελέτες συμφώνησαν στην τάση υπερεκπροσώπησης των AC ετεροζυγωτών ανάμεσα στους ασθενείς (OR=1.51, p=0.08). Το αποτέλεσμα αυτό έγινε στατιστικά σημαντικό μετά την προσαρμογή του στην ηλικία και την εθνικότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι δε βρέθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην ομόζυγη κατάσταση και την επίπτωση του καρκίνου του μαστού. Παρόλα αυτά, οι Naidu και συνεργάτες έδειξαν ότι υπήρχε πολύ ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην AA ομόζυγη κατάσταση και τον υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης. Ωστόσο, καμία άλλη συσχέτιση δεν εντοπίστηκε με άλλη κλινική ή ιστολογική παράμετρο.

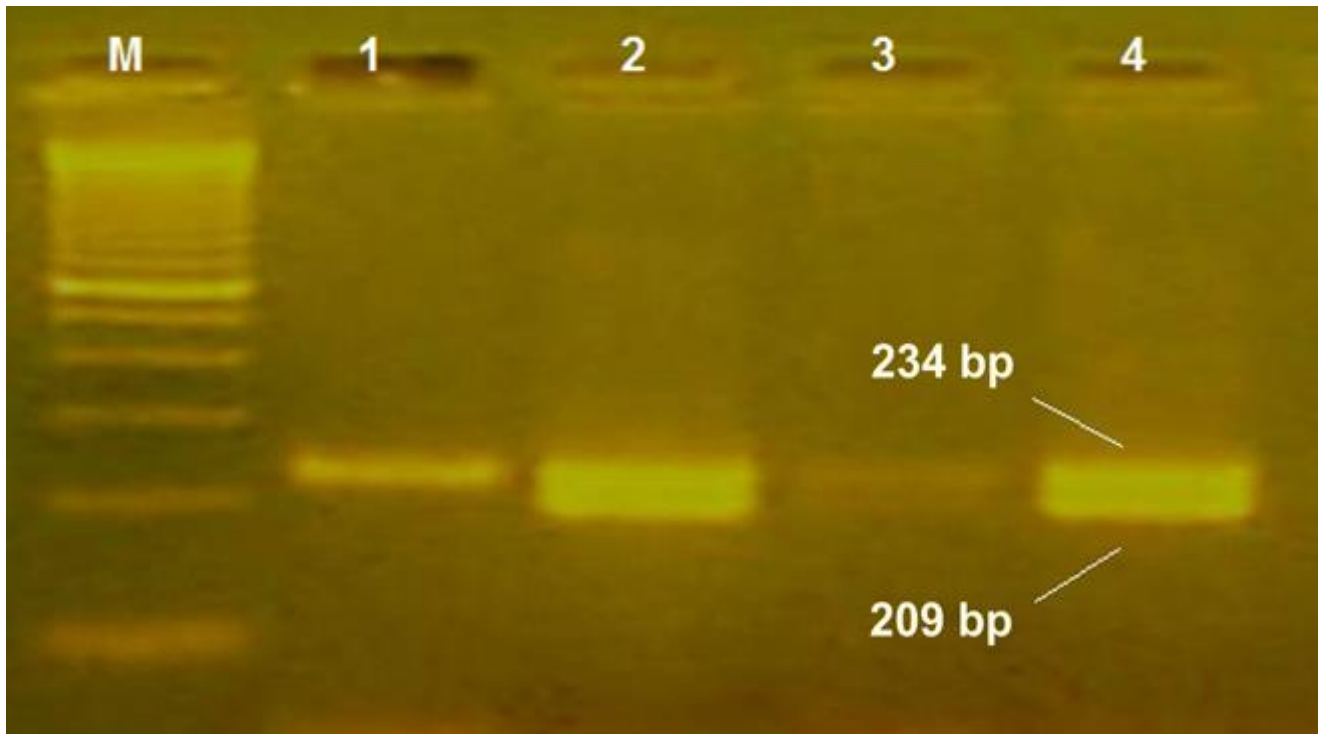
Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα αποτελέσματα της έρευνάς μας βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών σχετικά με το ρόλο του πολυμορφισμού SDF-1-3'-A στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και υποστηρίζουν τον πιθανό ρόλο του πολυμορφισμού S128R του γονιδίου της E-σελεκτίνης ως προγνωστικού παράγοντα για τον επιθετικό χαρακτήρα της συγκεκριμένης νόσου. Η μελέτη μας, ωστόσο, υπόκειται στους εγγενείς περιορισμούς που έχει οποιαδήποτε αναδρομική μελέτη. Αν και, εξαιτίας αυτών των περιορισμών, δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή και απόλυτα συμπεράσματα, τα ευρήματά μας ενισχύουν περισσότερο τα ευρήματα προηγούμενων μελετών πάνω στον κυρίαρχο ρόλο του πολυμορφισμού SDF-1-3' A στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Επίσης, το σχετικά μικρό ποσοστό ομοζυγωτών θα μπορούσε να ισχυριστεί κάποιος ότι μας απέτρεψε από το να αποκαλύψουμε πιθανές συσχετίσεις ανάμεσα στους πολυμορφισμούς. Άλλο ένα πρόβλημα ήταν το γεγονός ότι στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς που χειρουργήθηκαν μόνο σε ένα νοσηλευτικό ίδρυμα. Το σχετικά χαμηλό ποσοστό θανάτων, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σαν έκβαση της νόσου, συμβαδίζει με το σχετικά μικρό χρονικό διάστημα της μετεγχειρητικής παρακολούθησης. Και λέμε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα μετεγχειρητικής παρακολούθησης γιατί στη σύγχρονη εποχή και για τη συγκεκριμένη μορφή κακοήθειας έχει πλέον επιτευχθεί αρκετά μακροπρόθεσμη επιβίωση. Αυτό σημαίνει ότι ίσως το χρονικό διάστημα της μετεγχειρητικής παρακολούθησης που χρησιμοποιήθηκε θα έπρεπε να επεκταθεί σημαντικά περισσότερο.

Στον αντίποδα, η έρευνά μας περιλαμβάνει ένα σχετικά επαρκή αριθμό ασθενών της ίδιας εθνικότητας, όπως θα έπρεπε να συμβαίνει σε οποιαδήποτε μελέτη πολυμορφισμών, προκειμένου να εξαχθούν ουσιαστικά συμπεράσματα. Το σίγουρο είναι ότι χρειάζονται έρευνες σε πιο ευρύ πεδίο για να διερευνηθεί η προγνωστική αξία των δύο αυτών πολυμορφισμών καθώς και η αξία τους ως προγνωστικοί δείκτες για εξατομικευμένη αντιμετώπιση.

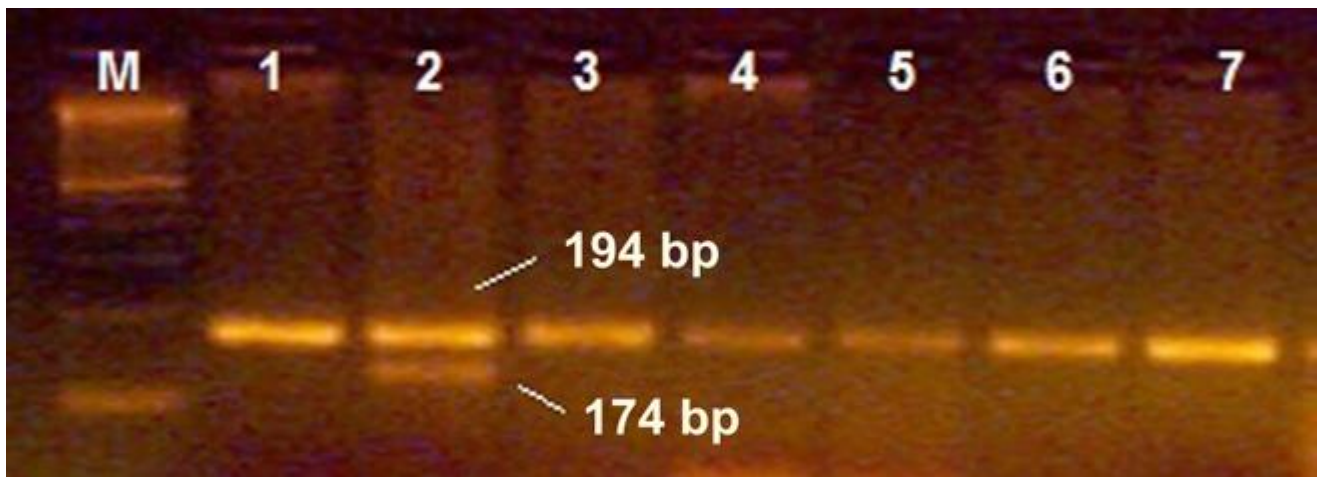
Συμπεράσματα

1. Οι κασπάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του καρκίνου. Τούτο συμβαίνει, καθώς είναι ουσίες με καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Οποιαδήποτε τροποποίησή τους μέσω πολυμορφισμών επηρεάζει την αποπτωτική διαδικασία και μέσω αυτής την καρκινική προοπτική.
2. Αρχικά μελετήθηκε ο πολυμορφισμός rs4645978 της κασπάσης-9. Οι φορείς του rs4645978 G αλληλόμορφου, δηλαδή τα άτομα εκείνα που είχαν τους γονοτύπους AG και GG βρέθηκε ότι διέτρεχαν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν άλλους γονοτύπους.
3. Συγκεκριμένα, ο rs4645978 GG γονότυπος συσχετίστηκε με τον υψηλότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.
4. Αυτά τα ευρήματα αποτέλεσαν έκπληξη για την έρευνά μας, καθώς στο παρελθόν σε άλλες έρευνες είχε καταδειχθεί ο προστατευτικός ρόλος που έπαιξε η ύπαρξη του rs4645978 G αλληλόμορφου στην αποτροπή ανάπτυξης καρκίνου στο στομάχι, τον προστάτη, την ουροδόχο κύστη, το ορθό και το κόλον και τον πνεύμονα.
5. Η ύπαρξη του rs4645978 G αλληλόμορφου είχε φανεί ότι είναι επιβαρυντική προς την κατεύθυνση της αύξησης του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου, εκτός από το μαστό, στην περίπτωση του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς.
6. Η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού φαίνεται ότι δημιουργεί μια επιπλέον θέση πρόσδεσης μεταγραφικού παράγοντα που λειτουργεί επιβαρυντικά στο θυρεοειδή και το μαστό σε αντίθεση με τα άλλα στο παρελθόν μελετηθέντα όργανα.
7. Ο δεύτερος πολυμορφισμός της κασπάσης-9 που μελετήθηκε ήταν ο rs4645981. Τα άτομα με τουλάχιστον ένα rs4645981 T αλληλόμορφο βρίσκονταν σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν το φυσιολογικό CC γονότυπο.
8. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξανόταν όσο αυξάνονταν τα rs4645981 T αλληλόμορφα.
9. Στο ίδιο συμπέρασμα είχαν καταλήξει και δύο έρευνες στο παρελθόν που διαπίστωσαν ότι η παρουσία του rs4645981 T αλληλόμορφου αύξησε τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε Κορεάτες ασθενείς.

10. Οι πολυμορφισμοί της περιοχής υποστήριξης του γονιδίου της κασπάσης-9 rs4645978 και rs4645981 συσχετίστηκαν με ευαισθησία για τον καρκίνο του μαστού και καταδεικνύουν την τεράστια σημασία που παίζει η ρύθμιση της διαδικασίας της μεταγραφής στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Στην πλήρη διερεύνηση της διαδικασίας αυτής πρέπει να στραφούν οι μελλοντικές έρευνες.
11. Η μεγάλη ετερογένεια του καρκίνου του μαστού τον καθιστά επιρρεπή σε μετάσταση ακόμα και σε πολύ αρχικά στάδια της νόσου. Δύο παράγοντες με ρόλο στη διαδικασία της μετάστασης είναι ο SDF-1 και η E-σελεκτίνη. Ο πρώτος ως μια χημοκίνη που εμπλέκεται στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένες εστίες και ο δεύτερος μέσω του διενδοθηλιακού αποικισμού.
12. Οι ασθενείς που ήταν φορείς του SDF-1-3' A πολυμορφισμού φάνηκε να έχουν αυξημένη ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού, κάτι που είχε φανεί και σε παρελθούσες έρευνες.
13. Για τον πολυμορφισμό S128R δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που βρέθηκε ήταν ανάμεσα στον ομόζυγο για τον πολυμορφισμό CC γονότυπο και την πιο φτωχή πρόγνωση ως προς τη συνολική επιβίωση.
14. Η έρευνά μας ήταν η πρώτη επιδημιολογική μελέτη σε μοριακό επίπεδο που υπερασπίστηκε τη συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς rs4645978 και rs4645981 της κασπάσης-9, τον πολυμορφισμό SDF-1-3' A του SDF-1 και τον πολυμορφισμό S128R της E-σελεκτίνης και την προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού σε έναν ομογενοποιημένο πληθυσμό της Μεσογείου. Περιελάμβανε δε επαρκή αριθμό ασθενών, όπως θα έπρεπε να συμβαίνει με οποιαδήποτε μελέτη πολυμορφισμών, προκειμένου να βγουν ασφαλή συμπεράσματα.
15. Ωστόσο, θα πρέπει η έρευνα να επεκταθεί και σε πληθυσμούς άλλων εθνικοτήτων, καθώς γνωρίζουμε ότι οι πολυμορφισμοί υπόκεινται σε διαφορές ανάλογα με την καταγωγή των ατόμων που τους φέρουν. Επίσης, υπόκειται στους περιορισμούς που υπόκειται οποιαδήποτε αναδρομική έρευνα. Τέλος, αναγνωρίζουμε ότι στη σύγχρονη εποχή και για το συγκεκριμένο καρκίνο ίσως έπρεπε το χρονικό διάστημα της μετεγχειρητικής παρακολούθησης να επεκταθεί.



Εικόνα 5. Αναλύσεις PCR-RFLP προκειμένου να ανιχνευτεί ο πολυμορφισμός της κασπάσης-9 rs4645978 (1263 A>G). M: γέφυρα DNA με 100 ζευγάρια βάσης; Στήλη 1: Ομοζυγώτης για το A αλληλόμορφο; Στήλες 2-4: A/G Ετεροζυγώτες



Εικόνα 6. Αναλύσεις PCR-RFLP προκειμένου να ανιχνευτεί ο πολυμορφισμός της κασπάσης-9 rs4645981 (712 C>T). M: Γέφυρα DNA με 100 ζευγάρια βάσης. Στήλη 2: C/T ετεροζυγώτης

Χαρακτηριστικό	Αριθμός περιστατικών	Ποσοστό (%)
<i>Σύνολο</i>	261	100
<i>Μέση ηλικία, σε έτη</i>	61.67	
<i>Κατάσταση T (T-status)</i>		
0	4	1.5
1	19	7.3
2	120	46.0
3	118	45.2
<i>Κατάσταση λεμφαδένων</i>		
+	101	38.7
-	160	61.3
<i>Κατάσταση υποδοχέων οιστρογόνου</i>		
-	138	52.9
+	25	9.6
++	43	16.5
+++	55	21.0
<i>Κατάσταση υποδοχέων προγεστερόνης</i>		
-	143	54.8
+	27	10.3
++	31	11.9
+++	60	23.0
<i>Βαθμός διαφοροποίησης</i>		
I	18	6.9
II	151	57.9
III	92	35.2
<i>Χημειοθεραπεία</i>		
Ναι	225	86.2
Όχι	36	13.8
<i>Ακτινοθεραπεία</i>		
Ναι	58	22.2
Όχι	203	77.8
<i>Επιβίωση κατά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση</i>		
Ναι	242	92.7
Όχι	19	7.3

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά ασθενών και όγκων των ασθενών

	Ασθενείς (%)	Μάρτυρες (%)	Τιμή p	OR (95% CI)
Συχνότητες γονοτύπων				
AA	41 (15.71)	110 (22.92)		1.00 (τιμή αναφοράς)
AG	111 (42.53)	240 (50.00)	0.342	1.24 (0.81-1.89)
GG	109 (41.76)	130 (27.08)	0.0003	2.25 (1.45-3.49)
AG+GG	220 (84.29)	370 (77.08)	0.022	1.59 (1.07-2.37)
Σύνολο	261 (100)	480 (100)		
Συχνότητες αλληλόμορφων				
A αλληλόμορφο	193 (36.97)	460 (47.92)		1.00 (τιμή αναφοράς)
G αλληλόμορφο	329 (63.03)	500 (52.08)	<0.0001	1.57 (1.26-1.95)
Σύνολο	522 (100)	960 (100)		

Πίνακας 7. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού -1263 A>G (rs4645978) της κασπάσης-9 στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων

	Ασθενείς (%)	Μάρτυρες (%)	Τιμή p	OR (95% CI)
Συχνότητες γονοτύπων				
CC	137 (52.49)	361 (75.21)	<0.0001	1.00 (τιμή αναφοράς)
CT	112 (42.91)	111 (23.12)	0.004	2.66 (1.91-3.69)
TT	12 (4.60)	8 (1.67)	<0.0001	3.95 (1.58-9.88)
CT+TT	124 (47.51)	119 (24.79)		2.75 (1.99-3.78)
Σύνολο	261 (100)	480 (100)		
Συχνότητες αλληλόμορφων				
C αλληλόμορφο	386 (73.95)	833 (86.77)	<0.0001	1.00 (τιμή αναφοράς)
T αλληλόμορφο	136 (26.05)	127 (13.23)		2.31 (1.74-3.03)
Σύνολο	522 (100)	960 (100)		

Πίνακας 8. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού -712 C>T (rs4645978) της κασπάσης-9 στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων

	Ασθενείς (%)	Μάρτυρες (%)	Τιμή p	OR (95% CI)
Συχνότητες γονοτύπων				
GG	114 (43.7)	247 (51.5)	-	1.00 (τιμή αναφοράς)
GA	118 (45.2)	198 (41.3)	0.12	1.29 (0.94-1.78)
AA	29 (11.1)	35 (7.3)	0.03	1.80 (1.05-3.08)
GA+AA	147 (56.3)	233 (48.5)	0.04	1.37 (1.01-1.85)
Σύνολο	261 (100)	480 (100)		
Συχνότητες αλληλόμορφων				
G αλληλόμορφο	346 (66.3)	692 (72.1)	-	1.00 (τιμή αναφοράς)
A αλληλόμορφο	176 (33.7)	268 (27.9)	0.02	1.31 (1.04-1.65)
Σύνολο	522 (100)	960 (100)		

Πίνακας 9. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού SDF-1-3' A του SDF-1 στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων

	Ασθενείς (%)	Μάρτυρες (%)	Τιμή p	OR (95% CI)
Συχνότητες γονοτύπων				
AA	153 (58.6)	311 (64.8)	-	1.00 (τιμή αναφοράς)
AC	100 (38.3)	151 (31.4)	0.07	1.35 (0.98-1.85)
CC	8 (3.1)	18 (3.8)	1.00	0.90 (0.38-2.13)
AC+CC	108 (41.4)	169 (35.2)	0.11	1.30 (0.95-1.77)
Σύνολο	261 (100)	480 (100)		
Συχνότητες αλληλόμορφων				
A αλληλόμορφο	406 (77.8)	773 (80.5)	-	1.00 (τιμή αναφοράς)
C αλληλόμορφο	116 (22.2)	187 (19.5)	0.21	1.18 (0.91-1.53)
Σύνολο	522 (100)	960 (100)		

Πίνακας 10. Κατανομή των γονοτύπων και των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού S128R της E-σελεκτίνης στην ομάδα των ασθενών και στην ομάδα ελέγχου των μαρτύρων

Χαρακτηριστικό	Γονότυποι		
	GG (n=114)	GA (n=118)	AA (n=29)
<i>Ηλικία</i>			
>70 έτη (n=83)	39 (46.9%)	36 (43.3%)	8 (9%)
<70 έτη (n=178)	75 (42.1%)	82 (46%)	21 (11.7%)
	p=0.423		
<i>Κατάσταση T (T-status)</i>			
0 (n=4)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)
1(n=19)	10 (52.6%)	5 (26.3%)	4 (21%)
2 (n=120)	57 (47.5%)	52 (43.3%)	11 (9.1%)
3 (n=118)	45 (38.1%)	59 (50%)	14 (11.8%)
	p=0.559		
<i>Κατάσταση λεμφαδένων</i>			
0 (n=161)	71 (44%)	78 (48.4%)	12 (7.4%)
1 (n=100)	43 (43%)	40 (40%)	17 (17%)
	p=0.963		
<i>Βαθμός διαφοροποίησης</i>			
1 (n=18)	8 (44.4%)	7 (38.8%)	3 (16.6%)
2 (n=151)	65 (43%)	68 (45%)	18 (12%)
3 (n=92)	41 (44.5%)	43 (46.7%)	8 (8.6%)
	p=0.9342		

Πίνακας 11. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς γονοτύπους και τους γονοτύπους του πολυμορφισμού SDF-1-3' A

Χαρακτηριστικό	Γονότυποι		
	GG (n=114)	GA (n=118)	AA (n=29)
<i>Κατάσταση υποδοχέων οιστρογόνου</i>			
- (n=138)	62 (44.9%)	65 (47.1%)	11 (7.9%)
+ (n=25)	13 (52%)	9 (36%)	3 (12%)
++ (n=43)	19 (44.1%)	17 (39.5%)	7 (16.2%)
+++ (n=55)	20 (36.3%)	27 (49.2%)	8 (14.5%)
	p=0.759		
<i>Κατάσταση υποδοχέων προγεστερόνης</i>			
- (n=143)	60 (41.9%)	70 (48.9%)	13 (9%)
+ (n=27)	12 (44.4%)	10 (37%)	5 (18.6%)
++ (n=31)	18 (58%)	9 (29%)	4 (13%)
+++ (n=60)	24 (40%)	29 (48.3%)	7 (11.67%)
	p=0.623		
<i>Χημειοθεραπεία</i>			
Ναι (n=225)	97 (43.1%)	102 (45.3%)	26 (11.5%)
Όχι (n=36)	17 (47.2%)	16 (44.4%)	3 (8.4%)
	p=0.587		
<i>Ακτινοθεραπεία</i>			
Ναι (n=58)	26 (44.8%)	27 (46.5%)	5 (8.7%)
Όχι (n=203)	88 (43.3%)	91 (44.8%)	24 (11.9%)
	p=0.8813		

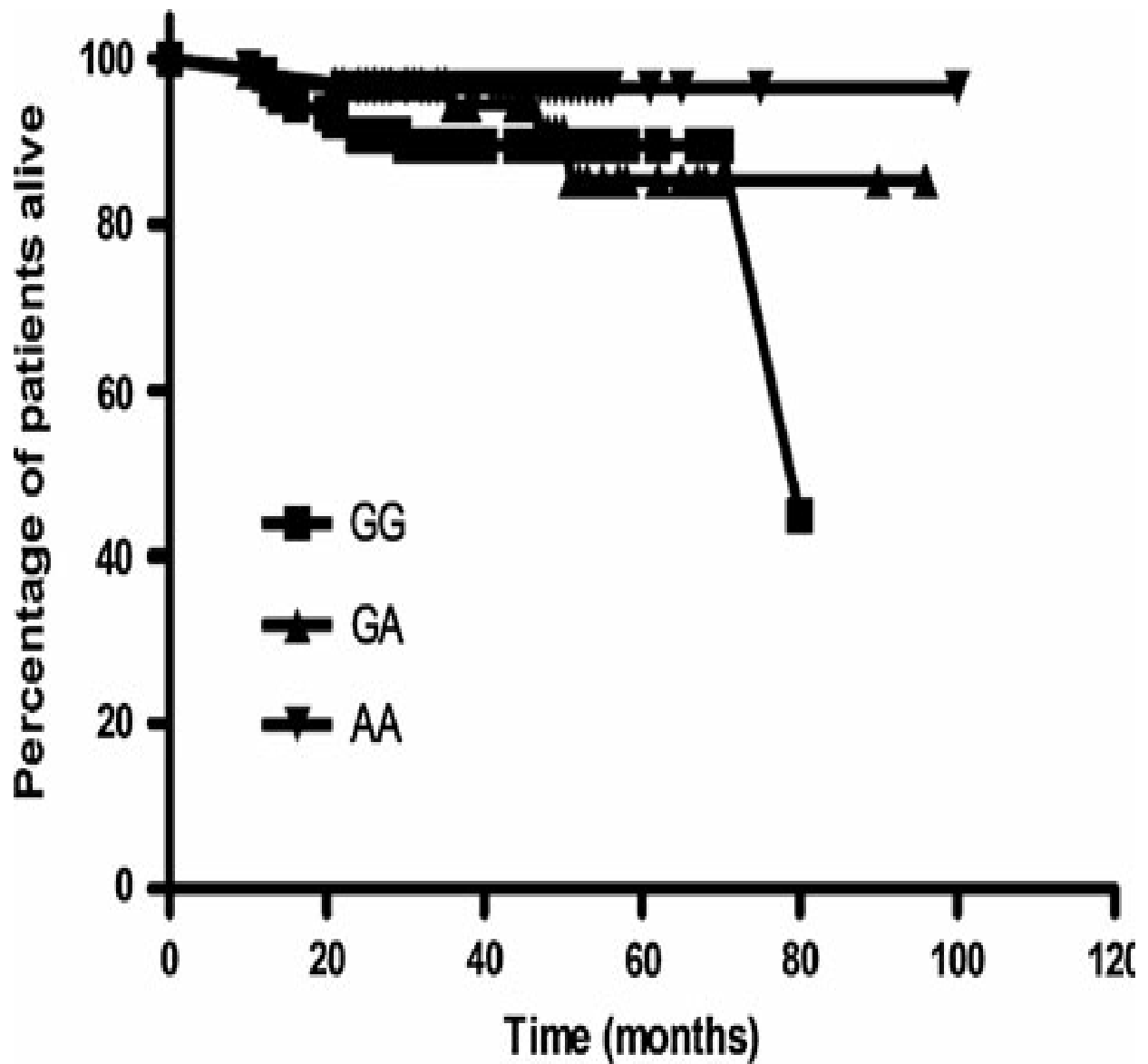
Συνέχεια πίνακα 11. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς γονοτύπους και τους γονοτύπους του πολυμορφισμού SDF-1-3' A

Χαρακτηριστικό	Γονότυποι		
	AA (n=153)	AC (n=100)	CC (n=8)
<i>Ηλικία</i>			
>70 έτη (n=83)	46 (55.4%)	35 (42.1%)	2 (2.4%)
<70 έτη (n=178)	107 (60.1%)	65 (36.5%)	6 (3.3%)
	p=0.501		
<i>Κατάσταση T (T-status)</i>			
0 (n=4)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)
1(n=19)	11 (57.8%)	6 (31.5%)	2 (10.5%)
2 (n=120)	70 (58.3%)	48 (40%)	2 (1.6%)
3 (n=118)	69 (58.4%)	45 (38.1%)	4 (3.3%)
	p=0.965		
<i>Κατάσταση λεμφαδένων</i>			
0 (n=161)	91 (56.5%)	67 (41.6%)	3 (1.8%)
1 (n=100)	62 (62%)	33 (33%)	5 (5%)
	p=0.456		
<i>Βαθμός διαφοροποίησης</i>			
1 (n=18)	8 (44.4%)	9 (50%)	1 (5.6%)
2 (n=151)	90 (59.6%)	56 (37.1%)	5 (3.3%)
3 (n=92)	55 (59.7%)	34 (36.9%)	3 (3.2%)
	p=0.881		

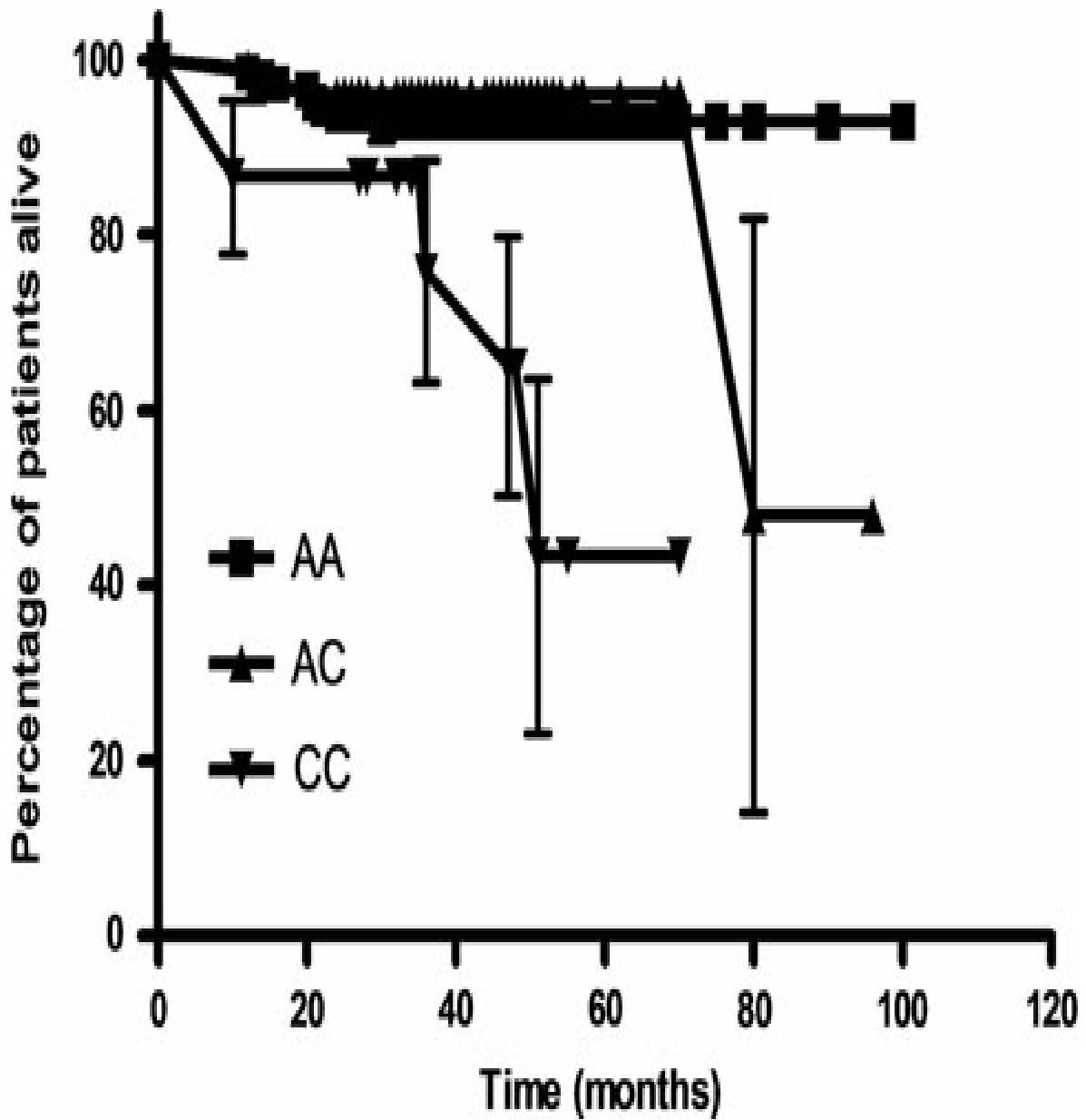
Πίνακας 12. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς γονοτύπους και τους γονοτύπους του πολυμορφισμού S128R της E-σελεκτίνης

Χαρακτηριστικό	Γονότυποι		
	AA (n=153)	AC (n=100)	CC (n=8)
<i>Κατάσταση υποδοχέων οιστρογόνου</i>			
- (n=138)	78 (56.5%)	55 (39.8%)	5 (3.6%)
+ (n=25)	19 (76%)	4 (16%)	2 (8%)
++ (n=43)	25 (58.1%)	17 (39.5%)	1 (2.3%)
+++ (n=55)	31 (56.3%)	24 (43.7%)	0 (0%)
	p=0.546		
<i>Κατάσταση υποδοχέων προγεστερόνης</i>			
- (n=143)	79 (55.2%)	61 (42.7%)	3 (2.1%)
+ (n=27)	20 (74%)	6 (22.2%)	1 (3.8%)
++ (n=31)	16 (51.6%)	12 (38.7%)	3 (9.6%)
+++ (n=60)	38 (63.3%)	21 (35%)	1 (1.67%)
	p=0.238		
<i>Χημειοθεραπεία</i>			
Ναι (n=225)	133 (59.1%)	84 (37.3%)	8 (3.6%)
Όχι (n=36)	20 (55.5%)	16 (44.4%)	0 (0%)
	p=0.717		
<i>Ακτινοθεραπεία</i>			
Ναι (n=58)	28 (48.2%)	29 (50%)	1 (1.8%)
Όχι (n=203)	125 (61.6%)	71 (34.9%)	7 (3.5%)
	p=0.095		

Συνέχεια πίνακα 12. Χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων των ασθενών σε σχέση με τους φυσιολογικούς γονοτύπους και τους γονοτύπους του πολυμορφισμού S128R της E-σελεκτίνης



Εικόνα 7. Υπολογισμοί Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού που είχαν φυσιολογικό φαινότυπο SDF-1/CXCL12 (γονότυπος GG; n=114), ήταν ετερόζυγοι (γονότυπος GA; n=118) και ομόζυγοι (γονότυπος AA; n=29) για τον πολυμορφισμό SDF-1-3' A



Εικόνα 8. Υπολογισμοί Kaplan-Meier της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού που είχαν φυσιολογικό φαινότυπο E-selectin/CD62E (γονότυπος AA; n=153), ήταν ετερόζυγοι (γονότυπος AC; n=100) και ομόζυγοι (γονότυπος CC; n=8) για τον πολυμορφισμό S128R της E-σελεκτίνης

Περίληψη. Οι κασπάσες παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου. Εκτιμήσαμε τη συσχέτιση ανάμεσα στους δύο πολυμορφισμούς (rs4645978 και rs4645981) του γονιδίου της κασπάσης-9 και τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Οι συχνότητες των γονοτύπων και των αλληλόμορφων για τους δύο πολυμορφισμούς καθορίστηκαν στους 261 ασθενείς και στους 480 υγιείς μάρτυρες. Χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης-πολυμερισμός μήκους θραυσμάτων από περιορισμό και η στατιστική ανάλυση έγινε με τη δοκιμασία χ^2 . Οι φορείς του rs4645978 G αλληλόμορφου (δηλαδή οι γονότυποι AG και GG) ήταν σε υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού από τα άτομα με άλλους γονοτύπους. OR=1.59, 95% CI=1.07-2.37, p=0.022. Ο γονότυπος rs4645978 συγκεκριμένα συσχετίστηκε με τον υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (OR 2.25, 95% CI 1.45-3.49, p=0.0003). Παρομοίως, τα άτομα με τουλάχιστον ένα rs4645981 T αλληλόμορφο ήταν σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού συγκρινόμενα με εκείνα που έφεραν το CC γονότυπο (OR 2.75, 95% CI 1.99-3.78, p<0.0001) και ο κίνδυνος του καρκίνου του μαστού αυξανόταν όσο αυξανόταν ο αριθμός των rs4645981 T αλληλόμορφων (OR 2.66, 95% CI 1.91-3.69, <0.0001 για το γονότυπο CT; OR 3.95, 95% CI 1.58-9.88, p=0.004 για το γονότυπο TT). Οι πολυμορφισμοί rs4645978 και rs4645981 σχετίζονται με ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού και προτείνουν ότι η μεταγραφική ρύθμιση της κασπάσης-9 είναι ένας πολύ σημαντικός για αυτό παράγοντας. Ο καρκίνος του μαστού είναι επιρρεπής σε μετάσταση ακόμα και σε πρώιμο στάδιο. Ο SDF-1 είναι μια χημοκίνη που έχει συσχετιστεί με τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, ενώ η σελεκτίνη έχει εμπλακεί στη διενδοθηλιακή μετανάστευση. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε για να εκτιμήσει τη συσχέτιση των πολυμορφισμών τους με τον κίνδυνο για καρκίνο μαστού, καθώς και με την έκβαση της νόσου. Οι συχνότητες για το φυσιολογικό (GG), GA και AA γονότυπο του SDF-1 ήταν 43.7, 45.2 και 11.1% στους ασθενείς και 51.5, 41.3 και 7.3% στους υγιείς μάρτυρες, αντίστοιχα, ενώ η συχνότητα των αλληλομόρφων του πολυμορφισμού ήταν 33.7% στους ασθενείς και 27.9% στους μάρτυρες. Οι φορείς του A αλληλόμορφου του SDF-1-3' A υπερεκπροσωπήθηκαν ανάμεσα στα περιστατικά καρκίνου του μαστού (p=0.04). Για τον πολυμορφισμό της E-σελεκτίνης S128R, οι συχνότητες για το φυσιολογικό (AA), τον AC και το CC γονότυπο ήταν 58.6, 38.3 και 3.1% στους ασθενείς και 63.8, 31.4 και 3.8% στους υγιείς αντίστοιχα, ενώ η συχνότητα του αλληλόμορφου C ήταν 22.2% για τους ασθενείς και 19.5% για τους μάρτυρες. Ο γονότυπος CC είχε τη φτωχότερη πρόγνωση. Συνολικά τα ευρήματά μας υποστηρίζουν ότι ο SDF-1-3' A προσφέρει αυξημένη ευαισθησία για καρκίνο του μαστού και ο S128R γονότυπος CC μπορεί να σχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση.

Abstract. Caspases (CASPs), play a crucial role in the development and progression of cancer. We evaluated the association between two polymorphisms (rs4645978 and rs4645981) of the CASP9 gene and the risk of breast cancer (BC). Genotypes and allelic frequencies for the two polymorphisms were determined in 261 patients with breast cancer and 480 healthy controls. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms were used, and statistical significance was determined by the χ^2 test. Carriers of the rs4645978 G allele (AG and GG genotypes) were at higher risk for BC than individuals with other genotypes (odds ratio (OR) 1.59, 95% confidence interval (CI) 1.07-2.37, $p=0.022$). The rs4645978 GG genotype, in particular, was associated with the highest risk for BC development (OR 2.25, 95% CI 1.45-3.49, $p=0.0003$). Similarly, individuals with at least one rs4645981 T allele were at a significantly increased risk of developing BC compared with those harboring the CC genotype (OR 2.75, 95% CI 1.99-3.78, $p<0.0001$), and the risk of BC increased with increasing numbers of rs4645981 T alleles (OR 2.66, 95% CI 1.91-3.69, $p<0.0001$ for the CT genotype; OR 3.95, 95% CI 1.58-9.88, $p=0.004$ for the TT genotype). The CASP9 promoter polymorphisms rs4645978 and rs4645981 are associated with BC susceptibility and suggest that CASP9 transcriptional regulation is an important factor during BC development. Breast cancer is prone to metastasis even in early stage disease. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is a chemokine that has been associated with the egress of cancer cells from the primary focus and homing to distant sites, while E-selectin has been implicated in their transendothelial migration. This study was performed to evaluate the association between SDF-1-3' A and E-selectin S128R—two polymorphisms associated with enhanced function—and the risk of breast cancer, as well as their influence on breast cancer outcome. The frequencies for the wild-type (GG), GA and AA genotypes of SDF-1 were 43.7, 45.2, and 11.1 % in patients, and 51.5, 41.3, and 7.3 % in healthy controls, respectively, while the SDF-1-3' A allelic frequency was 33.7 % at patients and 27.9 % at controls. The SDF-1-3' A carrier group of patients and the A allele of SDF-1 were overrepresented among the breast cancer cases ($p = 0.04$ and 0.02 , respectively). For the E-selectin S128R polymorphism, the frequencies for the wild-type (AA), AC and CC genotypes were 58.6, 38.3, and 3.1 % in patients and 63.8, 31.4, and 3.8 % in controls, respectively, while the C allelic frequency was 22.2 % for patients and 19.5 % for controls. The CC genotype was associated with poorer survival. Otherwise, no significant association was detected between examined genotypes and tumor characteristics. Overall, our findings support that the SDF-1-3' A confers increased susceptibility to breast cancer and that the E-selectin S128R CC genotype may be related to poorer prognosis. Investigation in bigger cohorts of patients is warranted.

Βιβλιογραφία

1. International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, 2014.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr 2011;61(2):69-90.
3. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. Available at <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/BreastCancerFactsFigures/breast-cancer-facts-and-figures-2011-2012>.
4. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, et al. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet.* 378(9801):1461-84, 2011.
5. Jemal A, Center MM, Desantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:1893-1907.
6. Althuis MD, Dozier JD, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973- 1997. *Int J Epidemiol.* 2005;34:405-412.
7. Autier P, Boniol M, La Vecchia C, et al. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database. *BMJ.* 2010;341:c3620.
8. Parkin DM, Namboozee S, Wabwire-Mangen F, Wabinga HR. Changing cancer incidence in Kampala, Uganda, 1991-2006. *Int J Cancer.* 2010;126:1187-1195.
9. Parkin DM, Whelan S, Ferlay J, Storm H, eds. Cancer Incidence in Five Continents. Vol I to VIII. Cancer Base No. 7. Lyon: IARC Press; 200
10. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev.* 2006;6:75-83.
11. Ito Y, Ioka A, Tanaka M, Nakayama T, Tsukuma H. Trends in cancer incidence and mortality in Osaka, Japan: evaluation of cancer control activities. *Cancer Sci.* 2009;100:2390-2395
12. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* 2001;38:103-113; discussion 113-116.
13. Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.* 2007;8:292-293.

14. Key J, Hodgson S, Omar RZ, et al. Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control*. 2006; 17:759-770.
15. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005;9:208–21.
16. Russell RC, Bulstrode CJ, Williams NS. Bailey and Love's short practice of surgery. In: Williams N, Bulstrode C, O'Connell, editors. Chapter on Breast Cancer. 23rd ed. London: Arnold; 2000.
17. Sabiston DC, Lyerly HK. 15th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1997. Sabiston textbook of surgery: The biological basis of modern surgical practice.
18. Aguas F, Martins A, Gomes TP, de Sousa M, Silva DP. Portuguese Menopause Society and Portuguese Gynaecology Society. Prophylaxis approach to a-symptomatic post-menopausal women: Breast cancer. *Maturitas*. 2005;52(Suppl 1):S23–31.
19. Murphy CE, Carder PJ, Lansdown MR, Speirs V. Steroid hormone receptor expression in male breast cancer. *Eur J of Surg Oncol*. 2006;32:44–7.
20. Cole MP, Jones CT, Todd ID. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer*. 1971;25:270–5.
21. Aiello EJ, Buist DS, White E, Porter PL. Association between mammographic breast density and breast cancer tumor characteristics. *Cancer Epidemiol*. 2005;14:662–8.
22. Weinberg OK, Marquez-Garban DC, Pietras RJ. New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer. *Drug Resist Updat*. 2005;8:219–33.
23. Hung MC, Lau WK. Basic science of HER-2/neu: A review. *Semin Oncol*. 1999;26:51–9.
24. Ganecberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M, Dileo A, et al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:675–82.
25. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, et al. Phase II study of weekly intravenous Trastuzumab (Herceptin) in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancers. *Semin Oncol*. 1999;26:78–83.
26. O'Toole SA, Beith JM, Millar EK, West R, Mclean A, Cazet A, et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2013;66:530–42.
27. Hurley J, Reis IM, Rodgers SE, Gomez-Fernandez C, Wright J, Leone JP, et al. The use of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in locally advanced breast cancer that is triple negative: Retrospective analysis of 144 patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138:783–94.

28. Wang C, Pécot T, Zynger DI, Machiraju R, Shapiro CI, Huang K. Identifying survival associated morphological features of triple negative breast cancer using multiple datasets. *J Am Med Inform Assoc.* 2013;20:680–7.
29. Al-Ejeh F, Shi W, Miranda M, Simpson PT, Vargas AC, Song S, et al. Treatment of triple-negative breast cancer using anti-EGFR directed radioimmunotherapy combined with radiosensitizing chemotherapy and parp inhibitor. *J Nucl Med.* 2013;54:913–21.
30. Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: Appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer.* 2011;18:165–73.
31. Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong ST, et al. Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19:2723–33.
32. Singh RR, Kumar R. Steroid hormone receptor signalling in tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005;96:490–505.
33. Malara NM, Leotta A, Sidoti A, Lio S, D’Angelo R, Caparello B, et al. Ageing, hormonal behaviour and cyclin D1 in ductal breast carcinomas. *Breast.* 2006;15:81–9.
34. Lerner LJ, Jordan VC. Development of antioestrogens and their use in breast cancer: Eighth cain memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990;50:4177–89.
35. Kato S, Sato T, Watanabe T, Takemasa S, Masuhiro Y, Ohtake F, et al. Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;56(Suppl 1):4–9.
36. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:791–799.
37. Connolly J, Kempson R, LiVolsi V, Page D, Patchefsky A, Silverberg S. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. *Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology.* 2004.
38. . Lagios MD, Margolin FR, Westdahl PR, Rose MR. Mammographically detected duct carcinoma in situ. Frequency of local recurrence following tylectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer.* 1989;63:618–624.
39. Poller DN, Silverstein MJ, Galea M, Locker AP, Elston CW, Blamey RW, et al. Ideas in pathology. Ductal carcinoma in situ of the breast: a proposal for a new simplified histological classification association between cellular proliferation and c-erbB-2 protein expression. *Mod Pathol.* 1994;7:257–262.

40. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ, et al. Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol*. 1994;11:167–180.
41. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, Colburn WJ, Barth A, Gierson ED, et al. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet*. 1995;345:1154–1157.
42. NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Breast Cancer*. 2010;2.
43. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93:1046–1052.
44. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133:1515–1538.
45. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:5287–5312.
46. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*. 2010;81:1339–1346.
47. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120:293–308.
48. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer—the present. *Histopathology*. 2008;52:82–90.
49. Paget J. On disease of the mammary areola preceding cancer of the mammary gland. *St. Bartholomew's Hospital Report* 1874; 10:87–89
50. Burke ET, Braeuning MP, McLelland R, Pisano ED and Cooper LL. Paget disease of the breast: a pictorial essay. *RadioGraphics* 1998; 18(6):1459–1464.
51. Da Costa D, Taddese A, Cure ML, Gerson D, Poppi ti R Jr and Esserman LE. Common and unusual diseases of the nipple- areolar complex. *Radiographics* 2007; 27 (Suppl 1):S65–S77.
52. Paone JF and Baker RR. Pathogenesis and treatment of Paget's disease of the breast. *Cancer* 1981; 48 (3): 825–829.
53. Günhan- Bilgen I and Oktay A. Paget's disease of the breast: clinical, mamographic, sonographic and pathologic findings in 52 cases. *Eur J Radiol* 2006; 60(2): 256–263.
54. Sawyer RH and Asbury DL. Mammographic appearances in Paget's disease of the breast. *Clin Radiol* 1994;49 (3):185–188.

55. Dalberg K, Hellborg H and Wörnberg F. Paget's disease of the nipple in a population based cohort. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 111(2):313–319.
56. Sakorafas GH, Blanchard DK, Sarr MG and Farley DR. Paget's disease of the breast: a clinical perspective. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386(6):444–450
57. Fu W, Mittel VK and Young SC. Paget disease of the breast: analysis of 41 patients. *Am J Clin Oncol* 2001; 24(4):397–400.
58. Ceccherini AF, Evans AJ, Pinder SE, Wilson AR, Ellis IO and Yeoman LJ. Is ipsilateral mammography worthwhile in Paget's disease of the breast? *Clin Radiol* 1996; 51 (1): 35–38.
59. Kothari AS, Beechey-Newman N, Hamed H, Fentiman IS, D'Arrigo C, Hanby AM and Ryder K. Paget disease of the nipple: a multifocal manifestation of higher-risk disease. *Cancer* 2002; 95(1):1–7.
60. Yim JH, Wick MR, Philpott GW, Norton JA and Doherty GM. Underlying pathology in mammary Paget's disease. *Ann Surg Oncol* 1997; 4(4):287–292.
61. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer. V 3.2013. National Comprehensive Cancer Network. Available at <http://bit.ly/jOuSuf>.
62. Brooks M. BRCA Testing Update: 'Do This, Don't Do That.'. *Medscape Medical News*. Available at <http://www.medscape.com/viewarticle/818267>.
63. [Guideline] Moyer VA. Risk Assessment, Genetic Counseling, and Genetic Testing for BRCA-Related Cancer in Women: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*. Dec 24 2013
64. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*. Oct 27 2005;353(17):1784-92.
65. Elmore JG, Armstrong K, Lehman CD, Fletcher SW. Screening for breast cancer. *JAMA*. Mar 9 2005;293(10):1245-56.
66. Chustecka Z. FDA Warning on Nipple Aspirate Test as Breast Cancer Screen. *Medscape Medical News* [serial online]. Dec 13 2013
67. Nyström L, Andersson I, Bjurstam N, Frisell J, Nordenskjöld B, Rutqvist LE. Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials. *Lancet*. Mar 16 2002;359(9310):909-19.

68. Tabar L, Yen MF, Vitak B, Chen HH, Smith RA, Duffy SW. Mammography service screening and mortality in breast cancer patients: 20-year follow-up before and after introduction of screening. *Lancet*. Apr 26 2003;361(9367):1405-10.
69. Noble M, Bruening W, Uhl S, Schoelles K. Computer-aided detection mammography for breast cancer screening: systematic review and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. Jun 2009;279(6):881-90.
70. Barclay L. Digital mammography: direct outperforms computed radiography. *Medscape Medical News* [serial online]. May 14, 2013
71. Chiarelli AM, Edwards SA, Prummel MV, Muradali D, Majpruz V, Done SJ, et al. Digital compared with screen-film mammography: performance measures in concurrent cohorts within an organized breast screening program. *Radiology*. May 14 2013
72. Humphrey LL, Helfand M, Chan BK, Woolf SH. Breast cancer screening: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. Sep 3 2002;137(5 Part 1):347-60.
73. Ward E, Jemal A, Thun M. Regarding "Increase in breast cancer incidence in middle-aged women during the 1990s". *Ann Epidemiol*. Jul 2005;15(6):424-5; author reply 426-7.
74. US Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer. Available at <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/uspsbrca.htm>.
75. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, Burke W, Costanza ME, Evans WP 3rd, et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin*. May-Jun 2003;53(3):141-69.
76. Hilton SV, Leopold GR, Olson LK, Willson SA. Real-time breast sonography: application in 300 consecutive patients. *AJR* 1986;147:479-486.
77. Hong AS, Rosen EL, Soo MS, Baker JA. BI-RADS for sonography: positive and negative predictive values of sonographic features. *AJR* 2005;184:1260-1265.
78. Mendelson EB, Baum JK, Berg WA, Merritt CB, Rubin E. Breast Imaging Reporting and Data System BI-RADS: Ultrasound. In: D'Orsi CJ, Mendelson EB, Ikeda DM, et al, ed. *Breast Imaging Reporting and Data System* 1st ed. Reston, Va: American College of Radiology; 2003.
79. Soo MS, Rosen EL, Baker JA, Vo TT, Boyd BA. Negative predictive value of sonography with mammography in patients with palpable breast lesions. *AJR* 2001;177:1167-1170.

80. Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, et al. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology* 2004;233:830-849.
81. Mendelson EB. Problem-solving ultrasound. *Radiol Clin North Am* 2004;42:909-918, vii.
82. Berg WA, Blume JD, Cormack JB, et al. Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA* 2008;299:2151-2163.
83. Gordon PB. Ultrasound for breast cancer screening and staging. *Radiol Clin North Am* 2002;40:431-441.
84. Alvarez S, Anorbe E, Alcorta P, Lopez F, Alonso I, Cortes J. Role of sonography in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer: a systematic review. *AJR* 2006;186:1342-1348.
85. Esen G, Gurses B, Yilmaz MH, et al. Gray scale and power Doppler US in the preoperative evaluation of axillary metastases in breast cancer patients with no palpable lymph nodes. *Eur Radiol* 2005;15:1215-1223.
86. Saslow D, Boetes C, Burke W, et al. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:75–89.
87. Lord SJ, Lei W, Craft P, et al. A systematic review of the effectiveness of magnetic resonance imaging (MRI) as an addition to mammography and ultrasound in screening young women at high risk of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2007;43:1905–1917.
88. Turnbull LW. Dynamic contrast-enhanced MRI in the diagnosis and management of breast cancer. *NMR Biomed.* 2009;22: 28–39.
89. Kopans DB. Magnetic resonance imaging of the breast. In: Kopans DB, ed. *Breast Imaging*, Third Edition. Lippincott Williams Wilkins; 2006:691–728
90. Houssami N, Ciatto S, Macaskill P, et al. Accuracy and surgical impact of magnetic resonance imaging in breast cancer staging: systematic review and meta-analysis in detection of multifocal and multicentric cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:3248–3258
91. Bilimoria KY, Cambic A, Hansen NM, Bethke KP. Evaluating the impact of preoperative breast magnetic resonance imaging on the surgical management of newly diagnosed breast cancers. *Arch Surg.* 2007; 142: 441–445; discussion 445–447.

92. Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, et al. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*. 2004;233:830–849
93. Liberman L, Morris EA, Dershaw DD, Abramson AF, Tan LK. MR imaging of the ipsilateral breast in women with percutaneously proven breast cancer. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180:901–910
94. Hollingsworth AB, Stough RG. Preoperative breast MRI for locoregional staging. *J Okla State Med Assoc*. 2006;99:505–515
95. Godinez J, Gombos EC, Chikarmane SA, Griffin GK, Birdwell RL. Breast MRI in the evaluation of eligibility for accelerated partial breast irradiation. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191:272–277
96. Taillefer R. Clinical applications of ^{99m}Tc-sestamibi scintimammography. *Semin Nucl Med*. Apr 2005;35(2):100-15.
97. Gutwein LG, Ang DN, Liu H, et al. Utilization of minimally invasive breast biopsy for the evaluation of suspicious breast lesions. *Am J Surg* 2011; 202:127.
98. Bruening W, Fontanarosa J, Tipton K, et al. Systematic review: comparative effectiveness of core-needle and open surgical biopsy to diagnose breast lesions. *Ann Intern Med* 2010; 152:238.
99. Liberman L, Ernberg LA, Heerdt A, et al. Palpable breast masses: is there a role for percutaneous imaging-guided core biopsy? *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175:779.
100. Hoorntje LE, Peeters PH, Mali WP, Borel Rinkes IH. Vacuum-assisted breast biopsy: a critical review. *Eur J Cancer* 2003; 39:1676.
101. Kettritz U, Rotter K, Schreer I, et al. Stereotactic vacuum-assisted breast biopsy in 2874 patients: a multicenter study. *Cancer* 2004; 100:245.
102. Margenthaler JA, Duke D, Monsees BS, et al. Correlation between core biopsy and excisional biopsy in breast high-risk lesions. *Am J Surg* 2006; 192:534.
103. Kopans DB, Lindfors K, McCarthy KA, Meyer JE. Spring hookwire breast lesion localizer: use with rigid-compression mammographic systems. *Radiology* 1985; 157:537.
104. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Breast Cancer, v.3.2014.
105. National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines. Invasive Breast Cancer. 2009.

106. [Guideline] Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. Jan 1 2007;25(1):118-45.
107. Jatoi I, Proschan MA. Randomized trials of breast-conserving therapy versus mastectomy for primary breast cancer: a pooled analysis of updated results. *Am j Clin oncol* 2005;28(3):289-94.
108. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon j M, Irwig L, Brennan ME, et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur j Cancer* 2010;46(18):3219-32.
109. Yin xP, Li xQ, Neuhauser D, Evans j T. Assessment of surgical operations for ductal carcinoma in situ of the breast. *Int j Technol Assess Health Care* 1997;13(3):420-9.
110. Veronesi U, Luini A, Galimberti v, Marchini S, Sacchini v, Rilke F. Extent of metastatic axillary involvement in 1446 cases of breast cancer. *Eur j Surg oncol* 1990;16(2):127-33
111. Veronesi U, Galimberti v, Zurrada S, Merson M, Greco M, Luini A. Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. *Breast* 1993;2(4):224-8.
112. Rodier j F, velten M, Wilt M, Martel P, Ferron G, vaini-Elies v, et al. Prospective multicentric randomized study comparing periareolar and peritumoral injection of radiotracer and blue dye for the detection of sentinel lymph node in breast sparing procedures: FRANSE No DE trial. *J Clin oncol* 2007;25(24):3664-9.
113. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de velde CjH, Mansel RE, Bogaerts j, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EoRTC 10981-22023 AMARoS trial. *Ann Surg oncol* 2010;17(7):1854-61
114. Kell MR, Burke jP, Barry M, Morrow M. outcome of axillary staging in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120(2):441-7
115. van der Ploeg IM, Niewego E, van Rijk MC, valdes olmos RA, kroon BB. Axillary recurrence after a tumour-negative sentinel node biopsy in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis of the literature. *Eur j Surg oncol* 2008;34(12):1277-84

116. Wang Z, Wu LC, Chen j Q. Sentinel lymph node biopsy compared with axillary lymph node dissection in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;129(3):675-89.
117. van La Parra RF, Peer PG, Ernst MF, Bosscha k. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur j Surg oncol* 2011;37(4):290-9
118. Sanghani M, Balk EM, Cady B. Impact of axillary lymph node dissection on breast cancer outcome in clinically node negative patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2009;115(8):1613-20.
119. Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de velde C j, Mansel RE, Bogaerts j, et al. Role of axillary clearance after a tumor-positive sentinel node in the administration of adjuvant therapy in early breast cancer. *J Clin oncol* 2010;28(5):731-7
120. Kelly AM, Dwamena B, Cronin P, Carlos RC. Breast cancer sentinel node identification and classification after neoadjuvant chemotherapy - systematic review and meta analysis. *Acad Radiol* 2009;16(5):551-63.
121. van Deurzen CHM, vriens BEP, Tjan-Heijnen v CG, van der Wall E, Albrechts M, van Hilligersberg R, et al. Accuracy of sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: a systematic review. *Eur j Cancer* 2009;45(18):3124-30
122. Gebiski v, Lagleva M, Keech A, Simes J, Langlands A O. Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biologically equivalent doses: a clinical perspective. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(1):26-38
123. Rowell NP. Radiotherapy to the chest wall following mastectomy for node-negative breast cancer: a systematic review. *Radiother Oncol* 2009;91(1):23-32.
124. Højris I, Overgaard M, Christensen JJ, Overgaard J. Morbidity and mortality of ischaemic heart disease in high-risk breast-cancer patients after adjuvant postmastectomy systemic treatment with or without radiotherapy: analysis of DBCG 82b and 82c randomised trials. Radiotherapy Committee of the Danish Breast Cancer Cooperative Group. *Lancet* 1999;354(9188):1425-30
125. Goodwin A, Parker S, Ghersi D, Wilcken N. Post-operative radiotherapy for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, Issue 4

126. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2010;2010(41):162-77.
127. Tai P, Joseph K, Sadikov E, Mahmood S, Lien F, Yu E. Nodal ratios in node-positive breast cancer - long-term study to clarify discrepancy of role of supraclavicular and axillary regional radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68(3):662-6.
128. Strom EA, Woodward WA, Katz A, Buchholz TA, Perkins GH, Jhingran A, et al. Clinical investigation: regional nodal failure patterns in breast cancer patients treated with mastectomy without radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63(5):1508-13.
129. Wang CW, Kuo WH, Chang KJ, Huang CS, Cheng JC. Should adjuvant radiotherapy to the supraclavicular fossa be routinely given in patients with breast conservative treatment? *J Surg Oncol* 2007;96(2):144-50.
130. Huang J, Barbera L, Brouwers M, Browman G, Mackillop WJ. Does delay in starting treatment affect the outcomes of radiotherapy? A systematic review. *J Clin Oncol* 2003;21(3):555-63.
131. Punglia RS, Saito AM, Neville BA, Earle CC, Weeks JC. Impact of interval from breast conserving surgery to radiotherapy on local recurrence in older women with breast cancer: retrospective cohort analysis. *BM J* 2010;340:c845.
132. Hershman DL, Wang X, McBride R, Jacobson JS, Grann VR, Neugut AI. Delay of adjuvant chemotherapy initiation following breast cancer surgery among elderly women. *Breast Cancer Res Treat* 2006;99(3):313-21.
133. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012;379(9814):432-44
134. Azim HA, de Azambuja E, Colozza M, Bines J, Piccart Mj. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22(9):1939-47.
135. Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M, et al. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer* 2006;106(11):2337-44.
136. De Laurentiis M, Cancellò G, D'Agostino D, Giuliano M, Giordano A, Montagna E, et al. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2008;26(1):44-53

137. Ferguson T, Wilcken N, Vagg R, Gherzi D, Nowak A. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 4.
138. Bonilla L, Ben-Aharon I, Vidal L, Gafter-Gvili A, Leibovici L, Stemmer SM. Dose-dense chemotherapy in nonmetastatic breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(24):1845-54
139. Dahabreh I J, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S. Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist* 2008;13(6):620-30
140. Moja L, Tagliabue L, Balduzzi S, Parmelli E, Pistotti V, Guarneri V, et al. Trastuzumab containing regimens for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 4
141. Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One* 2011;6(6):e21030.
142. Goldhirsch A, Piccart-Gebhart MJ, Procter M, de Azambuja E, Weber HA, Untch M, et al. HERA TRIAL: 2 years versus 1 year of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in women with HER2-positive early breast cancer at 8 years of median follow up. *Cancer Res* 2012;72(24 Suppl 3):S5-2
143. Pivot X, Romieu G, Bonnefoi H, Pierga J-Y, Kerbrat P, Guastalla J-P, et al. PHARE Trial results of subset analysis comparing 6 to 12 months of trastuzumab in adjuvant early breast cancer. *Cancer Res* 2012;72(24 Suppl 3):S5-3
144. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-92.
145. Goel S, Sharma R, Hamilton A, Beith J. LHRH agonists for adjuvant therapy of early breast cancer in premenopausal women. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009, Issue 4.
146. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378(9793):771-84

147. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365(2005):1687-717
148. Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 2013;381(9869):805-16
149. Furr B. Pharmacology of the luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) analogue, Zoladex. *Horm Res* 1989;32(Suppl 1):86-92
150. Josefsson ML, Leinster SJ. Aromatase inhibitors versus tamoxifen as adjuvant hormonal therapy for oestrogen sensitive early breast cancer in post-menopausal women: meta-analyses of monotherapy, sequenced therapy and extended therapy. *Breast* 2010;19(2):76-83
151. Hind D, Ward S, De Nigris E, Simpson E, Carroll C, Wyld L. Hormonal therapies for early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007;11(26):1-134
152. Eisen A, Trudeau M, Shelley W, Messersmith H, Pritchard KI. Aromatase inhibitors in adjuvant therapy for hormone receptor positive breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2008;34(2):157-74
153. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, et al. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(17):1262-71
154. Mir E, Seruga B, Niraula S, Carlsson L, Ocana A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(17):1299-309.
155. Brookes A J, The essence of SNPs, *Gene*, 234 (1999) 177-186.
156. Sachidanandam R, Wiessman D, Schmidt S C, Kakol J M, Stein L D et al, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms, *Nature (Lond)*, 409 (2001) 928-933.
157. Bhatramakki D, Ching A, Morgante M, Dolan M, Register J et al, Conserved single nucleotide polymorphism (SNP) haplotypes in maize, in *Proc Plant Anim Genomes VIII Conf* (San Diego, CA) 2000

158. Xiong M & Jin L, Comparison of the power and accuracy of biallelic and microsatellite markers in population based gene-mapping methods, *Am J Hum Genet*, 64 (1999) 629-640.
159. Kruglyak L, The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies, *Nat Genet*, 17 (1997) 21-24.
160. <http://www.pharmacy.upatras.gr>
161. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003; 11: 529–541.
162. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007;14:32-43.
163. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776
164. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-1042.
165. Wang, Y.X., Zhao, L., Wang, X.Y. et al. Role of *Caspase 8*, *Caspase 9* and *Bcl-2* polymorphisms in papillary thyroid carcinoma risk in Han Chinese population. *Med Oncol*. 2011
166. Liarmakopoulos, E., Gazouli, M., Aravantinos, G. et al. *Caspase 8* and *caspase 9* gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2011; 14: 317–321
167. Lee, S.Y., Choi, Y.Y., Choi, J.E. et al. Polymorphisms in the caspase genes and the risk of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2010; 5: 1152–1158
168. Park, J.Y., Park, J.M., Jang, J.S. et al. *Caspase 9* promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Hum Mol Genet*. 2006; 15: 1963–1971
169. Hosgood, H.D. 3rd, Baris, D., Zhang, Y. et al. Caspase polymorphisms and genetic susceptibility to multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2008; 26: 148–151
170. Lan, Q., Zheng, T., Chanock, S. et al. Genetic variants in caspase genes and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 823–827
171. Ulybina, Y.M., Kuligina, E.S., Mitiushkina, N.V. et al. Distribution of coding apoptotic gene polymorphisms in women with extreme phenotypes of breast cancer predisposition and tolerance. *Tumori*. 2011; 97: 248–251
172. Liu, C.Y., Wu, M.C., Chen, F. et al. A large-scale genetic association study of esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 1259–1263
173. Kelly, J.L., Novak, A.J., Fredericksen, Z.S. et al. Germline variation in apoptosis pathway genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010; 19: 2847–2858

174. Goehe, R.W., Shultz, J.C., Murudkar, C. et al. hnRNP L regulates the tumorigenic capacity of lung cancer xenografts in mice via caspase-9 pre-mRNA processing. *J Clin Invest.* 2010; 120: 3923–3939
175. Kesarwani, P., Mandal, R.K., Maheshwari, R. et al. Influence of caspases 8 and 9 gene promoter polymorphism on prostate cancer susceptibility and early development of hormone refractory prostate cancer. *BJU Int.* 2011; 107: 471–476
176. Gangwar, R., Mandhani, A., and Mittal, R.D. *Caspase 9* and *Caspase 8* gene polymorphisms and susceptibility to bladder cancer in North Indian population. *Ann Surg Oncol.* 2009; 16: 2028–2034
177. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261: 600–603, 1993.
178. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28: 495–500, 1995.
179. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 35760–35766, 2005.
180. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175–189, 2006.
181. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124: 407–421, 2006.
182. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3: 687–694, 2002.
183. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 106: 1331–1339, 2000.

184. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393: 595–599, 1998.
185. Kryczek I, Grybos M, Dlubek D, Klimczak A, Rabczynski J, Lange A. Accumulation of CD45RO⁺ cells in peritoneal carcinomatous fluid favours survival of ovarian carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 51: 513–519, 2002.
186. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61: 4961–4965, 2001.
187. Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, Wei S, Krzysiek R, Durand-Gasselini I, Gordon A, Pustilnik T, Curiel DT, Galanaud P, Capron F, Emilie D, Curiel TJ. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 7: 1339–1346, 2001.
188. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 173: 4433–4442, 2004.
189. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62: 1832–1837, 2002.
190. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 62: 7203–7206, 2002.
191. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7: R402–R410, 2005.
192. Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziante R, Florio T, Schettini G. Stromal cell-derived factor 1 α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* 63: 1969–1974, 2003.
193. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutierrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 6: 102–111, 2000.

194. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 6: 3530–3535, 2000.
195. Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res* 64: 8420–8427, 2004.
196. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 18: 1240–1242, 2004.
197. Sun YX, Wang J, Shelburne CE, Lopatin DE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Pienta KJ, Taichman RS. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 89: 462–473, 2003.
198. Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY, Shong M. CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 408–416, 2003.
199. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6: 17–32, 2004.
200. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121: 335–348, 2005.
201. Begley L, Monteleon C, Shah RB, Macdonald JW, Macoska JA. CXCL12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell* 4: 291–298, 2005.
202. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858–864, 2004.
203. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17: 792–803, 2003.

204. Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46: 2587–2597, 2002.
205. Kryczek I, Lange A, Mottram P, Alvarez X, Cheng P, Hogan M, Moons L, Wei S, Zou L, Machelon V, Emilie D, Terrassa M, Lackner A, Curiel TJ, Carmeliet P, Zou W. CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 65: 465–472, 2005.
206. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721–732, 2003.
207. G. S. Kansas, “Selectins and their ligands: current concepts and controversies,” *Blood*, vol. 88, no. 9, pp. 3259–3287, 1996.
208. K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, “Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 9, pp. 678–689, 2007.
209. M. Sperandio, C. A. Gleissner, and K. Ley, “Glycosylation in immune cell trafficking,” *Immunological Reviews*, vol. 230, no. 1, pp. 97–113, 2009.
210. A. Varki, “Selectin ligands: will the real ones please stand up?” *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 2, pp. 158–162, 1997.
211. R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, and N. Kimura, “Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis,” *Cancer Science*, vol. 95, no. 5, pp. 377–384, 2004.
212. Y. J. Kim and A. Varki, “Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer,” *Glycoconjugate Journal*, vol. 14, no. 5, pp. 569–576, 1997.
213. L. Borsig, J. L. Stevenson, and A. Varki, “Heparin in cancer: role of selectin interactions,” in *Cancer-Associated Thrombosis*, A. A. Khorana and C. W. Francis, Eds., pp. 97–113, Informa Healthcare, New York, NY, USA, 2007.
214. Y. J. Kim, L. Borsig, H. L. Han, N. M. Varki, and A. Varki, “Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium,” *American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 2, pp. 461–472, 1999.
215. G. Mannori, P. Crottet, O. Cecconi et al., “Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins,” *Cancer Research*, vol. 55, no. 19, pp. 4425–4431, 1995.

216. I. P. Witz, "The selectin-selectin ligand axis in tumor progression," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 27, no. 1, pp. 19–30, 2008.
217. H. Läubli and L. Borsig, "Selectins promote tumor metastasis," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 20, no. 3, pp. 169–177, 2010.
218. L. Borsig, R. Wong, J. Feramisco, D. R. Nadeau, N. M. Varki, and A. Varki, "Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 6, pp. 3352–3357, 2001.
219. L. Borsig, R. Wong, R. O. Hynes, N. M. Varki, and A. Varki, "Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 4, pp. 2193–2198, 2002.
220. Y. J. Kim, L. Borsig, N. M. Varki, and A. Varki, "P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 16, pp. 9325–9330, 1998.
221. S. Köhler, S. Ullrich, U. Richter, and U. Schumacher, "E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung," *British Journal of Cancer*, vol. 102, no. 3, pp. 602–609, 2010.
222. H. Läubli and L. Borsig, "Selectins as mediators of lung metastasis," *Cancer Microenvironment*, vol. 3, no. 1, pp. 97–105, 2010.
223. A. M. Khatib, M. Kontogianna, L. Fallavollita, B. Jamison, S. Meterissian, and P. Brodt, "Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells," *Cancer Research*, vol. 59, no. 6, pp. 1356–1361, 1999.
224. S. Gout, P. L. Tremblay, and J. Huot, "Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis," *Clinical and Experimental Metastasis*, vol. 25, no. 4, pp. 335–344, 2008.
225. S. Hiratsuka, S. Goel, W. S. Kamoun et al., "Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 9, pp. 3725–3730, 2011.

226. Peng, S., Lu, B., Ruan, W. et al. Genetic polymorphisms and breast cancer risk: evidence from meta-analyses, pooled analyses, and genome-wide association studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 127: 309–324
227. Shuen, A.Y. and Foulkes, W.D. Inherited mutations in breast cancer genes-risk and response. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011; 16: 3–15
228. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144: 646–674
229. Polyak K (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117(11):3155–3163.
230. Tang P, Skinner KA, Hicks DG (2009) Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol* 18(3):125–132.
231. Gupta GP, Massague J (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127(4):679–695.
232. Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2):121–127
233. Vagima Y, Lapid K, Kollet O, Goichberg P, Alon R, Lapidot T (2011) Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis. *Methods Mol Biol* 750:277–289. doi:10.1007/978-1-61779-145-1_19
234. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824):50–56.
235. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ (1998) Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 279(5349):389–393
236. Theodoropoulos GE, Panoussopoulos GS, Michalopoulos NV, Zambirinis CP, Taka S, Stamopoulos P, Gazouli M, Zografos G (2010) Analysis of the stromal cell-derived factor 1–3'A gene polymorphism in pancreatic cancer. *Mol Med Rep* 3(4):693–698.
237. Laubli H, Borsig L (2010) Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 20(3):169–177.

238. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 106(4):467–476
239. Somers WS, Tang J, Shaw GD, Camphausen RT (2000) Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* 103(3):467–479
240. Sperandio M, Gleissner CA, Ley K (2009) Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev* 230(1):97–113.
241. Gout S, Morin C, Houle F, Huot J (2006) Death receptor-3, a new E-selectin counter-receptor that confers migration and survival advantages to colon carcinoma cells by triggering p38 and ERK MAPK activation. *Cancer Res* 66(18):9117–9124.
242. Wenzel K, Hanke R, Speer A (1994) Polymorphism in the human E-selectin gene detected by PCR-SSCP. *Hum Genet* 94(4):452–453
243. Reville BM, Scott D, Beck PJ (1996) Single amino acid residues in the E- and P-selectin epidermal growth factor domains can determine carbohydrate binding specificity. *J Biol Chem* 271(27):16160–16170
244. Edge SB, American Joint Committee on Cancer (2010) *AJCC cancer staging manual*. 7th edn. Springer, New York
245. Panoussopoulos GS, Theodoropoulos G, Michalopoulos NV, Gazouli M, Flessas J, Taka S, Stamopoulos P, Manouras A, Zografos GC (2010) Analysis of E-selectin S128R gene polymorphism in pancreatic cancer. *J Surg Oncol* 102(6):604–607.
246. Theodoropoulos, G.E., Gazouli, M., Vaiopoulou, A. et al. Polymorphisms of *caspase 8* and *caspase 9* gene and colorectal cancer susceptibility and prognosis. *Int J Colorectal Dis*. 2011; 26: 1113–1118
247. Biancone L, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I (1996) Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med* 183(2):581–587
248. Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG (2005) Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7(4):R402–R410.
249. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast

- carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121(3):335–348.
250. Cabioglu N, Summy J, Miller C, Parikh NU, Sahin AA, Tuzlali S, Pumiglia K, Gallick GE, Price JE (2005) CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer Res* 65(15):6493–6497.
251. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW (2006) Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 86(12):1221–1232.
252. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A, Rapisarda A, Bernasconi S, Saccani S, Nebuloni M, Vago L, Mantovani A, Melillo G, Sica A (2003) Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 198(9):1391–1402.
253. Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4(7):540–550.
254. Zafiroopoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA (2004) Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet* 41(5):e59
255. Razmkhah M, Talei AR, Doroudchi M, Khalili-Azad T, Ghaderi A (2005) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. *Cancer Lett* 225(2):261–266.
256. Hassan S, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M (2008) Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived marker predictive of distant metastasis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14(2):446–454.
257. Miles FL, Pruitt FL, van Golen KL, Cooper CR (2008) Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25(4):305–324.
258. Kufe DW (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer* 9(12):874–885.
259. Renkonen J, Paavonen T, Renkonen R (1997) Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer* 74(3):296–300.
260. Julien S, Ivetic A, Grigoriadis A, QiZe D, Burford B, Sproviero D, Picco G, Gillett C, Papp SL, Schaffer L, Tutt A, Taylor-Papadimitriou J, Pinder SE, Burchell JM (2011) Selectin

ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res* 71(24):7683–7693.

261. Hebbar M, Adenis A, Revillion F, Duhamel A, Romano O, Truant S, Libersa C, Giraud C, Triboulet JP, Pruvot FR, Peyrat JP (2009) E-selectin gene S128R polymorphism is associated with poor prognosis in patients with stage II or III colorectal cancer.
262. Naidu R, Har YC, Taib NA (2011) Polymorphic variant Ser128Arg of E-selectin is associated with breast cancer risk and high grade tumors. *Onkologie* 34(11):592–597.