

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ
Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ ΠΑΤΣΟΥΡΗΣ**

**Διερεύνηση της ενδοκυττάριας εντόπισης
της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης Maspin,
της συσχέτισής της με την έκφραση του αγγειακού
ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF)
και των σχέσεων αυτών με το HER2 και άλλες
κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους
στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού.**

ΑΘΗΝΑ 2013

**ΜΑΡΙΟΣ Θ. ΠΑΝΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Lymph

Breast

Mamm

Nipple

ΕΙΚΟΝΑ ΕΞΩΦΥΛΛΟΥ:

Ο μηχανισμός δράσης των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων.

The mechanism of action of anti-VEGF agents:

1. Regression of tumor vasculature.
2. Normalization of surviving vasculature.
3. Inhibition of new and recurrent vessel growth.

http://www.anti-vegf.ru/portal/eipf/pb/avastin/sciencevegf/proposed_mode_of_action_of_anti-vegf_agents?requestid=352961

ΕΙΚΟΝΑ ΕΣΩΦΥΛΛΟΥ:

Η ανατομία του μαστού.



Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει και αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα.

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2)

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΗΥΜΙ ΑΠΟΛΛΑΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ
 ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΜΗΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΗΣΑΣΘΑΙ Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΗΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΘΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
 ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΘ
 ΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
 ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΜΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΕΠΙ ΔΙΑΛ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΜΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΟΥΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ ΑΓΝΟΥΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΟΥΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΛΝΤΑΣ ΕΚΧΥΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
 ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕΣΥ
 ΚΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΩΡΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ Α Δ' ΑΝ ΕΜ ΘΕΡΑΠΕΙΗ
 Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΗΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΩΡΩΝ Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΜΕΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙ ΤΕΛΕ
 Α ΠΟΙΕΩΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΣΙΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ Π
 ΑΣΙΝ ΑΝΩΡΩΝ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΒΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠ' ΟΡΚΟΥΝΤΙ ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕ ΩΝ

OATH OF HIPPOCRATES

I SWEAR BY APOLLO THE PHYSICIAN AND AEscu-
 LAPUS AND HEALTH AND ALL HEAL, AND AL-
 L THE GODS AND GODDESSES THAT, ACCORDING
 TO MY ABILITY AND JUDGEMENT, I WILL KEEP TH-
 IS OATH AND THIS STIPULATION. I RECKON H-
 IM WHO TAUGHT ME THIS ART EQUALLY DEAR T-
 O ME AS MY PARENTS, TO SHARE MY SUBSTANCE W-
 ITH HIM, AND RELIEVE HIS NECESSITIES IF REQUIRED,
 TO LOOK UPON HIS OFFSPRING IN THE SAME FOOT-
 ING AS MY OWN BROTHERS, AND TO TEACH THEM
 THIS ART, IF THEY SHALL WISH TO LEARN, IT WITH-
 OUT FEE OR STIPULATION AND THAT BY PRECEPT
 LECTURE AND EVERY OTHER MODE OF INSTRUCTIO-
 N, I WILL IMPART KNOWLEDGE OF THE ART TO MY O-
 WN SONS AND THOSE OF MY TEACHERS AND TO DIS-
 CIPLES BOUND BY A STIPULATION AND OATH ACCOR-
 DING TO THE LAW OF MEDICINE, BUT TO NONE OTH-
 ERS. I WILL FOLLOW THAT SYSTEM OF REGIMEN
 WHICH ACCORDING TO MY ABILITY AND JUDGEMENT
 I CONSIDER FOR THE BENEFIT OF MY PATIENTS AND
 ABSTAIN FROM WHATEVER IS DELETERIOUS AND
 INEFFECTUOUS. I WILL GIVE NO DEADLY MEDICINE
 TO ANYONE IF ASKED, NOR SUGGEST ANY SUCH CO-
 UNSEL, AND IN LIKE MANNER I WILL NOT GIVE TO A
 WOMAN A PESSARY TO PRODUCE ABORTION.
 WITH PURITY AND WITH HOLINESS I WILL PASS MY
 LIFE AND PRACTICE MY ART. I WILL NOT CUT P-
 ERSONS LABORING UNDER THE STONE, BUT WILL LE-
 AVE THIS TO BE DONE BY MEN WHO ARE PRACTI-
 CIANERS OF THIS WORK. INTO WHATEVER H-
 OUSES I ENTER, I WILL GO INTO THEM FOR THE B-
 ENEFIT OF THE SICK, AND WILL ABSTAIN FROM EV-
 ERY VOLUNTARY ACT OF MISCHIEF AND CORRUPTI-
 ON AND FURTHER, FROM THE SEDUCTION OF FE-
 MALES OR MALES, OF FREEMEN AND SLAVES.
 WHATEVER, IN CONNECTION WITH MY PROFESSIO-
 NAL PRACTICE, OR NOT IN CONNECTION WITH IT,
 I SEE OR HEAR, IN THE LIFE OF MEN, WHICH OUGHT
 NOT TO BE SPOKEN OF ABROAD, I WILL NOT DIVULGE
 AS RECKONING THAT ALL SUCH SHOULD BE KEPT
 SECRET. WHILE I CONTINUE TO KEEP THIS OATH
 UNVIOLATED, MAY IT BE GRANTED TO ME TO ENJOY
 LIFE AND THE PRACTICE OF THE ART, RESPECTED BY
 MEN IN ALL TIMES, BUT SHOULD I TREPASS AND VI-
 OLE THIS OATH, MAY THE REVERSE BE MY LOT.



Ευχαριστίες

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή της Χειρουργικής της Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Γεώργιο Ζωγράφο για το σύνολο των γνώσεων που απέκτησα κοντά του όλα τα χρόνια από το Ακαδημαϊκό Έτος 1999-2000 ως σήμερα. Κατά το προαναφερθέν Ακαδημαϊκό Έτος, ως 4ετής φοιτητής της Ιατρικής, βρέθηκα για πρώτη φορά στο πλάι του και ξεκίνησε έτσι μια μακρά πορεία μάθησης και εμπειρίας, η οποία περιελάμβανε την πολυετή συμμετοχή μου στο έργο του «Ιατρείου Μαστού» τότε, της «Μονάδος Μαστού» εν συνεχεία, της Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο καθώς και την εκπόνηση της Διδακτορικής μου Διατριβής. Τον ευχαριστώ, επίσης, για την πολύτιμη διαπροσωπική σχέση, διάρκειας σχεδόν 14 ετών πλέον και για το παράδειγμα του σοφού δασκάλου και ακούραστου ιατρού, που απετέλεσε και αποτελεί πρότυπο και για το δικό μου προσανατολισμό.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Ομότιμο Καθηγητή της Χειρουργικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ιωάννη Μπράμη για την προσφορά του προς εμένα από τα φοιτητικά μου χρόνια, όταν ως βετής φοιτητής είχα την τύχη να είμαι μαθητής του στο Λαϊκό Νοσοκομείο, αλλά και για τις συμβουλές του έκτοτε στο Ιπποκράτειο Νοσοκομείο, καθώς και την εν γένει στιβαρή παρουσία του, που με εμπνέει και με στηρίζει ως σήμερα.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Νικόλαο Καβαντζά για την πολυσχιδή του προσφορά προς εμένα κατά τα χρόνια της εκπόνησης της Διδακτορικής μου Διατριβής στο Α΄ Εργαστήριο της Παθολογικής Ανατομικής. Κατά τα χρόνια αυτά, μού στάθηκε ακούραστα, μού προσέφερε άπλετη γνώση, μού έλυσε τα προβλήματα, με στήριζε στις αντιξοότητες, τις δυσχέρειες και τις δυσκολίες, μού συμπαραστάθηκε συνολικά αμέριστα και ποικιλότροπα. Τον ευχαριστώ για όλα και τού είμαι ευγνώμων.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή και Διευθυντή του Α΄ Εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ευστράτιο Πατσούρη για τη δυνατότητα που μού προσέφερε και τις διευκολύνσεις που μού παρέσχε για την απρόσκοπτη διενέργεια της έρευνάς μου στο εργαστήριο.

Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου για την αληθινά καθοριστική συνεισφορά της στην ολοκλήρωση της έρευνας αυτής.

Ευχαριστώ το φίλο, συνάδελφο και συνεργάτη Θεόδωρο Σεργεντάνη για τη μείζονα βοήθειά του σε πολλά επίπεδα ώστε να έλθει εις πέρας η έρευνά μου.

Ευχαριστώ την πρώην συμφοιτήτρια και νυν συνάδελφο και φίλη, παθολογοανατόμο Στρατηγούλα Σακελλαρίου για την ανεκτίμητη

συμβολή της στη διεκπεραίωση του εργαστηριακού τμήματος της διατριβής.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Καλλιόπη για την κατανόηση, υπομονή και συνεχή συμπαράσταση, τους γονείς μου για τους άπειρους κόπους τους από τα παιδικά μου χρόνια και την παντοειδή και πολύχρονη στήριξη και βοήθεια κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά και της ιατρικής μου ως τώρα καριέρας και την αδελφή μου και συνάδελφο Οφθαλμίατρο Νικόλ Πάνου για την πολυπόικλη βοήθειά της ηθική και επιστημονική.

Μάριος Θ. Πάνου

Αθήνα, Ιαν. 2013

Επιβλέπων Καθηγητής: κ. Γεώργιος Κ. Ζωγράφος – Καθηγητής Χειρουργικής – Διευθυντής Α΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών – Ιπποκράτειο Νοσοκομείο

Τα μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

- Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Αθηνών
κ. Γεώργιος Κ. Ζωγράφος – Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική – Ιπποκράτειο Νοσοκομείο
- Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Αθηνών
κ. Ιωάννης Μπράμης
- Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών **κ. Νικόλαος Καβαντζάς** – Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής

Λοιπά μέλη 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

- Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών
κ. Ευστράτιος Πατσούρης – Διευθυντής Α΄ Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής
- Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Πανεπιστημίου Αθηνών **κ. Πηνελόπη Κορκολοπούλου** – Α΄ Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής
- Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Αθηνών
κ. Ευάγγελος Μενενάκος – Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική – Ιπποκράτειο Νοσοκομείο

- Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου Αθηνών
κ. Κωνσταντίνος Τούτουζας – Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική
Κλινική – Ιπποκράτειο Νοσοκομείο

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής:

01 / 2013

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I.	Εισαγωγή.....	19
II.	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
	II-1. Ανατομία και φυσιολογία του μαστού.....	25
	II-2. Ιστορία της αιτιοπαθογένειας και των φαρμακευτικών θεραπειών του καρκίνου του μαστού.....	37
	II-2.1 Ιστορία των θεωριών σχετικά με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του μαστού.....	39
	II-2.2 Ιστορία των φαρμακευτικών θεραπειών του καρκίνου του μαστού.....	46
	II-3. Γενικά στοιχεία περί του καρκίνου του μαστού	
	II-3.1 Επιδημιολογία.....	77
	II-3.2 Παράγοντες κινδύνου (Risk factors).....	89
	II-3.3 Ιστολογική ταξινόμηση.....	121
	II-3.3.1 Ιστολογικοί τύποι.....	121
	II-3.3.2 Προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας (Grading).....	125
	II-3.4 Σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM (Staging).....	127
	II-3.5 Σύγχρονη μοριακή ταξινόμηση.....	132

II-4. Vascular Endothelial Growth Factor (Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας) – VEGF	
II-4.1 Εισαγωγή.....	139
II-4.2 Ιστορία της αγγειογένεσης, του VEGF και της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας.....	139
II-4.3 Η «ύπνωση του όγκου» (tumor dormancy) και ο «αγγειογενετικός διακόπτης» (angiogenic switch).....	143
II-4.4 Νεοαγγειογένεση (neovascularization) και αγγειογένεση (angiogenesis).....	146
II-4.5 Η νεοαγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού...	150
II-4.6 Μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density – MVD) και CD34.....	153
II-4.7 Ο Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) και οι υποδοχείς του (VEGFRs)..	153
II-4.8 Ρύθμιση της έκφρασης του VEGF.....	158
II-4.9 Angiopoietins, HIF-1 και ο ρόλος τους στη νεοαγγειογένεση.....	161
II-4.10 Ο VEGF στον καρκίνο του μαστού.....	167
II-4.11 Αντι-VEGF θεραπείες στον καρκίνο του μαστού.....	168

II-6. Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 – HER2	
II-6.1 Η οικογένεια των HER (erbB) υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs), οι συνδέτες (ligands) των μελών της και το downstream σηματοδοτικό μονοπάτι (signaling pathway)....	199
II-6.2 Το HER2 (c-erbB2) – γονίδιο, πρωτεΐνη και συμμετοχή στον καρκίνο του μαστού.....	204
II-6.3 Οι λειτουργίες του HER2.....	207
II-6.4 Αντι-HER2 θεραπείες.....	208
II-6.5 Συνδυασμοί αντι-HER2 θεραπειών με άλλες θεραπείες στον καρκίνο του μαστού.....	213
II-7. Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors – ER) και προγεστερόνης (Progesterone Receptors – PR) στον καρκίνο του μαστού.....	217
II-8. Συνοπτική αναφορά στις συνομιλίες (cross-talks) μεταξύ βασικών μοριακών δρόμων και στην αντίσταση των όγκων στις θεραπείες (κλασσικές & στοχευμένες) λόγω των cross-talks, στον καρκίνο του μαστού	
II-8.1 Εισαγωγή.....	225
II-8.2 Παραδείγματα σημαντικών επικοινωνιών (cross- talks) μεταξύ μοριακών σηματοδοτικών δρόμων (signaling pathways) στο κύτταρο με ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο του μαστού.....	228

II-8.3 Αντίσταση στην αντι-HER2 στοχευμένη αγωγή (Trastuzumab).....	233
II-8.4 Αντίσταση στην αντι-VEGF και αντι-VEGFR στοχευμένη αγωγή (π.χ. Bevacizumab, Sunitinib).....	238
II-8.5 Αντίσταση στην Ορμονοθεραπεία.....	238
II-8.6 Αντίσταση στην Ακτινοθεραπεία.....	243
II-8.7 Φαρμακευτικές θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού με πρόσθετες διαφορετικές δράσεις, από τις προσδοκώμενες βάσει του αρχικού σχεδιασμού, λόγω των cross-talks.....	243
II-9. Ασαφή και διφορούμενα θέματα σχετιζόμενα με τη maspin και το VEGF.....	247
II-10. Σκοποί της μελέτης.....	251
III. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
III-1. Υλικό και Μέθοδοι	
III-1.1 Ασθενείς και δείγματα.....	259
III-1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι προς σύγκριση.....	260
III-1.3 Ανοσοϊστοχημική μέθοδος.....	261
III-1.4 Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	265

III-1.5 Σύστημα Ανάλυσης Εικόνας – Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα.....	267
III-1.6 Στατιστικές μέθοδοι.....	271
III-2. Αποτελέσματα	
III-2.1 Περιγραφή του δείγματος της έρευνας.....	275
III-2.2 Καταγραφή των μετρήσεων από το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα και από το οπτικό μικροσκόπιο (Light Microscopy – LM).....	292
III-2.3 Υπολογισμοί των $IRS_{PATHOLOGIST SCORES}$ και των $IRS_{I.A.SCORES}$	310
III-2.4 Στατιστικές συσχετίσεις.....	313
III-2.5 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο και το Computerized Image Analysis σύστημα.....	321
III-3. Συζήτηση.....	347
III-4. Συμπεράσματα.....	373
IV. Περίληψη (Summary).....	379
V. Δημοσίευση του Paper.....	385
VI. Βιβλιογραφία.....	411

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού προσβάλλει περίπου μία στις δέκα γυναίκες στις υγειονομικά ανεπτυγμένες χώρες και έχει τεκμαρτή πενταετή επιβίωση που πλησιάζει το 70% [1]. Κατά τον 20ό αιώνα, αλλά και στις αρχές του 21^{ου} αιώνα και μέχρι σήμερα, έγιναν και εξακολουθούν να πραγματοποιούνται εντατικές προσπάθειες με στόχο τη διαλεύκανση της αιτιολογίας, την πρόληψη και την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

Ωστόσο, παρά τις τεράστιες προόδους που έχουν συντελεσθεί στη διαλεύκανση της αιτιολογίας (κατανόηση καίριων παθοφυσιολογικών μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης και διασαφήνιση της λειτουργίας ενδοκυττάρων σηματοδοτικών δρόμων), στην πρόληψη (γενίκευση του πληθυσμιακού screening μέσω της μαστογραφίας) και στη θεραπεία (ορμονοθεραπεία – αναστολείς της αρωματάσης, στοχευμένες θεραπείες κ.ά.), ο καρκίνος του μαστού εξακολουθεί να αποτελεί μία από τις βασικότερες αιτίες θανάτου των γυναικών στο δυτικό κόσμο. Σε σχέση με άλλα νοσήματα, στο δυτικό κόσμο, ο καρκίνος του μαστού ευθύνεται για περισσότερους θανάτους γυναικών μέσης ηλικίας από ό,τι τα τροχαία ατυχήματα, καθώς επίσης και για περισσότερα χαμένα χρόνια ζωής σε σχέση με κάθε άλλη νοσολογική οντότητα για γυναίκες κάθε ηλικίας [2].

Για το λόγο αυτό, η έρευνα που διεξάγεται και αφορά στον καρκίνο εν γένει και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα είναι τεράστια και παγκόσμια. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας μόνο δεκαετίας

δημοσιεύτηκαν περισσότερες από 20.000 ερευνητικές μελέτες καθώς και αρκετά βιβλία και μονογραφίες σχετικά με τον καρκίνο του μαστού [2]. Η γιγαντιαία αυτή παγκόσμια ερευνητική πορεία οδήγησε σε μεγάλες ανακαλύψεις, όπως για παράδειγμα το περίφημο μονοκλωνικό αντίσωμα Trastuzumab, το οποίο μετέβαλε τη φυσική πορεία του HER2(+) καρκίνου του μαστού, αλλά και σε μεγάλες διαψεύσεις και απογοητεύσεις, όπως ήταν η αντι-αγγειογενετική θεραπεία. Η τελευταία ειδικά, όταν εμφανίστηκε προ 10 ετών περίπου, προκάλεσε ρίγη ενθουσιασμού στη διεθνή ιατρική κοινότητα και καλλιέργησε τεράστιες προσδοκίες, που έφθναν ως την ελπίδα πλήρους ίασης του καρκίνου. Οι προσδοκίες, όμως, αυτές σε μεγάλο βαθμό διαψεύστηκαν και η θεραπεία κατέλαβε απλώς τη θέση ενός χρήσιμου επικουρικού θεραπευτικού εργαλείου...Και ο πόλεμος της επιστημονικής κοινότητας με τον καρκίνο συνεχίζεται...

Το βάρος της συνεχιζόμενης έρευνας πέφτει όχι μόνο στην εύρεση νέων φαρμάκων και μεθόδων πρόληψης, αλλά κυρίως και πρωτίστως στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών. Κι αυτό, γιατί η περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης μπορεί να οδηγήσει τόσο στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών ουσιών όσο και στην εντόπιση νέων μορίων-δεικτών με προγνωστική και/ή διαγνωστική αξία, καθώς και με δυνατότητες παρακολούθησης της νόσου.

Ένα μόριο, το οποίο προ 15 περίπου ετών γέννησε ελπίδες για τη χρήση του κυρίως ως προγνωστικού δείκτη ήταν η ογκοκατασταλτική

πρωτεΐνη maspin. Για μία ακόμη, όμως, φορά στην έρευνα κατά του καρκίνου υπήρξε διάψευση των αρχικών προσδοκιών. Η βιολογική συμπεριφορά της maspin φάνηκε πως ήταν εξαιρετικά πολύπλοκη και τα δεδομένα των σχετικών ερευνών, σχετικά με το ρόλο της τόσο στον καρκίνο εν γένει όσο και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα, ήταν επί χρόνια, σε σημαντικό βαθμό αν όχι απολύτως, αντικρουόμενα και αντιφατικά.

Γιατί συνέβη αυτό άραγε; Το γιατί επιχειρούμε να αναλύσουμε στη μελέτη μας αυτή και ταυτόχρονα προσπαθούμε να φωτίσουμε σκοτεινά σημεία της παρουσίας της πρωτεΐνης αυτής:

- Πού ακριβώς βρίσκεται η maspin μέσα στο κύτταρο;
- Ποιος ο βιολογικός ρόλος της ενδοκυττάριας κατανομής της;
- Σχετίζεται η δράση της ως ογκοκαταστολέα με τη διαδικασία της αγγειογένεσης, το VEGF και άλλα μόρια όπως ο υποδοχέας HER2;

Με αυτά και άλλα ερωτήματα ασχοληθήκαμε στη μελέτη αυτή αισιοδοξώντας να συμβάλουμε κι εμείς στη σχετική έρευνα και στη μελλοντική χρήση της maspin ως δείκτη με προγνωστική, και όχι μόνο, αξία στον καρκίνο γενικά και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα.

II**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

II-1

Ανατομία και Φυσιολογία

του μαστού

I. Ανατομία του μαστού

Οι μαστοί είναι δύο ημισφαιρικά μορφώματα που βρίσκονται πάνω στην περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός, στο ύψος της 3^{ης}-7^{ης} πλευράς μεταξύ του στέρνου και της μασχάλης. Το διάστημα μεταξύ των μαστών καλείται μεσομάστιος κόλπος.

Το μέγεθός τους ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία. Στα κορίτσια είναι υποτυπώδεις και αυξάνουν μετά την εμφάνιση της έμμηνης ρύσης. Κατά τη διάρκεια της κύησης και του θηλασμού αυξάνουν ακόμη περισσότερο και, τέλος, μετά την κλιμακτήριο αρχίζουν να ατροφούν.

Περιγραφικά ο μαστός εμφανίζει πρόσθια επιφάνεια, οπίσθια και περιφέρεια. Η πρόσθια επιφάνεια είναι υπόκυρτη. Το δέρμα της είναι λείο και λεπτό, στη μέση δε αυτής προέχει η θηλή του μαστού, γύρω από την οποία σχηματίζεται η θηλαία άλως. Η οπίσθια επιφάνεια είναι επίπεδη, επί υπέρμετρης δε ανάπτυξης του μαστού, επεκτείνεται και πέραν της περιτονίας του μείζονος θωρακικού μυός πάνω στον πρόσθιο οδοντωτό μυ.

Εάν κάνουμε μία τομή στο μαστό (βλ. Εικόνα 1), για να δούμε μακροσκοπικά το εσωτερικό του, θα παρατηρήσουμε από έξω προς τα μέσα:

- i. Το δέρμα
- ii. Το περιμαστικό λίπος
- iii. Το μαστικό αδένια (ή μαζικό)

Το δέρμα στη θηλή και τη θηλαία άλω έχει σκοτεινότερο χρώμα και αυτό, γιατί υπάρχουν στα σημεία αυτά περισσότερα μελανοφόρα κύτταρα.

Η θηλαία άλως περιβάλλει τη θηλή, έχει διάμετρο περίπου 3-4 εκ και επιφάνεια ρυτιδωμένη, μεταξύ δε των ρυτίδων ανευρίσκονται οι σμηγόνιοι αδένες ή φυμάτια Montgomery, οι οποίοι μεγεθύνονται ακόμη περισσότερο κατά την κύηση, καθώς και οι μικρότεροι σμηγματογόνοιοι αδένες.

Η θηλή είναι μια κωνοειδής προεξοχή μεγεθυνόμενη κατά το θηλασμό. Βρίσκεται στο ύψος του 4^{ου} μεσοπλεύριου διαστήματος. Εμφανίζει ρωγμές, στον πυθμένα των οποίων υπάρχουν 20 περίπου τρήματα στα οποία εκβάλλουν οι γαλακτοφόροι πόροι του μαστού. Η θηλή αποτελείται από δέρμα, ινώδη ελαστικό ιστό και λείες μυϊκές ίνες, το σύνολο των οποίων αποτελεί το θηλαίο μυ (σφιγκτήρα).

Το περιμαστικό λίπος σχηματίζει ένα λιπώδες στρώμα, που περιβάλλει όλο το μαστό εκτός από τη θηλή και τη θηλαία άλω και είναι αφθονότερο στην πρόσθια επιφάνεια. Σε διατομή, το περιμαστικό λίπος εμφανίζει λοβιώδη όψη και τούτο, γιατί στη μάζα του απαντούν δεσμίδες (καθεκτικές), οι οποίες κατά κάποιο τρόπο το καθλώνουν και κατ' επέκταση προσδίδουν λοβιώδη όψη και στο μαζικό αδένα.

Ο μαστικός (ή μαζικός) αδένας βρίσκεται επί τα εντός του περιμαστικού λίπους, έχει λευκή χροιά και συμπαγή σύσταση. Εμφανίζει και αυτός πρόσθια, οπίσθια επιφάνεια και περιφέρεια. Η πρόσθια επιφάνεια

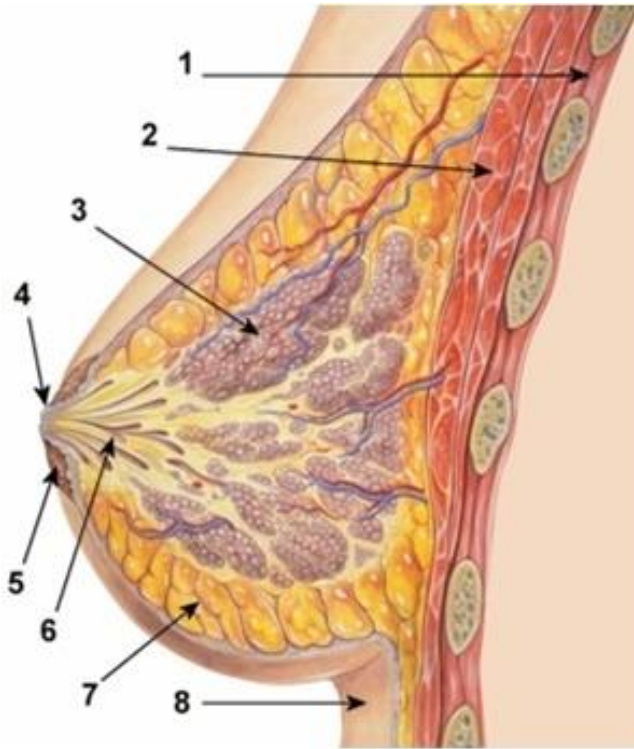
είναι υπόκυρτη και ανώμαλη, εμφανίζει δε προσεκβολές μεταξύ των οποίων παρατηρούνται βοθρία, που υποδέχονται τα λιπώδη λόβια. Ο μαστικός αδένας περιβάλλεται από ινώδη κάψα, το δε εσωτερικό του αποτελείται από 15-25 λόβια, από κάθε ένα από τα οποία ξεκινάει γαλακτοφόρος πόρος, που εκβάλλει, όπως είδαμε, στη θηλή. Η οπίσθια επιφάνεια του μαστικού αδένου δεν εμφανίζει τίποτε το ιδιαίτερο, η περιφέρεια, τέλος, φέρει τρεις αποφύσεις, μία στερνική και δύο μασχαλιαίες, άνω και κάτω. Υπέρμετρη ανάπτυξη αυτών καμιά φορά μπορεί να εκληφθεί, εσφαλμένα, πως υπάρχουν διογκωμένοι λεμφαδένες.

Στην αιμάτωση του μαστού συμβάλλουν η έσω μαστική, η πλάγια θωρακική, η ακρωμιοθωρακική και οι 2^η, 3^η και 4^η μεσοπλευρίες αρτηρίες.

Τα λεμφαγγεία εκβάλλουν στα μασχαλιαία λεμφογάγγλια (λεμφαδένες).

Τα νεύρα προέρχονται από τα υποκλείδια νεύρα και τα 2^ο-6^ο μεσοπλευρία νεύρα. Επιπλέον, ο μαστός δέχεται και συμπαθητική νεύρωση.

Τέλος, στη θηλή υπάρχουν και απτικά σωμάτια του Meissner. Έτσι ερμηνεύεται και η εύκολη διέγερση αυτής με το παραμικρό ερέθισμα, λόγω του πλούσιου νευρικού δικτύου, που ερεθίζει τις λείες μυϊκές ίνες του θηλαίου μύος. [3]



Τομή μαστού:

1. Μεσοπλευρικοί μύες
2. Θωρακικοί μύες
3. Λοβοί του μαστικού αδένα
4. Θηλή
5. Θηλαία άλως
6. Γαλακτοφόροι κόλποι
7. Περιμαστικό λίπος

Εικόνα 5: Ανατομία του μαστού.

Ανατομία της μασχάλης

Η μασχάλη οριοθετείται επί τα εντός από το θωρακικό τοίχωμα, προς τα έξω από τον πλατύ ραχιαίο μυ, προς τα άνω από τη μασχάλιαία φλέβα, προς τα πίσω από τον υποπλάτιο μυ, και προς τα κάτω από τη σύγκλιση του πλατέως ραχιαίου και του προσθίου οδοντωτού μυός. Η μασχάλη διαιρείται σε τρία επίπεδα, τα οποία καθορίζονται από την

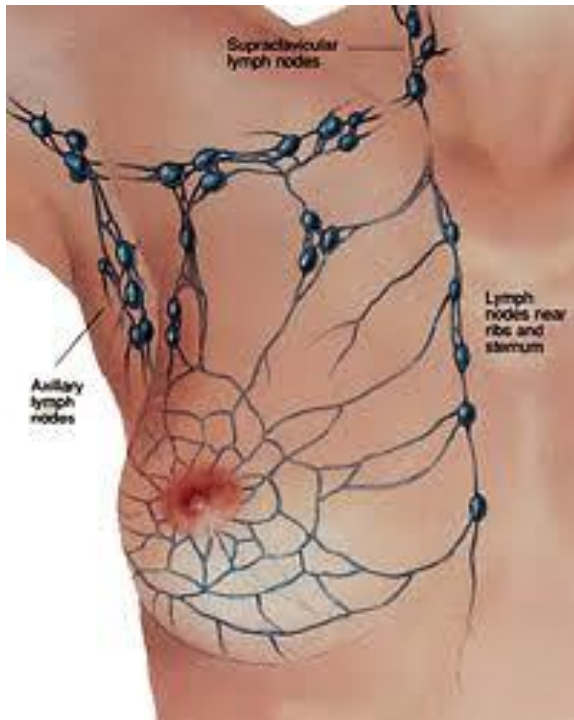
ανατομική σχέση τους με τον ελάσσονα θωρακικό μυ. Ο μασχάλιαϊος ιστός, που είναι επί τα εκτός των έξω ορίων του ελάσσονος θωρακικού μυός, ορίζεται ως επίπεδο I, το οπίσθιο τμήμα και μεταξύ των έξω και έσω ορίων του μυός είναι το επίπεδο II, και επί τα εντός του έσω ορίου του μυός είναι το επίπεδο III.

Μεταξύ του μείζονος και ελάσσονος θωρακικού μυός ανευρίσκονται οι λεμφαδένες του Rotter. Αυτοί οι λεμφαδένες βρίσκονται συνήθως στην οπίσθια επιφάνεια του μείζονος θωρακικού μυός.

Το έξω θωρακικό νεύρο πορεύεται επίσης κατά μήκος της οπίσθιας επιφάνειας του μείζονος θωρακικού μυός, και βλάβη σε αυτό το νεύρο οδηγεί σε ατροφία του μυός. Το έσω θωρακικό νεύρο, το οποίο έχει μορφή Y, νευρώνει την κάτω έξω επιφάνεια του μείζονος θωρακικού μυός.



Εικόνα 6: Ο μαστός και οι μασχάλιαϊοι λεμφαδένες (αδρή απεικόνιση).



Εικόνα 7: Ο μαστός και οι περιοχικοί του λεμφαδένες (λεπτομερής απεικόνιση).

Το δεύτερο δερματικό μεσοπλεύριο-βραχιόνιο νεύρο βρίσκεται περίπου 1 εκατ. κατώτερα από τη μασχालιαία φλέβα, και πορεύεται προς μια έσω-έξω κατεύθυνση. Το μακρό θωρακικό νεύρο, που νευρώνει τον πρόσθιο οδοντωτό μυ, μπορεί να προσδιοριστεί ακριβώς κάτω από το μεσοπλεύριο-βραχιόνιο νεύρο στο δεύτερο μεσοπλεύριο διάστημα. Το μακρό θωρακικό νεύρο ακολουθεί την καμπύλη του θωρακικού τοιχώματος κάτω και πίσω, όπου διαιρείται σε κλάδους που

παρεμβάλλουν τον πρόσθιο οδοντωτό μυ στο επίπεδο της τέταρτης ή πέμπτης πλευράς. Επίσης, το μακρό θωρακικό νεύρο τρέχει σε μια άνω-κάτω κατεύθυνση, και είναι πάντα πίσω από τα μεσοπλεύρια νεύρα (που τρέχουν σε μια έσω-έξω κατεύθυνση).

Το θωρακοραχιαίο νεύρο νευρώνει τον πλατύ ραχιαίο μυ. Προς τα άνω, αυτό βρίσκεται πίσω από την έξω θωρακική φλέβα. Ακολουθώντας, λαμβάνει μια κάτω-έξω πορεία, κείμενο στον υποπλάτιο μυ, συνοδευόμενο από τα υποπλάτια αγγεία, και εισέρχεται στην έσω επιφάνεια του πλατέως ραχιαίου μυός. [4]

II. Φυσιολογία του μαστού

Η ανάπτυξη και η λειτουργία του μαστού ξεκινά από ποικίλα ορμονικά ερεθίσματα, όπως των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, της προλακτίνης, της ωκυτοκίνης, της θυροξίνης, της κορτιζόλης, και της αυξητικής ορμόνης. Τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, και η προλακτίνη αποτελούν τις βασικές ορμόνες για τη φυσιολογική ανάπτυξη και τη λειτουργία του μαστού. Τα οιστρογόνα επιδρούν στην ανάπτυξη των πόρων, ενώ η προγεστερόνη είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση του επιθηλίου και για την ανάπτυξη των λοβίων. Η προλακτίνη είναι το αρχικό ορμονικό ερέθισμα για τη γαλακτογένεση κατά την εγκυμοσύνη και τη μετά τον τοκετό περίοδο. Ρυθμίζει τους ορμονικούς υποδοχείς και προάγει την επιθηλιακή ανάπτυξη.

Η έκκριση των νευροτροφικών ορμονών από τον υποθάλαμο ρυθμίζει την έκκριση των ορμονών που επηρεάζουν τους ιστούς του μαστού. Η ωχρινοποιητική ορμόνη (LH) και η θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH) ρυθμίζουν την απελευθέρωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από τις ωοθήκες. Η απελευθέρωση της LH και FSH από τα βασεόφιλα κύτταρα, που βρίσκονται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, ρυθμίζεται από την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (gonadotropin-releasing hormone) (GnRH) από τον υποθάλαμο. Θετική και αρνητική ανάδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης ρυθμίζει την έκκριση των LH, FSH και GnRH. Οι ορμόνες αυτές είναι αρμόδιες για την ανάπτυξη, τη λειτουργία και τη διατήρηση των ιστών του μαστού.

Στο θηλυκό νεογνό, τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται μετά από τη γέννηση και παραμένουν χαμηλά καθ' όλη τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, λόγω του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης, που δρα ως αρνητικό feedback.

Κατά την έναρξη της εφηβείας, μειώνεται η ευαισθησία του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης στο αρνητικό feedback και αυξάνεται η ευαισθησία του στο θετικό feedback από τα οιστρογόνα. Η αύξηση που προκαλείται στην έκκριση των GnRH, FSH και LH, οδηγεί στην αύξηση της έκκρισης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από τις ωοθήκες και στην έναρξη της έμμηνης ρύσης. Στο χρονικό αυτό σημείο, αυξάνεται το μέγεθος και η πυκνότητα των μαστών, ακολουθούμενα από την αύξηση των ιστών του μαστού και τον πολλαπλασιασμό του

επιθηλίου. Με την έναρξη της εμμηνόπαυσης, η αύξηση των ιστών και του μεγέθους των μαστών υποχωρεί και ο πολλαπλασιασμός του επιθηλίου μειώνεται.

Κύηση, γαλακτοπαραγωγή και γεροντική ηλικία

Μεγάλη αύξηση στην κυκλοφορία των οιστρογόνων, που εκκρίνονται από τις ωοθήκες και τον πλακούντα, καθώς και των προγεστινών, συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η οποία προκαλεί αλλαγές στη μορφή και το υπόστρωμα του μαστού. Ο μαστός αυξάνεται καθώς πολλαπλασιάζονται οι πόροι και τα λόβια, το δέρμα της άλω σκουραίνει, και οι επικουρικοί αδένες της άλω (αδένες του Montgomery) αναπτύσσονται. Κατά το πρώτο και δεύτερο τρίμηνο, οι ελάσσονες πόροι αναπτύσσονται. Κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου, λιπίδια συσσωρεύονται στο επιθήλιο και πρωτόγαλα γεμίζει τα διαστήματα μεταξύ των λοβίων και των πόρων. Στο τέλος της κύησης, η προλακτίνη ρυθμίζει τη σύνθεση των λιπαρών ουσιών και των πρωτεϊνών του γάλακτος. Μετά τον τοκετό του πλακούντα, η προγεστερόνη και τα επίπεδα των οιστρογόνων μειώνονται, γεγονός που επιτρέπει την πλήρη δράση της προλακτίνης. Η παραγωγή του γάλακτος ελέγχεται από τα νευρικά ανακλαστικά τόξα, που δημιουργούνται στις νευρικές απολήξεις της θηλής και της άλω. Η απελευθέρωση της ωκυτοκίνης ρυθμίζεται από τα ακουστικά, οπτικά, και οσφρητικά ερεθίσματα και συμβάλλει στην αποβολή του γάλακτος στους γαλακτοφόρους πόρους.

Μετά τον απογαλακτισμό του βρέφους, η απελευθέρωση της προλακτίνης και της ωκυτοκίνης μειώνεται. Το εναπομείναν γάλα αυξάνει την πίεση μέσα στους πόρους με συνέπεια την ατροφία του επιθηλίου. Κατά την εμμηνόπαυση, με τη μείωση στην έκκριση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από τις ωοθήκες, εκφυλίζονται οι πόροι του μαστού. Ο ινώδης συνδετικός ιστός αυξάνει σε πυκνότητα και οι ιστοί του μαστού αντικαθίστανται από λίπος. [4]

11-2

***Ιστορία της αιτιοπαθογένειας
και της φαρμακευτικής θεραπείας
του καρκίνου του μαστού***

Η γενική ιστορία του καρκίνου του μαστού είναι, εν πολλοίς, γνωστή στο χώρο μας. Για το λόγο αυτό, παρακάτω θα γίνει λόγος για δύο πτυχές της ιστορίας του καρκίνου του μαστού, όχι ιδιαιτέρως γνωστές: την ιστορία των θεωριών σχετικά με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του μαστού (Κεφ. II-2.1) και την ιστορία των φαρμακευτικών θεραπειών του καρκίνου του μαστού (Κεφ. II-2.2).

II-2.1 Ιστορία των θεωριών σχετικά με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του μαστού

Οι θεωρίες αιτιοπαθογένειας του καρκίνου γενικά και του καρκίνου του μαστού ειδικότερα από την αρχαιότητα ως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα

Οι αντιλήψεις του Ιπποκράτη, αλλά και όλων των αρχαίων ιατρών σχετικά με τη φυσιοπαθολογία του ανθρώπινου οργανισμού, περιλαμβάνουν την ύπαρξη τεσσάρων χυμών, εξ' ου και η φυσιοπαθολογία τους χαρακτηρίζεται ως «χυμοπαθολογία». Συγκεκριμένα, δέχονταν πως οι χυμοί του ανθρώπινου οργανισμού είναι τέσσερις: το αίμα, το φλέγμα, η κίτρινη χολή και η μαύρη ή μέλαινα χολή ή μελαγχολικός χυμός. Τα υγρά αυτά βρίσκονται σε μια ισορροπία μεταξύ τους, η οποία όταν διαταραχθεί, εκδηλώνονται τα διάφορα νοσήματα. «Ευκρασία» ονόμαζαν την ισορροπία στην αναλογία των τεσσάρων χυμών και «δυσκρασία» τη διαταραχή της ισορροπίας, η οποία έχει ως συνέπεια τις ασθένειες [5].

Έτσι, σε διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στους τέσσερις χυμούς του σώματος απέδιδαν οι αρχαίοι ιατροί και τη δημιουργία του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, ο Γαληνός θεωρεί πως η μαύρη χολή ευνοεί την ανάπτυξη του καρκίνου («διά την πλεονεξία της μαύρης χολής γίνεται καρκίνος») [5]. Εάν η κάθαρση της μέλαινας χολής, την οποία θεωρούσαν πως λαμβάνει χώρα στο σπλήνα, δεν είναι καλή, τότε η περίσσεια του χυμού αυτού είναι δυνατόν να δημιουργήσει καρκίνο. Επιπλέον, ανάλογα με τη δριμύτητα του μέλανος χυμού δημιουργείται ο ανέλκωτος ή ο μεθ' έλκους καρκίνος [6]. Είναι, επίσης, χαρακτηριστικό πως υπήρχε η άποψη πως η μαύρη χολή μπορούσε να δημιουργήσει συγκεκριμένο τύπο καρκίνου στο μαστό (διαβρωτικό) αλλά άλλες νόσους σε άλλα σημεία του σώματος όπως π.χ. κακοήθη έλκη στα πόδια. Την άποψη αυτή διατυπώνει ο Αλέξανδρος της Αφροδισίας [7].



Εικόνα 8: Ο Ιπποκράτης (δεξιά) διδάσκει το Γαληνό. Και οι δύο μεγάλοι ιατροί της Αρχαιότητας ήταν θιασώτες της θεωρίας της χυμοπαθολογίας για την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου. Από: [5].

Μία άλλη θεωρία, της αρχαίας επίσης εποχής, διατυπώνεται από το Δίωνα τον Κάσσιο (155-235 μ.Χ.), ο οποίος αναφέρει τα χτυπήματα στο στήθος ως αίτιο για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού [8].

Χρειάζεται να περάσουν αρκετοί αιώνες για να υπάρξει διατύπωση άλλων θεωριών σχετικά με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου, οι οποίες να ξεφεύγουν από τη χυμοπαθολογία του Ιπποκράτη και του Γαληνού. Δύο νέες θεωρίες εμφανίζονται το 17^ο αιώνα. Η πρώτη διατυπώθηκε από τον Ολλανδό ιατρό Nicolas Tulp (1593-1674). Ο Tulp υποστηρίζει πως ο καρκίνος του μαστού είναι μεταδοτική νόσος. Την άποψη αυτή είχε σχηματίσει από την περίπτωση μιας Ολλανδής κυρίας και της υπηρέτριάς της και η θεωρία του αυτή γνώρισε απίστευτη διάδοση μόνο από τη συγκεκριμένη περίπτωση και χωρίς καμία άλλη επιβεβαιωτική ένδειξη [9].

Την ίδια εποχή ιατροχημικοί και ιατροφυσικοί αρχίζουν να θεωρούν πως ο καρκίνος προέρχεται από τη λέμφο μάλλον παρά από τη μαύρη χολή [9]. Ο Pierre Dionis (1643-1718) συσχέτιζε την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού με τη στασιμότητα της λέμφου στο όργανο, η οποία ακολουθείται από διόγκωση και πόνο. Ο Dionis υποστήριζε, όμως και την επίδραση της ψυχικής διάθεσης [10].

Άλλη θεωρία συσχέτιζε τη γένεση του καρκίνου με το «πήξιμο του γάλακτος» των γυναικών, το οποίο προσδευτικά μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του καρκίνου, όπως αναφέρεται στο «Εγκόλπιο των ιατρών» από το Διονύσιο Πύρρο το 1831 [11].

Το 1802 ο περίφημος Γάλλος χειρουργός Guillaume Dupuytren (1778-1834) αποδεικνύει πως ο καρκίνος του μαστού δεν είναι μεταδοτική νόσος [9]. Μια ακόμη σημαντική αναφορά αποτελεί η αρχή που διατύπωσε ο Charles Hewitt Moore (βλ. παραπάνω – Κεφ. II-2.1) πως οι υποτροπές του καρκίνου προέρχονται από τον πρωτοπαθή όγκο (διασπορά) και όχι από μια ανεξάρτητη οργανική αρχή, όπως νόμιζαν μέχρι τότε [12].

Οι θεωρίες αιτιοπαθογένειας του καρκίνου γενικά και του καρκίνου του μαστού ειδικότερα κατά τη σύγχρονη εποχή (από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα ως σήμερα)

Η σύγχρονη εποχή όσον αφορά στην αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του μαστού άρχεται το έτος 1896, κατά το οποίο ο Beatson υποστήριξε πως υφίσταται πιθανώς κάποια συσχέτιση μεταξύ των ωθηθικών ορμονών και του καρκινώματος του μαστού. Την υπόθεση αυτή βάσιζε στην παρατήρηση της μείωσης του όγκου στο μαστό μιας γυναίκας μετά την υποβολή της σε ωθηκεκτομή [13].

Τέσσερα χρόνια αργότερα, το 1900, ο Boyd περιέγραψε μία σειρά 54 γυναικών με καρκίνο του μαστού, οι οποίες υπεβλήθησαν σε ωθηκεκτομή. Αναφέρει, πως οι 19 από αυτές παρουσίασαν αντικειμενική ύφεση της νόσου μετά την εγχείρηση, επιβεβαιώνοντας έτσι την αλήθεια της παρατήρησης του Beatson [13].

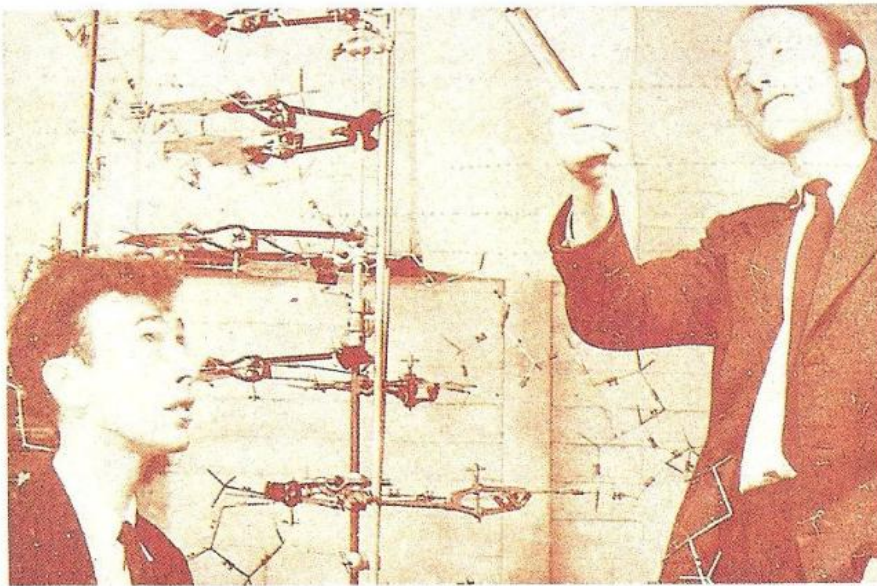
Το 1926 ο Lacassagne του «Radium Institute in Paris», προώθησε περαιτέρω τις γνώσεις για την παθογένεση του καρκίνου του μαστού, δείχνοντας ότι πειραματόζωα ανέπτυξαν καρκίνο του μαστού μετά από παρατεταμένη χορήγηση οιστρογόνων [13]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στην υπόθεση πως ο ανταγωνισμός των οιστρογόνων με ανδρογόνα θα μπορούσε να προσφέρει σημαντική βοήθεια στη θεραπεία των ανεγγχείρητων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

Φθάνουμε, έτσι, στο 1945, οπότε και έχει πλέον παγιωθεί η αντίληψη-γνώση της αιτιοπαθογενετικής σχέσης μεταξύ οιστρογόνων και καρκίνου του μαστού και, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, σε συμπόσιο στο Λονδίνο διατυπώνεται ξεκάθαρα η άποψη (και όχι πλέον ως υπόθεση) πως τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα έχουν να διαδραματίσουν ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού [14].

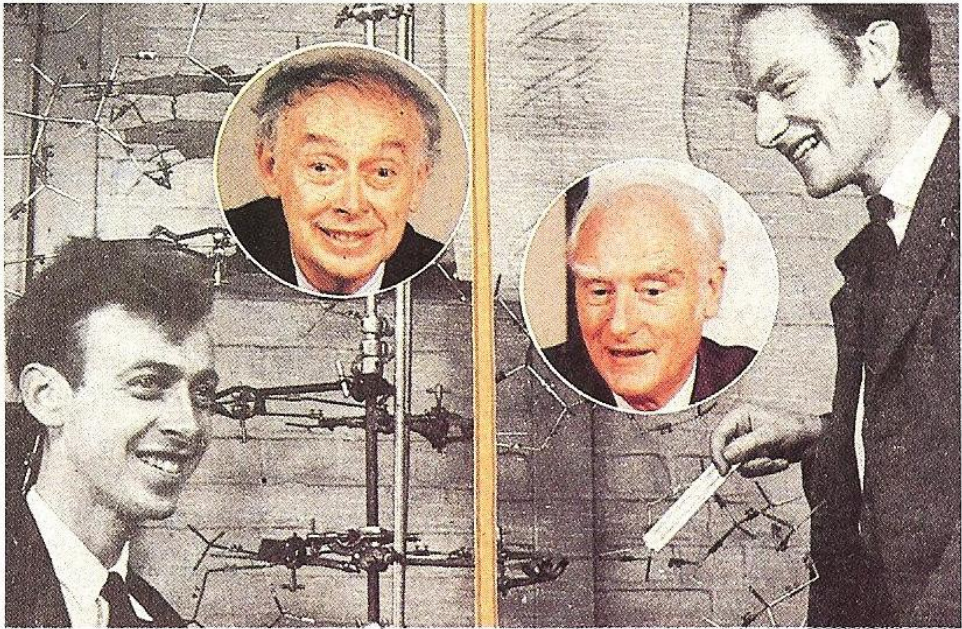
Η μεγαλύτερη, ωστόσο, ανακάλυψη, στο χώρο των ιατροβιολογικών επιστημών και ταυτόχρονα η σημαντικότερη ίσως ανακάλυψη του 20^{ου} αιώνα, είναι η αποκάλυψη της δομής του DNA από τους James Watson και Francis Crick το 1953. Η ανακάλυψη αυτή άνοιξε τις πύλες στη γονιδιακή και μοριακή έρευνα του καρκίνου, οδήγησε στη διαλεύκανση σε σημαντικό βαθμό του μυστηρίου της καρκινογένεσης και βοήθησε στην ύπαρξη στις ημέρες μας σύγχρονων και αποτελεσματικών θεραπειών για πολλές κακοήθεις νόσους.

Με τη συνεχή έρευνα, που βασίστηκε στην ανακάλυψη της δομής του DNA, έγινε σταδιακά κατανοητό πως ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα μεταβολών, «μεταλλάξεων» του DNA και ποικίλων γονιδίων του,

κυρίως των δύο μεγάλων άμεσα σχετιζόμενων ομάδων, των ογκογονιδίων (π.χ. HER2, c-myc, ras, raf, fos, src, abl, jun κ.ά.) και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. p53, APC, Rb, BRCA 1&2, PTEN, maspin κ.ά), αλλά και πλήθος άλλων με επικουρικές λειτουργίες. Για κάποια από τα παραπάνω γίνεται εκτενής λόγος στην παρούσα μελέτη.



Εικόνα 9: *James Watson (αριστερά) και Francis Crick. Μια ασύλληπτη ανακάλυψη που περιγράφεται σε ένα μονοσέλιδο άρθρο, το οποίο αρχίζει με τη φράση: «Επιθυμούμε να προτείνουμε μια δομή για το DNA με ασυνήθιστους χαρακτήρες και σημαντικό βιολογικό ενδιαφέρον...». Από: [5].*



Εικόνα 10: *James Watson (αριστερά) και Francis Crick, όπως ήταν το 1953 και το 1993 στα δύο στρογγυλά ένθετα. Από: [5].*

Τις δεκαετίες που μεσολάβησαν από την ανακάλυψη της δομής του DNA οι εξελίξεις ήταν ραγδαίες:

Το 1967 ο Jensen ανακάλυψε τους οιστρογονικούς υποδοχείς (estrogen receptors – ER) και έλαβε έτσι μοριακή μορφή η γνωστή συσχέτιση οιστρογόνων – καρκίνου του μαστού [15]. Το 1971 οι ER άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως προβλεπτικός παράγοντας για την εξέλιξη της νόσου. Το 1978 ο McGuire πέτυχε τη μέτρηση των επιπέδων των ER, οι οποίοι το 1979 ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται ως δείκτης για την επιλογή της θεραπείας. Το 1980 προσδιορίστηκαν και τα επίπεδα των

προγεστερονικών υποδοχέων (PR) και ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται και αυτοί επικουρικά [7].

Μία πολύ σημαντική ανακάλυψη, που αφορά στην αιτιοπαθογένεια του καρκίνου του μαστού, έγινε τη δεκαετία του 1980, κατά την οποία από τρεις διαφορετικές επιστημονικές ομάδες ανακαλύφθηκε το πρωτο-ογκογονίδιο HER2 (ή c-erbB2 ή neu) και ο ρόλος του στον καρκίνο του μαστού. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε σταδιακά σε πολύ ενδιαφέρουσες εξελίξεις στη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού, οι οποίες συζητούνται στο σχετικό Κεφάλαιο (II-6).

Τέλος, ειδικά για τον καρκίνο του μαστού αξίζει να μνημονευθεί η ανακάλυψη το 1994 του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA1 και λίγο αργότερα του BRCA2, οι μεταλλάξεις στα οποία είναι υπεύθυνες για οικογενείς τύπους καρκίνου του μαστού.

II-2.2 Ιστορία των φαρμακευτικών θεραπειών του καρκίνου του μαστού

Παρά την πανάρχαια γνώση του καρκίνου ως νόσου και την ενασχόληση των ιατρών από την εποχή της αρχαιότητας μαζί του, η ιστορία της αποτελεσματικής-δραστικής φαρμακοθεραπείας του καρκίνου γενικά και του καρκίνου του μαστού ειδικότερα έχει ηλικία μόλις λίγων δεκαετιών και ξεκινά οπωσδήποτε εντός του 20^{ου} αιώνα. Το γιατί είναι απολύτως προφανές, αν αναλογιστούμε τις υπάρχουσες

γνώσεις σχετικά με την αιτιοπαθογένεια του καρκίνου προ του 20^{ου} αιώνα, όπως έγινε φανερό στην προηγούμενη ενότητα.

Η φαρμακευτική θεραπεία του καρκίνου γενικά και του καρκίνου του μαστού ειδικότερα από την αρχαιότητα ως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα

Η αντίληψη της «χημειοθεραπείας» του καρκίνου, της αντιμετώπισής του δηλαδή με φαρμακευτικά μέσα, υπήρχε σε πρωτόγονη κατάσταση ήδη από την αρχαία ιατρική. Δεν απευθυνόταν, όμως, στην προχωρημένη, γενικευμένη ή μεταστατική νόσο, αλλά στην αρχομένη [16]. Έτσι, οι αρχαίοι Έλληνες ιατροί στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρκίνου εφάρμοζαν θεραπείες με διάφορα βοηθήματα, πρακτικές και φάρμακα και σε περίπτωση αποτυχίας επακολούθησε η χειρουργική θεραπεία. Οι πρακτικές και τα φάρμακα ήταν σύμφωνα με τις αντιλήψεις τους περί του αιτίου του καρκίνου, του μαύρου ή μελαγχολικού χυμού του ανθρωπίνου σώματος και σκοπό είχαν τη μείωση του πλεονάζοντος μελαγχολικού χυμού με τις καθάρσεις, τη φλεβοτομία και τα φάρμακα. Ωστόσο, τα μέσα αυτά είχαν αποτέλεσμα, όπως σημειώνουν πολλοί συγγραφείς, μόνο κατά τα πρώτα στάδια της νόσου. Ο Ορειβάσιος χαρακτηριστικά αναφέρει πως «δυνατόν μην τους αρχομένους καρκίνους κωλύει αύξεσθαι καθαίροντας τον μελαγχολικόν χυμόν, πριν εν τω πεπονθότι μορίω στηριχθήναι» [6].

Πολλές ήταν οι φαρμακευτικές ουσίες και τα θεραπευτικά σχήματα, που χρησιμοποιούνταν για τον καρκίνο, δηλωτικό και αυτό του ανιάτου της νόσου. Μερικές από τις ουσίες ήταν βότανα όπως: ασκληπιάς, ακαλύφη ή κνίδη, αριστολοχία, δρακοντία, ερύσιμον, ερέβινθος,

ελλέβορος, ερίκης καρπός, ελατήριον ή σίκυς άγριος, στρίχνου χυλός και επίθυμον. Επίσης, ως αντικαρκινικά φάρμακα χρησιμοποιούνταν η καδμεία, ο λιθάργυρος, ο μόλυβδος και η χαλκίτις (σκεύασμα από χαλκό) [6]. Αξίζει να αναφερθεί και η χρησιμοποίηση των καβουριών («ποτάμιοι καρκίνιοι») ως πηγών θεραπευτικών σκευασμάτων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, λόγω του ευνοήτου λεκτικού συνειρμού με τη νόσο του καρκίνου και την εξ' αυτού θεωρούμενη σχέση τους με αυτόν [16].

Είναι προφανές το γεγονός της πλήρους αποτυχίας της θεραπευτικής του καρκίνου με τα ανωτέρω «φάρμακα» και το γεγονός αυτό φαίνεται πως ήταν εις γνώσιν των ιατρών και υπήρχε έτσι η (σωστή) αντίληψη πως αν δε δυνηθεί ο ιατρός να θεραπεύσει τον καρκίνο με το χειρουργείο, δεν υπάρχει άλλος τρόπος ίασης. Έτσι, ο Γαληνός γράφει σχετικά: «...και τον μεν καρκίνον αρχόμενον ιασάμεθα, τον δε αρχόμενον εις μέγεθος αξιόλογον άνευ χειρουργείης ουδείς ίασατο» [16]. Είναι φανερό επομένως πως η ιστορία της θεραπείας του καρκίνου του μαστού από την αρχαιότητα έως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, δεν είναι τίποτε άλλο από την ιστορία της μαστεκτομής, καθώς φαρμακευτικές ουσίες με πραγματική φαρμακευτική δράση απέναντι στον καρκίνο δεν υφίσταντο.

Ένα ιδιαίτερης ιστορικής αξίας κείμενο για την ενημέρωσή μας σχετικά με τις ιατρικές γνώσεις της εποχής του αποτελεί το βιβλίο: «Το εγκόλπιον των ιατρών» του 1831 [11], ένα από τα πρώτα πρακτικά ιατρικά βιβλία που κυκλοφόρησαν στο νεοσύστατο ελληνικό κράτος

μετά την απελευθέρωση. Συγγραφέας του είναι ο αρχιμανδρίτης Διονύσιος Πύρρος ο Θετταλός, «ιατροφιλόσοφος και διδάσκαλος εις το εν Αθήναις πρώην Επιστημονικόν Σχολείον» και πρώτος πρόεδρος της Ιατρικής Εταιρείας Αθηνών.

Στο «εγκόλπιο» λοιπόν, το οποίο ήταν ένας πρακτικός οδηγός της εποχής, περιέχονται «τριακόσιες εξήκοντα δύο αρρώστιες» με προτεινόμενες θεραπευτικές συνταγές και φυσικά δε θα μπορούσε να εξαιρεθεί ο καρκίνος και δη ο καρκίνος του μαστού. Για τον καρκίνο του μαστού αναφέρεται αρχικά η θεωρούμενη αιτιοπαθογένεση και παθοφυσιολογία της νόσου και εν συνεχεία προτείνεται η εξής φαρμακευτική αγωγή: «το έμπλαστρον του κωνείου, το ίδιο το κώνειο και ο υοσκύαμος». Φυσικά, εν τέλει, αναφέρεται και στη μόνη πραγματική έστω και πολύ περιορισμένων ακόμη δυνατοτήτων – όμως πραγματική – θεραπευτική μέθοδο, δηλαδή τη «μασθοτομία» (το χειρουργείο) [11]. Τα παραπάνω φαίνονται στην εικόνα 11.

Το Πάγκρεας είναι ἐν κομμάτι κρέας ἐπίμηκες, κείμενον ὀπισθεν τοῦ στομάχου. Τοῦτο πολλάκις πρήσκεται καὶ σκίρρδνεται, τὸ ὁποῖον, ὅταν εἶναι εἰς τὸν ἀνώτατον βαθμῖν, εἶναι πλέον ἀθεράπευτον· μ' ὅλον τοῦτο δέχεται κάποιαν θεραπείαν, καὶ αὐτὴν παλαιῶν λεγομένην Ἰταλισί.

Εἰς τοῦτο ὠφελοῦσιν οἱ τροχίσκοι τοῦ σαπωνίου 876. ἢ τὸ ἐκχύλισμα αὐτοῦ 581. τὸ κώνειον 1142. τὸ ἔλαιον τοῦ κίκεως 576. τὸ ὄπιον 1161. ἢ τὸ λαύδαρον ρευσόν 692.

	(Σκίρρος τῶν μασθῶν.	Ἑλλην.
§. 296.	< (Σίρρο δέλλα μαμέλαι.	Ἰταλ.
	(Μεμέ σακίρουζοῦ.	Τουρκ.

Οταν τὸ γάλα τῶν γυναικῶν συναχθῆ εἰς ἓν μέρος τῶν γυναικείων μασθῶν, καὶ πύξη δυνατὰ, σχηματίζεται ὁ σκίρρος τῶν βυζίων.

Οὗτος εἶναι σκληρὸς καὶ δυνατὸς, ἀπλῶνει καὶ ὑπάγει ἕως εἰς τὴν μασχάλην μετὰ τὸν καιρὸν, καὶ μετὰ τὴν κακὴν κυβέρνησιν, μεταβάλλεται εἰς καρκίνωμα, καὶ σφακέλλωσιν τῶν μασθῶν.

Εἰς αὐτὸν ὠφελεῖ τὸ ἔμπλαστρον τοῦ κωνείου 603. καὶ τὸ ἴδιον κώνειον 1142, ὁ ὑοσκύαμος 1198. καὶ ἡ μασθοτομία. δηλ. καθαρίζεται ὁ μασθός, καὶ ρίπτεται.

	(Σκίρρος τῆς μήτρας.	Ἑλλην.
§. 297.	< (Σίρρο δὲλ οὔτερο.	Ἰταλ.
	(Ῥάχιμ σακίρουζοῦ.	Τουρκ.

Εικόνα 11: Αιτιοπαθογένεση και θεραπευτικές μέθοδοι για τον καρκίνο του μαστού κατά το Διονύσιο Πύρρο (στο: «Εγκόλπιον των ιατρών» - 1831). Από: [11]

Αξίζει, τέλος, να αναφερθεί πως τα σκευάσματα που περιείχαν αρσενικό χρησιμοποιήθηκαν κατά κόρον κατά το 19^ο αιώνα. Δε θα ήταν υπερβολή να πει κανείς πως για τουλάχιστον 100 χρόνια αποτέλεσαν το «gold standard», για να μιλήσουμε με σύγχρονη ορολογία, για την προσπάθεια φαρμακευτικής θεραπείας οιασδήποτε κακοήθειας, από τα τέλη του 18^{ου} έως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα.

Η φαρμακευτική θεραπεία του καρκίνου γενικά και του καρκίνου του μαστού ειδικότερα κατά τη σύγχρονη εποχή (από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα ως σήμερα)

Η χρήση των σκευασμάτων αρσενικού, η οποία, όπως αναφέραμε, ήταν ιδιαίτερα εκτεταμένη ως τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, αποτελεί τη γέφυρα ανάμεσα στις χωρίς αποτελεσματικότητα «φαρμακευτικές» θεραπείες των παλαιών εποχών και στη σύγχρονη φαρμακευτική θεραπεία του καρκίνου κατά τον 20^ο αιώνα. Είναι άξιο αναφοράς το γεγονός πως ίσως η πρώτη παγκοσμίως αναφορά επιστημονικής και ταυτόχρονα αποτελεσματικής φαρμακοθεραπείας για κακοήθες νόσημα ανάγεται στο 1892. Τη χρονιά εκείνη, ο Osler στο σύγγραμμά του της «Παθολογίας» αναφέρει τη χημειοθεραπεία των λεμφωμάτων με το

διάλυμα του Fowler, ένα σκεύασμα που περιείχε αρσενικό. Ήταν τότε η εποχή που τα οργανικά σκευάσματα του αρσενικού αποτελούσαν το πιο προωθημένο σημείο τόσο στην έρευνα όσο και στη φαρμακευτική βιομηχανία. Άλλωστε, όπως είναι ευρέως γνωστό, το 606^ο παράγωγο της ομάδας οργανικών ενώσεων του αρσενικού – η Salvarsan –, την οποία ανακάλυψε ο περίφημος Ehrlich, ήταν και το πρώτο αποτελεσματικό φάρμακο για την ωχρά σπειροχάιτη (τον αιτιολογικό μικροβιακό παράγοντα της σύφιλης). Με αυτό το μοντέλο καθορίστηκαν στα πρώτα χρόνια του 20^{ου} αιώνα και οι βασικές αρχές της χημειοθεραπείας των λοιμώξεων [16].

Παρακάτω, θα περιγράψουμε την ιστορική εξέλιξη της φαρμακευτικής θεραπείας κατά του καρκίνου κατά τον 20^ο αιώνα, παραθέτοντας ξεχωριστά τις τέσσερις – πλέον – μεγάλες κατηγορίες φαρμακευτικών ουσιών (τουλάχιστον όσον αφορά στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού): την κλασική χημειοθεραπεία, την ορμονοθεραπεία, τις στοχευμένες θεραπείες έναντι παραγόντων και υποδοχέων υπερπλασίας του κυττάρου (υπόθεση μόλις των τελευταίων 15 ετών) και τις αντι-αγγειογενετικές στοχευμένες θεραπείες (υπόθεση μόλις των τελευταίων 10 ετών).

- i. **Η κλασική χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου και η εξέλιξή της κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα**

Αλκυλιούντες παράγοντες

Η αντικαρκινική χημειοθεραπεία, με τη σύγχρονη έννοια του όρου, ξεκίνησε κατά την 1^η δεκαετία του 20^{ου} αιώνα. Ο γιατρός George Clowes στο «Roswell Park Memorial Institute» πειραματιζόταν με πιθήκους στους οποίους εμφύτευε όγκους και στη συνέχεια μελετούσε την επίδραση σε αυτούς διαφόρων ουσιών. Η εργασία του δηλαδή ήταν αντίστοιχη με την, λίγων ετών νωρίτερα, εργασία του Paul Ehrlich πάνω στην αντιμικροβιακή χημειοθεραπεία. Εντόπισε με τον τρόπο αυτό παράγωγα της ομάδας των αλκυλιούντων παραγόντων, τα οποία ήταν δραστικά σε διάφορους τύπους αιματολογικών κακοηθειών και συμπαγών όγκων.

Ένα τυχαίο γεγονός, λίγα χρόνια αργότερα, ήλθε να ενισχύσει τις παρατηρήσεις του Clowes: Ο αζωθυπερίτης (αέριο μουστάρδας), ο οποίος είχε ανακαλυφθεί το 1854 από τον Richie [13], ανήκει στην ομάδα των αλκυλιούντων παραγόντων και απετέλεσε σημαντικό πολεμικό αέριο κατά τη διάρκεια του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου (το έτος 1942), συμμαχικό πλοίο το οποίο μετέφερε αζωθυπερίτη βομβαρδίστηκε στο λιμάνι του Μπάρι στην Ιταλία. Σε όσους επιβίωσαν του βομβαρδισμού και του πνιγμού παρατηρήθηκε ένα αξιοσημείωτο γεγονός: εμφάνισαν σημαντική καταστολή του μυελού και πανκυτταροπενία. Αυτό οδήγησε στην άμεση χρήση του αζωθυπερίτη σε αρρώστους με λεμφοϋπερπλαστικά κακοήγη νοσήματα στο Πανεπιστήμιο του Yale και, έτσι, με την εισαγωγή του πρώτου αλκυλιούντα παράγοντα στη θεραπευτική κατά

του καρκίνου, άνοιξε η μεγάλη σελίδα της σύγχρονης αντινεοπλασματικής χημειοθεραπείας [16,17]. Το 1946, οι Gilman και Philips δημοσιεύουν τις παρατηρήσεις τους για τη δράση της νιτρογόνου μουστάρδας στο λεμφοσάρκωμα [18]. Η έρευνα στους αλκυλιούντες παράγοντες προχώρησε, αρκετοί νέοι παράγοντες ανακαλύφθηκαν (triethylenemelamine, triethylene-thiophosphoramide, χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη, μελφαλάνη, βουσουλφάνη κ.ά.) και ως τα μέσα της δεκαετίας του '60 οι παράγοντες αυτοί είχαν λάβει τη θέση τους στη θεραπευτική των περισσότερων κακοήθων νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού [17]. Η έρευνα στους αλκυλιούντες παράγοντες συνεχίζεται ως σήμερα, με αποτέλεσμα την παραγωγή νέων παραγόντων τα τελευταία χρόνια, όπως η ιφωσφαμίδη, η τεμοζολομίδη, η φοτεμουστίνη κ.ά.

Αντιμεταβολίτες

Τα ίδια χρόνια, με την ανάπτυξη των αλκυλιούντων παραγόντων, προάγεται και η αντίληψη των αντιμεταβολιτών: ορισμένες ουσίες, ανταγωνιζόμενες τους παράγοντες που είναι απαραίτητοι για το μεταβολισμό των κυττάρων, μπορούν να αναστείλουν την αύξηση και το μεταβολισμό τους [16]. Υπάρχουν τρεις τύποι αντιμεταβολιτών με κλινική αξία: οι ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος, των πουρινών και των πυριμιδινών.

Οι ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος αναπτύχθηκαν για πρώτη φορά το 1947 από τους Subba Row και συν και το 1948 ο Sidney Farber έδειξε πως η αμινοπτερίνη, μια ουσία με χημική δομή ανάλογη του φυλλικού

οξέος, μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη της οξείας λευχαιμίας στα παιδιά [19,20]. Το 1951, δημοσιεύτηκαν, από τους Wright και συν [21], τα αποτελέσματα της δράσης του επόμενου αντιμεταβολίτη που ανακαλύφθηκε, της έκτοτε χρησιμοποιούμενης συνεχώς μεθοτρεξάτης, σε συμπαγείς κακοήθειες δυσίατες έως τότε («incurable neoplasms», όπως χαρακτηριστικά αναφέρει αυτή η σπουδαία δημοσίευση). Η μελέτη αυτή έχει ιδιαίτερη αξία, λόγω και του προσανατολισμού της δικής μας μελέτης, καθώς αποτελεί την πρώτη αναφορά παγκοσμίως για χημειοθεραπευτικό παράγοντα δραστικό απέναντι στον καρκίνο του μαστού. Ακολούθησαν σύντομα αρκετές ακόμη μελέτες με πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, που τεκμηρίωσαν τη δράση της μεθοτρεξάτης στον καρκίνο του μαστού, αλλά και σε άλλες κακοήθειες νόσους [22-26].

Οι ανταγωνιστές πουρινών – με πρώτη την 6-μερκαπτοπουρίνη – εισήλθαν στη θεραπευτική του καρκίνου το 1953 και οι ανταγωνιστές πυριμιδινών το 1957. Ο πρώτος ανταγωνιστής πυριμιδινών που παρήχθη ήταν η fluorouracil (το γνωστό και χρησιμοποιούμενο ως σήμερα χημειοθεραπευτικό 5-FU) και η αντικαρκινική της δράση τεκμηριώθηκε από τους McIver και συν το 1957 [27] και Curregi και συν το 1958 [28]. Η fluorouracil αποτελεί επίσης ένα δραστικό φάρμακο για τον καρκίνο του μαστού.

Αλκαλοειδή της Vinca

Στα τέλη της δεκαετίας του '50 προωθούνται οι έρευνες για διάφορες ομάδες κυτταροστατικών. Από πολλά χρόνια, σε πολλές χώρες και

λαούς, τα φύλλα του φυτού *Cantharanthus roseus* (*Vinca rosea*) έχαιραν φήμης ως ιατρικά βότανα. Παραδοσιακά σκευάσματα από το φυτό αυτό κυκλοφορούσαν για διάφορες ενδείξεις και με διάφορες πιθανολογούμενες δράσεις, όπως π.χ. η υπογλυκαιμική. Ερευνώντας αυτή κυρίως την ιδιότητα, επιστήμονες από διαφορετικές χώρες διαπίστωσαν την κυτταροστατική δράση των αλκαλοειδών της *Vinca* [16]. Τα αλκαλοειδή της *Vinca* περιλαμβάνουν ουσίες όπως η βινμπλαστίνη, η βινκριστίνη και η βινδεσίνη και βρέθηκαν δραστικά έναντι αρκετών κακοήθων νόσων συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού [17].

Κυτταροτοξικά αντιβιοτικά

Τα κυτταροτοξικά (αντικαρκινικά) αντιβιοτικά προέρχονται από μικροοργανισμούς. Πρόκειται για αληθινά αντιβιοτικά, τα οποία όμως δε χρησιμοποιούνται στη θεραπεία λοιμώξεων, αλλά κακοήθων νόσων. Η πρώτη ομάδα αντικαρκινικών αντιβιοτικών, οι ακτινομυκίνες, απομονώθηκε το 1940 από τους Waxman και Woodruff [29]. Τα επόμενα χρόνια απομονώθηκαν αρκετά μέλη της ομάδας των ακτινομυκινών, όπως οι B, C, D, I, J, X και P₂ [17]. Οι πρώτες κλινικές έρευνες με την ακτινομυκίνη C, από το Schulte στη Δυτική Γερμανία το 1954, έδειξαν σημαντική δράση της ουσίας κυρίως στο λέμφωμα Hodgkin [29]. Το 1955, οι Farber και συν απέδειξαν τη χρήσιμη δράση της ακτινομυκίνης D (δακτυνομυκίνης) σε παιδικές κακοήθειες, όπως στο ραβδομυοσάρκωμα, τον όγκο του Wilms και το λέμφωμα Hodgkin [30].

Η μιτομυκίνες ανακαλύφθηκαν στην Ιαπωνία το 1956 και το 1959, αντίστοιχα [16], μετά από συστηματικές έρευνες σε διηθήματα του μικροοργανισμού *Streptomyces caespitosus*, ενώ στην Ιταλία το 1957 απομονώθηκε το αντιβιοτικό δαουνομυκίνη. Έτσι, παρήχθησαν τα πρώτα μέλη της εξαιρετικά σημαντικής ομάδας αντικαρκινικών αντιβιοτικών, των ανθρακυκλινών [16]. Η μπλεομυκίνη απομονώθηκε το 1966 [31,32], ενώ η δοξορουβικίνη (αδριαμυκίνη), άλλο σημαίνον μέλος των ανθρακυκλινών το 1969 από τους Arcamone και DiMarco. Τον ίδιο χρόνο, οι Bonadonna και συν απέδειξαν την ισχυρή αντικαρκινική δράση της αδριαμυκίνης, σε πολλούς καρκίνους και στον καρκίνο του μαστού [33,34].

Παράγωγα της πλατίνας

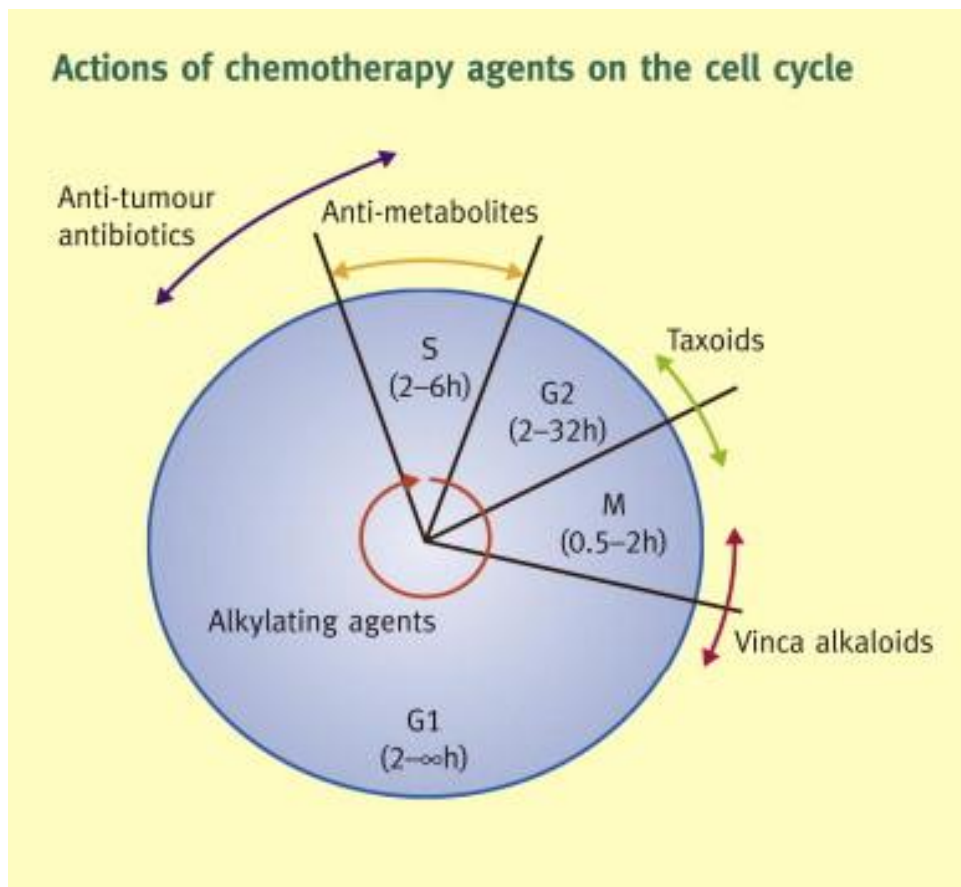
Αντίθετα από τις προγραμματισμένες μελέτες που οδήγησαν στην ανακάλυψη των ανθρακυκλινών, μία ακόμη σπουδαία ομάδα αντινεοπλασματικών φαρμάκων ανακαλύφθηκε από ένα τυχαίο γεγονός: η πλατίνα και τα παράγωγά της. Πώς έγινε αυτό; Το 1965 οι Rosenberg και συν έκαναν μία αξιοσημείωτη παρατήρηση: ηλεκτρόδια, που ήταν κατασκευασμένα από πλατίνα, με τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος, εμποδίζαν στο περιβάλλον τους την ανάπτυξη μικροβίων και συγκεκριμένα του μικροβίου *Escherichia coli*. Συστηματικές έρευνες ακολούθησαν, οι οποίες έδειξαν πως η *cis*-διαμινο-διχλωροπλατίνη II (*cis*-platin ή platinol ή *cDDP*) ασκούσε σημαντική αντιμικροβιακή και κυτταροστατική δράση [16]. Τα ευρήματά τους αυτά τα δημοσιεύουν τον ίδιο χρόνο στο *Nature* [35]. Το

1969, δημοσιεύουν εκ νέου στο Nature [36] την πρώτη μελέτη διεθνώς, με την οποία τα παράγωγα της πλατίνας παρουσιάζονται ως η νέα ομάδα κυτταροστατικών – αντικαρκινικών παραγόντων. Το 1971 οι Hill και συν [37] περιγράφουν τις πρώτες κλινικές ενδείξεις της πλατίνας, μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος του μαστού.

Το 1989 κυκλοφόρησε η καρβοπλατίνα, παράγωγο με μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με τη σισπλατίνα και το 1998 η οξαλιπλατίνα, η οποία επέκτεινε τη χρήση της πλατίνας σε τύπους καρκίνου, που αυτή δεν ήταν δραστική [16].

Ταξάνες

Το 1987 αποδείχτηκε η δραστικότητα των ταξανών, 23 χρόνια μετά την αρχική ανακάλυψή τους [16]. Σήμερα απολαμβάνουν ευρύτατη χρήση δύο μέλη της οικογένειας των ταξανών, η πακλιταξέλη και η δοσεταξέλη, οι οποίες είναι αποτελεσματικές σε μία πλειάδα κακοήθων νόσων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού.



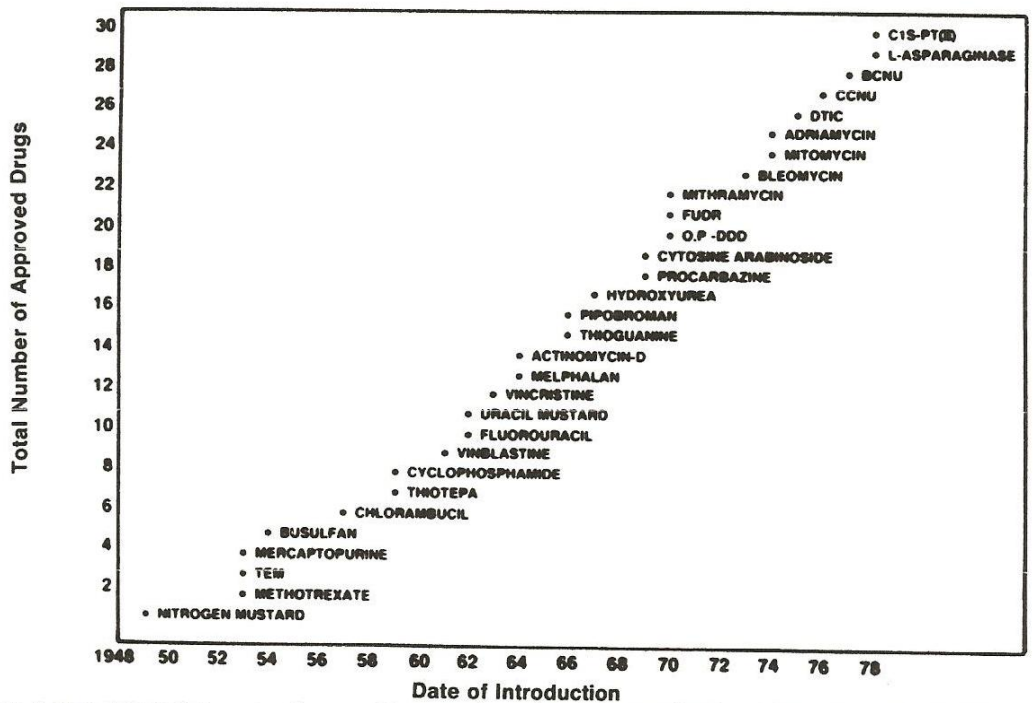
Εικόνα 12: Ο μηχανισμός δράσης των διαφόρων ομάδων χημειοθεραπευτικών. Από: [38].

Αντί επιλόγου

Ολοκληρώνοντας την αναφορά στην ιστορία των κυριότερων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων και της πορείας ανακάλυψής τους, αξίζει να αναφερθούμε σε μία περίφημη ρήση ενός σπουδαίου ιατρού, του WH Woglom προέδρου του Αντικαρκινικού Ινστιτούτου στο

Columbia το 1945, στο ξεκίνημα δηλαδή της μεγαλειώδους αυτής πορείας, που ακολούθησε τις τρεις τουλάχιστον επόμενες δεκαετίες και οδήγησε στην ανακάλυψη πλέον των 100 χημειοθεραπευτικών / κυτταροστατικών φαρμάκων: «Κάποιοι φαίνεται να μην αντιλαμβάνονται πόσο πολύπλοκο είναι το πρόβλημα της φαρμακευτικής θεραπείας του καρκίνου. Είναι σχεδόν, αν όχι απολύτως, σίγουρα όμως τόσο δύσκολο (Σημείωση: ο λεκτικός πλεονασμός είναι του Woglom), σαν να προσπαθείς να ανακαλύψεις ένα παράγοντα, ο οποίος θα μπορεί να εξοστρακίσει το αριστερό σου αυτί, αφήνοντας άθικτο το δεξιό – τόσο μικρή είναι η διαφορά μεταξύ του καρκινικού κυττάρου και του φυσιολογικού κυττάρου από τον ιστό προέλευσής του!» [39].

Στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 13) φαίνεται η χρονολογική εξέλιξη στην εύρεση (για την ακρίβεια στην έγκριση από τον FDA) των ποικίλων χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων. Δε συμπεριλαμβάνονται όμως τα ορμονικά σκευάσματα (ορμονοθεραπευτικά).



Εικόνα 13: Η χρονολογική εξέλιξη στην εύρεση των ποικίλων χημειοθεραπευτικών αντικαρκινικών σκευασμάτων. Από: [17].

- ii. Η αντικαρκινική ορμονοθεραπεία και ειδικότερα η ορμονοθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού και η εξέλιξή της κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα

Το ξεκίνημα

Βάσει της διαπίστωσης πως τα οιστρογόνα σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού, και της επίσημης ανακοίνωσης του γεγονότος αυτού στο Λονδίνο το 1945, όπως αναφέραμε και παραπάνω, οι Arair και Herman ανακοίνωσαν δύο χρόνια αργότερα τη χρησιμοποίηση της

τεστοστερόνης στη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού. Ο Nathanson ανακοίνωσε την επίδραση της silbestrol στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού και οι ορμόνες αυτές διατηρήθηκαν σε χρήση για τα επόμενα 20 χρόνια [7], τουλάχιστον δηλαδή ως την εμφάνιση της ταμοξιφαίνης. Από την έναρξη της δεκαετίας του '50 ως τα μέσα της δεκαετίας του '70, τουλάχιστον 150000 γυναίκες, από τις 200000, οι οποίες θεραπεύονταν για μεταστατικό καρκίνο του μαστού ετησίως στις ΗΠΑ, λάμβαναν ανδρογόνα ή οιστρογόνα για τη θεραπεία τους [17]. Η εμφάνιση, όμως, των αντι-οιστρογόνων παραμέρισε τις παραπάνω ορμόνες στη θεραπευτική του μαστού.

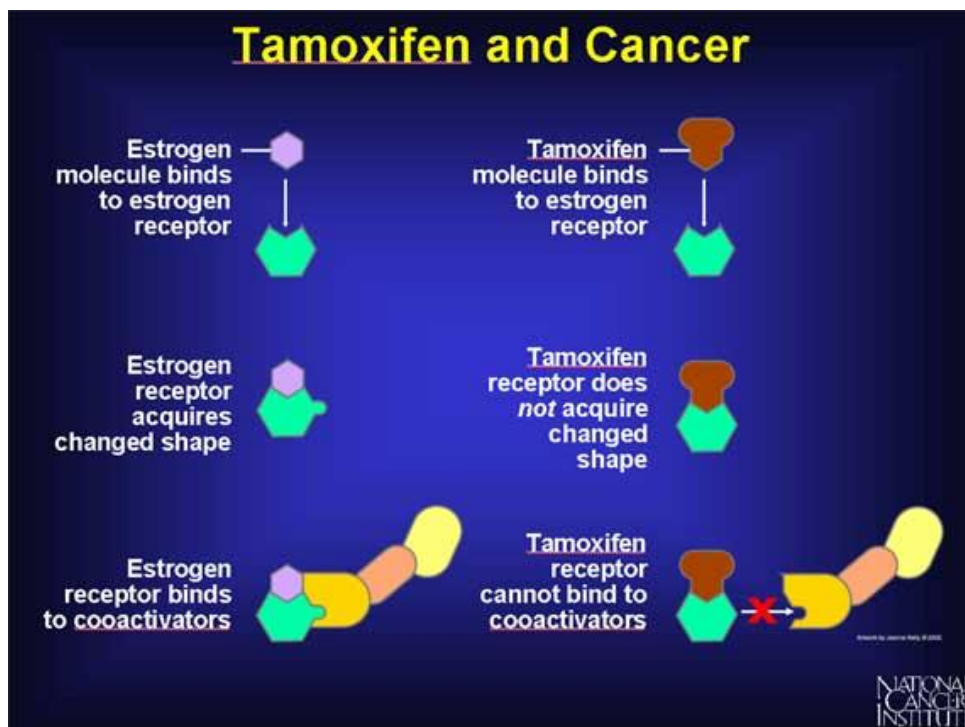
Κλομιφαίνη - το πρώτο αντι-οιστρογόνο

Η πρώτη κλινική χρήση ενός αντι-οιστρογόνου για τον καρκίνο του μαστού περιγράφηκε από τους Kistner και Smith το 1960 [40], ενώ το πρώτο αντι-οιστρογόνο, που επιβεβαιώθηκε πως εμφανίζει αποτελεσματικότητα έναντι του καρκίνου του μαστού, ήταν η κλομιφαίνη από τους Herbst και συν, το 1964 [41].

Ταμοξιφαίνη

Φθάνουμε έτσι στην περίφημη ταμοξιφαίνη, η χρήση της οποίας αποτέλεσε αληθινή επανάσταση στη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού. Η πρώτη δημοσιευμένη αναφορά για τη χορήγηση της ταμοξιφαίνης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού προέρχεται από τους Cole και συν, το 1971 [42]. Η ταμοξιφαίνη καθιερώθηκε, έκτοτε και για αρκετά χρόνια, ως το φάρμακο εκλογής τόσο για τις προ- όσο και για τις

μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ER (+) καρκίνο του μαστού, δεδομένης και της προηγηθείσας ανακάλυψης των ER από τον Jensen το 1967 [15], όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα II-2.2.



Εικόνα 14: Το περίφημο αντι-οιστρογόνο ταμοξιφαίνη και ο μηχανισμός δράσης της. Από: [43].

Αμινογλουτεθιμίδη – ο πρώτος αναστολέας αρωματάσης

Η αμινογλουτεθιμίδη ανευρίσκεται για πρώτη φορά στη φαρμακολογική βιβλιογραφία το 1956. Η αρχική της χρήση το 1960,

οπότε και έλαβε την έγκριση από τον FDA, ήταν ως αντι-επιληπτικό φάρμακο. Παρατηρήθηκε, όμως, πως εμφάνιζε πολύ σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και έτσι το 1966 αποσύρθηκε από την κυκλοφορία [44]. Ωστόσο, μεταξύ των σοβαρών της ανεπιθύμητων ενεργειών ήταν και η πλήρης καταστολή του φλοιού των επινεφριδίων και η αναστολή, έτσι, της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών. Προκαλούσε δηλαδή «φαρμακογενή-ιατρογενή επινεφριδεκτομή». Για το λόγο αυτό, εισήλθε στη θεραπευτική του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, καθώς την εποχή εκείνη η επινεφριδεκτομή και η υποφυσεκτομή αποτελούσαν συχνά χειρουργεία στην προσπάθεια αντιμετώπισης του προχωρημένου καρκίνου του μαστού [45]. Επιπλέον, βρέθηκε πως είχε τη δυνατότητα να αναστέλλει το ένζυμο αρωματάση, δηλαδή το ένζυμο, που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα, γεγονός, που ενίσχυσε έτι περαιτέρω το κύρος της ως αξιόλογου φαρμάκου για το καρκίνωμα του μαστού [46]. Το 1969, οι Griffiths και Hall ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν την αμινογλουτεθιμίδη σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και το 1973 δημοσίευσαν την πρώτη σχετική μελέτη [47]. Για λίγα χρόνια, η αμινογλουτεθιμίδη χρησιμοποιήθηκε παράλληλα με την ταμοξιφαίνη. Ωστόσο, οι μελέτες, που διενεργήθηκαν για τη σύγκριση των δύο ορμονικών σκευασμάτων, ανέδειξαν δύο σοβαρά μειονεκτήματα της αμινογλουτεθιμίδης, έναντι της ταμοξιφαίνης: Το πρώτο αφορούσε στην αναποτελεσματικότητα της αμινογλουτεθιμίδης στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο του μαστού, μειονέκτημα, που δεν εμφάνιζε η ταμοξιφαίνη, η οποία ήταν δραστική και στην

υποομάδα αυτή [48]. Το δεύτερο σοβαρό της μειονέκτημα αφορούσε στις πολύ σοβαρότερες και συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σχέση με την ταμοξιφαίνη [46]. Το αποτέλεσμα ήταν, λόγω των δύο αυτών σοβαρών της μειονεκτημάτων έναντι της ταμοξιφαίνης, η χρήση της αμινογλουτεθιμίδης να ατονήσει και σταδιακά να εγκαταλειφθεί.

LHRH ανάλογα

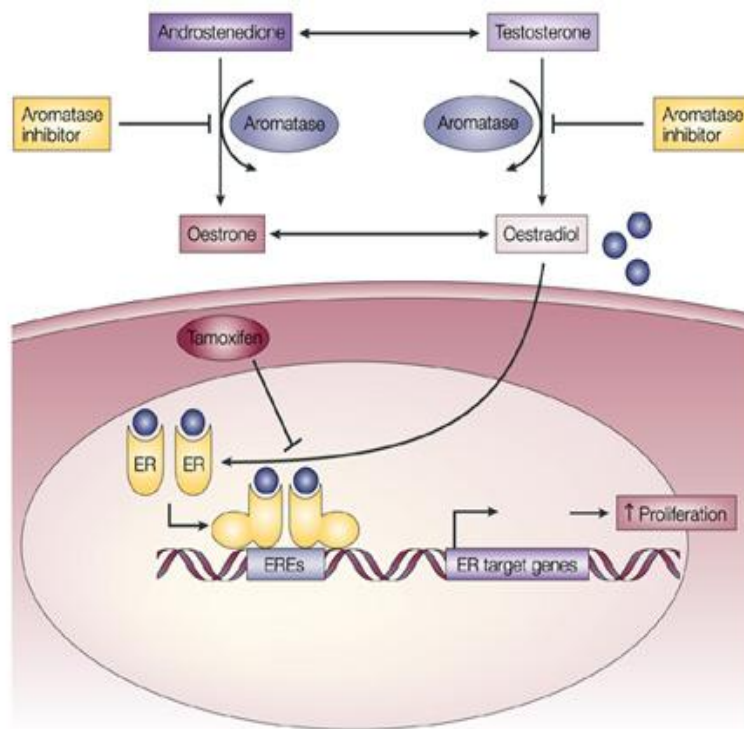
Το 1960 οι McCann και συν [49] έδειξαν πως μια υποθαλαμική ορμόνη οδηγούσε σε απελευθέρωση της ορμόνης LH (Luteinising Hormone) από την υπόφυση. Η ορμόνη αυτή απομονώθηκε το 1971 από τους Schally και συν [50] και έλαβε το όνομα LHRH (Luteinising Hormone Releasing Hormone) ή GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone). Αμέσως, ξεκίνησαν προσπάθειες για τη σύνθεση ουσιών με παρόμοια δράση με την LHRH και έτσι παρήχθησαν τα LHRH ανάλογα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπογοναδισμό [51], ως εναλλακτικά, μεγαλύτερης ασφάλειας, φάρμακα των αντισυλληπτικών [52-54], για τη θεραπεία της πρόωρης εφηβείας [55]. Έγινε, όμως, άμεσα φανερό πως η πιο σημαντική τους προσφορά θα ήταν στη χρησιμοποίησή τους στις ορμονο-εξαρτώμενες κακοήθειες νόσους. Έτσι, γρήγορα καθιερώθηκαν στη θεραπευτική του καρκίνου του προστάτη [56-58].

Η πρώτη αναφορά για χρήση των LHRH αναλόγων και πιο συγκεκριμένα της busarelin στον καρκίνο του μαστού ανήκει στους Klijn και de Jong το 1982 [59]. Έκτοτε, οι παράγοντες αυτοί έχουν καθιερωθεί στη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού, για πολύ συγκεκριμένες

υποομάδες ασθενών, με κυριότερο LHRH ανάλογο σε χρήση τη goserelin.

Αναστολείς αρωματάσης νέας γενιάς

Οι αναστολείς της αρωματάσης (Aromatase Inhibitors – AIs) δρουν αναστέλλοντας το ένζυμο αρωματάση, το οποίο καταλύει τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Όπως ειπώθηκε και νωρίτερα, ο πρώτος AI ήταν η αμινογλουτεθιμίδη, η οποία αποσύρθηκε όμως για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Το 1993, τέθηκε σε χρήση ο πρώτος AI νέας γενιάς, η φορμεστάνη, η οποία είναι ένας στεροειδικός AI βασισμένος στο ανδρογόνο ανδροστενδιόνη [60]. Λόγω της εκλεκτικότητάς της, η φορμεστάνη παρουσίαζε σημαντικά λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από την αμινογλουτεθιμίδη. Τα επόμενα χρόνια κυκλοφόρησαν και άλλοι AIs νεώτερης γενιάς: η αναστροζόλη, η λετροζόλη, η φαντροζόλη (υπάρχει μόνο στην Ιαπωνία) και η εξεμεστάνη, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που πάσχουν από ορμονο-ευαίσθητο καρκίνο του μαστού [60]. Στις γυναίκες αυτές θεωρούνται πιο αποτελεσματικές από την ταμοξιφαίνη [61]. Η φορμεστάνη και η εξεμεστάνη χαρακτηρίζονται ως Τύπου I AIs, βάσει της στεροειδικής φύσης τους και των συνεπειών, που αυτή έχει στον τρόπο δράσης τους, ενώ η αναστροζόλη, η φαντροζόλη και η λετροζόλη ως Τύπου II AIs, βάσει της μη-στεροειδικής τους φύσης και των συνεπειών της [60].



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 15: Οι αναστολείς της αρωματάσης και ο μηχανισμός δράσης τους. Από: [62].

- iii. **Στοχευμένες θεραπείες έναντι παραγόντων και υποδοχέων υπερπλασίας του κυττάρου στον καρκίνο γενικά και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα**

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί στη διάγνωση και στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού κατά τις προηγούμενες δεκαετίες, η κακοήθεια αυτή παραμένει μια από τις κύριες αιτίες θανάτου των γυναικών παγκοσμίως. Αυτό οδήγησε την έρευνα στη δημιουργία νέων

πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών παραγόντων, τα οποία μπορούν να ξεπερνούν τα όρια της κλασικής χημειοθεραπείας. Έτσι, προέκυψαν οι λεγόμενες «στοχευμένες θεραπείες», οι οποίες αφορούν σε φάρμακα, που έχουν σχεδιαστεί βασισμένα στις γνώσεις, που υπάρχουν πλέον για την υποκείμενη μοριακή βιολογία και παθολογία του καρκίνου.

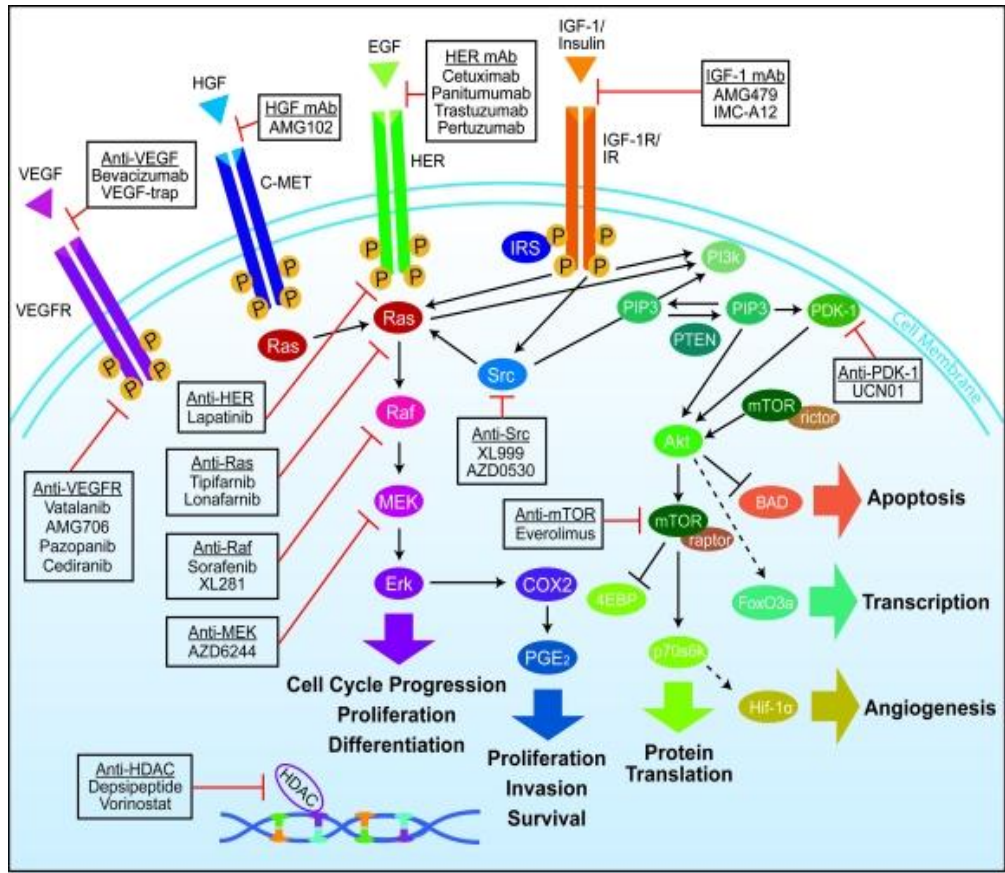
Γενικά μιλώντας, όταν μιλούμε για «στοχευμένες θεραπείες» εννοούμε τρεις κυρίως κατηγορίες φαρμάκων: (α') τους ανταγωνιστές των ορμονικών υποδοχέων, η ιστορία των οποίων εκτέθηκε αναλυτικά πιο πάνω, (β') τα μονοκλωνικά αντισώματα και (γ') τους αναστολείς αλληλουχιών κινάσης (ή συντομότερα αναστολείς κινασών – kinase inhibitors).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies) συνδέονται με υψηλή ειδικότητα στα αντιγόνα-στόχους τους. Οι αναστολείς κινασών συνδέονται συνήθως στην ATP-θέση σύνδεσης της κινάσης και έτσι αναστέλλουν την καταλυτική της δράση [63].

Ένα πανόραμα των αλληλοσυνδεόμενων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών στο κύτταρο και των αντιστοίχων στοχευμένων θεραπειών στον καρκίνο του παχέος εντέρου φαίνεται στην Εικόνα 16.

Αν και όλες οι βασικές διαδικασίες της καρκινογένεσης είναι σήμερα προσβάσιμες μέσω θεραπευτικών παραγόντων, μόνο σε τρεις από αυτές έχουν ως σήμερα βρεθεί αξιόπιστοι θεραπευτικοί παράγοντες

για τον καρκίνο του μαστού. Οι παράγοντες αυτοί αφορούν: (α') στην αναστολή συγκεκριμένων σηματοδοτικών δρόμων υπερπλασίας του κυττάρου, (β') στην επιδιόρθωση του DNA και (γ') στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία [63].



Εικόνα 16: Ένα πανόραμα των αλληλοσυνδεόμενων ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών στο κύτταρο και των αντιστοιχών στοχευμένων θεραπειών στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Από: [64].

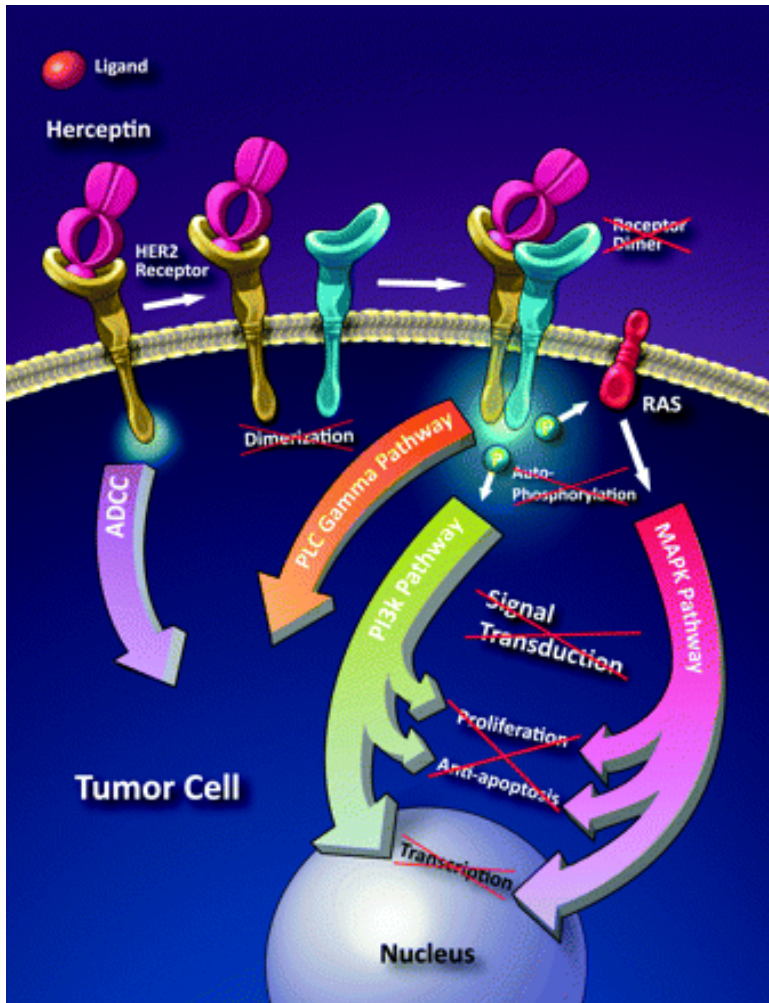
Η σηματοδότηση μέσω της οικογένειας των Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR ή ErbB) μοιάζει να αποτελεί τον πιο σημαντικό σηματοδοτικό δρόμο για τα κύτταρα στον καρκίνο του μαστού. Η σηματοδότηση μετά τον υποδοχέα ErbB (downstream δηλαδή) προχωρά μέσω δύο κρίσιμων μονοπατιών: του Ras-Raf-MAPK και του PI3K-PTEN-AKT-mTOR.

Στοχευμένες θεραπείες έναντι του HER2/c-ErbB2/neu

Ο υποδοχέας HER2 βρίσκεται αυξημένος σε ποσοστό μεταξύ 20% και 30% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Για τον υποδοχέα αυτόν, το 1998 έλαβε έγκριση από τον FDA το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (Herceptin), ένα φάρμακο το οποίο απετέλεσε αληθινή επανάσταση στη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού, καθώς άλλαξε τη φυσική πορεία της νόσου στις γυναίκες με υπερεκφρασμένο τον HER2 υποδοχέα. Περισσότερα για το φάρμακο αυτό, αναφέρονται στο Κεφ. «II-6.4 – Αντι-HER2 θεραπείες – i».

Ωστόσο, με τη χρήση του trastuzumab παρατηρήθηκε πως υπάρχουν περιπτώσεις ασθενών με HER2(+) καρκίνο του μαστού και ανθεκτικότητα στο trastuzumab. Για τις περιπτώσεις αυτές, βρέθηκαν νέες στοχευμένες θεραπείες. Το πρώτο φάρμακο, που έλαβε την έγκριση του FDA για τις περιπτώσεις ανθεκτικού στο trastuzumab καρκίνου του μαστού, ήταν το μονοκλωνικό αντίσωμα lapatinib. Μια νέα προσέγγιση για την υπέρβαση της ανθεκτικότητας των όγκων στο

trastuzumab είναι οι συνδυασμένες αγωγές με το μονοκλωνικό αντίσωμα pertuzumab, ενώ ακολούθησαν εν συνεχεία το neratinib, το canertinib κ.ά. (βλ. Κεφ. «II-6.4 – Αντι-HER2 θεραπείες – ii, iii, iv»).



Εικόνα 17: Το μονοκλωνικό αντίσωμα *trastuzumab* (*Herceptin*) και ο μηχανισμός δράσης του με τα σηματοδοτικά ενδοκυττάρια μονοπάτια στα οποία επιδρά. Από: [65].

Στοχευμένες θεραπείες έναντι του HER1 ή EGFR και του mTOR

Για την αναστολή του υποδοχέα ErbB1 ή EGFR βρέθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα gefitinib και erlotinib [66], ενώ για την αναστολή του mTOR το everolimus και το temsirolimus [67,68].

iv. Στοχευμένες αντι-αγγειογενετικές θεραπείες

Η αγγειογένεση, η διαδικασία δημιουργίας δηλαδή νέων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία και η vasculogenesis, η διαδικασία της de novo δημιουργίας νεοαγγείων, συνιστούν καθοριστικά βήματα για την πρόοδο των κακοήθων νεοπλασιών. Έτσι, η φαρμακευτική διακοπή τους μπορεί να οδηγήσει τους όγκους σε υποστροφή.

Αντι-VEGF-A θεραπείες

Το πρώτο αντι-αγγειογενετικό φάρμακο, το οποίο έλαβε έγκριση από τον FDA το 2004, ήταν το bevacizumab (βλ. Κεφ. II-4.2). Το bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στον κυριότερο τύπο VEGF, το VEGF-A.

Το aflibercept (VEGF Trap) είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη, που συνδέεται με όλες τις isoμορφές του VEGF (και όχι μόνο με το VEGF-A όπως το bevacizumab).

Για περισσότερες λεπτομέρειες για τις θεραπείες αυτές, βλ. Κεφ. «II-4.11 – Αντι-VEGF θεραπείες στον καρκίνο του μαστού – i,ii».

Αναστολείς του VEGFR

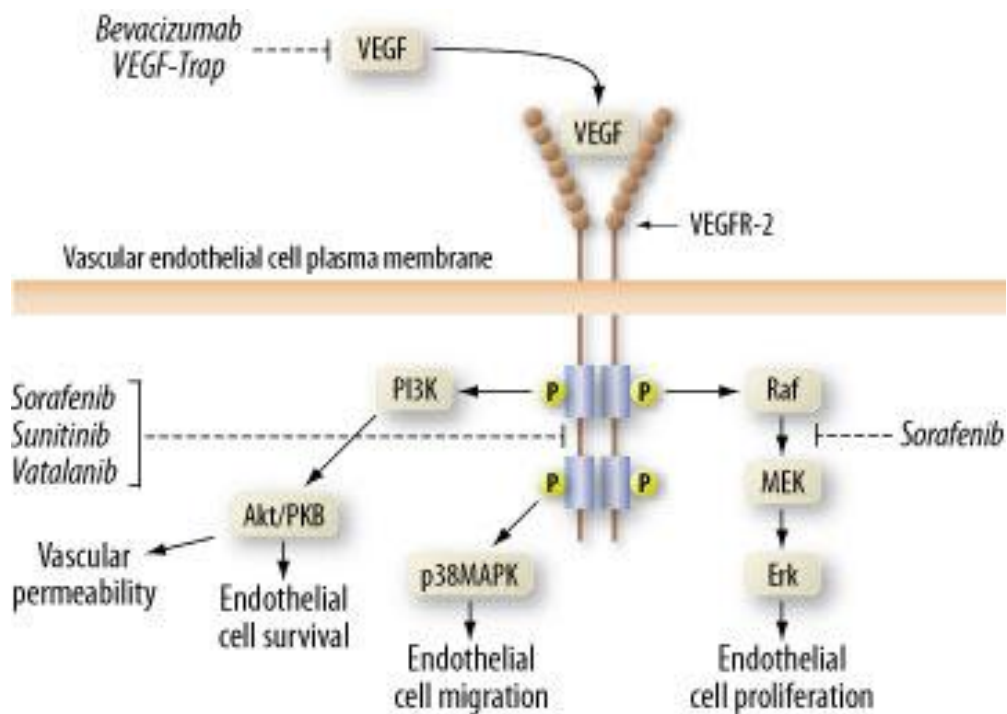
Το sunitinib είναι ένας από του στόματος πολυ-αναστολέας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI) και αναστέλλει τους εξής υποδοχείς: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-α και -β, stem-cell factor receptor (c-KIT), fms-like tyrosine kinase receptor 3 (flt-3) [69].

Το pazopanib είναι επίσης ένας πολυ-αναστολέας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI), ο οποίος αναστέλλει τους εξής υποδοχείς: VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3.

Το vandetanib είναι ένας αναστολέας τυροσινοκινασών (TKI) και αναστέλλει τους υποδοχείς VEGFR2 και EGFR.

Τέλος, το sorafenib είναι ένα μικρό μόριο-αναστολέας της δράσης της κινάσης Raf αλλά και αναστολέας υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI) με υποδοχείς-στόχους τους παρακάτω: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-β, c-KIT και flt-3, δηλαδή ταυτόχρονα αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και διεγείρει την απόπτωση [69].

Για περισσότερες λεπτομέρειες για τις θεραπείες αυτές, βλ. Κεφ. «II-4.11 – Αντι-VEGF θεραπείες στον καρκίνο του μαστού – iii,iv,v,vi».



Εικόνα 18: Οι κυριότεροι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες και τα σημεία δράσης τους. Από: [70]

II-3

Γενικά στοιχεία

περί του

καρκίνου του μαστού

II-3.1 Επιδημιολογία

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η σημασία των παραγόντων της αναπαραγωγής στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού άρχισε να διαφαίνεται ήδη από το 18^ο αιώνα, όταν παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι ο καρκίνος του μαστού ήταν περισσότερο συχνός στις μοναχές σε σχέση με τις άλλες γυναίκες. Τον 20^ό αιώνα, η εκτεταμένη χρήση των αντισυλληπτικών δισκίων, η οποία ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960, σε συνδυασμό με τη μετέπειτα αυξανόμενη χρήση της μετεμμηνοπαυσιακής ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης, διαμόρφωσαν καταστάσεις, που ως ένα βαθμό διατηρούν τα χαρακτηριστικά «επιδημιολογικού πειράματος» και αξιοποιήθηκαν κατάλληλα στην αξιολόγηση της αιτιολογικής συσχέτισης μεταξύ αναπαραγωγικών και ορμονικών παραγόντων και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών του 20^{ού} αιώνα, η σχέση μεταξύ των αναπαραγωγικών παραγόντων και του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού έχει μελετηθεί ευρύτατα και μεγάλος αριθμός ερευνητικών άρθρων έχει δημοσιευτεί στη διεθνή βιβλιογραφία [1].

Η επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού έχει μελετηθεί τα τελευταία 20 χρόνια περισσότερο από εκείνη οποιουδήποτε άλλου νοσήματος. Αρκετοί παράγοντες κινδύνου έχουν επαρκώς τεκμηριωθεί, αλλά οι μεγάλες διακρατικές και διαχρονικές διαφοροποιήσεις του νοσήματος δε φαίνεται ότι μπορούν να ερμηνευθούν ικανοποιητικά με βάση τους παράγοντες αυτούς [71-74]. Έτσι, οι μισές περίπου περιπτώσεις

μπορούν να αποδοθούν στους ήδη γνωστούς παράγοντες κινδύνου, όπως η ηλικία εμμηναρχής, η ηλικία πρώτης τελειόμηνης κύησης, η ηλικία εμμηνόπαυσης και οι υπερπλαστικές νόσοι του μαστού. Ένα επιπρόσθετο 10% των περιπτώσεων σχετίζεται με το θετικό οικογενειακό ιστορικό [2,75].

II. ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΟΣ – ΕΠΙΠΤΩΣΗ – ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ – ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Κάθε χρόνο υπολογίζεται ότι σε όλο τον κόσμο γίνεται πρωτοδιάγνωση καρκίνου του μαστού περίπου σε ένα εκατομμύριο γυναίκες, εκ των οποίων το 60% αφορά σε κατοίκους ανεπτυγμένων χωρών. Η νόσος αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα τύπο καρκίνου σε γυναίκες, που ζουν στις ανεπτυγμένες χώρες, μετά τον καρκίνο του δέρματος [2]. Παράλληλα, αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα αίτιο θανάτου από καρκίνο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Στη Βόρεια Ευρώπη και την Αμερική, η επίπτωση του καρκίνου του μαστού κυμαίνεται περίπου σε 100 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες ανά έτος και η διά βίου πιθανότητα είναι μία στις έξι συνολικά και μία στις οκτώ για διηθητικό καρκίνο του μαστού [76]. Στις ΗΠΑ, η διάγνωση του καρκίνου του μαστού αφορά στη 1 σε κάθε 3 διαγνώσεις καρκίνου στις γυναίκες ετησίως [77]. Η Αμερικανική Ένωση κατά του Καρκίνου (American Cancer Society) εκτίμησε σε 230.000 περίπου τις νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ το 2011, σε 57.000 περίπου τις νέες περιπτώσεις in situ καρκίνου του μαστού και σε 39.000 περίπου

τους θανάτους από καρκίνο του μαστού [77]. Τα παραπάνω φαίνονται στον Πίνακα 1.

Ηλικία	Περιπτώσεις in situ καρκίνου του μαστού	Περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού	Θάνατοι από καρκίνο του μαστού
< 40 ετών	1,780	11,330	1,160
< 50 ετών	14,240	50,430	5,240
50-64 ετών	23,360	81,970	11,620
> 65 ετών	20,050	98,080	22,660
Όλες οι ηλικίες	57,650	230,480	39,520

Πίνακας 1: Εκτίμηση νέων περιστατικών καρκίνου του μαστού και θανάτων από καρκίνο του μαστού, ανά ηλικιακή ομάδα, στις ΗΠΑ, το 2011. Από: [77].

Σε σχέση με άλλα νοσήματα στο δυτικό κόσμο, ο καρκίνος του μαστού ευθύνεται για περισσότερους θανάτους γυναικών μέσης ηλικίας από ό,τι τα τροχαία ατυχήματα, καθώς επίσης και για περισσότερα χαμένα χρόνια αναμενόμενης ζωής σε σχέση με κάθε άλλη νοσολογική οντότητα για γυναίκες κάθε ηλικίας [2,78].

Στο 1% των περιπτώσεων παρατηρείται σύγχρονη ανάπτυξη καρκίνου και στους δύο μαστούς, ποσοστό το οποίο αυξάνεται μέχρι και 10% αν γίνει βιοψία στον άλλο μαστό κατά τη διάρκεια της μαστεκτομής [2,79]. Επίσης, οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού έχουν σχετικά υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης και άλλων πρωτοπαθών μορφών καρκίνου, όπως του ενδομητρίου και της ωοθήκης και ενδεχομένως του παχέος εντέρου και του θυρεοειδούς αδένος ή του μελανώματος και παρουσιάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό οικογενή συρροή [2,80-82]. Ως προς τον παθογενετικό μηχανισμό, θεωρείται ότι οι καρκίνοι αυτοί προκύπτουν από την επίδραση κοινών αιτιολογικών παραγόντων. Ακόμη, καρκίνος του μαστού μπορεί να αναπτυχθεί συχνότερα του αναμενομένου μετά από χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία για άλλες μορφές καρκίνου [2,81].

Η νόσος έχει πενταετή τεκμαρτή επιβίωση που πλησιάζει το 70% [1].

III. ΔΙΑΧΡΟΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Για να σχολιάσουμε τις μεταβολές κατά τις τελευταίες δεκαετίες στην επίπτωση και τη θνησιμότητα του καρκίνου του μαστού, οφείλουμε να διακρίνουμε μεταξύ διηθητικών και *in situ* καρκινωμάτων. Οι συχνότητες στις οποίες θα αναφερθούμε αφορούν στις χώρες του δυτικού (ανεπτυγμένου) κόσμου, καθώς μόνο στις χώρες αυτές υπάρχουν επαρκή και αξιόπιστα επιδημιολογικά δεδομένα διαθέσιμα

από τη δεκαετία του 1970 ως σήμερα. Ως χαρακτηριστικό παράδειγμα θα χρησιμοποιήσουμε τις ΗΠΑ με τα πλούσια διαθέσιμα επιδημιολογικά στοιχεία από το πρόγραμμα «Surveillance, Epidemiology and End Results – SEER» του «National Cancer Institute – NCI» [83-85].

i. Επίπτωση

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, παρατηρήθηκε αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού κατά 3.7% περίπου κατ' έτος.

Διηθητικός καρκίνος του μαστού

Η αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού, από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, αντικατοπτρίζει δύο πραγματικότητες της εποχής: Η πρώτη αφορά στις αυξημένες δυνατότητες διάγνωσης με την εισαγωγή του screening για τον καρκίνο του μαστού μέσω της μαστογραφίας. Η δεύτερη αφορά στις ραγδαίες αλλαγές στα αναπαραγωγικά πρότυπα με τη σημαντική αύξηση της ηλικίας 1^{ης} κύησης και το μικρότερο αριθμό τέκνων, σε σχέση με προηγούμενα χρόνια, που αποτελούν αναγνωρισμένους παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού.

Έτσι, κατά την αναφερόμενη χρονική στιγμή, εμφανίζεται μια σταδιακή αύξηση της επίπτωσης του διηθητικού καρκίνου του μαστού τόσο στις γυναίκες άνω των 50 ετών όσο και στις νεότερες γυναίκες (5.4% και 3.2% ετήσια αύξηση, αντίστοιχα) [86]. Μεταξύ των γυναικών ηλικίας 50 ετών και άνω, η επίπτωση της νόσου σταθεροποιήθηκε μεταξύ των

ετών 1987 και 1993 και στη συνέχεια παρουσίασε νέα αύξηση, από το 1993 ως το 1999, αλλά με χαμηλότερο ρυθμό (1.9% κατ' έτος) [86]. Η νέα αυτή αύξηση αντανακλά πιθανώς περαιτέρω αύξηση στο screening μέσω μαστογραφίας, αύξηση της παχυσαρκίας και αύξηση στη μετεμμηνοπαυσιακή χρήση ορμονών. Μεταξύ των ετών 2002 και 2003, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παρουσίασε σημαντική πτώση (της τάξης του 7%) [87]. Αυτή η οξεία πτώση οφειλόταν πιθανώς στους εξής λόγους: (α') στην οξεία μείωση της μετεμμηνοπαυσιακής χρήσης ορμονών, που ακολούθησε τη δημοσίευση το έτος 2002 των αποτελεσμάτων της μελέτης «Women's Health Initiative randomized trial», που συνέδεαν τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) με τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού [88]. (β') Η μείωση αυτή μπορεί ακόμη να σχετίζεται με τα ποσοστά του μαστογραφικού screening, τα οποία έφθασαν σε μία κορύφωση (peak) κατά το έτος 2000 και εν συνεχεία παρουσίασαν μικρή σταδιακή κάμψη [89]. Από το έτος 2004 έως σήμερα η επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες άνω των 50 ετών έχει παραμείνει σταθερή [86]. Ωστόσο, η αντίστοιχη συχνότητα στις γυναίκες κάτω των 50 ετών έχει παραμείνει σταθερή από το 1985 [86].

In situ καρκίνος του μαστού

Η επίπτωση του in situ καρκίνου του μαστού παρουσίασε συνεχή σημαντική αύξηση τόσο κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 όσο και του 1990, κυρίως λόγω των αυξημένων δυνατοτήτων διάγνωσης μέσω του μαστογραφικού screening. Η αύξηση αφορούσε τις γυναίκες

και των δύο ηλικιακών ομάδων (άνω των 50 και κάτω των 50 ετών), αν και ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα των μεγαλύτερων ηλικιών. Από το 1999, η επίπτωση του in situ καρκίνου του μαστού έχει σταθεροποιηθεί για τις γυναίκες ηλικίας 50 ετών και άνω, αλλά εξακολουθεί να αυξάνεται στις νεότερες γυναίκες. Η σταθεροποίηση της συχνότητας στις μεγαλύτερες γυναίκες αντικατοπτρίζει πιθανώς τη μικρή αύξηση και το plateau στο μαστογραφικό screening από το 2000 ως σήμερα [89].

Διαχρονικές μεταβολές ανάλογα με το status των ορμονικών υποδοχέων

Τα στοιχεία από το SEER πρόγραμμα μεταξύ των ετών 1992 και 1998 δείχνουν πως η επίπτωση του καρκίνου του μαστού με αρνητικούς οιστρογονικούς (ER) και/ή προγεστερονικούς (PR) υποδοχείς παρουσίασε μείωση, ενώ αυτή των περιπτώσεων με ER/PR θετικούς υποδοχείς αύξηση [90]. Ένα μέρος τουλάχιστον αυτής της αύξησης μόνο της μίας ομάδας οφείλεται πιθανώς στη χρήση της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης (HRT), κατά τις δεκαετίες του 1980 και του 1990, καθώς η HRT οδηγεί μάλλον επιλεκτικά σε αύξηση των ER/PR θετικών όγκων [91].

Διαχρονικές μεταβολές της επίπτωσης ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου του μαστού (λοβιακό / πορογενή)

Άλλα δεδομένα από το SEER πρόγραμμα δείχνουν μία αύξηση κατά 100% (διπλασιασμό) της επίπτωσης των λοβιακών διηθητικών

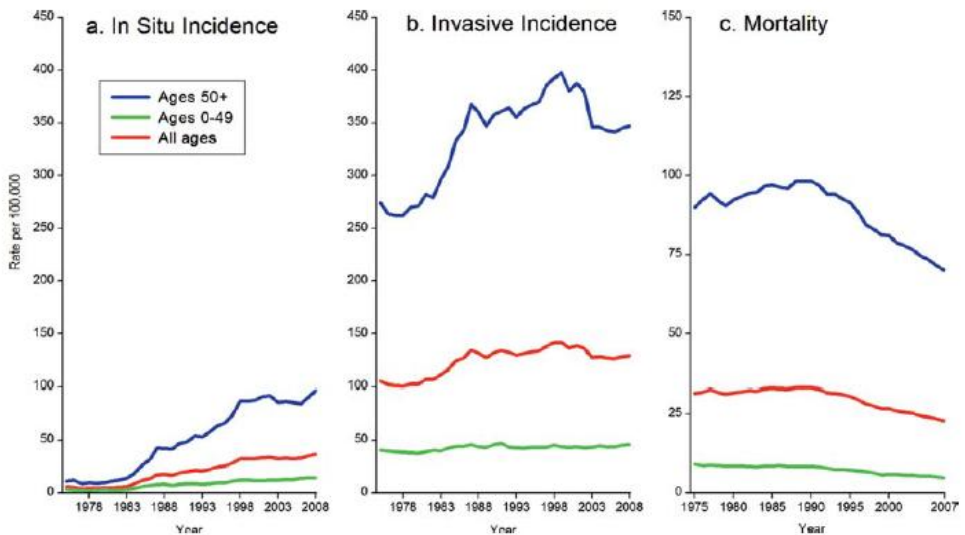
καρκινωμάτων του μαστού μεταξύ των ετών 1987 και 1999, σε αντίθεση με τη σταθεροποιημένη επίπτωση των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων κατά την ίδια χρονική περίοδο [92]. Το εύρημα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και σχετικές μελέτες έχουν συνδέσει τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) με τα λοβιακά καρκινώματα [93,94].

ii. Θνησιμότητα

Μετά από μία συνεχή αλλά πολύ μικρή αύξηση της θνησιμότητας επί αρκετά έτη (0.4% ετήσιος ρυθμός αύξησης μεταξύ των ετών 1975 και 1990), η συχνότητα των θανάτων από καρκίνο του μαστού παρουσίασε μείωση κατά 2.2% κατ' έτος από το 1990 ως το 2007 συνολικά για τις γυναίκες όλων των ηλικιακών ομάδων [95]. Η μείωση ήταν μεγαλύτερη μεταξύ των γυναικών ηλικίας κάτω των 50 ετών (3.2% κατ' έτος) σε σχέση με τις γυναίκες 50 ετών και άνω (2.0% κατ' έτος). Η μείωση αυτή στη θνησιμότητα οφείλεται τόσο στην πρόοδο των θεραπευτικών μεθόδων (επιθετική χρήση πολλών adjuvant θεραπειών) όσο και στην έγκαιρη διάγνωση (αυξημένη χρήση του μαστογραφικού screening) [96]. Επίσης, η μείωση της θνησιμότητας ήταν μεγαλύτερη μεταξύ των περιπτώσεων με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, συγκριτικά με τις περιπτώσεις με αρνητικούς, γεγονός που αναμφίβολα αντικατοπτρίζει τις περισσότερες θεραπευτικές δυνατότητες στους όγκους της πρώτης κατηγορίας [97].

Στην Εικόνα 19, παρουσιάζονται οι διαχρονικές μεταβολές της επίπτωσης του διηθητικού και του in situ καρκίνου του μαστού αλλά

και της θνησιμότητας ανά ηλικιακή ομάδα, στις ΗΠΑ, από τη δεκαετία του 1970.



Εικόνα 19: Επίπτωση και θνησιμότητα του γυναικείου καρκίνου του μαστού ανά ηλικιακή ομάδα στις ΗΠΑ, από το 1975 ως το 2008. Από: [77].

IV. ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΕΙΣ ΒΑΣΕΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΛΗΣ

Παγκοσμίως, η επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι υψηλότερη στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη και χαμηλότερη στην Ασία και την Αφρική [98]. Η επίπτωση στην Ιαπωνία και την αγροτική Κίνα αυξάνεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο, στις χώρες της ανατολικής Ασίας, η επίπτωση φθάνει μόλις το ένα πέμπτο εκείνης των ΗΠΑ [99].

Οι διαφορές αυτές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων χωρών, αλλά και οι μεταβολές μέσα στην κάθε χώρα, αντικατοπτρίζουν τις κοινωνικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα κατά την εκβιομηχάνιση μιας κοινωνίας, π.χ. μεταβολές στη διαιτητική πρόσληψη λίπους, στο σωματικό βάρος, στην ηλικία εμμηναρχής, στη διάρκεια του θηλασμού και στα αναπαραγωγικά πρότυπα, όπως οι λιγότερες γεννήσεις και η μεγαλύτερη ηλικία 1^{ης} κύησης.

Έρευνες σε μετανάστες, στις οποίες οι μεταβολές στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού εκτιμώνται σε γυναίκες, που μετακινήθηκαν από χώρες χαμηλού σε χώρες υψηλού κινδύνου, καταδεικνύουν πως η επίπτωση αυξάνεται στους μετανάστες δεύτερης γενιάς και ακόμη περισσότερο στους τρίτης γενιάς. Έτσι, η επίπτωση φθάνει να εξομοιωθεί με την αντίστοιχη της χώρας υποδοχής, συνήθως δύο γενιές μετά τη γενιά της μετανάστευσης [100,101]. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν πως οι διεθνείς διαφοροποιήσεις στους δείκτες του καρκίνου του μαστού οφείλονται, κατά βάση, στη σημαντική επίδραση της κουλτούρας, του τρόπου ζωής και των περιβαλλοντικών παραγόντων και σαφώς λιγότερο σε γενετικούς παράγοντες [1,102].

Στις ΗΠΑ, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθη νόσο στις γυναίκες σε κάθε εθνολογική ομάδα, αν και υφίστανται διαφορές μεταξύ τους [103,104]. Έτσι, τα δεδομένα της American Cancer Society δείχνουν πως την υψηλότερη επίπτωση εμφανίζουν οι λευκές γυναίκες (Καυκάσιας καταγωγής) (133 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες), ενώ η επίπτωση είναι χαμηλότερη στις μαύρες (Afro-Americans) (118

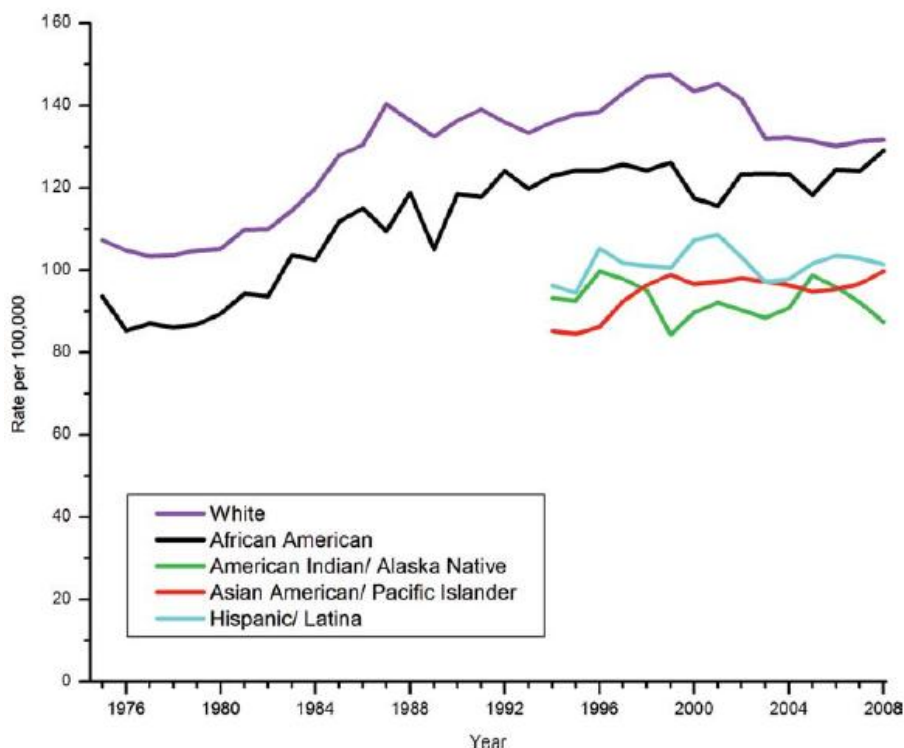
περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες), στις γυναίκες Ασιατικής καταγωγής (Asian Americans / Pacific Islanders) (89 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες), στις ισπανόφωνες γυναίκες από τη Λατινική Αμερική (89 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες) και στις Ινδιάνες Αμερικανίδες και γηγενείς της Αλάσκα (70 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες) [103].

Αρκετές από τις παρατηρούμενες διαφορές μπορούν να αποδοθούν, όπως είπαμε, σε παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (lifestyle) και το κοινωνικοοικονομικό status (π.χ. πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας για τη διάγνωση και τη θεραπεία των νόσων). Οι παράγοντες αυτοί μπορούν, εν μέρει τουλάχιστον, να ερμηνεύσουν κάποιες από τις πολύ σημαντικές διαφορές, που εμφανίζονται ειδικά στην επιβίωση και συχνά αποδίδονται εσφαλμένα στη φυλή. Πάντως, γενετικοί και/ή βιολογικοί παράγοντες πιθανώς να συνεισφέρουν και αυτοί [105,106]. Ως παράδειγμα για τα ανωτέρω, μπορούμε να αναφέρουμε τα παρακάτω που αφορούν στις μαύρες γυναίκες στις ΗΠΑ:

- Οι μαύρες γυναίκες εμφανίζουν νωρίτερα την ηλικιακή κορύφωση (peak) της συχνότητας καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις Καυκάσιες γυναίκες [103].
- Παρά τη χαμηλότερη επίπτωση καρκίνου του μαστού συνολικά, οι μαύρες γυναίκες έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού σε σχέση με τις λευκές. Επιπλέον, ενώ το ποσοστό θανάτων από καρκίνο του μαστού μειωνόταν κατά 2.4% κατ' έτος μεταξύ των λευκών γυναικών στις ΗΠΑ από το

1990, το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης μεταξύ των μαύρων γυναικών ήταν μόλις 1.1% κατ' έτος [103]. Οι διαφορές αυτές οφείλονται σε δύο κοινωνικοοικονομικούς λόγους και σε ένα μάλλον γενετικό: Πρώτον, οι μαύρες γυναίκες διαγιγνώσκονται σε υψηλότερο κατά μέσο όρο στάδιο (stage) νόσου και δεύτερον, εμφανίζουν υψηλότερη θνητότητα κατά στάδιο νόσου. Όσον αφορά στον ιδιοσυγκρασιακό λόγο, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως οι μαύρες γυναίκες πάσχουν συχνά από επιθετικότερες μορφές της νόσου (π.χ. με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς), γεγονός που σαφώς σχετίζεται με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από τον καρκίνο του μαστού [107].

Στην Εικόνα 20 φαίνονται οι διαφορές στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού, ανάλογα με τη φυλή, στις ΗΠΑ, από το 1975 ως το 2008.



Εικόνα 20: Οι τάσεις στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού, ανάλογα με τη φυλή, στις ΗΠΑ, από το 1975 ως το 2008. Από: [77].

II-3.2 Παράγοντες κινδύνου (Risk factors)

I. ΗΛΙΚΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΟ

Η ηλικία και το φύλο αποτελούν δύο από τους πλέον ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για την πρόκληση καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται 100 φορές συχνότερα στις γυναίκες από τους άνδρες. Στις ΗΠΑ, υπολογίζονται σε 200.000 περίπου οι

γυναίκες, που διαγιγνώσκονται κατ' έτος με καρκίνο του μαστού και οι άνδρες σε 1900 περίπου [108].

Η συχνότητα της νόσου αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία ως την ηλικία των 45-50 ετών, οπότε και η αύξηση γίνεται πιο ήπια [109]. Η μεταβολή αυτή στην κλίση της αύξησης αντικατοπτρίζει πιθανότατα την επίδραση των ορμονικών αλλαγών (εμμηνόπαυση), οι οποίες εμφανίζονται σε αυτή την ηλικία, αν και έχουν διατυπωθεί και διαφορετικές υποθέσεις [110]. Μετά την ηλικία των 75-80 ετών, η καμπύλη ισοπεδώνεται και ακολουθεί μια ελαφρά μείωση της συχνότητας [111].

II. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΝΟΣΟΙ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι καλοήθειες νόσοι του μαστού περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία παθολογικών καταστάσεων. Οι μονήρεις μη υπερπλαστικές βλάβες (π.χ. ινοκυστική αλλαγή, μονήρες θήλωμα, απλό ινοαδένωμα) δεν αυξάνουν τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Η παρουσία πολλαπλών μη υπερπλαστικών βλαβών μπορεί να αυξήσει ήπια τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού (σχετικός κίνδυνος – Relative Risk / RR=1.8 στη δεκαετία, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά σε μία προοπτική μελέτη [112]).

Ωστόσο, οι πιο σημαντικές βλάβες που προδιαθέτουν στην ανάπτυξη μη διηθητικού ή διηθητικού καρκίνου του μαστού είναι οι υπερπλαστικές βλάβες, κυρίως δε αυτές που συνοδεύονται από

κυτταρική ατυπία. Ο κίνδυνος πρόκλησης διηθητικού καρκίνου του μαστού είναι ελαφρώς αυξημένος (RR=1.3-2) για μία υπερπλαστική βλάβη χωρίς ατυπία (complex ινοαδένωμα, σκληρυντική αδένωση, ενδοπορικό θήλωμα). Ο κίνδυνος είναι υψηλότερος (RR=4-6) για τις υπερπλαστικές βλάβες με συνοδό ατυπία (άτυπη λοβιακή υπερπλασία, άτυπη πορογενή υπερπλασία) και ακόμη πιο υψηλός (10 φορές αυξημένος), όταν η ατυπία είναι πολυεστιακή [113].

III. ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Το προσωπικό ιστορικό διηθητικού ή in situ καρκίνου του μαστού αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης διηθητικού καρκίνου του μαστού στον άλλο μαστό. Αν έχουν βρεθεί μόνο in situ αλλοιώσεις, ο 10ετής κίνδυνος πρόκλησης καρκίνου στον άλλο μαστό είναι 5% [114]. Στις γυναίκες με διηθητικό καρκίνο, ο κίνδυνος πρόκλησης καρκίνου στον άλλο μαστό είναι 1% και 0.5% κατ' έτος για τις προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς, αντίστοιχα.

IV. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

i. Οικογενειακό ιστορικό

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, θετικό οικογενειακό ιστορικό αναφέρεται μόνο στο 15-20% των γυναικών, που

εμφανίζουν τη νόσο. Ο κίνδυνος σχετίζεται με την ύπαρξη ενός πάσχοντος συγγενούς πρώτου ή δεύτερου βαθμού από τη μητέρα ή από τον πατέρα. Ο κίνδυνος επηρεάζεται από την ηλικία τόσο του μέλους στο οποίο αναφερόμαστε όσο και του ασθενούς συγγενούς του κατά τη στιγμή της διάγνωσης, καθώς και από τον αριθμό των θηλέων συγγενών πρώτου βαθμού, που πάσχουν ή όχι από καρκίνο. Ως παράδειγμα, μπορούμε να αναφέρουμε μεγάλη έρευνα με τη συμμετοχή 50.000 γυναικών πασχόντων από καρκίνο του μαστού και 100.000 υγιών μαρτύρων. Όπως υπολογίστηκε από την έρευνα, ο σχετικός κίνδυνος (RR) εμφάνισης καρκίνου του μαστού για μια γυναίκα με μία συγγενή πρώτου βαθμού πάσχουσα ήταν 1.8. Με δύο συγγενείς πρώτου βαθμού πάσχουσες, ο RR ανέβαινε στο 2.93. Ο σχετικός κίνδυνος ήταν μεγαλύτερος για τις γυναίκες των οποίων η πάσχουσα συγγενής ήταν νεότερης ηλικίας. Έτσι, ο RR ήταν 2.9 για μια γυναίκα, όταν η συγγενής της είχε διαγνωστεί με τη νόσο σε ηλικία μικρότερη των 30 ετών, αλλά μόνο 1.5 όταν η διάγνωση είχε γίνει σε ηλικία 60 ετών και άνω [115].

ii. Γενετικοί παράγοντες

Μελέτες σε διδύμους έχουν δείξει πως η πλειοψηφία των περιστατικών οικογενούς καρκίνου του μαστού είναι συνέπεια κληρονομούμενης ευαισθησίας [110,116]. Ωστόσο, είναι, επίσης, γεγονός πως συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις που να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού είναι σπάνιες. Μόνο το 5-6% όλων των περιστατικών καρκίνου του μαστού μπορούν να θεωρηθούν απευθείας

συνέπεια κληρονόμησης μεταλλάξεων σε γονίδιο, που να σχετίζεται με ειδική ευαισθησία για εμφάνιση καρκίνου του μαστού, όπως είναι τα γονίδια BRCA1, BRCA2, p53, ATM, PTEN και STK11, τα οποία είναι υπεύθυνα και για την πρόκληση αντίστοιχων χαρακτηριστικών οικογενών συνδρόμων.

- Μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 είναι υπεύθυνες για το «σύνδρομο κληρονομούμενου καρκίνου μαστού-ωοθηκών». Το 80-90% των περιπτώσεων κληρονομικού οικογενούς καρκίνου μαστού και ωοθηκών οφείλεται σε μεταλλάξεις στα δύο αυτά γονίδια [117].
- Μια σπάνια αυτοσωμικά κληρονομούμενη μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 οδηγεί στο σπάνιο «σύνδρομο Li-Fraumeni» [118-120].
- Μεταλλάξεις του ATM γονιδίου οδηγούν στο αυτοσωμικά κληρονομούμενο «σύνδρομο Ataxia-Telangiectasia» [121].
- Οι μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN οδηγούν σε απώλεια της δράσης του και στο κληρονομούμενο «σύνδρομο Cowden», το οποίο ευθύνεται για λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων κληρονομικού καρκίνου του μαστού [122,123].
- Το «σύνδρομο Peutz-Jeghers» είναι ένα αυτοσωμικό επικρατές σύνδρομο, που οφείλεται σε μεταλλάξεις του STK11 γονιδίου [124,125].

Τα ανωτέρω σύνδρομα οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις υψηλής διεισδυτικότητας. Πρέπει να αναφερθεί, πάντως, πως υπάρχουν και άλλα πολυμορφικά συστήματα γονιδίων με χαμηλή διεισδυτικότητα, τα οποία εμπλέκονται επίσης στην αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Η περαιτέρω, όμως, ανάλυσή τους, όπως και των προαναφερθέντων συνδρόμων, ξεφεύγει από τους σκοπούς της παρούσας μελέτης.

V. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ (LIFESTYLE) ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

i. Κοινωνικοοικονομική κατάσταση (status)

Οι γυναίκες υψηλότερου κοινωνικοοικονομικού status εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ο σχετικός κίνδυνος των γυναικών της υψηλότερης βαθμίδος κοινωνικοοικονομικής κατάστασης είναι περίπου διπλάσιος σε σχέση με αυτές της χαμηλότερης. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει πως ο παράγοντας αυτός αποτελεί και ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου. Αντιθέτως, η επίδραση της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης (μορφωτικό, επαγγελματικό και οικονομικό επίπεδο) αφορά στα διαφορετικά αναπαραγωγικά πρότυπα, όπως η τεκνοποιία, η ηλικία 1^{ης} κύησης, η ηλικία εμμηναρχής και η συμμετοχή στο μαστογραφικό screening [126].

ii. Βάρος και Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)

Το βάρος και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (Body Mass Index – BMI) έχουν αντίθετες επιδράσεις στο μετεμμηνοπαυσιακό σε σχέση με τον προεμμηνοπαυσιακό καρκίνο του μαστού.

Μετεμμηνοπαυσιακός καρκίνος του μαστού

Το υψηλότερο σωματικό βάρος και το υψηλότερο BMI, καθώς και η μετεμμηνοπαυσιακή αύξηση του βάρους, έχουν σχετισθεί με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης μετεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού σε πολλές σχετικές μελέτες [127-132]. Η επίδραση του βάρους είναι ισχυρότερη στις γυναίκες, που δε λαμβάνουν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) [129]. Στη μελέτη «Nurses' Health Study», μεταξύ των γυναικών που δεν ελάμβαναν HRT, αυτές οι οποίες αύξησαν το σωματικό τους βάρος κατά 10 kg ή περισσότερο από τη στιγμή της εμμηνόπαυσης εμφάνιζαν 18% μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου του μαστού συγκρινόμενες με αυτές που είχαν διατηρήσει το βάρος τους σταθερό [129]. Αντιθέτως, οι γυναίκες που δεν ελάμβαναν HRT και είχαν χάσει 10 kg ή περισσότερα εμφάνιζαν μείωση του κινδύνου κατά 57%, συγκρινόμενες με αυτές που είχαν διατηρήσει το βάρος τους σταθερό.

Οι συσχετίσεις αυτές οφείλονται κυρίως στα υψηλότερα κυκλοφορούντα επίπεδα οιστρογόνων στις γυναίκες με αυξημένο λιπώδη ιστό, ο οποίος αυξάνει την περιφερική μετατροπή προδρόμων ουσιών των οιστρογόνων σε οιστρογόνα. Έτσι, στην προαναφερθείσα μελέτη, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στον ορό ήταν 4.7 pg/ml μεταξύ των γυναικών με BMI <21, ενώ ήταν 10.0 pg/ml σε

αυτές που είχαν BMI ≥ 29 kg/m² [133]. Επίσης, η παχυσαρκία σχετίζεται και με αυξημένη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού [134].

Προεμμηνοπαυσιακός καρκίνος του μαστού

Η πλειοψηφία των προοπτικών μελετών έχει δείξει πως υφίσταται αρνητική συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας και του προεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού. Σε μία μεγάλη pooled ανάλυση επτά προοπτικών μελετών καταδείχθηκε πως οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με BMI ≥ 31 kg/m² έχουν 46% μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του μαστού από γυναίκες με BMI < 21 kg/m² [127].

Οι βιολογικοί μηχανισμοί της συσχέτισης αυτής δεν είναι απολύτως ξεκάθαροι. Το υψηλό BMI συνδέεται ενδεχομένως με μη φυσιολογικούς ή μεγαλύτερης διάρκειας εμμηνορυσιακούς κύκλους ή με σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών και θεωρείται πως η έλλειψη ωοθυλακιωρρηξίας, η οποία σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά αυτά και με χαμηλότερα επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης, θα μπορούσε να ερμηνεύσει το χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [135]. Ωστόσο, όσον αφορά στους βιολογικούς μηχανισμούς, τα δεδομένα παρουσιάζουν αντιφάσεις [136-138]. Αν και η έλλειψη ωοθυλακιωρρηξίας σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, στη μελέτη «Nurses' Health Study», που αναφέρθηκε και προηγουμένως [138], η προσαρμογή (adjustment) για τα πρότυπα ωοθυλακιωρρηξίας στα στατιστικά μοντέλα δεν επέδρασε

ιδιαίτερα στην αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ προεμμηνοπαυσιακού BMI και καρκίνου του μαστού [136]. Έτσι, φαίνεται πως υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί εκτός της ωοθυλακιορρηξίας, που ερμηνεύουν τη συσχέτιση BMI/καρκίνου του μαστού στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

iii. Ύψος

Στην πλειοψηφία των σχετικών μελετών, το αυξημένο ύψος έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο τόσο για προεμμηνοπαυσιακό όσο και μετεμμηνοπαυσιακό καρκίνο του μαστού [127,128,139]. Στην προαναφερθείσα pooled ανάλυση των επτά προοπτικών μελετών βρέθηκε το εξής: οι γυναίκες με ύψος 175 cm και άνω εμφάνιζαν 20% μεγαλύτερο κίνδυνο συγκριτικά με τις γυναίκες με ύψος μικρότερο από 160 cm [127]. Ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανώς να περιλαμβάνει παράγοντες προγεννητικούς και της παιδικής ηλικίας, όπως το βάρος γέννησης και η ισορροπία βάρους/ενέργειας ή τα συστατικά του άξονα του Insulin-like growth factor (IGF).

iv. Φυσική άσκηση

Η μέτρια φυσική άσκηση φαίνεται να προσφέρει μέτρια προστασία έναντι του καρκίνου του μαστού [140-142], η σχέση όμως αυτή μοιάζει πολύπλοκη, ειδικά στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Κάποιες μελέτες δείχνουν μειωμένο κίνδυνο για προεμμηνοπαυσιακό καρκίνο του μαστού στις γυναίκες που ασκούνται περισσότερο, ειδικά κατά τη

διάρκεια της εφηβείας [140], άλλες όμως δεν έχουν εντοπίσει κάποια διαφορά [143,144]. Τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν πιθανώς εξισορροπιστικές επιδράσεις διαφορετικών παραγόντων κινδύνου. Στις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, ακόμη και η μέτρια άσκηση μπορεί να σχετίζεται με ανωθυλακιορρηκτικούς κύκλους, οι οποίοι με τη σειρά τους σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Από την άλλη, οι λεπτότερες γυναίκες, παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο για πρόκληση καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις βαρύτερες.

Στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, τα δεδομένα δείχνουν με μεγαλύτερη συνέπεια την προστατευτική δράση της έντονης σωματικής άσκησης απέναντι στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [141,145-147]. Για παράδειγμα, στην «Women's Health Initiative Observational» μελέτη, το όφελος από τη φυσική άσκηση ήταν εντονότερο στις γυναίκες που γυμνάζονταν έντονα στην ηλικία των 35 ετών, συγκριτικά με μικρότερη ηλικία (18 ετών) ή μεγαλύτερη (55 ετών), καθώς και στις γυναίκες οι οποίες προσφάτως ξεκίνησαν να γυμνάζονται με έντονο περπάτημα τουλάχιστον 10 ωρών ανά εβδομάδα και μάλιστα η προστασία ήταν εντονότερη για τις γυναίκες της χαμηλότερης βαθμίδος του BMI (RR=0.63 για το συνδυασμό των δύο παραγόντων) [145].

Η μείωση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού μέσω της σωματικής άσκησης μετριάζεται πιθανώς μέσω της μείωσης του σωματικού βάρους [102,140,148,149]. Ωστόσο, κάποιες μελέτες

απέτυχαν να αποδείξουν επίδραση του BMI στη σχέση μεταξύ σωματικής άσκησης και κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού [150,151]. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη πως η αυξημένη σωματική άσκηση μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού μέσω πιθανώς της μείωσης των οιστρογόνων στον ορό, τουλάχιστον στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [152,153].

v. Διαιτολογικοί παράγοντες

Με την εξαίρεση της λήψης αλκοόλ, η οποία μπορεί να μετρηθεί με αρκετή ακρίβεια μέσω ερωτηματολογίων, υπάρχουν σοβαρά μεθοδολογικά προβλήματα για τη μέτρηση της πρόσληψης των διαιτολογικών παραγόντων και έτσι της ανάλυσης της σχέσης τους με τον καρκίνο.

Αλκοόλ

Η μέτρια λήψη αλκοόλ σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και η επίδραση του αλκοόλ φαίνεται να είναι συνεργιστική με τη λήψη θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης (HRT).

Η πρόσφατη πρόσληψη αλκοόλ φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με τον κίνδυνο πρόκλησης μετεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού [154]. Ωστόσο, η συνολική χρονική διάρκεια πρόσληψης αλκοόλ δε φαίνεται να σχετίζεται με τον κίνδυνο. Όσον αφορά στην ποσότητα της πρόσληψης αλκοόλ, στην «American Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort» ο σχετικός κίνδυνος στις γυναίκες με τη μέγιστη

πρόσληψη αλκοόλ (15 gr/ημέρα ή περισσότερο) ήταν 1.26 σε σχέση με αυτές που δεν κατανάλωναν καθόλου [155].

Είναι εντυπωσιακό το γεγονός πως η πρόσληψη αλκοόλ φαίνεται να σχετίζεται πιο ισχυρά με τον κίνδυνο πρόκλησης λοβιακού καρκίνου του μαστού. Επίσης, το αλκοόλ αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης όγκων με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς αλλά όχι και αυτόν για όγκους με αρνητικούς υποδοχείς [156].

Αρκετοί παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την ερμηνεία της επίδρασης αυτής. Ο πλέον πιθανός μηχανισμός είναι μέσω της αύξησης της οιστρονής και της δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEAS) όπως, επίσης, και μέσω της δημιουργίας ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) [157,158].

Πρόσληψη λίπους

Τα δεδομένα από τα μελέτες που εξετάζουν την επίδραση της πρόσληψης λίπους στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού είναι εν πολλοίς αντικρουόμενα. Σε μία μεγάλη pooled ανάλυση με πάνω από 300.000 γυναίκες από προοπτικές μελέτες, δεν εντοπίστηκε η ύπαρξη οποιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ των ολικών, κορεσμένων, μονοακόρεστων ή πολυακόρεστων λιπών και του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού [159]. Στο διατροφολογικό σκέλος της μελέτης «Women's Health Initiative» με 48835 υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας μεταξύ 50 και 79 ετών, η μείωση της πρόσληψης

ολικού λίπους δεν είχε καμία επίδραση στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού (RR=0.91).

Αντίθετα με τα παραπάνω, μία τάση προς την κατεύθυνση της αύξησης του κινδύνου από μια πλούσια σε λίπος δίαιτα βρέθηκε από την προοπτική μελέτη «National Institutes of Health AARP Diet and Health» [160]. Οι γυναίκες με τη μέγιστη πρόσληψη λίπους (κατά μέσο όρο 90 gr/ημέρα, 40% των ολικών θερμίδων από λίπος) παρουσίαζαν υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού κατά 11-22%, σε σχέση με τις γυναίκες με την ελάχιστη πρόσληψη λίπους (24.2 gr/ημέρα, 20% των ολικών θερμίδων από λίπος). Συσχέτιση μεταξύ του διαιτητικού λίπους και του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού εντοπίστηκε και στη μελέτη «Nurses' Health Study II» με τη συμμετοχή 90655 γυναικών ηλικίας από 26 ως 46 ετών [161]. Σε follow-up διάρκειας 8 ετών, οι γυναίκες με τη μεγαλύτερη πρόσληψη ζωικού λίπους (αλλά όχι και φυτικού) παρουσίαζαν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο συγκριτικά με τις γυναίκες με την ελάχιστη πρόσληψη (RR=1.33).

Συμπερασματικά, παρά το ζωηρό ενδιαφέρον, που υφίσταται σχετικά με την επίδραση της πρόσληψης λίπους στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού, οι μελέτες είναι αντικρουόμενες και σε αυτές οι οποίες δείχνουν θετική συσχέτιση των δύο παραγόντων, φαίνεται πως η επίδραση της πρόσληψης λίπους είναι ήπια.

Ασβέστιο και βιταμίνη D

Στη μεγάλη προοπτική μελέτη «Nurses' Health Study» με 88.000 γυναίκες εντοπίστηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού και της πρόσληψης ασβεστίου (κυρίως διαιτητικής προέλευσης) και βιταμίνης D (κυρίως μη διαιτητικής προέλευσης) στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αλλά όχι στις μετεμμηνοπαυσιακές [162]. Η μελέτη «Women's Health Study» επιβεβαίωσε αυτά τα ευρήματα, δείχνοντας επίσης χαμηλότερο κίνδυνο πρόκλησης προεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού αλλά όχι και μετεμμηνοπαυσιακού με την υψηλή πρόσληψη ασβεστίου και βιταμίνης D [163].

Άλλα μικροσυστατικά

Δεν υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις πως υπάρχει κάποια επίδραση στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού από την πρόσληψη είτε της βιταμίνης E είτε της βιταμίνης C. Τα δεδομένα, που συνδέουν τη βιταμίνη A με τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, είναι αντιφατικά. Όσον αφορά στο σελήνιο, κάποιες μελέτες δείχνουν πως τα χαμηλά επίπεδα πιθανώς να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο, όμως, τα υψηλά επίπεδα δε βρέθηκε να ασκούν προστατευτική δράση [102,164].

Φυτοοιστρογόνα

Τα φυτοοιστρογόνα είναι φυσικά συστατικά των φυτών με χημική δομή παραπλήσια αυτής της 17-β οιστραδιόλης. Αποτελούνται κυρίως από τα isoflavones (που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στη σόγια και

στα όσπρια) και από τα lignans (που βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά).

Η υψηλή πρόσληψη σόγιας και η χαμηλή επίπτωση του καρκίνου του μαστού στους ασιατικούς πληθυσμούς οδήγησαν στην υπόθεση πως ίσως η πρόσληψη σόγιας να μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού μέσω απομάκρυνσης της οιστραδιόλης και δράσης αντίστοιχης με τα αντι-οιστρογόνα. Σε μία μεγάλη μετα-ανάλυση 18 μελετών, η υψηλή πρόσληψη σόγιας σχετίστηκε με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (RR=0.86) στις γυναίκες από δυτικές χώρες αλλά όχι και στις γυναίκες από χώρες από την Ασία [165]. Μία δεύτερη μετα-ανάλυση, η οποία εξέτασε ξεχωριστά τις μελέτες με προέλευση από την Ασία από αυτές με προέλευση από δυτικές χώρες, έδειξε πως η υψηλή κατανάλωση isoflavones (≥ 20 mg/ημέρα συγκριτικά με < 5 mg/ημέρα) μεταξύ των ασιατικών πληθυσμών σχετιζόταν με μείωση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού κατά 29%, με ιδιαίτερη έμφαση μάλιστα στη δόσο-εξαρτώμενη συσχέτιση [166]. Η προστατευτική αυτή δράση γινόταν ακόμη ισχυρότερη όταν η πρόσληψη της σόγιας αφορούσε στην περίοδο της εφηβείας. Αντιθέτως, μεταξύ των δυτικών πληθυσμών, δεν εντοπίστηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης σόγιας και κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Φαίνεται, επομένως, πως τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας επί του θέματος είναι μάλλον αντιφατικά.

Επιπλέον, *in vitro* και *in vivo* μελέτες δείχνουν πως τα φυτοοιστρογόνα εμφανίζουν ήπιες οιστρογονικές ιδιότητες σε περιβάλλον με χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων και αντι-οιστρογονικές ιδιότητες σε περιβάλλον με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων [167-169]. Εάν αυτό ισχύει, τότε η πρόσληψη των φυτοοιστρογόνων θα μπορούσε να αυξάνει αντί να μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα που συνδέουν τη διαιτητική πρόσληψη σόγιας με τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού είναι αντικρουόμενα και δεν υπάρχει καμία ισχυρή ένδειξη για την προώθηση διαιτητικών προτύπων με υψηλή περιεκτικότητα σε σόγια στις δυτικές χώρες με σκοπό την πρόληψη του καρκίνου του μαστού.

Καφεΐνη

Η καφεΐνη δε φαίνεται να σχετίζεται με τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού, όπως έχουν δείξει πολλές προοπτικές, αλλά και case-control μελέτες [102,170-172].

vi. Κάπνισμα

Η σχέση μεταξύ καπνίσματος και κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού είναι πολύπλοκη και επιπλέκεται έτι περαιτέρω λόγω της αλληλεπίδρασης του καπνίσματος με το αλκοόλ και τα ενδογενή οιστρογόνα, που αποτελούν επιβεβαιωμένους παράγοντες κινδύνου [173-176]. Οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με το ζήτημα έχουν δώσει αποτελέσματα με σημαντικές αποκλίσεις [166]. Άλλες δείχνουν μία

μέτρια αύξηση του κινδύνου από το κάπνισμα [176-179], άλλες μειωμένο κίνδυνο [173] και άλλες καμία επίδραση του καπνίσματος στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού [174].

VI. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΙ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις οιστρογόνων αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Η παραγωγή των υποτύπων των οιστρογόνων καθορίζεται από τη λειτουργία των ωοθηκών: εμμηναρχή, κύηση και εμμηνόπαυση. Μετά την εμμηνόπαυση, η βασική πηγή οιστρογόνων είναι η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), η οποία παράγεται στα επινεφρίδια και μεταβολίζεται στον περιφερικό λιπώδη ιστό σε οιστραδιόλη και οιστρόνη [180]. Οι ρόλοι των προγεστινών, της προλακτίνης και του insulin-like growth factor είναι λιγότερο ξεκάθαροι. Οι κύριοι αναπαραγωγικοί παράγοντες που επιδρούν στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού είναι η ηλικία εμμηναρχής, η ηλικία εμμηνόπαυσης, η ηλικία 1^{ης} τελειόμηνης κύησης και πιθανώς η τεκνοποιία και ο θηλασμός [98,181,182].

i. Ηλικία εμμηναρχής

Η νεότερη ηλικία εμμηναρχής σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού [183,184]. Σε μία σχετική μελέτη [183], βρέθηκε πως για κάθε αύξηση κατά δύο χρόνια της εμμηναρχής, υπήρχε μείωση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού κατά 10%. Η

ηλικία εμμηναρχής φαίνεται πως επιδρά στη βιολογία του καρκίνου του μαστού. Σε μία case-control μελέτη με μονοζυγωτικές διδύμους βρέθηκε πως η δίδυμη με νωρίτερη εμμηναρχή παρουσιάζει αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσει καρκίνο του μαστού πριν από τη μονοζυγωτική αδελφή της κατά 5 φορές [185].

Η ερμηνεία της προστασίας που παρέχει η καθυστέρηση της εμμηναρχής αφορά στο γεγονός πως η καθυστέρηση της έναρξης των φυσιολογικών εμμηνορυσιακών κύκλων σχετίζεται με καθυστερημένη και έτσι μικρότερης συνολικής χρονικής διάρκειας έκθεση των μαστών στα οιστρογόνα.

Αξίζει να σημειωθεί πως, αν και το μέγεθος του κινδύνου από την πρόωρη εμμηναρχή δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο, η σημαντική διακρατική διακύμανση της ηλικίας εμμηναρχής (μέση ηλικία 17 έτη στην αγροτική Κίνα και 12.5 έτη στις ΗΠΑ) μπορεί να ερμηνεύσει ένα σημαντικό ποσοστό της διεθνούς μεταβλητότητας της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού [2].

ii. Ηλικία εμμηνόπαυσης

Σχετική με τη σημασία της συνολικής διάρκειας έκθεσης των μαστών στις γεννητικές ορμόνες στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού είναι και η επιβεβαιωμένη αύξηση του κινδύνου από την καθυστερημένη εμμηνόπαυση [181,184,186]. Ο σχετικός κίνδυνος αυξάνεται κατά 1.03% για κάθε έτος καθυστέρησης της εμμηνόπαυσης,

το οποίο ως μέγεθος, είναι συγκρίσιμο με την αύξηση του κινδύνου από τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) [186].

Η αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή πριν την ηλικία των 40 ετών μειώνει τον εφ' όρου ζωής κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού κατά 50% [187]. Ωστόσο, είναι προφανές, πως η μείωση του κινδύνου μειώνεται ή και εξαλείφεται στην περίπτωση της λήψης HRT. Να σημειωθεί, εδώ, πως για δεδομένη ηλικία, η τεχνητή εμμηνόπαυση (αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή) προστατεύει περισσότερο από ό,τι η φυσική εμμηνόπαυση [2].

iii. Τεκνοποιία – ατεκνία

Οι άτεκνες γυναίκες εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις γυναίκες που έχουν τεκνοποιήσει. Ο σχετικός κίνδυνος κυμαίνεται μεταξύ 1.2 και 1.7 [181,184,188]. Η προστατευτική επίδραση της κύησης εμφανίζεται τουλάχιστον 10 χρόνια μετά τον τοκετό [189]. Ταυτόχρονα, φαίνεται πως υφίσταται μία προσωρινή αύξηση του κινδύνου αμέσως μετά από μία τελειόμηνη κύηση. Το ερώτημα, αν η πολυτοκία προσφέρει περαιτέρω προστασία έναντι του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού, αποτελεί αντικείμενο διαφωνιών. Η πλειοψηφία των μελετών φαίνεται να συντείνει στο συμπέρασμα πως ο κίνδυνος μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των κυήσεων [190].

Η προστασία αυτή από την τεκνοποιία είναι πιθανό να οφείλεται σε βιολογικούς μηχανισμούς, που σχετίζονται με την τελική

διαφοροποίηση των κυττάρων του αδενικού επιθηλίου του μαστού μετά την πρώτη, και σε λιγότερο βαθμό, μετά τις επόμενες τελειόμηνες κύσεις [2].

iv. Ηλικία 1^{ης} τελειόμηνης κύησης

Αποτελεί ξεκάθαρο παράγοντα που επιδρά στον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Έτσι, όσο νεότερη είναι η γυναίκα κατά την 1^η της τελειόμηνη κύηση, τόσο χαμηλότερος είναι ο κίνδυνος [181,184,188,190]. Σε μία σχετική μελέτη, οι γυναίκες με ηλικία 1^{ης} τελειόμηνης κύησης τα 35 έτη παρουσίαζαν 1.6 φορές υψηλότερο κίνδυνο συγκριτικά με τις γυναίκες με αντίστοιχη ηλικία 26 ή 27 ετών [190]. Από τα δεδομένα της «Nurses' Health Study», φαίνεται πως η συνολική επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες ηλικίας 70 ετών και άνω που είχαν τεκνοποιήσει, συγκριτικά με τις άτεκνες, ήταν 20% χαμηλότερη αν η 1^η κύηση ήταν σε ηλικία 20 ετών, 10% χαμηλότερη αν ήταν σε ηλικία 25 ετών και 5% υψηλότερη, στις περιπτώσεις που η 1^η κύηση ήταν στην ηλικία των 35 ετών [188]. Η εξήγηση της επίδρασης της μικρής ηλικίας κατά την 1^η κύηση είναι πως η πλήρης κυτταρική διαφοροποίηση, η οποία λαμβάνει χώρα στο μαζικό αδένια κατά τη διάρκεια της κύησης και μετά από αυτήν, προσφέρει προστασία στο μαστό από την ανάπτυξη καρκίνου [191]. Η μεγαλύτερη ηλικία της 1^{ης} κύησης αυξάνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού ακόμη και σε σχέση με τις άτεκνες γυναίκες, λόγω της επιπρόσθετης υπερπλαστικής διέγερσης των κυττάρων του μαζικού

αδένα, τα οποία έχουν ήδη ξεκινήσει μια πορεία αλλοίωσης και είναι πιο ευαίσθητα σε κυτταρικές βλάβες.

v. Εκτρώσεις – αποβολές

Καθώς η έκτρωση ή η αποβολή διακόπτουν τη διαδικασία ωρίμανσης του μαζικού αδένα, είχε από παλιά υποτεθεί πως μπορεί να αυξάνουν τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, οι σχετικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί όπως μια μεγάλη pooled ανάλυση [192] αλλά και πολλές προοπτικές population-based μελέτες [193-197] δεν ανέδειξαν να υφίσταται συσχέτιση μεταξύ της έκτρωσης ή της αποβολής με τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Το Μάρτιο του 2003, το «National Cancer Institute» των ΗΠΑ κατέστησε σαφές πως δεν υφίσταται αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού από την έκτρωση.

vi. Θηλασμός

Η προστατευτική επίδραση του θηλασμού έναντι του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού έχει αποδειχθεί με πολλές μελέτες τόσο ασθενών-μαρτύρων όσο και προοπτικές. Η προστατευτική επίδραση εξαρτάται από τη συνολική διάρκεια του θηλασμού και από το συγχυτικό παράγοντα της τεκνοποιίας [190,198-201]. Η μεγαλύτερη σχετική pooled ανάλυση, η οποία συμπεριέλαβε τα αποτελέσματα 47 επιδημιολογικών μελετών με συμμετοχή 50.302 γυναικών με διηθητικό καρκίνο του μαστού και 96.973 υγιών μαρτύρων [200], έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα: Ο σχετικός κίνδυνος πρόκλησης καρκίνου

του μαστού μειώνεται κατά 4.3% για κάθε 12 μήνες θηλασμού, επιπρόσθετα της μείωσης κατά 7% για κάθε κύηση. Υπολογίστηκε, ακόμη, πως η συνολική επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις ανεπτυγμένες χώρες θα μπορούσε να μειωθεί πάνω από το μισό (!) (από 6.3 σε 2.7 περιπτώσεις ανά 100 γυναίκες μέχρι την ηλικία των 70 ετών) εάν οι γυναίκες είχαν το μέσο αριθμό παιδιών (6.6 αντί για 2.5) και τη συνολική χρονική διάρκεια θηλασμού (24 μήνες ανά παιδί αντί για 3), που είχαν οι γυναίκες κατά τους παρελθόντες αιώνες. Τα δύο τρίτα της εκτιμώμενης αυτής μείωσης θα οφείλονταν στη μεγαλύτερη διάρκεια θηλασμού.

Η προστατευτική δράση του θηλασμού αφορά πιο έντονα τον κίνδυνο πρόκλησης προεμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού [202].

Ένας πιθανός μηχανισμός της προστατευτικής δράσης του θηλασμού είναι το γεγονός της καθυστέρησης της επανέναρξης των φυσιολογικών ωοθυλακορρηκτικών κύκλων. Άλλοι μηχανισμοί μπορεί να είναι η αύξηση της έκκρισης της προλακτίνης και η συνοδός μείωση της παραγωγής οιστρογόνων.

vii. Ενδογενή επίπεδα ορμονών

Επίπεδα οιστρογόνων

Οι παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα οιστρογόνων, λόγω της μετατροπής των ανδρογόνων που παράγονται από τα επινεφρίδια σε οιστρογόνα στο λιπώδη ιστό. Έτσι, εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού από

τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες φυσιολογικού βάρους [127,128,203]. Επιπλέον, η μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων (με την καταστολή της ωοθηκικής λειτουργίας στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή η χρήση φαρμάκων όπως οι αναστολείς της αρωματάσης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες) μειώνει τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού.

Οι παρατηρήσεις που υπάρχουν δείχνουν με σαφήνεια πως τα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στον ορό είναι στενά συνδεδεμένα με τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, τα επιδημιολογικά δεδομένα είναι πλέον πειστικά προς αυτήν την κατεύθυνση για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σχέση με τις προεμμηνοπαυσιακές. Για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η συσχέτιση κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού και οιστρογονικών επιπέδων είναι ξεκάθαρη και πολύ καλά τεκμηριωμένη [204-209]. Αντιθέτως, για τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα δεδομένα δεν είναι εξίσου ξεκάθαρα, εν μέρει, ίσως, λόγω της διακύμανσης των συγκεντρώσεων των οιστρογόνων κατά τη διάρκεια του κύκλου και της κύησης και έτσι οι μετρήσεις στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν είναι εύκολα αναπαραγώγιμες.

Οστική πυκνότητα

Καθώς τα οστά περιέχουν οιστρογονικούς υποδοχείς και είναι ευαίσθητα στα κυκλοφορούντα επίπεδα οιστρογόνων, η οστική πυκνότητα (Bone Mineral Density – BMD) μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστο δείκτη της μακράς (long-term) έκθεσης στα ενδογενή

οιστρογόνα. Σε πολλές μελέτες, οι γυναίκες με την υψηλότερη οστική πυκνότητα εμφάνιζαν και τον υψηλότερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού [210-212].

Επίπεδα άλλων ορμονών

Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υψηλότερα επίπεδα τεστοστερόνης έχουν πιθανώς και μεγαλύτερο κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού, όπως δείχνουν οι περισσότερες σχετικές μελέτες [205,207,208,213-215], αλλά όχι όλες [216]. Στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα υπάρχοντα δεδομένα είναι πιο περιορισμένα. Σε μία σχετική μελέτη [213], οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το υψηλότερο επίπεδο τεστοστερόνης, ανδροστενδιόνης και δεϋδροεπιανδροστερόνης παρουσίαζαν 1.5 φορά μεγαλύτερο κίνδυνο από τις γυναίκες, που είχαν το χαμηλότερο επίπεδο στον ορό των παραπάνω ορμονών. Στη μελέτη «Nurses' Health Study», αναδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ των υψηλών επιπέδων των ανδρογόνων και του υψηλού κινδύνου πρόκλησης μόνο του καρκίνου του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς [217].

Οι διαθέσιμες μελέτες που μελετούν την επίδραση άλλων ορμονών (προγεστερόνης, προλακτίνης, ινσουλίνης και του insulin-like growth factor) είναι ελάχιστες. Τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν μια πιθανή αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού σε υψηλά επίπεδα προλακτίνης [218] και σε υψηλά επίπεδα του insulin-like growth factor I (IGF-I), όπως και σε υψηλά επίπεδα του υποδοχέα του

IGF-I, του IGFBP-3, στις προεμμηνοπαυσιακές, αλλά όχι και στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [219,220].

Τέλος, αν και κάποιες μελέτες δείχνουν μια ελαφρά αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με διαβήτη τύπου II [221-225], άλλες μελέτες δεν αναδεικνύουν τη συσχέτιση αυτή [226-229]. Ο σακχαρώδης διαβήτης δε θεωρείται γενικά πως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού [230].

Μαστογραφική πυκνότητα

Η πυκνότητα του μαζικού αδένου αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα αύξησης του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Σε πολλές επιδημιολογικές μελέτες, ο κίνδυνος υπολογίζεται σε 4 ως 5 φορές μεγαλύτερος για τις γυναίκες με μαστογραφικά πυκνούς μαστούς (συνήθως περιγραφόμενοι ως μαστοί με πυκνότητα $\geq 75\%$), συγκρινόμενες με τις γυναίκες με λιγότερο ή καθόλου πυκνό μαστό [231-233]. Άλλες μελέτες ανέδειξαν την ύπαρξη ισχυρής γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της αυξημένης ή μειωμένης μαστογραφικής πυκνότητας και του αυξημένου ή μειωμένου κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού, αντίστοιχα [234].

Όσον αφορά στο μηχανισμό, που ερμηνεύει την επίδραση της μαστογραφικής πυκνότητας στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, αυτός φαίνεται να είναι ανεξάρτητος των δράσεων των οιστρογόνων. Έτσι, οι καρκίνοι του μαστού που σχετίζονται με

αυξημένη μαστογραφική πυκνότητα εμφανίζουν εξίσου θετικότητα ή όχι στους οιστρογονικούς υποδοχείς [235]. Επιπλέον, η πυκνότητα του μαζικού αδένου δε φαίνεται να σχετίζεται με τα κυκλοφορούντα επίπεδα των φυλετικών ορμονών [236]. Ο μηχανισμός ερμηνείας, λοιπόν, αφορά μάλλον σε αυξητικούς παράγοντες άλλους, πλην των οιστρογόνων, όπως είναι ο insulin-like growth factor-1.

viii. Εξωγενής λήψη οιστρογόνων

Αντισυλληπτικά

Η παρατεταμένη χρήση αντισυλληπτικών έχει συσχετισθεί ασθενώς με τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού και υψηλότερος κίνδυνος αναφέρεται μόνο για κάποιες υποομάδες των χρηστών. Η επίδραση των αντισυλληπτικών εξαρτάται από τη διάρκεια λήψης τους και από την ηλικία της γυναίκας [237-240]. Ο σχετικός κίνδυνος για λήψη 1 έτους ή περισσότερο, σε σχέση με τη λήψη για χρονική περίοδο μικρότερη του έτους έχει εκτιμηθεί στο 1.7 για τις γυναίκες ηλικίας 25-34 ετών, στο 0.9 για τις γυναίκες ηλικίας 35-44 ετών και στο 1.2 για την ηλικιακή ομάδα 45-49 [240]. Η λήψη των αντισυλληπτικών για χρονικό διάστημα 4 ετών πριν την 1^η τελειόμηνη κύηση οδηγεί σε μικρή αύξηση του κινδύνου [237].

Κορυφαίο ρόλο όμως διαδραματίζει και ο χρόνος που έχει παρέλθει από την τελευταία λήψη. Έτσι, σε μία μεγάλη μετα-ανάλυση με περισσότερες από 150.000 γυναίκες από 54 επιδημιολογικές μελέτες, 1-4 χρόνια μετά τη διακοπή της λήψης, ο RR υπολογίστηκε στο 1.6, 5-9

χρόνια μετά τη διακοπή στο 1.07 και για 10 έτη ή περισσότερα από τη στιγμή της διακοπής της λήψης φαίνεται πως ο RR εξισώνεται με το RR των γυναικών, που δεν έλαβαν ποτέ αντισυλληπτικά [241].

Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις πως η όποια προσωρινή αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού αφορά ειδικά στο λοβιακό καρκίνο του μαστού, ενώ η συσχέτιση με τον κίνδυνο πρόκλησης πορογενούς καρκίνου του μαστού παραμένει ασαφής [242].

Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Hormone Replacement Therapy – HRT)

Η Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Hormone Replacement Therapy – HRT) θεωρείται πως ενέχει αιτιολογικό ρόλο στην πρόκληση καρκίνου του μαστού, κυρίως μάλιστα με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς [91]. Ο σχετικός κίνδυνος είναι μέτριος, αλλά επαρκώς επιβεβαιωμένος. Στη μελέτη «Women’s Health Initiative Trial», ο σχετικός κίνδυνος υπολογίστηκε στο 1.24 για χρονική περίοδο λήψης HRT θεραπείας με οιστρογόνο και προγεστερόνη 5.2 ετών, συγκριτικά με τη λήψη placebo [243]. Η αύξηση αυτή του σχετικού κινδύνου θεωρείται απολύτως συμβατή με την αναμενόμενη αύξηση από αντίστοιχης χρονικής διάρκειας καθυστέρηση της εμμηνόπαυσης. Ο αυξημένος κίνδυνος ελαττώνεται σταδιακά μετά τη διακοπή της θεραπείας και φαίνεται να παύει να υπάρχει μετά από πέντε περίπου χρόνια [2].

Ο μεγαλύτερος κίνδυνος φαίνεται πως σχετίζεται με τη μεγαλύτερη διάρκεια λήψης. Αντίθετα, η μικρής διάρκειας λήψη δε φαίνεται να αυξάνει το σχετικό κίνδυνο ιδιαίτερα, αν και μπορεί να προξενήσει δυσκολίες στην εκτίμηση της μαστογραφίας. Η συνδυασμένη λήψη προγεστίνης μαζί με το οιστρογόνο φαίνεται πως αυξάνει το σχετικό κίνδυνο περισσότερο, σε σχέση με τη λήψη μόνο οιστρογόνου [244].

VII. ΜΑΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

i. Ιονίζουσα ακτινοβολία

Η έκθεση του θώρακα σε ιονίζουσα ακτινοβολία σε νέα ηλικία, όπως σε θεραπεία για λέμφωμα Hodgkin, σε επιβιώσαντες της ατομικής βόμβας ή σε πυρηνικά ατυχήματα, αποδείχθηκε πως σχετίζεται θετικά με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [245-247]. Η πιο ευπρόσβλητη ηλικία φαίνεται να είναι μεταξύ 10 και 14 ετών (προεφηβεία), όμως, εξεσημασμένος κίνδυνος υπάρχει και στις γυναίκες που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία σε ηλικία 45 ετών [248]. Μετά την ηλικία των 45, δε φαίνεται να υφίσταται κάποια συσχέτιση με τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού.

Όσον αφορά στη συσχέτιση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού με την έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία χαμηλών επιπέδων, όπως είναι η ακτινοβολία των διαγνωστικών απεικονιστικών εξετάσεων (μαστογραφίας, ακτινογραφίας θώρακος, αξονικής τομογραφίας) τα δεδομένα που υπάρχουν είναι αντικρουόμενα. Για τις γυναίκες,

τουλάχιστον, οι οποίες δεν έχουν γενετική προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, η επίδραση της ακτινοβολίας από τις απεικονιστικές εξετάσεις ρουτίνας θεωρείται ελάχιστη ως ανύπαρκτη [249-250].

ii. Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Τα ευρήματα των μελετών που εξετάζουν τη συσχέτιση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (από ηλεκτρικές καλωδιώσεις, ηλεκτρικές συσκευές οικιακής χρήσης ή από επαγγελματική έκθεση) είναι ασαφή και αντικρουόμενα. Ακόμη, όμως, και να υφίσταται κάποια συσχέτιση, το μέγεθος του κινδύνου πρέπει να είναι εξαιρετικά χαμηλό [2].

iii. Άλλες περιβαλλοντικές εκθέσεις

Οι οργανοχλωριούχες ενώσεις περιλαμβάνουν: τα polychlorinated biphenyls (PCB's), τις διοξίνες και τα οργανοχλωριούχα εντομοκτόνα, όπως το DDT. Τα συστατικά αυτά είναι ήπια οιστρογόνα, ισχυρά λιπόφιλα και ικανά, επομένως, να παραμένουν στους ιστούς του οργανισμού για πολλά χρόνια. Όμως, όλες οι μεγάλες μελέτες, που διερεύνησαν τη συσχέτιση της έκθεσης στις ουσίες αυτές με τον κίνδυνο πρόκλησης καρκίνου του μαστού, έδειξαν πως μια τέτοια σχέση είναι μάλλον ανύπαρκτη [251]. Τα κοσμητικά επιθέματα μαστού και οι βαφές των μαλλιών, επίσης, δε βρέθηκαν να αυξάνουν το σχετικό κίνδυνο [252].

VIII. ΑΛΛΟΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

i. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (ΜΣΑΦ)

Η ασπιρίνη και άλλα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) έχει βρεθεί πως μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη τόσο των καλοήθων όσο και των κακοήθων όγκων του παχέος εντέρου. Ωστόσο, τα δεδομένα που αφορούν στην αντίστοιχη πιθανή προστατευτική επίδραση της λήψης ΜΣΑΦ για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού είναι αντιφατικά. Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες (περιλαμβανομένης της μελέτης «Women’s Health Initiative Observational Study») έδειξαν ένα μικρό όφελος (κατά μέσο όρο μείωση του σχετικού κινδύνου κατά 15-20%) από τη μακράς διάρκειας λήψη ΜΣΑΦ [253-257]. Ωστόσο, άλλες μελέτες (περιλαμβανομένων των: «Nurses’ Health Study», «California Teachers Study», «Women’s Health Study» και «American Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort») απέτυχαν να αναδείξουν κάποια σημαντική προστατευτική επίδραση της μακράς διάρκειας χρήσης των ΜΣΑΦ ή της ασπιρίνης έναντι του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού [258-261]. Συμπερασματικά, η ύπαρξη ή μη τέτοιας συσχέτισης παραμένει ασαφής.

ii. Αντιβιοτικά

Η συσχέτιση μεταξύ αντιβιοτικών και καρκίνου του μαστού προτάθηκε για πρώτη φορά από μία μελέτη ασθενών-μαρτύρων, στην οποία έγινε σύγκριση μεταξύ 2266 γυναικών με διηθητικό καρκίνο του μαστού και 7953 μαρτύρων [262]. Από τη σύγκριση αυτή, φάνηκε πως η αύξηση των ημερών λήψης αντιβιοτικών για οποιαδήποτε αιτία σχετιζόταν με

σημαντική αύξηση του κινδύνου πρόκλησης καρκίνου του μαστού. Ο σχετικός κίνδυνος αυξανόταν αναλόγως της διάρκειας λήψης των αντιβιοτικών και αφορούσε όλες τις κατηγορίες τους.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η έρευνα αυτή οδήγησε στη διενέργεια πολλών άλλων σχετικών ερευνών [π.χ. 263-265], καμία εκ των οποίων, όμως, δεν επιβεβαίωσε τα ευρήματα της πρώτης. Το συμπέρασμα είναι πως μάλλον τέτοια συσχέτιση μεταξύ αντιβιοτικών και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού δεν υφίσταται.

ΙΧ. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΑΝΔΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Οι άνδρες έχουν περισσότερες από 100 φορές μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού. Οι παράγοντες κινδύνου που αφορούν στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού στους άνδρες είναι το σύνδρομο Klinefelter, οι παθολογικές καταστάσεις των όρχεων και του ήπατος, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού και οι μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου BRCA2.

Χ. ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

i. Αλλαγές στον τρόπο ζωής (lifestyle)

Παρόλο που ο ρόλος ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων θεωρείται τεκμηριωμένος, αυτή η γνώση, δυστυχώς, δε μεταφράζεται άμεσα στη δυνατότητα λήψης αποτελεσματικών μέτρων για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Έτσι, ορισμένοι από τους καλά τεκμηριωμένους αναπαραγωγικούς παράγοντες κινδύνου, όπως είναι η ηλικία εμμηναρχής και η ηλικία εμμηνόπαυσης (κυρίως η πρώτη από τις δύο) δεν είναι τροποποιήσιμοι και δεν προσφέρονται για παρεμβάσεις σε επίπεδο δημόσιας υγείας [1]. Υπάρχει, όμως, και ένας αριθμός παραγόντων, οι οποίοι επιδέχονται μεταβολών και μπορούν, έτσι, να οδηγήσουν σε μείωση του σχετικού κινδύνου:

- Η μείωση της λήψης μετεμμηνοπαυσιακών οιστρογόνων (θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης). Αντ' αυτών, υπάρχουν σήμερα μη-οιστρογονικές εναλλακτικές λύσεις για την οστεοπόρωση (π.χ. τα διφωσφονικά).
- Η απόκτηση του πρώτου τέκνου σε όσο το δυνατόν νεότερη ηλικία.
- Ο μεγαλύτερος αριθμός τέκνων.
- Η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη διάρκεια θηλασμού ανά τέκνο.
- Η αποφυγή της αύξησης του σωματικού βάρους μετά την εμμηνόπαυση.
- Ο περιορισμός της λήψης αλκοόλ. Για τις γυναίκες που πίνουν, η λήψη φυλλικού οξέος μπορεί να περιορίσει την αύξηση του σχετικού κινδύνου που προκαλεί το αλκοόλ [266].

- Η όσο το δυνατόν περισσότερη σε ένταση, διάρκεια και συχνότητα σωματική άσκηση.

ii. Φαρμακευτικοί παράγοντες

Για τις γυναίκες, οι οποίες έχουν ήδη αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με το μέσον όρο, ο κίνδυνος αυτός μπορεί να μειωθεί τουλάχιστον στο μισό με τη λήψη ταμοξιφαίνης ή ραλοξιφαίνης για 5 χρόνια. Η ταμοξιφαίνη ήταν το πρώτο φάρμακο που έλαβε έγκριση από τον FDA για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού.

iii. Έγκαιρη διάγνωση

Για τις γυναίκες, οι οποίες βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, ακόμη και αν ο κίνδυνος αυτός δεν υπάρχει τρόπος να μειωθεί ουσιαστικά, ο κίνδυνος θανάτου από καρκίνο του μαστού μπορεί και πρέπει να μειωθεί και αυτό εξαρτάται από την έγκαιρη διάγνωση μέσω πρωτίστως του μαστογραφικού screening.

II-3.3 Ιστολογική ταξινόμηση

II-3.3.1 Ιστολογικοί τύποι

Τα καρκινώματα του μαστού ταξινομούνται ιστολογικά βάσει του τύπου των κυττάρων, που τα αποτελούν και του τρόπου ανάπτυξής τους.

Οι δύο κύριοι ιστολογικοί τύποι είναι:

- i. το πορογενές, το οποίο αναπτύσσεται στους πόρους και
- ii. το λοβιακό, το οποίο αναπτύσσεται στα λόβια.

Και οι δύο αυτοί ιστολογικοί τύποι διακρίνονται ακόμη σε:

- i. διηθητικό καρκίνωμα, το οποίο έχει διασπάσει τη βασική μεμβράνη και επεκτείνεται στο περιβάλλον στρώμα και
- ii. μη διηθητικό καρκίνωμα (in situ), το οποίο δεν έχει διασπάσει τη βασική μεμβράνη, που περιβάλλει το λόβιο ή τον πόρο, και κατά συνέπεια στερείται διηθητικής ανάπτυξης.

Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα εμφανίζεται συχνότερα σε νέες γυναίκες και είναι συχνά πολυεστιακό. Αποτελεί τη συχνότερη μορφή κακοήθειας στο μαστό, σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ 60% και 75%.

Το μη διηθητικό (in situ) πορογενές καρκίνωμα (ή ενδοπορικό ή DCIS – ductal carcinoma in situ) αποτελεί μία κακοήθη βλάβη, η οποία συνήθως εξελίσσεται σε διηθητικό καρκίνο.

Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα του μαστού αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα κακοήθη νόσο του μαστού, σε ποσοστό που κυμαίνεται από 5% - 20%. Συχνότερα προσβάλλει μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στο 60% των περιπτώσεων συνυπάρχει με μη διηθητικό (in situ) λοβιακό καρκίνωμα. Είναι συχνά πολυεστιακό, αμφοτερόπλευρο και θετικό στους ορμονικούς υποδοχείς.

Το μη διηθητικό (in situ) λοβιακό καρκίνωμα (ή LCIS – lobular carcinoma in situ) δεν αποτελεί καρκίνο, με την ακριβή έννοια του όρου, αλλά πρόκειται μάλλον για προκαρκινική κατάσταση, η οποία αποτελεί ένδειξη ιδιαίτερα αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου.

Άλλοι, πιο σπάνιοι, ιστολογικοί τύποι καρκίνου του μαστού είναι το μυελοειδές καρκίνωμα, το βλεννώδες, το σωληνώδες, το αποκρινές και το μεταπλαστικό και το φαγεσωρικό (comedo).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως μία αρκετά σπάνια ιστολογική μορφή καρκινώματος του μαστού είναι ο καρκίνος της θηλής ή νόσος του Paget, ο οποίος μπορεί να συνυπάρχει με ενδοπορικό ή διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού [267].

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι κυριότεροι ιστολογικοί τύποι διηθητικού καρκίνου του μαστού, με τη συχνότητά τους και την 5ετή τους επιβίωση (στοιχεία του 2000).

<u>Ιστολογικός τύπος</u>	<u>Συχνότητα (%)</u>	<u>5ετής επιβίωση (%)</u>
Πορογενής διηθητικός	63.6	79
Λοβιακός διηθητικός	5.9	84

Μικτός διηθητικός	1.6	85
Μυελοειδής	2.8	82
Βλεννώδης	2.1	95
Σωληνώδης	1.4	87
Αποκρινής	0.5	80
Μεταπλαστικός	0.3	60

Πίνακας 2: Οι κυριότεροι ιστολογικοί τύποι διηθητικού καρκίνου του μαστού, συχνότητα και 5ετής επιβίωση. Από: [268]

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι κυριότεροι ιστολογικοί τύποι μη διηθητικού (in situ) καρκίνου του μαστού, με τη συχνότητά τους και την 5ετή τους επιβίωση.

<u>Ιστολογικός τύπος</u>	<u>Συχνότητα (%)</u>	<u>5ετής επιβίωση (%)</u>
Ενδοπορικός	3.6	> 99
Θηλώδης	0.4	> 99
Φαγεσωρικός (comedo)	0.3	> 99

Clinging	0.1	> 99
Λοβιακό in situ	1.6	> 99
Ενδοπορικό και λοβιακό in situ	0.2	> 99

Πίνακας 3: Οι κυριότεροι ιστολογικοί τύποι μη διηθητικού (*in situ*) καρκίνου του μαστού, συχνότητα και 5ετής επιβίωση. Από: [268]

II-3.3.2 Προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας (Grading)

Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας (Grading) ενός καρκίνου στο μαστό βασίζεται στη μικροσκοπική ομοιότητα των καρκινικών κυττάρων με τα φυσιολογικά κύτταρα του μαζικού αδένου και κατηγοριοποιεί τον καρκίνο σε καλής διαφοροποίησης (low grade), μέσης διαφοροποίησης (intermediate grade) και πτωχής διαφοροποίησης (high grade). Όσο εγγύτερα βρίσκεται η μορφολογία του καρκινικού κυττάρου σε αυτήν του φυσιολογικού, τόσο χαμηλότερο είναι το grade, πιο αργή η αύξηση του όγκου και καλύτερη η πρόγνωση.

Το πλέον χρησιμοποιούμενο σύστημα Grading σήμερα είναι το σύστημα Scarff-Bloom-Richardson [269,270], με την κατά Nottingham τροποποίηση (η οποία αλλιώς αναφέρεται και ως τροποποίηση Elston-Ellis) [271]. Το σύστημα αυτό προσδιορίζει το βαθμό κακοήθειας προσθέτοντας τα score των: σωληνωδών σχηματισμών, του πυρηνικού

πλειομορφισμού και του αριθμού των μιτώσεων, καθένα από τα οποία βαθμολογείται από το 1 ως το 3. Όταν τα score προστεθούν, προκύπτει το τελικό score και εξ' αυτού το grade του καρκίνου.

Σωληνώδεις σχηματισμοί: Η παράμετρος αυτή εκτιμά το ποσοστό των φυσιολογικών πορογενών σχηματισμών εντός του όγκου. Έτσι:

- 1 πόντος: σωληνώδεις φυσιολογικοί σχηματισμοί σε ποσοστό > 75% του όγκου
- 2 πόντοι: σωληνώδεις φυσιολογικοί σχηματισμοί σε ποσοστό 10% - 75% του όγκου
- 3 πόντοι: σωληνώδεις φυσιολογικοί σχηματισμοί σε ποσοστό < 10% του όγκου

Πυρηνικός πλειομορφισμός: Η παράμετρος αυτή εκτιμά το βαθμό ομοιότητας του πυρήνα του καρκινικού κυττάρου με του φυσιολογικού. Έτσι:

- 1 πόντος: πυρήνας με ελάχιστη ποικιλομορφία στο μέγεθος και το σχήμα
- 2 πόντοι: πυρήνας με μέτρια ποικιλομορφία στο μέγεθος και το σχήμα
- 3 πόντοι: πυρήνας με εξεσημασμένη ποικιλομορφία στο μέγεθος και το σχήμα

Αριθμός μιτώσεων: Η παράμετρος αυτή εκτιμά τον αριθμό των μιτώσεων που ο παθολογοανατόμος βλέπει σε 10 οπτικά πεδία. Έτσι:

- 1 πόντος: 0-9 μιτώσεις / ανά 10 οπτικά πεδία
- 2 πόντοι: 10-19 μιτώσεις / ανά 10 οπτικά πεδία
- 3 πόντοι: > 19 μιτώσεις / ανά 10 οπτικά πεδία

Ολικό grade: Τα τρία ανωτέρω score προστίθενται και δίνουν τα εξής:

- 3-5: **Grade 1** όγκος (καλής διαφοροποίησης). Με την καλύτερη πρόγνωση.
- 6-7: **Grade 2** όγκος (μέσης διαφοροποίησης). Με μέτρια πρόγνωση.
- 8-9: **Grade 3** όγκος (χαμηλής διαφοροποίησης). Με τη χειρότερη πρόγνωση.

II-3.4 Σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM (Staging)

Το σύστημα σταδιοποίησης αποτελεί τον ιδανικό τρόπο για την ογκολογική ομάδα να συγκεντρώνει τις απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με το βαθμό έκτασης και διασποράς ενός όγκου. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο σύστημα σταδιοποίησης για τον καρκίνο είναι το TNM σύστημα του AJCC (American Joint Committee on Cancer). Παρακάτω, θα δούμε τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού βάσει του συστήματος TNM, με τα στοιχεία του AJCC του 2008 [272].

Το σύστημα σταδιοποίησης TNM ταξινομεί τους καρκίνους βασισμένο στα στάδια των T, N και M.

- Το T αφορά στον όγκο: το μέγεθός του και πόσο έχει επεκταθεί στο μαστό και στα γύρω όργανα.
- Το N αφορά στην διασπορά του όγκου στους λεμφαδένες.
- Το M αφορά στις μεταστάσεις: τη διασπορά του όγκου σε απομακρυσμένα όργανα.

ι. Οι κατηγορίες των T, N και M στον καρκίνο του μαστού

Πρωτοπαθής όγκος (T):

TX: Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί

T0: Δεν υπάρχουν ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου

Tis: Καρκίνωμα in situ (DCIS, LCIS, νόσος Paget χωρίς συνοδό ογκίδιο)

T1: Όγκος 2 cm ή λιγότερο στη μεγαλύτερη διάσταση

T1a: Όγκος 0.5 cm ή λιγότερο στη μεγαλύτερη διάσταση

T1b: Όγκος μεγαλύτερος από 0.5 cm και μικρότερος από 1 cm στη μεγαλύτερη διάσταση

T1c: Όγκος μεγαλύτερος από 1 cm και μέχρι 2 cm στη μεγαλύτερη διάσταση

T2: Όγκος μεγαλύτερος από 2 cm και μικρότερος από 5 cm στη μεγαλύτερη διάσταση

T3: Όγκος μεγαλύτερος από 5 cm στη μεγαλύτερη διάσταση

T4: Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή το δέρμα.

T4a: Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα

T4b: Οίδημα (περιλαμβάνει το «φλοιό πορτοκαλιού») ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφόρα δερματικά οζίδια περιοριζόμενα στον ίδιο μαστό

T4c: Τα T4a και T4b μαζί

T4d: Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού

Επιχώριοι λεμφαδένες (N):

NX: Οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν (π.χ. αν έχει προηγηθεί αφαίρεση)

N0: Δεν υπάρχει μετάσταση σε επιχώριο λεμφαδένα

N1: Μεταστάσεις σε 1 έως 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες και/ή μικρομεταστάσεις στους έσω μαστικούς λεμφαδένες κατά τη βιοψία του λεμφαδένα φρουρού

N2: Μεταστάσεις σε 4 έως 9 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή στους έσω μαστικούς λεμφαδένες

N3: Συμβαίνει ένα από τα παρακάτω:

- Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες
- Μεταστάσεις σε υποκλείδιους λεμφαδένες
- Μεταστάσεις σε υπερκλείδιους λεμφαδένες
- Μεταστάσεις σε μασχαλιαίους λεμφαδένες και ύπαρξη λεμφαδενικού block στους έσω μαστικούς λεμφαδένες

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M):

MX: Δεν μπορεί να εκτιμηθεί η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

M0: Χωρίς απομακρυσμένη μετάσταση

M1: Υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. (Οι συχνότερες θέσεις είναι κατά σειρά: τα οστά, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος και το ήπαρ).

ii. Σταδιοποίηση κατά ομάδες

<u>Στάδιο (Stage)</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>M</u>
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0

	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
III B	T4	Οποιοδήποτε N	M0
	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 4: Παρουσιάζεται η σταδιοποίηση των καρκινωμάτων το μαστού βάσει του TNM συστήματος. Από: [267].

<u>Στάδιο (Stage)</u>	<u>5ετής επιβίωση</u>
0	100%
I	100%
II	86%
III	57%
IV	20%

Πίνακας 5: Παρουσιάζεται το 5ετές προσδόκιμο επιβίωσης ανά στάδιο νόσου. Από: [272].

II-3.5 Σύγχρονη μοριακή ταξινόμηση

Η συμβολή καινοτόμων μοριακών τεχνικών, όπως οι μικροσυστοιχίες έκφρασης (expression microarrays) στη μελέτη του καρκίνου του μαστού, οδήγησε σε μια νέα ταξινόμηση, βάσει του μοριακού προφίλ γονιδιακής έκφρασης. Έτσι, ο καρκίνος του μαστού ταξινομήθηκε σε τέσσερις κατηγορίες [273,274]:

- Luminal A: Πρόκειται για τους όγκους με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικό το HER2, οι οποίοι, ταυτόχρονα, εμφανίζουν χαμηλό ποσοστό (<14%) θετικών πυρήνων στο ki-67. Οι όγκοι αυτοί ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία και έχουν γενικά ευνοϊκή πρόγνωση.

- Luminal B: Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει δύο υποομάδες: Την υποομάδα με τους όγκους που έχουν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και θετικό το HER2 (Luminal-HER2 υποομάδα) και την υποομάδα με τους όγκους, που έχουν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και αρνητικό το HER2, οι οποίοι όμως εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ($\geq 14\%$) θετικών πυρήνων στο ki-67. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν πιο επιθετική συμπεριφορά από τους Luminal A.
- HER2 (+): Πρόκειται για τους όγκους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς και θετικό το HER2. Η θεραπεία με το trastuzumab έχει αλλάξει θεαματικά προς το καλύτερο τη φυσική ιστορία των όγκων αυτών.
- Basal-like (ή Triple-negative): Πρόκειται για τους όγκους με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς, αλλά και αρνητικό το HER2 (Triple-negative). Οι όγκοι αυτοί εκφράζουν επίσης την κυτταροκερατίνη 5/6 (CK 5/6) και/ή τον υποδοχέα EGFR. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν τη χειρότερη πρόγνωση από τις τέσσερις κατηγορίες, με το δεδομένο πως στερούνται θεραπευτικών επιλογών πλην της κλασικής χημειοθεραπείας και της ακτινοθεραπείας.
- Θα πρέπει να σημειωθεί πως υπάρχει και μια υποομάδα των Triple-negative όγκων, οι οποίοι δεν εκφράζουν την CK 5/6, ούτε τον EGFR. Αυτοί ονομάζονται Triple-negative-nonbasal (TPN-nonbasal) [275].

Οι κατηγορίες που αναφέρθηκαν παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω στον Πίνακα 6. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται βασικά γονιδιακά, κλινικά και θεραπευτικά χαρακτηριστικά των Luminal, HER2 και Basal μοριακών υποτύπων.

<u>Μοριακός υπότυπος</u>	<u>Μοριακό προφίλ</u>
Luminal A	ER+ και/ή PR+, HER2 – και χαμηλό ki-67 (< 14%)
Luminal B	ER+ και/ή PR+, HER2+ (Luminal-HER2 υποομάδα)
	ER+ και/ή PR+, HER2 – και υψηλό ki-67 (>= 14%)
HER2 (+)	ER –, PR – και HER2+
Basal-like	ER –, PR –, HER2 – και CK5/6+ και/ή EGFR+

Πίνακας 6: Τα ανοσοϊστοχημικά κριτήρια ταξινόμησης των μοριακών υποτύπων του καρκίνου του μαστού. Από: [273].

	Molecular subtype		
	Luminal	HER2	Basal
Gene expression pattern	High expression of hormone receptors and associated genes (luminal A>luminal B)	High expression of HER2 and other genes in amplicon Low expression of ER and associated genes	High expression of basal epithelial genes, basal cytokeratins Low expression of ER and associated genes Low expression of HER2
Clinical features	~70% of invasive breast cancers ER/PR positive Luminal B tend to be higher histological grade than luminal A Some overexpress HER2 (luminal B)	~15% of invasive breast cancers ER/PR negative More likely to be high grade and node positive	~15% of invasive breast cancers Most ER/PR/HER2 negative ('triple negative') <i>BRCA1</i> dysfunction (germline, sporadic) Particularly common in African-American women
Treatment response and outcome	Respond to endocrine therapy (but response to tamoxifen and aromatase inhibitors may be different for luminal A and luminal B)	Respond to trastuzumab (Herceptin) Respond to anthracycline-based chemotherapy Generally poor prognosis	No response to endocrine therapy or trastuzumab (Herceptin) Appear to be sensitive to platinum-based chemotherapy

	<i>Molecular subtype</i>		
	<i>Luminal</i>	<i>HER2</i>	<i>Basal</i>
	Response to chemotherapy variable (greater in luminal B than in luminal A) Prognosis better for luminal A than luminal B		and PARP inhibitors Generally poor prognosis (but not uniformly poor)

Πίνακας 7: Βασικά χαρακτηριστικά των *Luminal*, *HER2* και *Basal* μοριακών υποτύπων. Από: [273].

II-4***Vascular Endothelial******Growth Factor******(Αγγειακός Ενδοθηλιακός******Αυξητικός Παράγοντας)******– VEGF***

II-4.1 Εισαγωγή

Η αγγειογένεση αποτελεί μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό και συνίσταται στη δημιουργία και ανάπτυξη νέων αγγείων. Η αγγειογένεση αποτελεί σημαντικότερη διαδικασία κατά την εμβρυογένεση, ενώ στους ενήλικους περιορίζεται σε αυστηρά όρια και λαμβάνει κυρίως χώρα κατά την επούλωση τραυμάτων, στο ενδομήτριο μετά την εμμηνορροσία και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η ψωρίαση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Όμως, έχει αποδειχθεί πως διαδραματίζει, επίσης, εξέχοντα ρόλο κατά την ανάπτυξη και εξάπλωση των κακοήθων νεοπλασιών.

II-4.1 Ιστορία της αγγειογένεσης, του VEGF και της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας

Τα γεγονότα της ιδιαίτερης σχέσης του καρκίνου με το αγγειακό σύστημα και της ιδιαίτερης αγγείωσης των όγκων είχαν παρατηρηθεί ήδη από τα αρχαία χρόνια (!). Έτσι, ακόμη και το ίδιο το όνομα «καρκίνος» (το άλλο όνομα δηλαδή του κάβουρα) προέρχεται από την εικόνα των αγγείων περίξ του όγκου και πιο συγκεκριμένα του καρκίνου του μαστού και εφευρέτης του είναι ο Ιπποκράτης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως οι αρχαίοι Έλληνες ιατροί είχαν παρατηρήσει τη μεγάλη ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος στους όγκους, οι οποίοι «και κεκισωμένες έχοντες τας πέριξ φλέβας»,

όπως χαρακτηριστικά σημειώνει εκτός των άλλων και ο Αέτιος Αμιδηνός στο 16ο λόγο του [6].

Στον 20^ο αιώνα, ήδη κατά τα πρώτα μεταπολεμικά χρόνια, η αγγειογένεση προσέλκυσε το ενδιαφέρον της ιατρικής έρευνας όσον αφορά στη συμμετοχή της στις διαδικασίες της ανάπτυξης του καρκίνου. Έτσι, το 1945 έχουμε την πρώτη, ίσως, σχετική αναφορά στη διεθνή ιατρική βιβλιογραφία από τους Algire και Chalkley [276], οι οποίοι υποστήριξαν πως μία βασική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να προκαλούν συνεχώς τη δημιουργία νέων τριχοειδικών αγγείων *in vivo*. Το 1948 ο Michaelson μίλησε για έναν άγνωστο «Χ-παράγοντα», υπεύθυνο για την αγγειογένεση [277].

Καθώς η σχετική έρευνα προχωρούσε, βρίσκουμε μια σημαντική μελέτη που δημοσίευσε ο Greene το 1961 [278], στην οποία αναφέρει τις παρατηρήσεις του από μια σειρά ιδιαίτερα αξιόλογων πειραμάτων: Πολύ μικρού μεγέθους όγκοι, οι οποίοι εμφυτεύθηκαν στο οπίσθιο ημιμόριο του οφθαλμού χοιριδίων, αδυνατούσαν να αυξηθούν σε μέγεθος, καθώς αδυνατούσαν να δημιουργήσουν νεοαγγεία. Όταν όμως οι όγκοι αυτοί εμφυτεύθηκαν σε μυς επιμύων, αναπτύχθηκαν ταχύτατα σε μέγεθος, μέσω της δημιουργίας νεοαγγειακού δικτύου.

Το 1968 αποτέλεσε ένα σημαντικό έτος, όσον αφορά στην έρευνα σχετικά με την αγγειογένεση στον καρκίνο. Κατά το έτος αυτό, δημοσιεύτηκαν από δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών (Greenblatt και Shubik [279], Ehrman και Knoth [280]) ορισμένες πολύ ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις: Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης

καθιστά τα καρκινικά κύτταρα ικανά να επιβιώσουν χωρίς να βρίσκονται κοντά σε προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο, καθώς νέα αγγεία δημιουργούνται, τα οποία μπορούν να τα τρέφουν. Επιπλέον, υποστήριξαν την άποψη πως είναι πιθανή η ύπαρξη κάποιου παράγοντα, ο οποίος διαχέεται από τα κύτταρα του όγκου και προωθεί την αύξηση της παραγωγής τριχοειδικών αγγείων.

Και φθάνουμε στο 1971, το οποίο αποτέλεσε έτος-σταθμό στην ιστορία της αγγειογένεσης. Κατά το έτος αυτό, ο διάσημος πλέον χειρουργός και ερευνητής Judah Folkman δημοσίευσε την απομόνωση, για πρώτη φορά στην ιστορία, ενός αγγειογενετικού παράγοντα, ο οποίος παραγόταν από καρκινικό ιστό σε επίμυς και τον οποίο ονόμασε «Tumor Angiogenesis Factor – TAF» (Παράγοντα Αγγειογένεσης του Όγκου) (Folkman J et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. (1971) J Exp Med) [281]. Κατά το ίδιο έτος, εκτός της απομόνωσης για πρώτη φορά ενός αγγειογενετικού παράγοντα, ο Folkman στο έγκριτο περιοδικό «New England Journal of Medicine» (Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. (1971) N Engl J Med) [282] πρότεινε την ιδέα πως ένα πιθανό μπλοκάρισμα (blockade) του παράγοντα αυτού θα μπορούσε να οδηγήσει σε αναστολή της διαδικασίας της αγγειογένεσης και αυτό με τη σειρά του σε καθήλωση των συμπαγών όγκων σε μία μικρή διάμετρο της τάξης των λίγων χιλιοστών. Πρότεινε δηλαδή ο Folkman για πρώτη φορά την πραγματικά πρωτοποριακή, για την εποχή εκείνη, ιδέα της αντι-αγγειογενετικής θεραπείας.

Το επόμενο έτος-σταθμός στην ιστορία της αγγειογένεσης είναι το 1989, κατά το οποίο η ερευνητική ομάδα του Ferrara δημοσίευσε στο περιοδικό «Science» την απομόνωση για πρώτη φορά του περίφημου «Vascular Endothelial Growth Factor» ή VEGF (Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα), του πλέον σημαντικού αγγειογενετικού παράγοντα, που έχει βρεθεί ως σήμερα [283]. Οι ερευνητές αυτοί μάλιστα πρότειναν και την ονομασία αυτή για το συγκεκριμένο παράγοντα, την οποία και φέρει έκτοτε [284].

Τέσσερα χρόνια αργότερα, η ίδια ερευνητική ομάδα (Ferrara και συν) έδειξε, («Nature», 1993) [285], πως ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το VEGF, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της πυκνότητας των αγγείων και αναστολή της αύξησης των όγκων *in vivo* σε ποντίκια.

Έτσι, μετά από μερικά χρόνια κλινικών δοκιμών [ενδεικτικά: 286-288], φθάνουμε στο 2004, οπότε και χορηγείται η πρώτη έγκριση χρησιμοποίησης του μονοκλωνικού αντισώματος Bevacizumab (Avastin) για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου από τον FDA [289]. Το 2006 χορηγείται η έγκριση από τον FDA για τη χρησιμοποίηση του Bevacizumab στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, το 2008 στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, το 2009 στο μεταστατικό renal-cell καρκίνο και στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο FDA, το 2011, αφαίρεσε την έγκριση της χρησιμοποίησης του Bevacizumab για τον καρκίνο του μαστού [290,291], μετά από πολλές μελέτες, οι οποίες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως το Bevacizumab δεν αυξάνει την ολική επιβίωση στον

καρκίνο του μαστού, ούτε επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου, ενώ εκθέτει τις ασθενείς στις ανεπιθύμητες ενέργειές του, που περιλαμβάνουν την υψηλή αρτηριακή πίεση και την αιμορραγία. Ωστόσο, σε άλλες χώρες εκτός ΗΠΑ, το Bevacizumab εξακολουθεί να χορηγείται κανονικά σε γυναίκες πάσχουσες από καρκίνο του μαστού.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί πως από το 2004, οπότε και κυκλοφόρησε, όπως είπαμε, η πρώτη ειδική αντι-αγγειογενετική θεραπεία (το Bevacizumab), ως σήμερα, πολυάριθμα φάρμακα έχουν προστεθεί στη φαρέτρα της αντι-αγγειογενετικής αγωγής, είτε βρίσκονται ακόμη σε στάδια κλινικών δοκιμών, όπως: το Aflibercept, το Sunitinib, το Sorafenib, το Pazopanib, το Vandetanib κ.ά. (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφ. II-4.11).

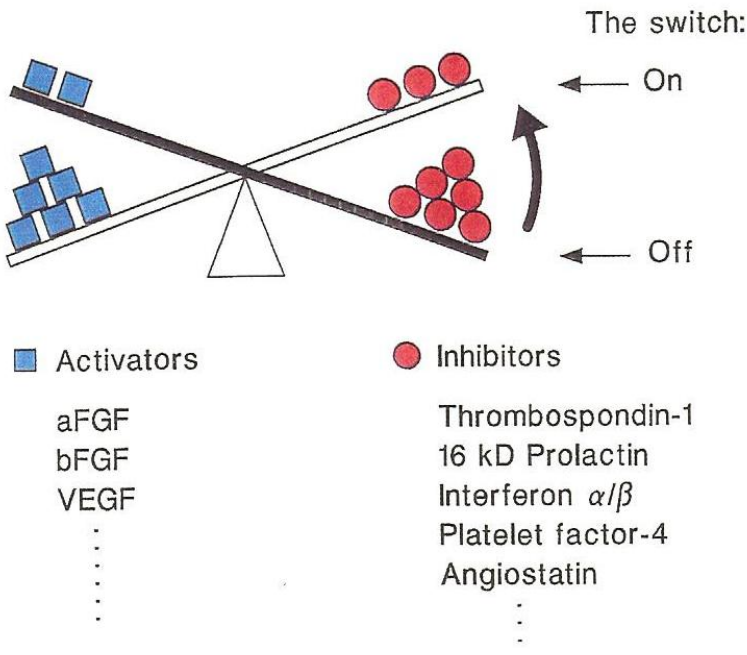
II-4.3 Η «ύπνωση του όγκου» (tumor dormancy) και ο «αγγειογενετικός διακόπτης» (angiogenic switch)

Όταν ένας πρωτοπαθής όγκος πρωτοδημιουργείται, ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων εξισορροπείται από τη διαδικασία της απόπτωσης και ο όγκος μπορεί να παραμένει ασυμπτωματικός, μη-ανιχνεύσιμος, σε στάδιο *in situ* και με μέγιστο μέγεθος περίπου 1 mm^3 για χρόνια, ίσως και για ολόκληρη την υπόλοιπη ζωή του ανθρώπου [292,293]. Τέτοιος αυστηρός περιορισμός της ανάπτυξης του όγκου μέσω υψηλού δείκτη απόπτωσης φαίνεται πως υπάρχει και στον κλινικά μη ανιχνεύσιμο μικρομεταστατικό

καρκίνο του μαστού [294]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «ύπνωση του όγκου» (tumor dormancy) και οι όγκοι που βρίσκονται σε «ύπνωση» αδυνατούν να αυξηθούν σε μέγεθος και να εξελιχθούν σε καρκινική μάζα λόγω έλλειψης οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων [293,294]. Η διατήρηση του status της «ύπνωσης» προϋποθέτει τη μη ύπαρξη νεοαγγειογένεσης από τον όγκο.

Η έξοδος από το status της «ύπνωσης» και η έναρξη της αύξησης του μεγέθους του όγκου απαιτούν την έναρξη της διαδικασίας της νεοαγγειογένεσης, γεγονός το οποίο μπορεί να λάβει χώρα ξαφνικά και περιγράφεται ως «αγγειογενετικός διακόπτης» (angiogenic switch). Ο αγγειογενετικός διακόπτης ορίζεται ως η υιοθέτηση από τα καρκινικά κύτταρα των ιδιοτήτων που απαιτούνται για την απρόσκοπτη αύξηση του όγκου με την υιοθέτηση αγγειογενετικού φαινότυπου και την έναρξη της παραγωγής νεοαγγείων [292,293,295]. Τα νεοαγγεία, με τη μεταφορά οξυγόνου, θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων, καθιστούν τα καρκινικά κύτταρα ικανά να πολλαπλασιάζονται γοργά και τον όγκο να περνά από το *in situ* στάδιο στο διηθητικό. Η λειτουργία του αγγειογενετικού διακόπτη θεωρείται πως τίθεται σε εφαρμογή, όταν διαταραχθεί η ισορροπία ανάμεσα στους διεγέρτες της αγγειογένεσης (π.χ. aFGF, bFGF, VEGF, PDGF, HGF, PlGF, IL-6, IL-8, Ang-2 κ.ά.) και στους αναστολείς της (π.χ. θρομβοσπονδίνη-1 – TSP-1, ιντερφερόνες, αγγειοστατίνη, αναστολείς των MMPs – TIMPs, Ang-1 κ.ά.) (βλ. Εικόνα 21). Σε ορισμένους ιστούς, η απουσία διεγερτών της αγγειογένεσης μπορεί να κρατάει τον

αγγειογενετικό διακόπτη στο «off», ενώ σε άλλους οι διεγέρτες της αγγειογένεσης είναι μεν παρόντες, η δράση τους όμως ελέγχεται από τα υψηλά επίπεδα των αναστολέων. Έτσι, είτε μειώνοντας τη συγκέντρωση των αναστολέων π.χ. της θρομβοσπονδίνης, είτε μέσω της απώλειας της δράσης κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, είτε μέσω της αύξησης των επιπέδων των διεγερτών της αγγειογένεσης π.χ. του VEGF ή της υποξίας, μπορεί να διαταραχθεί η ισορροπία και να ενεργοποιηθεί ο αγγειογενετικός διακόπτης, οδηγώντας στη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων [292].



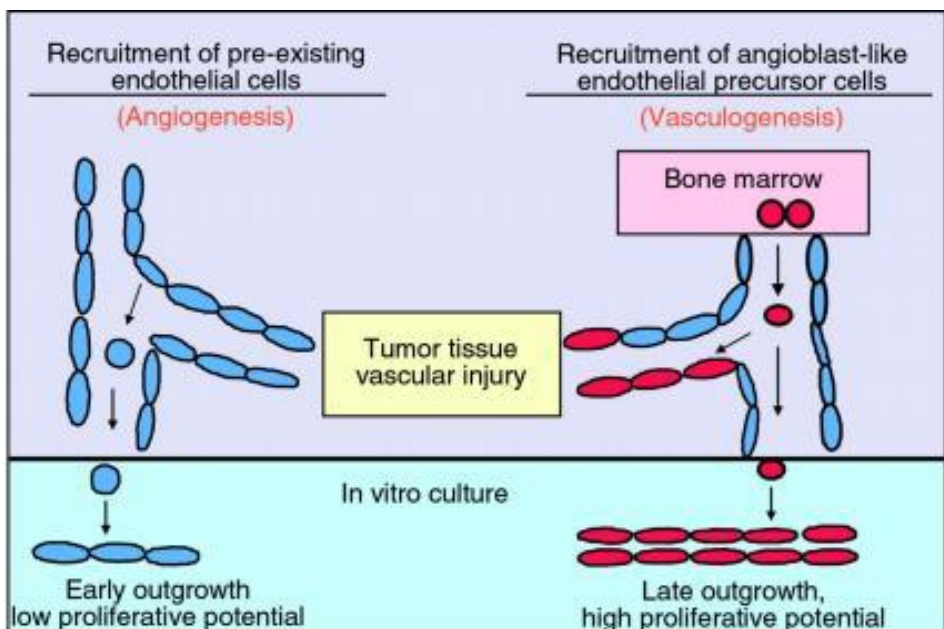
Εικόνα 21: *The balance hypothesis for the angiogenic switch. Από: [292]*

II-4.4 Νεοαγγειογένεση (neovascularization) και αγγειογένεση (angiogenesis)

Η αγγειογένεση (angiogenesis) του όγκου είναι η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο [296]. Η διαδικασία αυτή πυροδοτείται από εξωκυττάρια σήματα, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, από γενετικές μεταβολές όπως είναι η ενεργοποίηση ογκογονιδίων περιλαμβανομένου του PI3K και από μεταλλάξεις – και συνεπώς απενεργοποίηση – ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως είναι το PTEN και το p53 [297,298]. Μεταξύ όλων των προ-αγγειογενετικών παραγόντων, ο VEGF και οι αγγειοποιητίνες (angiopoietins – Ang) και οι υποδοχείς αυτών – VEGFR και Tie (tyrosine kinase with immunoglobulin – Ig – and EGF homology domains) έχουν τους σημαντικότερους ρόλους κατά την αύξηση των όγκων και την αγγειογένεση [299].

Αν και η αγγειογένεση αποτελεί ένα σημαντικό – το σημαντικότερο ίσως – μηχανισμό στη νεοαγγειογένεση (neovascularization) των όγκων, αρκετοί άλλοι μηχανισμοί, μέσω των οποίων οι όγκοι εξασφαλίζουν την τροφοδοσία τους με αίμα, έχουν εντοπιστεί. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι: η αγγειακή ανακατασκευή (vascular remodeling), η vasculogenesis, η vascular mimicry και η glomeruloid αγγειογένεση. Ο κάθε ένας μηχανισμός από αυτούς μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για ένα ορισμένο είδος όγκου ή για ένα ορισμένο στάδιο της αύξησης του όγκου, όμως, η ακριβής σημασία κάθε μηχανισμού σε κάθε τύπο καρκίνου παραμένει ασαφής. Η «αγγειακή ανακατασκευή» (vascular

remodeling) αποτελεί πιθανώς τον κυρίαρχο μηχανισμό για τη νεοαγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού [300-302]. Η «vasculogenesis» είναι η de novo γένεση αιμοφόρων αγγείων από προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως ακριβώς συμβαίνει και στο έμβryo. Σε ζωικά μοντέλα έχει αναφερθεί πως προγονικά κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από το μυελό των οστών, μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα και να προωθήσουν τη διαδικασία της νεοαγγειογένεσης, μέσω του συνδυασμού της vasculogenesis και της κλασικής αγγειογένεσης [303-306] (βλ. Εικόνα 22).

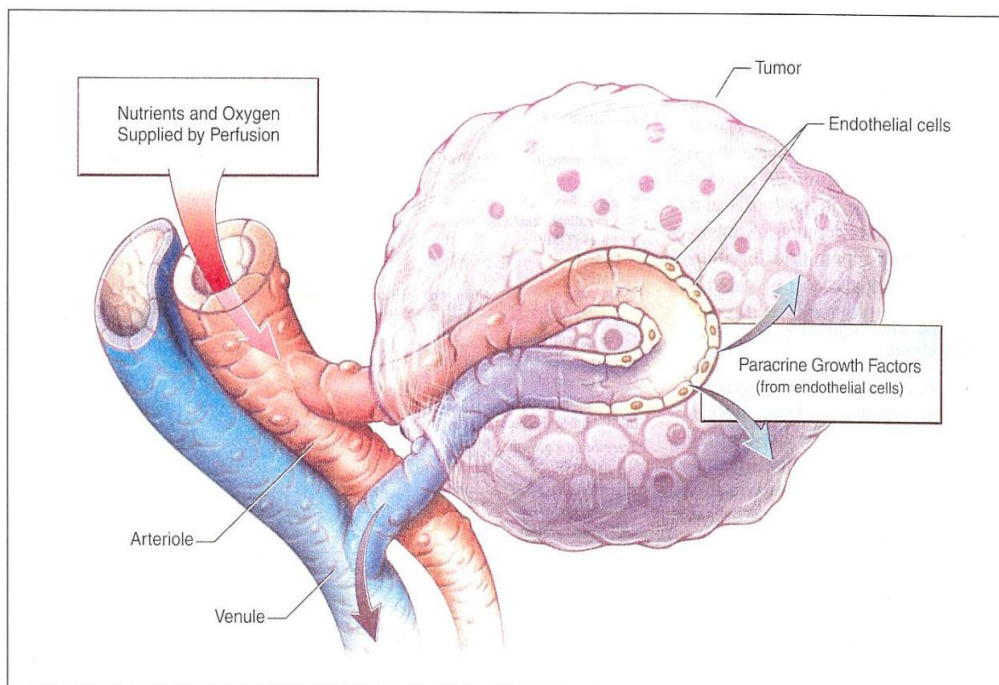


Εικόνα 22: *In vitro* μοντέλο των *postnatal* angiogenesis και vasculogenesis. Από: [305].

Η «glomeruloid αγγειογένεση» ομοιάζει περισσότερο στην «αγγειακή ανακατασκευή» παρά στην κλασική αγγειογένεση [307]. Τα glomeruloid bodies, τα οποία θεωρούνται χαρακτηριστικά για το γλοιοβλάστωμα έχουν ανιχνευθεί και στο διηθητικό καρκίνο του μαστού [308]. Η παρουσία τους έχει σχετισθεί με σημαντικά χαμηλότερη επιβίωση στον καρκίνο του μαστού, αλλά και σε άλλες κακοήθεις νόσους [309]. Η «vascular mimicry» αποτελεί μία νεοαγγειογενετική στρατηγική, η οποία πιθανώς είναι περιορισμένη στο επιθετικό οφθαλμικό μελάνωμα και στον καρκίνο των ωοθηκών [310], έχει όμως αναφερθεί και στον καρκίνο του μαστού. Η vascular mimicry ορίζεται ως ένα πλήρες δίκτυο τριχοειδών (capillary network), το οποίο δημιουργείται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα και όχι από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και το οποίο διενεργεί τη μεταφορά του αίματος [311,312]. Τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο λαμβάνουν τη μορφολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά υιοθετούν και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ενδοθηλίου, εκφράζοντας έναν αριθμό αγγειακών δεικτών. Είναι σημαντική η αναγνώριση αυτού του τύπου νεοαγγειογένεσης, καθώς υπάρχουν συνέπειες όσον αφορά στη θεραπευτική αντιμετώπιση του όγκου: Οι όγκοι, οι οποίοι έχουν ως κυρίαρχο μηχανισμό νεοαγγειογένεσης τη vascular mimicry, έχουν σημαντικές πιθανότητες να μην ανταποκριθούν στους κλασικούς αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες [296].

Τα αγγεία που δημιουργούνται κατά τη νεοαγγειογένεση είναι συχνά διατεταμένα λόγω του VEGF και παρουσιάζουν διαρροές λόγω της υπερπαραγωγής NO (nitric oxide) και της ανεπαρκούς επιστράτευσης

τοιχωματικών κυττάρων [313]. Τα νεοαγγεία του όγκου χαρακτηρίζονται από το ανώμαλο και ελικοειδές σχήμα τους, τον πλήρως διαταραγμένο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών τους κυττάρων και την ύπαρξη νεκρών άκρων, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας [314]. Επιπλέον, τα αγγεία που σχηματίζονται υπό την επίδραση αυτών των διαδικασιών εμφανίζουν ανάστροφη και διαλείπουσα ροή [315]. Το αποτέλεσμα όλων των παραπάνω είναι πως, παρόλη την αύξηση στη δημιουργία νέων αγγείων, η μεταφορά οξυγόνου και φαρμάκων παραμένει πολύ φτωχότερη σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Αυτό οδηγεί σε υποξία και έντονο stress στο μικροπεριβάλλον, τα οποία με τη σειρά τους έχουν προφανείς επιπτώσεις στη βιολογική συμπεριφορά του όγκου και στην αντίσταση στις θεραπείες [316].



Εικόνα 23: Η τροφοδοσία και αύξηση του όγκου μέσω της νεοαγγειογένεσης και ο ρόλος των αυξητικών παραγόντων που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεοαγγείων και δρουν παρακρινώς. Από: [298].

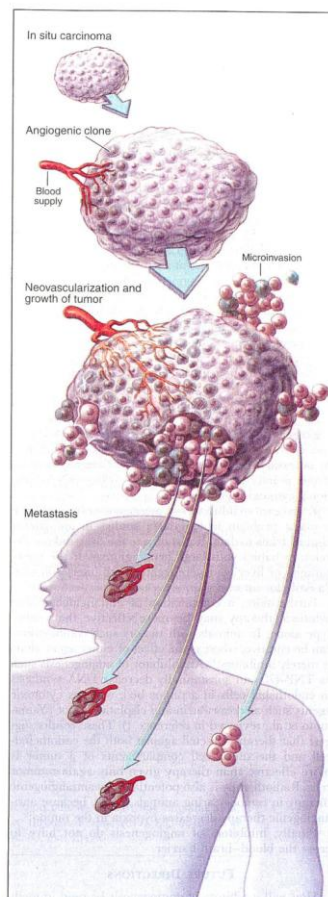
II-4.5 Η νεοαγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού

Πειραματικά μοντέλα στο μαστό, στα οποία έγινε διερεύνηση της διαδικασίας της νεοαγγειογένεσης, κατέληξαν σε άκρως ενδιαφέροντα συμπεράσματα:

- i. Δείγματα μαζικού αδένου με υπερπλαστικές βλάβες βρέθηκε να παρουσιάζουν έντονη νεοαγγειογένεση σε ποσοστό 30%, ενώ δείγματα από φυσιολογικό μαζικό αδένου παρουσίαζαν έντονη νεοαγγειογένεση μόνο στο 3% [317-319].
- ii. Δείγματα μαζικού αδένου από υγιή περιοχή γειτονική όμως σε περιοχή με κακοήγη βλάβη, παρουσίαζαν έντονη νεοαγγειογένεση τουλάχιστον με διπλάσια συχνότητα σε σχέση με δείγματα από μη-νεοπλασματικούς μαστούς. Το εύρημα αυτό καταδεικνύει πως ο «αγγειογενετικός διακόπτης» εμφανίζεται προτού υπάρξουν ανιχνεύσιμες μορφολογικές μεταβολές στον ιστό [320].
- iii. Χρησιμοποιώντας τη μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) ως δείκτη αγγειογένεσης, οι καλοήθεις βλάβες του μαστού, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή MVD, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού.
- iv. Η μέτρηση της αγγειογένεσης στο μαστό βρέθηκε πως βοηθά στον προσδιορισμό της πιθανότητας οι *in situ* κακοήθεις βλάβες να εξελιχθούν σε διηθητικές [321,322] ή της πιθανότητας ένας όγκος να απαντήσει στη θεραπεία [323-327], έχει δηλαδή προβλεπτική αξία.
- v. Τέλος, η μέτρηση της αγγειογένεσης στον καρκίνο του μαστού φαίνεται να συσχετίζεται ευθέως με την παρουσία μικρομεταστάσεων στο μυελό των οστών (διήθηση του μυελού) [328] και με την επιβίωση [329,330].

Όσον αφορά στους διάφορους μηχανισμούς νεοαγγειογένεσης που αναφέρθηκαν νωρίτερα, η αγγειογένεση και η αγγειακή ανακατασκευή αποτελούν τους σημαντικότερους στον καρκίνο του μαστού [296]. Υπάρχουν ενδείξεις πως η vascular mimicry έχει κάποια συμμετοχή στο φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού. Η απόκτηση βιολογικών πληροφοριών αυτού του τύπου γίνεται ολοένα και μεγαλύτερης σημασίας, δεδομένου του γεγονότος της ολοένα και περισσότερο εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης [296].

Εικόνα 24: Ο καθοριστικός ρόλος της νεοαγγειογένεσης στην αύξηση του όγκου και στη μεταστατική διαδικασία. Από: [298].



II-4.6 Μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density – MVD) και CD34

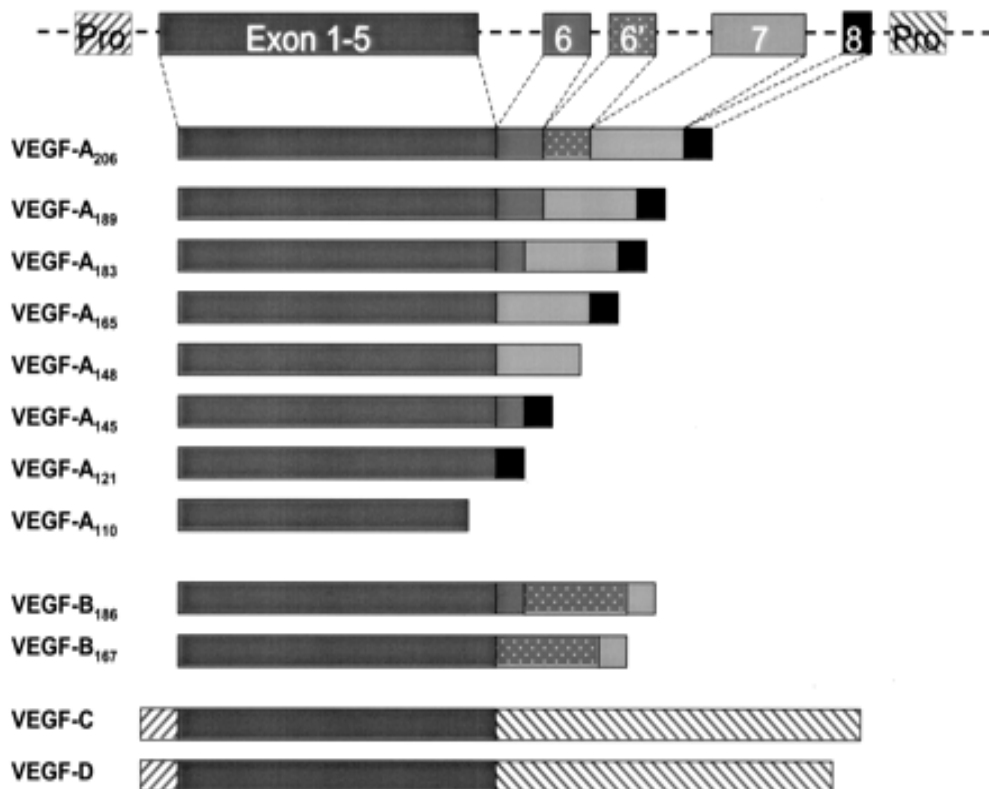
Υπάρχουν αρκετές παράμετροι για την εκτίμηση της νεοαγγειογένεσης των όγκων, όπως: η έκφραση των αγγειογενετικών παραγόντων (π.χ. VEGF), τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, η ωρίμανση των αγγείων και η υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, ο πλέον αξιόπιστος και ακριβής δείκτης της νεοαγγειογένεσης είναι η μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density – MVD) [329]. Η MVD δείχνει ακριβώς την πυκνότητα των νεοαγγείων που δημιουργούνται εντός του καρκινικού ιστού, με τη μέτρηση του μέγιστου αριθμού τους σε πλείστες hotspots περιοχές εντός του όγκου.

Όσον αφορά στην εκτίμηση της MVD, ένας από τους πλέον χρησιμοποιούμενους δείκτες είναι το αντίσωμα CD34 [ενδεικτικά: 331-333].

II-4.7 Ο Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) και οι υποδοχείς του (VEGFRs)

Το γονίδιο του VEGF στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6p21.3 και είναι οργανωμένο σε 8 εξόνια, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους από 7 ιντρόνια [334,335]. Το εναλλακτικό splicing των εξονίων ενός VEGF γονιδίου οδηγεί στην παραγωγή 6 ισομορφών: VEGF121,

VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 και VEGF206 [334] (βλ. Εικόνα 25).

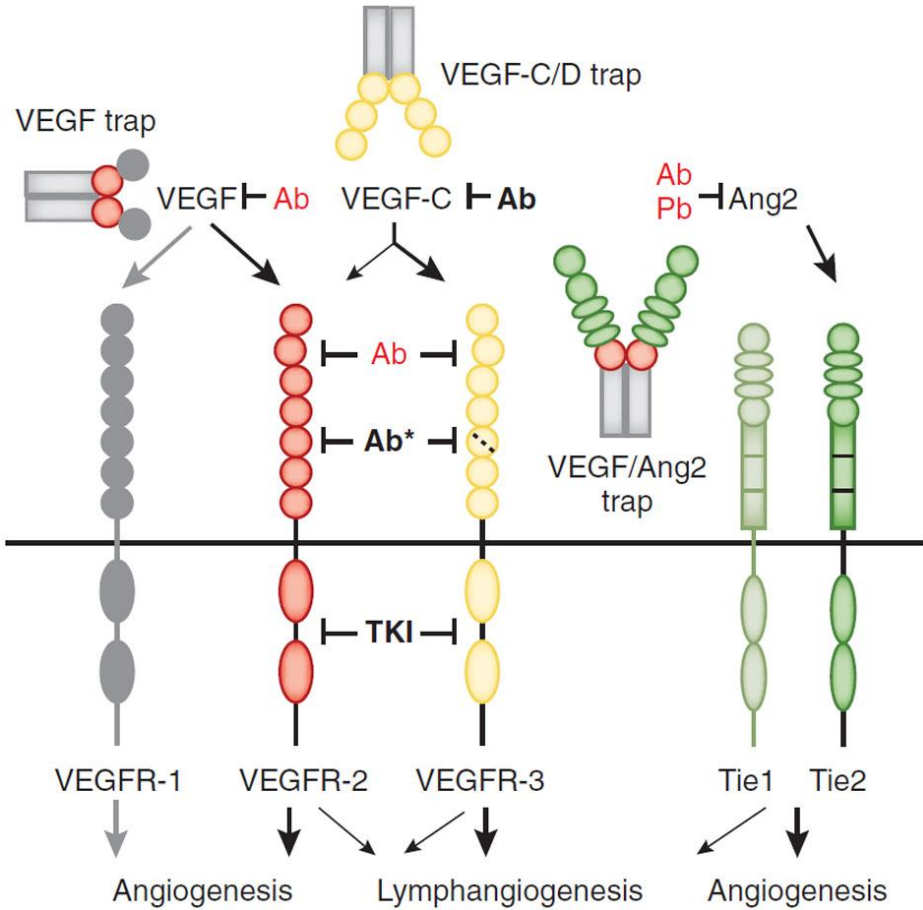


Εικόνα 25: Τα εξόνια του VEGF και οι ισομορφές του, συνέπεια του εναλλακτικού *splicing* των εξονίων του. [336]

Ο VEGF121 δεν παρουσιάζει heparin-binding δραστηριότητα, λόγω του όξινου χαρακτήρα του και μένει ελεύθερος προς διάχυση στον

εξωκυττάριο χώρο. Λόγω της δραστηριότητάς του αλλά και της βιολογικής του διαθεσιμότητας, ο VEGF165 αποτελεί τη δεσπόζουσα ισομορφή του VEGF [337]. Αν και ο VEGF165 εκκρίνεται επίσης, ένα σημαντικό κλάσμα του παραμένει συνδεδεμένο στην επιφάνεια του κυττάρου και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Extracellular Matrix – ECM). Οι VEGF189 και VEGF206 είναι οι πλέον απαντώμενοι στην ECM, εξαιτίας της ισχυρής τους συγγένειας και σύνδεσης με την ηπαρίνη. Μία άλλη ισομορφή, ο VEGF145 έχει προσφάτως εντοπιστεί [338,339].

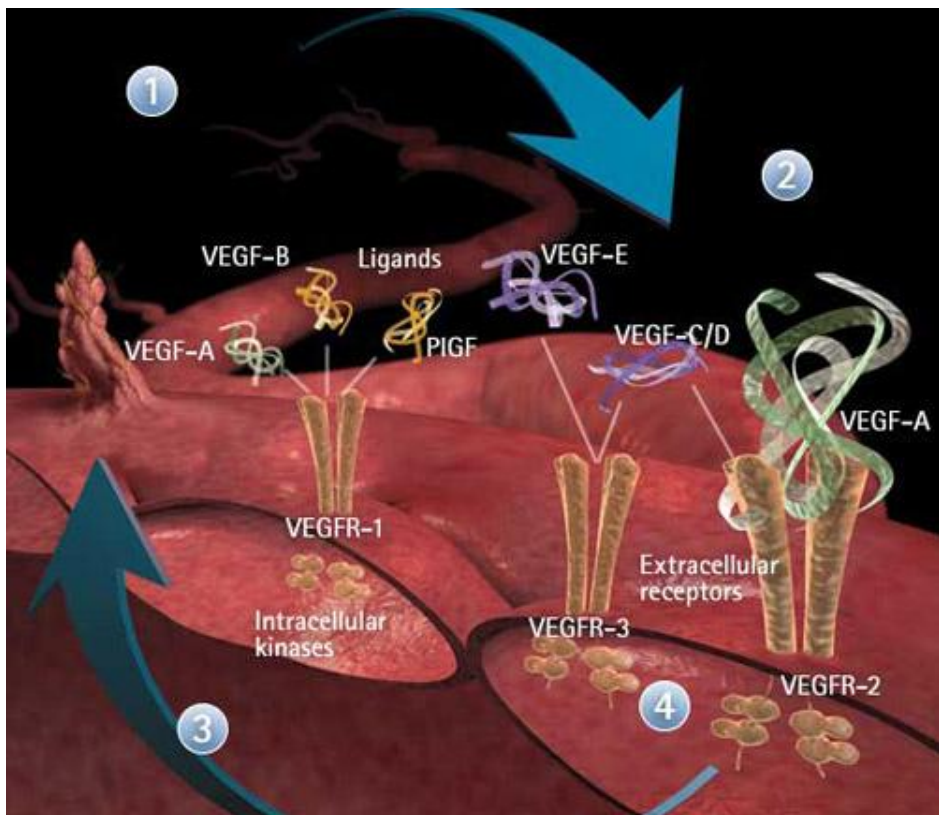
Οι υποδοχείς του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors – VEGFRs) είναι τρεις μεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (Tyrosine-Kinase Receptors – RTKs) και είναι: ο VEGFR-1 ή Flt-1, ο VEGFR-2 ή Flk-1 ή KDR και ο VEGFR-3 ή Flt-4, ενώ υπάρχει και μία διαλυτή μορφή του VEGFR-1, ο sVEGFR-1. Τα σήματα από το VEGF μεταδίδονται κυρίως μέσω δύο από τους υποδοχείς του, τους VEGFR-1 και VEGFR-2, οι οποίοι εδράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων.



Εικόνα 26: Τα μόρια του VEGF και οι υποδοχείς τους. Από: [340].

Ο VEGFR-1 και ο VEGFR-2 διαθέτουν επτά immunoglobulin (Ig)-like αλληλουχίες στον εξωκυττάριο χώρο με Kd περίπου 20 pM και 100 pM, αντίστοιχα [282,283,341]. Υπάρχει η υπόθεση πως ο VEGFR-2 δρα ως ο κύριος υποδοχέας για το VEGF σηματοδοτικό μονοπάτι, ενώ ο VEGFR-1 λειτουργεί ως ένας υποδοχέας-δόλωμα για τη ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας του VEGF.

Ο VEGFR-3 αποτελεί μέρος της ίδιας οικογένειας, αλλά δεν αποτελεί υποδοχέα για το VEGF, καθώς προσδένει μόνο το VEGF-C και το VEGF-D [342,343]. Ο VEGFR-3 εκφράζεται κυρίως στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων. Οι neuropilins, οι οποίοι είναι υποδοχείς ειδικό για την collapsin/semaphoring οικογένεια, έχει βρεθεί πως μπορούν επίσης να συνδέουν το VEGF, δρώντας, έτσι, ως πρόσθετοι VEGFR. Ο neuropilin-1 προσδένει μόνο το VEGF165, αλλά όχι και τον VEGF121. Ο neuropilin-2 βρέθηκε πως σχετίζεται με το VEGFR-1 [344].



Εικόνα 27: Ο VEGF και οι υποδοχείς του. Από: [345].

Η οικογένεια του VEGF θεωρείται σήμερα πως περιλαμβάνει και τους εξής παράγοντες: Placenta Growth Factor-1 (PlGF-1), PlGF-2, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E. Οι VEGF-C και VEGF-D αποτελούν συνδέτες του VEGFR-3, ο οποίος κυρίως υπερεκφράζεται στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων. Αρκετοί ερευνητές έχουν δείξει πως οι VEGF-C και VEGF-D διεγείρουν τη λεμφαγγειογένεση του όγκου και τις λεμφογενείς μεταστάσεις. Το σύστημα του VEGF και των υποδοχέων του VEGFR είναι υπεύθυνο τόσο για το αγγειακό όσο και για το λεμφαγγειακό ενδοθήλιο και, έτσι, διαδραματίζει ρόλο-κλειδί στην αύξηση του όγκου μέσω τόσο της αγγειογένεσης όσο και της λεμφαγγειογένεσης [346].

II-4.8 Ρύθμιση της έκφρασης του VEGF

Ο VEGF παράγεται τόσο από κακοήθη κύτταρα όσο και από καλοήθη ως απάντηση στην υποξία, τη φλεγμονή, ποικίλους αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες και αποκλειστικά από κακοήθη κύτταρα ως αποτέλεσμα γενετικών ανωμαλιών [347,348].

Η υποξία κατέχει ρόλο-κλειδί στην έκφραση του γονιδίου του VEGF τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* και η έκφραση του mRNA του VEGF αυξάνεται ως αποτέλεσμα της χαμηλής πίεσης οξυγόνου [335]. Η μέσω υποξίας μεταγραφή του mRNA του VEGF διαμεσολαβείται από την πρόσδεση του Hypoxia-Induced Factor-1 (HIF-1) σε μία θέση σύνδεσης για τον HIF-1 που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου του VEGF [349]. Διαταραχή της ρύθμισης της παραγωγής του HIF-1, όπως σε

μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου von Hippel-Lindau (VHL), η οποία καταστέλλει την παραγωγή του HIF-1, προκαλεί ιδιαίτερη αύξηση της παραγωγής VEGF, οδηγώντας στο υψηλό αγγειογενετικό profile των όγκων [350]. Εκτός της θέσης σύνδεσης για τον HIF-1, ο υποκινητής του γονιδίου του VEGF περιλαμβάνει και άλλες θέσεις σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων όπως είναι οι AP-1, AP-2, Egr-1, Sp-1 και κάποιιοι ακόμη, οι οποίοι συμμετέχουν επίσης στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου του VEGF [351].

Από την άλλη, αρκετές κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων είναι σε θέση να παράγουν υψηλές ποσότητες VEGF πρωτεΐνης σε συνθήκες φυσιολογικής μερικής πίεσης οξυγόνου *in vitro*. Έτσι, ο VEGF φαίνεται πως ρυθμίζεται και από γενετικές μεταβολές ανεξάρτητα από την υποξία [347,348]. Μεταβολές σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια περιλαμβανομένων των *ras*, *src* και *p53* έχουν χαρακτηριστεί ως παράγοντες διέγερσης (*up-regulation*) της έκφρασης του VEGF [346].

Οι αυξητικοί παράγοντες που μπορούν να διεγείρουν την παραγωγή VEGF περιλαμβάνουν τους: *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF-), *keratinocyte growth factor* (KGF) και *insulin-like growth factor* (IGF) [334,349]. Οι κυριότερες κυτοκίνες που αυξάνουν την έκφραση του VEGF είναι: η ιντερλευκίνη 1α (IL-1α) και η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) [334]. Ωστόσο, άλλες κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 10 (IL-10) και η ιντερλευκίνη 13 (IL-13) φαίνεται πως μειώνουν (*down-regulate*) την έκφραση του VEGF [349]. Έχει ακόμη βρεθεί πως η προσταγλανδίνη E2, η *thyroid stimulating hormone* (TSH)

και η adrenocorticotrophic hormone (ACTH) μπορούν επίσης να αυξήσουν την έκφραση του VEGF mRNA [335].

Ο σηματοδοτικός δρόμος RAF/MEK/extracellular signal-regulated kinase διεγείρει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του HIF-1α και ο δρόμος PI3K-AKT-FRAP αυξάνει τη σύνθεση του HIF-1α. Όπως αναφέρθηκε, καθώς ο HIF-1α διεγείρει την παραγωγή VEGF, είναι προφανής η θετική ρύθμιση του VEGF από τα δύο ανωτέρω σηματοδοτικά μονοπάτια [352,353].

Έχει, επίσης, βρεθεί πως τα οιστρογόνα μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή VEGF. Η δράση αυτή διαμεσολαβείται εν μέρει από την επίδραση των οιστρογόνων στον παράγοντα HIF-1 [354].

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, εκτός των VEGFRs, ο VEGF ρυθμίζεται και από άλλους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της κατηγορίας των τυροσινוקινασών, οι πιο σημαντικοί εκ των οποίων στον καρκίνο του μαστού είναι ο human epidermal growth factor (EGFR ή HER-1) και ο HER2 (ή c-erbB2, neu) [355-357]. Ο HER2 φαίνεται μάλιστα να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του VEGF και έχει προταθεί πως μεταξύ των δύο υφίσταται θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση [358-360] (για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη ρύθμιση του VEGF από το HER2 του και τις μεταξύ τους σχέσεις, βλ. στο Κεφ. «III-3 – Συζήτηση – Εύρημα 4^ο»).

Τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια περιέχουν VEGF πρωτεΐνη και την εκκρίνουν όταν διεγερθούν, φανερώνοντας τον κλασικό ρόλο

του VEGF στη φλεγμονή και στην πήξη του αίματος [361]. Έχει βρεθεί πως τα αιμοπετάλια από καρκινοπαθείς, ακόμη και από πάσχοντες από καρκίνο πρώιμου σταδίου, περιέχουν πολλές φορές υψηλότερα επίπεδα VEGF από αυτά των μη καρκινοπαθών [362]. Επίσης, στους καρκινοπαθείς, τα επίπεδα του κυκλοφορούντος VEGF στον ορό του αίματος είναι πολύ υψηλότερα από των υγιών μαρτύρων. Θεωρείται πως, στους πάσχοντες από κακοήγη νοσήματα, το σύστημα αποθήκευσης VEGF στα αιμοπετάλια επηρεάζεται και οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερη απελευθέρωση στον ορό VEGF όταν διεγερθεί [362].

II-4.9 Angiopoietins, HIF-1 και ο ρόλος τους στη νεοαγγειογένεση

Οι angiopoietins (αγγειοποιητίνες) αποτελούν μια οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών, η οποία περιλαμβάνει τρεις ανθρώπινες angiopoietins (Ang-1, Ang-2 και Ang-4) και μία angiopoietin ποντικού (Ang-3). Η Ang-1 είναι ένας αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας με κεντρικό ρόλο στην εξασφάλιση της ακεραιότητας του νεοσχηματιζόμενου αγγειογενετικού δικτύου. Τόσο η Ang-1 όσο και η Ang-2 συνδέονται στον Tie-2 υποδοχέα. Η Ang-1 είναι ένας Tie-2 αγωνιστής, ενώ η Ang-2 μπορεί να δράσει είτε ως ανταγωνιστής είτε ως αγωνιστής, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος [363,364]. Η ενεργοποίηση του Tie-2 από την Ang-1 οδηγεί το ενδοθηλιακό κύτταρο σε αυξημένη επιβίωση και

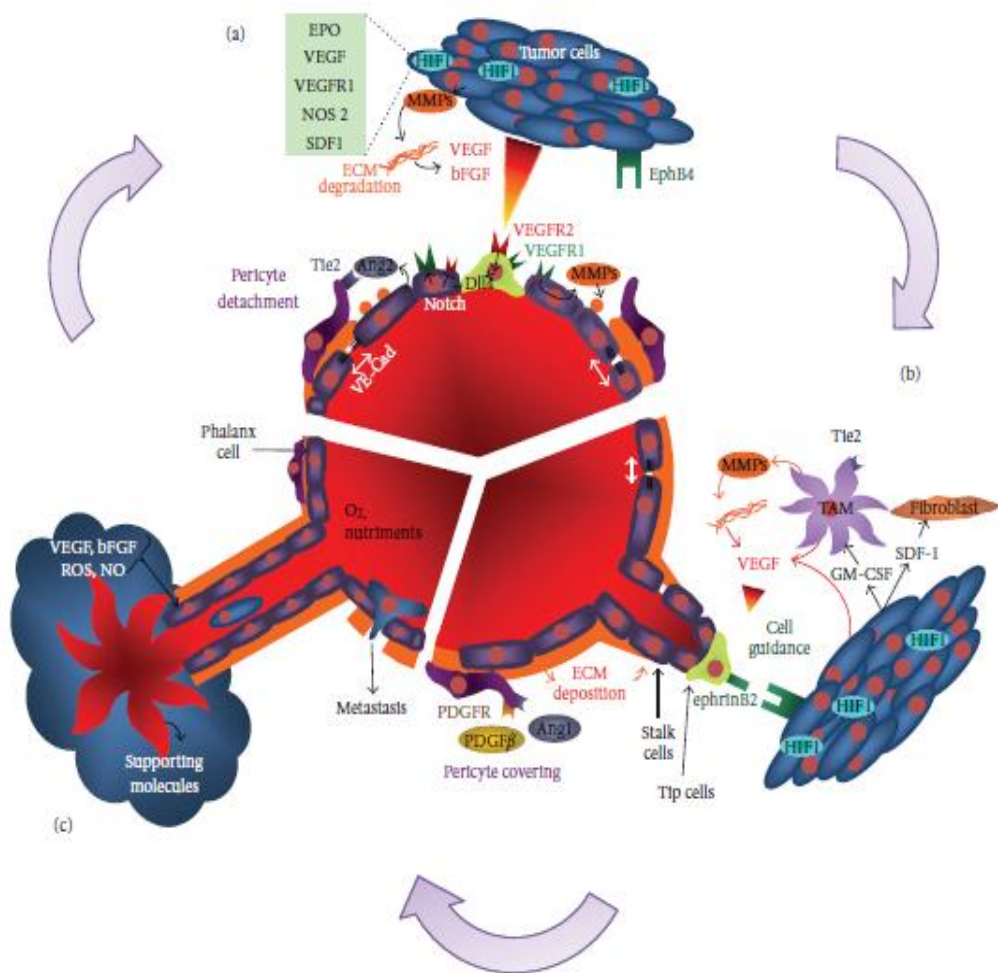
μετανάστευση, περιορίζει την αγγειακή διαπερατότητα και διεγείρει την επιστράτευση των λείων μυϊκών κυττάρων [365].

Η υποξία αποτελεί ένα πανταχού παρόν χαρακτηριστικό στο μικροπεριβάλλον του όγκου και σχετίζεται με την επιταχυνόμενη πρόοδο της νεοπλασίας. Ο Hypoxia-Induced Factor-1 (HIF-1) είναι ένα ετεροδιμερές, το οποίο αποτελείται από τις HIF-1α και HIF-1β υπομονάδες και δρα ως διαμεσολαβητής της ενεργοποίησης της μεταγραφικής διαδικασίας, ως απάντηση στην υποξία [366]. Ο HIF-1α διασπάται ταχύτατα κάτω από συνθήκες φυσιολογικής μερικής πίεσης οξυγόνου, μέσω υδροξυλίωσης σε κάποια κατάλοιπα προλίνης και ακετυλίωσης της λυσίνης στη θέση 5328 [367,368]. Η πρωτεΐνη pVHL, που παράγεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο von Hippel-Lindau, δρα ως συστατικό υποστρώματος για την E3-ubiquitin λιγάση, η οποία στοχοποιεί την ευαίσθητη στο οξυγόνο υποομάδα του HIF-1α με σκοπό να την οδηγήσει σε ταχεία αποδόμηση μέσω πρωτεασών. Τα παραπάνω λαμβάνουν χώρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες μερικής πίεσης οξυγόνου [369]. Η υποξία ή η απώλεια του pVHL αναστέλλουν την υδροξυλίωση της προλίνης, οδηγώντας σε συσσώρευση της HIF-1α πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα [370]. Οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και άλλα σηματοδοτικά μόρια διεγείρουν τη σύνθεση του HIF-1α μέσω ενεργοποίησης του δρόμου PI3K/AKT ή του δρόμου των MAPK [371,372].

Ο HIF-1α βρίσκεται αυξημένος σε αρκετές ανθρώπινες κακοήθειες [299] και φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην συμπεριφορά των

όγκων, συνεισφέροντας στον επιθετικό φαινότυπο και συμβάλλοντας στην αντίσταση τόσο στην ακτινοθεραπεία όσο και στη χημειοθεραπεία [373]. Κατά την ογκογενετική διαδικασία στο μαστό, η έκφραση του HIF-1α αυξάνει προοδευτικά κατά την εξέλιξη της πορείας από υπερπλαστικές βλάβες των πόρων σε καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα *in situ* (DCIS) και εν συνεχεία σε καλά διαφοροποιημένα διηθητικά καρκινώματα, πτωχής διαφοροποίησης DCIS και πτωχής διαφοροποίησης διηθητικά καρκινώματα [374].

Τα αυξημένα επίπεδα του HIF-1α σχετίζονται σημαντικά με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του VEGF [346]. Ο HIF-1α ρυθμίζει την έκφραση του VEGF μέσω σύνδεσής του στην αλληλουχία *hypoxia responsive element* (HRE) του υποκινητή του VEGF [366,375]. Επιπλέον, ο HIF-1α είναι σε θέση να ενεργοποιήσει περισσότερα από 60 γνωστά γονίδια, τα οποία σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση, τον κυτταρικό θάνατο, την κυτταρική προσκόλληση, την ερυθροποίηση, τη δομή του κυτταροσκελετού, τη ρύθμιση του pH, την ομοιόσταση του επιθηλίου, την αντίσταση στα φάρμακα, το μεταβολισμό του σιδήρου, της γλυκόζης, των αμινοξέων και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, το μυϊκό τόνο των αγγείων και την αγγειογένεση [376].

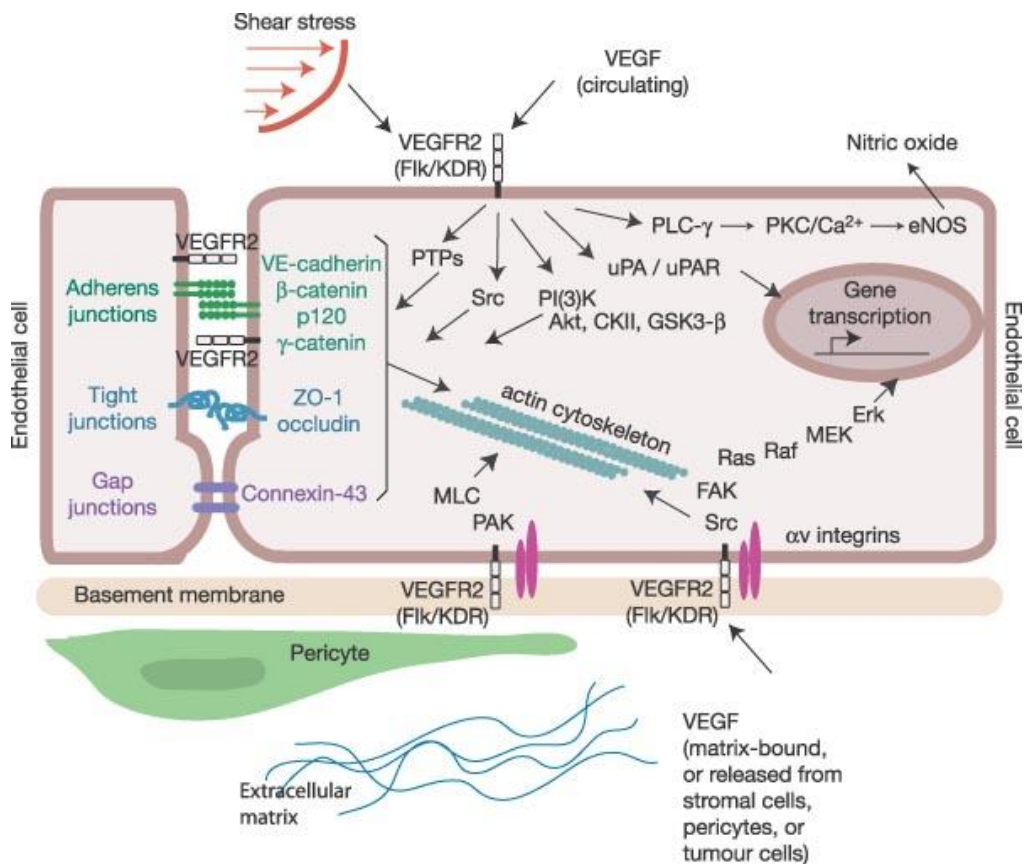


Εικόνα 28: Η μοριακή βάση της αγγειογένεσης των όγκων. Απεικονίζονται τα μόρια-κλειδιά της αγγειογένεσης (HIF-1, VEGF και VEGFRs, MMPs, Angiopoietins και Tie, κ.ά.) και οι βασικές τους λειτουργίες. Από: [314].

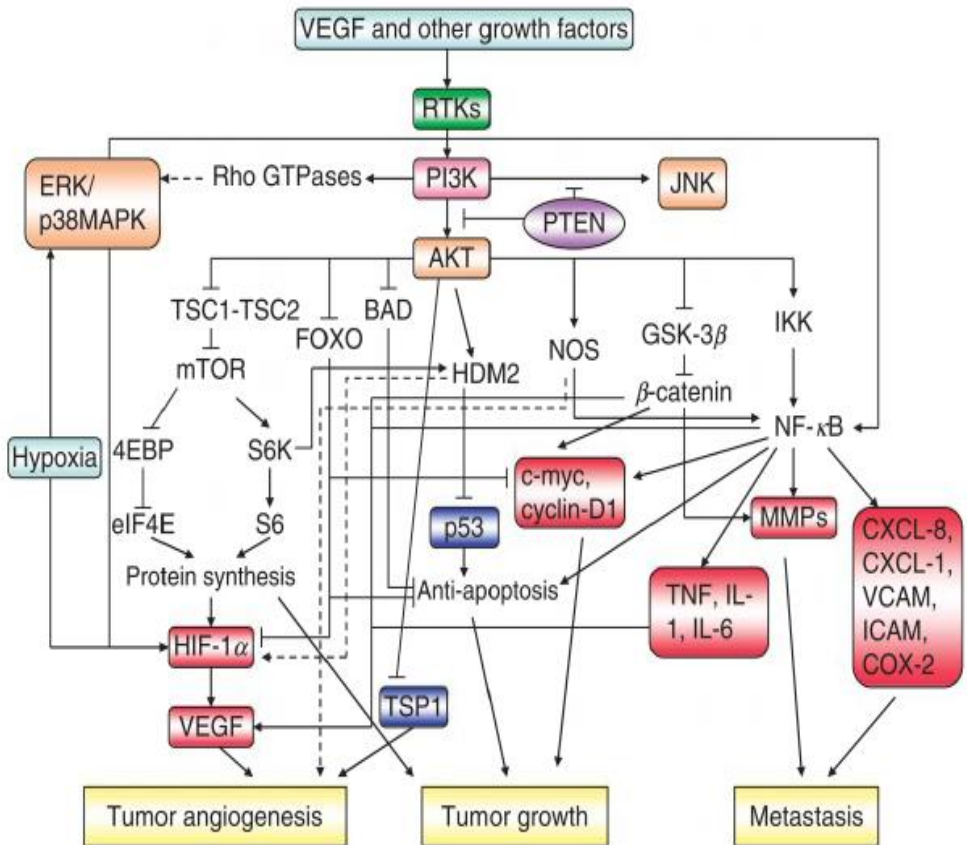
Τα γονίδια-στόχοι του HIF-1α οδηγούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε επιστράτευση στην περιοχή του όγκου, κυρίως μέσω της δράσης των VEGF/VEGFR. Η δράση αυτή ενισχύεται από τα κύτταρα του όγκου, τα οποία έχουν και αυτά τη δυνατότητα να προσελκύουν στρωματικά κύτταρα ως ινοβλάστες σχετιζόμενους με τον όγκο (cancer-associated fibroblasts – CAF) [377] και ως μακροφάγα σχετιζόμενα με τον όγκο (tumor-associated macrophages – TAM) [378]. Τα TAMs φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο καθώς εκκρίνουν VEGF, MMP-9 και ανοσοκατασταλτικά μόρια.

Τα υψηλά επίπεδα της Ang-2 ενεργοποιούν το «κλάδεμα» (pruning) των αγγείων μέσω της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό οδηγεί στην ύπαρξη υποξικών περιοχών, γεγονός το οποίο με τη σειρά του αυξάνει (up-regulates) την παραγωγή VEGF και έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη αγγειακή πυκνότητα [379]. Τέλος, μία από τις βασικές πηγές αγγειογενετικών παραγόντων είναι η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix – ECM), πρώτον γιατί μπορεί να αποθηκεύσει αυξητικούς παράγοντες όπως ο VEGF, δεύτερον γιατί η διάσπαση κάποιων από τα συστατικά της οδηγεί στη δημιουργία των προ- και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Μεταξύ των πρωτεασών που συμμετέχουν στην απελευθέρωση τέτοιων παραγόντων, οι πρωτεΐνες MMP, οι οποίες είναι μέλη μιας zinc-dependent οικογένειας ενδοπεπτιδασών, και πιο συγκεκριμένα η MMP-2 και η MMP-9 αποτελούν παράγοντες με ρόλο-κλειδί. Η MMP-9 έχει βρεθεί πως είναι ενεργοποιημένη σε αρκετούς καρκίνους και πως συμβάλλει στην αγγειογένεση των όγκων μέσω αύξησης της βιοδιαθεσιμότητας του

VEGF και του basic fibroblast growth factor (bFGF) και μέσω διάσπασης των τύπων IV και XVIII του κολλαγόνου και της perlecan [380,381]. Οι MMPs συμμετέχουν, ακόμη, στην κυτταρική μετανάστευση μέσω της επίδρασής τους στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και των κυττάρων μεταξύ τους.



Εικόνα 29: Τα πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο VEGF (1). Από: [382].



Εικόνα 30: Τα πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο VEGF (II). Η συμμετοχή του στη ρύθμιση των διαδικασιών της αύξησης του όγκου, της μετάστασης και της αγγειογένεσης. Από: [299].

II-4.10 Ο VEGF στον καρκίνο του μαστού

Κλινικοπαθολογικές συσχετίσεις επιβεβαιώνουν τον κεντρικό ρόλο της αγγειογένεσης στην αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού αλλά και στην πρόοδο της νόσου. Ινοκυστικές αλλοιώσεις με τη

μέγιστη αγγειακή πυκνότητα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [383]. Καρκινώματα *in situ* που χαρακτηρίζονται ιστοπαθολογικά ως επιθητικά, παρουσιάζουν υψηλή μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density – MVD) και αυξημένη παραγωγή VEGF [384,385]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση του VEGF εντός του όγκου σχετίζεται σημαντικά με την MVD και με πτωχή πρόγνωση σε μια πλειάδα συμπαγών όγκων στον άνθρωπο, περιλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού [341]. Στις περισσότερες μελέτες που έχουν εξετάσει την προγνωστική αξία του VEGF στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού, η έκφραση του VEGF αποτελούσε σημαντικό δείκτη πτωχής πρόγνωσης τόσο στην υποομάδα με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες όσο και σε αυτή με αρνητικούς [386]. Ο VEGF φαίνεται πως αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη τόσο για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (disease-free survival –DFS) όσο και για την ολική επιβίωση (overall survival – OS) [387].

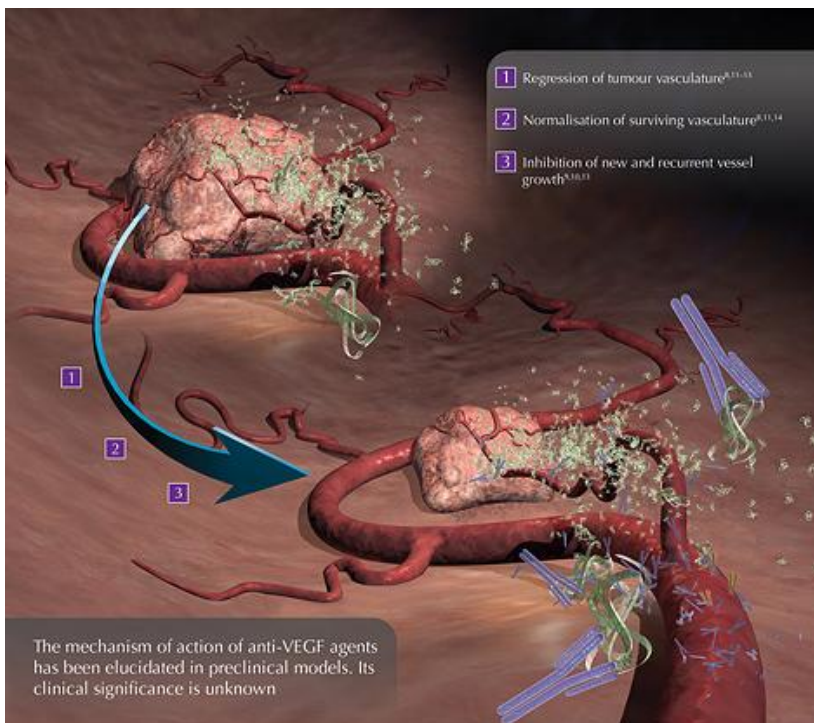
Όσον αφορά στην επίδραση του VEGF στην ευαισθησία του καρκίνου του μαστού στην ορμονοθεραπεία, βλ. Κεφ. II-8.5.

Σχετικά με την επίδραση του VEGF στην ευαισθησία του καρκίνου του μαστού στην ακτινοθεραπεία, βλ. Κεφ. II-8.6.

II-4.11 Αντι-VEGF Θεραπείες στον καρκίνο του μαστού

Ο VEGF μπορεί να ανασταλεί με αρκετούς τρόπους με παράγοντες οι οποίοι συνδέονται με τον ίδιο (π.χ. το bevacizumab), παράγοντες που

αναστέλλουν τους υποδοχείς τυροσινικινάσης του VEGF δηλαδή τους VEGFRs (π.χ. το sunitinib), παράγοντες που αναστέλλουν downstream διεγέρτες της δράσης του VEGF (αναστολείς του mTOR) και παράγοντες που τροποποιούν την παραγωγή του VEGF (παράγοντες που στοχοποιούν το HER2) κ.ά. [388]. Όσον αφορά στους αναστολείς των VEGFRs, αρκετές είναι οι μελέτες που δεν έχουν δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα [μία σύνοψή τους στο 389] και η ελπίδα πως η αναστολή των VEGFRs θα προσφέρει σημαντικά οφέλη στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού είναι μάλλον εξαιρετικά περιορισμένη [63].



Εικόνα 31: Ο μηχανισμός δράσης των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (εικόνα εξωφύλλου αυτού του βιβλίου). Από: [390].

i. Bevacizumab

Το πρώτο αντι-αγγειογενετικό φάρμακο το οποίο έλαβε έγκριση από τον FDA το 2004 ήταν το bevacizumab (βλ. Κεφ. II-4.2). Το bevacizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο προσδένεται στον κυριότερο τύπο VEGF, το VEGF-A.

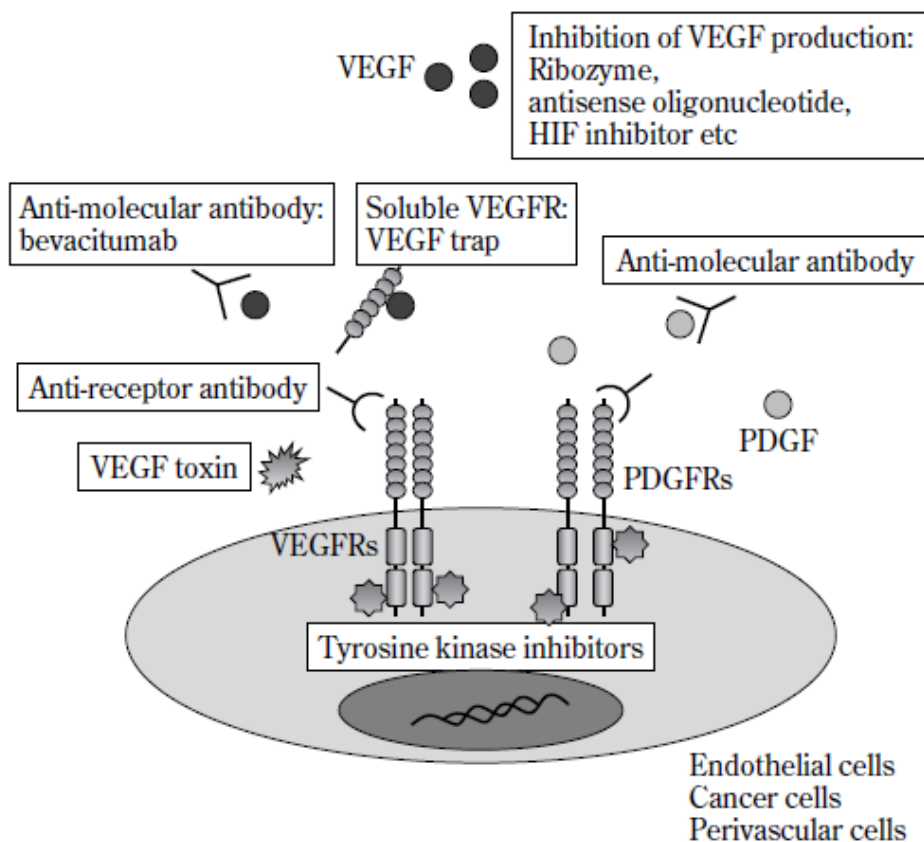
Στο setting της νεο-επικουρικής θεραπείας (neo-adjuvant), δύο μελέτες φάσης III έδειξαν μία αύξηση της πλήρους ύφεσης σε γυναίκες με τοπικά περιορισμένο HER2(-) καρκίνο του μαστού [391,392].

Στο setting του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, τρεις μεγάλες φάσης III μελέτες διερεύνησαν το bevacizumab ως θεραπεία πρώτης γραμμής: Στην ECOG E2100 μελέτη, ο συνδυασμός πακλιταξέλης και bevacizumab επιμήκυνε το PFS και αύξησε το ποσοστό ανταπόκρισης [393,394]. Η μελέτη AVADO είχε παρόμοια αν και λιγότερο εντυπωσιακά αποτελέσματα, συνδυάζοντας τη δοσεταξέλη με το bevacizumab [395]. Τέλος, η μελέτη RIBBON-1 έδειξε μία αύξηση στο PFS από 5.7 σε 8.6 μήνες προοπτικά με το συνδυασμό καπεσιταμπίνης και bevacizumab και μία αύξηση από 8 σε 9.2 μήνες με το συνδυασμό ταξάνης/ανθρακυκλίνης και bevacizumab [396]. Ωστόσο, είναι γεγονός πως και οι τρεις μελέτες απέτυχαν να αναδείξουν ωφέλεια, αύξηση δηλαδή της ολικής επιβίωσης (OS). Περαιτέρω στοιχεία προέρχονται από τη μελέτη «Athena» [397]. Στη μελέτη αυτή ασθενείς με HER2 (-) μεταστατικό καρκίνο του μαστού έλαβαν μία ταξάνη ή ένα άλλο χημειοθεραπευτικό φάρμακο, εκτός ανθρακυκλίνης, σε συνδυασμό με το bevacizumab. Στην περίπτωση που η χημειοθεραπεία διακοπτόταν

κατά τη διάρκεια της μελέτης λόγω τοξικότητας ή επιλογής του ασθενούς ή του θεράποντος (αλλά όχι λόγω προόδου νόσου), το bevacizumab συνεχιζόταν κανονικά ως μονοθεραπεία. Η μέση OS ήταν 30.0 μήνες στις ασθενείς που συνέχισαν το bevacizumab μετά τη διακοπή της χημειοθεραπείας και 18.4 μήνες στις ασθενείς που διέκοψαν το bevacizumab πριν ή ταυτόχρονα με τη διακοπή της χημειοθεραπείας [397]. Η ανάλυση στην υποομάδα των ασθενών με triple-negative καρκίνο του μαστού έδειξε πως αυτές οι ασθενείς πιθανώς να ωφελούνται περισσότερο από το bevacizumab. Ωστόσο, φαίνεται πως δεν έχει υπάρξει ως σήμερα απόδειξη ότι το bevacizumab αυξάνει την ολική επιβίωση (OS) στις ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού [63]. Αυτός είναι και ο βασικός λόγος για τον οποίο το bevacizumab έχασε την έγκρισή του από τον FDA για τον καρκίνο του μαστού το 2011, όπως αναφέραμε στο Κεφ. II-4.2.

ii. **Aflibercept**

Το aflibercept (VEGF Trap) είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη που συνδέεται με όλες τις ισομορφές του VEGF (και όχι μόνο με το VEGF-A όπως το bevacizumab). Επιπρόσθετα, το aflibercept συνδέεται με τον PGF, ο οποίος επίσης συμμετέχει στην αγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού. Αν και το aflibercept βρέθηκε να αναστέλλει την αύξηση του όγκου και τη μετάσταση σε in vitro μοντέλα [398], οι κλινικές δοκιμές απέτυχαν να δώσουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα [388].



Εικόνα 32: Σχηματική παρουσίαση των θεραπευτικών στόχων των διαφόρων αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Απεικονίζονται: η αναστολή της παραγωγής του VEGF, τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του VEGF, τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του VEGF, τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του PDGF, τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του υποδοχέα του PDGF και το VEGF-trap έναντι του διαλυτού VEGFR. Από: [346].

iii. Sunitinib

Το sunitinib είναι ένας από του στόματος πολυ-αναστολέας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI) και αναστέλλει τους εξής υποδοχείς: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-α και -β, stem-cell factor receptor (c-KIT), fms-like tyrosine kinase receptor 3 (flt-3) [388]. Το sunitinib έχει επίσης δοκιμαστεί σε συνδυασμούς με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Σε μία μελέτη φάσης II εκτιμήθηκε ο συνδυασμός πακλιταξέλης και bevacizumab με ή χωρίς το sunitinib, ως πρώτη γραμμής θεραπεία σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού, αλλά η μελέτη διακόπηκε πρόωρα λόγω της βαριάς τοξικότητας του χορηγούμενου σήματος. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλάμβαναν ουδετεροπενία, θρομβοπενία, υπερβολική κόπωση, διάρροια και ναυτία [399].

iv. Pazopanib

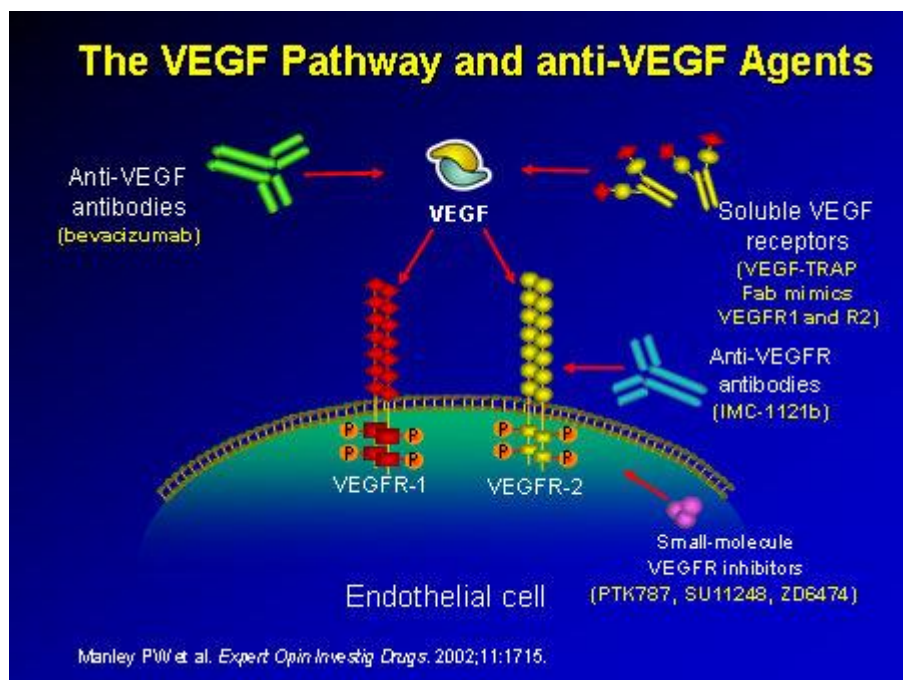
Το pazopanib είναι επίσης ένας πολυ-αναστολέας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI), ο οποίος αναστέλλει τους εξής υποδοχείς: VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3. Μελέτες φάσης II βρίσκονται σε εξέλιξη και συγκρίνουν το συνδυασμό pazopanib με lapatinib έναντι του lapatinib ως μονοθεραπεία, σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ή φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού. Επίσης, το pazopanib βρίσκεται στο στάδιο της εκτίμησής του σε μελέτες φάσης I και II, τόσο ως μονοθεραπεία όσο και σε θεραπευτικούς συνδυασμούς.

v. Vandetanib

Το vandetanib είναι ένας αναστολέας τυροσινוקινασών (TKI) και αναστέλλει τους υποδοχείς VEGFR2 και EGFR, με στόχο την αναστολή της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου. Το vandetanib ως μονοθεραπεία ήταν γενικά καλά ανεκτό, αλλά είχε περιορισμένη δράση σε ασθενείς με ανθεκτικό μεταστατικό καρκίνο του μαστού [400]. Κλινικές μελέτες είναι σε εξέλιξη για την εκτίμηση της δράσης του ως μονοθεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

vi. Sorafenib

Το sorafenib είναι ένα μικρό μόριο-αναστολέας της δράσης της κινάσης Raf αλλά και αναστολέας υποδοχέων τυροσινοκινάσης (TKI) με υποδοχείς-στόχους τους παρακάτω: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-β, c-KIT και flt-3, δηλαδή ταυτόχρονα αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση και διεγείρει την απόπτωση [388]. Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι οποίοι είχαν εμφανίσει πρόοδο νόσου μετά από τη λήψη τουλάχιστον ενός χημειοθεραπευτικού σκευάσματος, το από του στόματος sorafenib έδειξε μικρή μόνο βελτίωση. Ωστόσο, το sorafenib σε συνδυασμό με καπεσιταμπίνη βελτίωσε σημαντικά το PFS σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού από 4.1 σε 6.4 μήνες [401]. Μελέτη φάσης III που βρίσκεται σε εξέλιξη συγκρίνει την καπεσιταμπίνη σε συνδυασμό με το sorafenib ή placebo στη θεραπεία τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού HER2(-) καρκίνου του μαστού [388].



Εικόνα 33: Ο VEGF και οι αναστολείς του. Από: [402].

vii. Trastuzumab

Με δεδομένο το ρυθμιστικό ρόλο που ασκεί το HER2 στην παραγωγή του VEGF (βλ. Κεφ. II-4.8 & Κεφ. III-3), είναι επόμενο ο αντι-HER2 παράγοντας trastuzumab, με την αναστολή της δράσης του HER2 που προκαλεί, να έχει αντι-αγγειογενετική και αντι-VEGF δράση. Η δράση αυτή έχει όντως τεκμηριωθεί, αλλά είναι μόνο προσωρινή (βλ. Κεφ. II-8.7 – iv).

II-5***Mammary Serine******Protease Inhibitor******– Maspin***

II-5.1 Η maspin – οικογένεια, γονίδιο και πρωτεΐνη

Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (cell-matrix interactions) είναι αναγκαίοι για τη διηθητικότητα και τη μεταστατική δυνατότητα του όγκου. Οι πρωτεΐνάσες, οι οποίες εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα, όπως οι cathepsins, οι μεταλλοπρωτεΐνάσες και οι πρωτεΐνάσες σερίνης έχουν την ικανότητα να διασπούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και έτσι διευκολύνουν τη διήθηση του όγκου [403]. Δύο κατηγορίες πρωτεΐνασών έχουν μελετηθεί λεπτομερώς στον καρκίνο του μαστού αλλά και σε άλλους τύπους καρκίνου: οι πρωτεΐνάσες σερίνης με τους αναστολείς τους (plasminogen activator inhibitors, PAI-1 και PAI-2) και οι μεταλλοπρωτεΐνάσες (π.χ. κολλαγενάσες) με τους αναστολείς τους (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMPs) [404,405].

Η υπεροικογένεια των serpins είναι η υπεροικογένεια των αναστολέων των πρωτεΐνασών σερίνης (serine protease inhibitors). Η υπεροικογένεια διαχωρίζεται στις ανασταλτικές και στις μη-ανασταλτικές serpins [406]. Οι ανασταλτικές serpins χρησιμοποιούν τον ενεργό κεντρικό βρόχο (center loop) που διαθέτουν για να καταλαμβάνουν την πρωτεΐνάση-στόχο τους και να αναστέλλουν τη λειτουργία της. Οι μη ανασταλτικές serpins έχουν κοντύτερα αμινο- και καρβοξυ-τελικά άκρα και στερούνται της κλασικής πεπτιδικής εκκριτικής αλληλουχίας των serpin [406]. Οι serpins σχετίζονται και με

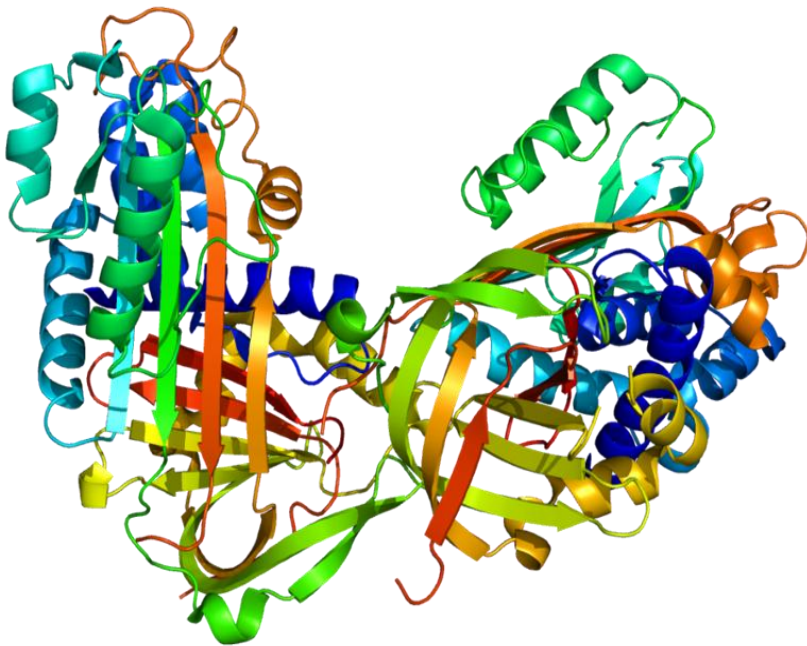
την κυτταρική προσκόλληση και παίζουν ρόλο στην ανακατασκευή (remodeling) της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας [407].

Ένα μέλος-κλειδί αυτής της μεγάλης οικογένειας αναστολέων είναι η maspin (MAmmary Serine Protease INhibitor) ή SERPINB5 [408]. Απομονώθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Ζου και συν το 1994 [409]. Η maspin μοιράζεται ομολογία αλληλουχιών με τις ανασταλτικές serpins όπως είναι οι plasminogen activator inhibitors (PAI-1 και PAI-2) και η α -1-antitrypsin, όπως επίσης και με τη μη ανασταλτική serpin ovalbumin [409]. Οι συγκρίσεις των αλληλουχιών δείχνουν πως η maspin ομοιάζει περισσότερο με τις μη ανασταλτικές clade B serpins. Ο ενεργός κεντρικός βρόχος της maspin είναι σημαντικά μικρότερος από τις περισσότερες ανασταλτικές serpins, όμως, είναι ιδιαίτερα σημαντικός για τη λειτουργία της. Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την προώθηση της κυτταρικής προσκόλλησης [410].

Το γονίδιο της maspin εδράζεται στο χρωμόσωμα 18q21.3-q23 στον άνθρωπο και ευθύνεται για την παραγωγή μιας 42 KDa serpin πρωτεΐνης (376 αμινοξέα) (βλ. Εικόνα 34). Το γονίδιο της maspin βρίσκεται μαζί με τα γονίδια άλλων serpins όπως τα γονίδια των αντιγόνων 1 και 2 του καρκινώματος από πλακώδη κύτταρα (squamous cell carcinoma – SCC), το γονίδιο του plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) και το γονίδιο της serpin κεφαλής και τραχήλου (headpin) [411-413]. Επιπλέον, το γονίδιο της maspin έχει χαρτογραφηθεί στην ίδια περιοχή με τα ογκοκατασταλτικά γονίδια DCC [414], SCCA 1 και 2 [415]

και με το γονίδιο του Bcl-2, το οποίο επαναδιατάσσεται στα non-Hodgkin λεμφώματα [416,417].

Η maspin διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου και εκφράζεται στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα και στα φυσιολογικά εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα [418,419]. Ωστόσο, το mRNA της maspin και η πρωτεΐνη της συχνά παράγονται ελάχιστα ή και καθόλου στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, όπως φαίνεται από αναλύσεις με Northern, Southern και Western Blot, όπως επίσης και με ανοσοϊστοχημική χρώση [409].



Εικόνα 34: Σχηματική απεικόνιση του μορίου της πρωτεΐνης της maspin. Από: [420].

II-5.2 Ρύθμιση του γονιδίου της maspin

II-5.2.1 Παράγοντες ρύθμισης του γονιδίου της maspin

i. Οι παράγοντες Ets, Ap1 και HRE

Η κλωνοποίηση του υποκινητή της maspin οδήγησε στην ταυτοποίηση θέσεων σύνδεσης (binding sites) στην περιοχή του υποκινητή μεγέθους 1-kb για: το Ets, την activator protein 1 (Ap1 factor), αλληλουχίες απάντησης σε ορμονικά ερεθίσματα (hormone responsive elements – HRE), και για τον HIF [421]. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πλήρη επάρκεια της 1-kb upstream περιοχής για την ενεργοποίηση της μεταγραφής στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού και καθόρισαν πως η δραστηριότητα αυτή οφείλεται στον Ets και τη συνεργιστική του δράση με τη θέση σύνδεσης της activator protein 1 [421]. Έτσι, έχει βρεθεί πως η απώλεια της έκφρασης της maspin κατά την ογκογενετική διαδικασία και την αύξηση του όγκου οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην απουσία της συνεργασίας μεταξύ των παραγόντων Ets και Ap1 [1/M5]. Η HRE αλληλουχία είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής, ο οποίος δρα μέσω του υποδοχέα ανδρογόνων στον προστάτη [422]. Η μη επικουρική ανδρογονική ablation θεραπεία στον προστάτη και η αντι-οιστρογονική θεραπεία με ταμοξιφαίνη στο μαστό οδηγούν σε αύξηση της maspin σε κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων του προστάτη [423] και στην κυτταρική σειρά MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού [424], αντίστοιχα.

ii. Ο p53 και ο PTEN

Οι Ζου και συν βρήκαν πως υπάρχει μία θέση σύνδεσης για τον p53 στον υποκινητή της maspin και καθόρισαν έτσι την ύπαρξη σχέσης μεταξύ του p53, ενός upstream ογκοκατασταλέα και της downstream effector maspin [423]. Οι ερευνητές ανέδειξαν το γεγονός πως ο γνωστός ρόλος ως ογκοκαταστολέα του p53 στην κυτταρική διήθηση και μετάσταση στον καρκίνο είναι πιθανό να οφείλεται στην ικανότητά του να ρυθμίζει την έκφραση της maspin [423]. Οι διηθητικοί όγκοι, οι οποίοι εμφάνιζαν έλλειψη του p53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου, αδυνατούσαν να ρυθμίσουν την παραγωγή της maspin και ήταν πιο πιθανό να μετασταθούν σε δευτερογενείς εστίες.

Με την πρόοδο της σχετικής έρευνας, οι Eitel και συν πρότειναν πρόσφατα έναν ακόμη μηχανισμό ρύθμισης του γονιδίου της maspin [425]. Καθώς ήταν ήδη γνωστό, όπως αναφέραμε πως ο p53 διεγείρει (upregulate) την έκφραση της maspin κάτω από συνθήκες τοξικές για το γονιδίωμα, δεν ήταν όμως ακόμη γνωστό πώς ο p53 συνεργάζεται με άλλους παράγοντες για τη ρύθμιση της maspin κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Έτσι, οι Eitel και συν, για πρώτη φορά, έδειξαν πως ο PTEN και ο p53 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο στον πυρήνα, το οποίο οδηγεί σε μία εξεσημασμένη έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου maspin, υπό συνθήκες υποξίας. Η μελέτη αυτή διενεργήθηκε στα γλοιοβλαστώματα. Τα περισσότερα γλοιοβλαστώματα δεν

εκφράζουν το γονίδιο της maspin. Ωστόσο, οι ερευνητές παρατήρησαν πως μία από τις κυτταρικές σειρές από τον όγκο, η σειρά SF767 εξέφραζε το γονίδιο της maspin και η σειρά αυτή είχε το χαρακτηριστικό πως ήταν η μόνη στην οποία υπήρχαν στον άγριο (μη μεταλλαγμένο) τύπο τόσο ο p53 όσο και ο PTEN. Ακολουθώντας αυτή την παρατήρηση, οδήγησαν σε επανενεργοποίηση του PTEN σε άλλες κυτταρικές σειρές, στις οποίες το PTEN απουσίαζε (PTEN loss) και εξέτασαν έπειτα την έκφραση της maspin. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η maspin επανεκφραζόταν υπό συνθήκες υποξίας. Εν συνεχεία, διερευνήθηκε περαιτέρω το πώς ο PTEN συνεργάζεται με τον p53 στη ρύθμιση του γονιδίου της maspin [410].

Η παραπάνω ανακάλυψη έχει και θα έχει πιθανώς στο μέλλον πολύ σημαντικές επιπτώσεις στη θεραπευτική του καρκίνου. Ο PTEN και/ή ο p53 χάνονται ή μεταλλάσσονται αντίστοιχα σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του προστάτη και του εγκεφάλου. Οι απώλειες αυτές έχουν σαν συνέπεια την απώλεια της έκφρασης της maspin, η οποία με τη σειρά της ευθύνεται, σε κάποιο τουλάχιστον βαθμό, για την ανθεκτικότητα των όγκων στη χημειοθεραπεία και άλλα ερεθίσματα που σχετίζονται με το σηματοδοτικό δρόμο του p53. Η αναγνώριση του PTEN ως ενός σημαντικού ρυθμιστή της maspin προσφέρει ένα νέο στόχο για την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της maspin και εξ' αυτού για τον έλεγχο της διήθησης των όγκων, της αγγειογένεσης και

της μετάστασης. Υπό αυτό το πρίσμα, η προσπάθεια συνδυασμένης ενεργοποίησης του p53 και του PTEN θα μπορούσε να αποτελέσει σοβαρή δυνατότητα στη θεραπεία του καρκίνου του εγκεφάλου αλλά και άλλων κακοηθειών [426].

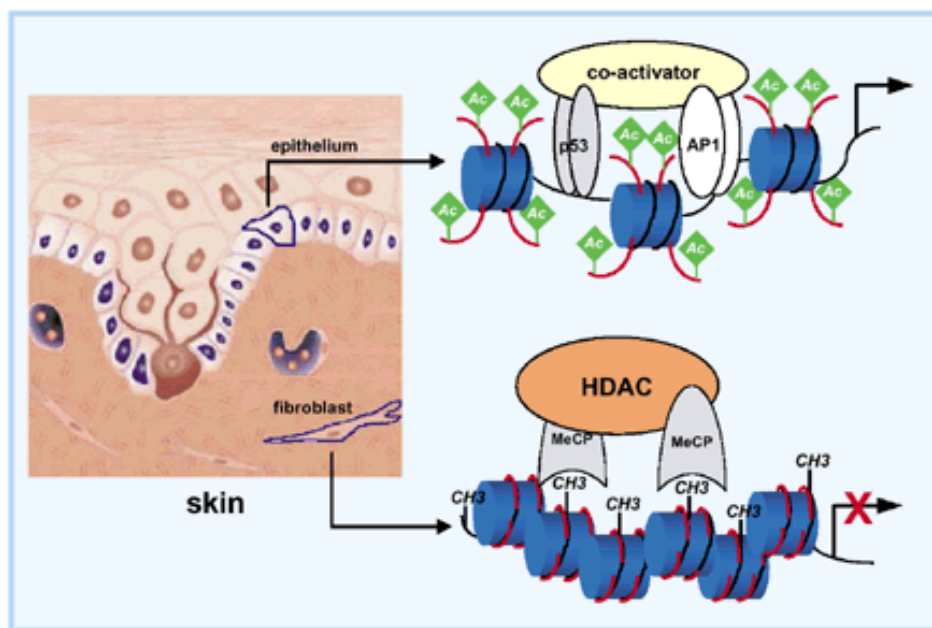
iii. Ο NFκB σηματοδοτικός δρόμος και η IKKα κινάση

Μία άλλη σημαντική ανακάλυψη σχετικά με την έκφραση του γονιδίου της maspin έγινε από το «Karin laboratory» σε μελέτη για τον καρκίνο του προστάτη. Οι ερευνητές βρήκαν πως η έκφραση του γονιδίου της maspin οδηγούνταν σε καταστολή από την IκB κινάση α (IKKα) [427], με τρόπο παρόμοιο με τον οποίο οι ορμονικοί υποδοχείς έχει βρεθεί να ελέγχουν την έκφραση της maspin. Οι Luo και συν έδειξαν πως η ενεργοποίηση του NFκB σηματοδοτικού μονοπατιού πυροδοτούσε τη φωσφορυλίωση της IKKα κινάσης. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγούσε με τη σειρά της στην εντόπιση της IKKα εντός του πυρήνα, όπου η IKKα αλληλεπιδρούσε με τον υποκινητή της maspin και οδηγούσε σε παροδική καταστολή της έκφρασης της maspin [427].

iv. Ο TGF-β

Έχει βρεθεί πως η το γονίδιο της maspin αποτελεί γονίδιο-στόχο και για τον Transforming Growth Factor β (TGF-β). Ο TGF-β διεγείρει (up-regulate) την έκφραση της maspin τόσο σε επίπεδο RNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης [428]. Η διέγερση αυτή

απαιτεί τη λειτουργία των Smad2/3 καθώς και άθικτων των αλληλουχιών σύνδεσης του p53 στον υποκινητή της maspin. Με τις μεθόδους DNA affinity immunoblot και ανοσοκαθήλωση χρωματίνης αποκαλύφθηκε η παρουσία τόσο των Smads όσο και του p53 στον υποκινητή της maspin, φανερώνοντας πως οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες και οι δύο ογκοκατασταλτικοί δρόμοι, που οι παράγοντες αυτοί αντιπροσωπεύουν, συνεργάζονται για τη διέγερση της μεταγραφής της maspin [428].



Εικόνα 35: Ρύθμιση του γονιδίου της maspin, όπου φαίνεται η δράση του p53 στον υποκινητή του γονιδίου (επάνω μέρος) και η δράση της αποακετυλάσης ιστονών (histone deacetylase – HDAC) (κάτω μέρος). Από: [429].

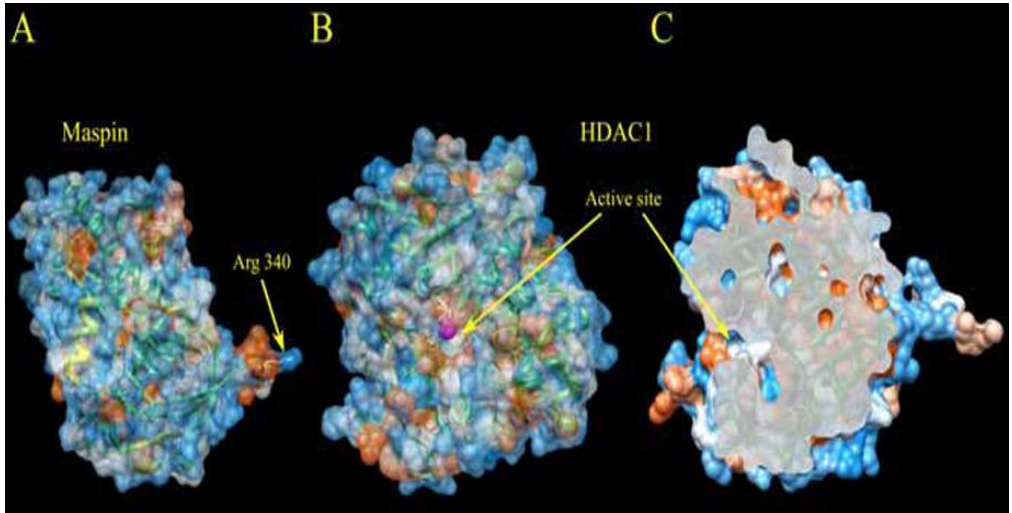
Συμπερασματικά, είναι πράγματι εντυπωσιακό το γεγονός πως, όπως έχει βρεθεί από τις ως τώρα έρευνες για τη ρύθμιση της έκφρασης του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *maspin*, συνεργάζονται δύο ακόμη ογκοκατασταλτικά γονίδια, του PTEN και του p53, ενώ συμμετέχει μαζί με αυτά και ένας αυξητικός παράγοντας ο TGF-β με σαφή ογκοκατασταλτικό ρόλο. Πρόκειται δηλαδή για τη συνεργασία τριών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (*maspin* – PTEN – p53) και τεσσάρων ογκοκατασταλτικών μονοπατιών (*maspin* – PTEN – p53 – TGF-β).

II-5.2.2 Επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης του γονιδίου της *maspin*

Ως σήμερα έχει επαρκώς τεκμηριωθεί πως η *maspin* ρυθμίζεται επιγενετικά και ακόμη πως η ιστο-ειδική της έκφραση (tissue-specific expression) σχετίζεται στενά με τη μεθυλίωση του DNA [430]. Επιγενετικές αλλαγές στην έκφραση της *maspin* εμφανίζονται στην 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου της *maspin* και περιλαμβάνουν (α') τη μεθυλίωση της κυτοσίνης (cytosine methylation), (β') την αποακετυλίωση ιστονών (histone deacetylation), η οποία λαμβάνει χώρα από το ένζυμο αποακετυλάση ιστονών και ειδικά από το ισοένζυμο αποακετυλάση ιστονών 1 (histone deacetylase 1 – HDAC1) (βλ. Εικόνες 35 & 36) και (γ') την προσβασιμότητα της χρωματίνης (chromatin accessibility) [431]. Η μεθυλίωση του DNA και η μεθυλίωση και/ή αποακετυλίωση της λυσίνης των ιστονών αποτελούν σταθερές τροποποιήσεις της χρωματίνης που καθορίζονται από επιγενετικά προγράμματα. Η απορρύθμιση των επιγενετικών διαδικασιών

συμμετέχει στην ογκογένεση μέσω απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η συσχέτιση της υπερμεθυλίωσης του υποκινητή και της «γονιδιακής σιωπής» (gene silencing) αποτελεί καλά τεκμηριωμένη ογκογενετική διαδικασία στον καρκίνο [432]. Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της *maspin* οδηγεί στη «γονιδιακή σιωπή» σε πολλούς καρκίνους, όπως του μαστού, του θυρεοειδή, του δέρματος και του παχέος εντέρου [433-435].

Είναι αξιοσημείωτο πως στους διάφορους ιστούς του σώματος η πλειοψηφία των CpG islands είναι μεθυλιωμένα και τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν σχεδόν ολική υπομεθυλίωση του DNA συγκρινόμενα με τα κύτταρα από τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς [436]. Η υπομεθυλίωση σχετίζεται γενικά με την πρόοδο από την προκαρκινική κατάσταση σε μία πλήρως ανεπτυγμένη κακοήθεια [437] και οδηγεί στην ενεργοποίηση γονιδίων απαραίτητων για την ανάπτυξη του καρκίνου. Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως η υπερέκφραση της *maspin* στον καρκίνο του στομάχου, του παγκρέατος και των ωθηκών αποτελεί συνέπεια της απομεθυλίωσης του υποκινητή CpG [431,438,439]. Τα παραπάνω αποδεικνύουν πως τόσο η μεθυλίωση όσο και η απομεθυλίωση του υποκινητή της *maspin* συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της *maspin*.



Εικόνα 36: Τρισδιάστατη περιγραφή του πιθανού τρόπου μοριακής αλληλεπίδρασης της *maspin* με τη *HDAC1*. Α. Κρυσταλλική δομή της *maspin*. Φαίνεται η Arg-340. Β. Μοντέλο της δομής της *HDAC1*. Σημειώνεται με βέλη η καταλυτική περιοχή, ενώ το ιόν Zn^{2+} φαίνεται ως σφαίρα με χρώμα magenta. Γ. Τομή της μοριακής επιφάνειας της *HDAC1*, όπου σημειώνεται η θέση πρόσβασης της *maspin* στην καταλυτική περιοχή του ενζύμου. Από: [440].

Ο «κώδικας ιστονών» (histone code), ο οποίος περιλαμβάνει ένα συνδυασμό τροποποιήσεων όπως η ακετυλίωση, η μεθυλίωση και η ubiquitination, υπαγορεύει τη δομή και τη λειτουργία της χρωματίνης κατά τις διαδικασίες της ανάπτυξης, της αύξησης, της διαφοροποίησης και της ομοιόστασης των κυττάρων [441]. Η θεραπεία κυτταρικών σειρών με κύτταρα από καρκίνο του μαστού και καρκίνο της ουροδόχου κύστης, τα οποία ήταν ελλιπή σε *maspin* (*maspin-deficient*), με το φάρμακο trichostatin A (ένας αναστολέας της αποακετυλάσης

των ιστονών) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της maspin στα καρκινικά κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών (μαστού και ουροδόχου κύστης) [442,443], οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η αποακετυλίωση του γονιδίου της maspin μπορεί να καταστέλλει την ενεργοποίησή του στους καρκίνους αυτούς.

Συμπερασματικά, το status της μεθυλίωσης (και/ή της αποακετυλίωσης ιστονών) τα του γονιδίου της maspin είναι ιστο-ειδικό. Έτσι, η επιγενετική ρύθμιση του ογκοκατασταλτή αυτού μπορεί να οδηγήσει είτε στην ενεργοποίησή του είτε στη «γονιδιακή σιωπή». Οι ακριβείς, όμως, μηχανισμοί που καθορίζουν την ιστο-ειδική μεθυλίωση της maspin παραμένουν άγνωστοι. Ωστόσο, καθώς τόσο η μεθυλίωση του DNA όσο και η αποακετυλίωση ιστονών αποτελούν αντιστρεπτές βιολογικές τροποποιήσεις, αποτελούν ταυτόχρονα και νέους στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου γενικά και για τη στοχευμένη επανενεργοποίηση της maspin σε συγκεκριμένους ιστούς [444].

II-5.3 Λειτουργίες της maspin

II-5.3.1 Εισαγωγή – ογκοκατασταλτικός ρόλος

Η maspin ως μέλος της οικογένειας των serpins έχει βρεθεί πως είναι μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, η οποία αρχικά εντοπίστηκε στα φυσιολογικά επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού, αλλά όχι και στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού [409]. Η maspin έχει εντοπιστεί και στα επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα πολλών

ακόμη ιστών [445]. Βάσει της διαφορετικής παρουσίας της maspin μεταξύ φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων και καρκινικών κυττάρων του μαστού, προτάθηκε ο ογκοκατασταλτικός της ρόλος [409,446]. Φαίνεται πως η επανεμφάνιση της maspin στα καρκινικά κύτταρα συμβάλλει στην αναστολή του όγκου, της κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης και της αγγειογένεσης, ενώ αυξάνει την κυτταρική προσκόλληση. Όλα αυτά αποτελούν συνιστώσες της δράσης ενός ογκοκαταστολέα. Πολλαπλές κλινικές μελέτες έχουν δείξει την απώλεια της maspin σε αρκετούς καρκίνους, κυρίως όμως στο μαστό και στον προστάτη και έχουν αποδείξει πως η επανέναρξη της έκφρασης της maspin συνεισφέρει σε καλή πρόγνωση [447].

II-5.3.2 Αλληλεπίδραση της maspin με ποικίλες εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια πρωτεΐνες

Παρά τις πολλές μελέτες που συσχετίζουν τη maspin με την καταστολή των όγκων, η φυσιολογική της λειτουργία παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστη. Αρχικά, είχε θεωρηθεί πως η maspin δρα εκτός του κυττάρου ρυθμίζοντας την προσκόλληση του κυττάρου στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τον κεντρικό ενεργό της βρόχο [410]. Για παράδειγμα, η επώαση καρκινικών κυττάρων μαστού ή προστάτη με ανασυνδυασμένη maspin ή η μεταφορά του cDNA της maspin οδηγεί σε αναστολή της διήθησης και της κινητικότητας [418] και yeast two-hybrid αναλύσεις έχουν δείξει πως η maspin συνδέεται με το κολλαγόνο τύπου I και III [448].

Επίσης, βρέθηκε πως η έλλειψη maspin οδηγεί σε θάνατο έμβρυα επιμυών λόγω της αδυναμίας σύζευξης της laminin [449], ενώ η maspin αυξάνει την προσκόλληση καλλιεργημένων κυττάρων του κερατοειδούς χιτώνα στην fibronectin, στο κολλαγόνο τύπου I και IV και στη laminin [450]. Ακόμη, έχει υποτεθεί πως η maspin μπορεί να τροποποιεί την προσκόλληση του κυττάρου στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία μέσω αλληλεπίδρασής της με τη β1-ιντεγκρίνη [451]. Οι Seftor και συν [452] αναφέρουν πως η maspin μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση ιντεγκρινών, μεταβάλλοντας έτσι το προφίλ ιντεγκρινών των καρκινικών κυττάρων, με προφανή επίδραση στο διηθητικό φαινότυπό τους. Αν και η maspin έχει δομικά χαρακτηριστικά τα οποία δείχνουν πως είναι μη-ανασταλτική serpin, έχει αναφερθεί πως αναστέλλει το εξωκυττάριο urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor σύστημα, αν και τα δεδομένα είναι αντιφατικά [453-455].

Πιο πρόσφατα, έχουν αναφερθεί και ενδοκυττάριας λειτουργίες της maspin. Αναφέρεται πως η ικανότητά της να επιδρά στην αλληλεπίδραση κυττάρου – εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ασκείται μέσω σηματοδότησης διά των Rac και Cdc42 [456,457]. Επίσης, φαίνεται να παίζει ρόλο στις απαντήσεις του κυττάρου στα σήματα stress.

Εδώ, πρέπει να σημειωθεί, πως τα δεδομένα της βιβλιογραφίας σχετικά με την εντόπιση της maspin στο κύτταρο και ως συνέπεια αυτού και των λειτουργιών που αυτή επιτελεί είναι αντιφατικά. Έτσι, υπάρχουν

πρόσφατες αναφορές πως η δράση της maspin ασκείται μόνο στον πυρήνα, μέσω ρύθμισης γονιδίων. Αυτά, όμως, θα συζητηθούν εκτενέστερα στο Κεφ. «III-3 – Συζήτηση», αφού πρώτα έχουν εκτεθεί τα δικά μας ευρήματα.

II-5.3.3 Συμμετοχή της maspin σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες και συσχέτιση με την καρκινογένεση και εξέλιξη των όγκων

Πολλές *in vitro* μελέτες έχουν δείξει πως η ογκοκατασταλτική ιδιότητα της maspin αποτελεί ένα συνδυασμό αυξημένης κυτταρικής προσκόλλησης και απόπτωσης και μειωμένης κινητικότητας, αγγειογένεσης και περικυτταρικής πρωτεόλυσης [450,452,456,458-461]. Η επανέναρξη έκφρασης της maspin σε κύτταρα διηθητικού καρκινώματος επιδρά στην έκφραση πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, την αρχιτεκτονική του κυτταροσκελετού και την ανακύκλωση των πρωτεϊνών, οδηγώντας σε αυξημένη συχνότητα αυθόρμητης απόπτωσης, περισσότερο αναπτυγμένο κυτταροσκελετό, μειωμένη διηθητική ικανότητα και αλλοιωμένη λειτουργικότητα των πρωτεασών [462]. Η maspin είναι η μόνη προ-αποπτωτική serpin μεταξύ όλων των serpins που συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της απόπτωσης [463]. Η δράση αυτή λαμβάνει χώρα μέσω της επίδρασής της στο προαναφερθέν σύστημα του πλασμινογόνου [453-455,463-465]. Οι Blacque και συν [448] αναφέρουν πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ανασυνδυασμένης maspin και κάποιων κολλαγόνων μπορούν να συμβάλλουν στην κυτταρική προσκόλληση, την κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση. Οι Sharma και συν

σε μία πρόσφατη μελέτη [466] διαπίστωσαν την ύπαρξη σημαντικής θετικής συσχέτισης μεταξύ της απώλειας της έκφρασης της maspin και της κυτταρικής συσσώρευσης του VEGF-A, επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο της maspin στην αγγειογένεση. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με προηγούμενες μελέτες σε καρκίνους του στομάχου, του παχέος εντέρου και των ωθηκών, οι οποίες έδειξαν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της maspin και της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD) [467,468]. Η ίδια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της maspin και της MVD βρέθηκε επίσης από τους Wang και συν στο γαστρικό καρκίνο [469].

II-5.3.4 Παράγοντες ρύθμισης των λειτουργιών της maspin

Αν και οι αρχικές παρατηρήσεις θεωρούσαν και παρουσίαζαν ως δεδομένη τη συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση της έκφρασης της maspin και στην πρόοδο του καρκίνου, οι μελέτες των τελευταίων ετών έχουν αποκαλύψει πως η συσχέτιση αυτή είναι αρκετά πιο πολύπλοκη από ό,τι είχε αρχικά εκτιμηθεί. Οι παράγοντες που συνεισφέρουν στην πολυπλοκότητα αυτή, χωρίς να είναι και οι μόνοι, είναι: το γενετικό υπόβαθρο, ο τύπος του καρκίνου, το όργανο στο οποίο εμφανίστηκε η πρωτοπαθής κακοήθεια, η έκφραση της maspin (ή η έλλειψή της) στο φυσιολογικό ιστό του οργάνου προέλευσης του όγκου, η ενδοκυττάρια/υποκυτταρική εντόπιση/κατανομή της maspin και η χρήση κυτταροτοξικών φαρμάκων για τη θεραπεία της εκάστοτε κακοήθειας [444].

II-5.4 Η maspin στους διάφορους τύπους καρκίνου, στον καρκίνο του μαστού και η ενδοκυττάρια κατανομή της

Από την ανακάλυψη του γονιδίου της maspin, πολύ μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων μελετών σε ανθρώπους έχει αναδείξει πως η έκφραση της maspin αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα για καλύτερη πρόγνωση σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Ωστόσο, σε άλλες κακοήθεις νόσους, η έκφραση της maspin βρίσκεται αυξημένη στα κακοήθη κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα του οργάνου προέλευσης και έτσι αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα για χειρότερη πρόγνωση. Τα αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία, δηλαδή, είναι αντιφατικά.

Όσον αφορά στο ρόλο της maspin στον καρκίνο του μαστού και στην επίδρασή της στην πρόγνωση της νόσου, τα αποτελέσματα από την υπάρχουσα βιβλιογραφία είναι, επίσης, απολύτως αντιφατικά. Έτσι, τα κλινικά δεδομένα, τα οποία συσχετίζουν τη maspin με καλύτερη πρόγνωση σε κάποιες μελέτες και με πτωχότερη πρόγνωση σε άλλες, έχουν σημαντικά μετριάσει τον αρχικό ενθουσιασμό που επικρατούσε σχετικά με τη δυνατότητα χρήσης της maspin ως δείκτη (biomarker) για την εξέλιξη της νόσου [470]. Το αποτέλεσμα είναι πως, έως σήμερα, ο ακριβής ρόλος της maspin, τόσο στον καρκίνο γενικά όσο και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα, παραμένει συγκεχυμένος και όχι πλήρως διευκρινισμένος και υπάρχει ανάγκη διασαφήνισής του στο μέλλον.

Ένα άλλο σημείο, το οποίο παραμένει αδιευκρίνιστο και πιθανώς να σχετίζεται σοβαρά με τα αντιφατικά αποτελέσματα της βιβλιογραφίας σχετικά με το ρόλο της maspin στον καρκίνο του μαστού, είναι η ενδοκυττάρια-υποκυτταρική της κατανομή-εντόπιση και οι επακόλουθες βιολογικές και κλινικές συνέπειες. Το μείζον ζήτημα είναι πως η παρουσία της maspin σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα είναι πιθανώς ενδεικτική και διαφορετικών λειτουργιών [444], αν και η βιολογική σημασία του γεγονότος παραμένει ασαφής [466]. Κάποιες πρόσφατες μελέτες αναφέρουν πως οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της maspin συνδέονται μόνο με την παρουσία της εντός του πυρήνα του κυττάρου. Περισσότερα, όμως, για το ρόλο της maspin στον καρκίνο γενικά, στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα και για την υποκυτταρική-ενδοκυττάρια εντόπισή της θα εκτεθούν στο Κεφ. «III-3 – Συζήτηση», αφού έχουν πρώτα αναφερθεί τα σχετικά αποτελέσματα της δικής μας μελέτης.

II-6

Human Epidermal

Growth Factor-2

– HER2

II-6.1 Η οικογένεια των HER (erbB) υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs), οι συνδέτες (ligands) των μελών της και το downstream σηματοδοτικό μονοπάτι (signaling pathway)

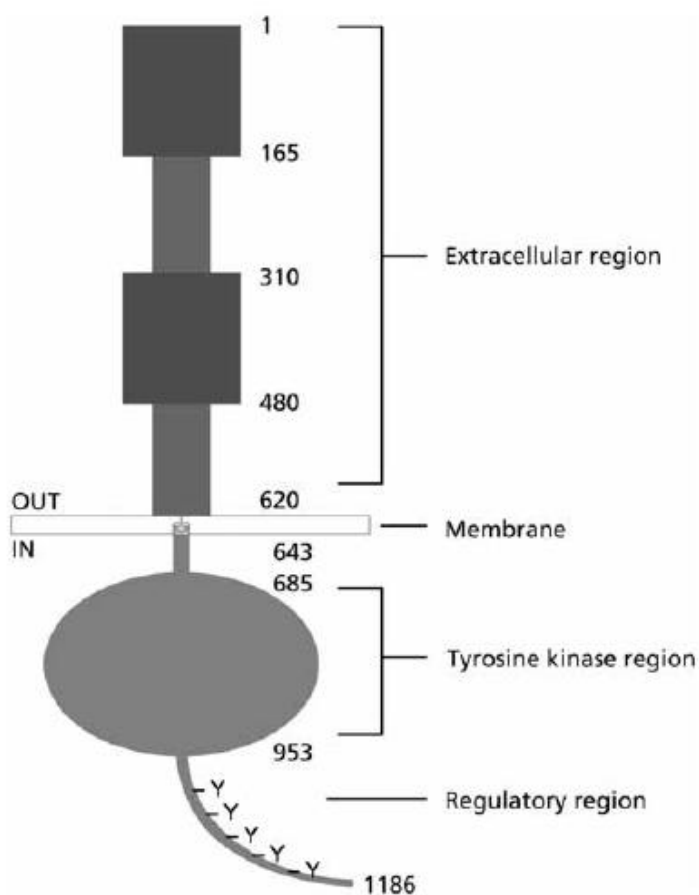
i. Η οικογένεια των HER (erbB) υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs)

Η ErbB οικογένεια πρωτεϊνών-υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs) αποτελείται από τέσσερα μέλη. Τον πλέον γνωστό HER2 (ή c-erbB2) και τον HER1, ο οποίος επίσης ονομάζεται ErbB1 και EGFR, τον HER3 (ErbB3) και τον HER4 (ErbB4). Οι ErbB RTKs είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες διαχωρίζονται σε ορισμένες διακριτές περιοχές [471] (βλ. Εικόνα 37). Και οι τέσσερις HER υποδοχείς (EGFR-HER1, HER2, HER3 και HER4) μοιράζονται ομόλογες εξωκυττάρια αλληλουχίες [472].

ii. Οι συνδέτες (ligands) των μελών της οικογένειας των HER υποδοχέων

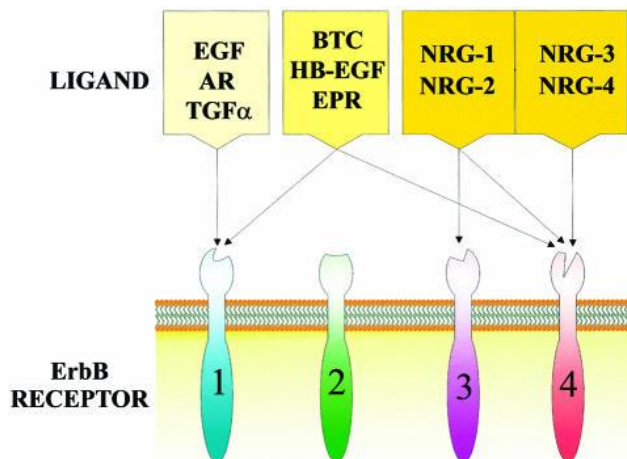
Τουλάχιστον 7 αυξητικοί παράγοντες έχουν εντοπιστεί ως ενεργοποιητικοί συνδέτες (ligands) για τους HER RTK υποδοχείς [473]. Οι αυξητικοί παράγοντες συνδέονται με τους HER RTK υποδοχείς και η σύνδεση αυτή οδηγεί σε ενεργοποίηση των υποδοχέων και διμερισμό τους. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται ομοδιμερή (δηλαδή διμερή που συνίστανται από τον ίδιο τύπο υποδοχέα) και ετεροδιμερή

(δηλαδή διμερή που συνίστανται από δύο διαφορετικούς HER RTK υποδοχείς, π.χ. το HER2/HER3 ετεροδιμερές) [473,474] (βλ. Εικόνα 39).



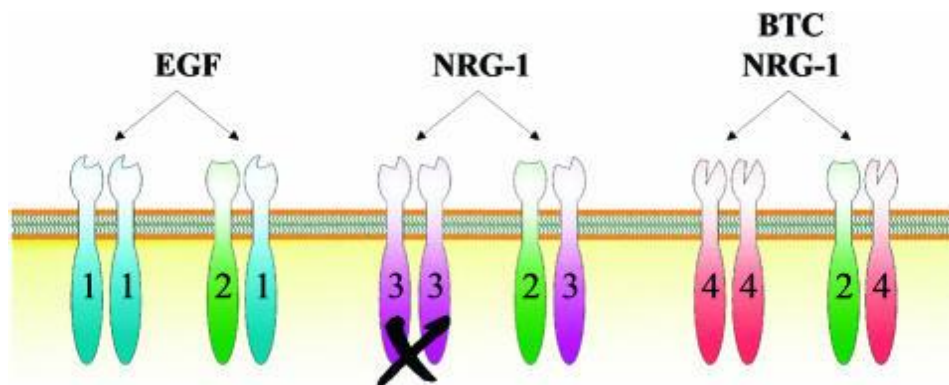
Εικόνα 37: Σχηματικό διάγραμμα της δομής ενός HER (ErbB) υποδοχέα. Οι αριθμοί που φαίνονται αφορούν στον αριθμό των αμινοξέων και είναι ειδικοί για τον HER1. Το γράμμα Y προσδιορίζει τυροσινικά κατάλοιπα στην ενδοκυττάρια ρυθμιστική περιοχή του υποδοχέα, τα οποία υφίστανται αντιστρεπτή φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση. Από: [471].

Με την εξαίρεση του HER3 υποδοχέα, ο οποίος δε διαθέτει ενδοκυττάρια δράση τυροσινικής κινάσης, ο σχηματισμός των διμερών προκαλεί μεγάλο συμπλησίωμα των ενδοκυτταρίων περιοχών με ιδιότητα τυροσινικής κινάσης των δύο συνδεδεμένων υποδοχέων, επιτρέποντας την cross-φωσφορυλίωση του ρυθμιστικού τυροσινικού καταλοίπου του κάθε υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του RTK υποδοχέα και τη φωσφορυλίωση από αυτόν τυροσινικών καταλοίπων άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Πρέπει να σημειωθεί πως κανένας συνδέτης δεν έχει εντοπιστεί ως σήμερα για τον HER2, δηλαδή ο HER2 είναι ένας «ορφανός υποδοχέας» (βλ. Εικόνα 38), αν και η μορφή της εξωκυττάριας περιοχής του HER2 χωρίς κάποιον συνδεδεμένο αυξητικό παράγοντα είναι όμοια με την «ενεργοποιημένη» μορφή των άλλων RTKs όταν έχουν συνδεθεί με αυξητικούς παράγοντες [475-477].



Εικόνα 38: Οι HER (ErbB) υποδοχείς και οι συνδέτες τους (EGF-related) αυξητικοί παράγοντες. Φαίνεται πως οι αυξητικοί παράγοντες

συνδέονται με όλους τους HER υποδοχείς πλην του HER2 (ορφανός υποδοχέας – βλ. κείμενο). Από: [478].

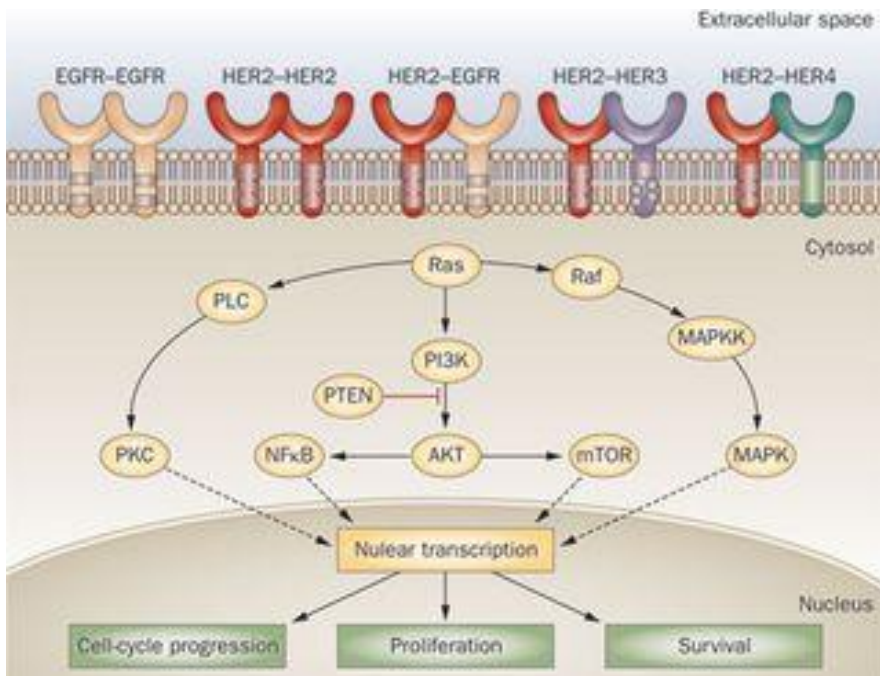


Εικόνα 39: Ετεροδιμερισμός των HER υποδοχέων. Φαίνεται πως ο HER2 αποτελεί τον προτιμητέο «σύντροφο» (*partner*) προς ετεροδιμερισμό και από τους τρεις άλλους υποδοχείς, γεγονός που αποδεικνύει και τη μεγάλη του κλινική σημασία. Από: [478].

iii. Το downstream σηματοδοτικό μονοπάτι των HER υποδοχέων

Η οικογένεια των HER υποδοχέων σχετίζεται με ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση, η διαφοροποίηση και η επιβίωση μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής σημάτων. Τυπικά, η σύνδεση ενός αυξητικού παράγοντα (συνδέτη) στον HER υποδοχέα οδηγεί στην έναρξη ενός πολύπλοκου καταρράκτη διαδοχικών γεγονότων (βλ. Εικόνα 40), τα οποία ξεκινούν από το διμερισμό του υποδοχέα (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) και συνεχίζουν με την

ενζυμική του φωσφορυλίωση. Ο φωσφορυλιωμένος υποδοχέας, εν συνεχεία, καταλύει τη φωσφορυλίωση της πρώτης από μια σειρά ενδοκυτταρίων πρωτεϊνών, οι οποίες δρουν ως σηματοδοτικοί ενδιάμεσοι παράγοντες. Πολλοί από τους σηματοδοτικούς αυτούς ενδιάμεσους παράγοντες διασπείρουν το σήμα μέσω ενζυματικής φωσφορυλίωσης ή αποφωσφορυλίωσης άλλων μορίων. Οι τελικοί στόχοι της διαδικασίας αυτής είναι ρυθμιστικά μόρια, όπως διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι τροποποιούνται ως απάντηση στο σήμα, έτσι ώστε να επιδράσουν στη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων [479].



Εικόνα 40: Ο διμερισμός των HER υποδοχέων και τα μετέπειτα σηματοδοτικά μονοπάτια. Από: [480].

II-6.2 Το HER2 (c-erbB2) – γονίδιο, πρωτεΐνη και συμμετοχή στον καρκίνο του μαστού

Η ανακάλυψη του Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2/neu ή c-erbB2) γονιδίου και κυρίως η επακόλουθη ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών έναντι της πρωτεΐνης που παράγεται από το γονίδιο αυτό μπορούν να θεωρηθούν ως ένα από τα σπουδαιότερα γεγονότα (αν όχι το σπουδαιότερο) των τελευταίων χρόνων στη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού και γενικότερα στη θεραπευτική του καρκίνου [481,482].

Το HER2 είναι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μέλος της οικογένειας των Epidermal Growth Factor Receptors – EGFR ή HER υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs), γνωστών αλλιώς και ως ErbB. Έτσι, άλλα ονόματα του HER2 είναι τα ErbB2 και neu. Το τελευταίο όνομα σχετίζεται με την αρχική απομόνωση του HER2 ογκογονιδίου από κύτταρα νευρογλοιοβλαστώματος (neuroglioblastoma – εξ' ου και το «neu») από επίμυς [483,484].

Το HER2 κωδικοποιείται από το HER2 (ErbB2) γονίδιο, το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21 [485]. Τυπικά, τα διπλοειδή υγιή επιθηλιακά κύτταρα του μαστού περιέχουν δύο αντίγραφα του HER2 γονιδίου, καθένα εκ των οποίων εδράζεται στο ένα από τα δύο αντίγραφα του χρωμοσώματος 17 [486]. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων φάσεων του κυτταρικού κύκλου, μέχρι 4 αντίγραφα του HER2 γονιδίου και πάνω από 2 αντίγραφα του χρωμοσώματος 17

μπορεί να υπάρχουν σε ένα φυσιολογικό κύτταρο [487]. Το HER2 είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο, δηλαδή είναι ένα φυσιολογικό κατά τα άλλα γονίδιο, το οποίο όμως έχει το δυναμικό να μετατραπεί σε ογκογονίδιο αν υποστεί μοριακές μεταβολές όπως μεταλλάξεις, ενίσχυση (amplification) του άγριου τύπου (wild-type) ή υπερέκφραση του πρωτεϊνικού παραγώγου του (της HER2 πρωτεΐνης) [488].

Η HER2 πρωτεΐνη είναι ένας τύπος διαμεμβρανικού υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (RTK), ο οποίος είναι σημαντικός στην έναρξη της σηματοδότησης μονοπατιών μεταγωγής σημάτων τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε παθολογικά κύτταρα. Συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής υπερπλασίας, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης [489]. Ο HER2 υποδοχέας παίζει σημαντικό συν-οργανωτικό ρόλο στο δίκτυο σχηματισμού διμερών από τους HER υποδοχείς, καθώς ο κάθε άλλος υποδοχέας που έχει ενεργοποιηθεί από ένα συγκεκριμένο συνδέτη φαίνεται να προτιμά τον HER2 ως το ζευγάρι του για τον ετεροδιμερισμό [490,491], λόγω της ιδιαίτερης «ανοιχτής» διαμόρφωσης του HER2. Είναι αξιοσημείωτο πως τα ετεροδιμερή τα οποία περιέχουν τον HER2 μπορούν να ενισχύσουν ιδιαίτερα τη σηματοδότηση, καθώς ο HER2 μειώνει τη συχνότητα απόσπασης του συνδέτη από τον υποδοχέα του. Το γεγονός αυτό επιτρέπει στα ετεροδιμερή αυτά να ενεργοποιούν πιο ισχυρά από τα άλλα τους downstream σηματοδοτικούς δρόμους [492,493] και τους δρόμους της phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) και των MAP κινασών (MAPK) [478]. Οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν τον HER2 έναν πολύ ελκυστικό θεραπευτικό στόχο και σημαίνουν, επίσης, πως μία HER2-στοχευμένη

θεραπεία θα στοχεύσει περισσότερα καρκινικά κύτταρα σε ένα δεδομένο ασθενή [494].

Η υπερέκφραση του HER2 σχετίζεται με ιδιαίτερα επιθετικές μορφές καρκίνου με χειρότερη πρόγνωση σε αρκετές κακοήθειες [495,496] και αποτελεί ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο στις κακοήθειες αυτές. Η ποσότητα της πρωτεΐνης HER2 που παράγεται στα καρκινικά κύτταρα είναι σημαντικά μεγαλύτερη από ό,τι συμβαίνει στα κύτταρα των φυσιολογικών ιστών [497]. Η υπερέκφραση του HER2 ανευρίσκεται τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στις μεταστατικές εστίες [498]. Από το γεγονός αυτό συνάγεται πως η HER2-στοχευμένη θεραπεία μπορεί να είναι αποτελεσματική σε όλες τις θέσεις της νόσου. Η ενίσχυση του γονιδίου του HER2 και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ανευρίσκονται σε υποομάδες αρκετών καρκίνων όπως του μαστού, του στομάχου, του οισοφάγου, του ενδομητρίου, της μήτρας, των ωθηκών και του πνεύμονα [499-504].

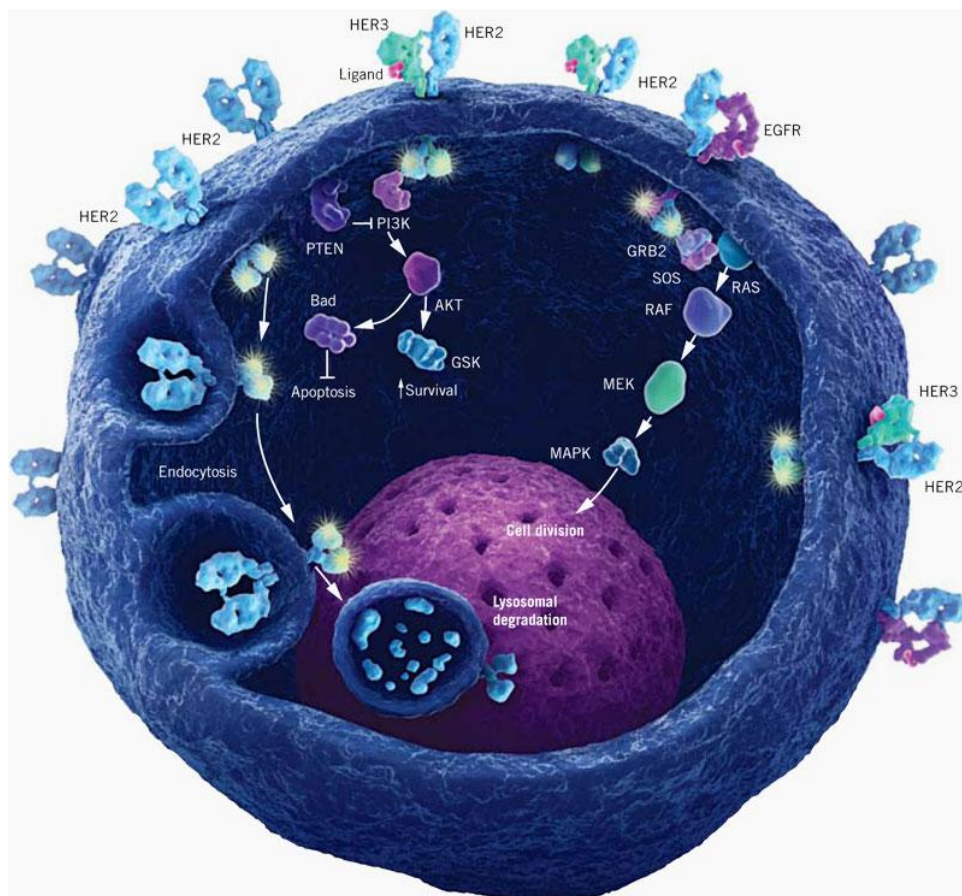
Η HER2 πρωτεΐνη υπερεκφράζεται και/ή το γονίδιο HER2 ενισχύεται σε ποσοστό 15-30% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου του μαστού και σχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο του όγκου [488,489,505]. Η υπερέκφραση του HER2 ή η γονιδιακή ενίσχυση στα δείγματα των όγκων έχουν θεωρηθεί ως δείκτες πτωχής πρόγνωσης για την ολική επιβίωση στον καρκίνο του μαστού [488].

II-6.3 Οι λειτουργίες του HER2

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υπερέκφραση και ενίσχυση της πρωτεΐνης και του γονιδίου του HER2 αντίστοιχα σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση. Οι ρόλοι αυτοί ασκούνται μέσω της διαδικασίας της ενδοκυττάριας μεταγωγής σημάτων (βλ. Εικόνα 41).

- i. Έτσι, οι downstream σηματοδοτικοί δρόμοι του HER2 περιλαμβάνουν τον PI3K/PTEN/AKT δρόμο και το δρόμο των MAPK [478], οι οποίοι αποτελούν δύο από τους πιο σημαντικούς σηματοδοτικούς δρόμους για την κυτταρική επιβίωση.
- ii. Πρέπει, ακόμη, να σημειωθεί πως η αύξηση (up-regulation) του HER2 σχετίζεται με αυξημένη έκφραση των VEGF-A και VEGF-C [494,505] (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφ. «III-3 – Συζήτηση – Εύρημα 4^ο»).
- iii. Επιπλέον, η υπερέκφραση του HER2 επιδρά στην αντίσταση των όγκων στην αντι-αγγειογενετική θεραπεία (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφ. «II-8.4») και στην ορμονοθεραπεία (για περισσότερες λεπτομέρειες βλ. Κεφ. «II-8.5»).

Συμπερασματικά, είναι προφανές γιατί ο HER2 αποτελεί ένα πολύ σημαντικό θεραπευτικό στόχο σε αρκετούς καρκίνους και ειδικά στον καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 41: Οι λειτουργίες του HER2. Από: [506].

II-6.4 Αντι-HER2 Θεραπείες

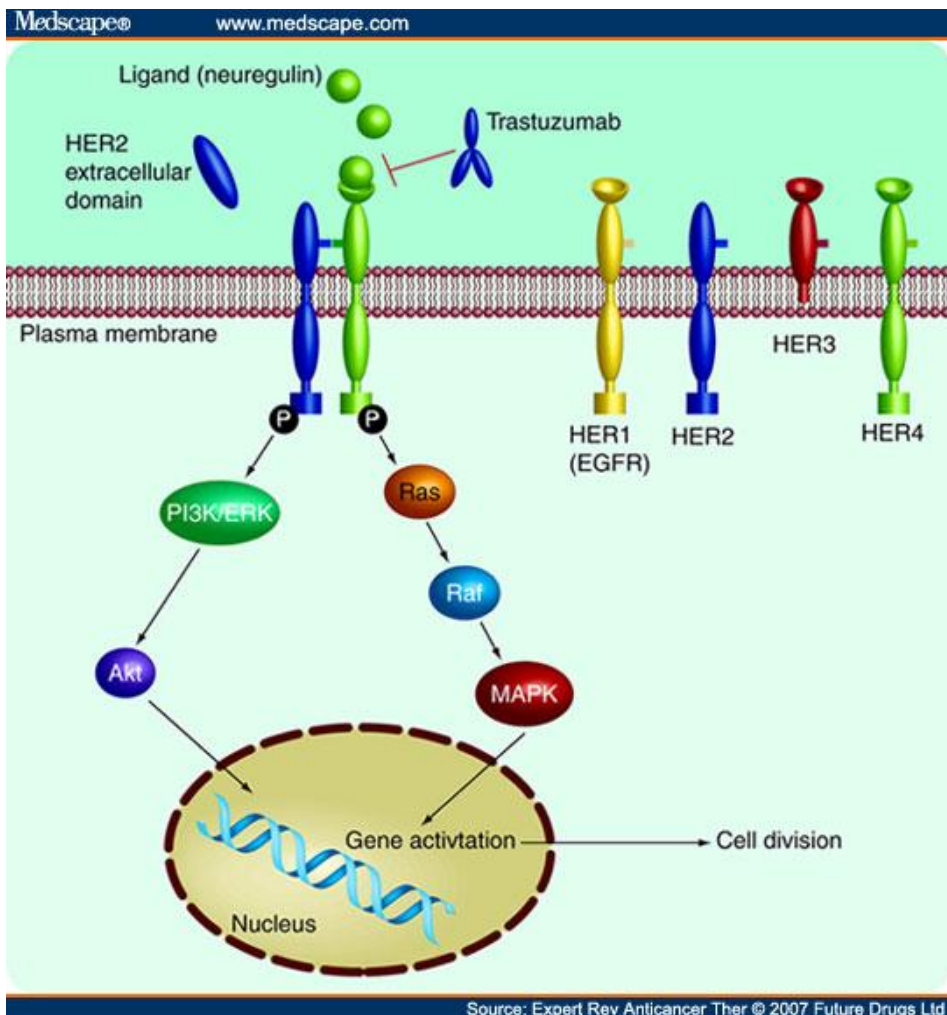
i. Trastuzumab

Το ανθρώπινο αντι-HER2 αντίσωμα trastuzumab (Herceptin) έλαβε την έγκριση του FDA το 1998 για χρήση στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού και έχει δείξει μεγάλο κλινικό όφελος, όταν συνδυάζεται με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία τόσο ως θεραπεία πρώτης γραμμής όσο

και ως επικουρική θεραπεία [507,508]. Το trastuzumab ήταν το πρώτο ανασυνδυασμένο διδύναμο ανθρώπινο αντίσωμα έναντι εξωκυτταρίων δομών του HER2, το οποίο παρεμπόδιζε και το ενδοκυττάριο σήμα. Βρέθηκε πως αναστέλλει τα καρκινικά κύτταρα που υπερκεφράζουν το HER2 τόσο in vitro όσο και in vivo (βλ. Εικόνα 42).

Το trastuzumab βελτίωσε σημαντικά την κλινική έκβαση των επιθετικών όγκων που υπερκεφράζουν το HER2 [388]. Οι ασθενείς με HER2(+) καρκίνο του μαστού είχαν στο παρελθόν, συνήθως, χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με αυτές τις ασθενείς που ήταν HER2(-). Αυτό άλλαξε στις ημέρες μας με τη χρήση του trastuzumab και οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού που υπερκεφράζει το HER2, οι οποίες λαμβάνουν το trastuzumab, εμφανίζουν πλέον καλύτερη πρόγνωση από τις ασθενείς με HER2(-) νόσο [509].

Όσον αφορά στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της δράσης του, το trastuzumab φαίνεται να έχει την ικανότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να μειώνει τον αριθμό των ki-67 θετικών κυττάρων [510]. Το trastuzumab αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω αύξησης (up-regulation) του cyclin dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} και αύξησης του arrest του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο G1 [511-515]. Επιπλέον, το trastuzumab αυξάνει την αντι-ογκογενετική δράση της χημειοθεραπείας [508,516].



Εικόνα 42: Οι HER υποδοχείς και ο ρόλος του *Trastuzumab*. Από: [517].

Ακόμη, το *trastuzumab* βρέθηκε πως έχει τη δυνατότητα να μειώσει τη μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD) και το VEGF, μέσω του PI3K δρόμου [518-520], να αυξήσει τα επίπεδα των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων (π.χ. της θρομβοσπονδίνης-1) και να αναστείλει πρόσθετους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες όπως είναι ο TGF- α , η

αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1), και ο plasminogen-activator inhibitor-1 [518,519]. Με όλους τους παραπάνω τρόπους φαίνεται πως το trastuzumab συμβάλλει στην αναστολή της αγγειογένεσης [510]. (Βλ. και Κεφ. «II-4.8», «II-8.7 – iv» και «III-3 – Εύρημα 4^ο»).

Αξίζει, ωστόσο, να αναφερθεί πως άνω του 50% των καρκίνων του μαστού που υπερεκφράζουν το HER2 είναι πρωτογενώς ανθεκτικοί στο trastuzumab [521] (για τους μηχανισμούς βλ. Κεφ. «II-8.3»).

ii. Lapatinib

Το πρώτο φάρμακο που έλαβε την έγκριση του FDA για τις περιπτώσεις ανθεκτικού στο trastuzumab καρκίνου του μαστού ήταν το lapatinib. Το lapatinib είναι ένας από του στόματος μικρός αναστολέας των HER2 και HER1 (EGFR) υποδοχέων. Το lapatinib είναι δηλαδή ένας διπλός αναστολέας τυροσινικής κινάσης (TKI) δύο RTK υποδοχέων (των EGFR & HER2). Η μονοθεραπεία με lapatinib ή σε συνδυασμό με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες βρέθηκε αποτελεσματική σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού ανθεκτικό στο trastuzumab [63]. Έτσι, βρέθηκε πως το lapatinib είναι αποτελεσματικό τόσο στην υποομάδα των HER2(+) ασθενών που συνεκφράζουν το p95HER2 υπότυπο και εξ' αυτού είναι ανθεκτικές στο trastuzumab [522]. Επιπλέον, φάνηκε να είναι αποτελεσματικό και στην ομάδα των γυναικών με HER2(+) καρκίνο μαστού και εγκεφαλικές μεταστάσεις, οι οποίες εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο trastuzumab, δεδομένου του γεγονότος πως το trastuzumab δε διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αντίθετα, το lapatinib φαίνεται να παρουσιάζει κάποια – έστω και μέτρια –

αποτελεσματικότητα στις περιπτώσεις με εγκεφαλικές μεταστάσεις [523].

iii. Pertuzumab

Μια νέα προσέγγιση για την υπέρβαση της ανθεκτικότητας των όγκων στο trastuzumab είναι οι συνδυασμένες αγωγές με το pertuzumab. Το pertuzumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο συνδέεται με ένα διαφορετικό επίτοπο του HER2 από ό,τι το trastuzumab και μπλοκάρει τον ομο- και ετερο-διμερισμό του HER2 με τους άλλους υποδοχείς HER1, HER3 και HER4 [63,388]. Έτσι, το pertuzumab μπορεί να θεωρηθεί ένα παράδειγμα για μια νέα γενιά στοχευμένων θεραπειών, οι οποίες έχουν ως στόχο τους να εμποδίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αντί να αναστέλλουν τις καταλυτικές υπομονάδες τους ή να αυξάνουν την ανοσιακή απόκριση [63].

iv. Neratinib & Canertinib

Οι neratinib και canertinib είναι από του στόματος αναστολείς όλων των HER υποδοχέων. Είναι δηλαδή pan-HER αναστολείς τυροσινοκινάσης (TKI). Έχουν ήδη δοκιμαστεί και δοκιμάζονται σε αρκετές μελέτες με ασθενείς με καρκίνο του μαστού [524,525].

II-6.5 Συνδυασμοί αντι-HER2 θεραπειών με άλλες θεραπείες στον καρκίνο του μαστού

i. Συνδυασμοί του trastuzumab με άλλες θεραπείες

Το trastuzumab έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμούς με χημειοθεραπευτικά σκευάσματα ως ακολούθως: Trastuzumab μαζί με ανθρακυκλίνη και κυκλοφωσφαμίδη ή μόνο με πακλιταξέλη [526,527], trastuzumab μαζί με κυκλοφωσφαμίδη και επιρουβικίνη (μελέτη HERCULES) [528], trastuzumab σε συνδυασμό με δοσεταξέλη και καπεσιταμπίνη ή βινορελμπίνη [529].

Οι συνδυασμοί του trastuzumab με κυτταροτοξικούς παράγοντες έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού, αλλά η καρδιακή τοξικότητα έχει περιορίσει τους συνδυασμούς αυτούς [388]. Το trastuzumab έχει, επίσης, προστεθεί στο setting της επικουρικής (adjuvant) θεραπείας [488]. Επίσης, το trastuzumab έχει συνδυαστεί θεραπευτικά και με την ορμονοθεραπεία σε ασθενείς με HER2(+) διηθητικό καρκίνο του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς [488]. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το trastuzumab έχει αφήσει υποσχέσεις για τη θεραπευτική του καρκίνου του μαστού χορηγούμενο σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία εγκεφάλου whole brain σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και εγκεφαλικές μεταστάσεις [388].

ii. Συνδυασμοί του lapatinib με άλλες θεραπείες

Το Lapatinib Expanded Access Program (LEAP) σχεδιάστηκε για να δώσει πρόσβαση στη θεραπεία με το lapatinib σε συνδυασμό με καπεσιταμπίνη σε ασθενείς πάσχουσες από HER2(+) μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι οποίες είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία με ανθρακυκλίνη, ταξάνη και trastuzumab και δεν είχαν πλέον άλλη θεραπευτική επιλογή [530]. Σε άλλες πρόσφατες μελέτες, το lapatinib έχει συνδυαστεί με καπεσιταμπίνη σε ασθενείς με προοδευτικά εξελισσόμενη νόσο του ΚΝΣ (εγκεφαλικές μεταστάσεις) [523,531].

Ως παρηγορητική θεραπεία πρώτης γραμμής, οι συνδυασμοί του lapatinib είτε με λετροζόλη είτε με πακλιταξέλη οδήγησαν σε αύξηση του ελεύθερου χρόνου ως την πρόοδο της νόσου (PFS) και του κλινικού οφέλους, σε σχέση με την ορμονοθεραπεία ή τη χημειοθεραπεία από μόνες τους [532,533].

Στο setting της νεο-επικουρικής (neo-adjuvant) θεραπείας, ο συνδυασμός του lapatinib με την πακλιταξέλη ήταν αποτελεσματικός έναντι του HER2(+) φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού [534].

Επίσης, είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός πως ο συνδυασμός του lapatinib με το trastuzumab σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού ανθεκτικό στο trastuzumab βρέθηκε να αυξάνει τον PFS και το κλινικό όφελος σε σχέση με τη μονοθεραπεία με το lapatinib [535].

Τέλος, έχει εξετασθεί και ο συνδυασμός του lapatinib με το bevacizumab για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζει το HER2 [536]. Η μελέτη αυτή έδειξε πως ο συνδυασμός μπορεί να είναι

πιο δραστικός από τη μονοθεραπεία είτε με το lapatinib είτε με το bevacizumab στις ασθενείς αυτές και θα μπορούσε, έτσι, να αποτελεί μια καλή εναλλακτική μη-χημειοθεραπευτική λύση για κάποιες ασθενείς.

II-7

Οι υποδοχείς οιστρογόνων

(*Estrogen Receptors – ER*)

και προγεστερόνης

(*Progesterone Receptors – ER*)

στον καρκίνο του μαστού

Εισαγωγή

Η σημασία των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στη βιολογία του καρκίνου του μαστού έγινε αντιληπτή πριν από περισσότερα από 40 χρόνια, όταν παρατηρήθηκε πως ραδιο-σημασμένα οιστρογόνα συγκεντρώνονταν επιλεκτικά στα όργανα-στόχους των οιστρογόνων στα θηλαστικά καθώς και στις κακοήθεις βλάβες του μαστού στον άνθρωπο. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στη θεωρία της ύπαρξης ενός υποδοχέα για τα οιστρογόνα (Estrogen Receptor – ER). Από τότε, έγινε σταδιακά ξεκάθαρο πως ο καρκίνος του μαστού είναι εξαρτημένος από τα οιστρογόνα και/ή την προγεστερόνη για την ανάπτυξή του και η δράση αυτή διαμεσολαβείται από τους ERs και προγεστερονικούς υποδοχείς (PRs). Όπως είναι αναμενόμενο, τόσο οι PR όσο και οι ER βρίσκονται υπερεκφρασμένοι στις κακοήθεις νόσους του μαστού.

Τα αυξανόμενα δεδομένα όσον αφορά στη βιολογία των ορμονικών υποδοχέων και ο αυξανόμενος αριθμός πρωτεϊνών, οι οποίες είναι σε θέση να επιδράσουν στη λειτουργία των υποδοχέων οδήγησε στην ανακάλυψη νέων θεραπειών για τον καρκίνο του μαστού. Ως τέτοιο παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί μία ομάδα φαρμάκων, που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς και ονομάζονται Selective Estrogen Receptors Modulators (SERMS) (π.χ. η ταμοξιφαίνη, η ραλοξιφαίνη κλπ) και τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αλλά και την πρόληψη του καρκίνου του μαστού.

Οι οιστρογονικοί και προγεστερονικοί υποδοχείς και η κλινική τους σημασία

Τόσο οι ER όσο και οι PR αποτελούν μέλη της υπερικογενείας των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει ακόμη τους υποδοχείς και των υπόλοιπων στεροειδών ορμονών (γονάδων και επινεφριδίων), τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος, τους υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών και τους υποδοχείς της βιταμίνης D. Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων και δρουν ως εξαρτώμενοι από το συνδέτη (ligand) μεταγραφικοί παράγοντες. Η σύνδεση μιας λιποδιαλυτής πρωτεΐνης στην ligand-binding αλληλουχία του υποδοχέα, οδηγεί σε αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης του υποδοχέα και στη μενάστευση του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα στον πυρήνα. Στον πυρήνα, οι ορμονικοί υποδοχείς μπορούν να συνδεθούν στις ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (hormone responsive elements – HRE), οι οποίες εδράζονται κοντά στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις φυσιολογικές λειτουργίες της ορμόνης. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν τη μεταγραφή του messenger RNA και του ριβοσωμικού RNA καθώς και την επακόλουθη πρωτεϊνοσύνθεση. Δύο ισομορφές των ER έχουν βρεθεί: οι ERα και οι ERβ. Παρά τις πολλές τους ομοιότητες, οι μεταγραφικές τους ιδιότητες είναι διαφορετικές.

Η κλινική σημασία των ορμονικών υποδοχέων είναι τεράστια , καθώς από αυτούς εξαρτάται η απάντηση του όγκου στην ορμονοθεραπεία, η οποία αποτελεί μία εξαιρετικά σημαντική παράμετρο στην

αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Το status των ορμονικών υποδοχέων μας προσφέρει σημαντικές προβλεπτικές (predictive) – όσον αφορά στην ανταπόκριση της νόσου στην ορμονοθεραπεία – και προγνωστικές (prognostic) – όσον αφορά στην επιθετικότητα του όγκου και τις προοπτικές ίασης, πληροφορίες.

Η ειδικότερη συνεισφορά των προγεστερονικών υποδοχέων (PR)

Το PR status χρησιμεύει για τον περαιτέρω καθορισμό της πιθανότητας απάντησης του όγκου στην ορμονοθεραπεία. Όταν συγκρίνονται όγκοι ER+/PR- με όγκους ER+/PR+ (ειδικά αν οι τελευταίοι είναι ισχυρά PR+), οι ER+/PR+ εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερο δείκτη ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία σε σχέση με τους ER+/PR- όγκους, στις ασθενείς με μεταστατική νόσο [537-539] και πιθανώς πιο παρατεταμένη επιβίωση στις ασθενείς που λαμβάνουν την ορμονοθεραπεία ως adjuvant αγωγή [540-545].

Η προβλεπτική αξία του PR status έχει από ετών αποδοθεί στην εξάρτηση της έκφρασης των PR από τη δράση των ER. Καθώς η σύνθεση των PR ρυθμίζεται θετικά από τους ER, η απουσία των PR είχε υποτεθεί πως αποτελεί δείκτη ενός μη λειτουργικού ER σηματοδοτικού δρόμου. Ωστόσο, νεότερες πληροφορίες προτείνουν την άποψη πως μπορεί να υπάρχουν επιπρόσθετοι μηχανισμοί. Εργαστηριακά και κλινικά δεδομένα αποκαλύπτουν πως οι ER+/PR- όγκοι είναι ανθεκτικοί ειδικά στους SERMS και πολύ λιγότερο ανθεκτικοί στους αναστολείς της

αρωματάσης, ένα εύρημα το οποίο δεν είναι πλήρως κατανοητό από τη θεωρία των μη λειτουργικών ER [541,546,547]. Αυξανόμενα δεδομένα δείχνουν πως η έλλειψη έκφρασης των PR σε ER+ όγκους μπορεί να αποτελεί ευαίσθητο δείκτη υπερδραστηριότητας σηματοδοτικών δρόμων από αυξητικούς παράγοντες, η οποία οδηγεί σε down-regulation τους PR και συμβάλλει στην αντίσταση στην ταμοξιφαίνη. Για περισσότερους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς σχετικά με την αντίσταση στην ορμονοθεραπεία, βλ. Κεφ. «II-8.5 – Αντίσταση στην Ορμονοθεραπεία».

11-8

**Συνοπτική αναφορά
στις συνομιλίες (*cross-talks*)
μεταξύ βασικών μοριακών δρόμων
και στην αντίσταση των όγκων
στις θεραπείες
(κλασικές & στοχευμένες)
λόγω των *cross-talks*,
στον καρκίνο του μαστού**

II-8.1 Εισαγωγή

Η μεταγωγή των σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου και οι διαδικασίες που διαμεσολαβούνται από εκεί και στο εξής δημιουργούν μια τεράστια ποικιλία κυτταρικών ρυθμίσεων, η οποία και είναι υπεύθυνη για τη δυνατότητα που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα να ξεπερνούν την επίδραση των αντικαρκινικών θεραπειών ή να εμφανίζουν προοδευτικά αντίσταση σε αυτές.

Συνοπτικά, τα παραπάνω λαμβάνουν χώρα ως εξής:

Οι αυξητικοί παράγοντες ασκούν τις δράσεις τους στον κυτταρικό μεταβολισμό και τη γονιδιακή έκφραση μέσω των ειδικών υποδοχέων τους, που βρίσκονται στη μεμβράνη των κυττάρων-στόχων τους. Οι υποδοχείς τους αναλαμβάνουν την περαιτέρω διάδοση του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Είναι σημαντικό να διευκρινισθεί πως η μεταγωγή του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου δεν περιλαμβάνει πλέον τον αυξητικό παράγοντα, αλλά διαμεσολαβείται από άλλα μόρια. Τα μόρια αυτά προκύπτουν ή ενεργοποιούνται από την αλληλεπίδραση αυξητικού παράγοντα-υποδοχέα, αλλά και από αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με άλλα μόρια στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης. Δημιουργείται έτσι μια αλληλουχία ή καταρράκτης (cascade) ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μορίων, που συνιστούν μια οδό, συχνότατα με αρκετές διακλαδώσεις και παραλλαγές από ιστό σε ιστό και με διαφορετικούς τελικούς κυτταρικούς στόχους. Οι στόχοι αυτοί μπορούν να είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, των οποίων τροποποιείται η λειτουργία ή και γονίδια, των οποίων ρυθμίζεται η

μεταγραφή. Το ίδιο αρχικό αυξητικό σήμα μπορεί να προσδεθεί σε διαφορετικό υποδοχέα του και να ενεργοποιήσει διαφορετική οδό μεταγωγής, οδηγώντας στο ίδιο ή διαφορετικό τελικό αποτέλεσμα. Ένα άλλο εξωκυττάριο σήμα, μπορεί να χρησιμοποιήσει την ίδια οδό μεταγωγής, αλλά και να καταλήξει σε διαφορετικό τελικό στόχο [548].

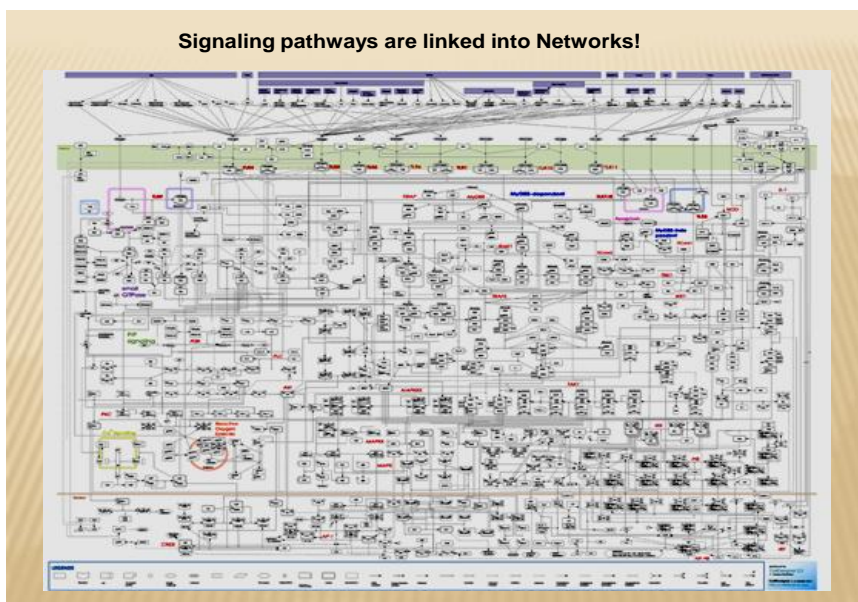
Παρόλο που τα αρχικά σήματα (αυξητικοί παράγοντες) δεν είναι πάρα πολλά και οι βασικές σηματοδοτικές οδοί είναι ακόμη λιγότερες:

- η αρθρωτή δομή των οδών,
- οι «μοριακοί διακόπτες» που λειτουργούν σε κάθε βήμα μετάδοσης του σήματος (αυτό σημαίνει πως τα σηματοδοτικά μόρια έχουν τη δυνατότητα να μεταπίπτουν άμεσα από την ενεργή στην ανενεργή κατάσταση και αντιστρόφως),
- οι συχνές αλληλεπιδράσεις – συνομιλίες μεταξύ των οδών (**cross-talks**) και
- οι διαφορετικοί τελικοί στόχοι,

δημιουργούν την τεράστια ποικιλία των κυτταρικών ρυθμίσεων [548], η οποία προαναφέρθηκε.

Οι αλληλεπιδράσεις – συνομιλίες (cross-talks) αποτελούν το σημαντικότερο από τους προαναφερθέντες παράγοντες συμμετοχής στην τεράστια αυτή ενδοκυττάρια ποικιλομορφία ρυθμίσεων και έχουν τη μέγιστη συμβολή στην εμφανιζόμενη αντίσταση των καρκινικών κυττάρων έναντι των αντικαρκινικών θεραπειών.

Σχηματικά, μπορεί κανείς να αντιληφθεί την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητα λόγω των cross-talks βλέποντας την εικόνα 43, όπου παρουσιάζεται μέρος των σηματοδοτικών οδών (signal transduction pathways) του κυττάρου και των cross-talks μεταξύ τους... Όχι τυχαία, η πολυπλοκότητα αυτή έχει παρομοιασθεί επιτυχώς με το εξαιρετικά πυκνό σιδηροδρομικό δίκτυο της πόλης του Τόκιο (εικόνα 44), με τη σημαντική διαφορά, βεβαίως, πως στο κύτταρο όσες σηματοδοτικές οδοί και να διακοπούν με τις φαρμακευτικές θεραπείες, αυτό συνήθως, βρίσκει τον τρόπο διά άλλων οδών ή επικοινωνιών (cross-talks) να μεταφέρει το μήνυμα και να επιβιώσει (= αντίσταση στις θεραπείες).



Εικόνα 43: Μέρος του πυκνού δικτύου (network) των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών και οι αλληλεπιδράσεις – επικοινωνίες μεταξύ τους (cross-talks).



Εικόνα 44: Μέρος του πυκνού σιδηροδρομικού δικτύου (*network*) της πόλης του Τόκιο και η προφανής του ομοιότητα με το πυκνό δίκτυο σηματοδοτικών δρόμων στο κύτταρο.

II-8.2 Παραδείγματα σημαντικών επικοινωνιών (*cross-talks*) μεταξύ μοριακών σηματοδοτικών δρόμων (*signaling pathways*) στο κύτταρο με ιδιαίτερη σημασία στον καρκίνο του μαστού.

- i. Η συνομιλία (*cross-talk*) του HER2 με το ιδιαίτερα σημαντικό για την κυτταρική λειτουργία και μεταφορά σημάτων σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/AKT [63].

Το σηματοδοτικό σήμα μέσα στο κύτταρο, μετά την ενεργοποίηση του HER2, μεταφέρεται και μέσω της οδού PI3K/PTEN/AKT, καθώς ενεργοποιείται η AKT και το downstream σηματοδοτικό μονοπάτι (signaling pathway) που ξεκινάει από αυτήν, το οποίο αξίζει στο σημείο αυτό να δούμε συνοπτικά:

Η ενεργοποιημένη AKT μπορεί απευθείας να ενεργοποιήσει μέσω φωσφορυλίωσης, ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών υποστρωμάτων όπως:

- Η πρωτεΐνη mTOR, μόριο-κλειδί σε πολλές ενδοκυττάρειες διεργασίες, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε άμεσα μέσω ενεργοποιητικής φωσφορυλίωσης από την AKT, είτε έμμεσα μέσω μιας ανασταλτικής φωσφορυλίωσης από το tuberous sclerosis complex (TSC) [549].
- Η πρωτεΐνη human double minute 2 (HDM2) [550-552].
- Η I ΚαρραB πρωτεϊνική κινάση (IKK), της οποίας η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί τον NF-κB αντιαποπτωτικό δρόμο [553-556].
- Η συνθετάση του νιτρικού οξέος (nitric oxide synthase – NOS) ενεργοποιείται επίσης από την AKT και αυτό συμβάλλει στην αντιαποπτωτική δράση του PI3K/AKT δρόμου [299].
- Το c-myc και η cyclin-D1 σταθεροποιούνται μέσω της ενεργοποίησης του NF-κB δρόμου και του GSK-3β/β-catenin-signaling άξονα [299].

- Οι πρωτεΐνες MMP-2, MMP-9 και urokinase-type plasminogen activator (uPA) [557,558] και οι BRCA1 και p21^{Cip1/WAF1} επίσης ενεργοποιούνται από την AKT.

Ωστόσο, η μέσω AKT φωσφορυλίωση μπορεί να οδηγήσει και σε down-regulation κάποιων πρωτεϊνών-στόχων, όπως:

- glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β),
- β-catenin,
- BCLXL/BCL2 associated death promoter homolog (BAD) και
- forkhead transcription factor 3a (FOXO3a),

μέσω ενεργοποίησης των διαδοχικών γεγονότων της φωσφορυλίωσης, της ubiquitination και της μέσω πρωτεασών διάσπασης (p/υ/p) [559].

Έτσι, η AKT κινάση αποτελεί έναν παράγοντα-κλειδί για την κυτταρική επιβίωση, καθώς αρκετοί από τους downstream παράγοντες, τους οποίους ενεργοποιεί, ρυθμίζουν απευθείας την πρωτεϊνοσύνθεση, τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης, τη σύνθεση του γλυκογόνου, την τροποποίηση της ακεραιότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την κυτταρική κινητικότητα και την απόπτωση [560]. Επιπλέον, η AKT ρυθμίζει την κυτταρική υπερπλασία και την αύξηση του όγκου προωθώντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τη μεταφορά του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S, μπλοκάροντας τη FOXO-mediated

μεταγραφή από αναστολείς του κυτταρικού κύκλου [299]. Ο PI3K/AKT δρόμος προωθεί επίσης τη διάσπαση της Βασικής Μembrάνης (Basement Membrane – BM) και την ανακατασκευή της Εξωκυττάριας Θεμέλιας Ουσίας (Extracellular Matrix – ECM) μέσω της ενεργοποίησης των MMP-2,-9 και uPA [557,558], ενώ, τέλος, μπορεί να ρυθμίσει την αγγειογένεση μέσω διαφόρων downstream στόχων όπως ο άξονας mtor/p70S6K1, η αναστολή του FOXO, η αύξηση του NOS και η αναστολή του GSK-3β [561-564].

ii. **Η συνομιλία (cross-talk) του HER2 με το VEGF-A και το VEGF-C [505]** (για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την επικοινωνία μεταξύ των δύο μοριακών δρόμων, βλ. Κεφ. «II-4.8 – Ρύθμιση της έκφρασης του VEGF» και «III-3 – Συζήτηση – Εύρημα 4^ο»).

iii. **Η συνομιλία (cross-talk) του HER2 με το c-myc.**

Η ενίσχυση του γονιδίου του c-myc βρέθηκε πως σχετίζεται με την ενίσχυση του γονιδίου του HER2 και αυτό οδηγεί σε αυξημένη υπερπλασία και φτωχότερη πρόγνωση [565,566].

iv. **Οι διαφορετικοί τρόποι ενεργοποίησης της HIF-1 πρωτεΐνης και της έκφρασης του VEGF mRNA ανάλογα με την ύπαρξη ή μη οξυγόνου στο περιβάλλον.**

- Υπό συνθήκες υποξίας, τόσο η ίδια η υποξία όσο και η απώλεια δραστηριότητας των p53 και/ή VHL αυξάνουν τη σταθερότητα της HIF-1α πρωτεΐνης μέσω μείωσης της ubiquitination της πρωτεΐνης και της διάσπασής της. Η πλέον σταθερή τώρα HIF-1α πρωτεΐνη, με τη σειρά της, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή VEGF.
- Σε συνθήκες ύπαρξης οξυγόνου, η αύξηση της έκφρασης του VEGF γίνεται με άλλο τρόπο: μέσω του HER2 δρόμου, ο οποίος διαμεσολαβείται από το PI3K/AKT μονοπάτι [359].

v. **Η ύπαρξη πολλών διαφορετικών αγγειογενετικών πρωτεϊνών, πλην του VEGF, ως προϊόντα πολλών όγκων, οι οποίοι οδηγούν, επίσης, στην παραγωγή νεοαγγείων και, ομοίως, η ύπαρξη άλλων μελών της υπερικογένειας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs) πλην των VEGFR 1-3 ως promoters της αγγειογένεσης στην πρόοδο του καρκίνου του μαστού.**

Για παράδειγμα, η υψηλή έκφραση του Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα μεταστάσεων, αντίσταση στη χημειοθεραπεία και μικρότερη επιβίωση [567].

vi. **Η συνομιλία (cross-talk) του ER με το HER2.**

Υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις πως οι σηματοδοτικοί δρόμοι των ER και HER2 συνομιλούν-επικοινωνούν (cross-talk) και με

τον τρόπο αυτό συνεργάζονται για την πρόοδο του όγκου [568]. Συγκεκριμένα, ο ER μπορεί να ενεργοποιήσει το δρόμο του HER2, ο οποίος, με τη σειρά του, μπορεί μετα-μεταφραστικά να τροποποιήσει τον ER και τους συν-ενεργοποιητές του. Με τον τρόπο αυτό, ο HER2 μπορεί να αυξήσει τη μέσω του ER μεταγραφή γονιδίων κρίσιμων για την πρόοδο του καρκίνου του μαστού [569]. Ο ER ενεργοποιεί το δρόμο του HER2 μέσω ποικίλων μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν: την αυξημένη παραγωγή των συνδετών του HER2, την ενεργοποίηση του HER2 μέσω μη-γενωμικών δράσεων του ER και την απελευθέρωση συνδετών του HER2, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην κυτταρική μεμβράνη και δρουν με αυτοκρινή τρόπο για να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι του HER2.

II-8.3 Αντίσταση στην αντι-HER2 στοχευμένη αγωγή (Trastuzumab)

Παρά το γεγονός πως η πρόγνωση των πρώιμου σταδίου HER2-overexpressing καρκίνων έχει βελτιωθεί αποφασιστικά με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος trastuzumab στην adjuvant θεραπεία του καρκίνου του μαστού τα τελευταία χρόνια, η ύπαρξη τόσο επίκτητης (acquired) όσο και εγγενούς (intrinsic) αντίστασης έχει περιορίσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας στην επιθετικού χαρακτήρα ομάδα που συνιστά η μεταστατική νόσος [570,571]. Μόνο

μια μειοψηφία της τάξης του 15-26% των ασθενών με HER2-overexpressing μεταστατική νόσο εμφανίζουν ανταπόκριση στην πρώτη γραμμή μονοθεραπεία με το trastuzumab, ενώ, συγχρόνως, οι περισσότεροι που εμφάνισαν αρχικά ανταπόκριση, παρουσιάζουν πρόοδο νόσου εντός του πρώτου έτους λήψης της θεραπείας [521,572]. Πού μπορεί να οφείλεται αυτή η συχνότατη αντίσταση στο trastuzumab;

- i. Μια υποομάδα των HER2-overexpressing καρκίνων του μαστού έχει βρεθεί πως συν-εκφράζει το μόριο p95HER2, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εγγενή αντίσταση στο trastuzumab. Η μονοθεραπεία με lapatinib ή ο συνδυασμός του lapatinib με την capecitabine βρέθηκε αποτελεσματικός στους ασθενείς με p95HER2 (+) και p95HER2 (-) HER2(+) καρκίνους μαστού [522].
- ii. Παρά την αρχική αποτελεσματικότητα του trastuzumab, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού παρουσιάζουν επίκτητη αντίσταση στο μονοκλωνικό αυτό αντίσωμα [388]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/AKT φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό – αν όχι το σημαντικότερο – καθοριστή της αντίστασης στο trastuzumab [573]. Η down-regulation ή ακόμη η απώλεια (loss) του PTEN βρέθηκε πως συνεπάγεται ανθεκτικότητα απέναντι στο trastuzumab [574]. Σε μία προοπτική μελέτη (cohort) με 55 ασθενείς πάσχουσες από καρκίνο του μαστού [573], η απώλεια του PTEN και οι ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του PIK3CA αποτελούσαν

προβλεπτικό παράγοντα αντίστασης στη θεραπεία με trastuzumab. Ωστόσο, μόνο το 50% των trastuzumab-ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων εμφάνιζε απώλεια του PTEN ή μεταλλάξεις στο PIK3CA. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση μήπως ένα μέρος έστω της πρωτοπαθούς αντίστασης στο trastuzumab οφείλεται σε μία κληρονομούμενη ανοσοαπόκριση, η οποία οδηγεί σε χαμηλή αποτελεσματικότητα του trastuzumab, αντί της πραγματικής αντίστασης σε αυτό [63].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, το πρώτο φάρμακο που έλαβε την έγκριση από τον FDA για τον trastuzumab-ανθεκτικό καρκίνο του μαστού ήταν ο από του στόματος αναστολέας των HER2 και EGFR κινασών lapatinib. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα όσον αφορά στο lapatinib δείχνουν πως (σε αντίθεση με το trastuzumab) η χαμηλή έκφραση του PTEN δεν προοιωνίζει αντίσταση στο lapatinib [575]. Ωστόσο, αντίθετα αποτελέσματα επίσης υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές [576], η ενεργοποίηση του PI3K δρόμου (μέσω μεταλλάξεων στο PIK3CA και/ή απώλεια του PTEN) μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στο lapatinib όπως ακριβώς και στο trastuzumab. Εδώ, αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν δεδομένα από προκλινικές μελέτες, τα οποία δείχνουν πως το lapatinib είναι επίσης δραστικό και σε HER2 (-) καρκινικά κύτταρα μαστού [63].

- iii. Είναι λίαν εντυπωσιακό το γεγονός πως όγκοι μεταστατικοί του μαστού HER2-εξαρτώμενοι, οι οποίοι εδράζονται και μεγαλώνουν στον εγκέφαλο, αποτυγχάνουν να απαντήσουν στη θεραπεία με trastuzumab. Υπάρχουν δύο πιθανές ερμηνείες του φαινομένου: Κατά πρώτον, έχει βρεθεί αυξημένη φωσφορυλίωση (και ενεργοποίηση) του HER2 στα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται στον εγκέφαλο, συγκρινόμενα με αυτά που εδράζονται στο μαζικό ιστό. Αυτή η αυξημένη δραστηριότητα του HER2 θα μπορούσε να αποτελεί ένα μηχανισμό αντίστασης [577]. Κατά δεύτερον, έχει βρεθεί πως το trastuzumab αδυνατεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και η αδυναμία του αυτή έχει θεωρηθεί ως μείζων παράγοντας που υποκρύπτεται πίσω από τις εγκεφαλικές μεταστάσεις στις ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με trastuzumab [388].

Μία δόκιμη επιλογή για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας του trastuzumab είναι ο συνδυασμός του με αναστολείς άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών (signal transduction pathway inhibitors). Έτσι, μικρά μόρια-αναστολείς τυροσινοκινάσης (tyrosine kinase inhibitors – TKIs), τα οποία στοχοποιούν τους HER2-overexpressing όγκους και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μπορούν να δείξουν αποτελεσματικότητα έναντι των εγκεφαλικών μεταστάσεων.

Τέτοιοι μικροί TKIs είναι οι διπλοί EGFR-HER2 αναστολείς για τον καρκίνο του μαστού όπως: lapatinib, pertuzumab, canertinib και neratinib [388].

- iv. Άλλος μηχανισμός αντίστασης στο trastuzumab είναι η αυξημένη κυτταρική σηματοδότηση από άλλους υποδοχείς της οικογένειας HER (erbB) όταν μπλοκάρεται με το trastuzumab ο HER2, όπως ο EGFR (HER1), ο HER3 και ο HER4.
- v. Τέλος, έναν ακόμη μηχανισμό αντίστασης στο trastuzumab αποτελεί η μεταπήδηση σε εναλλακτικά μονοπάτια ρύθμισης της ανάπτυξης, όπως το μονοπάτι του υποδοχέα του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα (Insulin-like Growth Factor Receptor – IGFR).

Συμπερασματικά, καθώς είναι εμφανές πως δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με trastuzumab όλες οι ασθενείς με HER2 (+) καρκίνο του μαστού, ο προσδιορισμός άλλων γονιδίων, που εμφανίζουν ενίσχυση (amplification) μαζί με το HER2, μπορεί να βοηθήσει στον προσδιορισμό των ασθενών αυτών, οι οποίες θα εμφανίζουν τις μεγαλύτερες πιθανότητες ανταπόκρισης στη θεραπεία με το trastuzumab [488].

II-8.4 Αντίσταση στην αντι-VEGF και αντι-VEGFR στοχευμένη αγωγή (π.χ. Bevacizumab, Sunitinib)

Όπως έγινε αναφορά και στο κεφάλαιο 11-4.10 (αντι-VEGF θεραπείες στον καρκίνο του μαστού), η αντίσταση των όγκων στο bevacizumab ως αντι-VEGF στοχευμένη αγωγή παρουσιάσθηκε ως μείζον πρόβλημα στην πορεία χορήγησης του φαρμάκου και διέψευσε τον αρχικό ενθουσιασμό. Η αντίσταση μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως:

- i. Το switch από VEGF-εξαρτώμενη αγγειογένεση σε bFGF- ή EGF-εξαρτώμενη, όταν αναστέλλεται η δράση του VEGF ή του VEGFR [578-580].
- ii. Η ύπαρξη και άλλων μελών της υπεροικογένειας των υποδοχέων τυροσινοκινάσης (RTKs) πλην των VEGFR 1-3, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, π.χ. του PDGFR, οι οποίοι δύνανται να ενεργοποιηθούν και να εκτελέσουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης επί απουσίας ή αδρανοποίησης του VEGF ή του VEGFR [567].

II-8.5 Αντίσταση στην Ορμονοθεραπεία

Τα τελευταία χρόνια, οι επικοινωνίες (cross-talks) μεταξύ των σηματοδοτικών δρόμων στο κύτταρο και των μηνυμάτων μέσω των

οιστρογονικών υποδοχέων (Estrogen Receptors – ER), οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε πολλαπλά επίπεδα στο κύτταρο, έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας με σκοπό αφενός τη διαλεύκανση της αιτιολογίας και των μηχανισμών ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού και αφετέρου τη διερεύνηση των μηχανισμών αντίστασης του καρκίνου στην ορμονοθεραπεία [581], η οποία είναι αρκετά συχνή.

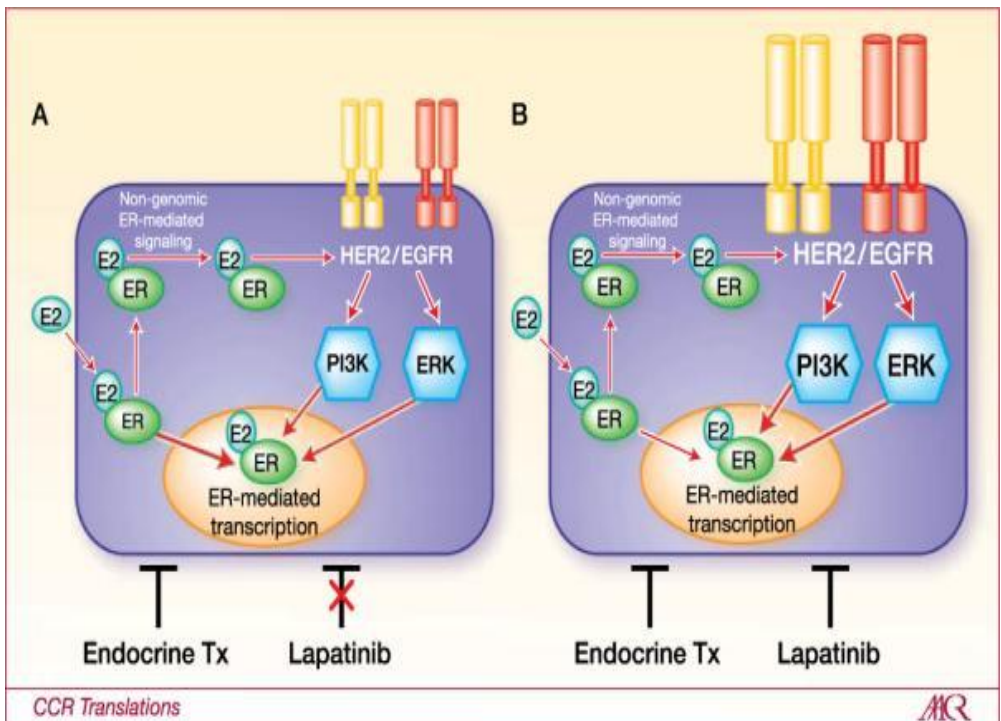
- i. Ο οιστρογονικός μεμβρανικός υποδοχέας ER όταν ενεργοποιηθεί από το οιστρογόνο ενεργοποιεί με τη σειρά του με άμεσο ή έμμεσο τρόπο μεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινοκινάσης (RTKs). Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση μορίων αγγελιοφόρων (messengers) με ρόλο-κλειδί, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν downstream μονοπάτια κινασών όπως οι δρόμοι ERK/MAPK (ο δρόμος των MAP κινασών) και ο PI3K/AKT (ο γνωστός δρόμος με τη μεγάλη σημασία στη μεταφορά μηνυμάτων στο κύτταρο, τον οποίο έχουμε αναφέρει ξανά). Οι κινάσες αυτών των δρόμων μπορούν να φωσφορυλιώσουν τον ER σε θέσεις-κλειδιά και εν συνεχεία τόσο ο φωσφορυλιωμένος ER όσο και οι κινάσες αυτές μπορούν να ενεργοποιήσουν την μεταγραφική δραστηριότητα του ER στον πυρήνα και να προωθήσουν έτσι την οιστρογονο-εξαρτώμενη (ER-dependent) μεταγραφή [582].

Η ενεργοποίηση του AKT έχει αναφερθεί να σχετίζεται με αντίσταση στην αντι-οιστρογονική θεραπεία π.χ. στην ταμοξιφαίνη. Επιπλέον, φαίνεται πως τα καρκινικά κύτταρα με ενεργοποιημένη AKT μπορούν να επιβιώσουν και από την

επίδραση άλλων ορμονικών θεραπειών όπως είναι οι αναστολείς της αρωματάσης και οι LH-RH αγωνιστές. Η ενεργοποιημένη AKT έχει βρεθεί πως σχετίζεται με φτωχή ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Έτσι, η αναστολή του PI3K/AKT σηματοδοτικού δρόμου θα μπορούσε να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της ορμονοθεραπείας στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού [583].

- ii. Όπως αναφέρθηκε και αναλύθηκε προηγουμένως (Κεφ. II-8.2), υπάρχουν αυξημένες ενδείξεις πως οι σηματοδοτικοί δρόμοι των ER και HER2 συνομιλούν-επικοινωνούν (cross-talk) και με τον τρόπο αυτό συνεργάζονται για την πρόοδο του όγκου [568]. Ασθενείς με ER(+) μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι οποίες έχουν λάβει αγωγή με letrozole ή ταμοξιφαίνη και παρουσιάζουν κατά την πρόοδο της νόσου μετατροπή σε HER2(+), εμφανίζουν μικρότερη επιβίωση σε σύγκριση με τις ασθενείς που δεν παρουσιάζουν αυτή τη μετατροπή [584]. Τα υπάρχοντα δεδομένα φανερώνουν πως η βέλτιστη θεραπεία έναντι των ER(+)/HER2(+) καρκίνων του μαστού αποτελείται από συνδυασμό ορμονοθεραπείας και αναστολέων του HER2. Σχετική προκλινική έρευνα από τους Leary και συν [585] με χρήση κυτταρικών μοντέλων που παρουσίαζαν επίκτητη αντίσταση στην ορμονοθεραπεία ανέδειξε πως η διακοπή της συνομιλίας (cross-talk) μεταξύ των HER2 και ER με το lapatinib θα μπορούσε να οδηγήσει σε επανάκτηση της ευαισθησίας στην

ορμονοθεραπεία σε ασθενείς με ER(+)/HER2(-) νόσο και επίκτητη αντίσταση σε αυτή. Η ικανότητα του lapatinib να αναστέλλει το cross-talk μεταξύ HER2 και ER στις HER2(-) ασθενείς έχει επισημανθεί και από τους Mayer και Arteaga [586] (βλ. Εικόνα 45).



Εικόνα 45: Η ικανότητα του Lapatinib να αναστέλλει τη συνομιλία (cross-talk) μεταξύ των σηματοδοτικών δρόμων του HER2 και του ER. Από: [586]

Η πρόσφατη κλινική έρευνα που λαμβάνει χώρα τόσο στο μεταστατικό καρκίνο του μαστού όσο και στον πρώιμο καρκίνο του μαστού έχει οδηγήσει σε μια σταδιακή υιοθέτηση της χρήσης του συνδυασμού αντι-HER2 και ορμονικών παραγόντων στη θέση της κυτταροτοξικής χημειοθεραπείας [587,588]. Τα τελευταία χρόνια απομονώνονται ομάδες ασθενών στις οποίες η χορήγηση συνδυασμού στοχευμένων παραγόντων φαίνεται να παρατείνει την ελεύθερη-χημειοθεραπείας (chemotherapy-free) επιβίωση [568].

- iii. Τέλος, έχει βρεθεί πως η αυξημένη έκφραση VEGF σχετίζεται με μειωμένη απάντηση στην ταμοξιφαίνη ή τη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού [589]. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει πως το status του VEGF αποτελεί σημαντικό προβλεπτικό παράγοντα για υποτροπή στις ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού, οι οποίες έχουν λάβει adjuvant ορμονοθεραπεία με ταμοξιφαίνη [590,591]. Αυτά τα κλινικά δεδομένα είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα πειραματικών ερευνών στις οποίες η μεταφορά του VEGF121 γονιδίου σε ορμονο-ευαίσθητους όγκους, τους μετέτρεψε σε ορμονο-ανθεκτικούς και εν συνεχεία η αντι-αγγειογενετική θεραπεία εμφάνισε συνεργιστική δράση με την ορμονοθεραπεία [592]. Ένα μικροπεριβάλλον πλούσιο σε VEGF πιθανώς να διευκολύνει την αύξηση (up-regulation) της παραγωγής αυξητικών παραγόντων και τη σύνθεση ενδοκρινών

ορμονών, αν και λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε μία τέτοια διαδικασία [346].

II-8.6 Αντίσταση στην Ακτινοθεραπεία

Τα επίπεδα της έκφρασης του VEGF στον νεοπλασματικό ιστό φαίνεται να αποτελούν σημαντικό προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής (disease free survival – DFS) καθώς και ολικής επιβίωσης (overall survival – OS) σε ασθενείς με καρκίνο μαστού χωρίς λεμφαδενική νόσο, οι οποίες έχουν λάβει αγωγή με τοπικο-περιοχική ακτινοθεραπεία [593]. Σε άλλη σχετική μελέτη με μοντέλα ακτινο-ανθεκτικών όγκων [594], η χορήγηση ανταγωνιστών του VEGFR-1 και ένας αναστολέας του VEGFR-2 μετέτρεψαν τους όγκους με ακτινο-ανθεκτικό φαινότυπο σε άλλους με ακτινο-ευαισθησία. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν πως η έκφραση του VEGF μπορεί να καθορίσει έναν ακτινο-ανθεκτικό κυτταρικό φαινότυπο.

II-8.7 Φαρμακευτικές Θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού με πρόσθετες διαφορετικές δράσεις, από τις προσδοκώμενες βάσει του αρχικού σχεδιασμού, λόγω των cross-talks

- i. Είναι πιθανό ότι στα επόμενα χρόνια ο σχεδιασμός της αγγειογενετικής θεραπείας θα περιλαμβάνει εκτός των

κλασικών αγγειογενετικών παραγόντων (βλ. παραπάνω) και παραδοσιακούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όπως η κυκλοφωσφαμίδη, η πακλιταξέλη, η δοξορουβικίνη και η βινκριστίνη, καθώς έχει βρεθεί πως φαίνεται να παρουσιάζουν αντιογκογενετική δράση και μέσω επίδρασής τους στη δημιουργία νεοαγγείων, όταν χορηγούνται σε «μετρονομικές» (metronomic) δόσεις. «Μετρονομική» χαρακτηρίζεται η χαμηλή δόση χορήγησης χημειοθεραπείας, με την οποία δεν εμφανίζεται μυελοκαταστολή και αποφεύγονται και άλλες δοσο-εξαρτώμενες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χαμηλή όμως «μετρονομική» δόση ορισμένων χημειοθεραπευτικών όπως τα αναφερόμενα συμβάλλει στην αναστολή της αύξησης του όγκου μέσω καταστροφής των ενδοθηλιακών κυττάρων [296].

Η στρατηγική αυτή εμφανίζει και άλλα πλεονεκτήματα, πλην της μειωμένης τοξικότητας και της καλύτερης έτσι ανοχής, λόγω της μειωμένης δόσης: Η διαφορετική αυτή δράση των ανωτέρω φαρμάκων (δηλαδή η αντι-αγγειογενετική) εμφανίζεται ανεξάρτητα από το προφίλ αντοχής του εκάστοτε καρκινικού πληθυσμού κυττάρων απέναντι στο συγκεκριμένο φάρμακο, καθώς το προφίλ αντοχής σχετίζεται με την κλασική κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου και όχι με την ενδεχόμενη αντι-αγγειογενετική του. Έτσι, π.χ. η πακλιταξέλη, ένας αναστολέας ο οποίος αποτελεί σημαντικό χημειοθεραπευτικό παράγοντα για τη

θεραπεία αρκετών διαφορετικών κακοηθειών, βρέθηκε πως εμφανίζει αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες, οι οποίες είναι πλήρως ανεξάρτητες από την αντι-υπερπλαστική της δράση σε *in vivo* μοντέλα [595].

- ii. Εκτός των κλασικών χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων με τις αντι-αγγειογενετικές δράσεις, βρέθηκε πως ορμονοθεραπευτικοί παράγοντες όπως η ταμοξιφαίνη μπορεί επίσης να εμφανίζουν αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες. Τα οιστρογόνα είναι γνωστό πως μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή του VEGF [596] και έτσι, μέσω του μηχανισμού αυτού, η ταμοξιφαίνη μπορεί να συντελέσει στην αναστολή της παραγωγής VEGF και FGF, στην αναστολή της αγγειογένεσης και στη μείωση της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD) και σε αυξημένη νέκρωση των MCF-7 xenografts [597-602]. Η ταμοξιφαίνη μπορεί επίσης να μειώσει (down-regulate) την παραγωγή του αναστολέα της αγγειογένεσης θρομβοσπονδίνη [603].
- iii. Άλλα φάρμακα τα οποία παρουσιάζουν παρόμοιο ενδιαφέρον είναι οι αναστολείς της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και τα διφωσφονικά. Τα φάρμακα αυτά βρέθηκε, επίσης, να παρουσιάζουν αντι-αγγειογενετικό δυναμικό [604-606].

- iv. Αξίζει να αναφερθεί πως και το trastuzumab βρέθηκε πως μπορεί από μόνο του να δρα ως αντι-αγγειογενετικός παράγοντας σε μοντέλο με μηνιγγικές μεταστάσεις από HER2-overexpressing καρκίνο του μαστού, μέσω μείωσης κάποιων προ-αγγειογενετικών παραγόντων και αύξησης ενός αντι-αγγειογενετικού παράγοντα [607]. Ωστόσο, φαίνεται πως οι επιδράσεις αυτές του trastuzumab είναι μόνο προσωρινές, καθώς εξουδετερώνονται από την αντισταθμιστική παραγωγή VEGF από στρωματικά κύτταρα, πιθανώς στην προσπάθεια του ιστού να διατηρήσει την αγγειογένεση [577].

11-9

***Ασαφή και διαφορούμενα
θέματα σχετιζόμενα
με τη maspin και το VEGF.***

Σχετικά με την παρουσία, τη δράση και τις σχέσεις της maspin και του VEGF, υπάρχουν σημαντικά θέματα τα οποία παραμένουν ασαφή, διφορούμενα και «σκοτεινά» και για τα οποία τα αποτελέσματα των σχετικών μελετών και τα δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία είναι επί το πλείστον αντιφατικά και αλληλοσυγκρουόμενα. Τέτοια θέματα είναι:

- i. Η δράση της maspin στους διάφορους τύπους καρκίνου. – Αντιφατικά, εν πολλοίς, τα υπάρχοντα δεδομένα, όπως αναφέρθηκε και στο σχετικό Κεφάλαιο και θα αναλυθεί περαιτέρω στο Κεφ. «Συζήτηση», αφού παρατεθούν πρώτα τα δικά μας ευρήματα.
- ii. Η δράση της maspin ειδικά στον καρκίνο του μαστού. – Επίσης αντιφατικά τα δεδομένα και πολλές οι αντικρουόμενες μελέτες, όπως επίσης αναφέρθηκε στο σχετικό Κεφάλαιο και θα αναλυθεί περαιτέρω στο Κεφ. «Συζήτηση», αφού παρατεθούν πρώτα τα δικά μας ευρήματα.
- iii. Η σχέση πυρηνικού κλάσματος/κυτταροπλασματικού κλάσματος της maspin στον καρκίνο γενικότερα και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα και η βιολογική σημασία της υποκυτταρικής κατανομής της.
- iv. Η σχέση της maspin με το VEGF και τη μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density – MVD) στον καρκίνο γενικότερα και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα.
- v. Η σχέση της maspin με άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους στον καρκίνο του μαστού, όπως: η ηλικία, το

grade, το μέγεθος του όγκου, το status των μασχαλιαίων λεμφαδένων, οι μεταστάσεις, το stage, οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), οι προγεστερονικοί υποδοχείς (PR), το HER2 status, η θετικότητα των ki-67 και p53 και η μοριακή ταξινόμηση της νόσου.

II-10**Σκοποί της μελέτης**

Με δεδομένες τις σημαντικές αντιθέσεις, αντικρουόμενες θέσεις και αντιφατικά δεδομένα σχετικά με το ρόλο της Mammary Serine Protease Inhibitor (Maspin) στον καρκίνο του μαστού, την υποκυτταρική της κατανομή, το βιολογικό ρόλο αυτής και τις σχέσεις της με το VEGF και άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους στον καρκίνο του μαστού, τα παρακάτω αποτελούν τους κύριους σκοπούς της παρούσας μελέτης:

- i. Να επικεντρωθεί στη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης (subcellular localization) της maspin (πυρήνας – κυτταρόπλασμα) στον καρκίνο του μαστού, εξετάζοντας τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής της στα δύο αυτά κυτταρικά διαμερίσματα ξεχωριστά μέσω απλού μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM).
- ii. Να συγκρίνει την εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της maspin από τον παθολογοανατόμο μέσω του LM με την εκτίμησή της μέσω ενός Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος. Από τα όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, πρόκειται για την πρώτη σχετική προσπάθεια στη διεθνή βιβλιογραφία.
- iii. Να εξετάσει τη σχέση της maspin, τόσο της ολικής όσο και της ανά κυτταρικό διαμέρισμα, με τη διαδικασία της αγγειογένεσης μέσω της συσχέτισής της με τον Αγγειακό Ενδοθηλιακό Αυξητικό Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF) και με τη μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density – MVD) διά του CD34 δείκτη.

- iv. Να εξετάσει πιθανές συσχετίσεις της maspin με άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους στον καρκίνο του μαστού όπως: η ηλικία, το grade, το μέγεθος του όγκου, το status των μασχαλιαίων λεμφαδένων, οι μεταστάσεις, το stage, οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), οι προγεστερονικοί υποδοχείς (PR), το HER2 status, η θετικότητα των ki-67 και p53 και η μοριακή ταξινόμηση της νόσου.

III

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III-1**Υλικό και Μέθοδοι**

III-1.1 Ασθενείς και δείγματα

Συγκεντρώσαμε block ιστών σε παραφίνη (paraffin-embedded) από 48 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού καθώς και από τους φυσιολογικούς παρακείμενους ιστούς για ζευγάρωμα (matching).

Οι 48 ασθενείς είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση στο μαστό για την εκτομή επιβεβαιωμένου κακοήθους όγκου, από τον Απρίλιο του 2004 ως το Νοέμβριο του 2008 στην 1^η Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο. Το χειρουργείο αφορούσε είτε σε μαστεκτομή (ολική ή μερική) είτε σε συντηρητικό χειρουργείο (ογκεκτομή) με λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης, όμως, σε όλες τις περιπτώσεις.

Όλα τα περιστατικά ταξινομήθηκαν ιστολογικά ως διηθητικά πορογενή καρκινώματα (invasive ductal carcinomas – IDC), σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας – Π.Ο.Υ. (World Health Organisation – W.H.O.). Περιπτώσεις διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων, στις οποίες υπήρχε εξεσημασμένο in situ στοιχείο, αφαιρέθηκαν από τη μελέτη. Επίσης, αφαιρέθηκαν από τη μελέτη ασθενείς, οι οποίες είχαν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν από τη χειρουργική επέμβαση.

Ο ιστολογικός τύπος και το grade καθορίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια των Elston και Ellis (η κατά Nottingham τροποποίηση του συστήματος των Bloom και Richardson). Το staging βασίστηκε στην TNM ταξινόμηση της «Διεθνούς Ένωσης ενάντια στον Καρκίνο»

(International Union against Cancer). Οι καρκίνοι της μελέτης ταξινομήθηκαν, ακόμη, σε τέσσερις κατηγορίες (Luminal A, Luminal B, HER2(+) και Triple-Negative), σύμφωνα με τη σύγχρονη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (για όλα τα ανωτέρω, βλ. Κεφ. II-3.3, II-3.4 και II-3.5).

III-1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι προς σύγκριση

Η χρώση της maspin εξετάσθηκε τόσο ξεχωριστά μεταξύ πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος όσο και συνολικά και ερευνήθηκαν οι συσχετίσεις των τριών κλασμάτων της maspin μεταξύ τους (πυρηνικής – κυτταροπλασματικής – ολικής) αλλά και οι συσχετίσεις τους με την έκφραση του VEGF, του CD34 (No/mm²) και των ποικίλων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (ηλικίας, grade, μεγέθους του όγκου, status των μασχαλιαίων λεμφαδένων, μεταστάσεων, stage, οιστρογονικών υποδοχέων (ER), προγεστερονικών υποδοχέων (PR), HER2 status, θετικότητας των ki-67 και p53 και μοριακής ταξινόμησης της νόσου).

III-1.3 Ανοσοϊστοχημική μέθοδος

i. Αντισώματα και διαλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν (βλ. Πίνακα 8):

- Maspin Rb Polyclonal (h-130): sc-22762 (Santa Cruz Biotechnology, INC), 1:100.
- Purified monoclonal mouse Anti-Human VEGF: Material Number: 555036, Isotype: G153-694 (BD Pharmingen™), 1:500.
- Monoclonal mouse CD34 antibody: NCL-L-END (Novocastra), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human ki-67 antigen: Clone MIB-1, Code: M7240 (Dako), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human estrogen receptor α : Clone 1D5, Code: M7047 (Dako), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human progesterone receptor: Clone PgR 636, Code: M3569 (Dako), 1:50.
- Mouse anti-HER2: MSK044 (Zytomed Systems), 1:100.
- Monoclonal mouse anti-human p53 protein: Clone DO-7, Code: IR616 (Dako), 1:50.

Καθορισμός	Τύπος	Ειδικότητα	Είδος κυττάρων	Υποκυτταρική περιοχή χρώσης	Εταιρεία	Διάλυση	Προετοιμασία πριν την επώαση
Maspin	Π	Maspin	Μυοεπιθηλιακά & επιθηλιακά	Πυρήνας και/ή κυτταρόπλασμα	Santa Cruz Biotechnology	1:100	10 ml κίτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
VEGF	M	Vascular Endothelial Growth Factor	Επιθηλιακά	Κυτταρόπλασμα	BD Pharmingen™	1:500	10 ml κίτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
CD34	M	CD34	Ενδοθηλιακά	Κυτταρόπλασμα	Novocastra	1:50	10 ml κίτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
ER	M	Οιστρογονικός υποδοχέας	Επιθηλιακά	Κυτταρόπλασμα	Dako	1:50	10 ml κίτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
PR	M	Προγεστερονικός υποδοχέας	Επιθηλιακά	Κυτταρόπλασμα	Dako	1:50	10 ml κίτρικό διάλυμα

		ας					με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
HER2	M	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2	Επιθηλιακά	Κυτταρόπλασμα	Zytomed Systems	1:100	10 ml κιτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
Ki-67	M	Ki-67	Επιθηλιακά	Πυρήνας	Dako	1:50	10 ml κιτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων
P53	M	P53	Επιθηλιακά	Πυρήνας	Dako	1:50	10 ml κιτρικό διάλυμα με pH=6 σε κλίβανο μικροκυμάτων

Πίνακας 8: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική μελέτη (M = μονοκλωνικό αντίσωμα, Π = πολυκλωνικό αντίσωμα).

ii. Ανοσοϊστοχημική διαδικασία

Τα δείγματα από τις κακοήθειες βλάβες των μαστών ελήφθησαν από το χειρουργείο και αμέσως τέθηκαν σε 10% ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΐδης. Εν συνεχεία, έγινε εμβάπτιση του ιστού σε παραφίνη. Κόπηκαν τομές («πλακάκια») πάχους 3-4 μm και παρέμειναν σε κλίβανο στους 40°C για 24 ώρες. Ακολούθησε τοποθέτηση σε κλίβανο στους 60°C για 30 λεπτά και μετά η διαδικασία της αποπαραφίνωσης. Η αποπαραφίνωση έγινε με διαδοχικά μείγματα αιθανόλης. Ακολούθησε ενυδάτωση. Στη συνέχεια, η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης αδρανοποιήθηκε με διάλυμα H_2O_2 3% σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά. Έγινε αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων όταν τα slides τέθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (10 ml με $\text{pH}=6$) μέσα σε κλίβανο μικροκυμάτων για 10 λεπτά. Το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα (βλ. Πίνακα 8) διαλύθηκε στην κατάλληλη συγκέντρωση σε ρυθμιστικό διάλυμα phosphatase saline (PBS). Τα slides, εν συνεχεία, επώαστηκαν με τα πρωτογενή αντισώματα στους 4°C για 24 ώρες. Κατόπιν, προστέθηκε δευτερογενές αντίσωμα με βιοτίνη σε διάλυμα 1:200 για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομάκρυνση του χρώματος από το αντίσωμα, τα slides επώαστηκαν με χρωμογόνο διάλυμα DAB (diaminobenzine) για 10 λεπτά. Μετά, τα slides βάφθηκαν με χρώση Hematoxylin Gill's για 1-2 λεπτά και τέθηκαν κάτω από τρεχούμενο νερό. Τέλος, τα slides αφυδατώθηκαν κάτω από αλκοόλη (οινόπνευμα), με διαδοχικά ανιούσες συγκεντρώσεις, καθαρίστηκαν με xylene και καλύφθηκαν με DPX με καλυπτρίδα.

Η χρώση των μυοεπιθηλιακών κυττάρων στους παρακείμενους των όγκων φυσιολογικούς ιστούς χρησιμοποιήθηκε ως θετικός εσωτερικός μάρτυρας (control). Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν slides, τα οποία επώαστηκαν με PBS αντί για τα πρωτογενή αντισώματα.

III-1.4 Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις εξετάστηκαν και βαθμονομήθηκαν μέσω του κοινού απλού μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM). Σε κάθε slide τουλάχιστον τρεις περιοχές με την υψηλότερη πυκνότητα θετικών κυττάρων επιλέχθηκαν και τυπικά 400-500 καρκινικά κύτταρα σε κάθε πεδίο μετρήθηκαν, ανεξάρτητα από το status ενεργότητάς τους. Μετά από αυτά, τα θετικά κύτταρα μετρήθηκαν και καθορίστηκε το ποσοστό τους. Το αποτέλεσμα κάθε χρώσης εκτιμήθηκε από δύο παθολογοανατόμους (NK και ΣΣ) ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο και χωρίς κάποια γνώση της υποκείμενης πληροφορίας (data). Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες υπήρχε διαφορετική εκτίμηση, η τελική απόφαση λαμβανόταν μετά από συμφωνία.

Για την εκτίμηση της χρώσης της maspin, χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα το οποίο έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί παλαιότερα [608,609]. Για τον κάθε όγκο υπολογίστηκε ένα score, για τον υπολογισμό του οποίου η ένταση της χρώσης (καμία ένταση = 0, χαμηλή ένταση = 1, μέτρια ένταση = 2 και ισχυρή ένταση =3) και το ποσοστό των θετικών κυττάρων (0% = 0, <10% = 1, 10-50% = 2, 51-80% = 3 και >80% = 4)

πολλαπλασιάστηκαν μεταξύ τους. Με τον πολλαπλασιασμό των δύο αυτών παραγόντων, ένα score ανοσοενεργότητας (ImmunoReactive Score – IRS ή $IRS_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$) ελήφθη, το οποίο κυμαινόταν από 0 έως 12. Υπολογίστηκε ξεχωριστά ένα $IRS_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$ για το πυρηνικό κλάσμα της maspin και ένα για το κυτταροπλασματικό.

Οι όγκοι που εμφάνιζαν ποσοστό θετικών κυττάρων <10% για το p53 και τους οιστρογονικούς (ER) και προγεστερονικούς (PR) υποδοχείς αξιολογήθηκαν ως αρνητικοί.

Όσον αφορά στο ki-67, ο δείκτης υπολογισμού του ήταν το ακριβές ποσοστό των θετικών κυττάρων.

Τέλος, το scoring των αποτελεσμάτων του HER2 έγινε βάσει των γνωστών κατηγοριών 0, 1+, 2+, 3+. Οι κατηγορίες 0 και 1+ θεωρήθηκαν ως αρνητικές και η κατηγορία 3+ ως θετική. Οι καρκίνοι του μαστού, οι οποίοι κατηγοριοποιήθηκαν στο 2+ ελέγχθηκαν και με τη μέθοδο του Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) για τον τελικό καθορισμό της θετικότητας ή αρνητικότητας του HER2 status.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να τονιστεί πως εκτίμηση μέσω απλού μικροσκοπίου, όπως περιγράψαμε, διενεργήθηκε για τους εξής παράγοντες: maspin, ki-67, p53, οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), προγεστερονικοί υποδοχείς (PR) και HER2. Οι χρώσεις των παραγόντων VEGF και CD34, εκτιμήθηκαν μόνο μέσω του Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος και όχι μέσω απλού μικροσκοπίου. Η εκτίμηση της χρώσης της maspin έγινε και με τους δύο τρόπους.

III-1.5 Σύστημα Ανάλυσης Εικόνας – Computerized Image Analysis (CIA)

Το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα έχει χρησιμοποιηθεί και αλλού [610,611] και στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των κάτωθι:

- Η ολική maspin σε κάθε κύτταρο, ανεξάρτητα από την κυτταροπλασματική ή πυρηνική της εντόπιση/κατανομή.
- Ο VEGF.
- Ο αριθμός των σημασμένων μέσω του CD34 αγγείων ανά τετραγωνική μονάδα επιφανείας.

Αναγκαίος εξοπλισμός

- Μικροσκόπιο με τριοφθάλμια κεφαλή και αντικειμενικό φακό 40x (η μεγέθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτίμηση των maspin και VEGF – για την εκτίμηση του CD34 χρησιμοποιήθηκε φακός 20x) / BX43 Μικροσκόπιο.
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής.
- Πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας – Image Analysis Software / Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, INC, Silver Spring, Maryland, USA).
- Αναλογική κάμερα (768 x 576 x 24) και ψηφιακή κάρτα σύλληψης / SC30 Olympus Camera.

Μεθοδολογία επεξεργασίας

- Για τη μέτρηση των maspin και VEGF: Σε κάθε μία ιστολογική τομή επιλέχθηκαν τουλάχιστον 7 περιοχές (Hot Spots) που παρουσίαζαν ενδιαφέρον και ελήφθησαν εικόνες από το σύστημα ανάλυσης εικόνας, με αντικειμενικό φακό 40x.
- Για τη μέτρηση του CD34: Κάθε ιστολογική τομή σαρώθηκε ολόκληρη από το σύστημα ανάλυσης εικόνας και ελήφθησαν τουλάχιστον 25 εικόνες από αυτή, ανάλογα με το μέγεθός της, με αντικειμενικό φακό 20x.
- Οι εικόνες αποθηκεύτηκαν στον υπολογιστή με αύξοντα αριθμό για κάθε ένα πλακάκι ξεχωριστά, στη μορφή των TIFF (tagged image file format) αρχείων.
- Βαθμονόμηση της εικόνας βάσει της χρώσεως και της οπτικής της πυκνότητας (Optical Density – O.D.). The Standard Optical Density option in the Intensity Calibration dialog box, uses the following standard light transmission formula for calculating OD from intensity. This formula assumes an exponential decay of light inside the transmitting material:

Optical density (x,y) = $-\log [(intensity(x,y) - black) / (incident - black)]$, where:

Intensity (x,y): is the intensity at pixel (x,y)

Black: is the intensity generated when no light goes through the material

Incident: is the intensity of the incident light [612].

- Βαθμονόμηση της εικόνας βάσει των φακών του μικροσκοπίου, με μικρομετρική κλίμακα, σε μονάδα μέτρησης μικρομέτρων (microns) (για τη μέτρηση των maspin και VEGF) και σε μονάδα μέτρησης mm (millimeters) (για τη μέτρηση του CD34).
- Αφαίρεση τεχνικών σφαλμάτων (artifacts) από την εικόνα.
- Για τη μέτρηση των maspin και VEGF:
 - Εύρεση και μέτρηση των θετικών κυττάρων πάνω στην εικόνα.
 - Οι παράμετροι που πάρθηκαν αφορούν στη μορφολογία των κυττάρων (εμβαδό, μήκος, πλάτος, διάμετρος κ.ά.), το σχήμα των κυττάρων (καμπυλότητα, λόγος μήκους/πλάτος) και τη χρωματική τους κατανομή (χρώση, κοκκίωση κ.ά.).
 - Σε κάθε εικόνα μετρήθηκε η ένταση της χρώσης τόσο της maspin όσο και του VEGF στα καρκινικά κύτταρα και το ποσοστό της θετικής έκτασης σε σχέση με το συνολικό ιστό της εικόνας.
 - Σε κάθε περιστατικό, η ένταση της χρώσης της maspin και του VEGF και το ποσοστό της θετικής περιοχής μετρήθηκε και στον παρακείμενο του νεοπλασματικού

φυσιολογικό ιστό, για τη χρησιμοποίησή του ως εσωτερικού μάρτυρα.

- Για τη μέτρηση του CD34:
 - Μέτρηση παραμέτρων των λιποκυτταρικών στοιχείων (αριθμός, εμβαδό, διάμετρος, λόγος μήκους/πλάτος, ποσοστό επιφανείας).
 - Μέτρηση παραμέτρων των κυτταρικών στοιχείων (εμβαδό, ποσοστό επιφανείας).
 - Μέτρηση παραμέτρων των αγγείων (αριθμός, εμβαδό, διάμετρος, λόγος μήκους/πλάτος, ποσοστό επιφανείας).
- Οι περιοχές στην κάθε εικόνα περιγράφηκαν με τη χρήση του «irregular area of interest» εργαλείου, το οποίο περιέχονταν στο Image-Pro Plus πρόγραμμα σε συνδυασμό με ένα «Intuos digitizing pen» και η συνολική περιγραφείσα περιοχή υπολογίστηκε.
- Οι νεοπλασματικές καθώς και οι μη-νεοπλασματικές γειτονικές περιοχές, οι οποίες χρωματίστηκαν από τα αντισώματα, εντοπίστηκαν και μετρήθηκαν με τη βοήθεια του software «histogram-based algorithm».
- Τα επίπεδα έντασης της χρώσης της maspin και του VEGF μετρήθηκαν με τη χρήση arbitrary units σε μία γραμμική συνεχή κλίμακα από το 0 (μέγιστη ένταση) έως το 255 (μη ανιχνεύσιμη ένταση), για κάθε RGB (Red – Green – Blue) κανάλι (διαδικασία που ονομάζεται: color segmentation).

- Υπολογίζοντας τις μέσες τιμές από τα δεδομένα 7-10 εικόνων για κάθε περιστατικό, οι οποίες υπέστησαν επεξεργασία από το Image Analysis program, λάβαμε στο τέλος μία μέση ένταση χρώσης και ένα μέσο ποσοστό θετικής έκτασης (% περιοχή).
- Όλες οι μετρήσεις απεστάλησαν αυτόματα στο πρόγραμμα Microsoft Excel και αποθηκεύτηκαν σε ξεχωριστά αρχεία για κάθε περιστατικό.
- Η αντίστροφη τιμή της έντασης έγινε αντικείμενο επεξεργασίας από το Microsoft Excel Software.
- Το $IRS_{\text{IMAGE ANALYSIS Score}}$ ($IRS_{\text{I.A.Score}}$) για τη maspin και το VEGF υπολογίστηκε βάσει της παρακάτω φόρμουλας:

$IRS_{\text{I.A.Score}} = (255 - a) \times b\%$, όπου:

a = η μετρημένη ένταση της χρώσης της maspin ή του VEGF (διακύμανση μεταξύ 0 – 255) και

b = το ποσοστό των θετικών κυττάρων.

- Για το CD34 η μέτρηση αφορούσε στον αριθμό αγγείων ανά μονάδα επιφανείας (No / mm^2).

III-1.6 Στατιστικές μέθοδοι

Μετά τις μετρήσεις της περιγραφικής στατιστικής, εκτιμήθηκαν οι σχέσεις μεταξύ των: VEGF ($IRS_{\text{I.A.Score}}$), ολική maspin ($IRS_{\text{I.A.Score}}$),

πυρηνική maspin ($IRS_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$), κυτταροπλασματική maspin ($IRS_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$), CD34 (No/mm^2) και των ποικίλων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων (ηλικία, grade, μέγεθος του όγκου, status των μασχαλαίων λεμφαδένων, μεταστάσεις, stage, οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), προγεστερονικοί υποδοχείς (PR), HER2 status, θετικότητα των ki-67 και p53 και μοριακή ταξινόμηση της νόσου).

Given the marked deviation from normality of the scores (as attested by the Shapiro-Wilk test), non-parametric statistical tests were performed; specifically, Spearman's rank correlation coefficient, Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test for independent samples and Kruskal-Wallis (KW) test were undertaken, as appropriate. The assessment of the intercorrelations between the aforementioned parameters should be deemed exploratory, due to the multiple underlying comparisons-tests.

In order to overcome the statistical problem of multiple comparisons and ascertain the independence of associations, stepwise multivariate ordinal logistic regression was performed; total maspin IRS score ($IRS_{\text{I.A.SCORE}}$) was converted into ordinal variable using a 4-level scale (1: minimum value-25th percentile; 2: 25th percentile – median; 3: median - 75th percentile, 4: 75th percentile-maximum value). The proportionality-of-odds assumption was evaluated by the appropriate likelihood ratio test. The level of statistical significance was set at 0.05. Statistical analyses were performed with STATA 11.1 software (StataCorp, College Station, TX, USA).

III-2**Αποτελέσματα**

III-2.1 Περιγραφή του δείγματος της έρευνας

Πίνακας 9

Ο Πίνακας 9 παρουσιάζει τη γενική περιγραφή του δείγματος της μελέτης.

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν μεταξύ 33 και 86 ετών (63.3 ± 12.5 έτη, mean \pm SD). Στη μοριακή ταξινόμηση οι κατηγορίες Luminal A (33.3%) και Luminal B (36.1%) ήταν οι επικρατέστερες. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων αποτελούνταν από καρκινώματα grade III (70.8%). Σχεδόν τα μισά περιστατικά ήταν stage II (II_A: 29.2% και II_B: 20.8%). T2 (54.2%) και NO (ακόμη 54.2%) ήταν οι συχνότερες κατηγορίες όσον αφορά στο μέγεθος του όγκου και το status των μασχαλιαίων λεμφαδένων, αντίστοιχα. Απομακρυσμένες μεταστάσεις υπήρχαν στο 10.4% των περιπτώσεων. Θετικότητα των p53, ER, PR και HER2 υπήρχε σε ποσοστό 29.2%, 58.3%, 45.8% και 33.3% των περιπτώσεων, αντίστοιχα. Οι παράγοντες: VEGF (IRS_{I.A.SCORE}), ολική maspin (IRS_{I.A.SCORE}), πυρηνική maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}), κυτταροπλασματική maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}), CD34 (No/mm²) και ki-67 (%) φαίνονται στον Πίνακα 9.

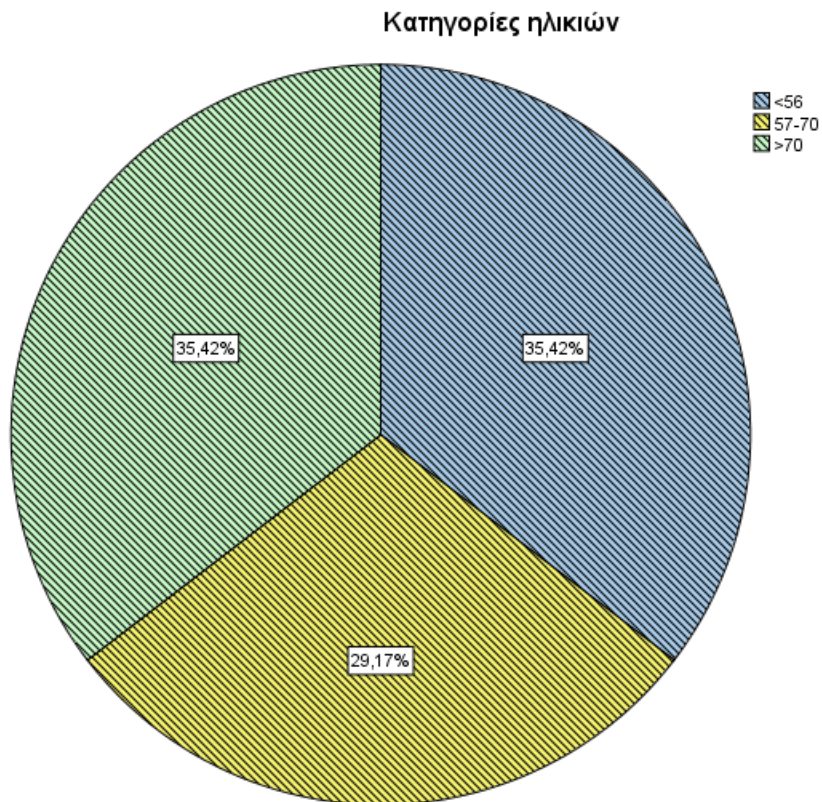
Συνεχείς μεταβλητές	mean \pm SD
Ηλικία (έτη)	63.3 \pm 12.5
VEGF (IRS _{I.A.SCORE})	1716 \pm 1154
Ολική maspin (IRS _{I.A.SCORE})	763 \pm 1025

Πυρηνική maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	3.31±2.73
Κυτταροπλασματική maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	2.75±2.34
CD34 (No/mm ²)	220±201
Ki-67 (%)	20.5±21.3
Categorical και ordinal μεταβλητές	N (%)
Μοριακή ταξινόμηση	
<i>luminal A</i>	12 (33.3)
<i>luminal B</i>	13 (36.1)
<i>HER2-overexpressing</i>	6 (16.7)
<i>triple negative</i>	5 (13.9)
Grade	
1	4 (8.3)
2	10 (20.8)
3	34 (70.8)
Stage	
I	9 (18.7)
II _A	14 (29.2)
II _B	10 (20.8)
III _A	3 (6.3)
III _B	7 (14.6)
IV	

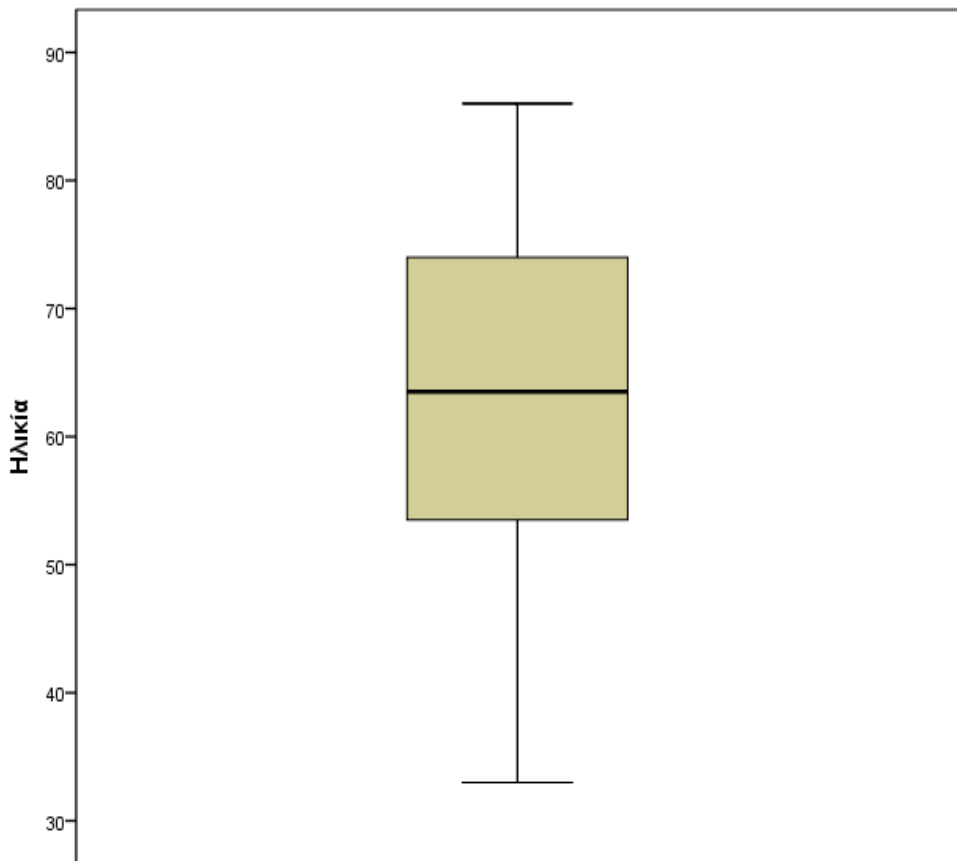
	5 (10.4)
Μέγεθος όγκου	
<i>T1</i>	12 (25.0)
<i>T2</i>	26 (54.2)
<i>T3</i>	8 (16.7)
<i>T4</i>	2 (4.2)
Status μασχαλιαίων λεμφαδένων	
<i>N0</i>	26 (54.2)
<i>N1</i>	10 (20.8)
<i>N2</i>	5 (10.4)
<i>N3</i>	7 (14.6)
Μεταστάσεις	
<i>M0</i>	43 (89.6)
<i>M1</i>	5 (10.4)
Έκφραση του p53	
<i>θετική</i>	14 (29.2)
<i>αρνητική</i>	34 (70.8)
ER status	
<i>θετική</i>	28 (58.3)
<i>αρνητική</i>	20 (41.7)
PR status	
<i>θετική</i>	22 (45.8)

αρνητική HER2 status	26 (54.2)
θετική αρνητική	16 (33.3) 32 (66.7)

Πίνακας 9: Γενική περιγραφή του δείγματος της μελέτης.

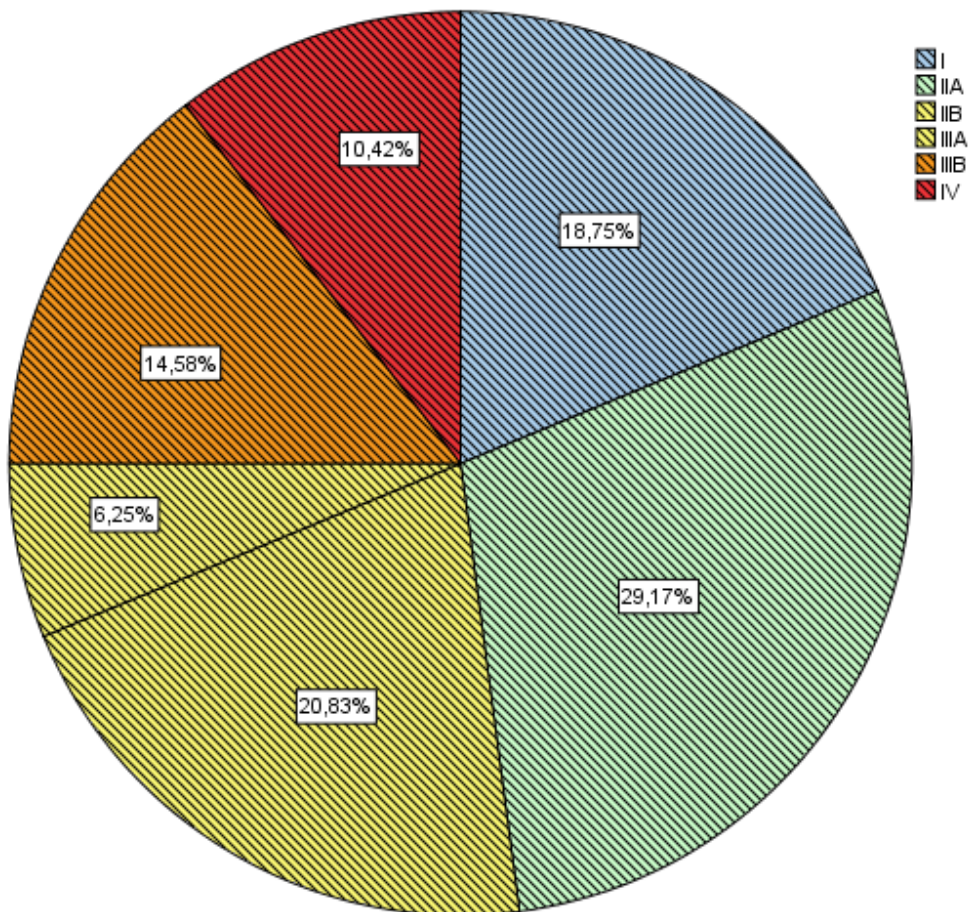


Γράφημα 1: Κατηγορίες των ηλικιών.

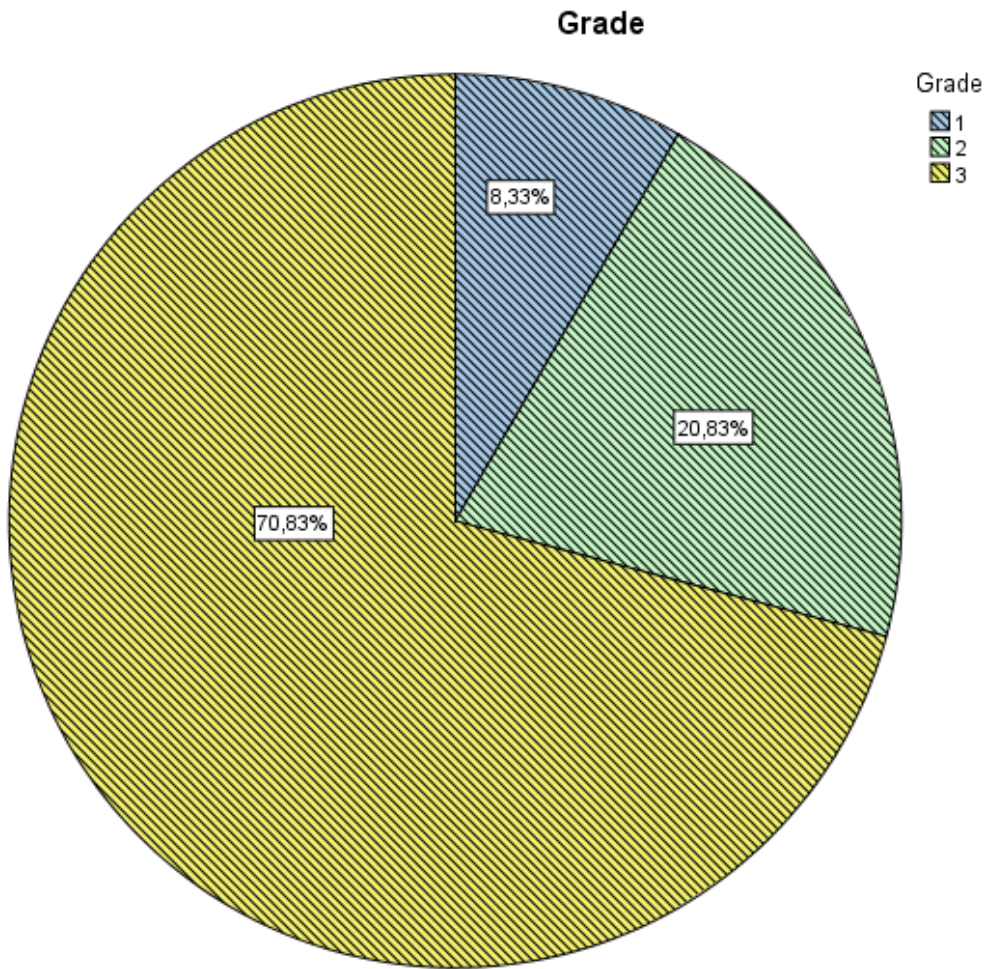


Γράφημα 2: *Box-plot (θηκόγραμμα) των ηλικιών, όπου φαίνονται το εύρος τιμών, η διάμεσος τιμή και το 50% των κεντρικών τιμών.*

Στάδιο νόσου

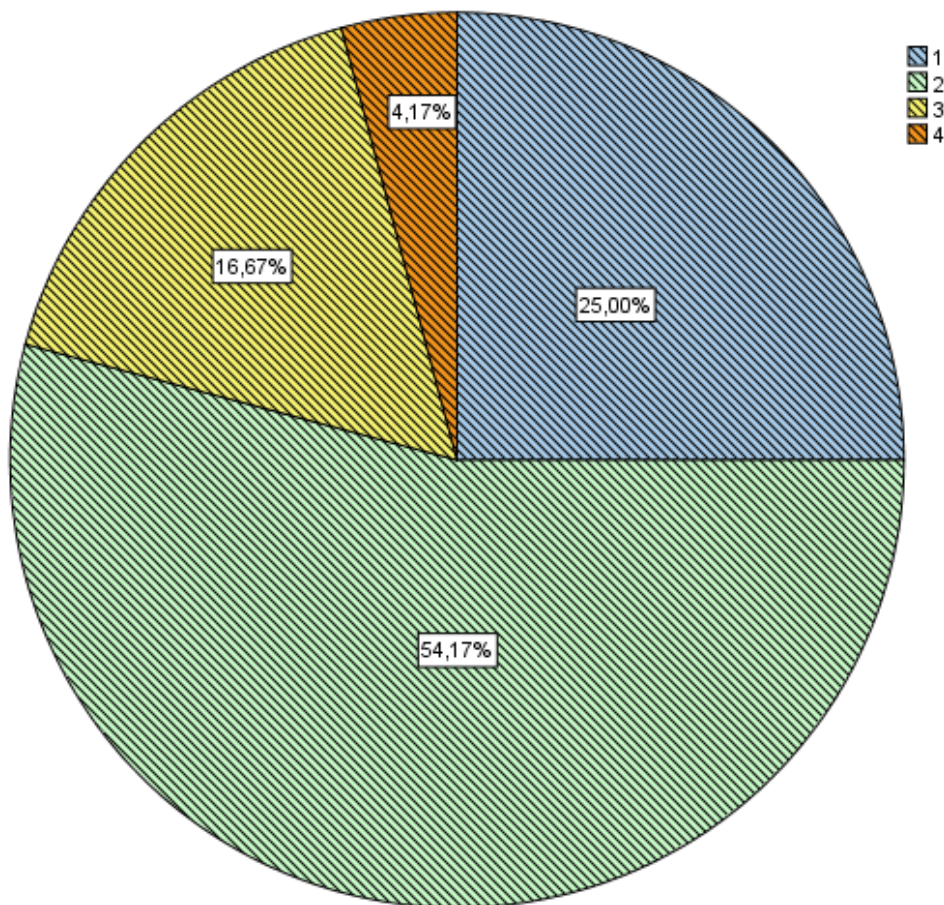


Γράφημα 3: Σταδιοποίηση της νόσου (Staging) – φαίνονται τα ποσοστά ανά στάδιο – I, II A, II B, III A, III B, IV (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.4).



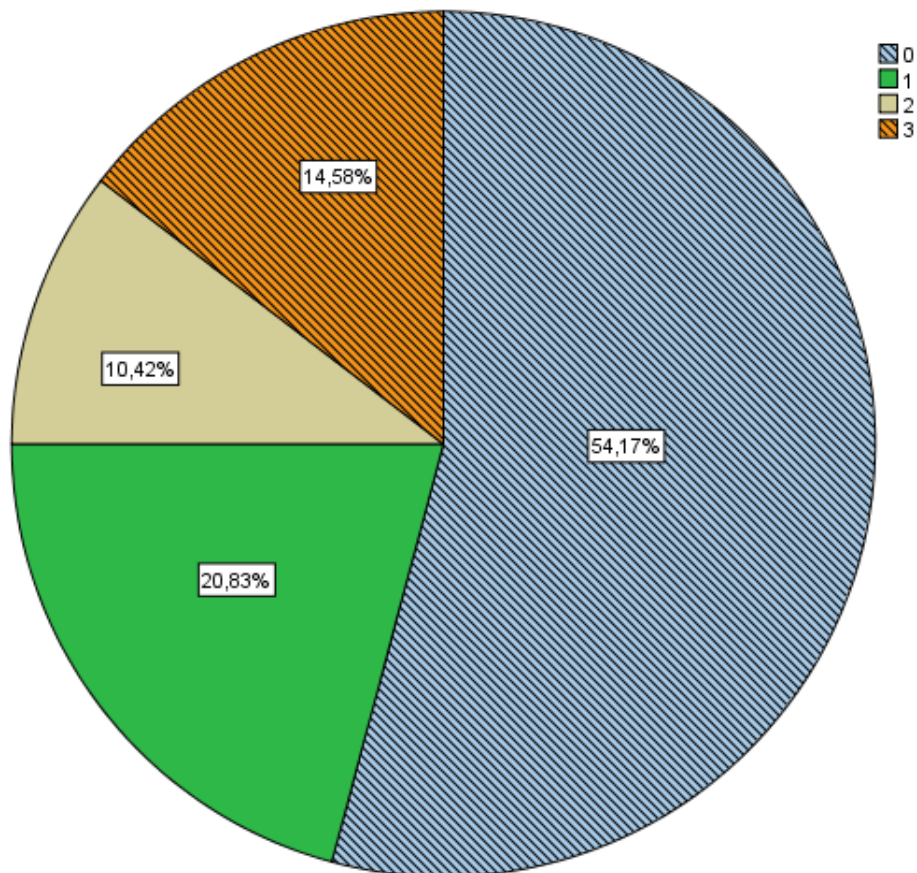
Γράφημα 4: Βαθμός κακοήθειας της νόσου (Grade). Διαβάθμιση από 1-3 (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.3.2).

Μέγεθος όγκου Tumor size (T)

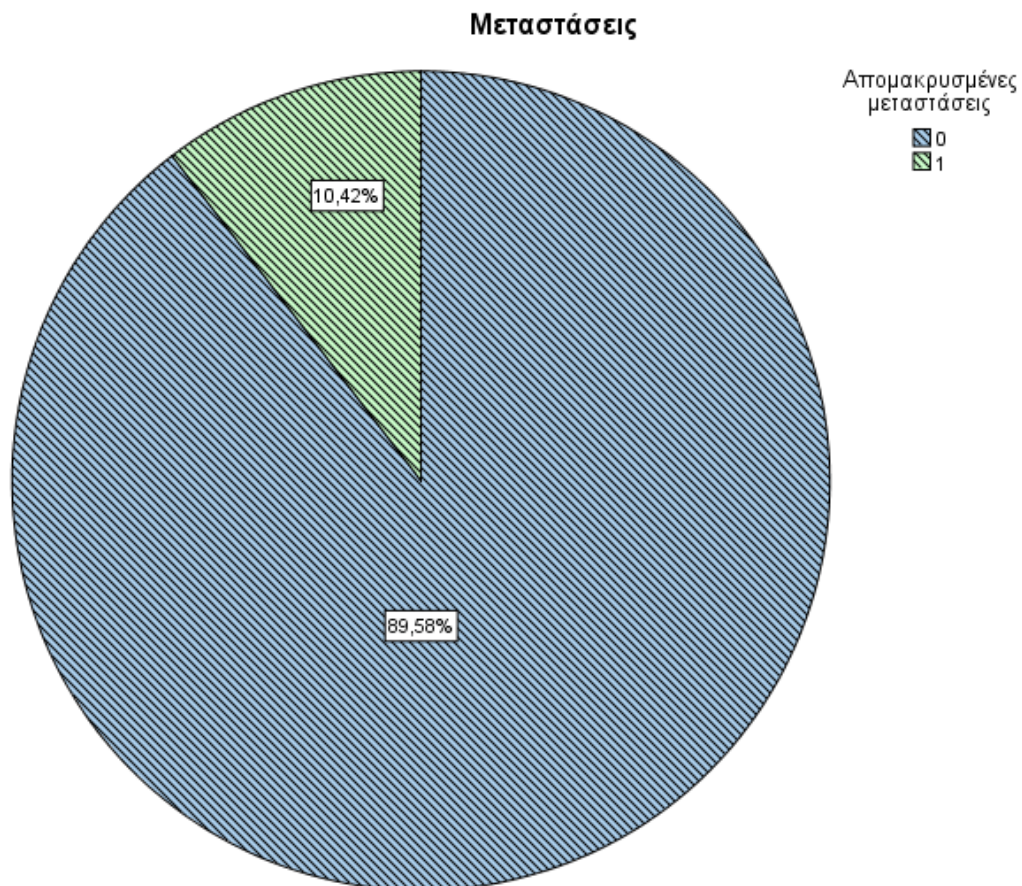


Γράφημα 5: Μέγεθος του όγκου – Tumor size (T). Διαβάθμιση: από T1-T4 (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.4).

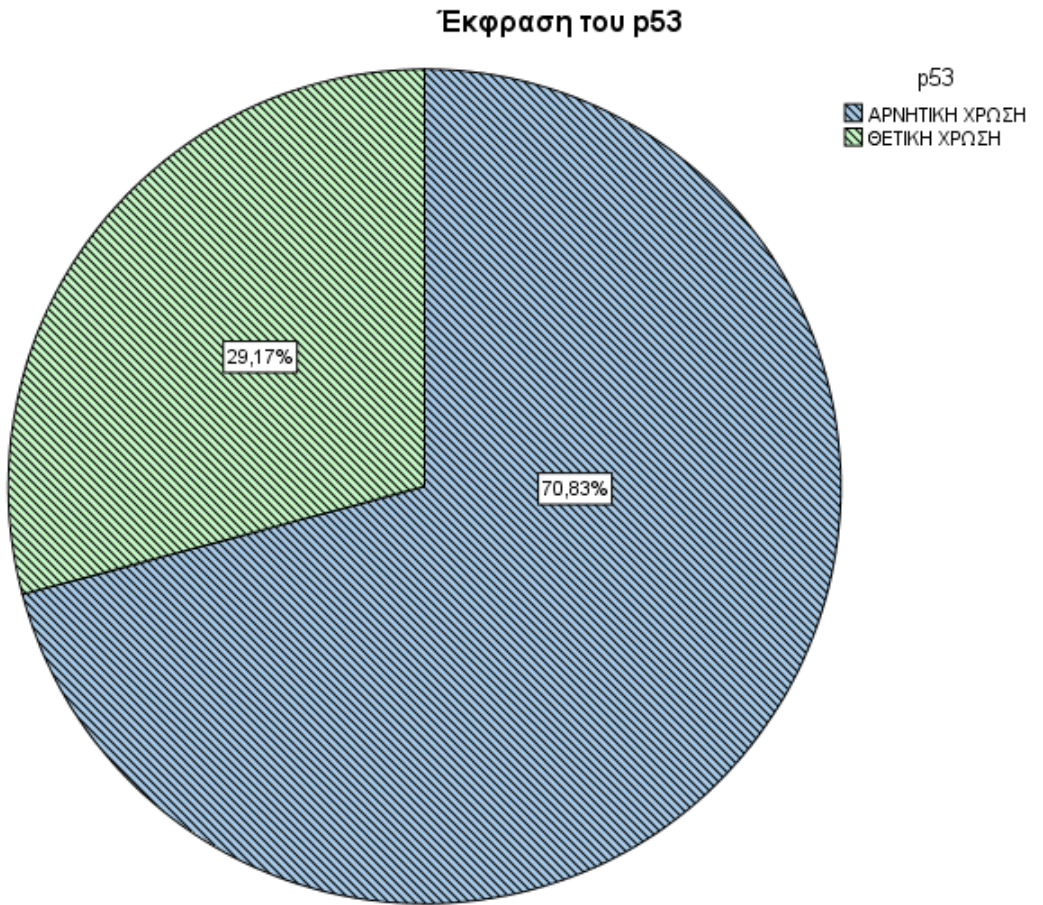
Status μασχαλιαίων λεμφαδένων



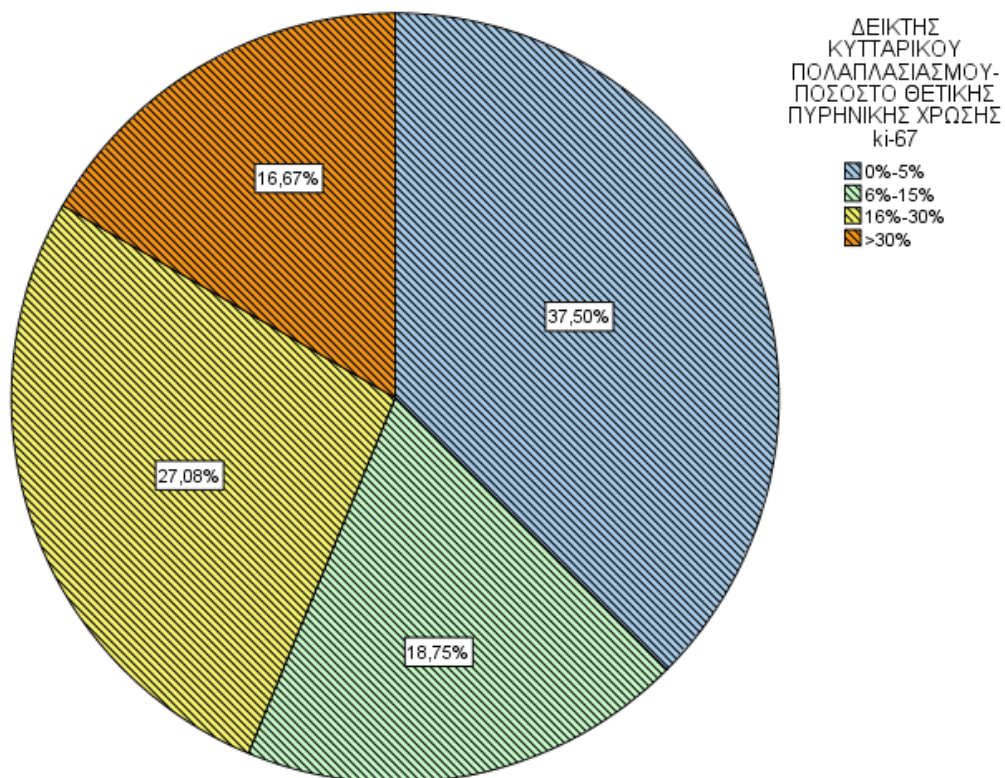
Γράφημα 6: Status των μασχαλιαίων λεμφαδένων – Nodal status (N). Διαβάθμιση: από N0-N3 (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.4).



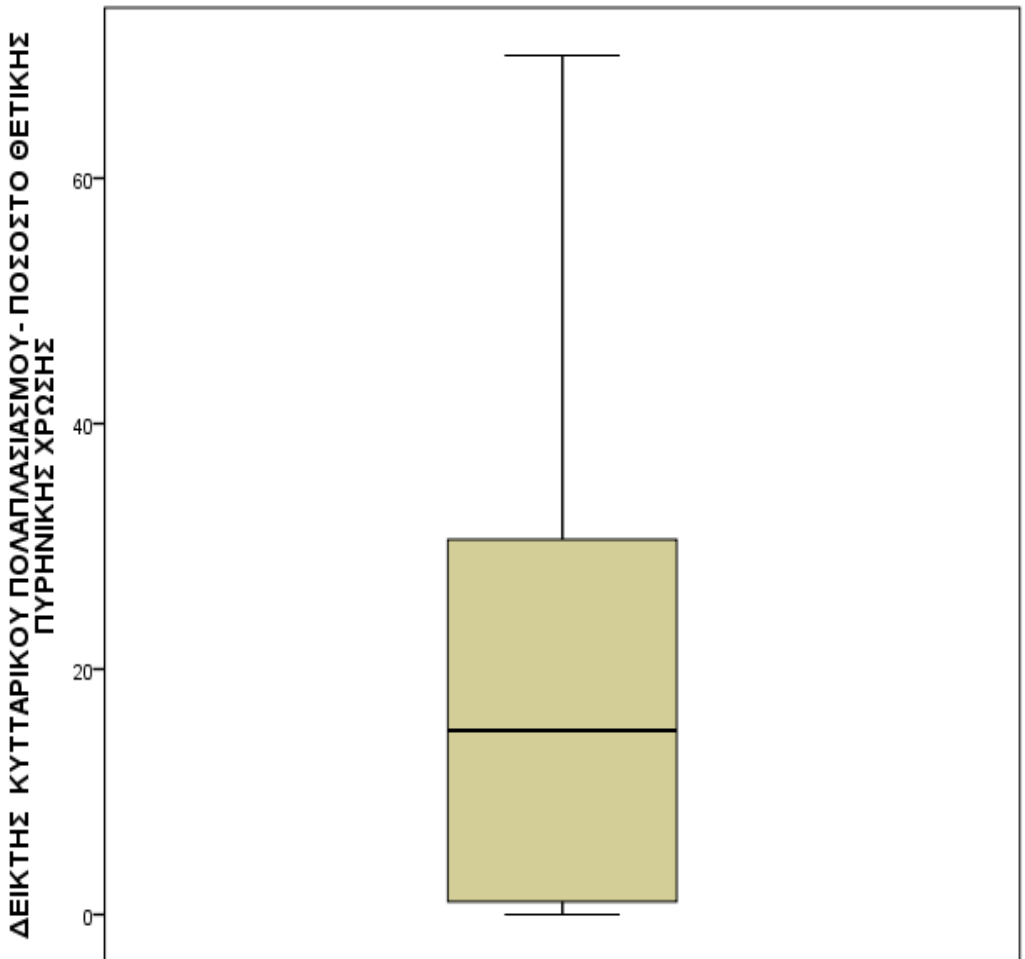
Γράφημα 7: Απομακρυσμένες μεταστάσεις – *Distant Metastases (M)*.
0=όχι, 1=ναι (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.4).



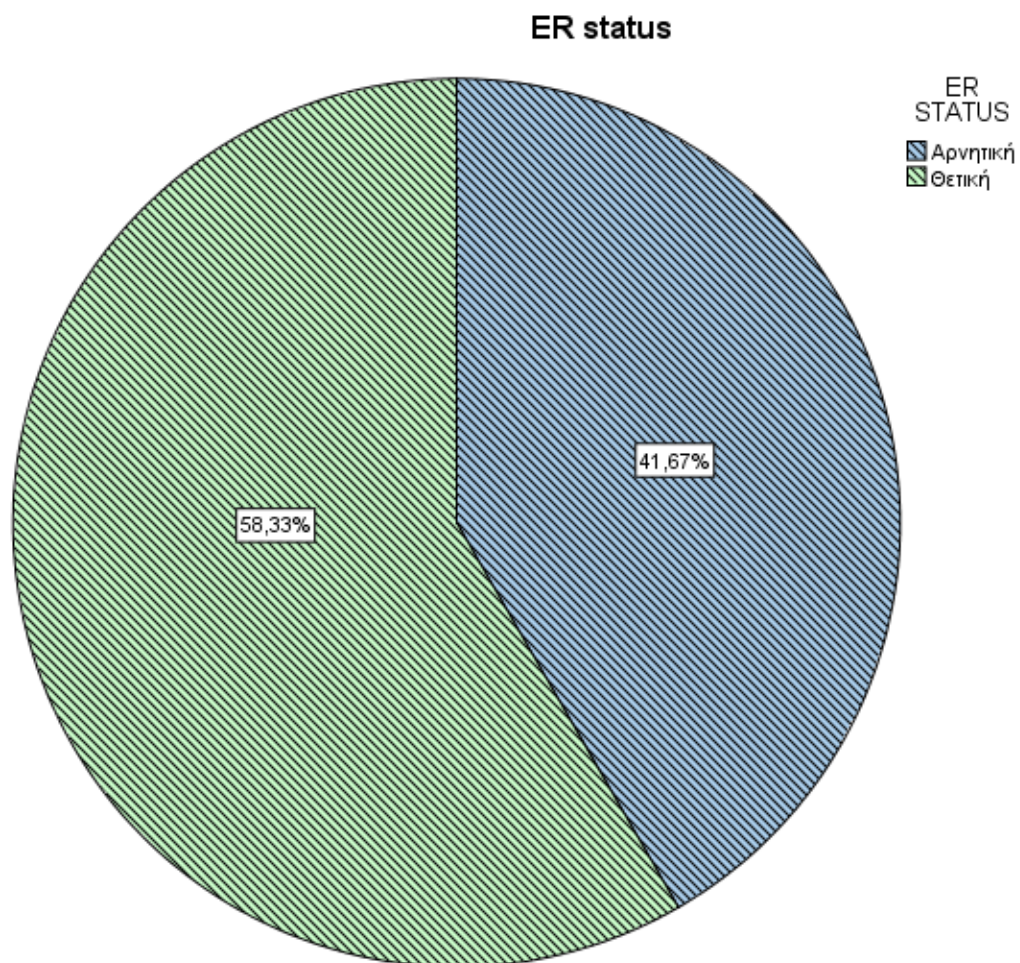
Γράφημα 8: Το status του μεταλλαγμένου p53 στον όγκο (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).

ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ-ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ki-67

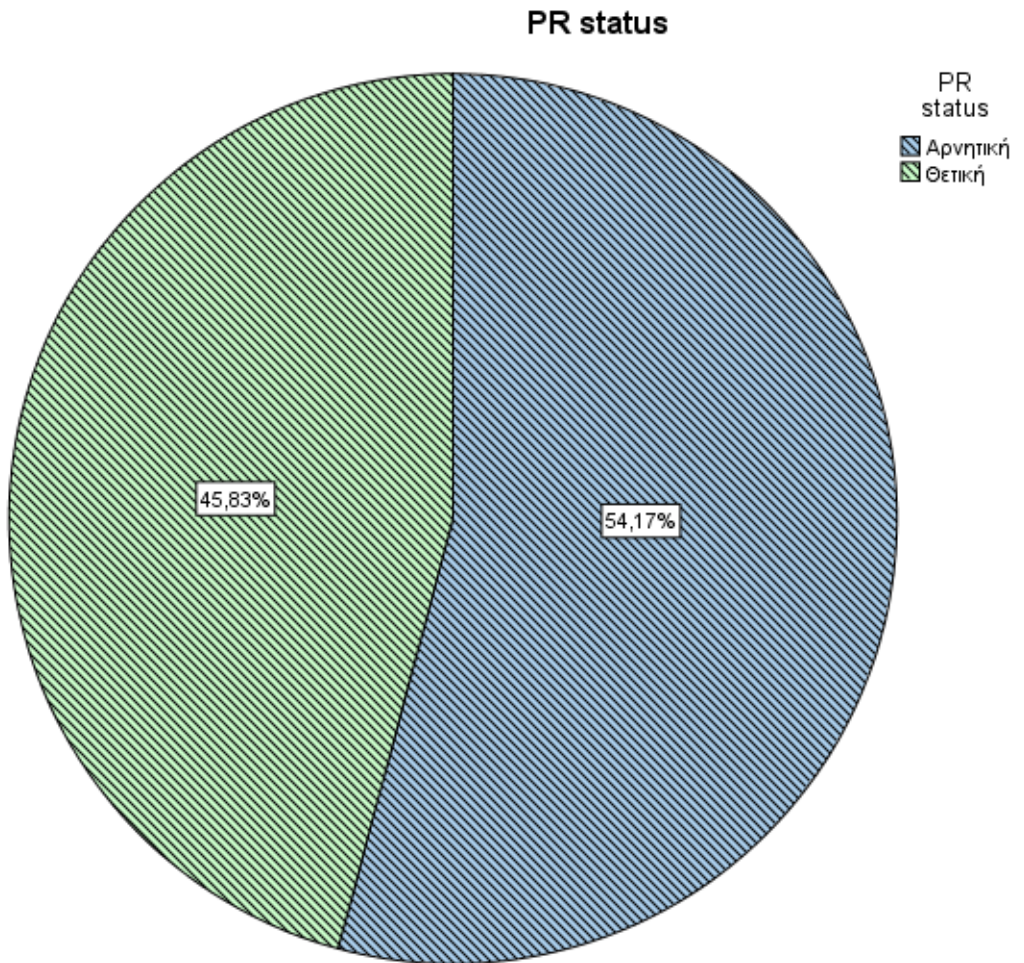
Γράφημα 9: Τα ποσοστά των καρκινικών κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67 (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).



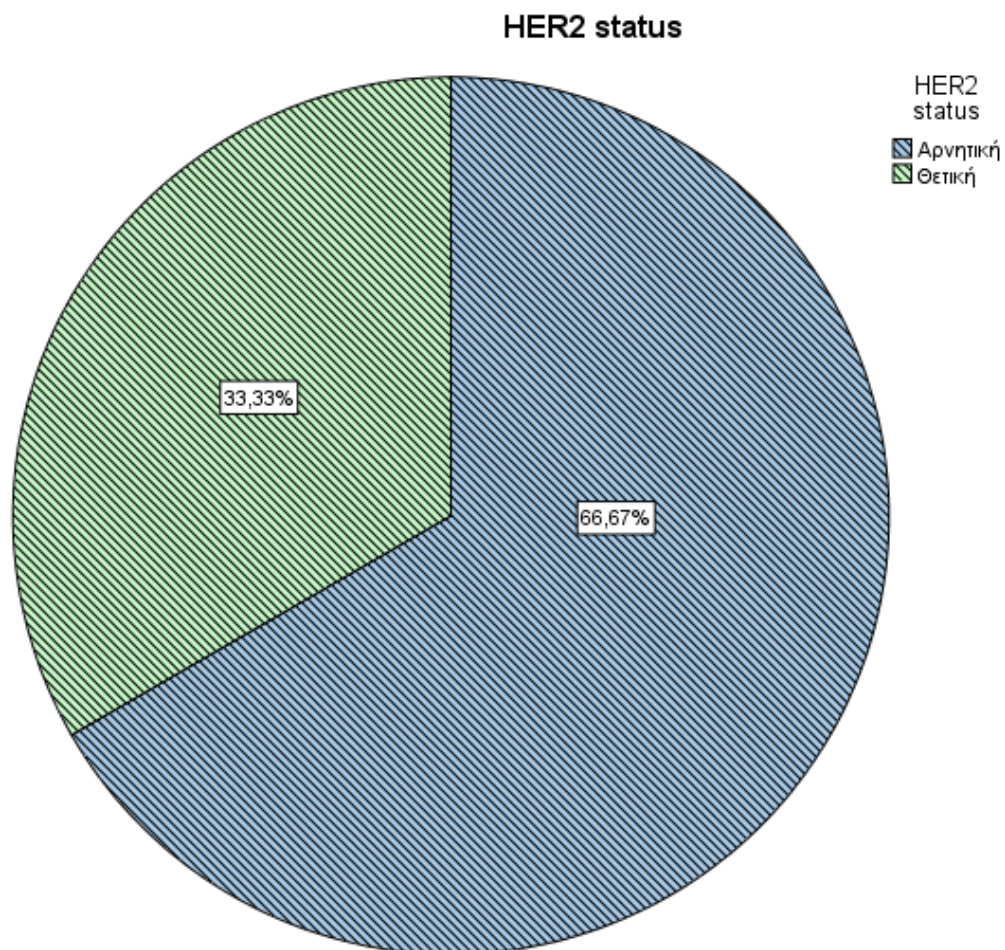
Γράφημα 10: Box-plot (θηκόγραμμα) των ποσοστών των καρκινικών κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ki-67, όπου φαίνονται το εύρος τιμών, η διάμεσος τιμή και το 50% των κεντρικών τιμών.



Γράφημα 11: Το status των οιστρογονικών υποδοχέων – Estrogen Receptors (ER) (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).

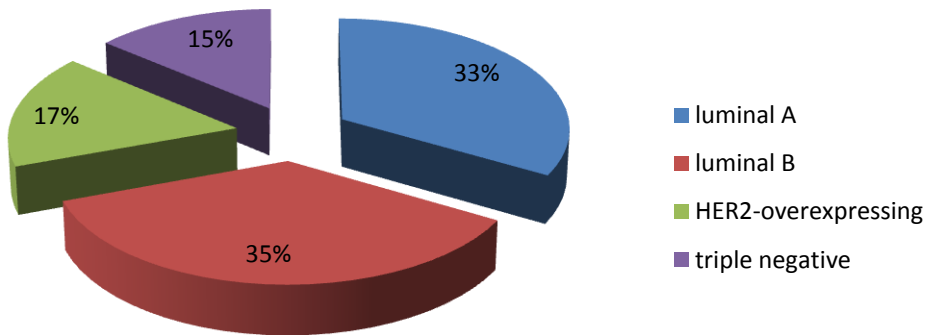


Γράφημα 12: Το status των προγεστερονικών υποδοχέων – Progesterone Receptors (PR) (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).



Γράφημα 13: Το status του υποδοχέα HER2 (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).

Μοριακή ταξινόμηση



Γράφημα 14: Η μοριακή ταξινόμηση των όγκων του δείγματος (για επεξήγηση βλ. Κεφ. II-3.5 & III-1.4).

III-2.2 Καταγραφή των μετρήσεων από το Computerized Image Analysis (CIA) και από το οπτικό μικροσκόπιο (Light Microscopy – LM)

Πίνακας 10

Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει αναλυτικά όλες τις μετρήσεις του Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος. Φαίνονται οι τιμές που ελήφθησαν για: (α') το CD34 (No αγγείων/mm²), (β') το ακριβές ποσοστό της επιφανείας του ιστού με θετική κυτταροπλασματική χρώση VEGF, (γ') την ένταση της χρώσης του VEGF (τιμές 0-255), (δ') το ακριβές ποσοστό της επιφανείας του ιστού με θετική πυρηνική και/ή κυτταροπλασματική χρώση maspin και (ε') την ένταση της χρώσης της maspin (τιμές 0-255). Σημειώνεται πως: η ένταση χρώσης του VEGF και της maspin με το CIA σύστημα μετράται από 0-255, όπου το 0 αντιστοιχεί στη μέγιστη ένταση και το 255 σε μηδενική ένταση χρώσης.

Αρ. Περ.	CD34 (No /mm ²)	VEGF (%)	VEGF (ένταση χρώσης)	maspin (%)	maspin (ένταση χρώσης)
1	139,442	1,084	172,506	1,596	177,321
2	309,303	39,853	200,024	5,382	187,979
3	281,138	52,470	184,645	0,987	163,054
4	305,427	15,241	196,193	1,075	167,567

5	152,714	25,637	202,488	17,901	186,758
6	167,442	8,318	194,436	9,620	175,710
7	119,380	6,720	174,523	8,479	172,863
8	148,838	6,168	189,824	0,077	144,253
9	167,442	34,736	184,166	0,039	126,533
10	74,419	6,088	185,171	0,242	122,318
11	88,372	0,402	184,494	1,032	130,506
12	371,319	12,064	190,322	0,158	167,908
13	86,822	22,727	192,036	20,711	162,762
14	202,791	6,700	170,468	31,566	157,243
15	163,101	25,333	191,005	14,641	165,249
16	207,753	20,710	193,064	13,776	170,728
17	258,915	15,881	185,378	19,956	146,176
18	129,199	7,645	186,399	0,019	137,932
19	227,908	23,614	186,782	0,065	121,285
20	93,024	3,542	191,481	0,005	175,451
21	224,032	32,530	192,911	1,670	188,421
22	239,536	39,075	179,060	11,383	173,756
23	67,597	21,048	197,750	32,865	174,361
24	135,659	35,490	173,570	0,012	144,550
25	660,209	24,436	179,929	19,960	162,013
26	226,357	3,949	142,468	7,014	145,966
27	131,783	11,487	170,421	7,804	160,020
28	59,432	17,084	156,871	23,673	175,206
29	143,153	36,928	196,841	11,422	190,990
30	189,148	6,506	171,430	0,369	160,417
31	113,179	57,958	186,604	1,206	160,086
32	129,199	16,940	194,809	1,448	137,124
33	163,566	35,739	188,681	1,107	153,688
34	198,967	58,896	177,458	0,239	153,591
35	650,131	22,634	190,366	9,220	138,192
36	1036,902	34,937	178,264	47,283	150,745
37	208,528	46,774	190,579	0,071	164,149
38	71,318	60,596	182,785	0,587	158,053
39	173,024	53,035	188,022	20,169	169,496

40	143,876	31,345	179,928	3,465	162,865
41	185,013	3,748	172,395	2,870	169,669
42	930,235	20,398	161,486	1,111	152,866
43	84,496	35,880	183,846	0,056	178,267
44	107,494	22,706	156,555	8,293	141,243
45	245,996	19,516	148,679	1,208	185,992
46	140,569	12,031	162,676	0,711	159,092
47	122,481	31,433	174,528	24,763	199,526
48	68,992	28,117	188,091	38,775	193,648

Πίνακας 10: Παράθεση όλων των μετρήσεων του *Computerized Image Analysis (CIA)* συστήματος.

Πίνακας 11: Ο Πίνακας 11 παρουσιάζει αναλυτικά όλες τις μετρήσεις που έγιναν με το οπτικό μικροσκόπιο (Light Microscopy – LM). Φαίνονται οι τιμές που ελήφθησαν για: (α') το ποσοστό των κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση της maspin, (β') την ένταση της πυρηνικής χρώσης της maspin (τιμές 0-3), (γ') το ποσοστό των κυττάρων με θετική κυτταροπλασματική χρώση της maspin και (δ') την ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης της maspin (τιμές 0-3).

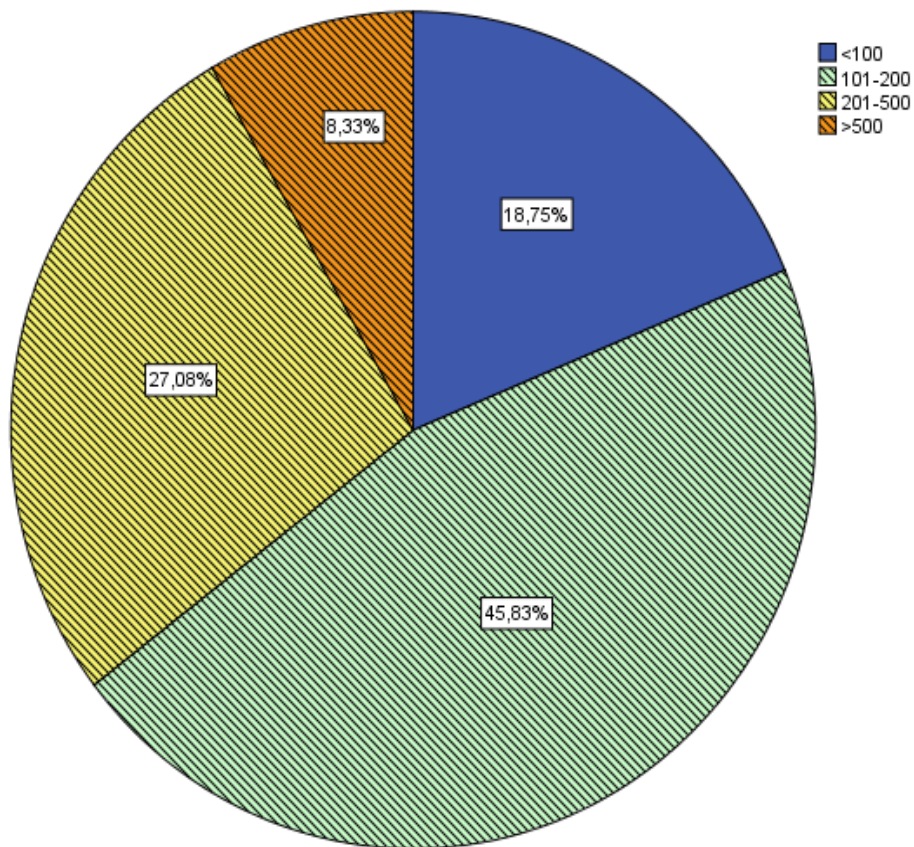
AA	Πυρηνική maspin (%)	Πυρηνική maspin (Ένταση χρώσης) (0-3)	Κυτταροπλ. maspin (%)	Κυτταροπλ. Maspin (Ένταση χρώσης) (0-3)
1	1	1	15	1
2	0	0	15	2

3	2	1	5	3
4	2	3	5	3
5	25	2	30	2
6	20	2	35	2
7	25	3	10	1
8	1	2	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	5	1
12	2	1	0	0
13	25	3	45	3
14	40	3	45	1
15	10	2	40	1
16	10	3	50	3
17	45	3	20	2
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	10	1
22	20	3	35	1
23	15	3	70	2
24	0	0	0	0
25	40	3	45	1
26	70	3	10	1
27	20	3	40	3
28	15	3	40	2
29	15	3	20	1
30	5	3	5	3
31	5	3	3	2
32	1	3	1	2
33	1	3	10	3
34	1	2	3	1
35	60	3	50	3
36	70	3	85	3
37	0	0	1	1

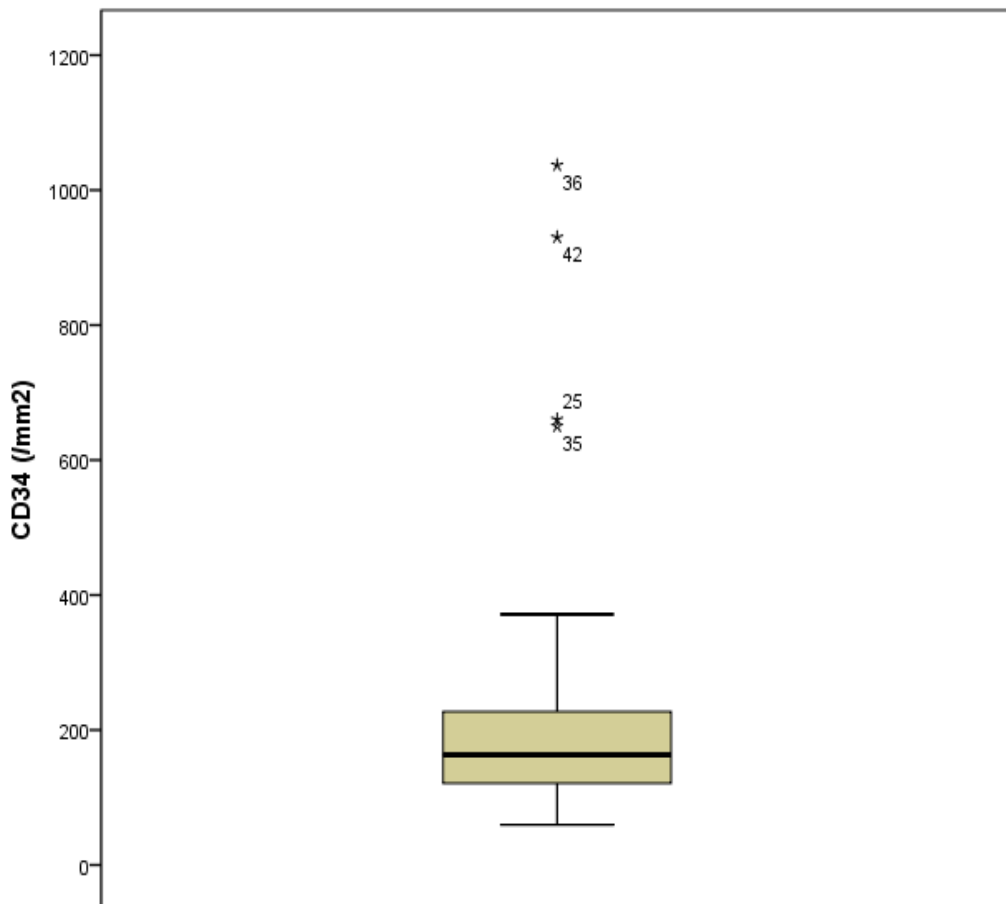
38	2	3	2	2
39	50	3	80	2
40	3	2	10	2
41	5	2	5	2
42	10	2	10	1
43	0	0	3	1
44	45	2	30	1
45	0	0	5	1
46	5	3	5	2
47	15	3	30	2
48	5	2	45	2

Πίνακας 11: Παράθεση όλων των μετρήσεων με το οπτικό μικροσκόπιο (*Light Microscopy – LM*).

Αριθμός αγγείων ανά mm² σημασμένα με το αντίσωμα CD34

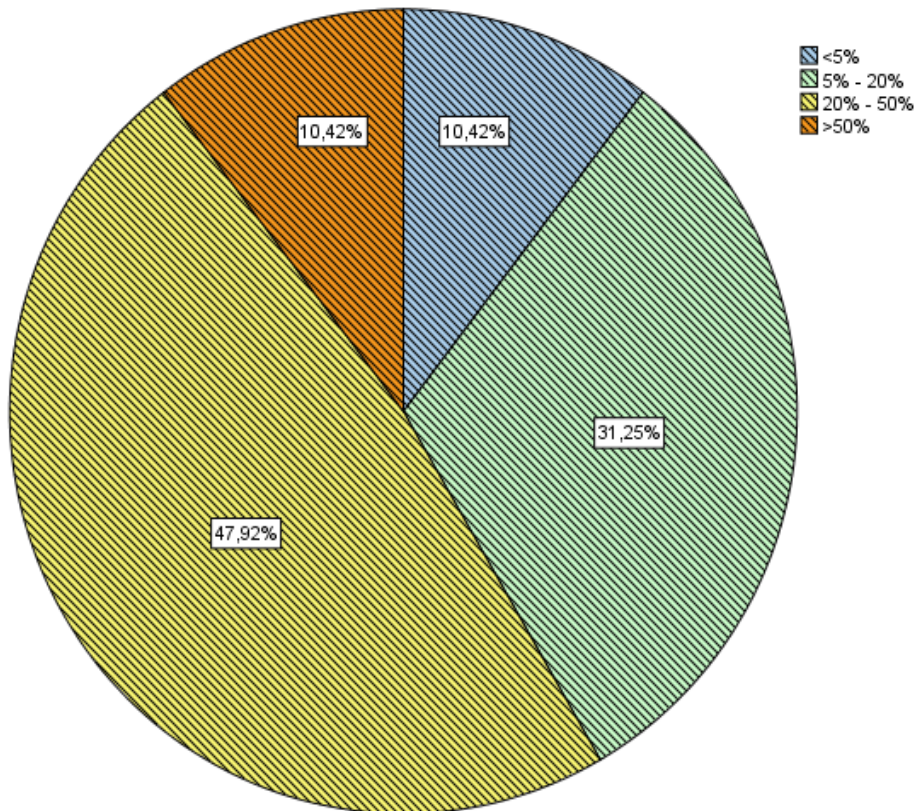


Γράφημα 15: Αριθμός αγγείων / mm² σημασμένων με το αντίσωμα CD34. Μέτρηση με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.5).



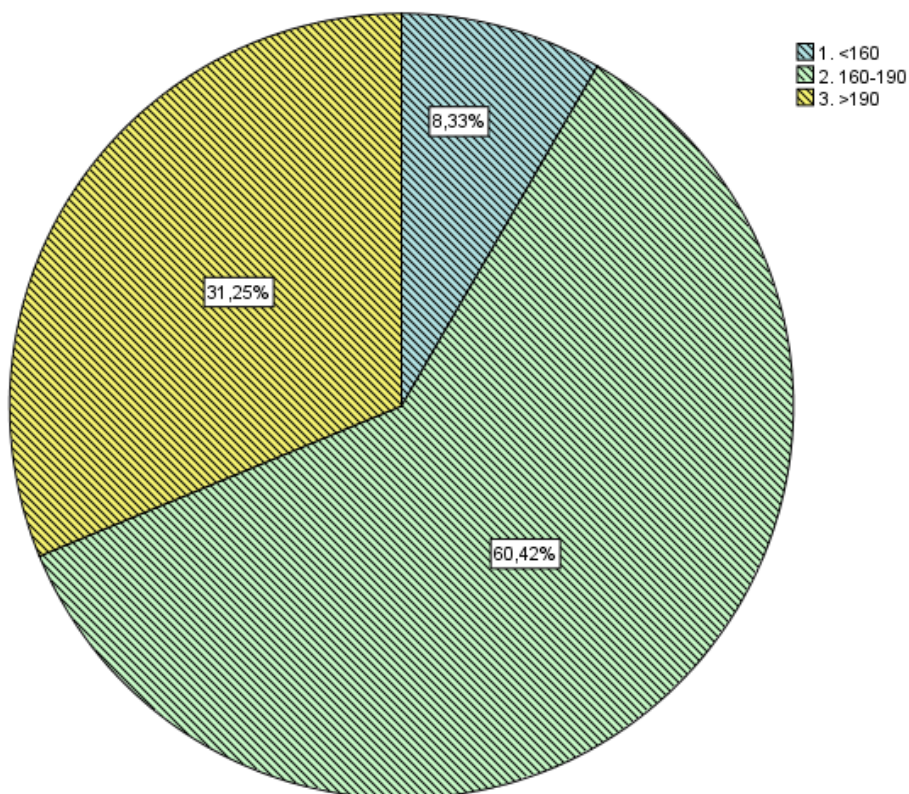
Γράφημα 16: *Box-plot (θηκόγραμμα) του αριθμού των αγγείων σημασμένων με το αντίσωμα CD34, όπου φαίνονται το εύρος τιμών, η διάμεσος τιμή και το 50% των κεντρικών τιμών. Οι αριθμοί που φαίνονται αντιστοιχούν στους αριθμούς των περιστατικών, των οποίων οι αριθμοί των αγγείων απείχαν ιδιαίτερως από τις τιμές των υπολοίπων περιστατικών.*

ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΤΟΥ VEGF ΜΕ COMP. IMAGE ANALYSIS



Γράφημα 17: Ποσοστά θετικής κυτταροπλασματικής χρώσης του VEGF. Μέτρηση με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.5).

ΕΝΤΑΣΗ ΧΡΩΣΗΣ ΤΟΥ VEGF (0-255) ΜΕ COMP. IMAGE ANALYSIS



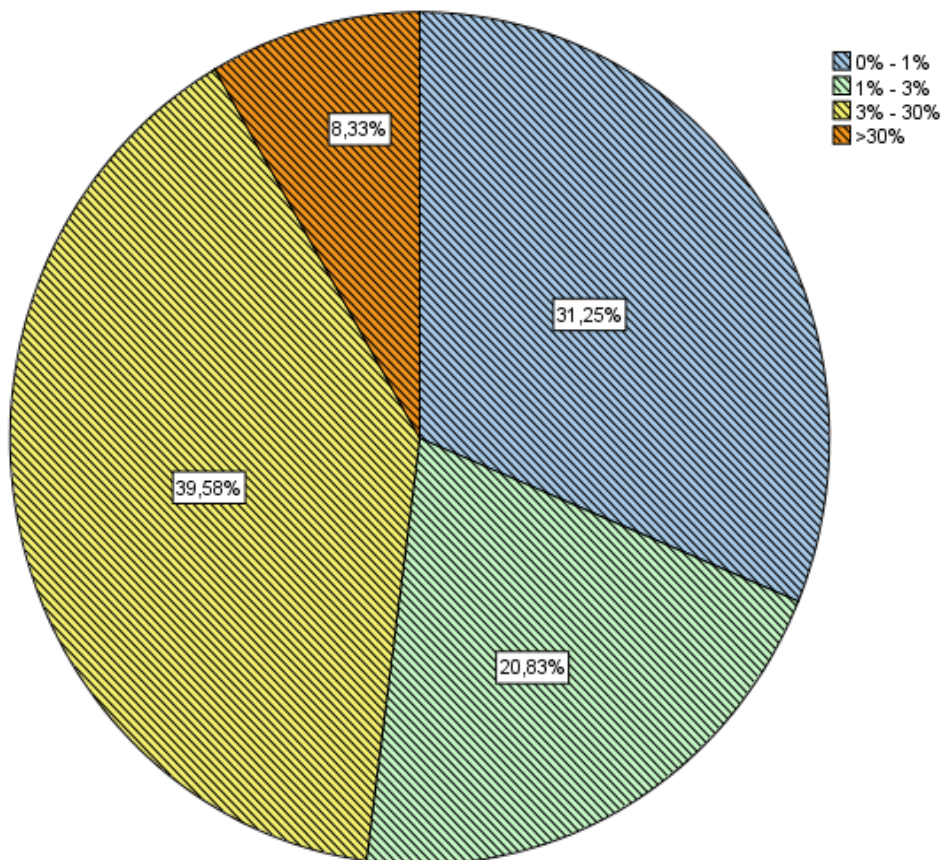
Γράφημα 18: Ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης του VEGF. Μέτρηση με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.5). Σημειώνεται πως οι τιμές της έντασης της χρώσης κυμαίνονται από 0-255, όπου το 0 αντιστοιχεί στη μέγιστη ένταση και το 255 σε μηδενική ένταση χρώσης.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid <5%	5	10,4	10,4	10,4
>50%	5	10,4	10,4	20,8
20% - 50%	23	47,9	47,9	68,8
5% - 20%	15	31,3	31,3	100,0
Total	48	100,0	100,0	

Πίνακας 12: Ποσοστά θετικής κυτταροπλασματικής χρώσης του VEGF με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα.

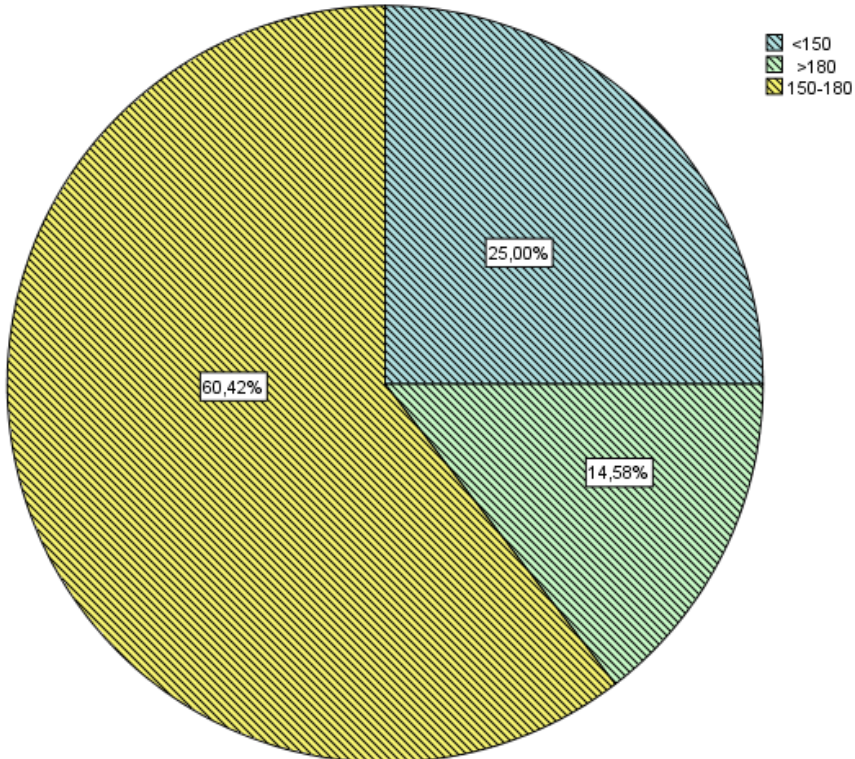
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1. <160	4	8,3	8,3	8,3
2. 160-190	29	60,4	60,4	68,8
3. >190	15	31,3	31,3	100,0
Total	48	100,0	100,0	

Πίνακας 13: Τιμές της έντασης της κυτταροπλασματικής χρώσης του VEGF με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα.

ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΤΗΣ MASPIN ΜΕ COMP. IMAGE ANALYSIS

Γράφημα 19: Ποσοστά θετικής κυτταρικής χρώσης της maspin. Μέτρηση με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.5).

ΕΝΤΑΣΗ ΧΡΩΣΗΣ ΤΗΣ MASPIN (0-255) ΜΕ COMP. IMAGE ANALYSIS



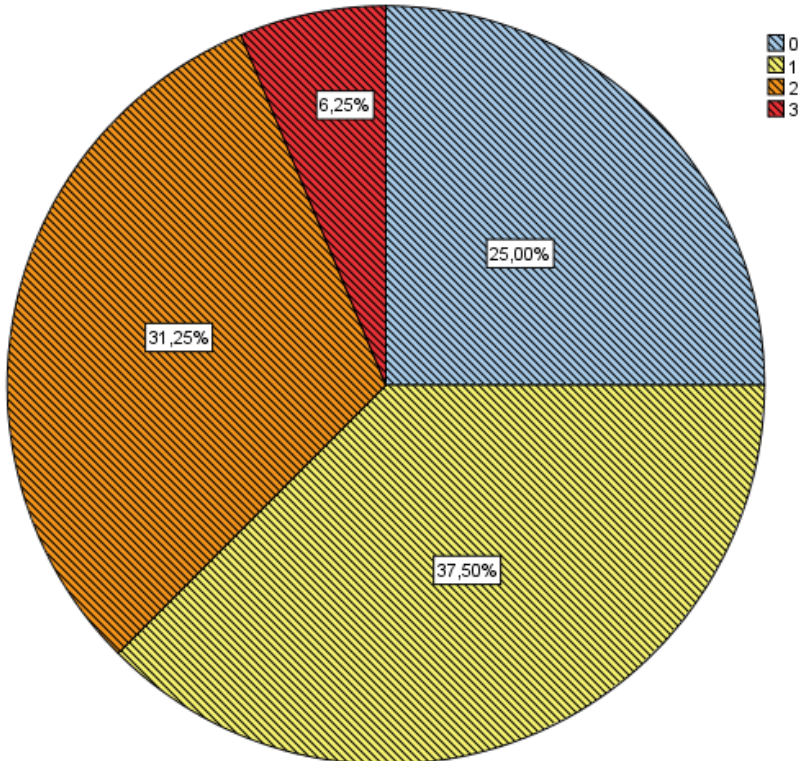
Γράφημα 20: Ένταση της κυτταρικής χρώσης της maspin. Μέτρηση με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.5). Σημειώνεται πως οι τιμές της έντασης της χρώσης κυμαίνονται από 0-255, όπου το 0 αντιστοιχεί στη μέγιστη ένταση και το 255 σε μηδενική ένταση χρώσης.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid >30%	4	8,3	8,3	8,3
0% - 1%	15	31,3	31,3	39,6
1% - 3%	10	20,8	20,8	60,4
3% - 30%	19	39,6	39,6	100,0
Total	48	100,0	100,0	

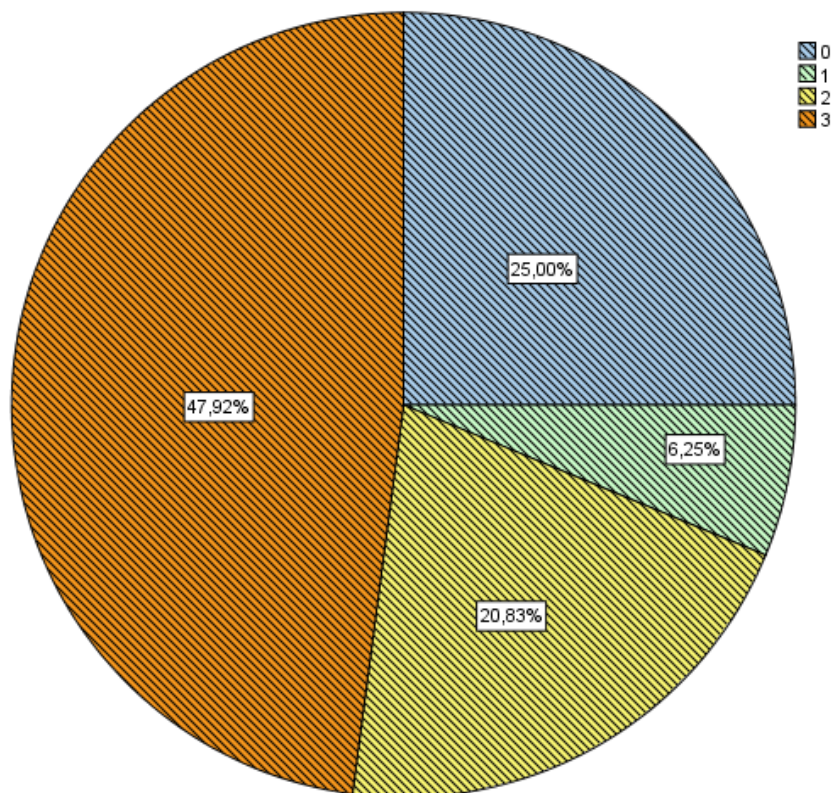
Πίνακας 14: Ποσοστά θετικής κυτταρικής χρώσης της *maspin* με το *Computerized Image Analysis (CIA)* σύστημα.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid >180	7	14,6	14,6	14,6
<150	12	25,0	25,0	39,6
150-180	29	60,4	60,4	100,0
Total	48	100,0	100,0	

Πίνακας 15: Τιμές της έντασης της κυτταρικής χρώσης της *maspin* με το *Computerized Image Analysis (CIA)* σύστημα.

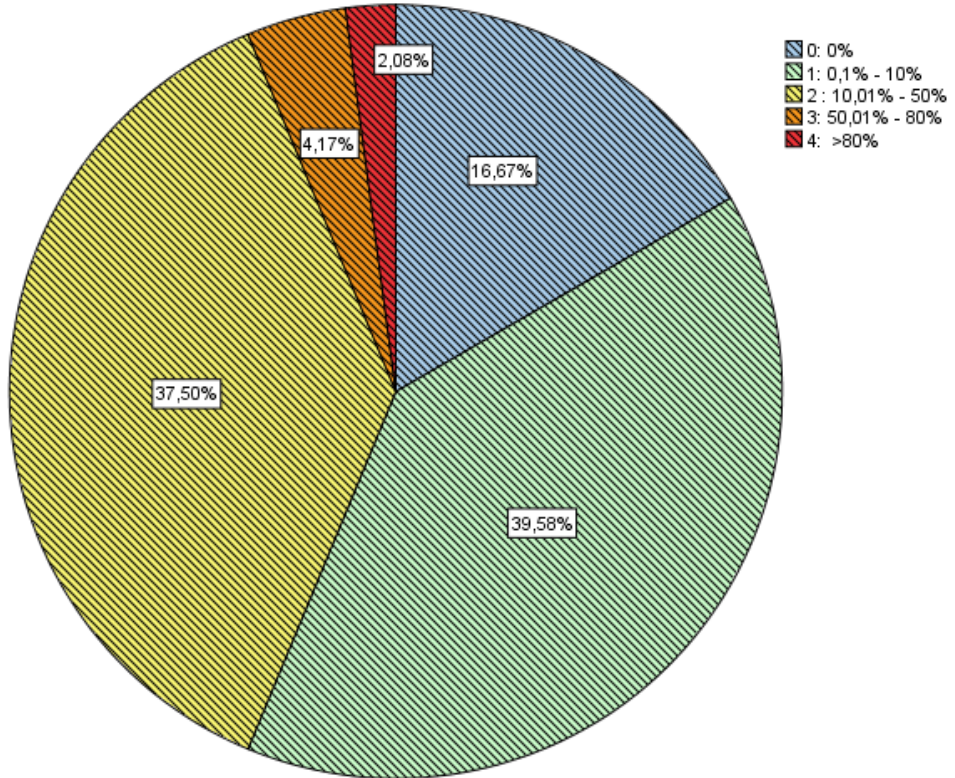
Ποσοστά θετικής πυρηνικής χρώσης για τη *maspin* με το οπτικό μικροσκόπιο

Γράφημα 21: Ποσοστά κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση της *maspin*. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) (για επεξήγηση βλ. Κεφ. ΙΙΙ-1.4). 0= 0%, 1= 0.01-10%, 2= 10.01-50%, 3= >50%. Δεν υπήρχαν περιστατικά με ποσοστό κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση της *maspin* >80%.

Ένταση της χρώσης της maspin του πυρήνα από το οπτικό μικροσκόπιο

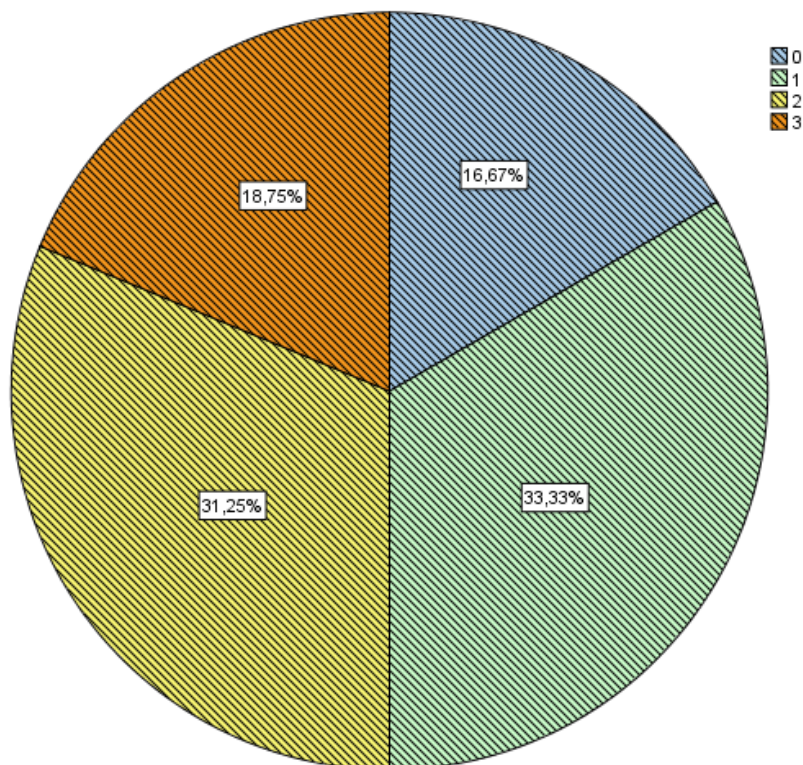
Γράφημα 22: Ένταση της χρώσης της maspin του πυρήνα. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4). Διαβάθμιση από 0-3. 0= καμία χρώση, 1= ασθενής χρώση, 2= μέτριας έντασης χρώση, 3= ισχυρής έντασης χρώση.

Ποσοστά θετικής κυτταροπλασματικής χρώσης για τη *maspin* με το οπτικό μικροσκόπιο



Γράφημα 23: Ποσοστά κυττάρων με θετική κυτταροπλασματική χρώση της *maspin*. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4). 0= 0%, 1= 0.01-10%, 2= 10.01-50%, 3= 50.01-80%, 4= >80%.

Ένταση της χρώσης της *maspin* του κυτταροπλάσματος από το οπτικό
μικροσκόπιο



Γράφημα 24: Ένταση της χρώσης της *maspin* του κυτταροπλάσματος. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – *Light Microscopy (LM)* (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4). Διαβάθμιση από 0-3. 0= καμία χρώση, 1= ασθενής χρώση, 2= μέτριας έντασης χρώση, 3= ισχυρής έντασης χρώση.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0: 0%	12	25,0	25,0	25,0
1: 0.1% - 10%	18	37,5	37,5	62,5
2: 10.01% - 50%	15	31,3	31,3	93,8
3: >50%	3	6,3	6,3	100,0
Total	48	100,0	100,0	

Πίνακας 16: Ποσοστά κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση της *maspin*. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – *Light Microscopy (LM)* (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0: 0%	8	16,7	16,7	16,7
1: 0,1% - 10%	19	39,6	39,6	56,3
2 : 10,01% - 50%	18	37,5	37,5	93,8
3: 50,01% - 80%	2	4,2	4,2	97,9
4: >80%	1	2,1	2,1	100,0
Total	48	100,0	100,0	

Πίνακας 17: Ποσοστά κυττάρων με θετική κυτταροπλασματική χρώση της *maspin*. Μέτρηση με το οπτικό μικροσκόπιο – *Light Microscopy (LM)* (για επεξήγηση βλ. Κεφ. III-1.4).

III-2.3 Υπολογισμοί των $IRS_{PATHOLOGIST SCORES}$ ΚΑΙ ΤΩΝ

$IRS_{I.A.SCORES}$

Πίνακας 18:

Παράθεση όλων των τιμών των 4 IRS scores: (α') του $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της πυρηνικής *maspin* – μετρήσεις με το οπτικό μικροσκόπιο – *Light Microscopy (LM)*, (β') $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της κυτταροπλασματικής *maspin* – μετρήσεις με το LM, (γ') του $IRS_{I.A.SCORE}$ της *maspin* – μέτρηση με το *Computerized Image Analysis (CIA)* σύστημα και (δ') του $IRS_{I.A.SCORE}$ του VEGF – μέτρηση με το CIA σύστημα.

AA	IRS PATHOLOGIST SCORE της πυρηνικής <i>maspin</i>	IRS PATHOLOGIST SCORE της κυτταροπλασματικής <i>maspin</i>	IRS I.A.SCORE της <i>maspin</i>	IRS I.A.SCORE του VEGF
1	1	2	123,976	89,423
2	0	4	360,707	2190,959
3	1	3	90,751	3691,527
4	3	3	93,990	896,277
5	4	4	1221,600	1346,250
6	4	4	762,770	503,771
7	6	1	696,440	540,805

8	2	0	8,528	402,006
9	0	0	5,010	2460,490
10	0	0	32,109	425,119
11	0	1	128,478	28,343
12	1	0	13,761	780,275
13	6	6	1910,341	1430,983
14	6	2	3085,797	566,364
15	2	2	1314,044	1621,185
16	3	6	1160,931	1282,695
17	6	4	2171,692	1105,667
18	0	0	2,224	524,455
19	0	0	8,691	1610,900
20	0	0	0,398	224,984
21	0	1	111,187	2019,755
22	6	2	924,800	2967,356
23	6	6	2650,201	1204,998
24	0	0	1,325	2889,951
25	6	2	1856,021	1834,435
26	9	1	764,764	444,389
27	6	6	741,224	971,559
28	6	4	1888,963	1676,436
29	6	2	731,122	2147,696
30	3	3	34,901	543,706
31	3	2	114,466	3964,095
32	3	2	170,684	1019,636
33	3	3	112,152	2370,175
34	2	1	24,237	4566,914
35	9	6	1076,970	1462,926
36	9	12	4929,489	2680,926
37	0	1	6,450	3013,228
38	3	2	56,908	4375,940
39	6	6	1724,530	3552,178
40	2	2	319,248	2353,132
41	2	2	244,900	309,604

42	2	1	113,471	1907,499
43	0	1	4,297	2553,006
44	4	2	943,387	2235,292
45	0	1	83,362	2074,961
46	3	2	68,191	1110,750
47	6	4	1373,703	2529,476
48	2	4	2378,924	1881,280
	3,166666667	2,5625	763,377405 6	1716,32865 6

Πίνακας 18: Παράθεση των τιμών όλων των IRS_{SCORES} .

Πίνακας 19: Περιγραφή των: μέση, διάμεση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή και του *standard deviation* και των 4 IRS_{SCORES} .

	$IRS_{PATHOLOGIST}$ SCORE ΤΗΣ πυρηνικής maspin	$IRS_{PATHOLOGIST}$ SCORE ΤΗΣ κυτταροπλ. maspin	$IRS_{I.A.SCORE}$ της maspin	$IRS_{I.A.SCORE}$ του VEGF
Mean	3,17	2,56	763,377	1716,329
Median	3,00	2,00	207,792	1616,043
Minimum	,00	,00	,398	28,343
Maximum	9,00	12,00	4929,489	4566,914
Standard Deviation	2,71	2,32	1025,416	1153,805

III-2.4 Στατιστικές συσχετίσεις

Πίνακας 20

Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τις συσχετίσεις μεταξύ των: CD34 (No/mm²), VEGF, maspin scores (ολική, πυρηνική, κυτταροπλασματική) και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων στο δείγμα της μελέτης. Ο VEGF (IRS_{I.A.SCORE}) σχετιζόταν θετικά με το grade (Spearman's rho=+0.345, p=0.016) και τη θετικότητα του HER2 (MWW z-value=+2.275, p=0.023). Το score της ολικής maspin (IRS_{I.A.SCORE}) σχετιζόταν θετικά και ισχυρά τόσο με την πυρηνική maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}) (Spearman's rho=+0.797, p<0.001) όσο και με την κυτταροπλασματική maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}) (Spearman's rho=+0.752, p<0.001). Είναι αξιοσημείωτο πως τα δύο υποκυτταρικά κλάσματα της maspin (πυρηνικό και κυτταροπλασματικό) σχετιζόνταν ισχυρά μεταξύ τους (Spearman's rho=+0.673, p<0.001). Αντιθέτως, δεν υπήρχαν σημαντικές συσχετίσεις του CD34 με κάποιο παράγοντα.

	CD34	VEGF	Ολική Maspin	Πυρηνική ή Maspin	Κυτταροπλασματική Maspin
CD34 (No/mm ²)					
VEGF (IRS _{I.A.SCORE})	+0.120 (0.416)				

Ολική Maspin (IRS _{I.A.SCORE})	+0.028 (0.852)	+0.001 (0.997)			
Πυρηνική Maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	+0.113 (0.444)	+0.007 (0.960)	+0.797 (<0.001)		
Κυτταροπλασματική Maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	+0.075 (0.614)	+0.141 (0.338)	+0.752 (<0.001)	+0.673 (<0.001)	
Ηλικία	-0.113 (0.443)	-0.097 (0.512)	+0.123 (0.407)	+0.006 (0.966)	+0.071 (0.631)
Stage	-0.008 (0.959)	+0.058 (0.695)	-0.185 (0.209)	-0.070 (0.639)	-0.167 (0.256)
T status	+0.085 (0.566)	-0.002 (0.988)	-0.115 (0.437)	-0.017 (0.908)	-0.054 (0.718)
N status	+0.093 (0.531)	-0.087 (0.558)	-0.131 (0.376)	-0.057 (0.700)	-0.114 (0.441)
M status [§]	-0.540 (0.589)	+0.996 (0.319)	-0.861 (0.389)	-0.258 (0.796)	-0.693 (0.489)
Grade	-0.032 (0.827)	+0.345 (0.016)	-0.011 (0.941)	+0.113 (0.443)	+0.028 (0.849)
Μοριακή Ταξινόμηση†	2.411 (0.492)	7.042 (0.071)	3.570 (0.312)	3.521 (0.318)	0.950 (0.813)
Ki-67 (%)	-0.109	+0.195	+0.144	+0.220	+0.127

	(0.528)	(0.254)	(0.402)	(0.197)	(0.460)
ER θετικότητα [§]	-0.241	-1.338	+0.167	-0.726	+0.976
	(0.810)	(0.181)	(0.867)	(0.468)	(0.329)
PR θετικότητα [§]	-0.631	+0.062	-1.552	-1.891	-0.287
	(0.528)	(0.951)	(0.121)	(0.059)	(0.774)
HER2 θετικότητα [§]	+0.722	+2.275	-0.853	-0.045	-0.415
	(0.470)	(0.023)	(0.394)	(0.964)	(0.678)
p53 θετικότητα [§]	-0.049	-0.110	-0.281	-0.062	+0.100
	(0.961)	(0.913)	(0.779)	(0.950)	(0.920)

[§]Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test for independent samples was performed, as these variables were binary; MWW z-values and p-values (in parentheses) are provided

†Kruskal-Wallis (KW) test was performed, as this variable included more than two groups; KW chi-square values (3 degrees of freedom) and p-values (in parentheses) are provided

Πίνακας 20. Οι συσχετίσεις μεταξύ των: CD34 (No/mm²), VEGF, maspin scores (ολική, πυρηνική, κυτταροπλασματική) και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων στο δείγμα της μελέτης. Εμφανίζονται οι Spearman's rank correlation coefficients (p-values εντός παρενθέσεων), εκτός και αν σημειώνεται κάτι διαφορετικό. Τα έντονα (με bold) κελιά υποδηλώνουν συσχετίσεις με $p < 0.05$.

Πίνακας 21

Ο Πίνακας 11 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της multivariate ordinal logistic regression ανάλυσης σχετικά με το VEGF (upper panels) και την ολική maspin (lower panels). Όσον αφορά στο VEGF, όπως φαίνεται στο Model 1, το grade έχασε τον ανεξάρτητο προβλεπτικό του ρόλο και συνεπώς το HER2 αναδύθηκε ως ο μόνος ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας της έκφρασης του VEGF στο δείγμα μας (OR=4.46, 95%CI: 1.38-14.45, $p=0.013$, Model 2). Όσον αφορά στην ολική maspin, και τα δύο στενά συνδεδεμένα κλάσματα της maspin, δηλαδή το πυρηνικό (OR=1.63, 95%CI: 1.20-2.21, $p=0.002$) και το κυτταροπλασματικό (OR=1.95, 95%CI: 1.26-3.02, $p=0.003$) συσχετίζονταν ανεξάρτητα με την ολική (Model 3).

Variables	Category Increment	or	OR (95%CI)	p-value
Model 1 Εξαρτημένη μεταβλητή: VEGF Ανεξάρτητες μεταβλητές: grade, HER2 θετικότητα				
Grade	1 level increase		1.68 (0.71-3.98)	0.235
HER2 θετικότητα	Θετικό Αρνητικό	vs.	3.72 (1.10-12.59)	0.035

Model 2				
Εξαρτημένη μεταβλητή: VEGF				
Ανεξάρτητη μεταβλητή: HER2 θετικότητα				
HER2 positivity	Θετικό vs. Αρνητικό		4.46 (1.38-14.45)	0.013
Model 3				
Εξαρτημένη μεταβλητή: Ολική maspin (IRS _{I.A.SCORE})				
Ανεξάρτητες μεταβλητές: πυρηνική maspin, κυτταροπλασματική maspin				
πυρηνική maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	1 unit increase		1.63 (1.20-2.21)	0.002
κυτταροπλασματική maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	1 unit increase		1.95 (1.26-3.02)	0.003

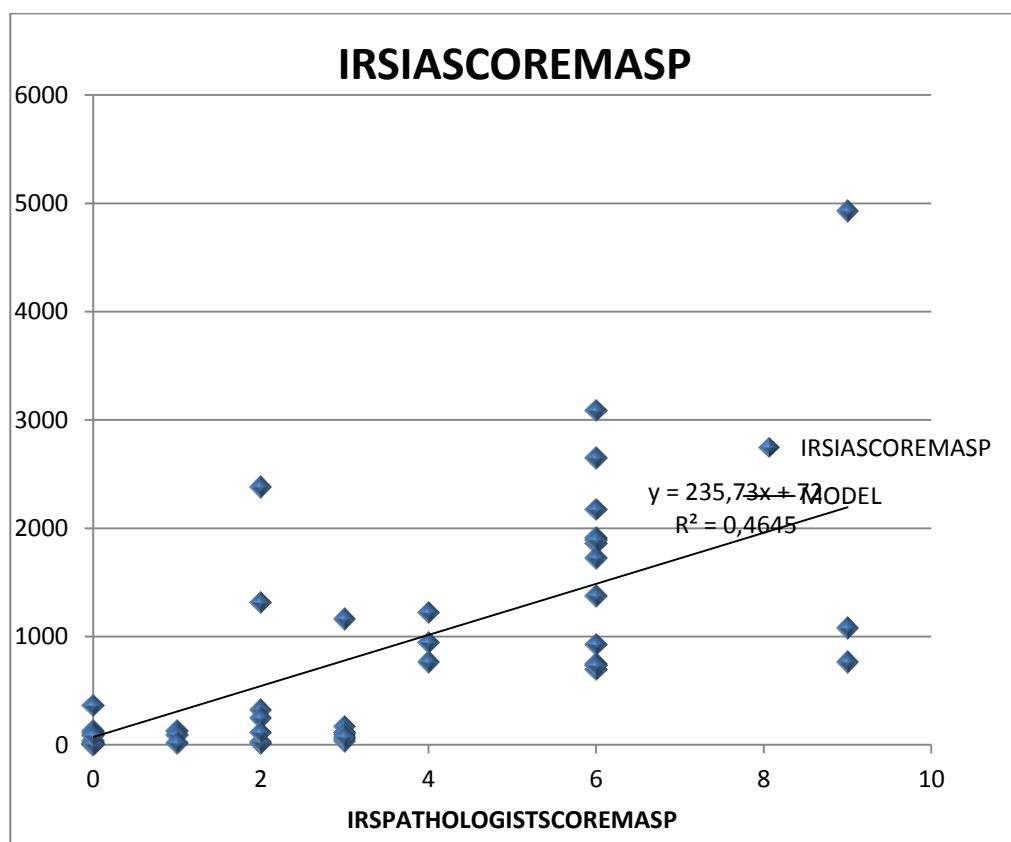
[§]adjusted for age, sex, stage, grade

Πίνακας 21. Αποτελέσματα από τη *multivariate ordinal logistic regression* ανάλυση. Τα έντονα (*bold*) κελιά υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

OR: Odds ratio; CI: confidence interval.

Γράφημα 25:

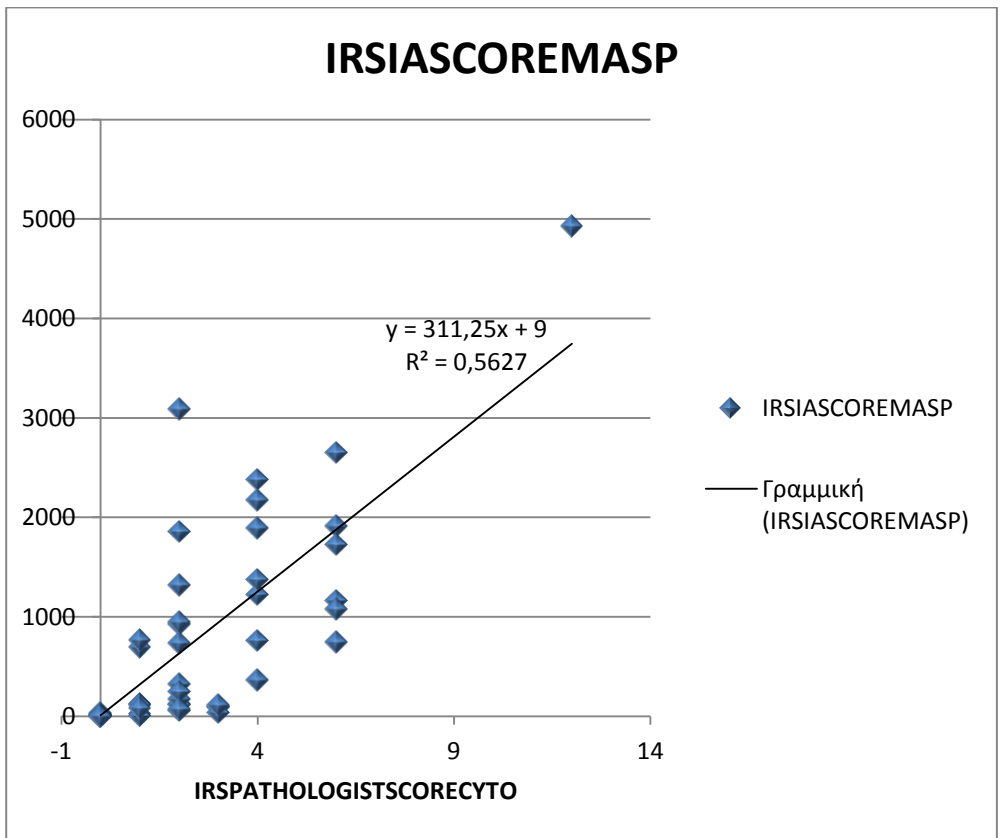
Scatter Plot (Γράφημα Διασποράς) στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ του $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της πυρηνικής *maspin* που μετρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) και του $IRS_{I.A.SCORE}$ της ολικής *maspin* που μετρήθηκε με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα.



Γράφημα 25: Scatter Plot – $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της πυρηνικής *maspin* (άξονας x) / $IRS_{I.A.SCORE}$ της ολικής *maspin* (άξονας y).

Γράφημα 26:

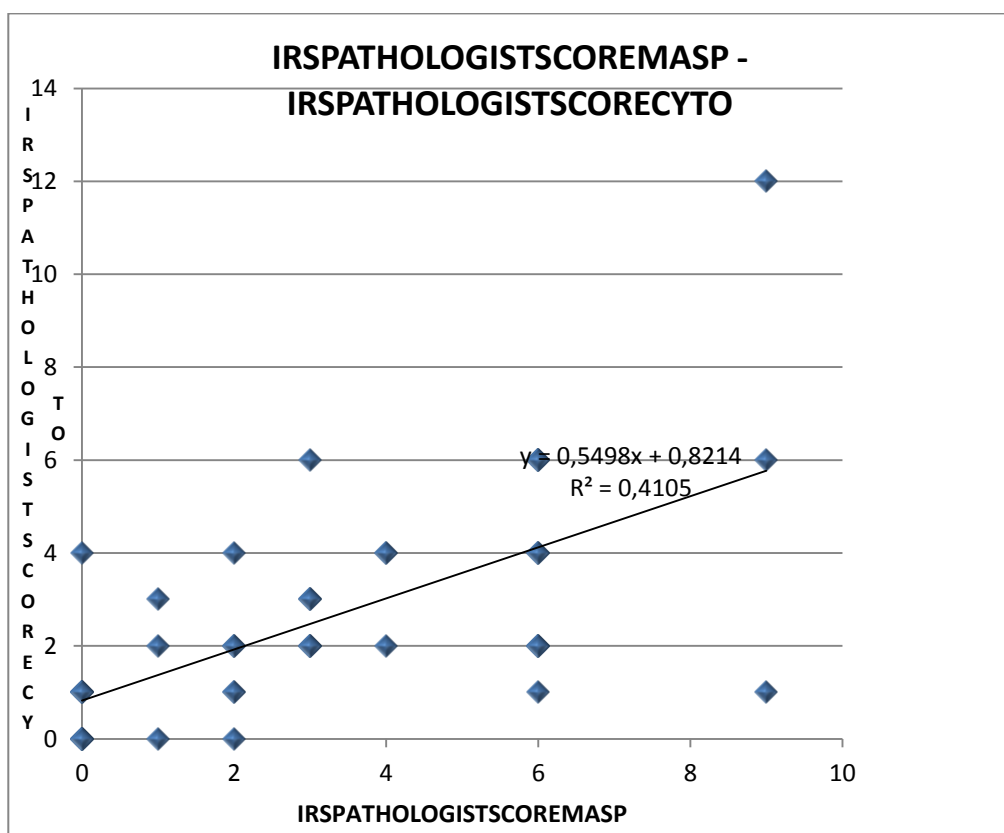
Scatter Plot (Γράφημα Διασποράς) στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ του $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της κυτταροπλασματικής maspin που μετρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) και του $IRS_{I.A.SCORE}$ της ολικής maspin που μετρήθηκε με το Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα.



Γράφημα 26: Scatter Plot – $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της κυτταροπλασματικής maspin (άξονας x) / $IRS_{I.A.SCORE}$ της ολικής maspin (άξονας y).

Γράφημα 27:

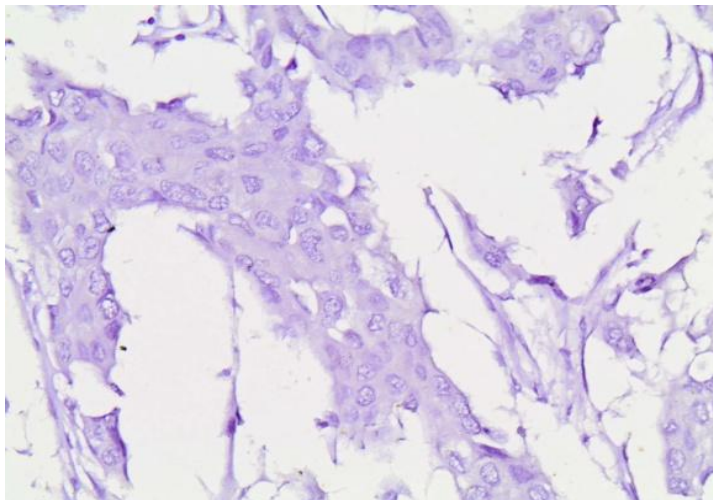
Scatter Plot (Γράφημα Διασποράς) στο οποίο απεικονίζεται η συσχέτιση μεταξύ του $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της πυρηνικής *maspin* που μετρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM) και του $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της κυτταροπλασματικής *maspin* που μετρήθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο – Light Microscopy (LM).



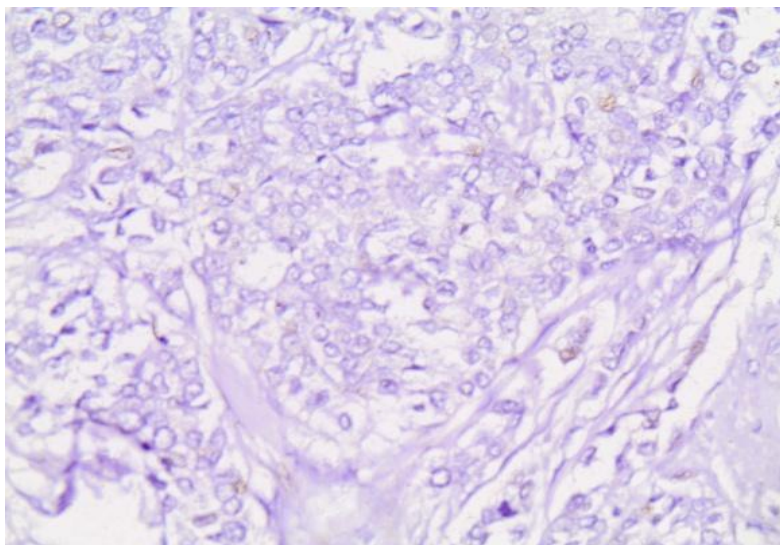
Γράφημα 27: Scatter Plot – $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της πυρηνικής *maspin* (άξονας x) / $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ της κυτταροπλασματικής *maspin* (άξονας y).

III-2.5 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο και το Computerized Image Analysis σύστημα

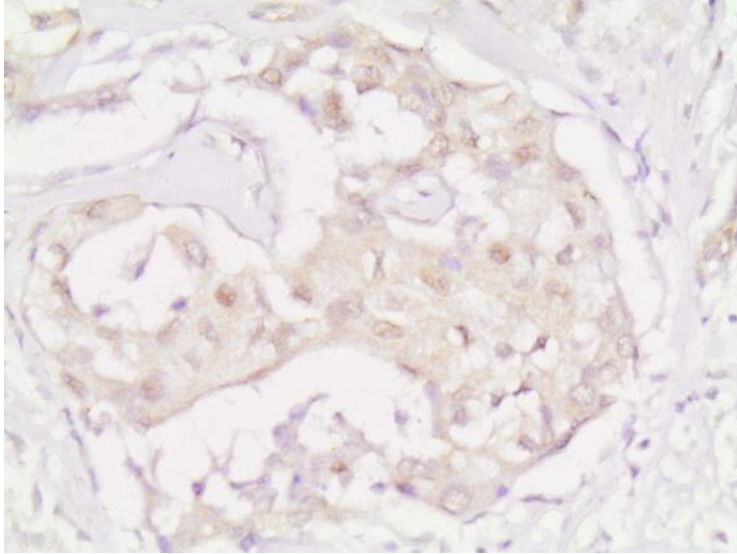
Παρακάτω παρατίθενται δειγματοληπτικά μερικές εικόνες, κατά το δυνατόν αντιπροσωπευτικές, από το οπτικό μικροσκόπιο (Light Microscopy – LM) και το Σύστημα Ανάλυσης Εικόνας – Computerized Image Analysis (CIA) σύστημα κατά σειρά: για τη maspin, το VEGF και την αγγείωση των όγκων (σημασμένα αγγεία μέσω του αντισώματος CD34).

ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ MASPIN

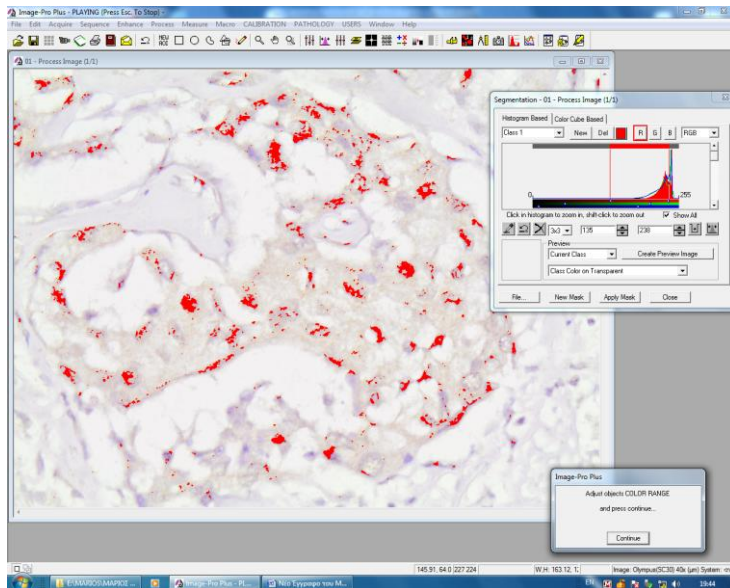
Εικόνα 46: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Η maspin δε βάφει τον ιστό.



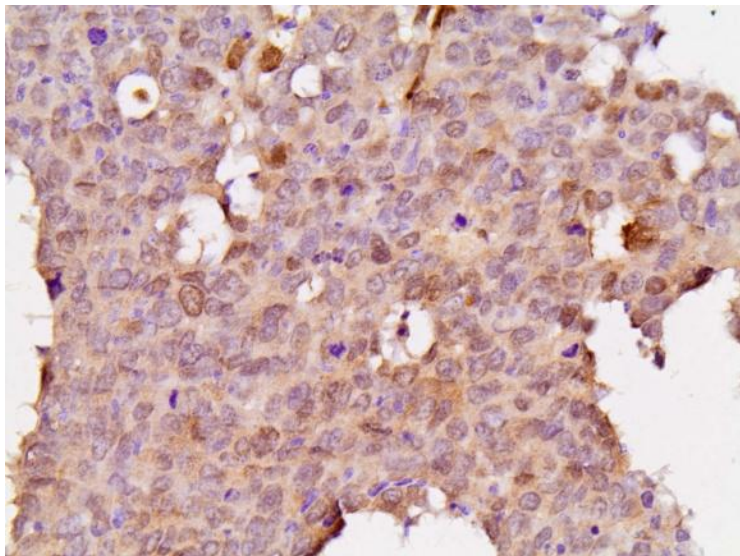
Εικόνα 47: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Η maspin δε βάφει τον ιστό.



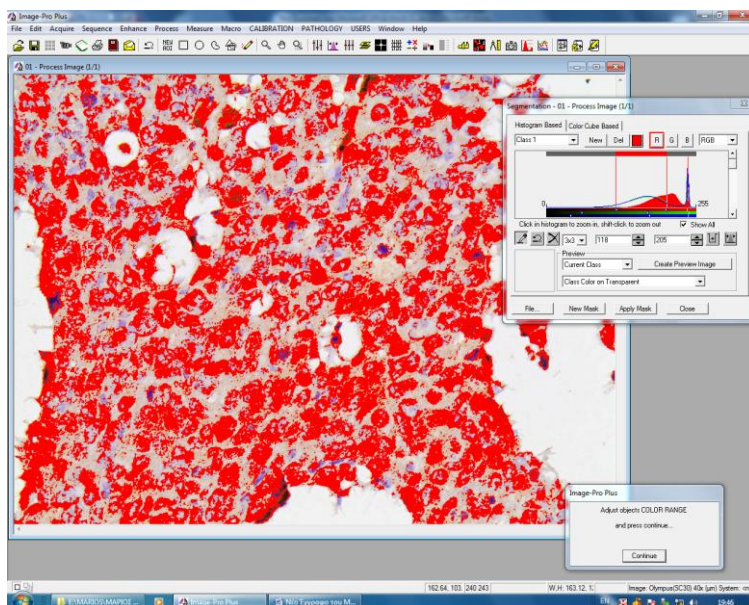
Εικόνα 48: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Ασθενής χρώση της maspin.



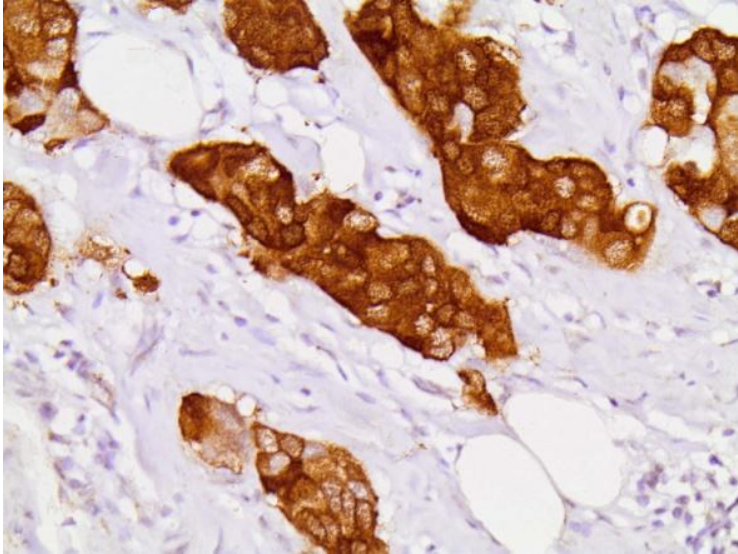
Εικόνα 49: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Ασθενής χρώση της maspin.



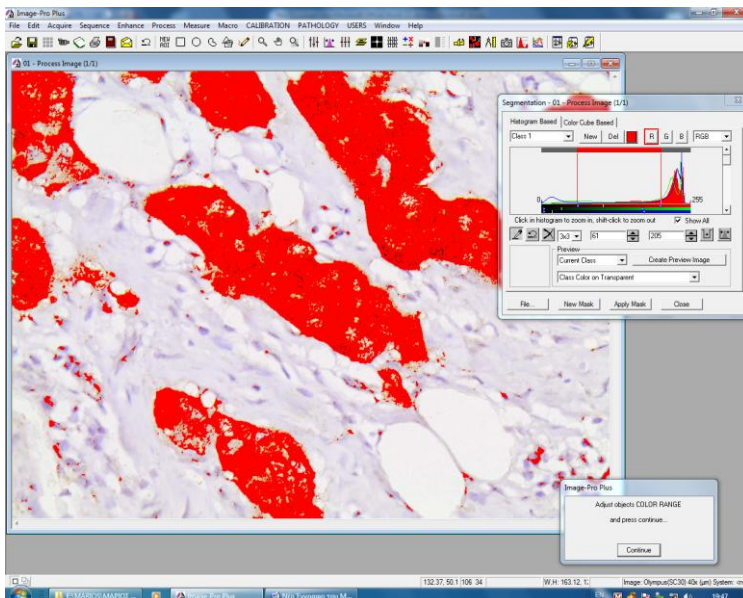
Εικόνα 50: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μέτρια χρώση της *maspin*.



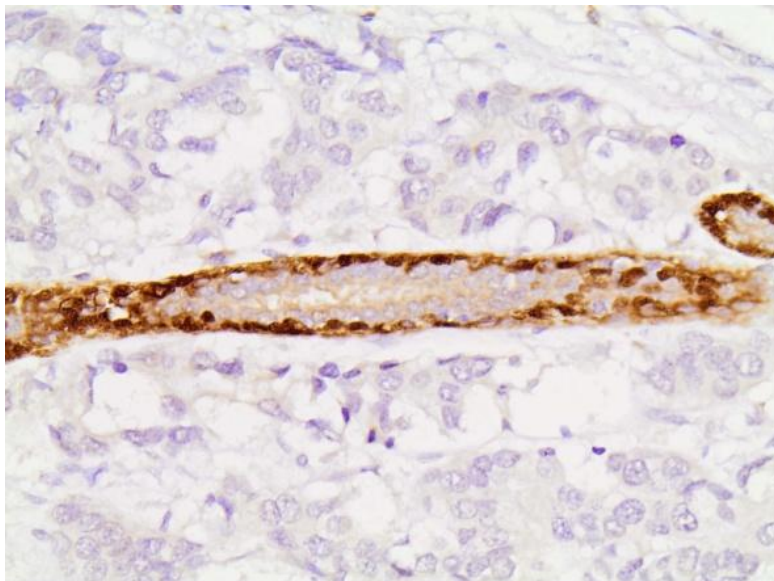
Εικόνα 51: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού– Image Analysis (CIA). Μέτρια χρώση της *maspin*.



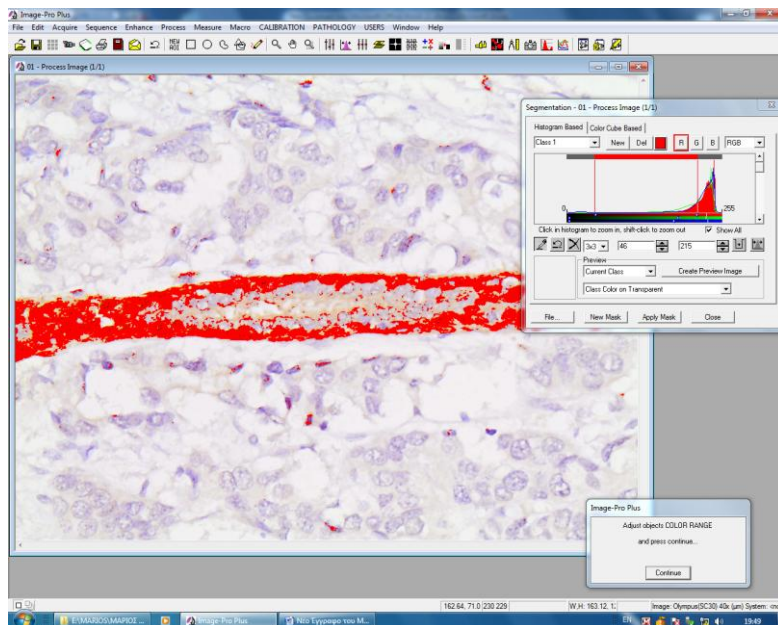
Εικόνα 52: *Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Ισχυρή χρώση της maspin.*



Εικόνα 53: *Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Ισχυρή χρώση της maspin.*



Εικόνα 54: Φυσιολογικός ιστός (LM).



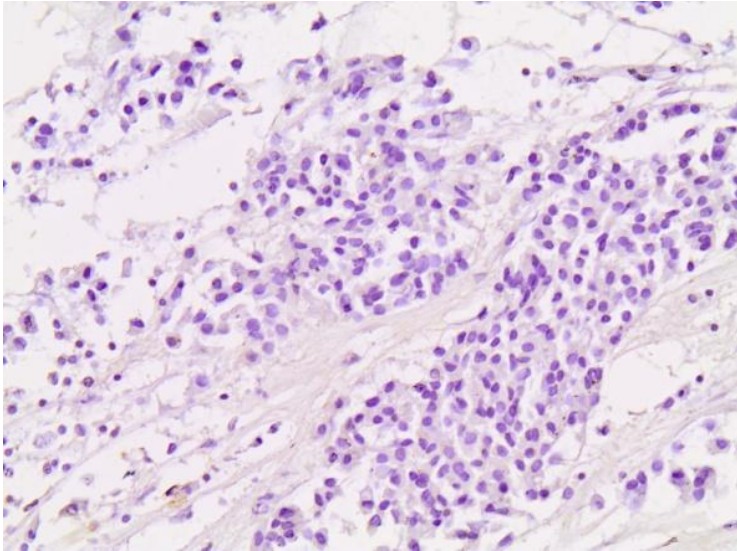
Εικόνα 55: Φυσιολογικός ιστός – Image Analysis (CIA).

Πίνακας 22

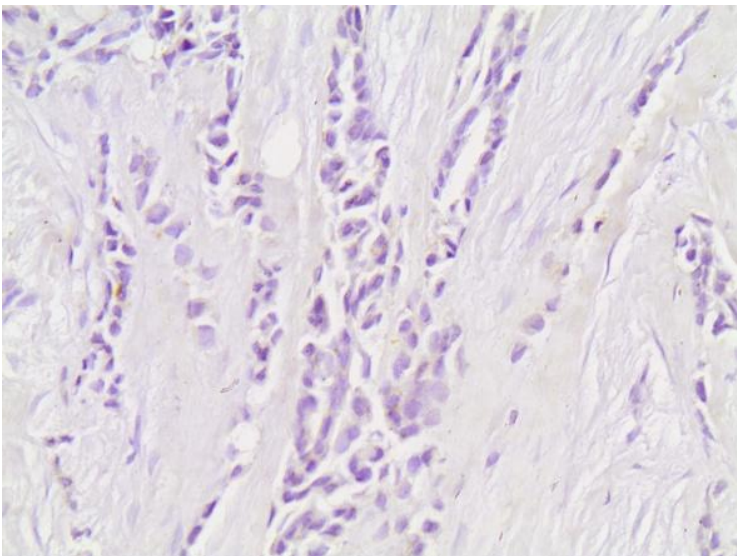
Στη μελέτη μας αυτή, όπως έχει αναφερθεί, έγινε, μεταξύ των άλλων, όσον αφορά αποκλειστικά στη χρώση της maspin, σύγκριση των μετρήσεων μέσω του μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM) με τις μετρήσεις από το Computerized Image Analysis (CIA). Στον Πίνακα 22 παραθέτουμε, κατ' αντιπαράσταση, ενδεικτικά τις μετρήσεις της maspin που ελήφθησαν με τις δύο μεθόδους, για τα περιστατικά, των οποίων οι εικόνες παρατέθηκαν νωρίτερα ως ένα μικρό αντιπροσωπευτικό δείγμα (Εικόνες 46-55). Σημειώνεται πως: η ένταση της maspin με το CIA σύστημα μετράται από 0-255, όπου το 0 αντιστοιχεί στη μέγιστη ένταση και το 255 σε μηδενική ένταση. Η ένταση της χρώσης με το LM είναι βαθμονομημένη από 0-3. Τα ποσοστά της έκτασης της χρώσης είναι με ακρίβεια μετρημένα με το CIA σύστημα και κατ' εκτίμηση με το LM.

Πίνακας 22: *Οι μετρήσεις της χρώσης της maspin (ποσοστό έκτασης και ένταση χρώσης) με το CIA σύστημα και με το μικροσκόπιο (LM), των περιστατικών, των οποίων οι εικόνες παρατέθηκαν νωρίτερα ως ένα μικρό αντιπροσωπευτικό δείγμα (Εικόνες 46-55).*

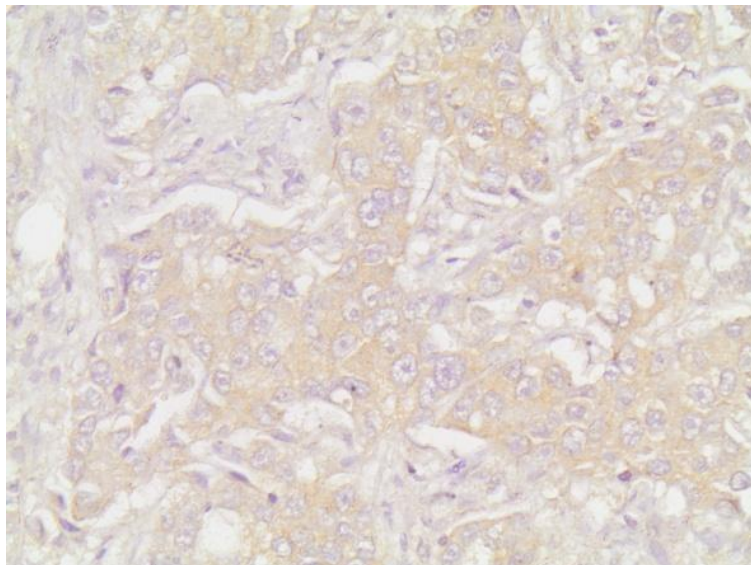
ΑΑ Περ.	Αρ. Εικ.	Ποσο- στό θετικής έκτα- σης της maspin (%) με το CIA	Έντα- ση χρώσης maspin με το CIA (0-255)	Ποσο- στό κυττά- ρων με θετική πυρηνι- κή χρώση maspin (%) με το LA	Έντα- ση πυρη- νικής χρώσης maspin με το LA	Ποσο- στό κυττά- ρων με θετική κυττα- ροπλ. χρώση maspin (%) με το LA	Έντα- ση κυττα- ροπλ. Χρώ- σης mas- pin με το LA
1	46	0.039	126	0	0	0	0
2	47	0.019	138	0	0	0	0
3	48, 49	0.587	158	2	3	2	2
4	50, 51	31.566	157	40	3	45	1
5	52, 53	47.283	150	70	3	85	3
6	54, 55	0.369	160	5	3	3	2

ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ VEGF

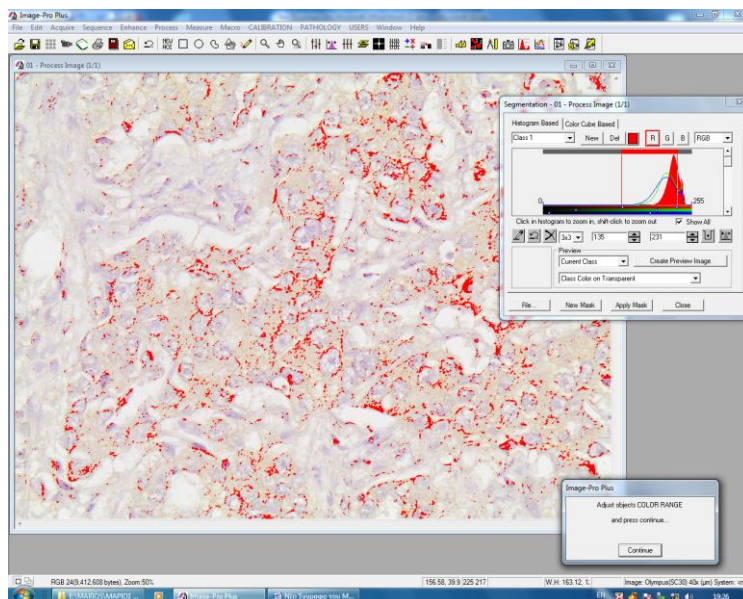
Εικόνα 56: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Χωρίς χρώση του VEGF.



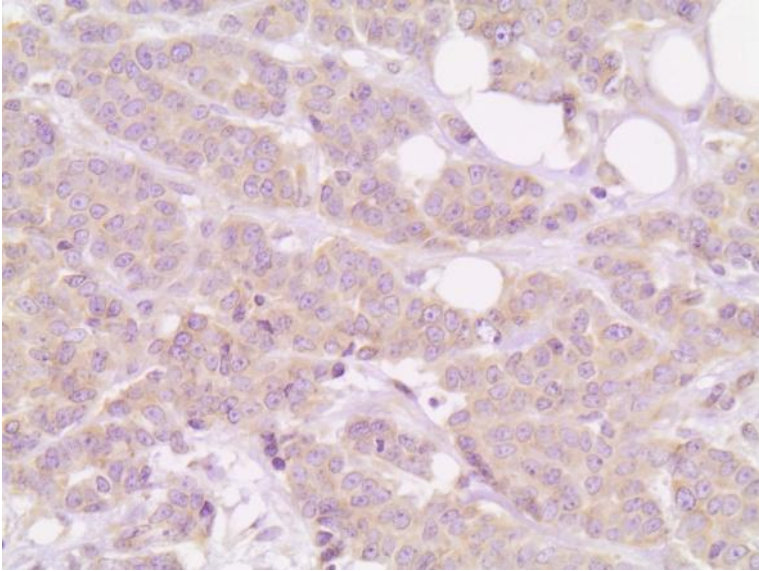
Εικόνα 57: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Χωρίς χρώση του VEGF.



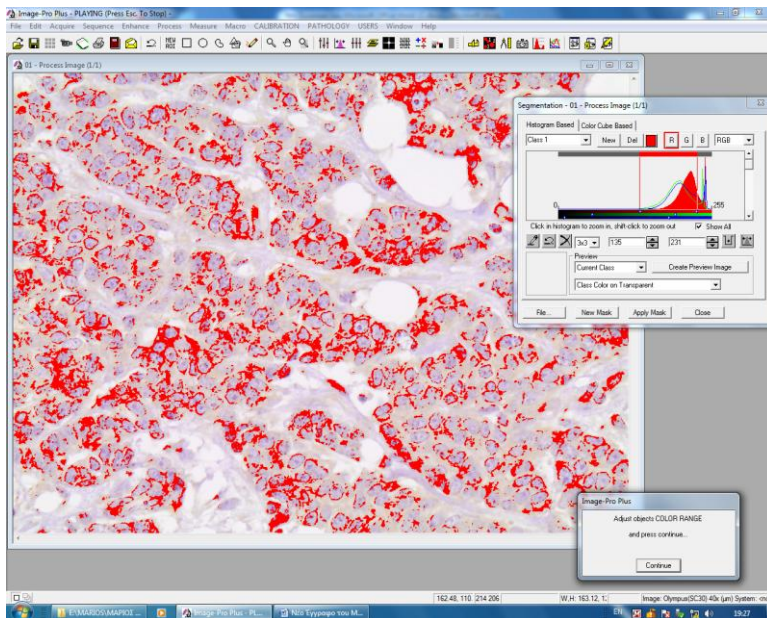
Εικόνα 58: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Ασθενής χρώση του VEGF.



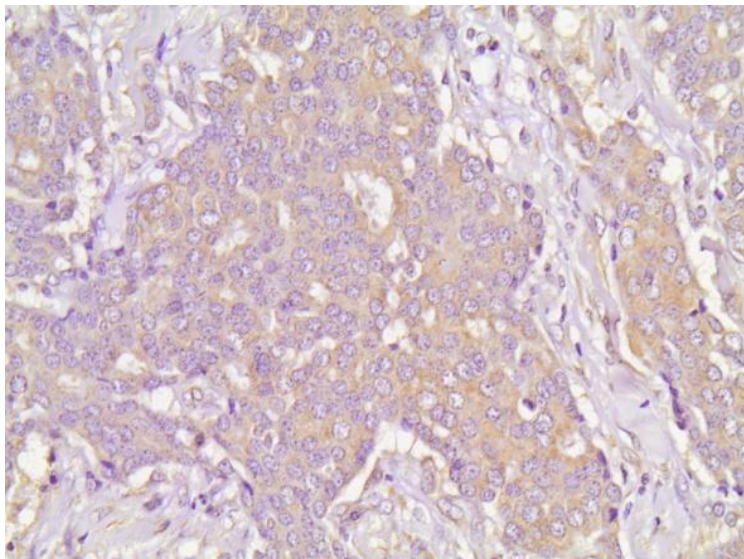
Εικόνα 59: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Ασθενής χρώση του VEGF.



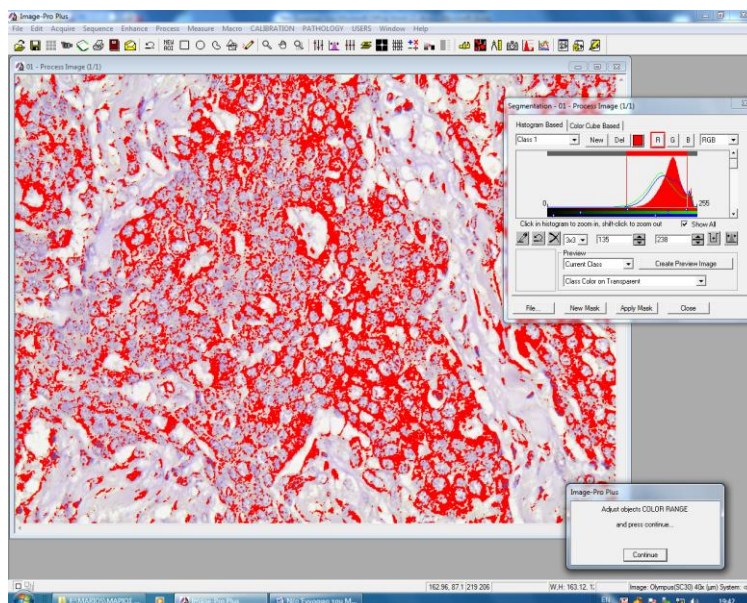
Εικόνα 60: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μέτρια χρώση του VEGF.



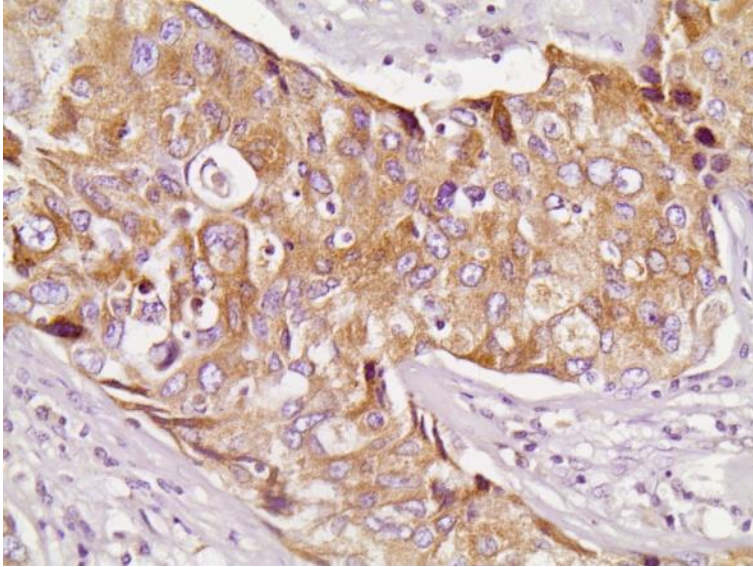
Εικόνα 61: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Μέτρια χρώση του VEGF.



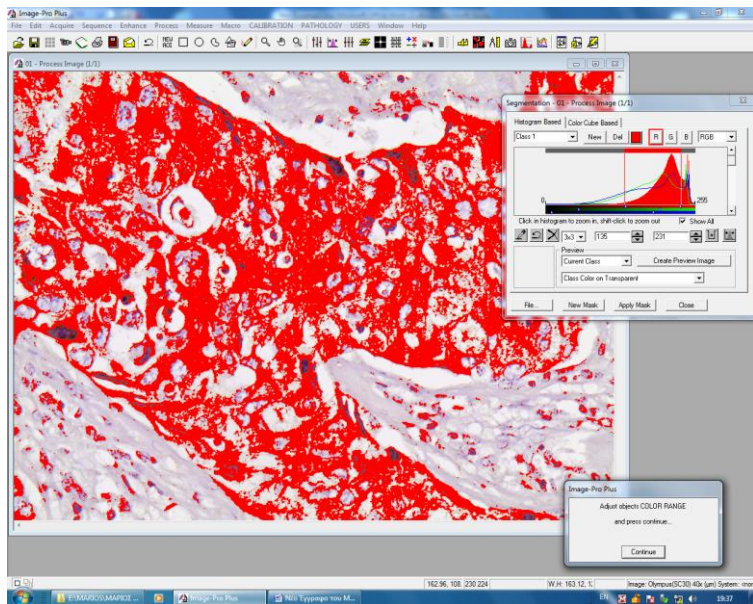
Εικόνα 62: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μέτρια χρώση του VEGF.



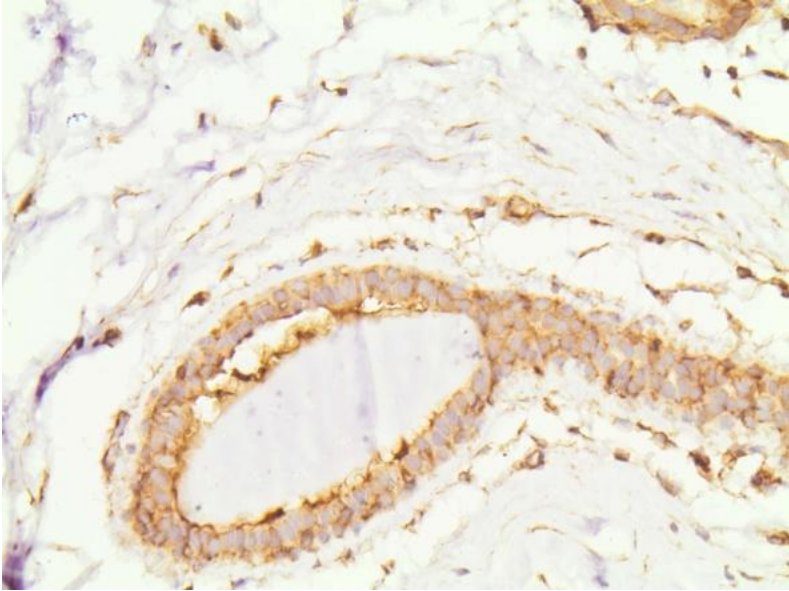
Εικόνα 63: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Μέτρια χρώση του VEGF.



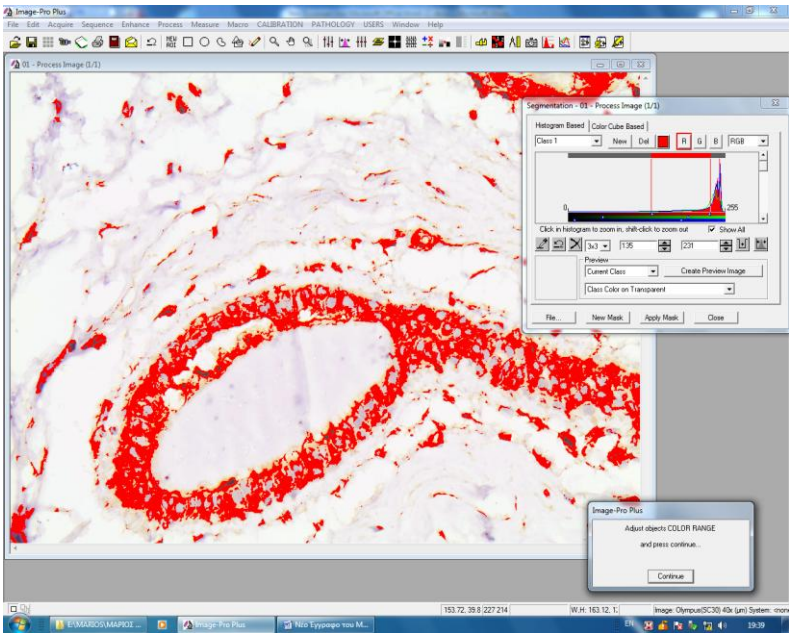
Εικόνα 64: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Ισχυρή χρώση του VEGF.



Εικόνα 65: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Ισχυρή χρώση του VEGF.

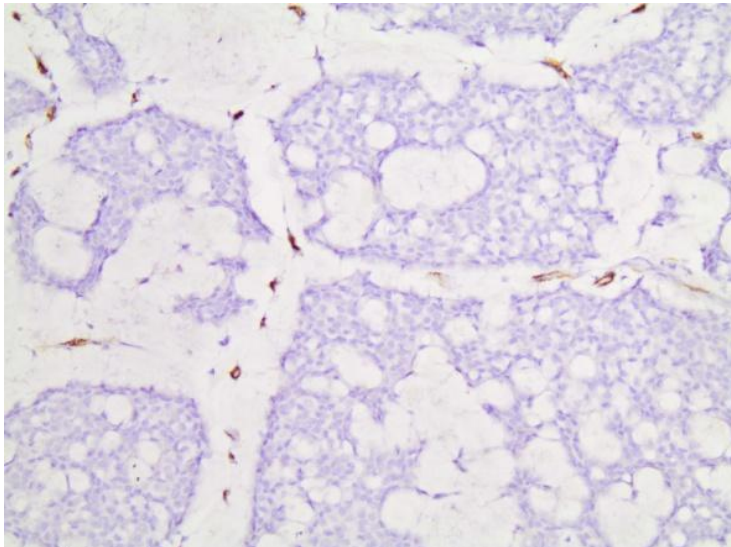


Εικόνα 66: Φυσιολογικός ιστός (LM).

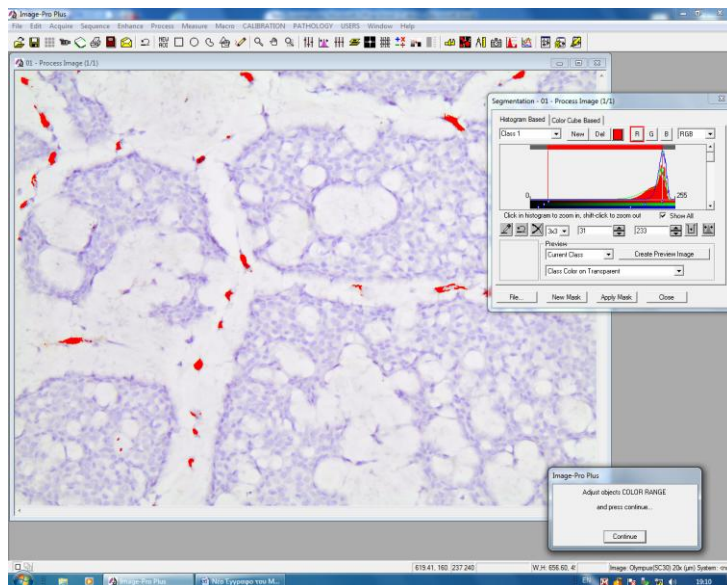


Εικόνα 67: Φυσιολογικός ιστός – Image Analysis (CIA).

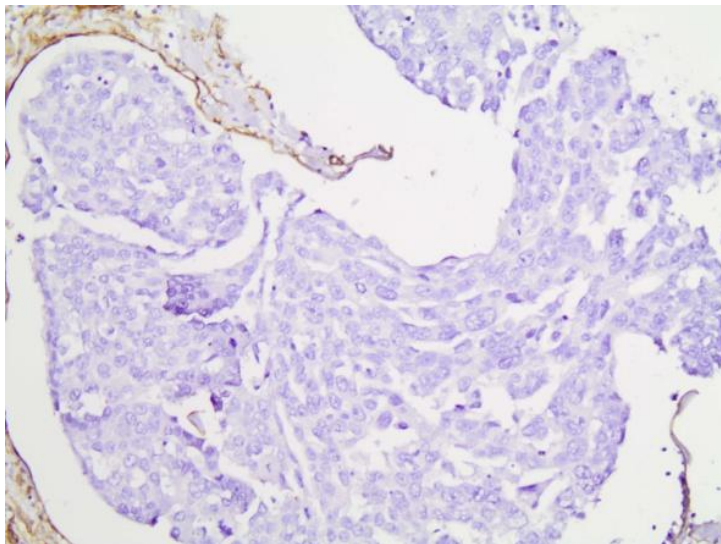
ΕΙΚΟΝΕΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΓΓΕΙΩΣΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ (ΑΝΤΙΣΩΜΑ CD34)



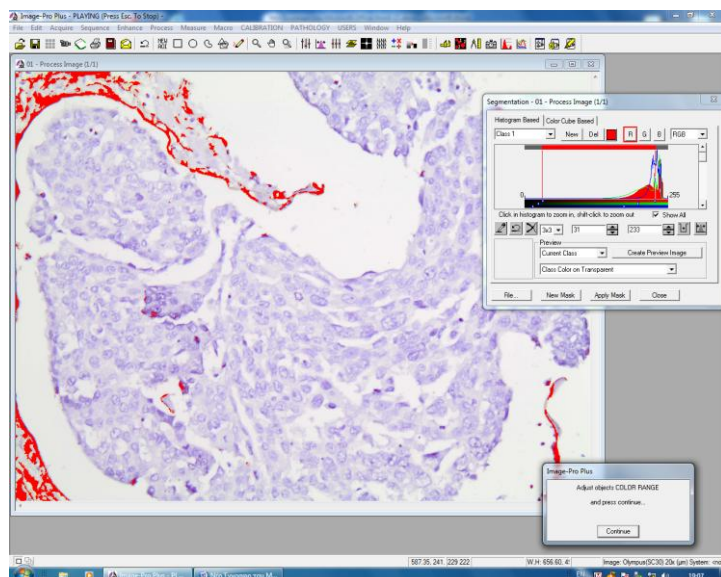
Εικόνα 68: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM).
Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού.



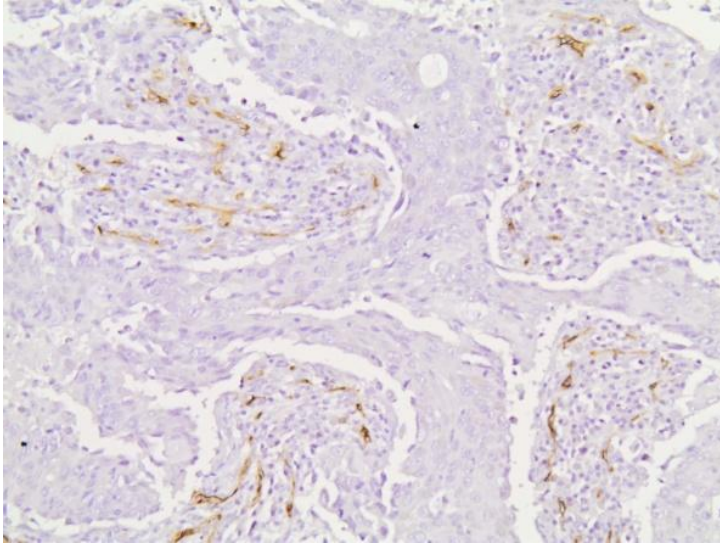
Εικόνα 69: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image
Analysis (CIA). Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού.



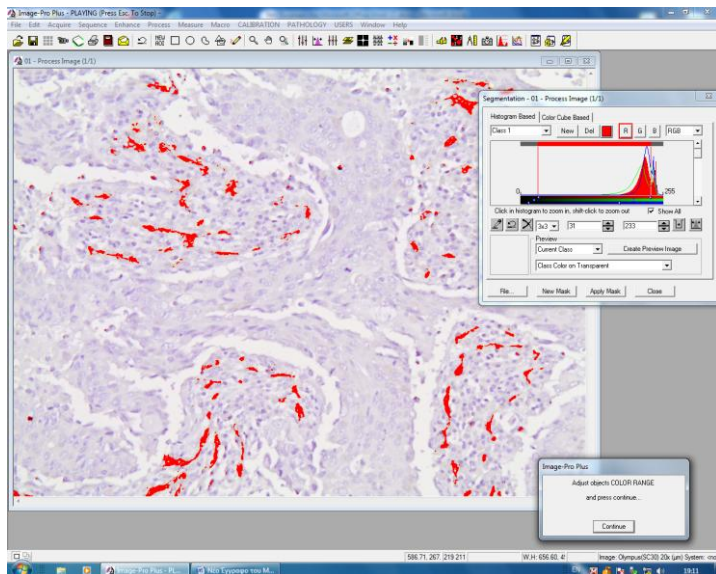
Εικόνα 70: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στην περιφέρεια του όγκου.



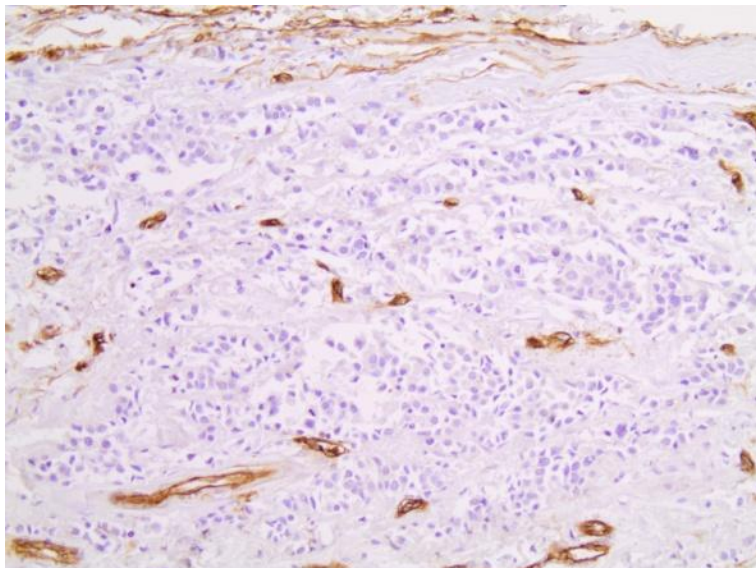
Εικόνα 71: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στην περιφέρεια του όγκου.



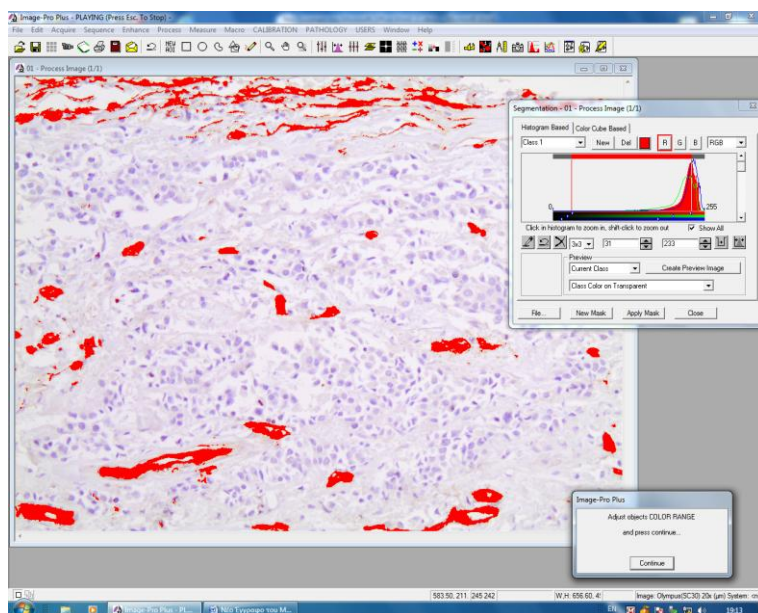
Εικόνα 72: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στους περίξ του όγκου ιστούς.



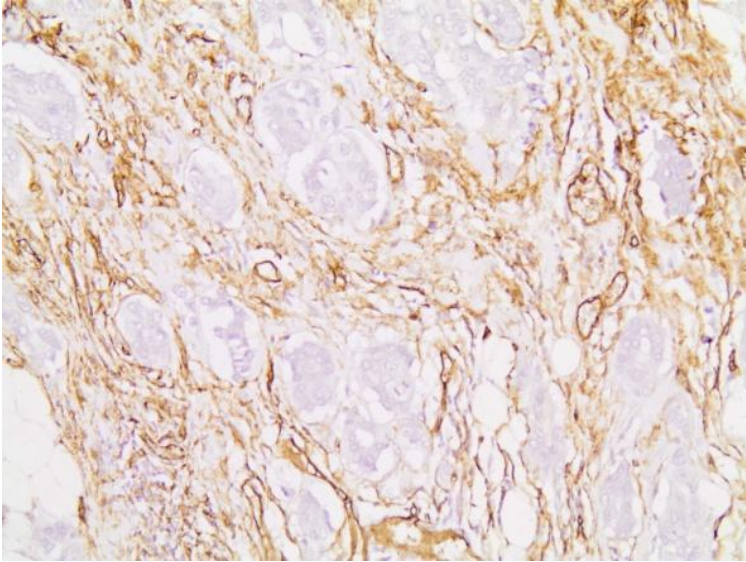
Εικόνα 73: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στους περίξ του όγκου ιστούς.



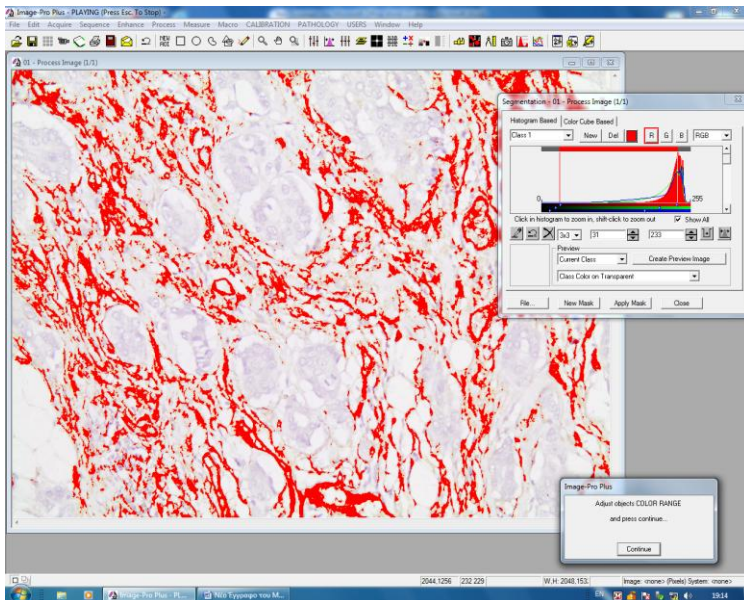
Εικόνα 74: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Μετρίου βαθμού αγγείωση.



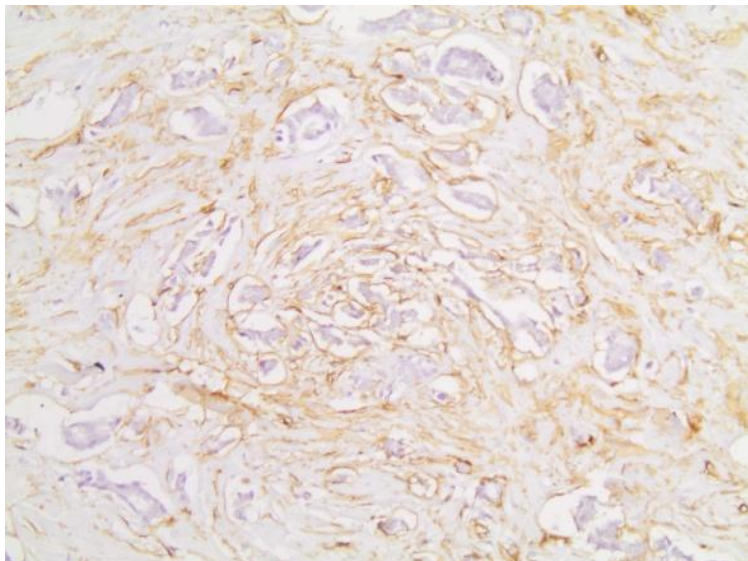
Εικόνα 75: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Μετρίου βαθμού αγγείωση.



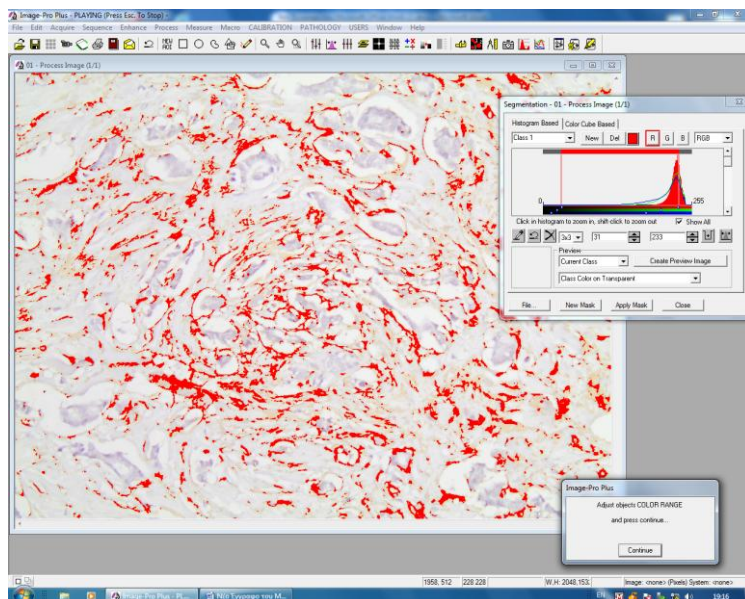
Εικόνα 76: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Έντονη αγγείωση εντός του όγκου.



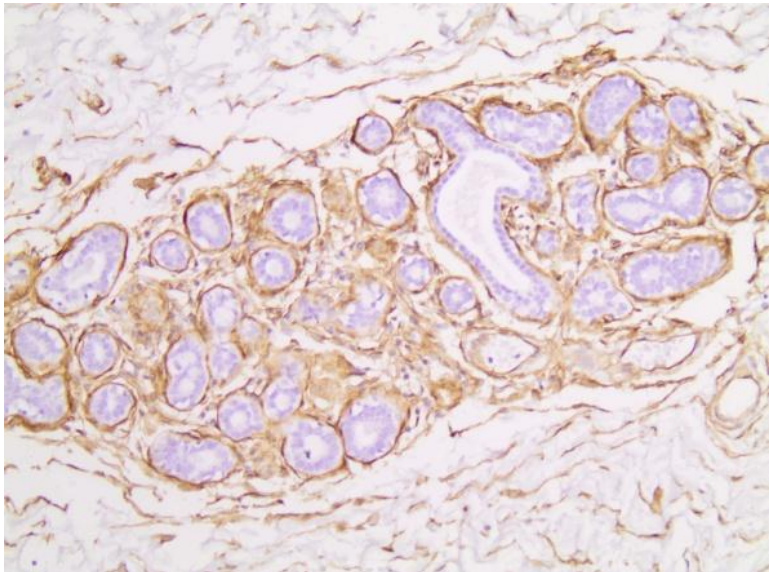
Εικόνα 77: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Έντονη αγγείωση εντός του όγκου.



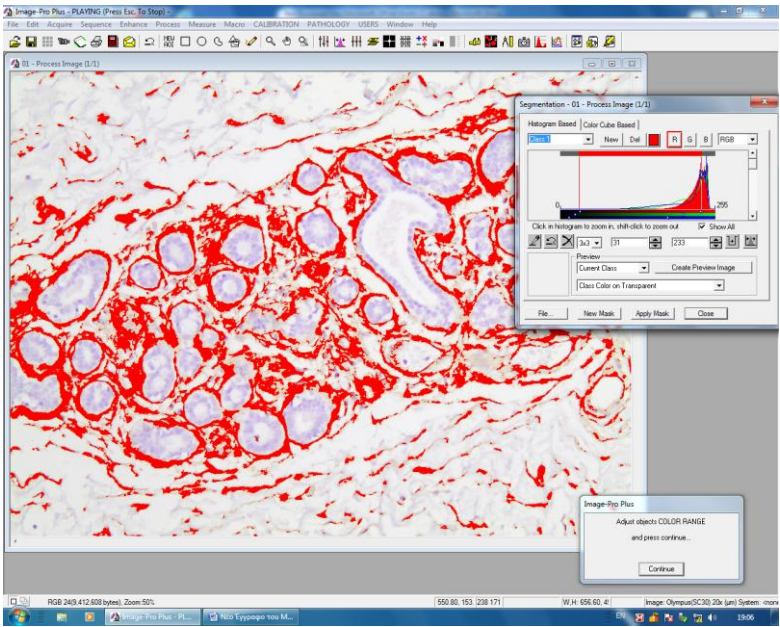
Εικόνα 78: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (LM). Έντονη αγγείωση εντός του όγκου.



Εικόνα 79: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού – Image Analysis (CIA). Έντονη αγγείωση εντός του όγκου.



Εικόνα 80: Φυσιολογικοί πόροι με έντονη αγγείωση (LM).



Εικόνα 81: Φυσιολογικοί πόροι με έντονη αγγείωση – Image Analysis (CIA).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΕΘΗΚΑΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ

Εικόνα 46: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο η maspin δεν έχει βάψει σχεδόν καθόλου τα καρκινικά κύτταρα είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα.

Εικόνα 47: Ομοίως με την προηγούμενη.

Εικόνα 48: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο η maspin έχει βάψει ασθενώς κάποια κύτταρα.

Εικόνα 49: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 48.

Εικόνα 50: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο η maspin παρουσιάζει μέτριας έντασης και έκτασης χρώση.

Εικόνα 51: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 50.

Εικόνα 52: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο η maspin παρουσιάζει ισχυρής έντασης και έκτασης χρώση.

Εικόνα 53: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 52.

Εικόνα 54: Φυσιολογικός, μη-νεοπλασματικός ιστός (πόρος), που δείχνει ισχυρής έντασης και έκτασης χρώση της maspin στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι στα επιθηλιακά. Ο πόρος αυτός βρίσκεται εντός περιοχής διηθητικού νεοπλασματικού ιστού.

Εικόνα 55: Snapshot από το Image Analysis του φυσιολογικού πόρου της εικόνας 54.

Εικόνα 56: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο ο VEGF δεν έχει βιάψει σχεδόν καθόλου τα καρκινικά κύτταρα.

Εικόνα 57: Ομοίως με την προηγούμενη.

Εικόνα 58: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο ο VEGF έχει βιάψει με ασθενή ένταση.

Εικόνα 59: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 58.

Εικόνα 60: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο ο VEGF έχει βιάψει με μέτρια ένταση.

Εικόνα 61: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 60.

Εικόνα 62: Ομοίως με την εικόνα 60.

Εικόνα 63: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 62.

Εικόνα 64: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού, στο οποίο ο VEGF έχει βιάψει με ισχυρή ένταση.

Εικόνα 65: Snapshot από το Image Analysis του φυσιολογικού πόρου της εικόνας 64.

Εικόνα 66: Φυσιολογικός, μη-νεοπλασματικός ιστός (πόρος), στον οποίο ο VEGF έχει βάψει με ισχυρή ένταση.

Εικόνα 67: Snapshot από το Image Analysis του φυσιολογικού πόρου της εικόνας 66.

Εικόνα 68: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού με μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού.

Εικόνα 69: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 68.

Εικόνα 70: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού με μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στην περιφέρεια του όγκου.

Εικόνα 71: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 70.

Εικόνα 72: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού με μηδαμινή αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού. Αγγείωση μόνο στους πείριξ του όγκου ιστούς.

Εικόνα 73: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 72.

Εικόνα 74: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού με μετρίου βαθμού αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού.

Εικόνα 75: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 74.

Εικόνα 76: Διθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού με έντονη αγγείωση εντός του νεοπλασματικού ιστού.

Εικόνα 77: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 76.

Εικόνα 78: Ομοίως με την εικόνα 76.

Εικόνα 79: Snapshot από το Image Analysis του καρκινώματος της εικόνας 78.

Εικόνα 80: Φυσιολογικός, μη-νεοπλασματικός ιστός (πόροι του μαζικού αδένου), με έντονη αγγείωση.

Εικόνα 81: Snapshot από το Image Analysis των φυσιολογικών πόρων της εικόνας 80.

III-3**Συζήτηση**

Εύρημα 1^ο:

Στην παρούσα μελέτη, αρχικά εκτιμήσαμε την έκφραση της maspin ξεχωριστά στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων του μαστού στα 48 περιστατικά διηθητικού πορογενούς καρκινώματος του μαστού, τα οποία αποτέλεσαν το δείγμα μας. Η αρχική αυτή εκτίμηση έγινε μέσω απλού μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM) από δύο παθολογοανατόμους (όπως αναφέρεται στο Κεφ. «III-1.4 – εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης»). Η εκτίμηση αυτή ανέδειξε ισχυρότατη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πυρηνικής και της κυτταροπλασματικής χρώσης της maspin ($P < 0.001$).

Εν συνεχεία, βρέθηκε πως οι υπολογισμοί των δύο χρώσεων της maspin (πυρηνικής και κυτταροπλασματικής) – $IRS_{PATHOLOGIST SCORE}$ – σχετίζονταν ισχυρά με τα αποτελέσματα από την εκτίμηση της maspin μέσω του Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος – $IRS_{IMAGE ANALYSIS SCORE}$ ($IRS_{I.A.SCORE}$). Η περιγραφή της εκτίμησης της maspin μέσω του CIA system έγινε στο Κεφ. III-1.5 και το σκεπτικό της ήταν το ακόλουθο: Δεδομένης της ισχυρής συσχέτισης μεταξύ πυρηνικού και κυτταροπλασματικού κλάσματος της maspin, φάνταζε ανέφικτο για το πρόγραμμα CIA να διακρίνει και να μετρήσει ξεχωριστά τη maspin των δύο κυτταρικών διαμερισμάτων. Έτσι, η έκφραση της maspin εκτιμήθηκε στο κύτταρο ως σύνολο, ανεξαρτήτως της παρουσίας της στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή και στους δύο χώρους και, στη συνέχεια, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά τα οποία οι παθολογοανατόμοι είχαν λάβει εκτιμώντας ξεχωριστά τη maspin του

πυρήνα και του κυτταροπλάσματος. Όπως αναφέραμε, η συσχέτιση μεταξύ των δύο μετρήσεων (maspin του πυρήνα έναντι συνολικής $\text{maspin} - \text{IRS}_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$ πυρήνα/ $\text{IRS}_{\text{I.A.SCORE}}$ – και maspin του κυτταροπλάσματος έναντι συνολικής $\text{maspin} - \text{IRS}_{\text{PATHOLOGIST SCORE}}$ κυτταροπλάσματος/ $\text{IRS}_{\text{I.A.SCORE}}$) ήταν επίσης πολύ ισχυρή στατιστικά ($P < 0.001$ και για τις δύο) φανερώνοντας την αλήθεια της ξεχωριστής μέτρησης και επιβεβαιώνοντας, έτσι, τα αποτελέσματα.

Όπως αναφέραμε στο «Γενικό Μέρος» στο Κεφάλαιο για τη maspin , τα αποτελέσματα των μελετών όσον αφορά στη δράση της είναι απολύτως αντιφατικά. Έτσι, άλλες μελέτες δείχνουν πως η maspin δρα ογκοκατασταλτικά και σχετίζεται με καλούς προγνωστικούς παράγοντες (χαμηλό grade, αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, αρνητική χρώση για το p53, χαμηλό ki-67, χαμηλή έκφραση του VEGF, υψηλή έκφραση των ER και PR) και εν γένει με καλή πρόγνωση και άλλες μελέτες δείχνουν τα αντίθετα. Τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα εμφανίζονται τόσο στους διάφορους τύπους καρκίνου γενικότερα όσο και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα.

Ας εξετάσουμε πρώτα τα ως τώρα δεδομένα σχετικά με τη δράση της maspin στους διάφορους τύπους καρκίνου. Η maspin έχει εντοπιστεί σε αρκετά φυσιολογικά επιθήλια όπως του μαστού, του προστάτη, του λεπτού εντέρου, του παχέος εντέρου, της μήτρας, του νεφρού, του θύμου, του όρχι κ.ά. [ενδεικτικά: 423,467,469,608,613]. Από την ανακάλυψη του γονιδίου της maspin , πολύ μεγάλος αριθμός δημοσιευμένων μελετών σε ανθρώπους έχει αναδείξει πως η έκφραση

της maspin αποτελεί προβλεπτικό παράγοντα για καλύτερη πρόγνωση σε αρκετούς τύπους καρκίνου όπως του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του καρκίνου του στόματος εκ πλακωδών κυττάρων. Στις κακοήθειες αυτές φαίνεται πως η μείωσή της (down-regulation) σχετίζεται με πρόοδο της νόσου και μεταστατικό δυναμικό [για μία σύνοψη, βλ. 458]. Ωστόσο, σε άλλες κακοήθειες νόσους, όπως του παγκρέατος, του πνεύμονα, του θυρεοειδή, των ωοθηκών και του ενδομητρίου [614-618], η έκφραση της maspin, παραδόξως, βρισκόταν αυξημένη στα κακοήθη κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα του οργάνου προέλευσης. Η διαφορετική έκφραση της maspin στην πρόοδο του όγκου μοιάζει πολυπαραγοντική και σχετίζεται τουλάχιστον με τους εκάστοτε τύπους ή υπότυπους του καρκίνου [440].

Θα πρέπει να επισημανθεί πως στους τύπους καρκίνου στους οποίους η έκφραση της maspin σχετιζόταν με καλύτερη πρόγνωση και η μείωση της έκφρασής της με πρόοδο της νόσου και μεταστατικό δυναμικό, η έκφραση της maspin σχετιζόταν, επίσης, με αρκετούς κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες καλής πρόγνωσης όπως η ελαττωμένη αγγειογένεση και τα χαμηλότερα επίπεδα VEGF. Τέτοιοι τύποι καρκίνου ήταν το μελάνωμα [619], ο καρκίνος του πνεύμονα [620], ο καρκίνος του παχέος εντέρου [621], ο καρκίνος των ωοθηκών [622] και ο καρκίνος του στόματος εκ πλακωδών κυττάρων [623]. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν αντίθετα αποτελέσματα, δηλαδή θετική συσχέτιση της maspin με την αυξημένη έκφραση του VEGF στον καρκίνο των ωοθηκών (π.χ. [618]) ή καμία συσχέτιση όπως στο

νεφροκυτταρικό [624] ή στο γαστρικό καρκίνωμα [625]. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα τα αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία είναι αντιφατικά.

Όσον αφορά στο ρόλο της maspin στον καρκίνο του μαστού και στην επίδρασή της στην πρόγνωση της νόσου, τα αποτελέσματα από την υπάρχουσα βιβλιογραφία φαίνονται, επίσης, απολύτως αντιφατικά. Κάποιες πρώιμες μελέτες υποστήριξαν τις ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της maspin [409,418,626]. Έτσι, ανεδείχθη η ανασταλτική επίδραση της maspin στην αύξηση του όγκου μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως η αντι-αγγειογενετική της δράση [461], οι αντι-διηθητικές και αντι-μεταστατικές της ιδιότητες [418,452,627] και η αύξηση της μέσω του p53 απόπτωσης [628]. Από την άλλη, διαφορετικά αποτελέσματα έχουν επίσης δημοσιευτεί. Κάποια κρίσιμα στοιχεία αναφέρονται παρακάτω:

- i. **Grade:** Έχει αναφερθεί σημαντική συσχέτιση της maspin με χαμηλό grade [629], γεγονός το οποίο ήταν μάλλον αναμενόμενο, όμως, σε άλλες μελέτες [425,630-634] η υψηλή έκφραση της maspin στον καρκίνο του μαστού σχετιζόταν με υψηλό ιστολογικό grade.
- ii. **Θετικοί μασχαλιαίοι λεμφαδένες:** Οι Hojo και συν [629] ανέδειξαν χαμηλότερη συχνότητα διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων στην ομάδα με θετική maspin. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Maass και συν [608]. Υπήρχε σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της maspin και του status των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Αντίθετα, οι Tsolí και συν [633] έδειξαν θετική στατιστική

σχέση μεταξύ της υψηλής έκφρασης maspin και της θετικότητας των μασχαλιαίων λεμφαδένων.

- iii. **Οι μεταβολές της έκφρασης της maspin κατά την πρόοδο της νόσου:** Σε μία πρώιμη μελέτη [608], ανεδείχθη σημαντική βαθμιαία μείωση της έκφρασης της maspin κατά την εξέλιξη της αλληλουχίας DCIS – διηθητική νόσος – μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Ομοίως, άλλες μελέτες έδειξαν πως το mRNA της maspin είναι μειωμένο στους πρωτοπαθείς όγκους και μη ανιχνεύσιμο στις μεταστάσεις τους [635,636]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, οι Umekita και συν [630] υποστήριξαν μια βαθμιαία αύξηση της συχνότητας έκφρασης της maspin από το στάδιο του DCIS ως το στάδιο του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος του μαστού.
- iv. **p53 status:** Αρκετές μελέτες έδειξαν πως ο p53 ενεργοποιεί τον υποκινητή της maspin μέσω σύνδεσής του απευθείας στην ειδική για αυτόν θέση σύνδεσης [461,637] (βλ. Κεφ. II-5.2.1 – ii). Σε μία πρόσφατη μελέτη [466], οι Sharma και συν έδειξαν πως η θετικότητα του p53 στην ανοσοϊστοχημεία, η οποία σημαίνει απώλεια της λειτουργικής p53 πρωτεΐνης, φαίνεται να συνεισφέρει στην απώλεια της έκφρασης της maspin σε ιστούς από πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού. Από την άλλη, το θετικό p53 status στην ανοσοϊστοχημεία βρέθηκε αλλού [631] να σχετίζεται θετικά και ισχυρά με την έκφραση της maspin.

- v. **Η maspin ως προγνωστικός δείκτης της νόσου:** Οι Maass και συν [608], οι οποίοι έδειξαν πως η έκφραση της maspin φαίνεται να μειώνεται στα προχωρημένα στάδια του καρκίνου του μαστού, υποστηρίζουν πως η maspin αποτελεί ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη, καθώς η αύξησή της (up-regulation) προβλέπει και καλύτερη πρόγνωση. Πολλοί άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν την ιδέα της χρήσης της maspin ως προγνωστικού δείκτη αλλά για τον αντίθετο ακριβώς λόγο. Έτσι, οι Umekita και συν [630,631,638] υποστηρίζουν πως η έκφραση της maspin προβλέπει επιθετικό φαινότυπο και στις μελέτες τους θα μπορούσε να αποτελεί έναν ανεξάρτητο δείκτη πτωχής πρόγνωσης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Παρόμοια αποτελέσματα με τους τελευταίους ερευνητές, προέρχονται και από τους Lee και συν [634], οι οποίοι θεωρούν πως η έκφραση της maspin σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση και από τους Tsoi και συν [632], οι οποίοι θεωρούν πως η υπερέκφραση της maspin σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για διασπορά κλινικά μη ανιχνεύσιμης νόσου και επακόλουθη υποτροπή, σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και, έτσι, είναι πληροφοριακή ως ένας δείκτης πτωχής πρόγνωσης στις ασθενείς αυτές.

Στο σημείο αυτό είναι επιβεβλημένο να αναφερθεί πως οι ερευνητές, οι οποίοι βρήκαν πως η maspin σχετίζεται με επιθετικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και αντίστοιχο φαινότυπο

και προτείνουν το ρόλο δείκτη πτωχής πρόγνωσης για τη maspin, έχουν προσπαθήσει να εξηγήσουν το γιατί τα αποτελέσματά τους διαφέρουν τόσο πολύ από αυτά πολλών άλλων ερευνητών και έχουν δώσει κάποιες πιθανές ερμηνείες: Μία είναι η μετάλλαξη του γονιδίου της maspin, με επακόλουθη πρόκληση απώλειας της φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης της maspin. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να συσσωρευούνται μη λειτουργικές μορφές της πρωτεΐνης [630,631,633]. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που παρουσιάζεται και με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53. Μία δεύτερη πιθανή εξήγηση είναι πως μία υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση της πρωτεΐνης της maspin θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυτο-αναστολή της δράσης της μέσω non-covalent πολυμερισμού [630,639].

Τα εκ διαμέτρου αντίθετα αποτελέσματα των μελετών καθιστούν κατανοητό το γιατί ο πρώιμος ενθουσιασμός σχετικά με τη χρήση της maspin ως δείκτη (biomarker) για την πρόοδο του καρκίνου έχει μετριασθεί αρκετά.

Όπως αναφέρθηκε στο σχετικό κεφάλαιο της maspin, παραμένει ασαφές και διφορούμενο και το ζήτημα της υποκυτταρικής εντόπισης και κατανομής της maspin και πιθανώς αυτή η κατανομή να σχετίζεται με τα αντιφατικά αποτελέσματα των ερευνών.

Δεδομένου του γεγονότος πως η maspin είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών serpin, η έκφρασή της αρχικά θεωρούνταν πως περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Ωστόσο, οι Pemberton και συν [445] πρώτοι έδειξαν, μέσω western blotting, πως η maspin

μπορεί επίσης να ανιχνευτεί στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και μέσω της ανοσοϊστοχημείας. Πιο πρόσφατα, άλλοι ερευνητές ανέδειξαν την πυρηνική εντόπιση της maspin στους καρκίνους του μαστού, του προστάτη και του παγκρέατος [608,614,640]. Έτσι, η maspin φαίνεται να είναι κυρίως κυτταροπλασματική, με κάποια παρουσία στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μερική έκκριση εκτός του κυττάρου καθώς και πυρηνική εντόπιση [444]. Ωστόσο, άλλες πρόσφατες μελέτες [π.χ. 447] υποστηρίζουν πως η maspin είναι μια αυστηρά ενδοκυττάρια (πυρηνο-κυτταροπλασματική) πρωτεΐνη και δεν εκκρίνεται από το κύτταρο. Η παρουσία της maspin σε διαφορετικούς χώρους του κυττάρου υποδεικνύει πιθανώς και διαφορετικές λειτουργίες του κάθε κλάσματος ανάλογα με την εντόπισή του [444], αν και η βιολογική σημασία του γεγονότος αυτού παραμένει συγκεχυμένη [466]. Υπάρχουν πειραματικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν πως οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της maspin οφείλονται στο πυρηνικό της κλάσμα και μόνο.

Αξίζει να σημειωθεί πως οι μελέτες, οι οποίες ανέδειξαν συσχέτιση της maspin με πτωχή πρόγνωση και πτωχές προγνωστικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, εκτίμησαν (πιθανώς στο σύνολό τους, βάσει της σχετικής διερεύνησης που διενεργήσαμε στη διεθνή βιβλιογραφία) τη χρώση της maspin ανεξάρτητα από την υποκυτταρική της κατανομή, χωρίς δηλαδή να διαχωρίσουν κατά την εκτίμηση το πυρηνικό από το κυτταροπλασματικό κλάσμα της. Οι Umekita και συν [630,631,638], οι οποίοι βρήκαν σημαντική συσχέτιση

της έκφρασης της maspin με το μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, το υψηλότερο ιστολογικό grade [630,631,638], τον basal-like υπότυπο [638] και επομένως μεταξύ της maspin και της υιοθέτησης επιθετικού φαινότυπου από τον όγκο, εκτέλεσαν τις μετρήσεις τους χωρίς να ξεχωρίζουν μεταξύ πυρηνικής και κυτταροπλασματικής maspin. Οι Lee και συν [634], οι οποίοι συσχέτισαν την έκφραση της maspin με υψηλότερο ιστολογικό grade, μεγαλύτερο μέγεθος όγκου, θετικό p53 status, χαμηλότερη επιβίωση και πτωχή πρόγνωση «εκτίμησαν την έκφραση της maspin στο κυτταρόπλασμα ή στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού», δε διαχώρισαν δηλαδή στις μετρήσεις τους ούτε αυτοί τα δύο υποκυτταρικά κλάσματα της maspin. Ομοίως, οι Tsoi και συν [633], οι οποίοι βρήκαν πως η υπερέκφραση της maspin σχετιζόταν με αυξημένο κίνδυνο θανάτου και πως η maspin προοδευτικά αυξανόταν στους υψηλού grade όγκους, επίσης, «εκτίμησαν ως θετική την πυρηνική ή κυτταροπλασματική χρώση στα καρκινικά κύτταρα».

Σε αντίθεση με τους ανωτέρω ερευνητές, οι ερευνητές οι οποίοι εκτίμησαν την ενδεχόμενη συσχέτιση του καρκίνου του μαστού με το πυρηνικό κλάσμα της maspin συγκεκριμένα, έλαβαν ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα. Οι Mohsin, Zhang, Clark και Allred, σε μία πρώιμη κλινικοπαθολογοανατομική μελέτη (2003) [641], με τη συμμετοχή μεγάλου αριθμού ασθενών, ήταν οι πρώτοι ερευνητές, οι οποίοι εκτίμησαν την επίδραση της πυρηνικής maspin στον καρκίνο του μαστού ξεχωριστά από αυτήν της κυτταροπλασματικής maspin. Στη μελέτη τους, η πυρηνική χρώση της maspin σχετιζόταν με καλούς

προγνωστικούς παράγοντες (θετικοί οιστρογονικοί – ER και προγεστερονικοί – PR υποδοχείς), ενώ η κυτταροπλασματική χρώση σχετιζόταν με πτωχούς προγνωστικούς παράγοντες (αρνητικοί ER και PR). Έτσι, οι ερευνητές αυτοί ήταν οι πρώτοι που πρότειναν την ιδέα πως η παρουσία της maspin σε δύο διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου μπορεί να συνεπάγεται και αντίστοιχη διαφορετική βιολογική και κλινική συμπεριφορά. Οι Joensuu και συν [642] βρήκαν πως ειδικά η κυτταροπλασματική έκφραση της maspin ήταν πολύ υψηλότερη στους πρωτοπαθείς όγκους των καρκίνων του μαστού που μεθίστανται νωρίτερα (early metastasizing breast cancers), όπως και στις μεταστατικές εστίες τους, σε σχέση με τους όγκους που μεθίστανται πιο καθυστερημένα (late metastasizing breast cancers). Αντιθέτως, οι όγκοι που χαρακτηρίζονταν από καθυστερημένη υποτροπή (late recurrence) εμφάνιζαν και αυξημένη πυρηνική χρώση της maspin. Επιπλέον, η έκφραση του p53 (δείκτης πτωχής πρόγνωσης) σχετιζόταν σημαντικά με την κυτταροπλασματική maspin. Πολλές άλλες σχετικές μελέτες [π.χ. 447,470,643] έχουν καταλήξει σε παρόμοια αποτελέσματα.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η παρατήρηση πως η maspin του πυρήνα σχετίζεται με ευνοϊκότερες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και μακρότερη επιβίωση έχει ισχύ όχι μόνο στον καρκίνο του μαστού αλλά και σε άλλες κακοήθεις νόσους όπως π.χ. ο καρκίνος του πνεύμονα. Έτσι, μία πρόσφατη σχετική μελέτη στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [440] έδειξε πως το πυρηνικό κλάσμα της maspin, αλλά όχι το πυρηνικό κλάσμα μαζί με το κυτταροπλασματικό, συνδέεται με καλύτερα διαφοροποιημένους

επιθηλιακούς φαινότυπους, μειωμένη αγγειογένεση του όγκου, αυξημένη ευαισθησία στην απόπτωση που προκαλείται από την αντινεοπλασματική αγωγή (αυξημένη δηλαδή ευαισθησία στα φάρμακα) και εν τέλει καλύτερη πρόγνωση. Στη μελέτη αυτή, αυστηρά η πυρηνική εντόπιση της maspin σχετιζόταν με σημαντικά χαμηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού ki-67 και χαμηλότερο VEGF-A (και οι δύο παράγοντες πτωχής πρόγνωσης). Βρέθηκε ακόμη πως υπάρχει ένας διακόπτης (switch), ο οποίος οδηγεί το κύτταρο από ένα μοντέλο αποκλειστικής παρουσίας της maspin στον πυρήνα σε ένα άλλο, στο οποίο η maspin εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ο διακόπτης αυτός φαίνεται πως ενεργοποιείται σε πιο πρώιμο στάδιο από το in situ καρκίνωμα.

Κατά συνέπεια, είναι προφανές πως η πυρηνική παρουσία της maspin είναι αναγκαία και απαραίτητη για την ογκοκατασταλτική και κατασταλτική – της διαδικασίας της μετάστασης – δράση της in vivo [470,643]. Σε μία ιδιαίτερα σημαντική πρόσφατη (2011) μελέτη [643], διερευνήθηκε η παρουσία και η δράση της maspin σε δύο κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων από διηθητικά, υψηλού μεταστατικού δυναμικού καρκινώματα. Η πρώτη κυτταρική σειρά ήταν από μεταστατικό καρκίνο του μαστού με όνομα D3H2LN και η δεύτερη από άλλο μεταστατικό επιθηλιακό καρκίνωμα με όνομα H3p3. Και στις δύο κυτταρικές σειρές η ποσότητα της maspin ήταν τόσο χαμηλή, σε σημείο που να καθίσταται μη ανιχνεύσιμη. Όταν στις δύο επιθετικές κυτταρικές σειρές τα καρκινικά κύτταρα ωθήθηκαν να παράγουν ξανά maspin, αυτή φαίνεται πως τις εμπόδιζε να δημιουργήσουν

μεταστάσεις, σε δύο in vivo μοντέλα. Ωστόσο, είναι εντυπωσιακό το γεγονός πως όταν η maspin οδηγούνται σε έξοδο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, η αναστολή του μεταστατικού δυναμικού που παρείχε προηγουμένως χανόταν. Στην πραγματικότητα, τα καρκινικά κύτταρα που εξέφραζαν κυρίως εξωπυρηνική (κυτταροπλασματική) maspin εμφάνιζαν ισχυρότερο μεταστατικό δυναμικό από τα κύτταρα-μάρτυρες, δηλαδή από αυτά που δεν παρήγαγαν καθόλου maspin. Τα δεδομένα αυτά, όχι μόνο δείχνουν πως η πυρηνική εντόπιση της maspin είναι ζωτικής σημασίας για τη δράση της ως ογκοκαταστολέα, αλλά δείχνουν ακόμη πως η κυτταροπλασματική maspin καθώς και η εκκρινόμενη maspin στον εξωκυττάριο χώρο δε συνεισφέρουν καθόλου στη δράση της.

Ο μηχανισμός που ρυθμίζει την πυρηνική εντόπιση της maspin ή την είσοδο και την έξοδό της από τον πυρήνα παραμένει άγνωστος. Έχει υποτεθεί πως το πυρηνικό κλάσμα της maspin είτε περιέχει μια μη κλασική αλληλουχία, η οποία ακόμη παραμένει να ανακαλυφθεί, είτε συνδέεται με κάποια ειδική πρωτεΐνη για να μεταφερθεί εντός του πυρήνα μετά την παραγωγή της [643].

Όσον αφορά στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς μέσω των οποίων η maspin δρα ως ογκοκαταστολέα και ως καταστολέα της μεταστατικής διαδικασίας, φαίνεται πως η maspin πιθανώς να ασκεί το ρόλο της στον πυρήνα στο επίπεδο της ρύθμισης γονιδίων και, έτσι, με έμμεσο τρόπο να συμμετέχει και να επηρεάζει την αλληλεπίδραση κυττάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας ή τους μηχανισμούς

κυτταρικής διαφοροποίησης [447,470,643]. Έχουν ως σήμερα εξεταστεί αρκετά γονίδια ως πιθανοί στόχοι της maspin, για ρύθμισή τους από αυτήν.

Εδώ, θα πρέπει να αναφερθεί πως η ιδέα ότι οι serpins, μία εκ των οποίων είναι και η maspin, αποτελούν ρυθμιστές της χρωματίνης δεν είναι καινούρια. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη MENT (myeloid and erythroid nuclear termination stage-specific protein) είναι μία serpin γνωστή για τη συμμετοχή της στη συμπύκνωση της χρωματίνης [644].

Τα δεδομένα που ολοένα προκύπτουν δείχνουν πως η πυρηνική maspin μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να διαμεσολαβεί μια συνομιλία («cross-talk») μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των συστατικών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης ορισμένων γονιδίων όπως είναι π.χ. το CSF1. Το CSF1 είναι ένα γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή του παράγοντα cytokine colony-stimulating factor-1 [643]. Η συμμετοχή του CSF1 στην πρόοδο του καρκίνου του μαστού και στη διαδικασία της μετάστασης είναι γνωστή και επαρκώς τεκμηριωμένη [645]. Στη μελέτη, στην οποία αναφερθήκαμε πιο πάνω με τις δύο κυτταρικές σειρές [643], βρέθηκε πως η maspin έχει τη δυνατότητα να συνδέεται στον υποκινητή (promoter) το γονιδίου CSF1, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή της CSF1 πρωτεΐνης και έτσι η έκφραση της CSF1 πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μειωμένη στα καρκινικά κύτταρα που εξέφραζαν περισσότερο τη maspin. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής δείχνουν την ύπαρξη ευθείας

συσχέτισης μεταξύ της μειωμένης έκφρασης CSF1 και της σύνδεσης της πυρηνικής maspin στον promoter του γονιδίου CSF1.

Στην παραπάνω μελέτη [643], διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η maspin συνδέεται και στον promoter του γονιδίου ESRRA. Το ESRRA (Estrogen Receptor Related Alpha, γνωστό και ως ERR1) κωδικοποιεί την παραγωγή ενός καλά μελετημένου «ορφανού» πυρηνικού υποδοχέα, ο οποίος μοιάζει με τον υποδοχέα οιστρογόνων (Estrogen Receptor – ER) και σχετίζεται με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της ενέργειας. Τα επίπεδα της έκφρασης του ESRRA έχουν συσχετισθεί θετικά με την πρόοδο του καρκίνου του μαστού και την αγγειογένεση [646-650, περίληψη στο 651]. Στον καρκίνο των ωοθηκών, η έκφραση του ESRRA έχει επίσης σχετισθεί με μειωμένη επιβίωση [652]. Στην προαναφερθείσα, λοιπόν, μελέτη [643], αναδείχθηκε η σύνδεση της maspin στον promoter του ESRRA, ενώ και τα επίπεδα του mRNA του ESRRA βρίσκονται μειωμένα στους όγκους που εκφράζουν τη maspin. Συμπερασματικά, φαίνεται πως τουλάχιστον δύο γονίδια με ρόλο κρίσιμο για την πρόοδο του καρκίνου του μαστού υφίστανται αρνητική ρύθμιση από την πυρηνική maspin, γεγονός που υποστηρίζει σθεναρά τον ογκοκατασταλτικό ρόλο του πυρηνικού κλάσματος της maspin [643].

Αξίζει να επισημανθεί πως, σε μοριακό επίπεδο, η maspin αλληλεπιδρά και ρυθμίζει τη δράση της αποακετυλάσης ιστονών-1 (HDAC1), η οποία, όπως αναφέρθηκε στο σχετικό κεφάλαιο για τη maspin στο «Γενικό Μέρος», αποτελεί η ίδια έναν από τους ρυθμιστές του γονιδίου της

maspin. Είναι πιθανό πως αντί να ρυθμίζει τη συνολικά ακετυλίωση των ιστονών, η maspin επηρεάζει ειδικά τη δράση της αποακετυλάσης των ιστονών (HDAC1), μέσω γονιδιακής ρύθμισης (η μία πρωτεΐνη δηλαδή ρυθμίζει το γονίδιο της άλλης και αντιστρόφως) [643].

Προσθέτοντας και το γονίδιο της HDAC1 σε αυτά των CSF1 και ESRRΑ, έχουμε συνολικά τρία γονίδια με ρόλο κρίσιμο στη διαδικασία της ανάπτυξης και προόδου του καρκίνου τα οποία ρυθμίζονται από το πυρηνικό κλάσμα της maspin, ασκώντας τον ογκοκατασταλτικό της ρόλο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν πως οι μεταβολές στην υποκυτταρική – ενδοκυττάρια εντόπιση – κατανομή της maspin μπορούν να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά και την επιθετικότητα ενός όγκου, χωρίς μεταβολή των επιπέδων του RNA (!) της πρωτεΐνης της maspin. Έτσι, ενώ οι γονιδιακές υπογραφές έχουν καταστεί αναγκαίες και απαραίτητες για την κατανόηση της καρκινογενετικής διαδικασίας, φαίνεται πως είναι η έκφραση, οι μετα-μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η ενδοκυττάρια εντόπιση των πρωτεϊνών που είναι τελικά υπεύθυνες για τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και την πρόγνωση των ασθενών [643]. Τέλος, υπάρχουν σαφείς ενδείξεις πως η προσπάθεια επανέκφρασης της maspin στους maspin-αρνητικούς όγκους χρησιμοποιώντας τεχνητούς μεταγραφικούς παράγοντες (Artificial Transcription Factors – ATFs) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπευτική του καρκίνου [653]. Όσον αφορά στην

υποκυτταρική εντόπιση της maspin, φαίνεται πως είναι κρίσιμο να διαλευκανθούν οι ρυθμιστικοί παράγοντες, τα ρυθμιστικά σηματοδοτικά μονοπάτια και οι συνομιλίες μεταξύ τους (cross-talks), που διαμεσολαβούν την πυρηνική έναντι της κυτταροπλασματικής εντόπισής της, καθώς είναι φανερό πως αυτό θα μπορούσε να προσφέρει νέους θεραπευτικούς στόχους.

Συνεκτιμώντας όλα τα ανωτέρω αλλά και λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός πως η εκτίμηση της πυρηνικής χρώσης, γενικά μιλώντας στην Παθολογοανατομία, είναι λιγότερο χρονοβόρα, λιγότερο επίπονη, δυσχερής και απαιτητική και περισσότερο σαφής και αντικειμενική από την αντίστοιχη εκτίμηση μιας κυτταροπλασματικής χρώσης, φαίνεται πως η ξεχωριστή εκτίμηση του πυρηνικού κλάσματος της maspin έχει ιδιαίτερη αξία στην κλινική πράξη.

Εύρημα 2^ο:

Στη μελέτη μας, ο μόνος παράγοντας που βρέθηκε να συσχετίζεται με τη maspin ήταν οι προγεστερονικοί υποδοχείς (PR), οι οποίοι ανέδειξαν αρνητική συσχέτιση, οριακής στατιστικής σημαντικότητας ($P = 0.059$) με τη maspin του πυρήνα. Είναι αξιοσημείωτο πως, αντιθέτως, δεν ανεδείχθη ουδεμία συσχέτιση μεταξύ των PR και της maspin του κυτταροπλάσματος, γεγονός που συνεισφέρει στην ιδέα των διαφορετικών ρόλων των υποκυτταρικών κλασμάτων της maspin.

Η σχετική βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα πτωχή, με ελάχιστες μελέτες να έχουν διερευνήσει μία πιθανή σχέση μεταξύ των PR και της maspin. Δύο σχετικές μελέτες [631,634], οι οποίες όμως εξέτασαν την έκφραση της maspin ανεξαρτήτως του υποκυτταρικού διαμερίσματος εντόπισής της, ανέδειξαν, όπως κι εμείς, αρνητική συσχέτιση της έκφρασης των PR και της maspin. Αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάσθηκαν στη μελέτη των Mohsin και συν [641] στον καρκίνο του μαστού, όπου η πυρηνική maspin σχετιζόταν θετικά και ισχυρά τόσο με τους οιστρογονικούς (ER) όσο και με τους προγεστερονικούς (PR) υποδοχείς, ενώ η κυτταροπλασματική maspin σχετιζόταν αρνητικά και με τις δύο κατηγορίες ορμονικών υποδοχέων. Έτσι, στη μελέτη αυτή η πυρηνική maspin ανέδειξε συσχέτιση με παράγοντες καλής πρόγνωσης.

Είναι φανερό πως τόσο λόγω των ελάχιστων σχετικών ερευνών όσο και λόγω των αντιφατικών αποτελεσμάτων, η συσχέτιση της maspin με τους ορμονικούς υποδοχείς και μάλιστα με τους προγεστερονικούς (PR), η οποία είναι και η λιγότερο διερευνημένη, παραμένει ασαφής.

Εύρημα 3^ο:

Κατά τη διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της maspin και της διαδικασίας της αγγειογένεσης, μέσω της εκτίμησης του VEGF και της μικροαγγειακής πυκνότητας (MicroVessel Density – MVD, διά του CD34) στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού δεν αναδείξαμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε μεταξύ της maspin και του VEGF, ούτε μεταξύ της maspin και του CD34.

Η σχετική βιβλιογραφία όσον αφορά στην εξέταση της σχέσης maspin – αγγειογένεσης, στον καρκίνο του μαστού, είναι ελάχιστη ως μηδαμινή. Συγκεκριμένα, από τη σχετική διερεύνηση στην οποία προβήκαμε, εντοπίσαμε μόνο μία σχετική μελέτη [466], στην οποία να έχουν μελετηθεί ταυτόχρονα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού η maspin και ο VEGF. Όσον αφορά στην εξέταση της σχέσης αυτής σε άλλους τύπους καρκίνου, τα ευρήματα είναι και πάλι αντιφατικά, αν και οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν πως μάλλον η maspin (και μάλιστα το πυρηνικό της κλάσμα) δρα αντι-αγγειογενετικά.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, στη μοναδική σχετική μελέτη στη βιβλιογραφία (2011) [466], η έκφραση του VEGF-A ήταν χαμηλότερη στους όγκους με αυξημένη έκφραση maspin σε σχέση με τους όγκους που εμφάνιζαν απώλεια της έκφρασής της (μέσω υπερμεθυλίωσης του promoter).

Στον καρκίνο των ωοθηκών, σε τρεις σχετικές μελέτες [618,622,654], τα αποτελέσματα είναι πλήρως αλληλοσυγκρουόμενα και αντιφατικά. Στη μία από αυτές [618], σε έλεγχο 60 περιστατικών καρκίνου των ωοθηκών, η maspin παρουσίαζε ισχυρή θετική συσχέτιση με τον VEGF-A ($P = 0.01$), το VEGF-C ($P < 0.001$) και το VEGF-D ($P < 0.001$). Έτσι, θεωρήθηκε πως η maspin σχετίζεται ευθέως με τη βιολογική επιθετικότητα του συγκεκριμένου τύπου καρκινώματος και πως ασκεί τις αρνητικές προγνωστικές της επιδράσεις δρώντας σε συνεργασία με το VEGF, προωθώντας τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Στις δύο άλλες μελέτες [622,654], η έκφραση της maspin σχετιζόταν αρνητικά με την

έκφραση τόσο του VEGF όσο και του MVD. Στην δεύτερη μάλιστα [654], η αντίστροφη συσχέτιση maspin – VEGF αφορούσε στο πυρηνικό κλάσμα της maspin: οι όγκοι με θετική πυρηνική χρώση για τη maspin παρουσίαζαν χαμηλότερη έκφραση VEGF και MVD, σε σχέση με τους όγκους χωρίς έκφραση maspin ή με κυτταροπλασματική έκφραση μόνο. Το συμπέρασμα, από τις δύο τελευταίες μελέτες [622,654], ήταν πως η πυρηνική maspin ασκεί ογκοκατασταλτική δραστηριότητα και αυτή διενεργείται, τουλάχιστον κατά μέρος, μέσω αντι-αγγειογενετικής δράσης. Πρέπει να σημειωθεί πως στην πρώτη μελέτη που αναφέραμε σχετικά με τη σχέση VEGF – maspin στον καρκίνο των ωοθηκών [618] και η οποία ανέδειξε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο μορίων και στενή θετική συσχέτιση της maspin με την επιθετικότητα του όγκου, η μέτρηση της έκφρασης της maspin είχε γίνει ανεξαρτήτως της ενδοκυττάριας εντόπισής της, γεγονός που παραπέμπει σε όσα έχουν προηγουμένως διατυπωθεί σχετικά με την εξήγηση των αντιφατικών αποτελεσμάτων για το ρόλο της maspin.

Για τον καρκίνο του πνεύμονα, τα αποτελέσματα είναι επίσης αντιφατικά. Έτσι, οι Frey και συν [620], όπως επίσης και οι Lonardo και συν [440] βρήκαν πως η πυρηνική maspin, σε σχέση με τη συνολική κυτταρική έκφραση της maspin (πυρηνική και κυτταροπλασματική μαζί), σχετιζόταν με χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του VEGF-A, φανερώνοντας ογκοκατασταλτική δράση και καλύτερη πρόγνωση. Τα ενδοκυττάρια μονοπάτια που συνδέουν την πυρηνική maspin με το VEGF παραμένουν άγνωστα, ωστόσο, έχει υποτεθεί πως η πυρηνική maspin μπορεί να επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου του VEGF

[620]. Σε άλλη μελέτη, σχετική με τη συσχέτιση μεταξύ maspin και VEGF [655], έχει δειχθεί πως η maspin εμποδίζει τη μέσω οξειδωτικού stress αύξηση της παραγωγής VEGF-A στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, άλλες μελέτες [655-659] δεν ανέδειξαν την ύπαρξη κάποιας συσχέτισης μεταξύ της maspin και του VEGF στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Στον καρκίνο του στόματος από πλακώδη κύτταρα, μία σχετική μελέτη [623] ανέδειξε ισχυρή αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF με την έκφραση του γονιδίου της maspin, υιοθετώντας το συμπέρασμα πως το γονίδιο της maspin προκαλεί πιθανώς down-regulation της έκφρασης του γονιδίου του VEGF. Άλλη έρευνα σε καρκινώματα της γλώσσας [660] ανέδειξε αρνητική συσχέτιση της κυτταροπλασματικής (!) χρώσης της maspin με την έκφραση του VEGF, ενώ παράλληλα στη μελέτη αυτή η maspin δεν εμφάνιζε καθόλου πυρηνική χρώση.

Μελέτες σε γαστρικό [625] και σε νεφροκυτταρικό καρκίνωμα [624] δεν κατάφεραν να αναδείξουν την ύπαρξη οιασδήποτε συσχέτισης μεταξύ του VEGF και της maspin. Στη μελέτη στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα [624], οι ερευνητές οδηγήθηκαν έτσι στην υπόθεση πως η maspin ασκεί τις δράσεις της μέσω μηχανισμών, στους οποίους δε συμπεριλαμβάνεται η αγγειογένεση.

Μελέτη σε ασθενείς με μελάνωμα [619] φανέρωσε σημαντική αρνητική συσχέτιση της ολικής maspin με την αγγειογένεση. Συγκεκριμένα, η αυξημένη maspin φαίνεται πως είχε σχέση με

λεπτότερους όγκους, μειωμένη αγγειογένεση και χαμηλότερα επίπεδα VEGF και MVD.

Σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο [621] το πυρηνικό κλάσμα της maspin βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με το VEGF. Επιπλέον, η πυρηνική maspin μειωνόταν όσο εξελίσσονταν τα στάδια της νόσου με την παρουσία της να μηδενίζεται στο στάδιο IV, εκεί όπου η χρώση του VEGF ήταν η μέγιστη σε ένταση.

Οι παραπάνω αντιφάσεις που υπάρχουν στην ως τώρα διατιθέμενη βιβλιογραφία σχετικά και με τη σχέση της maspin με το VEGF ή αλλιώς της maspin με την αγγειογένεση φανερώνουν τη μεγάλη ανάγκη για περισσότερες σχετικές έρευνες σε όλους τους τύπους καρκίνου. Ακόμη περισσότερο επιτακτική, όμως, μοιάζει να είναι η ανάγκη μελετών στον καρκίνο του μαστού, καθώς η έλλειψη δεδομένων για τη σχέση maspin και αγγειογένεσης, ειδικά σε αυτό τον τύπο κακοήθειας, είναι εκκωφαντική.

Στη δική μας μελέτη, ύπαρξη τέτοιας σχέσης δεν αναδείξαμε, κάτι το οποίο συνέβη και σε κάποιες άλλες μελέτες, όπως προαναφέραμε. Αν όντως αυτό ισχύει, φαίνεται πως η δράση της maspin ασκείται στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού, χωρίς στους στόχους της να περιλαμβάνονται η αγγειογένεση και η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF.

Εύρημα 4^ο:

Στη μελέτη μας εντοπίσαμε την ύπαρξη ισχυρής θετικής συσχέτισης μεταξύ του VEGF και της θετικότητας του HER2 ($P = 0.023$), καθώς επίσης και μεταξύ του VEGF και του ιστολογικού grade της νόσου ($P = 0.016$) στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού.

Τα γεγονότα αυτά έχουν ήδη αναδειχθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, θεωρείται πως η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται θετικά από τη σηματοδότηση που ξεκινά από τον υποδοχέα HER2 [357,359,661,662]. Η αύξηση (up-regulation) του HER2 σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του VEGF τόσο στο επίπεδο του RNA όσο και στο επίπεδο της παραγωγής της πρωτεΐνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Ακολούθως, βρέθηκε πως η έκθεση HER2(+) κυττάρων στο trastuzumab επιφέρει σημαντική μείωση στην παραγωγή του VEGF [663] (η δράση αυτή του trastuzumab διενεργείται κυρίως μέσω down-regulating του PI3K/AKT σηματοδοτικού δρόμου). Τα επίπεδα του VEGF έχουν βρεθεί στενά σχετισμένα με την έκφραση του HER2 σε αρκετές προκλινικές και κλινικές μελέτες στον καρκίνο του μαστού [360,664]. Έτσι, τα υψηλά επίπεδα του VEGF συνεισφέρουν στην πτωχή πρόγνωση και την επιθετική συμπεριφορά των όγκων σε περιπτώσεις HER2-overexpressing καρκίνων του μαστού, φανερώνοντας πως η διέγερση της παραγωγής VEGF και η προώθηση έτσι της αγγειογένεσης αποτελεί μία από τις βασικές λειτουργίες του σηματοδοτικού δρόμου που κινητοποιείται από τον ενεργοποιημένο HER2 υποδοχέα [510]. Με άλλα λόγια, οι επιδράσεις του HER2 στη συμπεριφορά των όγκων και στον επιθετικό φαινότυπο διαμεσολαβούνται, έστω εν μέρει, από την αυξημένη αγγειογένεση

[360,494]. Η Shc, μία downstream πρωτεΐνη-συνδετήρας (adaptor) του σηματοδοτικού δρόμου του HER2, έχει βρεθεί να αποτελεί κριτικό «διακόπτη» (switch) για την παραγωγή του VEGF [398].

Επιπλέον, η διέγερση του HER2 από τη heregulin-β βρέθηκε πως οδηγεί σε up-regulation της έκφρασης του VEGF-C και σε προώθηση έτσι της διαδικασίας της λεμφαγγειογένεσης [505].

Είναι, επομένως, εμφανές πως, όπως δείξαμε στη μελέτη μας αλλά είναι γνωστό και από την ως τώρα βιβλιογραφία, υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ VEGF και HER2 και, όπως όλες οι ενδείξεις συντείνουν, το HER2 αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου του VEGF. Τέλος, σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί η σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης του VEGF με το υψηλό grade της νόσου τόσο στον καρκίνο του μαστού όσο και σε άλλες κακοήθειες.

Εύρημα 5^ο:

Δεν ανεδείχθησαν συσχετίσεις στατιστικά σημαντικές της maspin με τις παρακάτω παραμέτρους: ηλικία, grade, status των T, N και M, stage, οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), HER2 status, θετικότητα των ki-67 και p53 και μοριακή ταξινόμηση της νόσου. Ανεδείχθη, ωστόσο, συσχέτιση της maspin με τους προγεστερονικούς υποδοχείς (PR), όπως περιγράφηκε παραπάνω (εύρημα 2^ο).

III-4**Συμπεράσματα****& Προοπτικές**

- I. Στη μελέτη μας αυτή, εξετάσαμε την έκφραση της maspin στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού, αρχικά ξεχωριστά στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα μέσω απλού μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM) και στη συνέχεια συνολικά στο κύτταρο μέσω ενός Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος. Η συγκριτική αυτή εξέταση, απ' όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, δεν έχει πραγματοποιηθεί ξανά για τη maspin, όχι μόνο στον καρκίνο του μαστού αλλά ούτε σε κάποια άλλη κακοήθη νόσο. Και τα δύο υποκυτταρικά κλάσματα της maspin σχετιζόνταν ισχυρά μεταξύ τους ($P < 0.001$). Η ολική maspin που εκτιμήθηκε με το Image Analysis (CIA) σύστημα σχετιζόταν θετικά και ισχυρά τόσο με το πυρηνικό κλάσμα της maspin όσο και με το κυτταροπλασματικό ($P < 0.001$ και για τα δύο). Λαμβάνοντας υπόψιν τη διαφαινόμενη διαφορετική δράση των δύο υποκυτταρικών κλασμάτων της maspin, οι μελλοντικές έρευνες θα είναι χρήσιμο να μελετούν και τις τρεις συνιστώσες της maspin στο κύτταρο (πυρηνική – κυτταροπλασματική – ολική), όπως τις μελετήσαμε και εμείς, για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων.
- II. Στη μελέτη μας, το πυρηνικό κλάσμα της maspin σχετιζόταν αρνητικά, σε οριακό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ($P = 0.059$), με τους προγεστερονικούς υποδοχείς (PR), ενώ το κυτταροπλασματικό κλάσμα δεν παρουσίαζε συσχέτιση με τους PR. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη περί διακριτών

(συνήθως δε, αντιθέτων)δράσεων των δύο υποκυτταρικών κλασμάτων της maspin.

- III. Δεν ανευρέθηκε στη μελέτη μας συσχέτιση στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού μεταξύ της έκφρασης της maspin και της έκφρασης του VEGF. Τα σχετικά δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά στο μαστό είναι από ελάχιστα ως ανύπαρκτα (μία μόνο σχετική μελέτη εντοπίσαμε κατά τη διερεύνηση της βιβλιογραφίας), ενώ όσον αφορά σε άλλες κακοήθειες πλήρως αντιφατικά. Αυτό έρχεται σε αναλογία με τα γενικότερα αντιφατικά και αλληλοσυγκρουόμενα αποτελέσματα αφορώντα στη δράση της maspin τόσο στον καρκίνο του μαστού όσο και στις άλλες κακοήθειες νόσους. Ωστόσο, αν το εύρημά μας επιβεβαιωθεί και σε μελλοντικές έρευνες, υποδηλώνει πως η δράση της maspin, τουλάχιστον στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού, ασκείται χωρίς να περιλαμβάνεται στους στόχους της η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου του VEGF και, ως εκ τούτου, η διαδικασία της αγγειογένεσης.
- IV. Στη μελέτη μας αναδείχθηκε η ύπαρξη ισχυρής θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του VEGF από τη μία και της θετικότητας του υποδοχέα HER2 καθώς και του grade της νόσου από την άλλη, στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού. Τα ευρήματα αυτά είναι απολύτως συμβατά με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Είναι, επιπλέον, πιθανό ο HER2 υποδοχέας να αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της έκφρασης του γονιδίου του VEGF.

- V. Συμπερασματικά, φαίνεται πως τα διφορούμενα και «σκοτεινά» σημεία παραμένουν αρκετά, όπως: Η ακριβής λειτουργία της maspin στον καρκίνο γενικότερα και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα, η υποκυτταρική της εντόπιση και η βιολογική της, η σχέση της με την αγγειογένεση και το VEGF καθώς και η σχέση της με τους ορμονικούς υποδοχείς και πιο ειδικά με τους προγεστερονικούς (PR). Για την πλήρη διαλεύκανσή τους υπάρχει ανάγκη πολλών ακόμη σχετικών ειδικά σχεδιασμένων μελετών, ούτως ώστε να επιτευχθεί η υιοθέτηση της maspin ως αξιόπιστου δείκτη (biomarker), όπως είχε αρχικά προβλεφθεί.
- VI. Ωστόσο, φαίνεται πως, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφ. «III-3 Συζήτηση», οι μεταβολές στην υποκυτταρική – ενδοκυττάρια εντόπιση – κατανομή της maspin μπορούν να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό τη συμπεριφορά και την επιθετικότητα ενός όγκου. Έτσι, καθώς η έρευνα προχωρά και οι γονιδιακές υπογραφές έχουν καταστεί αναγκαίες και απαραίτητες για την κατανόηση της καρκινογενετικής διαδικασίας, φαίνεται πως είναι η έκφραση, οι μετα-μεταγραφικές και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και η ενδοκυττάρια εντόπιση των πρωτεϊνών που είναι τελικά υπεύθυνες για τη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων και την πρόγνωση των ασθενών.
- VII. Επιπλέον, δεδομένων των ενδείξεων που υπάρχουν πως η προσπάθεια επανέκφρασης της maspin στους maspin-αρνητικούς όγκους αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπευτική του καρκίνου, η maspin θα μπορούσε

μελλοντικά, αφού διευκρινισθούν επαρκώς οι δράσεις της, να αποτελέσει έναν ακόμη θεραπευτικό στόχο, μαζί με πολλούς άλλους, στα δαιδαλώδη σηματοδοτικά μονοπάτια και αναρίθμητα cross-talks εντός του κυττάρου, για την καταπολέμηση της κακοήθους νόσου.

IV.

Περίληψη (Summary)

Σκοπός της μελέτης

Αντιφατικά αποτελέσματα έχουν ως τώρα αναφερθεί αφορώντα το ρόλο της maspin αλλά και την υποκυτταρική (ενδοκυττάρια) κατανομή της στον καρκίνο του μαστού. Σκοπός της έρευνάς μας ήταν να εξετάσει την υποκυτταρική εντόπιση (πυρηνική – κυτταροπλασματική) της maspin στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού και να συγκρίνει την εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης από ένα παθολογοανατόμο μέσω του απλού μικροσκοπίου (Light Microscopy – LM) με την εκτίμηση μέσω ενός Computerized Image Analysis (CIA) συστήματος. Επίσης, εξετάσθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης της maspin και της έκφρασης του VEGF, της εκτίμησης της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD) μέσω του CD34 και άλλων κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων.

Μέθοδοι

Το δείγμα μας αποτέλεσαν 48 πρωτοπαθή πορογενή διηθητικά καρκινώματα του μαστού. Η χρώση της maspin μετρήθηκε και βαθμολογήθηκε από δύο παθολογοανατόμους μέσω του μικροσκοπίου (LM) ξεχωριστά για το πυρηνικό και το κυτταροπλασματικό κυτταρικό διαμέρισμα. Η έκφραση της ολικής maspin εκτιμήθηκε μέσω ενός CIA συστήματος. Εφαρμόσθηκε μονομεταβλητή μη παραμετρική στατιστική καθώς και πολυμεταβλητή stepwise ordinal logistic regression ανάλυση.

Αποτελέσματα

Τα δύο υποκυτταρικά κλάσματα της maspin σχετίζονταν θετικά και ισχυρά μεταξύ τους ($P < 0.001$). Η ολική maspin σχετιζόταν επίσης θετικά και ισχυρά τόσο με το πυρηνικό κλάσμα της όσο και με το κυτταροπλασματικό ($P < 0.001$ και για τις δύο συσχετίσεις). Η πυρηνική maspin εμφάνιζε αρνητική οριακής στατιστικής σημαντικότητας συσχέτιση με τους προγεστερονικούς υποδοχείς (PR). Ο VEGF σχετιζόταν θετικά και ισχυρά τόσο με τον υποδοχέα HER2 όσο και με το grade του όγκου. Δεν ανεδείχθησαν άλλες συσχετίσεις στατιστικά σημαντικές και των τριών κλασμάτων της maspin (ολικής – πυρηνικής – κυτταροπλασματικής) με τα εξής: ηλικία, grade, status των T, N και M, stage, οιστρογονικοί υποδοχείς (ER), HER2 status, θετικότητα των ki-67 και p53, ούτε και με κάποια από τις τέσσερις ομάδες της μοριακής ταξινόμησης.

Συμπεράσματα

Το κυτταροπλασματικό και το πυρηνικό κλάσμα της maspin σχετίζονται μεταξύ τους ισχυρά στο διηθητικό πορογενή καρκίνο του μαστού. Και τα δύο στενά συνδεδεμένα υποκυτταρικά κλάσματα της maspin είναι και ισχυρά συσχετισμένα, ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, με τα επίπεδα της ολικής maspin, όπως αυτά μετρήθηκαν με το Image Analysis σύστημα. Οι μελλοντικές έρευνες θα είναι χρήσιμο να μελετούν και τις τρεις συνιστώσες της maspin στο κύτταρο (πυρηνική – κυτταροπλασματική – ολική), όπως τις μελετήσαμε και εμείς, για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Ο VEGF σχετίζεται θετικά και ισχυρά τόσο με τον υποδοχέα HER2 όσο και με το grade του όγκου και

έτσι προκύπτει πως ο HER2 εμφανίζει στενή σύνδεση με τη διαδικασία της αγγειογένεσης.

Το παρακάτω Paper έγινε δεκτό

προς δημοσίευση στο:

Journal of Balkan

Union of Oncology

(J BUON)

TITLE:

Estimation of maspin's subcellular localization in invasive ductal breast cancer via Light Microscopy (LM) and Computerized Image Analysis (CIA) system: a comparative study.

AUTHORS' NAMES:

1. Marios Panou, MD^{*,#,a,e}
2. Nikolaos Kavantzias MD, PhD^{*,a}
3. Theodoros Sergentanis MD^b
4. Stratigoula Sakellariou MD^a
5. George Agrogiannis MD^a
6. Paschalis Chatzipantelis MD, PhD^c
7. Evangelia Anastasopoulou MD^c
8. Vassilios Soranoglou MD^d
9. Flora Zagouri MD, PhD^e
10. Pinelopi Korkolopoulou MD, PhD^a
11. Efstratios Patsouris MD, PhD^a
12. Ioannis Bramis MD, PhD^e
13. George C. Zografos MD, PhD^e

^a1st Department of Pathology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^bDepartment of Hygiene, Epidemiology and Medical Statistics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

^cDepartment of Pathology, "Hippokrateion" General Hospital, Athens, Greece

^d2nd Department of Orthopaedics, “G. Gennimatas” Athens General Hospital, Athens, Greece

^e1st Department of Propaedeutic Surgery, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

*Both authors have equally contributed.

[#]Corresponding author: Marios Panou, MD; 1st Department of Pathology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; mail address: Moschopoulou 3, 18547 N. Faliro; e-mail address: marios.panou@yahoo.gr; Tel: +306972600283 (mobile), +302104813035; Fax: +302107462157.

ABSTRACT

Purpose: Contradictory results have been reported concerning the role of maspin and its cellular distribution in breast cancer. The purpose of our study was to examine the subcellular localization (nuclear – cytoplasmic) of maspin in breast cancer and to compare the evaluation of maspin immunostaining by a pathologist via Light Microscopy (LM) to the estimation via Computerized Image Analysis (CIA) system. We also examined correlations between maspin expression and several clinicopathological parameters.

Methods: The sample consisted of 48 primary invasive ductal carcinomas. Maspin immunostaining was quantified and graded via LM by two pathologists, separately in the nuclear and cytoplasmic compartments. Total maspin expression was also estimated via CIA system. Univariate non-parametric statistics and stepwise multivariate ordinal logistic regression were performed.

Results: Both maspin components (nuclear and cytoplasmic) were closely associated with each other ($p < 0.001$). Total maspin score was positively and closely associated with nuclear maspin ($p < 0.001$) and cytoplasmic maspin ($p < 0.001$). Total maspin, nuclear maspin and cytoplasmic maspin did not correlate statistically significantly with any of: age, grade, T, N and M status, stage, MVD (CD34), ki-67, p53, estrogen receptor and HER-2 status, nor with any of the four groups of the molecular classification. The only factor that showed a borderline inverse correlation with nuclear maspin ($p = 0.059$) was progesterone receptors positivity.

Conclusions: The cytoplasmic and nuclear fractions of maspin seem to be closely interwoven. Evidently, both mutually intertwined counterparts were independently reflected upon the total maspin levels measured by Image

Analysis. Future studies should ideally encompass all three approaches (nuclear; cytoplasmic; total) adopted herein.

Key words:

maspin, subcellular localization, breast cancer, Image Analysis, immunohistochemistry, progesterone receptor

INTRODUCTION

Clade B serpin family of proteins regulate a variety of cellular functions including cell adhesion and motility. One key member of the family is maspin (Mammary Serine Protease Inhibitor) or SERPINB5. Maspin plays a role in development of the mammary gland and is expressed in myoepithelial cells and normal secretory epithelial cells.

To date, an impressive list of biological functions has been attributed to both intercellular and extracellular maspin, which includes promoting cell adhesion and apoptosis and inhibiting cell motility, invasion and angiogenesis, suggesting that maspin is a tumor suppressor gene. Maspin expression may predict a better prognosis for several types of carcinomas including breast, prostate, colon and oral squamous cell carcinoma. However, in other malignancies, such as pancreatic, lung, thyroid, ovary and endometrial cancers, maspin expression was paradoxically increased in malignant cells compared to their normal cells of origin. Concerning the role of maspin in breast cancer and its prognostic impact, contradictory results have been reported. Some earlier studies on maspin demonstrated its tumor-suppressive properties mediated by several mechanisms including anti-angiogenesis, anti-invasion and anti-metastatic functions and induction of p53-mediated apoptosis. Conversely, Umekita et al reported that expression of maspin in breast cancer is associated with significantly shorter relapse-free survival and that the expression of maspin is up-regulated during the progression of ductal breast carcinoma. Other researchers have, also, associated maspin expression with higher histologic grade, larger tumor size, positive p53 status, shorter survival and finally with poor prognosis. Consequently, the mutually conflicting data have tempered early enthusiasm for maspin as a biomarker for disease progression.

Another unclear topic about maspin expression in breast cancer is relevance of subcellular localization of maspin, as the latter may indicate different functions; therefore, the aforementioned discrepancies may be a consequence of differential cellular distribution of maspin. Still, many studies do not dissociate between its nuclear and cytoplasmic staining.

In light of the above controversies, this study aims:

- i. To focus on the subcellular localization of maspin (nuclear – cytoplasmic) in breast cancer, examining the association between the expression of maspin in the two compartments .
- ii. To compare the evaluation of maspin immunostaining by a pathologist via light microscopy (LM) to the estimation via Computerized Image Analysis (CIA) system; to our knowledge this is the first published effort in the literature.
- iii. To examine correlations between maspin expression and several clinicopathological parameters in breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tissue specimens

We collected paraffin-embedded tissue blocks from 48 primary breast cancers and their adjacent normal breast tissues. The 48 patients had undergone breast cancer surgery for tumor resection, from April 2004 to November 2008 (either a mastectomy or breast-conserving surgery with axillary lymph node dissection) in the 1st Department of Propaedeutic Surgery

of Athens Medical School, Hippokration General Hospital. All breast cancers were histologically classified as invasive ductal carcinomas (IDC) according to the criteria of the World Health Organisation (WHO). Cases of IDC with a predominant in situ component were excluded; moreover, patients who had undergone chemotherapy or radiotherapy prior to surgery were excluded, too. The histologic tumor type and grade were assigned according to the criteria of Elston and Ellis. Cancers were staged according to the International Union against Cancer – TNM classification. They were also classified in four categories (Luminal A, Luminal B, HER2(+) and Triple-Negative) according to the modern molecular classification. The study protocol was approved by the local institutional review board.

Immunohistochemical method

Antibodies and dilutions used:

- Maspin Rb Polyclonal (h-130): sc-22762 (Santa Cruz Biotechnology, INC), 1:100.
- Monoclonal mouse CD34 antibody: NCL-L-END (Novocastra), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human ki-67 antigen: Clone MIB-1, Code: M7240 (Dako), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human estrogen receptor α : Clone 1D5, Code: M7047 (Dako), 1:50.
- Monoclonal mouse anti-human progesterone receptor: Clone PgR 636, Code: M3569 (Dako), 1:50.
- Mouse anti-HER2: MSK044 (Zytomed Systems), 1:100.

- Monoclonal mouse anti-human p53 protein: Clone DO-7, Code: IR616 (Dako), 1:50.

Specimens were fixed in 10% neutrally buffered formalin and embedded in paraffin. The slides, 3 μm thick, were heated at 40°C, deparaffinized and rehydrated through a graded series of ethanols. Then, endogenous peroxidase activity was blocked by incubation with 3% H₂O₂ solution in methanol. Antigen retrieval was achieved when the slides were placed in sodium citrate buffer (10 mM, pH 6.0) in a microwave oven for 10 min. The appropriate primary antibody was diluted to its optimum concentration in phosphatase buffered saline (PBS). The slides were then incubated with primary antibodies at 4°C for 24 hours. Thereafter, the slides were thoroughly rinsed with PBS and polymer envision secondary antibody was applied to them for 30 min at room temperature. To reveal the color of antibody staining, the slides were applied with DAB (diaminobenzidine) substrate solution as a chromogen. In each case, maspin staining was also examined in adjacent normal breast tissue for matching (internal control).

Assessment of immunohistochemical staining by the pathologists

Immunostaining was quantified and graded by light microscopy (LM). At least three areas with the highest degree of positive cells were selected and typically 400-500 tumor cells in each field were counted irrespective of immunoreactive status. Thereafter, positive cells were counted and the percentage of positive cells was determined. Each staining result was assessed independently by two pathologists (NK and SS), blind to outcome data and

results of Image Analysis. When the evaluations differed, final agreement was reached by consensus.

For maspin staining quantification, we used an already published system; specifically, the intensity of staining (no staining =0; low level =1; medium staining =2; strong staining =3) and percentage of stained cells (0% =0; <10% =1; 11-50% =2; 51-80% =3; >80% =4) were multiplied and an immunoreactive score (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}) ranging from 0 to 12 was obtained. We obtained separately IRS scores for nuclear maspin and cytoplasmic maspin.

Tumors that showed <10% of positive cells in p53, ER and PR were interpreted as being negative. The ki-67 labelling index was determined as the percentage of positive cells. Finally, scoring of HER2 results was done using the categories 0, 1+, 2+, 3+, as it is well known. Categories 0 & 1+ were considered as negative and category 3+ as positive; cases categorized as 2+ underwent Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) to define HER2 status.

Computerized Image Analysis (CIA) system

Computerized Image Analysis (CIA) system was used, as described elsewhere, for the estimation of total maspin expression and for the estimation of MicroVessel Density (MVD), through counting the total number of intimal blood vessels, which were lined with CD34-positive endothelial cells.

Processing methodology

- In every histological section, 7-10 regions were selected (Hot Spots) and captured as images (Analog SC30 Olympus Camera), using 40x

objective lens (BX43 3-Ophthalmic Microscope). All images were stored as TIFF files.

- Image calibration, based on stain and Optical Density.
- Image calibration, based on microscope lens, with micrometric scale, in measurements unit microns.
- Positive cells detection and counting.
- In each image, the parameters measured by the Computerized Image Analysis (CIA) system (Image-Pro Plus 6.0 – Media Cybernetics, INC) were the intensity of maspin staining in tumor cells and the percentage of maspin-stained area (% area) in relation to the whole tissue.
- Concerning CD34-positive endothelial cells blood vessels counting and thus MVD estimation, the parameters measured were: number of vessels, area, diameter, aspect ratio, percentage area.
- The areas, stained by the antibodies, were identified and calculated using the software “histogram-based algorithm”.
- Staining intensity levels were measured using arbitrary units on a linear scale ranging from 0 (highest intensity) to 255 (not detectable), for every RGB (Red – Green – Blue) channel (color segmentation). Averaging the quantitative computerized Image Analysis data from the 7-10 images of each tissue section yielded an average staining intensity and an average percentage of extent of staining (% area) (see Figures 1d, 2b, 2d, 3b).
- The $IRS_{\text{IMAGE ANALYSIS SCORE}} (IRS_{\text{I,A,SCORE}})$ was estimated through the following formula:

$IRS_{\text{I,A,SCORE}} = (255 - a) \times b\%$, where:

a = the measured intensity of maspin staining (range between 0 – 255)

and

b = the percentage of positive cells.

- MVD estimation was expressed as the total number of intimal blood vessels per unit area (No/mm²).

Statistical Methods

After the calculation of descriptive statistics, the intercorrelations between total maspin (IRS_{I.A.SCORE}), nuclear maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}), cytoplasmic maspin (IRS_{PATHOLOGIST SCORE}), CD34 (No/mm²) and clinicopathological parameters (molecular classification, grade, stage, tumor size, nodal status, metastasis, p53 expression, ER status, PR status, HER2 status) were evaluated. Given the marked deviation from normality of the scores (as attested by the Shapiro-Wilk test), non-parametric statistical tests were performed; specifically, Spearman's rank correlation coefficient, Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test for independent samples and Kruskal-Wallis (KW) test were undertaken, as appropriate. The assessment of the intercorrelations between the aforementioned parameters should be deemed exploratory, due to the multiple underlying comparisons-tests.

In order to overcome the statistical problem of multiple comparisons and ascertain the independence of associations, stepwise multivariate ordinal logistic regression was performed; total maspin IRS score (IRS_{I.A.SCORE}) was converted into ordinal variable using a 4-level scale (1: minimum value-25th percentile; 2: 25th percentile – median; 3: median - 75th percentile, 4: 75th percentile-maximum value). The proportionality-of-odds assumption was evaluated by the appropriate likelihood ratio test. The level of statistical significance was set at 0.05. Statistical analyses were performed with STATA 11.1 software (StataCorp, College Station, TX, USA).

RESULTS

Table 1 presents the description of the study sample. The age of women ranged between 33 and 86 years (63.3 ± 12.5 years, mean \pm SD). Luminal A (33.3%) and luminal B (36.1%) carcinomas were the most prevalent categories. The majority of cases consisted of grade 3 carcinomas (70.8%); nearly half the cases were stage II (II_A: 29.2% and II_B: 20.8%). T2 (54.2%) and N0 (another 54.2%) were the most common categories regarding tumor size and nodal status, respectively.

Table 2 presents the intercorrelations of variables. Total maspin score ($IRS_{I.A.SCORE}$) was positively and closely associated with nuclear maspin ($IRS_{PATHOLOGIST\ SCORE}$) (Spearman's $\rho = +0.797$, $p < 0.001$) and cytoplasmic maspin ($IRS_{PATHOLOGIST\ SCORE}$) (Spearman's $\rho = +0.752$, $p < 0.001$); of note, both components (nuclear and cytoplasmic) were closely associated with each other (Spearman's $\rho = +0.673$, $p < 0.001$).

Table 3 presents the results of the multivariate ordinal logistic regression analysis regarding total maspin (lower panels). Both mutually interwoven components, namely nuclear (OR=1.63, 95%CI: 1.20-2.21, $p = 0.002$) and cytoplasmic maspin (OR=1.95, 95%CI: 1.26-3.02, $p = 0.003$) were independently associated with the total maspin.

Representative figures of immunostaining and Image Analysis are provided in **Figures 1, 2 & 3**.

DISCUSSION

The present study, through estimating maspin expression separately in the nucleus and cytoplasm revealed a statistically significant positive correlation between nuclear and cytoplasmic staining of maspin, as estimated by the pathologists via Light Microscopy (LM). In addition, the two pathologist-evaluated counterparts (nuclear and cytoplasmic) were closely linked to the results of Computerized Image Analysis (CIA) system. Most probably, taking into account the close correlation between nuclear and cytoplasmic maspin, it seemed fairly impossible for the program to distinct and measure separately maspin staining in the two compartments and thus, maspin expression was evaluated as an aggregate, independently integrating both compartments.

Based on the differential expression of maspin in normal epithelial cells and breast carcinoma cell lines, a tumor-suppressive property for maspin has been proposed. In vitro studies have revealed that the function of maspin as a tumor suppressor is a combination of increased cell adhesion and apoptosis and decreased motility, angiogenesis and pericellular proteolysis. Indeed, a shotgun proteomic approach has indicated that restoring the expression of maspin in invasive carcinoma cells alters the expression of proteins regulating cell death, cytoskeletal architecture and protein turnover, resulting in increased rate of spontaneous apoptosis, more prominent actin cytoskeleton, reduced invasive capacity and altered proteasome function. Maspin has been reported to induce apoptosis by reducing cell surface-associated prosurvival uPA – uPA receptor complex. Maspin may function in the inhibition of cell invasion either through interactions with collagens or regulation of integrins. Sharma et al observed a significant association

between loss of maspin expression and cytoplasmic accumulation of VEGF-A, underlining the role of maspin in angiogenesis.

Although original observations pointed to the association of reduced maspin with cancer progression, ensuing studies have revealed this correlation to be far more complex than originally concluded. Factors contributing to this complexity include, but are not limited to, genetic background, type of cancer, the organ where tumorigenesis originated, the expression of maspin (or lack of it) in the original corresponding normal tissue, subcellular distribution of maspin and use of cytotoxic drugs for cancer therapy. It is also imperative to consider that both methylation and demethylation processes could, at least in part, determine the “presence or absence” of maspin in the tumor. Maspin has been located in many normal epithelial tissues, i.e. breast, prostate, placenta, small intestine, colon, uterus, kidney, thymus, testis, being paradoxically either down-regulated or up-regulated therein. Maspin expression down-regulation correlated with progression and metastatic status in prostate, colon, gastric and oral cancers, while maspin expression was up-regulated in other malignancies such as pancreatic, lung, thyroid, ovary and endometrial cancers.

Unfortunately, contradictory results have also been reported concerning the role of maspin in breast cancer. Some crucial points are discussed below:

- i. *Grade*: A significant correlation of maspin with low Grade has been suggested, while, elsewhere high maspin expression was demonstrated in high-grade cases.
- ii. *Lymph node positivity*: Hojo et al and Maass et al found a lower frequency of regional lymph node metastasis in the maspin-positive

group. Conversely, Tsoli et al showed a positive association between high maspin expression and lymph node positivity.

- iii. *Maspin expression changes during disease progression:* A significant stepwise decrease in maspin expression occurred in the sequence DCIS – invasive cancer – lymph node metastasis, in an early study. Similarly, other studies showed that maspin mRNA is reduced in primary tumors and undetectable in metastases. In contrast, Umekita et al demonstrated a stepwise increase in the frequency of maspin expression from DCIS to invasive breast ductal carcinoma.
- iv. *p53:* Sharma et al recently showed that p53 immunopositivity seems to contribute to the loss of maspin expression, whereas positive p53 status has been found elsewhere to correlate significantly with maspin expression.
- v. *Maspin as a prognostic indicator:* Maass et al portrayed maspin as a useful prognostic indicator, since its up-regulation predicted favorable prognosis. However, many other researchers have presented maspin as a poor prognostic factor. Specifically, Umekita et al suggested that the expression of maspin predicted an aggressive phenotype; similar suggestions came from Tsoli et al who considered the possibility that maspin overexpression is associated with a high risk for clinically undetectable disease spread and subsequent recurrence in patients with lymph node negative disease.

The other point that remains elusive and is probably strongly related to the contradictory results concerning the role of maspin in breast cancer pertains to its subcellular localization. Since maspin is related to the serpin family proteins, its expression was always regarded to be limited to the cytoplasmic compartment of the cell. However, Pemberton et al first

demonstrated that, by western blotting and immunohistochemistry, maspin can be detected in the nucleus of cancer cells. More recently, other investigators have documented the presence of nuclear maspin in breast, prostate and pancreatic tumors.

Studies that have shown a correlation of maspin with poor prognosis and poor prognostic clinicopathological parameters have estimated its staining mainly irrespectively of its subcellular localization. Umekita et al, Lee et al and Tsoli et al who have found significant correlations between maspin expression and larger tumor size and higher histological grade have measured without separating between nuclear and cytoplasmic maspin.

In contrast, researchers who estimated the correlation between breast cancer and especially the nuclear fraction of maspin, have obtained exactly the opposite results, as a rule. Mohsin et al., in an early large clinicopathological study were the first investigators who estimated the impact of nuclear maspin on breast cancer separately of cytoplasmic maspin. In their study, maspin nuclear staining was significantly associated to good prognostic factors (ER, PR positivity), while cytoplasmic staining was associated to poor prognostic ones (ER, PR negativity). Thus, they suggested that the presence of maspin in two different compartments of the cell may have different biological and clinical implications. Joensuu et al found that especially cytoplasmic expression of maspin was significantly higher in the primary tumors of the early metastasizing breast cancers and also in their metastases compared to late metastasizing cancers. Moreover, the expression of p53 (poor prognostic marker) correlated significantly with cytoplasmic maspin. In contrast, tumors with late recurrence displayed significantly increased staining for nuclear maspin. It is worth mentioning that nuclear maspin correlates with better

clinicopathological parameters and survival also in other cancer types such as lung.

Consequently, it looks obvious that nuclear localization of maspin is required and necessary for its tumor and metastasis suppressor function in vivo. Taking into consideration that nuclear staining assessment, generally speaking in pathology, is less time-consuming, less strenuous, demanding and ambiguous and more objective and unbiased, the separate estimation of the maspin nuclear fraction seems to be particularly valuable. Regarding pathophysiological mechanisms, maspin possibly exerts its role in the nucleus at the level of gene or chromatin regulation and thus indirectly affects the cell-matrix interaction or differentiation state.

Concerning the intercorrelation of maspin with clinicopathological parameters we found no statistically significant correlations, probably due to the small sample. The only factor that showed an inverse borderline correlation ($p=0.059$) with nuclear maspin was PR status; on the contrary, there was no correlation between PR positivity and cytoplasmic maspin, a result that contributes to the idea of the different roles by subcellular maspin fractions. Once again, data from relevant literature is contradictory and further investigation is needed for safer deduction.

In conclusion, the cytoplasmic and nuclear fractions of maspin seem to be closely interwoven. Evidently, both mutually intertwined counterparts are reflected upon the total maspin levels measured by Image Analysis. Future studies should ideally encompass all three approaches (nuclear; cytoplasmic; total) adopted herein and should report the intercorrelations regarding the expression of maspin in the subcellular compartments, so as to further validate the present results.

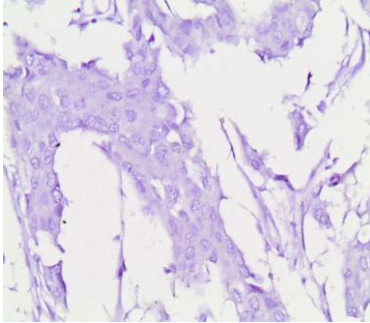


Figure 1a. No staining.

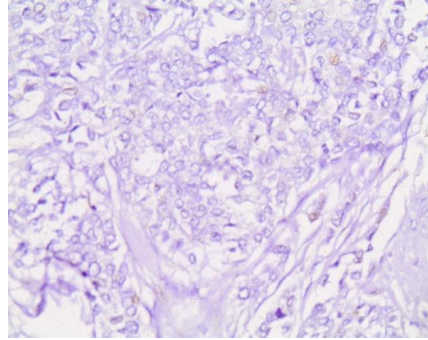


Figure 1b. No staining.

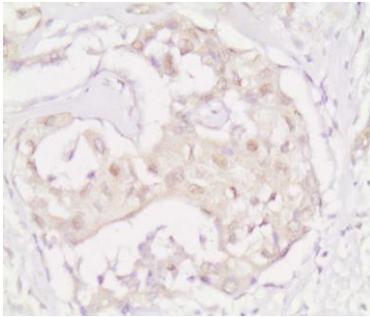


Figure 1c. Faint staining.
Image Analysis.

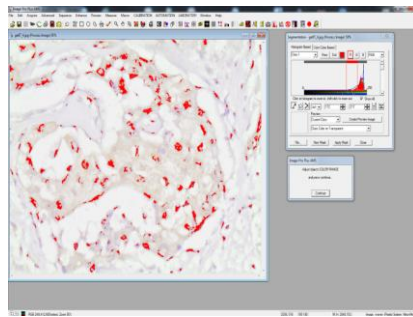


Figure 1d. Faint staining – Image Analysis

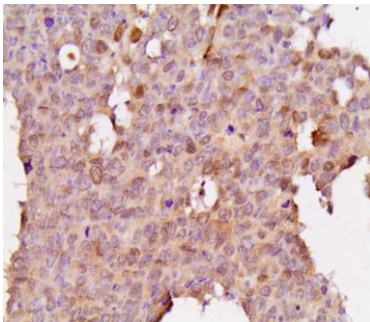


Figure 2a. Moderate staining.
Image Analysis.

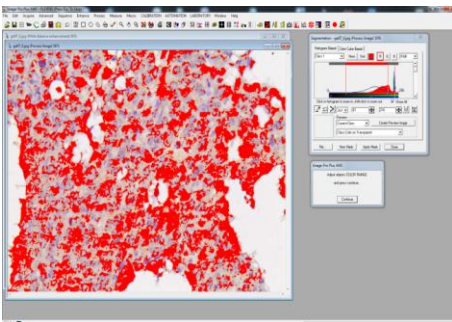


Figure 2b. Moderate staining – Image Analysis

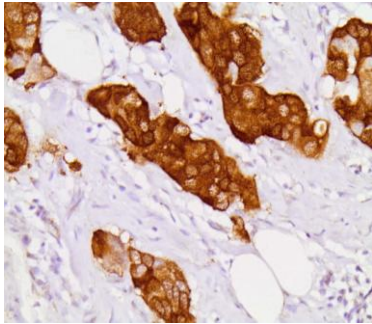


Figure 2c. Strong staining.
Analysis.

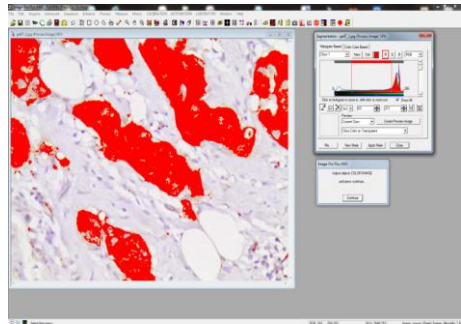


Figure 2d. Strong staining – Image
Analysis.

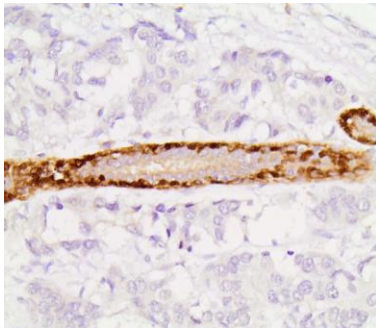


Figure 3a. Normal tissue.
Analysis.

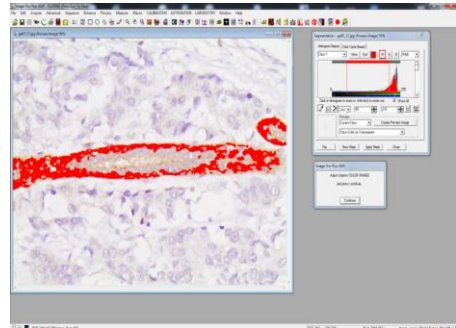


Figure 3b. Normal tissue – Image
Analysis.

Figure 1: Invasive ductal carcinomas showing no immunostaining for maspin in both the nucleus and cytoplasm of carcinoma cells (1a & 1b). Invasive ductal carcinomas showing faint immunostaining (1c) and the respective snapshot from Image Analysis (1d).

Figure 2: Invasive ductal carcinomas showing moderate (2a) and strong (2c) positive immunostaining for maspin in both the nucleus and cytoplasm of carcinoma cells and the respective snapshots from Image Analysis (2b & 2d).

Figure 3: Normal, non-neoplastic mammary duct, showing strong positive immunostaining for maspin in myoepithelial cells, but not in epithelial mammary cells (3a) and the respective snapshot from Image Analysis (3b). This normal duct exists inside an invasive neoplastic tissue area.

Table 1. Description of the study sample

Continuous variables	mean±SD
Age (years)	63.3±12.5
Total maspin (IRS _{I.A.SCORE})	763±1025
Nuclear maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	3.31±2.73
Cytoplasmic maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	2.75±2.34
CD34 (No/mm ²)	220±201
Ki-67 (%)	20.5±21.3
Categorical and ordinal variables	N (%)

Molecular classification	
<i>luminal A</i>	12 (33.3)
<i>luminal B</i>	13 (36.1)
<i>HER-2 overexpressing</i>	6 (16.7)
<i>triple negative</i>	5 (13.9)
Grade	
1	4 (8.3)
2	10 (20.8)
3	34 (70.8)
Stage	
<i>I_A</i>	9 (18.7)
<i>II_A</i>	14 (29.2)
<i>II_B</i>	10 (20.8)
<i>III_A</i>	3 (6.3)
<i>III_B</i>	7 (14.6)
<i>IV</i>	5 (10.4)
Tumor size	
<i>T1</i>	12 (25.0)
<i>T2</i>	26 (54.2)
<i>T3</i>	8 (16.7)
<i>T4</i>	2 (4.2)
Nodal status	
<i>N0</i>	26 (54.2)

<i>N1</i>	10 (20.8)
<i>N2</i>	5 (10.4)
<i>N3</i>	7 (14.6)
Metastasis	
<i>M0</i>	43 (89.6)
<i>M1</i>	5 (10.4)
p53 expression	
<i>positive</i>	14 (29.2)
<i>negative</i>	34 (70.8)
ER status	
<i>positive</i>	28 (58.3)
<i>negative</i>	20 (41.7)
PR status	
<i>positive</i>	22 (45.8)
<i>negative</i>	26 (54.2)
HER-2 status	
<i>positive</i>	16 (33.3)
<i>negative</i>	32 (66.7)

Table 2. The intercorrelations of CD34 (No/mm²), maspin scores (total; nuclear; cytoplasmic) and clinicopathological parameters in the study sample. Spearman’s rank correlation coefficients (p-values in parentheses) are provided, unless denoted otherwise. Bold cells denote correlations with p<0.05.

	CD34	Total Maspin (IRS)	Nuclear Maspin	Cytoplasmic Maspin
CD34				
Total Maspin (IRS _{I.A.SCORE})	+0.028 (0.852)			
Nuclear Maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	+0.113 (0.444)	+0.797 (<0.001)		
Cytoplasmic Maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	+0.075 (0.614)	+0.752 (<0.001)	+0.673 (<0.001)	
Age	-0.113 (0.443)	+0.123 (0.407)	+0.006 (0.966)	+0.071 (0.631)
Stage	-0.008 (0.959)	-0.185 (0.209)	-0.070 (0.639)	-0.167 (0.256)
T status	+0.085 (0.566)	-0.115 (0.437)	-0.017 (0.908)	-0.054 (0.718)
N status	+0.093 (0.531)	-0.131 (0.376)	-0.057 (0.700)	-0.114 (0.441)
M status ^s	-0.540 (0.589)	-0.861 (0.389)	-0.258 (0.796)	-0.693 (0.489)
Grade	-0.032 (0.827)	-0.011 (0.941)	+0.113 (0.443)	+0.028 (0.849)
Molecular	2.411	3.570	3.521	0.950

classification†	(0.492)	(0.312)	(0.318)	(0.813)
Ki-67 (%)	-0.109 (0.528)	+0.144 (0.402)	+0.220 (0.197)	+0.127 (0.460)
ER positivity [§]	-0.241 (0.810)	+0.167 (0.867)	-0.726 (0.468)	+0.976 (0.329)
PR positivity [§]	-0.631 (0.528)	-1.552 (0.121)	-1.891 (0.059)	-0.287 (0.774)
HER-2 positivity [§]	+0.722 (0.470)	-0.853 (0.394)	-0.045 (0.964)	-0.415 (0.678)
p53 positivity [§]	-0.049 (0.961)	-0.281 (0.779)	-0.062 (0.950)	+0.100 (0.920)

[§]Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW) test for independent samples was performed, as these variables were binary; MWW z-values and p-values (in parentheses) are provided

†Kruskal-Wallis (KW) test was performed, as this variable included more than two groups; KW chi-square values (3 degrees of freedom) and p-values (in parentheses) are provided

Table 3. Results of the multivariate ordinal logistic regression analysis for total maspin levels (IRS score). OR: Odds ratio; CI: confidence interval.

Variables	Category Increment	or	OR (95%CI)	p-value
Nuclear maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	1 unit increase		1.63 (1.20-2.21)	0.002
Cytoplasmic maspin (IRS _{PATHOLOGIST SCORE})	1 unit increase		1.95 (1.26-3.02)	0.003

VI**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Σημείωση: Οι βιβλιογραφικές αναφορές έχουν παρατεθεί σύμφωνα με το πλέον διαδεδομένο και χρησιμοποιούμενο διεθνώς πρότυπο: Παρατίθενται όλα τα ονόματα των συγγραφέων κάθε πηγής, εφόσον ο αριθμός τους είναι μέχρι έξι. Στις περιπτώσεις που οι συγγραφείς είναι περισσότεροι, παρατίθενται μόνο τα ονόματα των τριών πρώτων και προστίθεται το «et al».

1. Λάγιου Α. **Επιδημιολογία και πρόληψη του καρκίνου του μαστού**. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2008; 25: 742-8.
2. Πετρίδου Ε. **Επιδημιολογία και πρόληψη του καρκίνου του μαστού**. Στο: Πεκτασίδης Δ, Δημόπουλος Μ-Α. Γυναικολογική Ογκολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, Αθήνα, 2001, σελ. 673-718.
3. Μομφερράτου Ε, Παράσχος Α. **Συνοπτική περιγραφική ανατομική**. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1989, σελ. 171-2.
4. Σγουράκης Γ. **Ανατομία και φυσιολογία του μαστού**. <http://www.exe1928.gr/static/media/2011/12/cf80cf81cebfcceb3cf81ceb1cebccebcceb1-cebcceb5cf84ceb5cebafcf80ceb1ceb9ceb4ceb5cf85cf84ceb9cebafcf89cebdcf83ceb5ceb5cebcecb9cebdceb1.pdf>.
5. Μαρκέτος Σ. **Εικονογραφημένη Ιστορία της Ιατρικής**. Εκδόσεις «Ζήτα», Αθήνα, 1996, σελ. 53-74, 113-128, 360.
6. Καραμπερόπουλος Δ. **Περί καρκίνου γνώσεις των αρχαίων Ελλήνων ιατρών**. Περιοδικό «Μ' ενδιαφέρει» της Ελληνικής Αντικαρκινικής Εταιρείας 2005; 44: 85-7.
7. Μάλλιου Σ, Αγκάντη Ν, Παυλίδης Ν, Καππάς Α, Κριαράς Ι, Γερουλάνος Σ. **Η ιστορία του καρκίνου του μαστού**. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2006; 23: 260-78.
8. Ρηγάτος ΑΓ. **Ο μαστός στην ελληνική τέχνη και λογοτεχνία**. Αθήνα, 1995.
9. Cooper WH. **The history of the radical mastectomy**. Ann Med Hist 1941; 3: 36-54.
10. Dionis P. **Verhandeling van alle de chirurgicale operation, na de nieuwste, zekerste, en gemakkelijkste manier**. Joannes Hoofhout, Rotterdam, 1710.
11. Πύρρος Δ. **Εγκόλπιον των ιατρών ήτοι πρακτική ιατρική περιέχουσα τριακοσίας εξήκοντα δύο αρρωστίας κλπ. Τόμος Πρώτος**. Εν Ναυπλίου, 1831. Τω δεκάτω έτει της ελληνικής ελευθερίας. Στο: Ρηγάτος ΑΓ. Η ιστορία του καρκίνου και της Ογκολογίας. Εκδόσεις Ascent, Αθήνα, 2009, σελ. 273-283.
12. Moore C. **On the influence of inadequate operations on the theory of cancer**. F Med Chir Soc Lond 1867; 1: 244-80.

13. Wright JC. **Clinical cancer chemotherapy.** NY State J Med 1961; 2:61: 249-80.
14. Rutkow IM. **Surgery an illustrated history.** Mosby, 1998.
15. Jensen EV, DeSombre EP, Jungblut PW. **Estrogen receptors in hormone responsive tissues and tumors.** In: Wissler RW, Dao TL, Wood S Jr, eds. Endogenous factors influencing host-tumor balance. Chicago: University of Chicago Press, 1967, pp 15-30.
16. Ρηγάτος ΑΓ. **Η ιστορία του καρκίνου και της Ογκολογίας.** Εκδόσεις Ascent, Αθήνα, 2009, σελ. 114-138, 158-167, 273-283.
17. Wright JC. **Cancer chemotherapy: past, present and future – Part I.** J Natl Med Assoc 1984; 76: 773-84.
18. Gilman A, Philips FS. **The biological actions and therapeutic applications of the B-chlorethylamines and sulfides.** Science 1946; 103: 409-15.
19. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, et al. **Temporary remission in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin).** N Engl J Med 1948; 238: 787-93.
20. Farber S. **Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer.** Blood 1949; 4: 160-7.
21. Wright JC, Prigot A, Wright BP, et al. **An evaluation of folic acid antagonists in adults with neoplastic diseases. A study of 93 patients with incurable neoplasms.** J Natl Med Assoc 1951; 43: 211-40.
22. Wright JC. **Proceedings of the second conference on folic acid antagonists in the treatment of leukemia.** Blood (suppl) 1952; 7: 178-81.
23. Wright JC, Cobb JP, Golomb FM, et al. **Chemotherapy of disseminated carcinoma of the breast.** Ann Surg 1959; 150: 221-40.
24. Wright JC, Gumport SL, Golomb FM, et al. **Remissions produced with the use of methotrexate in patients with mycosis fungoides.** Cancer Chemother Rep 1960; 9: 11-20.
25. Wright JC, Lyons M, Walker DG, et al. **Observations on the use of cancer chemotherapeutic agents in patients with mycosis fungoides.** Cancer 1964; 17: 1045-62.

26. Li MC, Hertz R, Spencer DB. **Effect of methotrexate upon choriocarcinoma.** Proc Soc Exp Biol Med 1956; 93: 361-6.
27. McIver FA, Curreri AR, Meyer OO, et al. **Clinical studies with 5-fluorouracil.** Proc Am Cancer Res 1957; 2: 230.
28. Curreri AR, Ansfield FJ, McIver FA, et al. **Clinical studies with 5-fluorouracil.** Cancer Res 1958; 18: 478-84.
29. Wright JC, Medrek TJ, Walker DG, Lyons MM. **The current status of chemotherapy and hormone therapy for cancer.** In: Ariel IM, eds. Progress in clinical cancer, Vol I. New York: Grune & Stratton, 1965, pp 264-307.
30. Farber S, Maddock D, Swaffield M. **Studies on the carcinolytic and other biological activity of actinomycin D.** Proc Am Assoc Cancer Res 1956; 2: 104.
31. Clinical screening co-operative group of the European organization for research on the treatment of cancer: **Study of the clinical efficiency of bleomycin in human cancer.** Br Med J 1970; 2: 643-5.
32. Crooke ST, Bradner WT. **Bleomycin, a review.** J Med 1976; 7: 333-427.
33. Bonadonna G, Monfardini S, DeLena M, Fossati-Bellani F. **Clinical evaluation of Adriamycin, a new anti-tumor antibiotic.** Br Med J 1969; 3: 503-6.
34. Young RC, Ozols RF, Myers CE. **The anthracycline antineoplastic drugs. Medical Progress.** N Engl J Med 1981; 16: 305: 139-53.
35. Rosenberg B, VanCamp L, Krigas T. **Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode.** Nature 1965; 205: 698-9.
36. Rosenberg B, VanCamp L, Trosco JE, et al. **Platinum compounds: A new class of potent anti-tumor agents.** Nature 1969; 222: 385-7.
37. Hill JM, Speer RJ, Loeb E, et al. **Clinical experience with cisplatinous diammine dichloride (PDD).** In: Hejzlar M, Semonsky M, Masak, eds. Advances in antimicrobial and antineoplastic chemotherapy. Baltimore: University Park Press, 1972, pp 255-7.
38. <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0263931912000166-gr1.jpg> &w=387&h=356&ei=F6P2UJXYH8ed0QX08IGACw&zoom=1&iact=hc&vpx= 723&vpy=107&dur=6239&hovh=215&hovw=234&

tx=110&ty=121&sig=100926890728340017982&page=1&tbnh=129
&tbnw=159&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:9,s:0,i:103.

39. Woglom WH. **General review of cancer therapy.** In: Mouton FR, ed. Approaches to tumor chemotherapy. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, 1947, pp 1-12.
40. Kistner RW, Smith OW. **Observations on the use of a non-steroidal estrogen antagonist: MER25.** Surg Forum 1960; 10: 725-9.
41. Herbst AL, Griffiths CT, Kistner RW. **Clomiphene citrate (NSC 35770) in disseminated mammary cancer.** Cancer Chemother Rep 1964; 43: 39-41.
42. Cole MP, Jones CTZ, Todd IDH. **A new anti-estrogenic agent in late breast cancer: An early clinical appraisal of IC 146474.** Br J Cancer 1971; 25: 270-5.
43. <http://www.web-books.com/eLibrary/ON/B0/B18/15MB18.html>.
44. Hughes SW, Burley DM. **Aminoglutethimide: a "side-effect" turned to therapeutic advantage.** Postgrad Med J 1970; 46: 409-16.
45. Wells SA Jr, Santen RJ, Lipton A, et al. **Medical adrenalectomy with aminoglutethimide: clinical studies in postmenopausal patients with metastatic breast carcinoma.** Ann Surg 1978; 187: 475-84.
46. Smith IE, Harris AL, Morgan M, et al. **Tamoxifen versus aminoglutethimide in advanced breast carcinoma: a randomized cross-over trial.** Br Med J (Clin Res Ed) 1981; 283: 1432-4.
47. Griffiths CT, Hall TC, Saba Z, Barlow JJ, Nevinny HB. **Preliminary trial of aminoglutethimide in breast cancer.** Cancer 1973; 32: 31-7.
48. Harris AL, Dowsett M, Smith IE, et al. **Aminoglutethimide in premenopausal patients with breast cancer: endocrine studies and tumor response.** Cancer Chemother 1980; 5: 23.
49. McCann SM, Taleisnik S, Friedman HM. **LH-Releasing activity in hypothalamic extracts.** Proc Soc Exp Biol Med 1960; 104: 432-4.
50. Schally AV, Nair RM, Carter WH. **Countercurrent distribution as a tool for purification of hypothalamic hormones on a preparative scale.** Anal Chem 1971; 43: 1527-9.
51. Tharandt L, Schulte H, Benker G, Hackenberg K, Reinwein D. **Treatment of isolated gonadotropin deficiency in men with synthetic LR-RH and a more potent analogue of LH-RH.** Neuroendocrinology 1977; 24: 195-207.

52. Labrie F, Auclair C, Cusan L, Kelly PA, Pelletier G, Ferland L. **Inhibitory effect of LH-RH and its agonists on testicular gonadotrophin receptors and spermatogenesis in the rat.** *Int J Androl* 1978; 2: 303-18.
53. Bergquist C, Nillius SJ, Bergh T, Skarin G, Wide L. **Inhibitory effects on gonadotrophin secretion and gonadal function in men during chronic treatment with a potent stimulatory luteinizing hormone-releasing hormone analogue.** *Acta Endocrinol (Copenh)* 1979; 91: 601-8.
54. Bergquist C, Nillius SJ, Wide L. **Inhibition of ovulation in women by intranasal treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist.** *Contraception* 1979; 19: 497-506.
55. Crowley WF Jr, Comite F, Vale W, Rivier J, Loriaux DL, Cutler GB Jr. **Therapeutic use of pituitary desensitization with a long-acting lhrh agonist: a potential new treatment for idiopathic precocious puberty.** *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 370-2.
56. Tolis G, Ackman D, Apostolos S, et al. **Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 1658-62.
57. Walker KJ, Nicholson RI, Turkes AO, et al. **Therapeutic potential of the LHRH agonist, ICI 118630, in the treatment of advanced prostatic carcinoma.** *Lancet* 1983; 2: 413-5.
58. Ahmed SR, Brooman PJ, Shalet SM, Howell A, Blacklock NJ, Rickards D. **Treatment of advanced prostatic cancer with LHRH analogue ICI 118630: clinical response and hormonal mechanisms.** *Lancet* 1983; 2: 415-9.
59. Klijn JG, de Jong FH. **Treatment with a luteinising-hormone-releasing-hormone analogue (buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer.** *Lancet* 1982; 1: 1213-6.
60. Buzdar AU, Robertson JF, Eiermann J, Nabholz JM. **An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane.** *Cancer* 2002; 95: 2006-16.
61. Nabholz JM, Bonnetterre J, Buzdar A, Robertson JF, Thürlimann B. **Anastrozole (Arimidex) versus tamoxifen as first-line therapy for**

- advanced breast cancer in postmenopausal women: survival analysis and updated safety results.** Eur J Cancer 2003; 39: 1684-9.
62. <http://www.nature.com/nrc/journal/v3/n11/images/nrc1211-f1.jpg>.
63. Wicki A, Rochlitz C. **Targeted therapies in breast cancer.** Swiss Med Wkly 2012; 142: 1-7.
64. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. **Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer.** J Natl Cancer Inst 2009; 101: 1308-24.
65. <http://www.ajnr.org/content/32/8/1373/F1.expansion.html>
American Journal of Neuroradiology. 2011; 32: 1373-4.
66. Cristofanilli M SRVV, et al. **Exploratory subset analysis according to prior endocrine treatment of two randomized phase II trials comparing gefitinib with placebo in combination with tamoxifen or anastrozole in hormone receptor positive metastatic breast cancer.** J Clin Oncol 2009; 27: suppl; abstr 1014.
67. Chow LSY JJ, Baselga J, et al. **Phase III study of temsirolimus with letrozole or letrozole alone in postmenopausal women with locally advanced or metastatic breast cancer.** Breast Cancer Res Treat 2006; 97: suppl; abstr 6091.
68. Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, et al. **Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer.** J Clin Oncol 2009; 27: 2630-7.
69. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. **Promising molecular targeted therapies in breast cancer.** Indian J Pharmacol 2011; 43: 236-45.
70. Estelamari Rodriguez. **Biology and Clinical Applications of Angiogenesis Inhibition in Malignant Disease.** The Molecular Oncology Report 2007; 1(2).
71. Adami H-O, Adams G, Boyle P, et al. **Breast cancer etiology.** Int J Cancer 1990; 5: 22-39.
72. Adami H-O, Persson I, Ekblom A, et al. **The aetiology and pathogenesis of human breast cancer.** Mutat Res 1995; 333: 29-35.
73. Lipworth L. **Epidemiology of breast cancer.** Eur J Cancer Prev 1995; 4: 7-30.

74. Ursin G, Bernstein L, Pike MC. **Breast cancer.** *Cancer Surv* 1994; 19-20: 241-64.
75. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, et al. **Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors.** *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1681-5.
76. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/results_merged/topic_lifetime_risk.pdf.
77. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. **Breast cancer statistics, 2011.** *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 409-18.
78. Κογεβίνας Μ, Κατσουγιάννη Κ, Winkelmann R, και συν. **Χαμένα χρόνια αναμενόμενης ζωής κατά αιτία θανάτου στην Ελλάδα.** *Ιατρική* 1992; 62: 162-8.
79. Urban JA, Papachristou D, Taylor J. **Bilateral breast cancer: biopsy of the opposite breast.** *Cancer* 1977; 40: 1968-73.
80. Boice JD Jr, Storm HH, Curtis RE, et al, (eds). **Multiple primary cancers in Connecticut and Denmark (National Cancer Institute monograph no 68).** Bethesda, MD: National Cancer Institute, (NIH publication no 85-2714), 1985.
81. Harvey EB, Brinton LA. **Second cancer following cancer of the breast.** *Natl Cancer Inst Monogr* 1985; 68: 99-112.
82. Schatzin A, Baranovsky A, Kessler LG. **Diet and cancer: evidence from associations of multiple primary cancers in the SEER program.** *Cancer* 1988; 62: 1451-7.
83. **Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. SEER*Stat Database: Incidence-SEER 9** Regs Research Data, Nov 2010 Sub (1973-2008) <Katrina/Rita Population Adjustment>-Linked to County Attributes-Total US, 1969-2009 Counties. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch; 2011. Released April 2011 based on the November 2010 submission.
84. **Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. SEER*Stat Database: Incidence-SEER 17** Regs Research Data + Hurricane Katrina Impacted Louisiana Cases, Nov 2010 Sub (2000-2008) <Katrina/Rita Population Adjustment>-Linked to County Attributes-Total US, 1969-2009 Counties. Bethesda, MD: National

Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch; 2011. Released April 2011 based on the November 2010 submission.

85. **Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. SEER*Stat Database: Incidence-SEER 13** Regs Research Data, Nov 2010 Sub (1992-2008) <Katrina/Rita Population Adjustment>-Linked to County Attributes-Total US, 1969-2009 Counties. Bethesda, MD: National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch; 2011. Released April 2011 based on the November 2010 submission.
86. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al, eds. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2011. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site. Accessed July 20, 2011.
87. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, et al. **The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States**. *N Engl J Med* 2007; 356: 1670-4.
88. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. **Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial**. *JAMA* 2002; 288: 321-33.
89. Breen N, Gentleman JF, Schiller JS. **Update on mammography trends: comparisons of rates in 2000, 2005, and 2008**. *Cancer* 2011; 117: 2209-18.
90. Li CI, Daling JR, Malone KE. **Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998**. *J Clin Oncol* 2003; 21: 28-34.
91. Chen WY, Hankinson SE, Schnitt SJ, Rosner BA, Holmes MD, Colditz GA. **Association of hormone replacement therapy to estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma**. *Cancer* 2004; 101: 1490-500.

92. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE. **Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma.** JAMA 2003; 289: 1421-4.
93. Chen CL, Weiss NS, Newcomb P, Barlow W, White E. **Hormone replacement therapy in relation to breast cancer.** JAMA 2002; 287: 734-41.
94. Li CI, Malone KE, Porter PL, et al. **Relationship between long durations and different regimens of hormone therapy and risk of breast cancer.** JAMA 2003; 289: 3254-63.
95. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, et al, eds. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007.** Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2010.
96. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, et al. **Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer.** N Engl J Med 2005; 353: 1784-92.
97. Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, Rosenberg PS. **Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis.** J Clin Oncol 2007; 25: 1683-90.
98. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108.
99. Smart CR, Byrne C, Smith RA, et al. **Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project.** CA Cancer J Clin 1997; 47: 134-49.
100. Tominaga S. **Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States.** Natl Cancer Inst Monogr 1985; 69: 83-92.
101. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al. **Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women.** J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1819-27.
102. Willett, WC, Rockhill B, Hankinson SE, et al. **Nongenetic factors in the causation of breast cancer.** In: Diseases of the breast. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2004, 3rd ed, p.223, 246-249,253,255.
103. **American Cancer Society Breast Cancer Facts and Figures 2008** available online at: www.cancer.org/docroot/STT/STT_0.asp.

104. Howe HL, Wu X, Ries LA, et al. **Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations.** *Cancer* 2006; 107: 1711-42.
105. Bradley CJ, Given CW, Roberts C. **Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival.** *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 490-6.
106. Palmer JR, Wise LA, Horton NJ, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. **Dual effect of parity on breast cancer risk in African-American women.** *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 478-83.
107. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. **Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.** *JAMA* 2006; 295: 2492-502.
108. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96.
109. **Data on SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) cancer statistics** available online at http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/results_merged/sect_04_breast.pdf.
110. Peto J, Mack TM. **High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer.** *Nat Genet* 2000; 26: 411-4.
111. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. **Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk.** *Epidemiol Rev* 1993; 15: 17-35.
112. Worsham MJ, Raju U, Lu M, Kapke A, Cheng J, Wolman SR. **Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5474-9.
113. Degnim AC, Visscher DW, Berman HK, et al. **Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study.** *J Clin Oncol* 2007; 25: 2671-7.
114. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al. **Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial.** *Lancet* 1999; 353: 1993-2000.
115. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast**

- cancer and 101,986 women without the disease.** Lancet 2001; 358: 1389-99.
116. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. **Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland.** N Engl J Med 2000; 343: 78-85.
 117. Thull DL, Vogel VG. **Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes.** Oncologist 2004; 9: 13-24.
 118. Levine AJ. **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** Cell 1997; 88: 323-31.
 119. Li FP, Fraumeni JF Jr. **Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome?** Ann Intern Med. 1969; 71: 747-52.
 120. Birch JM, Blair V, Kelsey AM, et al. **Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome.** Oncogene 1998; 17: 1061-8.
 121. Izatt L, Greenman J, Hodgson S, et al. **Identification of germline missense mutations and rare allelic variants in the ATM gene in early-onset breast cancer.** Genes Chromosomes Cancer 1999; 26: 286-94.
 122. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, et al. **Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23.** Nat Genet 1996; 13: 114-6.
 123. Eng C. **Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria.** J Med Genet 2000; 37: 828-30.
 124. Boardman LA, Thibodeau SN, Schaid DJ, et al. **Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome.** Ann Intern Med 1998; 128: 896-9.
 125. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, et al. **Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome.** N Engl J Med 1987; 316: 1511-4.
 126. Kelsey JL, Fischer DB, Holford TR, et al. **Exogenous estrogens and other factors in the epidemiology of breast cancer.** J Natl Cancer Inst 1981; 67: 327-33.
 127. van den Brandt PA, Spiegelman D, Yaun SS, et al. **Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk.** Am J Epidemiol 2000; 152: 514-27.

128. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, et al. **Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC).** *Int J Cancer* 2004; 111: 762-71.
129. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE. **Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer.** *JAMA* 2006; 296: 193-201.
130. Morimoto LM, White E, Chen Z, et al. **Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States).** *Cancer Causes Control* 2002; 13: 741-51.
131. Feigelson HS, Jonas CR, Teras LR, Thun MJ, Calle EE. **Weight gain, body mass index, hormone replacement therapy, and postmenopausal breast cancer in a large prospective study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 220-4.
132. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV Jr, et al. **Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk.** *Arch Intern Med* 2007; 167: 2091-102.
133. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, et al. **Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women.** *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1297-302.
134. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** *N Engl J Med* 2003; 348: 1625-38.
135. Key TJ, Pike MC. **The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer.** *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 29-43.
136. Michels KB, Terry KL, Willett WC. **Longitudinal study on the role of body size in premenopausal breast cancer.** *Arch Intern Med* 2006; 166: 2395-402.
137. Potischman N, Swanson CA, Siiteri P, Hoover RN. **Reversal of relation between body mass and endogenous estrogen concentrations with menopausal status.** *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 756-8.
138. Terry KL, Willett WC, Rich-Edwards JW, Michels KB. **A prospective study of infertility due to ovulatory disorders, ovulation induction, and incidence of breast cancer.** *Arch Intern Med* 2006; 166: 2484-9.

139. Ahlgren M, Melbye M, Wohlfahrt J, Sørensen TI. **Growth patterns and the risk of breast cancer in women.** *N Engl J Med* 2004; 351: 1619-26.
140. Maruti SS, Willett WC, Feskanich D, Rosner B, Colditz GA. **A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 728-37.
141. Bernstein L, Patel AV, Ursin G, et al. **Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women.** *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1671-9.
142. Dallal CM, Sullivan-Halley J, Ross RK, et al. **Long-term recreational physical activity and risk of invasive and in situ breast cancer: the California teachers study.** *Arch Intern Med* 2007; 167: 408-15.
143. Margolis KL, Mucci L, Braaten T, et al. **Physical activity in different periods of life and the risk of breast cancer: the Norwegian-Swedish Women's Lifestyle and Health cohort study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 27-32.
144. Mertens AJ, Sweeney C, Shahar E, Rosamond WD, Folsom AR. **Physical activity and breast cancer incidence in middle-aged women: a prospective cohort study.** *Breast Cancer Res Treat* 2006; 97: 209-14.
145. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. **Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study.** *JAMA* 2003; 290: 1331-6.
146. Patel AV, Calle EE, Bernstein L, Wu AH, Thun MJ. **Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer in a large cohort of US women.** *Cancer Causes Control* 2003; 14: 519-29.
147. Bardia A, Hartmann LC, Vachon CM, et al. **Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer based on hormone receptor status.** *Arch Intern Med* 2006; 166: 2478-83.
148. Thune I, Brenn T, Lund E, Gaard M. **Physical activity and the risk of breast cancer.** *N Engl J Med* 1997; 336: 1269-75.
149. Brinton LA, Bernstein L, Colditz GA. **Summary of the workshop: Workshop on Physical Activity and Breast Cancer, November 13-14, 1997.** *Cancer* 1998; 83: 595-9.

150. Friedenreich CM, Bryant HE, Courneya KS. **Case-control study of lifetime physical activity and breast cancer risk.** *Am J Epidemiol* 2001; 154: 336-47.
151. Yang D, Bernstein L, Wu AH. **Physical activity and breast cancer risk among Asian-American women in Los Angeles: a case-control study.** *Cancer* 2003; 97: 2565-75.
152. Lee IM, Cook NR, Rexrode KM, Buring JE. **Lifetime physical activity and risk of breast cancer.** *Br J Cancer* 2001; 85: 962-5.
153. McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, et al. **Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women: a 12-month randomized clinical trial.** *Cancer Res* 2004; 64: 2923-8.
154. Tjønneland A, Christensen J, Thomsen BL, et al. **Lifetime alcohol consumption and postmenopausal breast cancer rate in Denmark: a prospective cohort study.** *J Nutr* 2004; 134: 173-8.
155. Feigelson HS, Jonas CR, Robertson AS, McCullough ML, Thun MJ, Calle EE. **Alcohol, folate, methionine, and risk of incident breast cancer in the American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 161-4.
156. Vachon CM, Sellers TA, Carlson EE, et al. **Strong evidence of a genetic determinant for mammographic density, a major risk factor for breast cancer.** *Cancer Res* 2007; 67: 8412-8.
157. Irwin ML, Aiello EJ, McTiernan A, et al. **Physical activity, body mass index, and mammographic density in postmenopausal breast cancer survivors.** *J Clin Oncol* 2007; 25: 1061-6.
158. Boyd NF, Greenberg C, Lockwood G, et al. **Effects at two years of a low-fat, high-carbohydrate diet on radiologic features of the breast: results from a randomized trial.** Canadian Diet and Breast Cancer Prevention Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 488-96.
159. Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, et al. **Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer--a pooled analysis.** *N Engl J Med* 1996; 334: 356-61.
160. Thiébaud AC, Kipnis V, Chang SC, et al. **Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort.** *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 451-62.

161. Cho E, Chen WY, Hunter DJ, et al. **Red meat intake and risk of breast cancer among premenopausal women.** Arch Intern Med 2006; 166: 2253-9.
162. Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Wu K, Colditz GA, Willett WC. **Intake of dairy products, calcium, and vitamin d and risk of breast cancer.** J Natl Cancer Inst 2002; 94: 1301-11.
163. Lin J, Manson JE, Lee IM, Cook NR, Buring JE, Zhang SM. **Intakes of calcium and vitamin D and breast cancer risk in women.** Arch Intern Med 2007; 167: 1050-9.
164. Kushi LH, Fee RM, Sellers TA, Zheng W, Folsom AR. **Intake of vitamins A, C, and E and postmenopausal breast cancer. The Iowa Women's Health Study.** Am J Epidemiol 1996; 144: 165-74.
165. Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. **Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk.** J Natl Cancer Inst 2006; 98: 459-71.
166. Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Pike MC. **Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk.** Br J Cancer 2008; 98: 9-14.
167. Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. **Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo.** Cancer Res 1998; 58: 3833-8.
168. Zava DT, Duwe G. **Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro.** Nutr Cancer 1997; 27: 31-40.
169. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. **Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.** Endocrinology 1998; 139: 4252-63.
170. Ganmaa D, Willett WC, Li TY, et al. **Coffee, tea, caffeine and risk of breast cancer: a 22-year follow-up.** Int J Cancer 2008; 122: 2071-6.
171. Michels KB, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. **Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women.** Ann Epidemiol 2002; 12: 21-6.
172. Folsom AR, McKenzie DR, Bisgard KM, Kushi LH, Sellers TA. **No association between caffeine intake and postmenopausal breast cancer incidence in the Iowa Women's Health Study.** Am J Epidemiol 1993; 138: 380-3.

173. Band PR, Le ND, Fang R, Deschamps M. **Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer.** *Lancet* 2002; 360: 1044-9.
174. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, et al. **Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease.** *Br J Cancer* 2002; 87: 1234-45.
175. Chaturvedi P. **Does smoking increase the risk of breast cancer?** *Lancet Oncol* 2003; 4: 657-8; discussion 658.
176. Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, et al. **Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study.** *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 29-37.
177. Cui Y, Miller AB, Rohan TE. **Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study.** *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100: 293-9.
178. Al-Delaimy WK, Cho E, Chen WY, Colditz G, Willet WC. **A prospective study of smoking and risk of breast cancer in young adult women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 398-404.
179. Lissowska J, Brinton LA, Zatonski W, et al. **Tobacco smoking, NAT2 acetylation genotype and breast cancer risk.** *Int J Cancer* 2006; 119: 1961-9.
180. Clemons M, Goss P. **Estrogen and the risk of breast cancer.** *N Engl J Med* 2001; 344: 276-85.
181. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. **Reproductive factors and breast cancer.** *Epidemiol Rev* 1993; 15: 36-47.
182. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, et al. **Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk.** *Int J Cancer* 1982; 30: 427-31.
183. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. **Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study.** *Int J Cancer* 1990; 46: 796-800.

184. Colditz GA, Rosner B. **Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study.** Am J Epidemiol 2000; 152: 950-64.
185. Hamilton AS, Mack TM. **Puberty and genetic susceptibility to breast cancer in a case-control study in twins.** N Engl J Med 2003; 348: 2313-22.
186. **Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer.** Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Lancet 1997; 350: 1047-59.
187. Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. **Menstrual factors and risk of breast cancer.** Cancer Invest 1988; 6: 245-54.
188. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. **Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study.** Am J Epidemiol 1994; 139: 819-35.
189. Bruzzi P, Negri E, La Vecchia C, et al. **Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy.** BMJ 1988; 297: 1096-8.
190. Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW. **The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer.** Cancer and Steroid Hormone Study Group. J Clin Epidemiol 1989; 42: 963-73.
191. Colditz GA, Frazier AL. **Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1995; 4: 567-71.
192. Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83,000 women with breast cancer from 16 countries.** Lancet 2004; 363: 1007-16.
193. Melbye M, Wohlfahrt J, Olsen JH, et al. **Induced abortion and the risk of breast cancer.** N Engl J Med 1997; 336: 81-5.
194. Erlandsson G, Montgomery SM, Cnattingius S, Ekblom A. **Abortions and breast cancer: record-based case-control study.** Int J Cancer 2003; 103: 676-9.

195. Paoletti X, Clavel-Chapelon F. **Induced and spontaneous abortion and breast cancer risk: results from the E3N cohort study.** *Int J Cancer* 2003; 106: 270-6.
196. Reeves GK, Kan SW, Key T, et al. **Breast cancer risk in relation to abortion: Results from the EPIC study.** *Int J Cancer* 2006; 119: 1741-5.
197. Michels KB, Xue F, Colditz GA, Willett WC. **Induced and spontaneous abortion and incidence of breast cancer among young women: a prospective cohort study.** *Arch Intern Med* 2007; 167: 814-20.
198. Zheng T, Holford TR, Mayne ST, et al. **Lactation and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut.** *Br J Cancer* 2001; 84: 1472-6.
199. Tryggvadóttir L, Tulinius H, Eyfjord JE, Sigurvinsson T. **Breastfeeding and reduced risk of breast cancer in an Icelandic cohort study.** *Am J Epidemiol* 2001; 154: 37-42.
200. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease.** *Lancet* 2002; 360: 187-95.
201. Jernström H, Lubinski J, Lynch HT, et al. **Breast-feeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.** *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1094-8.
202. Martin RM, Middleton N, Gunnell D, Owen CG, Smith GD. **Breast-feeding and cancer: the Boyd Orr cohort and a systematic review with meta-analysis.** *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1446-57.
203. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, et al. **Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women.** *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1218-26.
204. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, et al. **Plasma sex steroid hormone levels and risk of breast cancer in postmenopausal women.** *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1292-9.
205. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. **Endogenous sex hormones and**

- breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies.** J Natl Cancer Inst 2002; 94: 606-16.
206. Lippman ME, Krueger KA, Eckert S, et al. **Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants.** J Clin Oncol 2001; 19: 3111-6.
207. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR. **Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer.** Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Ann Intern Med 1999; 130: 270-7.
208. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. **Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women.** J Natl Cancer Inst 2004; 96: 1856-65.
209. Beattie MS, Costantino JP, Cummings SR, et al. **Endogenous sex hormones, breast cancer risk, and tamoxifen response: an ancillary study in the NSABP Breast Cancer Prevention Trial (P-1).** J Natl Cancer Inst 2006; 98: 110-5.
210. Zmuda JM, Cauley JA, Ljung BM, Bauer DC, Cummings SR, Kuller LH; **Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Bone mass and breast cancer risk in older women: differences by stage at diagnosis.** J Natl Cancer Inst 2001; 93: 930-6.
211. Zhang Y, Kiel DP, Kreger BE, et al. **Bone mass and the risk of breast cancer among postmenopausal women.** N Engl J Med 1997; 336: 611-7.
212. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Vogt MT, Browner WS, Cummings SR. **Bone mineral density and risk of breast cancer in older women: the study of osteoporotic fractures.** Study of Osteoporotic Fractures Research Group. JAMA 1996; 276: 1404-8.
213. Kaaks R, Berrino F, Key T, et al. **Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** J Natl Cancer Inst 2005; 97: 755-65.
214. Thomas HV, Key TJ, Allen DS, et al. **A prospective study of endogenous serum hormone concentrations and breast cancer**

- risk in premenopausal women on the island of Guernsey. *Br J Cancer* 1997; 75: 1075-9.
215. Zeleniuch-Jacquotte A, Bruning PF, Bonfrer JM, et al. **Relation of serum levels of testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to risk of breast cancer in postmenopausal women.** *Am J Epidemiol* 1997; 145: 1030-8.
216. Adly L, Hill D, Sherman ME, et al. **Serum concentrations of estrogens, sex hormone-binding globulin, and androgens and risk of breast cancer in postmenopausal women.** *Int J Cancer* 2006; 119: 2402-7.
217. Tworoger SS, Missmer SA, Eliassen AH, et al. **The association of plasma DHEA and DHEA sulfate with breast cancer risk in predominantly premenopausal women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 967-71.
218. Tworoger SS, Sluss P, Hankinson SE. **Association between plasma prolactin concentrations and risk of breast cancer among predominately premenopausal women.** *Cancer Res* 2006; 66: 2476-82.
219. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. **Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis.** *Lancet* 2004; 363: 1346-53.
220. Sugumar A, Liu YC, Xia Q, Koh YS, Matsuo K. **Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein 3 and the risk of premenopausal breast cancer: a meta-analysis of literature.** *Int J Cancer* 2004; 111: 293-7.
221. Michels KB, Solomon CG, Hu FB, et al. **Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the Nurses' Health Study.** *Diabetes Care* 2003; 26: 1752-8.
222. Baron JA, Weiderpass E, Newcomb PA, et al. **Metabolic disorders and breast cancer risk (United States).** *Cancer Causes Control* 2001; 12: 875-80.
223. Talamini R, Franceschi S, Favero A, Negri E, Parazzini F, La Vecchia C. **Selected medical conditions and risk of breast cancer.** *Br J Cancer* 1997; 75: 1699-703.

224. Lipscombe LL, Goodwin PJ, Zinman B, McLaughlin JR, Hux JE. **Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population-based cohort study.** *Breast Cancer Res Treat* 2006; 98: 349-56.
225. Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. **Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis.** *Int J Cancer* 2007; 121: 856-62.
226. Weiss HA, Brinton LA, Potischman NA, et al. **Breast cancer risk in young women and history of selected medical conditions.** *Int J Epidemiol* 1999; 28: 816-23.
227. Sellers TA, Sprafka JM, Gapstur SM, et al. **Does body fat distribution promote familial aggregation of adult onset diabetes mellitus and postmenopausal breast cancer?** *Epidemiology* 1994; 5: 102-8.
228. Hjalgrim H, Frisch M, Ekblom A, Kyvik KO, Melbye M, Green A. **Cancer and diabetes--a follow-up study of two population-based cohorts of diabetic patients.** *J Intern Med* 1997; 241: 471-5.
229. Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Sasazuki S, Noda M, Tsugane S. **Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan.** *Arch Intern Med* 2006; 166: 1871-7.
230. Wolf I, Sadetzki S, Catane R, Karasik A, Kaufman B. **Diabetes mellitus and breast cancer.** *Lancet Oncol* 2005; 6: 103-11.
231. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al. **Mammographic density and the risk and detection of breast cancer.** *N Engl J Med* 2007; 356: 227-36.
232. Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, et al. **Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer.** *Lancet Oncol* 2005; 6: 798-808.
233. McCormack VA, dos Santos Silva I. **Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1159-69.
234. Kerlikowske K, Ichikawa L, Miglioretti DL, et al. **Longitudinal measurement of clinical mammographic breast density to improve estimation of breast cancer risk.** *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 386-95.
235. Ziv E, Tice J, Smith-Bindman R, Shepherd J, Cummings S, Kerlikowske K. **Mammographic density and estrogen receptor**

- status of breast cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 2090-5.
236. Tamimi RM, Byrne C, Colditz GA, Hankinson SE. **Endogenous hormone levels, mammographic density, and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women.** *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1178-87.
237. Fentiman IS. **Oral contraceptives, hormone replacement therapy and breast cancer.** *Int J Clin Pract* 2002; 56: 755-9.
238. Dumeaux V, Alsaker E, Lund E. **Breast cancer and specific types of oral contraceptives: a large Norwegian cohort study.** *Int J Cancer* 2003; 105: 844-50.
239. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, et al. **Oral contraceptives and breast cancer: a cooperative Italian study.** *Int J Cancer* 1995; 60: 163-7.
240. Rosenberg L, Palmer JR, Rao RS, et al. **Case-control study of oral contraceptive use and risk of breast cancer.** *Am J Epidemiol* 1996; 143: 25-37.
241. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. **Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies.** *Lancet* 1996; 347: 1713-27.
242. Newcomer LM, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Longnecker MP, Greenberg ER. **Oral contraceptive use and risk of breast cancer by histologic type.** *Int J Cancer* 2003; 106: 961-4.
243. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, et al. **Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial.** *JAMA* 2003; 289: 3243-53.
244. Beral V; Million Women Study Collaborators. **Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study.** *Lancet* 2003; 362: 419-27.
245. Kenney LB, Yasui Y, Inskip PD, et al. **Breast cancer after childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study.** *Ann Intern Med* 2004; 141: 590-7.

246. Guibout C, Adjadj E, Rubino C, et al. **Malignant breast tumors after radiotherapy for a first cancer during childhood.** *J Clin Oncol* 2005; 23: 197-204.
247. Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, et al. **Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident.** *Int J Cancer* 2006; 119: 651-8.
248. John EM, Kelsey JL. **Radiation and other environmental exposures and breast cancer.** *Epidemiol Rev* 1993; 15: 157-62.
249. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE. **Radiation and breast cancer: a review of current evidence.** *Breast Cancer Res* 2005; 7: 21-32.
250. John EM, Phipps AI, Knight JA, et al. **Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry.** *Int J Cancer* 2007; 121: 386-94.
251. Calle EE, Frumkin H, Henley SJ, Savitz DA, Thun MJ. **Organochlorines and breast cancer risk.** *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 301-9.
252. McLaughlin JK, Lipworth L, Fryzek JP, Ye W, Tarone RE, Nyren O. **Long-term cancer risk among Swedish women with cosmetic breast implants: an update of a nationwide study.** *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 557-60.
253. Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, et al. **Association of frequency and duration of aspirin use and hormone receptor status with breast cancer risk.** *JAMA* 2004; 291: 2433-40.
254. Harris RE, Chlebowski RT, Jackson RD, et al. **Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative.** *Cancer Res* 2003; 63: 6096-101.
255. Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA. **Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage.** *Br J Cancer* 2000; 83: 112-20.
256. Zhang Y, Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. **Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of breast cancer: the Case-Control Surveillance Study revisited.** *Am J Epidemiol* 2005; 162: 165-70.
257. Gallicchio L, Visvanathan K, Burke A, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. **Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of developing**

- breast cancer in a population-based prospective cohort study in Washington County, MD.** *Int J Cancer* 2007; 121: 211-15.
258. Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA. **Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 988-93.
259. Marshall SF, Bernstein L, Anton-Culver H, et al. **Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk by stage and hormone receptor status.** *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 805-12.
260. Cook NR, Lee IM, Gaziano JM, et al. **Low-dose aspirin in the primary prevention of cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2005; 294: 47-55.
261. Jacobs EJ, Thun MJ, Bain EB, Rodriguez C, Henley SJ, Calle EE. **A large cohort study of long-term daily use of adult-strength aspirin and cancer incidence.** *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 608-15.
262. Velicer CM, Heckbert SR, Lampe JW, Potter JD, Robertson CA, Taplin SH. **Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer.** *JAMA* 2004; 291: 827-35.
263. Sørensen HT, Skriver MV, Friis S, McLaughlin JK, Blot WJ, Baron JA. **Use of antibiotics and risk of breast cancer: a population-based case-control study.** *Br J Cancer* 2005; 92: 594-6.
264. García Rodríguez LA, González-Pérez A. **Use of antibiotics and risk of breast cancer.** *Am J Epidemiol* 2005; 161: 616-9.
265. Didham RC, Reith DM, McConnell DW, Harrison KS. **Antibiotic exposure and breast cancer in New Zealand.** *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 163-7.
266. Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. **Folate and risk of breast cancer: a meta-analysis.** *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 64-76.
267. Τζωρακολευθεράκης Ε. **Χειρουργικές παθήσεις του μαστού.** Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 1992, σελ. 89,90.
268. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. **Cancer statistics, 2000.** *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
269. Bloom, H. J.; Richardson, W. W. **Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.** *British journal of cancer* 1957; 11: 359-377.
270. Genestie C, Zafrani B, Asselain B, Fourquet A, Rozan S, Validire P, Vincent-Salomon A, Sastre-Garau X. **Comparison of the prognostic**

- value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: Major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer research* 1998; 18: 571–576.
271. Elston CW, Ellis IO. **Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up.** *Histopathology* 1991; 19: 403-410.
272. http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_3X_How_is_breast_cancer_staged_5.asp.
273. Schnitt SJ. **Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy.** *Mod Pathol* 2010; 23 Suppl 2: S60-4.
274. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, et al. **Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype.** *BMC Res Notes* 2012; 5: 376.
275. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. **Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.** *J Clin Oncol* 2010; 28: 1684-91.
276. Algire GH, Chalkley HW. **Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants.** *J Nat Cancer Inst* 1945; 6: 73.
277. Michaelson I. **The mode of development of the vascular system in the retina, with some observations in its significance for certain retinal diseases.** *Trans Ophthalmol Soc UK* 1948; 68: 137-80.
278. Greene HSN. **Heterologous transplantation of mammalian tumors.** *J Exp Med* 1961; 73: 461.
279. Greenblatt M, Shubik P. **Tumour angiogenesis: transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster by the transparent chamber technique.** *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 111-24.
280. Ehrmann RL, Knoth M. **Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy.** *J Natl Cancer Inst* 1968; 41: 1329-41.
281. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. **Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.** *J Exp Med* 1971; 133: 275-88.

282. Folkman J. **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.
283. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.** Science 1989; 246: 1306-9.
284. Ferrara N, Henzel WJ. **Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.** Biochem Biophys Res Commun 1989; 161: 851-8.
285. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. **Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.** Nature 1993; 362: 841-4.
286. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. **Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer.** N Engl J Med 2006; 355: 2542-50.
287. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. **Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer.** N Engl J Med 2007; 357: 2666-76.
288. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. **Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.** N Engl J Med 2004; 350: 2335-42.
289. <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/avastin-prescribing.pdf>.
290. Pollack, Andrew (18 November 2011). **"F.D.A. Revokes Approval of Avastin for Breast Cancer"**. New York Times. <http://prescriptions.blogs.nytimes.com/2011/11/18/f-d-a-revokes-approval-of-avastin-for-breast-cancer/>.
291. **"Cancer drug Avastin loses US approval"**. BBC. November 18, 2011. <http://www.bbc.co.uk/news/world-us-canada-15800907>.
292. Hanahan D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** Cell 1996; 86: 353-64.
293. Naumov GN, Akslen LA, Folkman J. **Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch.** Cell Cycle 2006; 5: 1779-87.
294. Holmgren L. **Antiangiogenesis restricted tumor dormancy.** Cancer Metastasis Rev 1996; 15: 241-5.

295. Gupta MK, Qin RY. **Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis.** World J Gastroenterol 2003; 9: 1144-55.
296. Fox SB, Generali DG, Harris AL. **Breast tumour angiogenesis.** Breast Cancer Res 2007; 9: 216.
297. Carmeliet P, Jain RK. **Angiogenesis in cancer and other diseases.** Nature 2000; 407: 249-57.
298. Folkman J. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis.** N Engl J Med 1995; 333: 1757-63.
299. Jiang BH, Liu LZ. **PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis.** Adv Cancer Res 2009; 102: 19-65.
300. Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, et al. **Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer.** Cancer Res 1993; 53: 4161-3.
301. Kakolyris S, Giatromanolaki A, Koukourakis M, et al. **Assessment of vascular maturation in non-small cell lung cancer using a novel basement membrane component, LH39: correlation with p53 and angiogenic factor expression.** Cancer Res 1999; 59: 5602-7.
302. Kakolyris S, Fox SB, Koukourakis M, et al. **Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39.** Br J Cancer 2000; 82: 844-51.
303. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. **Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.** Circ Res 1999; 85: 221-8.
304. Gundersen E, Duba HC, Petzer AL, et al. **Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells.** Lancet 2000; 355: 1688-91.
305. Rafii S. **Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise.** J Clin Invest 2000; 105: 17-9.
306. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. **VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.** EMBO J 1999; 18: 3964-72.

307. Döme B, Hendrix MJ, Paku S, Tóvári J, Tímár J. **Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications.** Am J Pathol 2007; 170: 1-15.
308. Brat DJ, Van Meir EG. **Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research.** Am J Pathol 2001; 158: 789-96.
309. Straume O, Chappuis PO, Salvesen HB, et al. **Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers.** Cancer Res 2002; 62: 6808-11.
310. Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, et al. **Molecular determinants of ovarian cancer plasticity.** Am J Pathol 2001; 158: 1279-88.
311. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. **Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis.** Am J Pathol 2000; 156: 361-81.
312. McDonald DM, Munn L, Jain RK. **Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant?** Am J Pathol 2000; 156: 383-8.
313. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. **Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.** Am J Pathol 2002; 160: 985-1000.
314. Rodriguez S, Huynh-Do U. **The Role of PTEN in Tumor Angiogenesis.** J Oncol 2012; 2012: 141236.
315. Vaupel P, Mayer A, Briest S, Höckel M. **Hypoxia in breast cancer: role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion.** Adv Exp Med Biol 2005; 566: 333-42.
316. Harris AL. **Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth.** Nat Rev Cancer 2002; 2: 38-47.
317. Brem SS, Jensen HM, Gullino PM. **Angiogenesis as a marker of preneoplastic lesions of the human breast.** Cancer 1978; 41: 239-44.
318. Jensen HM, Chen I, DeVault MR, Lewis AE. **Angiogenesis induced by "normal" human breast tissue: a probable marker for precancer.** Science 1982; 218: 293-5.
319. Lichtenbeld HC, Barendsz-Janson AF, van Essen H, Struijker Boudier H, Griffioen AW, Hillen HF. **Angiogenic potential of malignant and**

- non-malignant human breast tissues in an in vivo angiogenesis model.** *Int J Cancer* 1998; 77: 455-9.
320. Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. **Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas.** *Science* 1996; 274: 2057-9.
321. Engels K, Fox SB, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. **Distinct angiogenic patterns are associated with high-grade in situ ductal carcinomas of the breast.** *J Pathol* 1997; 181: 207-12.
322. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. **Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast.** *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 614-9.
323. Marson LP, Kurian KM, Miller WR, Dixon JM. **The effect of tamoxifen on breast tumour vascularity.** *Breast Cancer Res Treat* 2001; 66: 9-15.
324. Gasparini G, Fox SB, Verderio P, et al. **Determination of angiogenesis adds information to estrogen receptor status in predicting the efficacy of adjuvant tamoxifen in node-positive breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1191-8.
325. Macaulay V, Fox SB, Zhang H, et al. **Breast cancer angiogenesis and tamoxifen resistance.** *Endocr Rel Cancer* 1995; 2: 1-8.
326. Gasparini G, Toi M, Verderio P, et al. **Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients.** *Int J Oncol* 1998; 12: 1117-25.
327. Gasparini G, Biganzoli E, Bonoldi E, Morabito A, Fanelli M, Boracchi P. **Angiogenesis sustains tumor dormancy in patients with breast cancer treated with adjuvant chemotherapy.** *Breast Cancer Res Treat* 2001; 65: 71-5.
328. Fox SB, Leek RD, Bliss J, et al. **Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients.** *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1044-9.
329. Fox SB. **Quantitative angiogenesis in breast cancer.** *Methods Mol Med* 2006; 120: 161-87.
330. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. **Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic**

- review of the literature and meta-analysis.** *Cancer Res* 2004; 64: 2941-55.
331. Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraishi S, Nakagawa K, Sueishi K. **Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 131-9.
332. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. **Changes in microvessel density as assessed by CD34 antibodies after primary chemotherapy in human breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1816-21.
333. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, Pe'er J, Folberg R. **Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2533-9.
334. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat Med* 2003; 9: 669-76.
335. Ferrara N. **Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.** *J Mol Med (Berl)* 1999; 77: 527-43.
336. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. **Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.** *Pharmacol Rev* 2004; 56: 549-80.
337. Mura M, dos Santos CC, Stewart D, Liu M. **Vascular endothelial growth factor and related molecules in acute lung injury.** *J Appl Physiol* 2004; 97: 1605-17.
338. Ferrara N. **VEGF: an update on biological and therapeutic aspects.** *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-24.
339. Ferrara N, Alitalo K. **Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors.** *Nat Med* 1999; 5: 1359-64.
340. http://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/fig_tab/nm.2545_F4.html&docid=MD53J5M6sPRI1M&imgurl=http://www.nature.com/nm/journal/v17/n11/images/nm.2545-F4.jpg&w=946&h=930&ei=M532UOeyEaWA0AXdjY_GYDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=475&vpy=92&dur=10616&hovh=223&hovw=226&tx=152&ty=98&sig=100926890728340017982&page=1&tbnh=134&tbnw=137&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:9,s:0,i:106.

341. Toi M, Matsumoto T, Bando H. **Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications.** *Lancet Oncol* 2001; 2: 667-73.
342. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. **Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4).** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 548-53.
343. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, et al. **A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases.** *EMBO J* 1996; 15: 290-98.
344. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Shibuya M, Neufeld G. **Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes.** *J Biol Chem* 2001; 276: 18688-94.
345. http://www.biooncology.com/research-education/vegf/images/VEGF_ligand.jpg&w=500&h=433&ei=M532UOeyEaWA0AXdjYGYDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=323&vpy=108&dur=4345&hovh=209&hovw=241&tx=127&ty=110&sig=100926890728340017982&page=1&tbnh=134&tbnw=175&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:2,s:0,i:85
346. Bando H. **Vascular endothelial growth factor and bevacizumab in breast cancer.** *Breast Cancer* 2007; 14: 163-73.
347. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. **How tumors become angiogenic.** *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-74.
348. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. **Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth.** *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 24-33.
349. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors.** *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
350. Krieg M, Haas R, Brauch H, Acker T, Flamme I, Plate KH. **Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function.** *Oncogene* 2000; 19: 5435-43.
351. Shi Q, Le X, Abbruzzese JL, et al. **Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular**

- endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2001; 61: 4143-54.
352. Agani F, Semenza GL. **Mersalyl is a novel inducer of vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity.** *Mol Pharmacol* 1998; 54: 749-54.
353. Richard DE, Berra E, Gothié E, Roux D, Pouyssegur J. **p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1.** *J Biol Chem* 1999; 274: 32631-7.
354. Kazi AA, Koos RD. **Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.** *Endocrinology* 2007; 148: 2363-74.
355. Clarke K, Smith K, Gullick WJ, Harris AL. **Mutant epidermal growth factor receptor enhances induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia and insulin-like growth factor-1 via a PI3 kinase dependent pathway.** *Br J Cancer* 2001; 84: 1322-9.
356. Maity A, Pore N, Lee J, Solomon D, O'Rourke DM. **Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia.** *Cancer Res* 2000; 60: 5879-86.
357. Yen L, You XL, Al Moustafa AE, et al. **Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis.** *Oncogene* 2000; 19: 3460-9.
358. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, et al. **bcl-2 and c-erbB-2 proteins are involved in the regulation of VEGF and of thymidine phosphorylase angiogenic activity in non-small-cell lung cancer.** *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 545-54.
359. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. **HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.** *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.
360. Konecny GE, Meng YG, Untch M, et al. **Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts**

- clinical outcome in primary breast cancer patients.** Clin Cancer Res 2004; 10: 1706-16.
361. Salven P, Orpana A, Joensuu H. **Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor.** Clin Cancer Res 1999; 5: 487-91.
362. Poon RT, Fan ST, Wong J. **Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients.** J Clin Oncol 2001; 19: 1207-25.
363. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. **Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.** Cell 1996; 87: 1161-9.
364. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. **Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.** Science 1997; 277: 55-60.
365. Daly C, Wong V, Burova E, et al. **Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1).** Genes Dev 2004; 18: 1060-71.
366. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5510-4.
367. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. **Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation.** Cell 2002; 111: 709-20.
368. Semenza GL. **HIF-1 and human disease: one highly involved factor.** Genes Dev 2000; 14: 1983-91.
369. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** Nature 1999; 399: 271-5.
370. Kapitsinou PP, Haase VH. **The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice.** Cell Death Differ 2008; 15: 650-9.
371. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. **Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element.** Blood 1997; 90: 3322-31.

372. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. **Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.** *Cancer Res* 2000; 60: 1541-5.
373. Generali D, Berruti A, Brizzi MP, et al. **Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4562-8.
374. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, et al. **Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis.** *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 309-14.
375. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. **Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia.** *J Biol Chem* 1995; 270: 13333-40.
376. Semenza GL. **Targeting HIF-1 for cancer therapy.** *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.
377. Kalluri R, Zeisberg M. **Fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.
378. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, et al. **VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 658-64.
379. Kumar SR, Singh J, Xia G, et al. **Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer.** *Am J Pathol* 2006; 169: 279-93.
380. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, et al. **Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo.** *J Cell Biol* 2001; 154: 1069-79.
381. Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. **The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases.** *J Biol Chem* 1996; 271: 10079-86.
382. <http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7058/images/nature03987-f3.2.jpg&w=600&h=505&ei=M532UOeyEaWA0AXdjYGyDQ&zoom=1&iact=rc&dur=427&sig=100926890728340017982&page>

=6&tbnh=136&tbnw=162&start=81 =15&ved=1t:429,r:83,s:0,i:334&tx=61&ty=74.

383. Guinebretière JM, Lê Monique G, Gavoille A, Bahi J, Contesso G. **Angiogenesis and risk of breast cancer in women with fibrocystic disease.** J Natl Cancer Inst 1994; 86: 635-6.
384. Guidi AJ, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. **Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast.** J Natl Cancer Inst 1994; 86: 614-9.
385. Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L, et al. **Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast.** Cancer 1997; 80: 1945-53.
386. Gasparini G. **Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer.** Oncologist 2000; 5 Suppl 1: 37-44.
387. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** Science 1989; 244: 707-12.
388. Munagala R, Aqil F, Gupta RC. **Promising molecular targeted therapies in breast cancer.** Indian J Pharmacol 2011; 43: 236-45.
389. Nielsen DL, Andersson M, Andersen JL, Kamby C. **Antiangiogenic therapy for breast cancer.** Breast Cancer Res 2010; 12: 209.
390. http://www.anti-vegf.ru/portal/eipf/pb/avastin/ciencevegf/proposedmode_of_action_of_anti-vegf_agents?_requestid=352961.
391. von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, et al. **Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer.** N Engl J Med 2012; 366: 299-309.
392. Bear HD, Tang G, Rastogi P, et al. **Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.** N Engl J Med 2012; 366: 310-20.
393. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. **Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer.** N Engl J Med 2007; 357: 2666-76.
394. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL. **Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer.** J Clin Oncol 2009; 27: 4966-72.

395. Miles DW, Chan A, Dirix LY, et al. **Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010; 28: 3239-47.
396. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, et al. **RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2011; 29: 1252-60.
397. Smith I, Pierga JY, Biganzoli L, et al. **Final overall survival results and effect of prolonged (≥ 1 year) first-line bevacizumab-containing therapy for metastatic breast cancer in the ATHENA trial.** *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130: 133-43.
398. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. **VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11393-8.
399. Mayer EL, Dhakil S, Patel T, et al. **SABRE-B: an evaluation of paclitaxel and bevacizumab with or without sunitinib as first-line treatment of metastatic breast cancer.** *Ann Oncol* 2010; 21: 2370-6.
400. Miller KD, Trigo JM, Wheeler C, et al. **A multicenter phase II trial of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor-2 and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with previously treated metastatic breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3369-76.
401. Baselga J, Roche H, Costa F, et al. **SOLTI-0701: A multinational double-blind, randomized phase 2b study evaluating the efficacy and safety of sorafenib compared to placebo when administered in combination with capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer (BC).** *Cancer Res* 2009; 69: 497s.
402. <http://img.medscape.com/slide/migrated/editorial/cmecircle/2007/7168/images/partridge/3.jpg&w=450&h=337&ei=P572UKfZDoqU0QX72YHABg&zoom=1&iact=hc&vpx=502&vpy=2&dur=66&hovh=194&hovw=260&tx=155&ty=73&sig=100926890728340017982&page=7&tbnh=146&tbnw=196&ndsp=16&ved=1t:429,r:9,s:100,i:31>

403. Duffy MJ, McCarthy K. **Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and targets for therapy (review)**. *Int J Oncol* 1998; 12: 1343-8.
404. Duffy MJ, Reilly D, O'Sullivan C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreassen P. **Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer**. *Cancer Res* 1990; 50: 6827-9.
405. Potempa J, Korzus E, Travis J. **The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation**. *J Biol Chem* 1994; 269: 15957-60.
406. Gettins PG. **Serpin structure, mechanism, and function**. *Chem Rev* 2002; 102: 4751-804.
407. Mikus P, Ny T. **Intracellular polymerization of the serpin plasminogen activator inhibitor type 2**. *J Biol Chem* 1996; 271: 10048-53.
408. Endsley MP, Zhang M. **Investigating maspin in breast cancer progression using mouse models**. *Methods Enzymol* 2011; 499: 149-65.
409. Zou Z, Anisowicz A, Hendrix MJ, et al. **Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells**. *Science* 1994; 263: 526-9.
410. Ngamkitidechakul C, Warejcka DJ, Burke JM, O'Brien WJ, Twining SS. **Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule**. *J Biol Chem* 2003; 278: 31796-806.
411. Kim DH, Yoon DS, Dooley WC, et al. **Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer**. *Histopathology* 2003; 42: 37-42.
412. Yu M, Zheng H, Tsuneyama K, et al. **Paradoxical expression of maspin in gastric carcinomas: correlation with carcinogenesis and progression**. *Hum Pathol* 2007; 38: 1248-55.
413. Marioni G, Staffieri C, Staffieri A, De Filippis C, Blandamura S. **MASPIN tumour-suppressing activity in head and neck squamous cell carcinoma: emerging evidence and therapeutic perspectives**. *Acta Otolaryngol* 2009; 129: 476-80.

414. Sager R, Sheng S, Anisowicz A, et al. **RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994; 59: 537-46.
415. Schneider SS, Schick C, Fish KE, et al. **A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene.** Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 3147-51.
416. Le Beau MM, Overhauser J, Straub RE, et al. **Report of the first international workshop on human chromosome 18 mapping.** Cytogenet Cell Genet 1993; 63: 78-96.
417. Markie D, Jones TA, Sheer D, Bodmer WF. **A somatic cell hybrid panel for regional mapping of human chromosome 18.** Genomics 1992; 14: 431-6.
418. Sheng S, Carey J, Seftor EA, Dias L, Hendrix MJ, Sager R. **Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells.** Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 11669-74.
419. Liu J, Yin S, Reddy N, Spencer C, Sheng S. **Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin.** Cancer Res 2004; 64: 1703-11.
420. <http://en.wikipedia.org/wiki/Maspin>.
421. Zhang M, Magit D, Sager R. **Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor.** Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5673-8.
422. Zhang M, Maass N, Magit D, Sager R. **Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin.** Cell Growth Differ 1997; 8: 179-86.
423. Zou Z, Zhang W, Young D, et al. **Maspin expression profile in human prostate cancer (CaP) and in vitro induction of Maspin expression by androgen ablation.** Clin Cancer Res 2002; 8: 1172-7.
424. Khalkhali-Ellis Z, Christian AL, Kirschmann DA, et al. **Regulating the tumor suppressor gene maspin in breast cancer cells: a potential mechanism for the anticancer properties of tamoxifen.** Clin Cancer Res 2004; 10: 449-54.

425. Eitel JA, Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, et al. **PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells.** *Cell Cycle* 2009; 8: 896-901.
426. Zhang M. **PTEN in action: coordinating with p53 to regulate maspin gene expression.** *Cell Cycle* 2009; 8: 1112-3.
427. Luo JL, Tan W, Ricono JM, et al. **Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin.** *Nature* 2007; 446: 690-4.
428. Wang SE, Narasanna A, Whitell CW, Wu FY, Friedman DB, Arteaga CL. **Convergence of p53 and transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling on activating expression of the tumor suppressor gene maspin in mammary epithelial cells.** *J Biol Chem* 2007; 282: 5661-9.
429. <http://www.nature.com/ng/journal/v31/n2/full/ng0602-123.html>.
430. Domann FE, Rice JC, Hendrix MJ, Futscher BW. **Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers.** *Int J Cancer* 2000; 85: 805-10.
431. Rose SL, Fitzgerald MP, White NO, et al. **Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells.** *Gynecol Oncol* 2006; 102: 319-24.
432. Laird PW, Jaenisch R. **DNA methylation and cancer.** *Hum Mol Genet* 1994; 3 Spec No: 1487-95.
433. Boltze C, Schneider-Stock R, Quednow C, et al. **Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer.** *Int J Mol Med* 2003; 12: 479-84.
434. Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, et al. **Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer.** *J Pathol* 2005; 205: 606-14.
435. Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. **Maspin expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas.** *Virchows Arch* 2002; 441: 551-8.
436. Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. **Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms.** *Science* 1985; 228: 187-90.
437. Dunn BK. **Hypomethylation: one side of a larger picture.** *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 28-42.

438. Sato N, Maitra A, Fukushima N, et al. **Frequent hypomethylation of multiple genes overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Res* 2003; 63: 4158-66.
439. Akiyama Y, Maesawa C, Ogasawara S, Terashima M, Masuda T. **Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells.** *Am J Pathol* 2003; 163: 1911-9.
440. Lonardo F, Li X, Kaplun A, et al. **The natural tumor suppressor protein maspin and potential application in non small cell lung cancer.** *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1877-81.
441. Beck HC, Nielsen EC, Matthiesen R, et al. **Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones.** *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1314-25.
442. Maass N, Biallek M, Rösel F, et al. **Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 125-8.
443. Sugimoto S, Maass N, Takimoto Y, et al. **Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in human bladder cancer.** *Cancer Lett* 2004; 203: 209-15.
444. Khalkhali-Ellis Z. **Maspin: the new frontier.** *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7279-83.
445. Pemberton PA, Tipton AR, Pavloff N, et al. **Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface.** *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1697-706.
446. Sager R, Sheng S, Pemberton P, Hendrix MJ. **Maspin: a tumor suppressing serpin.** *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 51-64.
447. Teoh SS, Whisstock JC, Bird PI. **Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin.** *J Biol Chem* 2010; 285: 10862-9.
448. Blacque OE, Worrall DM. **Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen.** *J Biol Chem* 2002; 277: 10783-8.
449. Gao F, Shi HY, Daughy C, Cella N, Zhang M. **Maspin plays an essential role in early embryonic development.** *Development* 2004; 131: 1479-89.

450. Ngamkitidechakul C, Burke JM, O'Brien WJ, Twining SS. **Maspin: synthesis by human cornea and regulation of in vitro stromal cell adhesion to extracellular matrix.** Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 3135-41.
451. Cella N, Contreras A, Latha K, Rosen JM, Zhang M. **Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells.** FASEB J 2006; 20: 1510-2.
452. Seftor RE, Seftor EA, Sheng S, Pemberton PA, Sager R, Hendrix MJ. **Maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma.** Cancer Res 1998; 58: 5681-5.
453. Yin S, Lockett J, Meng Y, et al. **Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system.** Cancer Res 2006; 66: 4173-81.
454. Biliran H Jr, Sheng S. **Pleiotropic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin.** Cancer Res 2001; 61: 8676-82.
455. McGowen R, Biliran H Jr, Sager R, Sheng S. **The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin.** Cancer Res 2000; 60: 4771-8.
456. Odero-Marah VA, Khalkhali-Ellis Z, Chunthapong J, et al. **Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells.** Cancer Biol Ther 2003; 2: 398-403.
457. Shi HY, Stafford LJ, Liu Z, Liu M, Zhang M. **Maspin controls mammary tumor cell migration through inhibiting Rac1 and Cdc42, but not the RhoA GTPase.** Cell Motil Cytoskeleton 2007; 64: 338-46.
458. Sheng S. **The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer.** Front Biosci 2004; 9: 2733-45.
459. Shao ZM, Nguyen M, Alpaugh ML, O'Connell JT, Barsky SH. **The human myoepithelial cell exerts antiproliferative effects on breast carcinoma cells characterized by p21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis.** Exp Cell Res 1998; 241: 394-403.
460. Shi HY, Zhang W, Liang R, et al. **Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm.** Histol Histopathol 2003; 18: 201-6.

461. Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N. **Maspin is an angiogenesis inhibitor.** *Nat Med* 2000; 6: 196-9.
462. Chen EI, Florens L, Axelrod FT, et al. **Maspin alters the carcinoma proteome.** *FASEB J* 2005; 19: 1123-4.
463. Toillon RA, Lagadec C, Page A, et al. **Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin.** *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1239-47.
464. Amir S, Margaryan NV, Odero-Marah V, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. **Maspin regulates hypoxia-mediated stimulation of uPA/uPAR complex in invasive breast cancer cells.** *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 400-6.
465. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. **Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth.** *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 613-20.
466. Sharma G, Mirza S, Parshad R, et al. **Clinical significance of Maspin promoter methylation and loss of its protein expression in invasive ductal breast carcinoma: correlation with VEGF-A and MTA1 expression.** *Tumour Biol* 2011; 32: 23-32.
467. Song SY, Lee SK, Kim DH, et al. **Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density.** *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1831-5.
468. Terashima M, Maesawa C, Oyama K, et al. **Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis.** *Br J Cancer* 2005; 92: 1130-6.
469. Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. **Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer.** *World J Gastroenterol* 2004; 10: 634-7.
470. Goulet B, Chan G, Chambers AF, Lewis JD. **An emerging role for the nuclear localization of maspin in the suppression of tumor progression and metastasis.** *Biochem Cell Biol* 2012; 90: 22-38.
471. Burgess AW, Cho H-S, Eigenbrot, et al. **An open and shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors.** *Molecular Cell* 2003; 12: 541-52.

472. Barbacci EG, Guarino BC, Stroh JG, et al. **The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding.** J Biol Chem 1995; 270: 9585-9.
473. Nair P. **Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression.** Current Science 2005; 88: 890-8.
474. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. **The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3.** Exp Cell Res 2003; 284: 54-65.
475. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, et al. **The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors.** Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 4995-5000.
476. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, et al. **Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab.** Nature 2003; 421: 756-60.
477. Garrett TP, McKern NM, Lou M, et al. **The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors.** Mol Cell 2003; 11: 495-505.
478. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. **The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.** EMBO J 2000; 19: 3159-67.
479. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. **The HER2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target for therapy.** The Oncologist 2003; 8: 307-25
480. <http://www.tissuepathology.com/weblog/2012/09/can-2007-ascocap-scoring-guidelines-for-her2-protein-expression-and-gene-amplification-be-applied-to-1>.
481. Eisenhauer EA. **From the molecule to the clinic--inhibiting HER2 to treat breast cancer.** N Engl J Med 2001; 344: 841-2.
482. Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. **HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.** Cancer Treat Rev 2009; 35: 121-36.
483. Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. **Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts.** Nature 1981; 290: 261-4.

484. Shih C, Shilo BZ, Goldfarb MP, Dannenberg A, Weinberg RA. **Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin.** Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 5714-8.
485. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. **HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.** Mol Cell Biol 2001; 21: 3995-4004.
486. Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. **Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens.** J Clin Oncol 2002; 20: 3095-105.
487. Pauletti G, Dandekar S, Rong H, et al. **Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry.** J Clin Oncol 2000; 18: 3651-64.
488. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, et al. **HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations.** J Natl Compr Canc Netw 2006; 4 Suppl 3: S1-22.
489. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** Science 1987; 235: 177-82.
490. Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al. **A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.** Mol Cell Biol 1996; 16: 5276-87.
491. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. **ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.** EMBO J 1997; 16: 1647-55.
492. Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE. **Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is**

- cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2.** Mol Cell Biol 1995; 15: 6496-505.
493. Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. **Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling.** Mol Cell Biol 1995; 15: 1182-91.
494. Foy KC, Liu Z, Phillips G, Miller M, Kaumaya PT. **Combination treatment with HER-2 and VEGF peptide mimics induces potent anti-tumor and anti-angiogenic responses in vitro and in vivo.** J Biol Chem 2011; 286: 13626-37.
495. Hynes NE, Stern DF. **The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer.** Biochim Biophys Acta 1994; 1198: 165-84.
496. Scholl S, Beuzeboc P, Pouillart P. **Targeting HER2 in other tumor types.** Ann Oncol 2001; 12 Suppl 1: S81-7.
497. Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. **Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues.** Oncogene 1990; 5: 953-62.
498. Niehans GA, Singleton TP, Dykoski D, Kiang DT. **Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites.** J Natl Cancer Inst 1993; 85: 1230-5.
499. Mimura K, Kono K, Hanawa M, et al. **Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma.** Br J Cancer 2005; 92: 1253-60.
500. Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. **HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients.** J Clin Oncol 2006; 24: 2376-85.
501. Yano T, Doi T, Ohtsu A, et al. **Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer.** Oncol Rep 2006; 15: 65-71.
502. Cirisano FD, Karlan BY. **The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers.** J Soc Gynecol Investig 1996; 3: 99-105.
503. Berchuck A, Rodriguez G, Kinney RB, et al. **Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease.** Am J Obstet Gynecol 1991; 164: 15-21.

504. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, et al. **p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival.** *Cancer Res* 1990; 50: 5184-7.
505. Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, et al. **HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer.** *Ann Oncol* 2010; 21: 955-60.
506. <http://trialx.com/curetalk/wp-content/blogs.dir/7/files/2012/02/HER-signaling.jpg>.
507. Smith I, Procter M, Gelber RD, et al. **2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2007; 369: 29-36.
508. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. **Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.** *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
509. Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. **Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review.** *J Clin Oncol* 2010; 28: 92-8.
510. Le XF, Mao W, Lu C, et al. **Specific blockade of VEGF and HER2 pathways results in greater growth inhibition of breast cancer xenografts that overexpress HER2.** *Cell Cycle* 2008; 7: 3747-58.
511. Le XF, McWatters A, Wiener J, Wu JY, Mills GB, Bast RC Jr. **Anti-HER2 antibody and heregulin suppress growth of HER2-overexpressing human breast cancer cells through different mechanisms.** *Clin Cancer Res* 2000; 6: 260-70.
512. Lane HA, Motoyama AB, Beuvink I, Hynes NE. **Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling.** *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1: S21-2.
513. Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. **Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action.** *Cancer Res* 2002; 62: 4132-41.
514. Le XF, Claret FX, Lammayot A, et al. **The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell**

- cycle arrest and tumor growth inhibition.** J Biol Chem 2003; 278: 23441-50.
515. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. **PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients.** Cancer Cell 2004; 6: 117-27.
516. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. **Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.** J Clin Oncol 1999; 17: 2639-48.
517. **Οι HER υποδοχείς και ο ρόλος του Trastuzumab.** Από: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/568/845/era568845.fig1.jpg&w=540&h=579&ei=D5X2UJ7SFKG30QWJyIGYDQ&zoom=1&iact=rc&dur=238&sig=100926890728340017982&page=1&tbnh=148&tbnw=138&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:4,s:0,i:91&tx=96&ty=57>.
518. Wen XF, Yang G, Mao W, et al. **HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy.** Oncogene 2006; 25: 6986-96.
519. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. **Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail.** Nature 2002; 416: 279-80.
520. Spiridon CI, Guinn S, Vitetta ES. **A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F(ab')₂ fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies.** Clin Cancer Res 2004; 10: 3542-51.
521. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. **Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer.** J Clin Oncol 2002; 20: 719-26.
522. Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, et al. **Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor.** Clin Cancer Res 2010; 16: 2688-95.

523. Lin NU, Diéras V, Paul D, et al. **Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer.** Clin Cancer Res 2009; 15: 1452-9.
524. Burstein HJ, Sun Y, Dirix LY, et al. **Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer.** J Clin Oncol 2010; 28: 1301-7.
525. Smaill JB, Palmer BD, Rewcastle GW, et al. **Tyrosine kinase inhibitors. 15. 4-(Phenylamino)quinazoline and 4-(phenylamino)pyrido[d]pyrimidine acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor.** J Med Chem 1999; 42: 1803-15.
526. Mass RD, Press MF, Anderson S, et al. **Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab.** Clin Breast Cancer 2005; 6: 240-6.
527. **FDA/CBER Clinical Review; Trastuzumab (Herceptin)** November 05, 2001; Oncologic Drugs Advisory Committee.
528. Untch M, Muscholl M, Tjulandin S, et al. **First-line trastuzumab plus epirubicin and cyclophosphamide therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: cardiac safety and efficacy data from the Herceptin, Cyclophosphamide, and Epirubicin (HERCULES) trial.** J Clin Oncol 2010; 28: 1473-80.
529. Ishida T, Kiba T, Takeda M, et al. **Phase II study of capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy in patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers resistant to both anthracyclines and taxanes.** Cancer Chemother Pharmacol 2009; 64: 361-9.
530. Capri G, Chang J, Chen SC, et al. **An open-label expanded access study of lapatinib and capecitabine in patients with HER2-overexpressing locally advanced or metastatic breast cancer.** Ann Oncol 2010; 21: 474-80.
531. Sutherland S, Ashley S, Miles D, et al. **Treatment of HER2-positive metastatic breast cancer with lapatinib and capecitabine in the lapatinib expanded access programme, including efficacy in brain metastases--the UK experience.** Br J Cancer 2010; 102: 995-1002.

532. Johnston S, Pippen J Jr, Pivot X, et al. **Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2009; 27: 5538-46.
533. Di Leo A, Gomez HL, Aziz Z, et al. **Phase III, double-blind, randomized study comparing lapatinib plus paclitaxel with placebo plus paclitaxel as first-line treatment for metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2008; 26: 5544-52.
534. Bousсен H, Cristofanilli M, Zaks T, DeSilvio M, Salazar V, Spector N. **Phase II study to evaluate the efficacy and safety of neoadjuvant lapatinib plus paclitaxel in patients with inflammatory breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010; 28: 3248-55.
535. Blackwell KL, Burstein HJ, Storniolo AM, et al. **Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010; 28: 1124-30.
536. Rugo HS, Chien AJ, Franco SX, et al. **A phase II study of lapatinib and bevacizumab as treatment for HER2-overexpressing metastatic breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 13-20.
537. Bezwodna WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M. **The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen.** *Cancer* 1991; 68: 867-72.
538. Elledge RM, Green S, Pugh R, et al. **Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study.** *Int J Cancer* 2000; 89: 111-7.
539. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. **Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study.** *J Clin Oncol* 1992; 10: 1284-91.

540. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. **Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases.** *J Clin Oncol* 2003; 21: 1973-9.
541. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. **Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype.** *J Clin Oncol* 2007; 25: 4772-8.
542. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R. **Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06.** *J Clin Oncol* 1988; 6: 1076-87.
543. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. **Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma.** *Cancer* 2005; 103: 2241-51.
544. Stendahl M, Rydén L, Nordenskjöld B, Jönsson PE, Landberg G, Jirström K. **High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4614-8.
545. Huseby RA, Ownby HE, Brooks S, Russo J. **Evaluation of the predictive power of progesterone receptor levels in primary breast cancer: a comparison with other criteria in 559 cases with a mean follow-up of 74.8 months. The Breast Cancer Prognostic Study Associates.** *Henry Ford Hosp Med J* 1990; 38: 79-84.
546. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, et al. **Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses.** *Cancer* 2003; 98: 1802-10.
547. Cui X, Schiff R, Arpino G, Osborne CK, Lee AV. **Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy.** *J Clin Oncol* 2005; 23: 7721-35.

548. Κιτράκη Ε, Τρούγκος Κ. **Βιολογία του καρκίνου**. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2006, σελ. 73-75.
549. Figlin RA, Brown E, Armstrong AJ, et al. **NCCN Task Force Report: mTOR inhibition in solid tumors**. J Natl Compr Canc Netw 2008; 6 Suppl 5: S1-20.
550. Fang J, Ding M, Yang L, Liu LZ, Jiang BH. **PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis**. Cell Signal 2007; 19: 2487-97.
551. Mayo LD, Donner DB. **A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus**. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 11598-603.
552. Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH. **Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia-inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling**. J Biol Chem 2004; 279: 45643-51.
553. Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, et al. **Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection**. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 4061-6.
554. Lu Y, Wahl LM. **Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKKalpha/NF-kappaB pathway**. J Leukoc Biol 2005; 78: 259-65.
555. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. **NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase**. Nature 1999; 401: 82-5.
556. Tanaka H, Fujita N, Tsuruo T. **3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling**. J Biol Chem 2005; 280: 40965-73.
557. Ispanovic E, Haas TL. **JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells**. Am J Physiol Cell Physiol 2006; 291: C579-88.

558. Shukla S, Maclennan GT, Hartman DJ, Fu P, Resnick MI, Gupta S. **Activation of PI3K-Akt signaling pathway promotes prostate cancer cell invasion.** *Int J Cancer* 2007; 121: 1424-32.
559. Mailleux AA, Overholtzer M, Schmelzle T, Bouillet P, Strasser A, Brugge JS. **BIM regulates apoptosis during mammary ductal morphogenesis, and its absence reveals alternative cell death mechanisms.** *Dev Cell* 2007; 12: 221-34.
560. Sheng S, Qiao M, Pardee AB. **Metastasis and AKT activation.** *J Cell Physiol* 2009; 218: 451-4.
561. Emerling BM, Weinberg F, Liu JL, Mak TW, Chandel NS. **PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a).** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 2622-7.
562. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. **The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism.** *Nat Rev Genet* 2006; 7: 606-19.
563. Quintero M, Brennan PA, Thomas GJ, Moncada S. **Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation.** *Cancer Res* 2006; 66: 770-4.
564. Wang FS, Kuo YR, Wang CJ, et al. **Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1alpha activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts.** *Bone* 2004; 35: 114-23.
565. Kim C, Bryant J, Horne Z, et al. **Trastuzumab sensitivity of breast cancer with co-amplification of HER2 and cMYC suggests pro-apoptotic function of dysregulated cMYC in vivo [abstract].** San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, TX, December 8-11, 2005; Abstract 46.
566. Park K, Kwak K, Kim J, Lim S, Han S. **c-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers.** *Hum Pathol* 2005; 36: 634-9.
567. Bischoff J, Ignatov A. **The Role of Targeted Agents in the Treatment of Metastatic Breast Cancer.** *Breast Care (Basel)* 2010; 5: 134-141.

568. Glück S, Arteaga CL, Osborne CK. **Optimizing chemotherapy-free survival for the ER/HER2-positive metastatic breast cancer patient.** Clin Cancer Res 2011; 17: 5559-61.
569. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. **Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance.** Endocr Rev 2008; 29: 217-33.
570. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. **Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med 2005; 353: 1673-84.
571. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. **Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med 2005; 353: 1659-72.
572. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. **Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer.** Ann Oncol 2007; 18: 977-84.
573. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, et al. **A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer.** Cancer Cell 2007; 12: 395-402.
574. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. **PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients.** Cancer Cell 2004; 6: 117-27.
575. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, et al. **Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers.** J Clin Oncol 2011; 29: 166-73.
576. Wang L, Zhang Q, Zhang J, et al. **PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib.** BMC Cancer 2011; 11: 248.
577. Kodack DP, Chung E, Yamashita H, et al. **Combined targeting of HER2 and VEGFR2 for effective treatment of HER2-amplified breast cancer brain metastases.** Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: E3119-27.

578. Alessi P, Leali D, Camozzi M, Cantelmo A, Albini A, Presta M. **Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist.** *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 225-34.
579. Ueda S, Basaki Y, Yoshie M, et al. **PTEN/Akt signaling through epidermal growth factor receptor is prerequisite for angiogenesis by hepatocellular carcinoma cells that is susceptible to inhibition by gefitinib.** *Cancer Res* 2006; 66: 5346-53.
580. Shi YH, Bingle L, Gong LH, Wang YX, Corke KP, Fang WG. **Basic FGF augments hypoxia induced HIF-1-alpha expression and VEGF release in T47D breast cancer cells.** *Pathology* 2007; 39: 396-400.
581. Ali S, Coombes RC. **Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance.** *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 101-12.
582. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Mohsin SK, Osborne CK. **Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance.** *Clin Cancer Res* 2004; 10: 331S-6S.
583. Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, et al. **Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer.** *Breast Cancer* 2006; 13: 137-44.
584. Lipton A, Leitzel K, Ali SM, et al. **Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy.** *Cancer* 2005; 104: 257-63.
585. Leary AF, Drury S, Detre S, et al. **Lapatinib restores hormone sensitivity with differential effects on estrogen receptor signaling in cell models of human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with acquired endocrine resistance.** *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1486-97.
586. Mayer IA, Arteaga CL. **Does lapatinib work against HER2-negative breast cancers?** *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1355-7.
587. Cardoso F, Castiglione M; ESMO Guidelines Working Group. **Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2009; 20 Suppl 4: 15-8.

588. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. **Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009.** *Ann Oncol* 2009; 20: 1319-29.
589. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, et al. **High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer.** *Cancer Res* 2001; 61: 5407-14.
590. Gasparini G, Toi M, Miceli R, et al. **Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy.** *Cancer J Sci Am* 1999; 5: 101-11.
591. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R. **Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment.** *J Clin Oncol* 2000; 18: 1423-31.
592. Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, et al. **The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo.** *Br J Cancer* 2000; 83: 63-8.
593. Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R. **Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer?** *Br J Cancer* 1999; 81: 727-32.
594. Geng L, Donnelly E, McMahon G, et al. **Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy.** *Cancer Res* 2001; 61: 2413-9.
595. Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. **Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol.** *Cancer Res* 1997; 57: 81-6.
596. Kazi AA, Koos RD. **Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.** *Endocrinology* 2007; 148: 2363-74.

597. Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Härkönen PL. **Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells.** *Mol Cell Endocrinol* 1999; 149: 29-40.
598. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. **Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10972-7.
599. McNamara DA, Harmey J, Wang JH, Kay E, Walsh TN, Bouchier-Hayes DJ. **Tamoxifen inhibits endothelial cell proliferation and attenuates VEGF-mediated angiogenesis and migration in vivo.** *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 714-8.
600. Garvin S, Nilsson UW, Dabrosin C. **Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells.** *Br J Cancer* 2005; 93: 1005-10.
601. Morena AM, Oshima CT, Gebrim LH, et al. **Early nuclear alterations and immunohistochemical expression of Ki-67, Erb-B2, vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor (TGF-beta1) and integrine-linked kinase (ILK) two days after tamoxifen in breast carcinoma.** *Neoplasma* 2004; 51: 481-6.
602. Hyder SM. **Sex-steroid regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 667-87.
603. Silva ID, Salicioni AM, Russo IH, Higgy NA, Gebrim LH, Russo J. **Tamoxifen down-regulates CD36 messenger RNA levels in normal and neoplastic human breast tissues.** *Cancer Res* 1997; 57: 378-81.
604. Nie D, Honn KV. **Eicosanoid regulation of angiogenesis in tumors.** *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 119-25.
605. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. **Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1055-61.
606. Santini D, Vincenzi B, Dicuonzo G, et al. **Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2893-7.
607. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. **Tumour biology: hereptin acts as an anti-angiogenic cocktail.** *Nature* 2002; 416: 279-80.

608. Maass N, Teffner M, Rösel F, et al. **Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast.** J Pathol 2001; 195: 321-6.
609. Kröger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, et al. **Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients.** Clin Cancer Res 2006; 12: 159-68.
610. Bailey CM, Margaryan NV, Abbott DE, et al. **Temporal and spatial expression patterns for the tumor suppressor Maspin and its binding partner interferon regulatory factor 6 during breast development.** Dev Growth Differ 2009; 51: 473-81.
611. Kavoura E, Gakiopoulou H, Paraskevskou H, et al. **Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephritic syndrome.** Hum Pathol 2011; 42: 227-35.
612. **Image-Pro® Plus, Version 6.0 for Windows™. Start-Up Guide.** Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, Maryland, USA, 2005.
613. Navarro Rde L, Martins MT, de Araújo VC. **Maspin expression in normal and neoplastic salivary gland.** J Oral Pathol Med 2004; 33: 435-40.
614. Maass N, Hojo T, Ueding M, et al. **Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers.** Clin Cancer Res 2001; 7: 812-7.
615. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. **Maspin expression in normal lung and non-small-cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation.** Oncogene 2004; 23: 4041-9.
616. Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, et al. **Maspin expression is directly associated with biological aggressiveness of thyroid carcinoma.** Thyroid 2004; 14: 13-8.
617. Rose SL, Fitzgerald MP, White NO, et al. **Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells.** Gynecol Oncol 2006; 102: 319-24.
618. Bolat F, Gumurdulu D, Erkanli S, et al. **Maspin overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial**

- growth factors A, C, and D in human ovarian carcinoma.** *Pathol Res Pract* 2008; 204: 379-87.
619. Chua R, Setzer S, Govindarajan B, Sexton D, Cohen C, Arbiser JL. **Maspin expression, angiogenesis, prognostic parameters, and outcome in malignant melanoma.** *J Am Acad Dermatol* 2009; 60: 758-66.
620. Frey A, Soubani AO, Adam AK, Sheng S, Pass HI, Lonardo F. **Nuclear, compared with combined nuclear and cytoplasmic expression of maspin, is linked in lung adenocarcinoma to reduced VEGF-A levels and in Stage I, improved survival.** *Histopathology* 2009; 54: 590-7.
621. Gurzu S, Szentirmay Z, Toth E, Jung I. **Possible Predictive Value of Maspin Expression in Colorectal Cancer.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
622. Ma Y, Peng ZL. **Expression of maspin and its relation to tumor vascularization in epithelial ovarian cancer.** *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2009; 40: 223-7.
623. Zhang L, Tang ZG, Zhou ZG, Tong XJ, Li XL. **The expression of Maspin and VEGF gene in oral squamous cell carcinoma and its significance.** *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2005; 14: 557-60.
624. Turunc T, Bal N, Dirim A, Kuzgunbay B, Gul U, Ozkardes H. **Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters.** *Urology* 2010; 76: 765.e8-13.
625. Li JJ, Chen Y, Zhang SM, Wu DY, Wang YP, Xin Y. **Pathobiological significance of vascular endothelial growth factor and Maspin expressions in human gastric carcinoma.** *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2624-7.
626. Zhang M, Sheng S, Maass N, Sager R. **mMaspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility.** *Mol Med* 1997; 3: 49-59.
627. Hopkins PC, Whisstock J. **Function of maspin.** *Science* 1994; 265: 1893-4.
628. Zou Z, Gao C, Nagaich AK, et al. **p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin.** *J Biol Chem* 2000; 275: 6051-4.

629. Hojo T, Akiyama Y, Nagasaki K, et al. **Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues.** *Cancer Lett* 2001; 171: 103-10.
630. Umekita Y, Yoshida H. **Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma.** *Histopathology* 2003; 42: 541-5.
631. Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y, Yoshida H. **Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients.** *Int J Cancer* 2002; 100: 452-5.
632. Kim DH, Yoon DS, Dooley WC, et al. **Association of maspin expression with the high histological grade and lymphocyte-rich stroma in early-stage breast cancer.** *Histopathology* 2003; 42: 37-42.
633. Tsoli E, Tsantoulis PK, Papalambros A, et al. **Simultaneous evaluation of maspin and CXCR4 in patients with breast cancer.** *J Clin Pathol* 2007; 60: 261-6.
634. Lee MJ, Suh CH, Li ZH. **Clinicopathological significance of maspin expression in breast cancer.** *J Korean Med Sci* 2006; 21: 309-14.
635. Maass N, Hojo T, Rösel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. **Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis.** *Clin Biochem* 2001; 34: 303-7.
636. Vecchi M, Confalonieri S, Nuciforo P, et al. **Breast cancer metastases are molecularly distinct from their primary tumors.** *Oncogene* 2008; 27: 2148-58.
637. Zhang M. **Toward re-expressing tumor suppressor gene maspin in breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2002; 3: 353-4.
638. Umekita Y, Ohi Y, Souda M, et al. **Maspin expression is frequent and correlates with basal markers in triple-negative breast cancer.** *Diagn Pathol* 2011; 6: 36.
639. Liu T, Pemberton PA, Robertson AD. **Three-state unfolding and self-association of maspin, a tumor-suppressing serpin.** *J Biol Chem* 1999; 274: 29628-32.
640. Machtens S, Serth J, Bokemeyer C, et al. **Expression of the p53 and Maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features.** *Int J Cancer* 2001; 95: 337-42.

641. Mohsin SK, Zhang M, Clark GM, Craig Allred D. **Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors.** *J Pathol* 2003; 199:432-5.
642. Joensuu KM, Leidenius MH, Andersson LC, Heikkilä PS. **High expression of maspin is associated with early tumor relapse in breast cancer.** *Hum Pathol* 2009; 40: 1143-51.
643. Goulet B, Kennette W, Ablack A, et al. **Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis.** *Lab Invest* 2011; 91: 1181-7.
644. McGowan S, Buckle AM, Irving JA, et al. **X-ray crystal structure of MENT: evidence for functional loop-sheet polymers in chromatin condensation.** *EMBO J* 2006; 25: 3144-55.
645. Beck AH, Espinosa I, Edris B, et al. **The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2009; 15: 778-87.
646. Ariazi EA, Clark GM, Mertz JE. **Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer.** *Cancer Res* 2002; 62: 6510-8.
647. Riggins RB, Mazzotta MM, Maniya OZ, Clarke R. **Orphan nuclear receptors in breast cancer pathogenesis and therapeutic response.** *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: R213-31.
648. Stein RA, Chang CY, Kazmin DA, et al. **Estrogen-related receptor alpha is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer.** *Cancer Res* 2008; 68: 8805-12.
649. Stein RA, Gaillard S, McDonnell DP. **Estrogen-related receptor alpha induces the expression of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 114: 106-12.
650. Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguère V, Kralli A. **Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1418-23.
651. Tremblay AM, Giguère V. **The NR3B subgroup: an overview.** *Nucl Recept Signal* 2007; 5: e009.
652. Sun P, Sehoul J, Denkert C, et al. **Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new**

- tumor biomarkers in ovarian cancer cells.** *J Mol Med (Berl)* 2005; 83: 457-67.
653. Beltran AS, Blancafort P. **Reactivation of MASPIN in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells by artificial transcription factors (ATFs).** *Epigenetics* 2011; 6: 224-35.
654. Solomon LA, Munkarah AR, Schimp VL, et al. **Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer.** *Gynecol Oncol* 2006; 101: 385-9.
655. Yin S, Lockett J, Meng Y, et al. **Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system.** *Cancer Res* 2006; 66: 4173-81.
656. Bircan A, Bircan S, Kapucuoglu N, Songur N, Ozturk O, Akkaya A. **Maspin, VEGF and p53 expression in small biopsies of primary advanced lung cancer and relationship with clinicopathologic parameters.** *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 553-61.
657. Nakagawa M, Katakura H, Adachi M, et al. **Maspin expression and its clinical significance in non-small cell lung cancer.** *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1517-23.
658. Takanami I, Abiko T, Koizumi S. **Expression of maspin in non-small-cell lung cancer: correlation with clinical features.** *Clin Lung Cancer* 2008; 9: 361-6.
659. Katakura H, Takenaka K, Nakagawa M, et al. **Maspin gene expression is a significant prognostic factor in resected non-small cell lung cancer (NSCLC).** *Maspin in NSCLC. Lung Cancer* 2006; 51: 323-8.
660. Cho JH, Kim HS, Park CS, et al. **Maspin expression in early oral tongue cancer and its relation to expression of mutant-type p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF).** *Oral Oncol* 2007; 43: 272-7.
661. Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, et al. **ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2006; 66: 2028-37.

662. Loureiro RM, Maharaj AS, Dankort D, Muller WJ, D'Amore PA. **ErbB2 overexpression in mammary cells upregulates VEGF through the core promoter.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 455-65.
663. Rugo HS. **Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data.** *Oncologist* 2004; 9 Suppl 1: 43-9.
664. Yang W, Klos K, Yang Y, Smith TL, Shi D, Yu D. **ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma.** *Cancer* 2002; 94: 2855-61.