



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Β ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΛΑΪΚΟ ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΚΟΥΡΑΚΛΗΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ CD146
(MCAM) ΚΑΙ ΝΕΣΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ
ΒΑΣΙΣΜΕΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.

ΤΑΜΠΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΙΑΤΡΟΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2015

“Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα”
(Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του νόμου 1268/82, σε συνδυασμό με τις διατάξεις του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202 παράγραφος 2 του νόμου 5343)

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 21 /02/2011 (αριθ. Πρωτ. 5744)

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:** 05/07/2011 (αριθ. Πρωτ. 9514)

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Γρηγόριος Κουράκλης, Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ, Επιβλέπων.

Κωνσταντίνος Κόντζογλου, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής
ΕΚΠΑ.

Αφροδίτη Νόννη, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογοανατομικής ΕΚΠΑ.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 22/06/2012 (αριθ. Πρωτ.
8594)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 14/12/2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ:

Καθηγητής Πέτρος Σφηκάκης

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Ευστράτιος Πατσούρης, Καθηγητής Παθολογοανατομίας ΕΚΠΑ

Μιχάλης Κουτσιλιέρης, Καθηγητής Φυσιολογίας ΕΚΠΑ

Δημήτριος Μαντάς, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Μιχάλης Κοντός, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής ΕΚΠΑ

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΤΟΝ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΕΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΠΑΝΔΕΙΑ ΚΑΙ Ε' ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΥΣ ΤΗΝ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΤΟΥΣ, ΝΑ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΑΥΤΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΣΕ ΑΥΤΗ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΚΟ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΜΟΙΡΑΣΤΩ ΜΑΖ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΨΗΜΑΤΑ ΜΟΥ ΑΝ ΕΧΕΙ ΑΝΑΡΧΗ ΦΡΟΝΤΙΔΕ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥΣ ΚΙΟΥΣ ΜΕ Τ' ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΑΜΟΙΒΗ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΚΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΓΑΡΑΓΓΕΛΙΣ, ΟΔΗΓΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΟΛΗ ΤΗΝ ΥΠΟΛΟΙΠΗ ΓΝΩΣΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΕΚΕΙΝΟΥ ΠΟΥ ΜΕ ΔΙΔΑΣΕ ΚΑΙ ΕΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΕΙ ΤΡΑΠΗΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΚΑΙ Ε' ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΟΡΚΙΣΘΕΙ ΕΤΟΝ ΙΑΤΡΙΚΟ ΝΟΜΟ ΚΑΙ ΕΕ ΚΑΝΕΝΑΝ ΑΛΛΟ ΚΑΙ ΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΗ ΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΡΟΤΕ, ΕΚΟΥΣΙΩΣ, ΝΑ ΤΟΥΣ ΒΛΑΨΩ 'Η ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΕΣΤΩ ΚΙ ΑΝ ΜΟΥ ΤΟ ΖΗΤΗΣΕΙ, ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ, ΟΥΤΕ ΝΑ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΟΜΟΙΩΣ, ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ Ν' ΑΠΟΒΑΛΕΙ. ΝΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΔΕ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΙ ΑΓΝΗ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΓΟ ΛΙΘΟΥΣ ΑΛΛΑ Ν' ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΔΙΚΟΥΣ. ΚΑΙ Ε' ΟΠΟΙΑ ΣΠΙΤΙΑ ΚΙ ΑΝ ΜΠΩ, ΝΑ ΜΠΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟΦΕΥΓΟΝΤΑΣ ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑΙ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΕΝΕΤΗΣΙΑ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΜΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ. ΚΑΙ ΟΤΙ ΔΩ 'Η ΑΚΟΥΣΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΚΗΝ ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ, 'Η ΚΙ' ΕΚΤΟΣ, ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΠΟΙΗΘΕΙ, ΝΑ ΣΙΩΠΗΣΩ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΜΥΕΤΙΚΟ. ΑΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΑΦΕΤΗΣΩ, ΕΙΘΕ Ν' ΑΠΟΛΔΥΣΩ ΓΙΑ ΠΑΝΤΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΑΦΕΤΗΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΝΑ ΥΠΟΣΤΩΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ.

Στους λατρεμένους μου γονείς, Νίκη και Γιάννη.

Στον αδελφό μου Θάνο.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πέντε χρόνια προσπάθειας οδήγησαν στο σύγγραμμα που κρατάτε στα χέρια σας. Η δουλειά αυτή υπογράφεται ως είθισται από ένα μόνο άτομο, σαφέστατα όμως, μερίδιο κατέχουν και όλοι οι άνθρωποι οι οποίοι βοήθησαν, συμβούλεψαν, συνεργάστηκαν και διαμόρφωσαν το κατάλληλο περιβάλλον ώστε να καταστεί εφικτή η υλοποίησή της. Κατά συνέπεια, ένα ευχαριστώ είναι το λιγότερο που μπορώ να προσφέρω σε αυτούς τους ανθρώπους

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Β΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Λαϊκό, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής Δρ. Γρηγόριο Κουράκλη, κατά τη χρονική περίοδο 2011-2015. Για την ολοκλήρωσή της, συνεργάστηκαν επίσης το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμότες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητή Δρ. Γρηγόριο Κουράκλη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ'όλο το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας, τη συνεχή και ουσιαστική καθοδήγησή του, την πολύπλευρη στήριξη που μου παρείχε, την αμέριστη συμπαράσταση και πίστη του στην εκπονηθείσα μελέτη και την σημαντική προσφορά της αλλά κυρίως την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί του όσο και με το επιστημονικό προσωπικό της Β΄ Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής.

Ακόμα ευχαριστώ εκ' βάθους καρδιάς τον Αναπληρωτή καθηγητή της Β Προπαιδευτικής Κλινικής στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Λαϊκό Δρ. Κωνσταντίνο Κόντζογλου για την στήριξη που μου παρείχε, τις υπερπολύτιμες συμβουλές του και τη σημαντική του βοήθεια και συμβολή στην επιτυχή περάτωση της παρούσης διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Αφροδίτη Νόννη για την ιδιαίτερα σημαντική συμμετοχή της και

συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράστασή της.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής και Διευθυντή του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Δρ. Ευστράτιο Πατσούρη για την γενικότερη βοήθεια και έμπρακτη υποστήριξή του μέσω της διάθεσης του εξοπλισμού του Εργαστηρίου, χωρίς τον οποίο η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν δυνατή.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον αδελφό μου Θάνο, την κρυφή μου δύναμη, για τη συμβολή του στη διεκπεραίωση των στατιστικών αναλύσεων που παρουσιάζονται εντός της παρούσης διατριβής, αλλά και των αναλύσεων που δημοσιεύθηκαν ή παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Ακόμη ένα πολύ μεγάλω ευχαριστώ στους πολυαγαπημένους μου γονείς Νίκη και Γιάννη, για την ατέλειωτη προσφορά τους, τη διαχρονική υποστήριξη και την αγάπη που μου έχουν προσφέρει. Τα λόγια είναι λίγα για να εκφράσω τη σημασία που έχει για μένα η στήριξη και η πίστη προς τις επιλογές μου που αισθάνομαι από την οικογένειά μου, χωρίς την οποία δεν θα είχα καταφέρει τίποτα στη ζωή μου.

“Ουκ ενί δυνατόν ιατρικήν ειδέναι όστις μή οίδεν ό,τι έστιν άνθρωπος.”
Ιπποκράτης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	2
ΌΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	3
ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	14
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	24
ABSTRACT	27
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
1.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	29
1.1.1. Δομές του μαστού	29
1.1.2. Αιμάτωση	33
1.1.3. Νεύρωση	33
1.1.4. Λεμφαγγεία	33
1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	34
1.2.1. Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού.	34
1.2.2. Παράγοντες κινδύνου και γενετική του καρκίνου του μαστού.	36
1.2.2.1. Γενετική προδιάθεση-Κληρονομικός καρκίνος του μαστού.	36
1.2.2.2 Παράγοντες κινδύνου. Βιολογικοί παράγοντες.	39
1.2.2.3.Μικροπεριβαλλοντικοί και μακροπεριβαλλοντικοί παράγοντες.	49
1.2.3. Προληπτικός έλεγχος για τον καρκίνο του μαστού.	51
1.2.3.1. Κλινική εξέταση μαστού.	51
1.2.3.2. Μαστογραφία	51
1.2.3.3. Νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι.	59
1.2.3.3.1. Βιοψία	60
1.2.3.3.2. Η σημασία της FNA.	62
1.2.3.3.3. Χειρουργική βιοψία μαστού - Προεγχειρητικός εντοπισμός με	63

βελόνη υπό μαστογραφική καθοδήγηση. Βιοψία έπειτα από εντοπισμό με συρμάτινο οδηγό.	
1.2.4. Ιστολογική κατάταξη.	64
1.2.5. Ταξινόμηση και μοριακή βιολογία του καρκίνου του μαστού.	80
1.2.6. Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού- Ιστοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες.	89
1.3. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΝΕΣΤΙΝΗ	93
1.3.1. Ο κυτταροσκελετός.	93
1.3.1.1. Εισαγωγικά στοιχεία.	93
1.3.1.2. Κυτταροσκελετός των ενδιάμεσων ινιδίων.	94
1.3.1.3. Δομή των ενδιάμεσων ινιδίων.	95
1.3.1.4. Συγκρότηση ινιδίων.	97
1.3.1.5. Μηχανισμοί ρύθμισης.	97
1.3.1.6. Λειτουργίες των ενδιάμεσων ινιδίων.	98
1.3.1.7. Ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις των ενδιάμεσων ινιδίων.	98
1.3.2. Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης νεστίνης- Τελευταίες μελέτες.	99
1.3.3. Έκφραση της νεστίνης σε φυσιολογικούς ιστούς, σε φλεγμονή και στον καρκίνο.	102
1.3.3.1. Έκφραση της νεστίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα.	105
1.3.3.2. Έκφραση της νεστίνης στους νεφρούς.	107
1.3.3.3. Έκφραση της νεστίνης στο πάγκρεας.	108
1.3.3.4. Έκφραση της νεστίνης στο γαστρεντερικό σύστημα.	111
1.3.3.5. Έκφραση της νεστίνης στο ανθρώπινο κόλον.	112
1.3.3.6. Έκφραση της νεστίνης σε GISTs, GCTs και νευρινώματα.	113
1.3.3.7. Έκφραση της νεστίνης στον καρκίνο του προστάτη.	114
1.3.3.8. Έκφραση της νεστίνης στον μαστό.	114
1.3.3.9. Έκφραση της νεστίνης στον καρκίνο του ήπατος.	116

1.3.3.10. Έκφραση της νεστίνης σε αγγειακά ενδοθηλιακά κυτταρα και αγγειογένεση.	117
1.3.3.11. Συμπεράσματα και προοπτικές.	118
1.4. CD146 / MCAM: ΜΟΡΙΟ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕΛΑΝΩΜΑΤΟΣ.	125
1.4.1. Λειτουργία του CD146 (MCAM).	125
1.4.2. Κλινική σημασία του δείκτη CD146 (MCAM).	126
1.4.3. Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF). Περιγραφή και δράση του VEGF.	132
1.4.4. Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT-Epithelial to mesenchymal transition) – CD146 – Μεταστατικό δυναμικό επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων.	134
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	143
2.1. ΣΚΟΠΟΣ	144
2.2. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ	145
2.2.1. Πληθυσμός ασθενών	145
2.2.2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνης και του δείκτη CD146 σε ιστολογικά παρασκευάσματα μαζικού αδένου.	145
2.2.3. Ανάλυση δεδομένων.	146
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	148
2.3.1. Αριθμός ασθενών για κάθε ανοσοφαινότυπο του δείγματος.	148
2.3.2. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με μοριακούς υποτύπους τριπλά αρνητικό, HER2 θετικό, αυλικού τύπου Β και αυλικού τύπου Α.	149
2.3.3. Περαιτέρω αναλύσεις επιδημιολογικών στοιχείων στον υπό μελέτη πληθυσμό.	150
2.3.4. Αποτελέσματα όσον αφορά το ολικό δείγμα των ασθενών μας (N=141).	156
2.3.4.1. Έκφραση της πρωτεΐνης νεστίνης στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον	156

διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.	
2.3.4.2. Έκφραση του δείκτη CD146 (MCAM) στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.	159
2.3.4.3. Έκφραση του δείκτη P53 στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.	161
2.3.4.4. Έκφραση της νεστίνης στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο σε σύγκριση με τους ασθενείς με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.	163
2.3.4.5. Έκφραση του δείκτη CD146 στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο σε σύγκριση με την ομάδα με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.	165
2.3.4.6. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=137).	166
2.3.4.7. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου.	168
2.3.4.8. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση.	170
2.3.4.9. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση.	171
2.3.4.10. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=136).	173
2.3.4.11. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=136).	175
2.3.4.12. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=134).	177
2.3.4.13. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=134).	179
2.3.4.14. Μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την ηλικία των	181

ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).	
2.3.4.15. Μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).	184
2.3.4.16. Μελέτη της έκφρασης του p53 σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).	184
2.3.4.17. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).	185
2.3.4.18. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του δείκτη CD146 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).	187
2.3.4.19. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του δείκτη p53 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).	190
2.3.5. Αποτελέσματα στο δείγμα των ασθενών με τον τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).	191
2.3.5.1. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).	191
2.3.5.2. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (N=42).	193
2.3.5.3. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας σε δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).	195
2.3.5.4. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στο δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).	197
2.3.5.5. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στον ιστό των ασθενών με τριπλά	198

αρνητικά υπότυπο (N=42).	
2.3.5.6. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).	200
2.3.5.7. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου στο δείγμα των ασθενών τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).	202
2.3.5.8. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας σε δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).	204
2.3.6. Επιβίωση και υποτροπή των ασθενών στα 5 έτη στο ολικό δείγμα αυτών.	205
2.3.6.1. Πενταετής επιβίωση του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης.	206
2.3.6.2. Πενταετής επιβίωση του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση του δείκτη CD146.	207
2.3.6.3. Εμφάνιση χρόνου υποτροπής στο πλαίσιο της πενταετούς παρακολούθησης του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης.	208
2.3.6.4. Εμφάνιση χρόνου υποτροπής στο πλαίσιο της πενταετούς παρακολούθησης του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση του CD146.	210
2.3.6.5. Ο δείκτης CD146 (MCAM) αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για τον χρόνο υποτροπής σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού P=0,037.	213
2.3.7. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ	215
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	221
2.4.1. CD146 (MCAM)	226
2.4.2. Νεστίνη	232
2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	238
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	244

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Ταμπάκη Αικατερίνη Χριστίνα

Ημερομηνία γέννησης: 23/11/1982

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη

Υπηκοότητα: Ελληνική

Διεύθυνση οικίας: Ελλήνων Πατριωτών 4B, 16233 Καρέας, Αθήνα

Τηλ: 6972074768, 210-7654011

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: actampaki@yahoo.com

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Εγκύκλιες Σπουδές

1994-2000

Απολυτήριο Γυμνασίου-Λυκείου. Ενιαίο Λύκειο Καρέα, Βαθμός Αποφοίτησης «Άριστα».

Προπτυχιακή Εδίκευση

2001-2006

Πενταετής φοίτηση, Σχολές Επιστημών Υγείας, Φαρμακευτική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Βαθμός Αποφοίτησης «Λίαν Καλώς».

05.2007

Άδεια ασκήσεως Φαρμακευτικού Επαγγέλματος: Νομαρχία Αθηνών.

2007-2014

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ruprecht-Karls Χαϊδελβέργης, Βάδη-Βυρτεμβέργη, Γερμανία, Βαθμός Αποφοίτησης «Καλώς».

08.2009

Πρώτες Κρατικές Πανγερμανικές Εξετάσεις προς συνέχιση και απόκτηση του πτυχίου Ιατρικής, Ruprecht Karls Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης. Staatsexamen, Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

04.2014

Δεύτερες Κρατικές Πανγερμανικές Εξετάσεις προς απόκτηση του πτυχίου Ιατρικής, Ruprecht Karls Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης. Staatsexamen, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

10.06.2014

Άδεια Ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος στη Γερμανία: Πανεπιστήμιο Χαϊδελβέργης, Κυβερνητικό Προεδρείο Στουτγκάρδης, Κρατίδιο Βάδης Βυρτεμβέργης/Universität Heidelberg, Deutsche Approbation als Ärztin zur Ausübung des ärztlichen Berufs vom Regierungspräsidium Stuttgart, Baden-Württemberg).

27.07.2014

Άδεια ασκήσεως του Ιατρικού Επαγγέλματος στην Ελλάδα, Νομαρχία Αθηνών.

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΕ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΑ
ΙΔΡΥΜΑΤΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΤΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΥ ΚΑΙ
ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ**

07.2005- 06.2006:

Ερευνητική απασχόληση στο Εργαστήριο Πειραματικής Ανοσολογίας της Δ΄ Παθολογικής Κλινικής, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών στα πλαίσια διπλωματικής εργασίας με τίτλο:

«Μεταβολές της έκφρασης του αντιγόνου βλαστοκυττάρων CD34 στο περιφερικό αίμα ασθενών με σήψη από πνευμονία του αναπνευστήρα ».

Βαθμός αξιολόγησης: Άριστα

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δ΄ Παθολογική Κλινική, Παν/κο Νοσοκομείο Αττικών, Ερευνητική ομάδα: Καθηγήτρια Διευθύντρια Ελένη Γιαμαρέλλου, επιβλέπον μέλος: Επίκουρος Καθηγητής Ευάγγελος Γιαμαρέλλος Μπουρμπούλης. Τριμελής εξεταστική επιτροπή: Καθηγητής Φαρμακευτικής Τεχνολογίας και πρόεδρος της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών Γεώργιος Θ. Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής καθηγητής Φαρμακευτικής Τεχνολογίας Δεμέτζος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Νικόλαος Δρακούλης.

20.08.2012-09.12.2012:

Πρακτική Άσκηση σε Έμμισθη θέση πλαστικής χειρουργικής στην Κλινική Πλαστικής και Επανορθωτικής Χειρουργικής, Χειρουργικής Άνω Χείρας και στο Κέντρο Εγκαυμάτων του Ludwigshafen, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ruprecht-Karls Χαϊδελβέργης. Διευθυντής κλινικής και καθηγητής: Ulrich Kneser

(PJ Tertial, Klinik für Hand-, Plastische und Rekonstruktive Chirurgie mit Schwerbrandverletzentzentrum der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Chefärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Kneser)

20.08.2012-09.12.2012:

Ερευνητική απασχόληση στην Κλινική Πλαστικής Χειρουργικής, Επανορθωτικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Άνω Χείρας και στο Κέντρο Εγκαυμάτων με θέμα «Προσθήκη Μοσχευμάτων Πλαστικής μετά από θερμικό τραύμα» (Κλινική και Στατιστική μελέτη). Ludwigshafen, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ruprecht-Karls Χαϊδελβέργης. Διευθυντής κλινικής και καθηγητής: Ulrich Kneser. (Klinik für Hand-, Plastische und Rekonstruktive Chirurgie mit Schwerbrandverletzentzentrum der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Ludwigshafen, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Chefärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Kneser)

20.01.2013 - 30.03.2013:

Πρακτική Άσκηση σε Έμμισθη θέση Πνευμονολογίας στην Πανεπιστημιακή Κλινική Πνευμονολογίας και Νοσημάτων Θώρακος, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ruprecht-Karls Χαϊδελβέργης. Διευθυντής καθηγητής: Felix Herth

(Innere Medizin PJ Tertial: Abteilung für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Thoraxklinik, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Chefärztlicher Direktor: Prof Dr Felix Herth)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Από 21.02.2011

Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θέμα Διατριβής: «Διερεύνηση του ρόλου των μοριακών δεικτών CD146 και νεστίνης στον καρκίνο του μαστού βασισμένων στους βιολογικούς μηχανισμούς δράσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων.» Β Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική. Λαϊκό Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών. Επιβλέπων: Διευθυντής Καθηγητής Δρ Γρηγόριος Κουράκλης.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ

12.2014

Θέση Ειδικότητας Γενικής Χειρουργικής – Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Βασιλείας, Ελβετία. (Abteilung für Allgemeine und Viszeralchirurgie, Universitätsspital Basel. Klinikleiter: Chefarzt Prof. Daniel Oertli)

29.12.2014 – σήμερα

Διορισμός σε μόνιμη οργανική θέση φαρμακοποιού στον Ε.Ο.Π.Υ.Υ (ΕΘΝΙΚΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΟΧΗΣ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΥΓΕΙΑΣ)

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Alterations of the Expression of CD34 during the Evolution of sepsis by Ventilator-associated pneumonia. A Antonopoulou , I Floros, P Koutoukas, **C Tampaki**, S Siasiakou, S Nanas. “International Conference Centre at Megaron”, 3rd Annual Congress, Interdisciplinary Review Course on Pulmonary Diseases, Critical Care, Emergency Medicine & Nursing Care, 12-13 May 2006 Athens, Greece.
2. Alterations of the Expression of CD34 during the Evolution of Sepsis by Ventilator-Associated- Pneumonia. **Aikaterini Christina Tampaki**, Thomas Tsaganos, Aikaterini Spyridaki, Basiliki Karagianni, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, Helen Giamarellou, Nikolaos Drakoulis, Diamantis Plachouras. 4th Panhellenic Congress of Pharmacology, Hellenic Society of Pharmacology, 19-20 May, 2006 Patra, Greece.
3. Der Einsatz freier Lappenplastiken nach thermischer Verletzung. D. Kotsougiani, **A. C. Tampaki**, M. Lehnhardt, U. Kneser, A. Daigeler. 31. Jahrestagung der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Verbrennungsbehandlung (DAV 2013). 16.01. - 19.01.2013, Mayrhofen, Österreich
4. The protein expression of nestin in invasive breast carcinomas. C. Magkou, **A. Tampaki**, I. Theohari, E. Tsaldari, I. Giannopoulou, A. Keramopoulos, L. Nakopoulou. 25th European Congress of Pathology. 31.08. -04.09.2013, Lisbon, Portugal.
5. Safety of Early and Urgent Carotid Endarterectomy (CEA) in Symptomatic Carotid Artery Stenosis (sCAS): An International, Multicenter Study. Georgios Tsivgoulis, Christos Krogias, Georgios S Georgiadis, Robert Mikulik, Dimitrios Athanasiadis, Apostolos Safouris, Sakia H Meves, Konstantinos Vadikolias, Konstantinos Voumvourakis, Michal Haršány, Ioannis Heliopoulos, Sokratis Papageorgiou, Efstratios Georgakarakos, **Ekaterini-Christina Tampaki**, Andreas Lazaris, Charitomeni Piperidou, Elefterios Stamboulis, Leonidas Stefanis, Miltos Lazarides, and Spyros N Vasdekis. International Stroke Conference, 11-13 February 2014, San Diego, USA

6. Safety of Statin Pretreatment in Intravenous Thrombolysis (IVT) for Acute Ischemic Stroke (AIS) Georgios Tsivgoulis, Pavla Kadlecová, Anna Czlonkowska, Miroslav Brozman, Victor Švigelj, Laszlo Csiba, Janika Kõrv, Vanja Bašić Kes, Dalius Jatuzis, Jobst Rudolf, **Ekaterini-Christina Tampaki**, Yakup Krespi, and Robert Mikulik. 23. European Stroke Conference, 6-9 Mai 2014 Nice, France
7. Safety and efficacy of aggressive antiplatelet treatment in acute cerebral ischemia due to large vessel atherosclerosis: a pilot, case-control study. Georgios Tsivgoulis, Konstantinos Voumvourakis, Konstantinos Vadikolias, Ioannis Heliopoulos, Chrissoula Liantinioti, Christina Giavasi, Maria Chondrogianni, Dimitrios Athanasiadis, **Ekaterini-Christina Tampaki**, Sokratis Papageorgiou, Anastasios Bonakis, Charitomeni Piperidou, Andrei V. Alexandrov, Leonidas Stefanis. 23. European Stroke Conference, 6-9 Mai 2014 Nice, France
8. Nestin Involvement in Tissue Injury and Cancer - a Potential Tumor Marker? Konstantinos Kontzoglou, **Ekaterini Christina Tampaki**, Athanasios Tampakis, Afroditi Nonni, Efstratios Patsouris, Gregory Kouraklis. BIT's 8th World Cancer Congress, 15-17 May 2015, Beijing (Peking), China.
9. Expression of stem cell markers CD146 (MCAM) and nestin in different molecular subtypes in breast cancer. **Ekaterini Christina Tampaki**, Athanasios Tampakis, Afroditi Nonni, Efstratios Patsouris, Konstantinos Kontzoglou, Gregory Kouraklis. 13th Panhellenic Congress of Surgical Oncology, 17-20 December 2015, Thessaloniki, Greece
10. Evaluation of Nestin and CD146 (MCAM) expression in breast cancer. Predicting specific metastasis markers for breast cancer. Konstantinos Kontzoglou, **Ekaterini Christina Tampaki**, Athanasios Tampakis, Afroditi Nonni, Efstratios Patsouris, Gregory Kouraklis. BIT's 9th World Cancer Congress, May 14-16, 2016, Shanghai, China

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Kinetics of progenitor hemopoetic stem cells in sepsis: correlation with patients survival? Tsaganos T, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kollias S, Zervakis D, Karagianni V, Pelekanou A, **Tampaki EC**, Kontogiorgi M, Koroneos A, Drakoulis N, Armaganidis A, Roussos C, Giamarellou H. BMC Infect Dis. 2006 Sep 18;6:142. PubMed PMID: 16981997; PubMed Central PMCID: PMC1586204.
2. Cranberry as promising natural source of potential anticancer agents: current evidence and future perspectives. Katsargyris A, **Tampaki EC**, Giaginis C, Theocharis S. Anticancer Agents Med Chem. 2012 Jul;12(6):619-30. Review.
3. A case of positive mixed epithelial/mesenchymal metaplastic breast carcinoma (carcinosarcoma). Towards novel therapeutic targets: case report. **Tampaki EC**, Tampakis A, Agrogiannis G, Kavantzias N, Kontzoglou K, Kouraklis G. Onkologie. 2013;36(9):506-9. doi: 10.1159/000354638. Epub 2013 Aug 19.
4. Nestin involvement during tissue injury and cancer – a potential tumor marker? **Tampaki EC**, Tampakis A, Kontzoglou K, Walter W, Kouraklis G. Cell Oncol (Dordr). 2014 Oct;37(5):305-15. doi: 10.1007/s13402-014-0193-5. Epub 2014 Aug 28. Review.
5. Histone deacetylase Inhibitors and colorectal cancer: what is new? Tampakis A, **Tampaki EC**, Nebiker CA, Kouraklis G. Anticancer Agents Med Chem. 2014;14(9):1220-7.
6. Tampakis A, Droeser R, **Tampaki EC**, Von Holzen U, Delko T. Ogilvie Syndrome versus caecal Volvulus in a hospitalized patient with a pelvis fracture. Annals of medicine and surgery 2015 (under submission).
7. Tampakis A, Zetl A, **Tampaki EC**, Posabella A, Von Flüe M, Guenin MO. Two large benign branch duct gastric type IPMN with positive GNAS mutations: A question of when or using which technique to operate? Pancreas 2015 (Epub ahead of print)

8. **Tampaki EC**, Tampakis A, Nonni A, Kontzoglou K, Patsouris E, Kouraklis G. Nestin and CD146 expression in breast cancer. Evidence of association with aggressive molecular subtypes. (under submission).
9. **Tampaki EC**, Tampakis A, Nonni A, Kontzoglou K, Patsouris E, Korkolopoulou P, Kouraklis G. A case of a Glycogen-Rich Clear Cell Carcinoma of the Breast. Potential association of it's aggressiveness with stem cell markers? (under submission)
10. **Tampaki EC**, Tampakis A, Nonni A, Kontzoglou K, Patsouris E, Kouraklis G. A case of a metaplastic male breast cancer. Towards understanding signs of prognosis. (under submission)
11. Tampakis A, **Tampaki EC**, Posabella A, Zettl A, Von Flüe M, Guenin MO. KRAS mutations with no GNAS mutations in an IPMN: Could this define a significant malignant molecular profile? Lessons from an extended IPMN covering the entire pancreas. (under submission)

ΓΝΩΣΗ ΞΕΝΩΝ ΓΛΩΣΣΩΝ

Αγγλικά

Επίπεδο C2

Certificate of Proficiency in English, Cambridge University

Γερμανικά

Επίπεδο C2

Kleines Deutsches Sprachdiplom, Ludwig Maximilians Universität Muenchen

Γαλλικά

Επίπεδο B1

Diplôme d'Etudes en Langue Française, D.E.L.F

Ισπανικά

Επίπεδο A2

Nível Initial

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Οι δείκτες CD146 (MCAM) και νεστίνη εκφράζονται σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και σε ανεπαρκώς διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού, εμπλέκονται στην αγγειογένεση των όγκων μέσω της αλληλεπίδρασης των καρκινικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων και διευκολύνουν την ανάπτυξη του όγκου. Τόσο ο δείκτης MCAM, όσο και η νεστίνη μπορεί να αποδειχθούν σημαντικοί θεραπευτικοί δείκτες στις πιο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η κατανόηση της έκφρασης, της κατανομής και του ρόλου των CD146 και νεστίνης σε διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους και μοριακούς υποτύπους στον καρκίνο του μαστού και η συσχέτιση τους με καθιερωμένες παραμέτρους εκτίμησης της νεοπλασίας.

Υλικό και Μέθοδος: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 141 ασθενείς που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του μαστού τα έτη 2000 έως 2014, από τον φυσιολογικό ιστό των οποίων προήλθε και η ομάδα ελέγχου και μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης νεστίνης και του δείκτη CD146 σε ιστολογικά παρασκευάσματα μαζικού αδένου.

Αποτελέσματα: Η έκφραση της νεστίνης παρατηρήθηκε αυξημένη στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικούς όγκους και όγκους βασικού τύπου ($p < 0,001$), αλλά όχι σε ασθενείς με μοριακό υπότυπο HER2 θετικό, αυλικού τύπου B και αυλικού τύπου A. Η έκφραση του MCAM βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό και βασικού τύπου υπότυπο ($p < 0,001$) και λιγότερο αυξημένη σε μοριακούς υποτύπους HER2 θετικούς, αυλικού τύπου B και αυλικού τύπου A. Η έκφραση τόσο της νεστίνης ($p = 0,0021$) όσο και του MCAM ($p = 0,008$) βρέθηκε στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($P = 0,007$ και $P < 0,001$ αντίστοιχα) στο ολικό ιστικό δείγμα, καθώς και σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στους 42 ασθενείς με τριπλά αρνητικό υπότυπο ($p = 0,035$ και $p = 0,040$ αντίστοιχα). Η έκφραση του MCAM βρέθηκε στατιστικά σημαντική σε σχέση με το στάδιο νόσου σε όλους τους ασθενείς ($p = 0,006$). Η έκφραση της νεστίνης βρέθηκε στατιστικά σημαντική σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα ($p = 0,029$). Καμία στατιστική σύνδεση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των

δεικτών με την λεμφαδενική διήθηση, το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου και τον δείκτη p53 στο ολικό δείγμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάλυση του μέσου χρόνου επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν CD146 και ήταν οι 42 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν CD146 ήταν οι 52 μήνες ($p=0,003$). Η αντίστοιχα ανάλυση του μέσου χρόνου επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη ήταν οι 39 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν νεστίνη ήταν οι 50 μήνες ($p=0,022$).

Συμπεράσματα: Η έκφραση της νεστίνης και του MCAM σχετίζεται με όγκους επιθετικής κλινικής συμπεριφοράς με κακή πρόγνωση και αποτελούν αναπτυξιακό δυναμικό θεραπευτικό στόχο ιδιαίτερα στα τριπλά αρνητικά και στα βασικού τύπου καρκινώματα του μαστού. Περαιτέρω μελέτες αναμένονται και καθίστανται επιτακτική ανάγκη για να καθορίσουν τον βιολογικό ρόλο της νεστίνης και του MCAM στην προσπάθεια για τον εντοπισμό επιλεκτικότερων δεικτών και θεραπευτικών στόχων που θα βελτιώσουν την ανίχνευση, διάγνωση και θεραπεία των καρκινωμάτων του μαστού.

ABSTRACT

Background&Purpose: MCAM (CD146) and nestin are expressed in cancer stem-like cells and poorly differentiated cancer cells, they are involved in tumor angiogenesis through interaction of cancer cells and blood vessel endothelial cells and facilitate tumor growth. Both markers, nestin and MCAM may prove to be significant therapeutic indexes in breast cancer. The purpose of our study was to understand the expression, distribution and role of MCAM and nestin in different histological types and molecular immunophenotypes in breast cancer and their correlation with standard tumor assessment parameters.

Subjects&Methods: We identified from the files of the 1st and 2nd Department of Propedeutic Surgery in Laiko General Hospital, patients diagnosed with breast cancer who underwent surgery in Athens Greece in 2000-2014. A total of 141 cases including paraffin-embedded tumor tissues were selected, the cancers were classified into luminal A, luminal B, HER2+, triple-negative, or non-expressor subtypes and the protein expression of MCAM and nestin were analyzed using immunohistochemistry.

Results: Nestin expression was observed in 18.4% (26/141) of cases and in 47,6% (20/42) of the patients with triple-negative breast cancer. Additionally, MCAM expression was detected in 35,5% (50/141) of cases and in 73,8% (31/42) patients within the triple-negative subgroup. Among the breast cancer subtypes, nestin was highly expressed in tissues of patients with triple-negative tumors ($p < 0,001$), but not in patients exhibiting HER2+ molecular subtype, luminal B and luminal A subtype. Furthermore, our immunohistochemical results revealed that MCAM was highly expressed particularly in patients demonstrating the triple-negative subtype ($p < 0,001$) and decreasingly expressed in molecular subtypes such as the HER2+, luminal B and luminal A subtype. Expression of both nestin ($p = 0.0021$) and MCAM ($p = 0.008$) were found statistically significant relative to the histological grade and the Ki-67 cell proliferation marker ($p=0,007$ for nestin and $p<0,001$ for CD146) in the total tissue sample, and compared to the size of the primary tumor in 42 patients exhibiting the triple-negative subtype ($p = 0.035$ and $p = 0.040$ respectively). MCAM expression was associated with the disease stage in all 141 patients ($p = 0.006$). Moreover, expression of nestin was statistically

significant relative to the younger age of the patients in the overall sample ($p = 0.029$). However, no statistical association was observed between nestin or MCAM expression and lymph node infiltration, size of the primary tumor and p53 protein in all bulk samples. Interestingly, the 5-year recurrence rates of the patients with MCAM expression and those without were 42 months and 52 months, respectively ($P = 0.003$). The 5-year recurrence rates of the patients with nestin expression and those without were 39 months and 50 months, respectively ($P = 0.022$).

Conclusions: Nestin and MCAM expression were associated with aggressive tumor features and clinical behavior of breast carcinomas exhibiting poor prognosis. Consequently, they may be used as predictors for the prognosis of breast cancers and they represent a new molecular target for nestin-positive cancer cells and tumor vessels, as well as a potential therapeutic target regarding triple-negative and basal-like breast cancers. Further studies are expected to become imperative to determine the biological role of nestin and MCAM in trying to identify selective markers and therapeutic targets that will improve detection, diagnosis and treatment of breast carcinomas.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Ανατομία του μαστού

1.1.1. Δομές του μαστού

Ο μαστός αποτελεί έναν τροποποιημένο αποκρινή ιδρωτοποιό αδένα του δέρματος, ο οποίος αναπτύσσεται από τη μαστική ακρολοφία κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και παράγει γάλα κατά τη γαλουχία. Κείται κατά τα δύο τρίτα πάνω και πλάγια του μείζονα θωρακικού μυ και κατά το ένα τρίτο στον πρόσθιο οδοντωτό μυ, εκτεινόμενος συνήθως μεταξύ της κλείδας και της 6ης μέχρι 8ης πλευράς. Μαζικός αδένας μπορεί να βρεθεί προς τα έσω μέχρι το στήρνο και προς τα έξω μέχρι τη μέση μασχαλιαία γραμμή, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι και την κορυφή της μασχαλιαίας κοιλότητας (ουρά του Spence). Επιπλέον, συχνά μικροσκοπικές εστίες ιστού επεκτείνονται και εκτός των τυπικών ορίων, διαπερνώντας ακόμα και την περιτονία του μείζονα θωρακικού μύ. Το παραπάνω είναι πολύ σημαντικό, καθώς σε περιπτώσεις ολικής μαστεκτομής δεν αφαιρείται απαραίτητα ο μαζικός αδένας στο σύνολό του. Το λίπος απαντάται διάσπαρτα στο μαστό, τον οποίο επίσης περιβάλλει ως υποδόριος και οπισθομαζικός λιπώδης ιστός (1,2,3).

Ο μαστός ιστολογικά αποτελείται από τρεις κύριες δομές: το δέρμα, το υποδόριο λίπος και το μαζικό αδέν, ο οποίος με τη σειρά του αποτελείται από το παρέγχυμα και το στρώμα. Ο μαζικός αδένας περιβάλλεται από μια επιπολής και μια εν τω βάθει περιτονία, ενώ διαμερισματοποιείται από ινώδεις δέσμες συνδετικού ιστού. Κάποιες από αυτές συνδέονται με τις περιτονίες συνιστώντας τους συνδέσμους του Cooper, οι οποίοι υποστηρίζουν το μαστό.

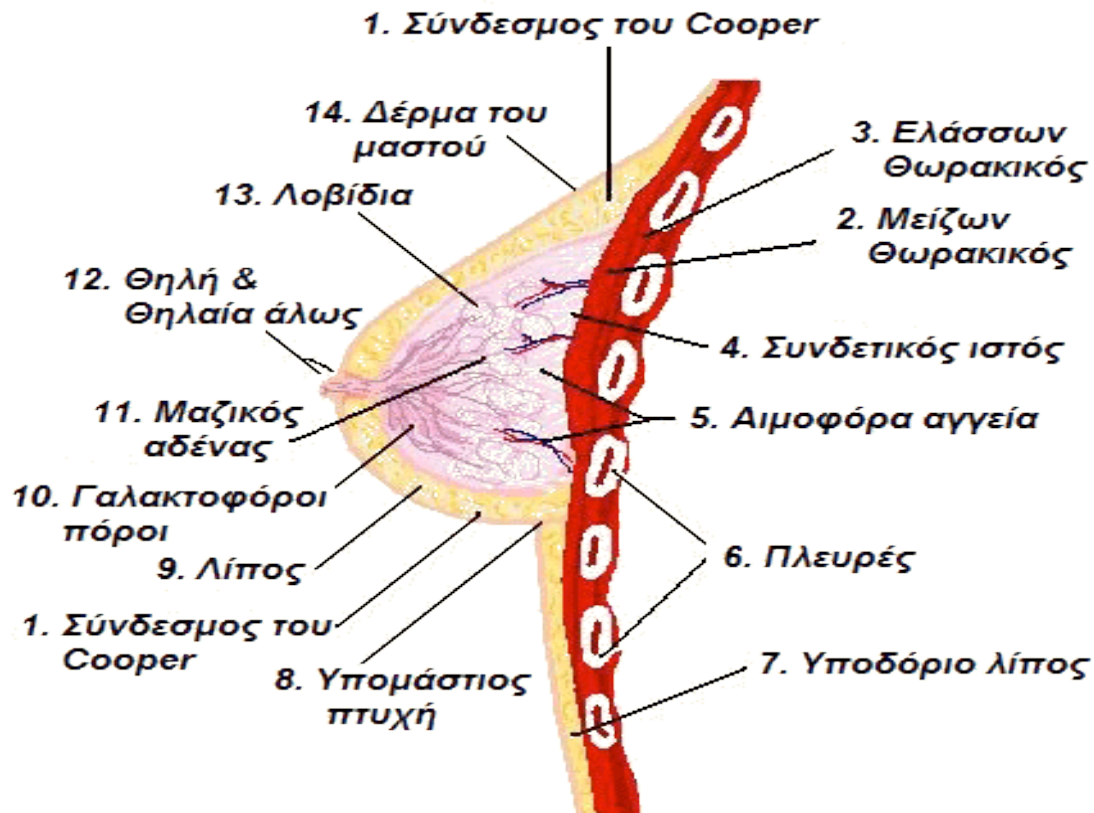
Ο μαστός της γυναίκας βρίσκεται στην υποδέρια περιτονία της πρόσθιας επιφάνειας του θώρακος μεταξύ της στερνικής και της πρόσθιας μασχαλιαίας γραμμής και εμφανίζει δύο επιφάνειες: την πρόσθια και οπίσθια και την περιφερική. Η πρόσθια επιφάνεια καλύπτεται από δέρμα και εμφανίζει τη θηλή και την άλω. Η κορυφή της θηλής παρουσιάζει ρωγμές στις οποίες βρίσκονται 15-20 στόμια που αποτελούν τις εκβολές των αντίστοιχων γαλακτοφόρων πόρων.

Η γύρω από την θηλή καστανέρυθρη περιοχή του δέρματος αποτελεί την άλω και παρουσιάζει 10-15 υποστρόγγυλα υποδέρια φυμάτια (φυμάτια του Montgomery) που

είναι οι σμηγματογόνοι αδένες της θηλαίας άλως. Η οπίσθια επιφάνεια εφάπτεται στην περιτονία τον μείζονος θωρακικού μυός.

Η δομή του μαστού σχηματίζεται από τον ινώδη ιστό τον οποίο περιβάλλει και διαπερνά. Ο μαστός περιβάλλεται από περιτονία, η οποία προέρχεται από την υποδόρεια περιτονία, η οποία χωρίζεται στην εν τω βάθει και στην επιπολής περιτονία που περικλείει το στρώμα, το επιθήλιο και το αδενικό στοιχείο του μαστού. Ένα διασταυρούμενο δίκτυο από στηρικτικές ινώδεις δομές, οι οποίες πορεύονται μεταξύ της εν τω βάθει και επιπολής περιτονίας, διαμερισματοποιούν τις δομές του μαστού. Αυτοί οι “σύνδεσμοι”, οι οποίοι έχουν περιγραφεί από τον Cooper το 1880, σχηματίζουν επικαλυπτόμενες δομές, οι οποίες είναι ανώμαλες στο σχήμα και κάνουν δύσκολη την ανάλυση της εικόνας του μαστού (Εικ. 1.1.).

Εικόνα 1.1. Ανατομία του μαστού. Προσαρμογή απο: *Netter Frank H.: Atlas of Human Anatomy. 5th Ed. Saunders, 2011.*



Οι συγκεκριμένοι σύνδεσμοι εισέρχονται στο δέρμα διαμέσου των δεσμίδων του συνδετικού ιστού και ενώνονται με το χόριο του υποδορίου συνδετικού ιστού, σχηματίζοντας μια συνεκτική δομή που ανθίσταται στο χειρουργικό διαχωρισμό των ιστών κατά επίπεδα και οι οποίες καθιστούν αναγκαία την χρησιμοποίηση διαφόρων τεχνικών για τον διαχωρισμό τους σε χειρουργεία μαστού (2,3).

Το μαζικό παρέγχυμα περιβάλλεται από στιβάδα υποδορίου λίπους το οποίο ποικίλλει σε πάχος. Αυτή η στιβάδα του λίπους εισέρχεται στο μαζικό παρέγχυμα διαμέσου των προσφύσεων του δέρματος και έτσι μπορεί να βρεθεί επιθήλιο των πόρων άμεσα στο βάθος της επιδερμίδας. Αυτή η επέκταση κάνει δυνατή την επιλογή της υποδόριας μαστεκτομής ως τεχνικής, οι επιθηλιακοί όμως ιστοί που παραμένουν κάνουν την μέθοδο αυτή ελλιπή για την πλήρη εξαίρεση του κινδύνου του καρκίνου του μαστού.

Η εν τω βάθει περιτονία χωρίζεται από τον μείζονα θωρακικό μύ από μία στιβάδα λίπους, η οποία ποικίλλει σε πάχος και σχηματίζει τον οπίσθιο μαστικό χώρο, δίνοντας στο μαστό ένα βαθμό κινητικότητας στο θωρακικό τοίχωμα. Αντίθετα ο οπίσθιος μαστικός χώρος και η περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός δεν χωρίζουν εντελώς. Προεκβολές της εν τω βάθει περιτονίας περνούν τον οπίσθιο μαστικό χώρο στον μείζονα θωρακικό μύ δίνοντας τη δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να διηθούν το θωρακικό τοίχωμα διαμέσου των αγγείων και λεμφαγγείων. Συνεπώς, λόγω έλλειψης της τέλει απομόνωσης του μαστού από τον μείζονα θωρακικό μύ, η ριζική μαστεκτομή αποτέλεσε στο παρελθόν την πιο συχνή επιλογή όσον αφορά στη χειρουργική αντιμετώπιση. Η θηλή και η περιθηλαία άλω περιέχει στυτικούς λείους μύες καθώς και σμηγματογόνους αδένες. Συγκεκριμένα στην περιθηλαία περιοχή υπάρχουν θύλακες τριχών, όπου σπάνια οι αδένες ή οι θύλακες των τριχών περιέχουν αποτιτανώσεις οι οποίες δημιουργούν διαγνωστικό πρόβλημα στην μαστογραφία.

Η μικροανατομία του μαστού περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1959 από τον Parks (4). Οκτώ ή περισσότεροι γαλακτοφόροι πόροι ξεκινούν από την κορυφή της θηλής, ενώ κάθε μείζον γαλακτοφόρος πόρος εκτείνεται στο μαστό σχηματίζοντας διακλαδώσεις από μικρότερους πόρους. Η έκταση που παροχετεύει κάθε πόρος θεωρείται ένας λοβός ή τμήμα του μαστού, οι οποίοι δεν αναγνωρίζονται σαν ιστολογικές χωριστές οντότητες, καθώς δεν υπάρχουν όρια που τις χωρίζουν μεταξύ τους. Οι κλάδοι που δίνει ένας πόρος μπορεί να εκτείνονται σε διάφορες κατευθύνσεις (εικ.1.1) και να επικαλύπτουν κλάδους

από άλλον τμηματικό πόρο, αλλά ποτέ κλάδοι από ένα τμηματικό πόρο δεν επικοινωνούν με άλλους κλάδους άλλων πόρων.

Πίσω απο την θηλή βρίσκεται ένα τμήμα του κύριου πόρου το οποίο είναι διατεταμένο και είναι γνωστό ως λήκυθος ή γαλακτοφόρος κόλπος. Μετά από αυτό το σημείο ο πόρος αρχίζει να δίνει κλάδους σε μικρότερα τμήματα ποικίλου μήκους, ενώ μικρότεροι κλάδοι δημιουργούν την απομακρυσμένη περιοχή των κλάδων στα τελικά τους άκρα, σχηματίζοντας τα μικροσκοπικά τελικά λόβια. Οι συγκεκριμένες εκκριτικές μονάδες σχηματίζουν τις αδενικές κυψελίδες (5).

Οι πόροι καλύπτονται από δύο τύπους κυττάρων. Ο ένας τύπος αποτελείται από τα κύτταρα της έσω επιθηλιακής στιβάδας, η οποία καλύπτεται από μία πιο λεπτή διακοπτόμενη στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων, τα οποία παίζουν πιθανώς κάποιο ρόλο στην έκκριση του γάλακτος κατά την γαλουχία. Η παρουσία και των δύο ειδών κυττάρων σε μια αλλοίωση αυξάνουν την πιθανότητα της καλοήθειας.

Ο τελικός κλάδος από τον τμηματικό πόρο καλείται εξωλοβιακός τελικός πόρος που συνεχίζει στους τυφλούς λεπτούς τελικούς πόρους το "λοβίδιο", το οποίο μοιάζει με δάκτυλα μέσα στα κύτταρα του λοβίου, παράγοντας 10-100 κυψελίδες. Ιστολογικά υπάρχει όριο μεταξύ του έξω λοβιακού πόρου και της τελικής πορολοβιακής μονάδας (TDLU) του λοβίου. Πολλές θεωρίες υποστηρίζουν ότι οι περισσότεροι καρκίνοι ξεκινούν από τον εξωλοβιακό τελικό πόρο, ακριβώς εγγύς του λοβίου, όπου ο χαλαρός συνδετικός ιστός στη θέση αυτή καλύπτει τους εξωλοβιακούς τελικούς πόρους. Τα κύτταρα στους ενδολοβιακούς τελικούς πόρους διαφέρουν ιστολογικά από τα κύτταρα του έξω λοβιακού τελικού πόρου και αυτά διακρίνονται μικροσκοπικά, ενώ το λοβίο διακρίνεται καθαρά από τους μεγάλους πόρους, από το στρώμα που το περιβάλλει. Το στρώμα, η μεσοκυττάρια ουσία, μπορεί να προέρχεται από το ιδίως χόριο, περιέχει πολύ λεπτές ίνες κολλαγόνου και δικτυωτό ιστό και είναι περισσότερο κυψελοειδής και ανάγγειος. Το λοβίο δεν μοιάζει με τους μεγάλους πόρους και δεν περιέχει ελαστικό ιστό. Αν και οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού είναι επιθηλιακής αρχής μπορεί και τα μη επιθηλιακά στοιχεία του στρώματος να παίζουν κάποιο ρόλο. Πιστεύεται ότι υπάρχει αλληλοεπίδραση μεταξύ στρώματος και επιθηλίου μεταφέροντας πληροφορίες οι οποίες προάγουν το κύτταρο για την δημιουργία της κακοήθειας.

1.1.2. Αιμάτωση

Ο μαστός αιματώνεται από κλάδους της μασχαλιαίας αρτηρίας, των μεσοπλευρίων και από κλάδους της έσω μαστικής. Οι αρτηρίες δεν σκιαγραφούνται στη μαστογραφία, εκτός εάν υπάρχει εναπόθεση αλάτων ασβεστίου στα τοιχώματά τους. Οι φλέβες σχηματίζουν ένα αναστομωτικό κύκλο γύρω από την βάση της θηλής, μεταφέρουν το αίμα από την περιφέρεια του μαστού και απολήγουν στη μασχαλιαία και έσω μαστική φλέβα. Οι φλέβες σκιαγραφούνται σαφώς στη μαστογραφία, ιδιαίτερα όταν περιβάλλονται από λιπώδη ιστό, ενώ στις κακοήθειες εξεργασίες και στις φλεγμονώδεις καταστάσεις παρατηρείται αυξημένη αγγειοβρίθεια. Τα λεμφικά αγγεία και νεύρα δεν παίζουν σπουδαίο ρόλο στη μαστογραφία (6).

1.1.3. Νεύρωση

Πραγματοποιείται από το πρόσθιο και πλάγιο κλάδο των θωρακικών μεσοπλευρίων νεύρων με μερική νεύρωση από το αυχενικό πλέγμα για τον άνω μαστό. Συχνά ο πόνος που προκαλείται από την πλευρίτιδα αντανακλά από τον μαστό και προέρχεται από το θωρακικό τοίχωμα (2,3).

1.1.4. Λεμφαγγεία

Υπάρχουν πολλές μελέτες για τα λεμφαγγεία. Έχει βρεθεί ότι υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των επιφανειακών δερματικών λεμφαγγείων και του εν τω βάθει συστήματος που κατανέμεται διαμέσου του μαστικού παρεγχύματος. Τα δερματικά λεμφαγγεία έχουν ροή προς το περιθηλαίο πλέγμα και αυτό προς τα μασχαλιαία λεμφαγγεία (2,3), ενώ μερικά λεμφαγγεία παροχετεύουν στους ενδομαστικούς λεμφαδένες. Η κύρια παροχέτευση της λέμφου από όλα τα τμήματα του μαστού και του έσω τμήματος, είναι η μασχαλιαία κοιλότητα.

1.2. Ο καρκίνος του μαστού

1.2.1 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Με περισσότερες από ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις το χρόνο και κοντά στους 500.000 θανάτους ετησίως, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες και την δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στο γυναικείο πληθυσμό, ακολουθώντας τον καρκίνο του πνεύμονα. Στον Δυτικό κόσμο μία στις οκτώ γυναίκες θα νοσήσουν σε κάποια χρονική στιγμή της ζωής τους από καρκίνο του μαστού, ανεβάζοντας την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε κάθε γυναίκα στο 12,5% (7,8).

Το 2015, υπάρχουν πάνω από 2,8 εκατομμύρια γυναίκες με ιστορικό καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ. Ανάμεσα σε αυτές συμπεριλαμβάνονται γυναίκες που βρίσκονται ήδη σε θεραπεία και γυναίκες που έχουν ολοκληρώσει τη θεραπεία τους. Το 2015 εκτιμάται ότι περίπου 231.840 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού αναμένεται να διαγνωστούν σε γυναίκες στις ΗΠΑ, μαζί με 60.290 νέες περιπτώσεις in situ καρκίνου του μαστού, ενώ στην Ελλάδα η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού υπολογίζεται σε 3.500-4000 νέες περιπτώσεις ετησίως. Περίπου 2.350 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού αναμένεται να διαγνωστούν στους άνδρες το 2015. Εκτιμάται ότι ο κίνδυνος στη ζωή ενός άντρα εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι περίπου 1 στις 1.000. Περίπου 40.290 γυναίκες στις ΗΠΑ αναμένεται να πεθάνουν το 2015 από καρκίνο του μαστού, αν και τα ποσοστά θανάτου βρίσκονται σε καθοδική πορεία από το 1989. Οι γυναίκες κάτω των 50 ετών έχουν βιώσει μεγαλύτερες μειώσεις. Αυτές οι μειώσεις πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα της γενικής προόδου της θεραπευτικής αντιμετώπισης, της έγκαιρης ανίχνευσης μέσω προσυμπτωματικού ελέγχου καθώς και της αύξησης της ευαισθητοποίησης ανάμεσα στις γυναίκες (9).

Εκτός του καρκίνου του δέρματος, ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος μεταξύ των αμερικανίδων γυναικών. Το 2015 εκτιμάται ότι μόλις το 30 % των νεοδιαγνωσθέντων κρουσμάτων καρκίνου στις γυναίκες θα είναι καρκίνοι του μαστού (9). Παγκοσμίως η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι μεγαλύτερη στη Βόρεια Αμερική και τη Βόρεια Ευρώπη και μικρότερη στην Ασία και την Αφρική.

Παρότι η επιβίωση από τον καρκίνο του μαστού έχει σημειώσει αξιόλογη αύξηση στις αναπτυγμένες οικονομικά χώρες, προφανώς λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και της βελτίωσης των θεραπευτικών μεθόδων, με ποσοστό πενταετούς επιβίωσης που ξεπερνά το 80% σε ορισμένες περιοχές όπως στη Βόρεια Αμερική, στις αναπτυσσόμενες χώρες παραμένει σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα, ακόμη και κάτω από 40% (10). Έτσι, ενώ η νόσος θεωρείται συχνότερη στις δυτικές χώρες, η συντριπτική πλειοψηφία των θανάτων από καρκίνο του μαστού, 70% περίπου, αφορά στις αναπτυσσόμενες χώρες (7,8).

Η ίδια ανισότητα εμφανίζεται και ανάμεσα σε γυναίκες διαφορετικής κοινωνικοοικονομικής θέσης με τις ασθενείς που προέρχονται από φτωχότερα κοινωνικά στρώματα να διαγιγνώσκονται με καθυστέρηση, σε προχωρημένα στάδια και να εμφανίζουν χαμηλότερη επιβίωση (11). Στις ΗΠΑ οι λευκές γυναίκες έχουν ελαφρώς περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού από τις γυναίκες αφρικανικής καταγωγής. Ωστόσο, σε γυναίκες κάτω των 45 ετών, ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες αφρικανικής καταγωγής από ότι στις λευκές γυναίκες. Συνολικά, σύμφωνα με επίσημα στοιχεία από την American Cancer Society, αфроαμερικανές γυναίκες είναι πιο πιθανό να πεθάνουν από καρκίνο του μαστού. Ο κίνδυνος ανάπτυξης και θανάτου από καρκίνο του μαστού είναι χαμηλότερος στις αμερικανίδες ασιατικής καταγωγής, στις ισπανόφωνες και στις λευκές αμερικανίδες (12).

Ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι μετά από δεκαετίες που ο καρκίνος του μαστού εμφάνιζε συνεχώς αυξανόμενη επίπτωση στις Δυτικές χώρες, η συχνότητα της νόσου παρουσιάζει στις ΗΠΑ και σε άλλες δυτικές χώρες τα τελευταία χρόνια και κυρίως από το 1975 πτωτική τάση. Αυτή η πτωτική τάση που αφορά κυρίως στους όγκους με θετικούς οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, συσχετίζεται με τη μείωση της χρήσης ορμονικής υποκατάστασης στις ίδιες γυναίκες, την εισαγωγή του προληπτικού ελέγχου με τη χρήση της μαστογραφίας και την ευρύτερη χρήση και βελτίωση των επικουρικών θεραπειών (13,14). Στο Ηνωμένο Βασίλειο την τελευταία δεκαετία, η θνησιμότητα του καρκίνου του μαστού έχει μειωθεί σχεδόν κατά ένα πέμπτο, με τα ποσοστά της επιβίωσης να διαφέρουν ανάλογα με τις ηλικίες διάγνωσης. Έτσι, οι γυναίκες που βρίσκονται στην 5^η και 6^η δεκαετία της ζωής τους όταν διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (15,16).

1.2.2. Παράγοντες κινδύνου και γενετική του καρκίνου του μαστού

1.2.2.1 Γενετική προδιάθεση-Κληρονομικός καρκίνος του μαστού

Υπάρχει πληθώρα γονιδίων που έχουν ενοχοποιηθεί ότι σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης καρκίνου του μαστού. Παρότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί όλα, εκείνα που στην κλινική πράξη είναι περισσότερο αποδεκτό να σχετίζονται είναι τα BRCA1 και BRCA2, τα οποία πιστεύεται ότι ευθύνονται για πάνω από 80% των περιπτώσεων κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Η συντριπτική πλειοψηφία των οικογενειών με καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών είναι φορείς των μεταλλαγμένων γονιδίων BRCA1 και BRCA2. Ο συνολικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού θεωρείται ότι είναι μεταξύ 60-85% για καρκίνο του μαστού και 40-60% για καρκίνο ωοθηκών για το BRCA1 καθώς και μεταξύ 50-85% και 10-30% αντίστοιχα για το BRCA2. Οι ετερόζυγοι φορείς της μετάλλαξης ATM και οι πάσχοντες από τα σύνδρομα Muir-Torre και Peutz- Jeghers εμφανίζουν επίσης αυξημένο κίνδυνο να νοσήσουν.

Η συχνότητα της μετάλλαξης στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 δεν ξεπερνά το 1:500 στο γενικό πληθυσμό ενώ μεταξύ ορισμένων φυλών όπως οι Εβραίοι Ασκενάζυ μπορεί να φτάνει και το 1:40. Τα ατομικά και οικογενειακά χαρακτηριστικά που συνδέονται με αυξημένη πιθανότητα μετάλλαξης στα BRCA 1 και 2 φαίνονται στους πίνακες (17,18,19,20,21).

Η βιολογική συμπεριφορά των όγκων σε ασθενείς που είναι φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 πιστεύεται ότι είναι διαφορετική από τα καρκινώματα του μαστού που εμφανίζονται σποραδικά στον πληθυσμό, με τα πρώτα να σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και υψηλότερα ποσοστά αμφοτερόπλευρης προσβολής (22,23,24,25,26,27).

Το γονίδιο TP53 στο χρωμόσωμα 17p προδιαθέτει επίσης για πρόιμη εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με πάνω από 70% των περιπτώσεων συνδρόμου Li Fraumeni. Το σύνδρομο αυτό, παρατηρείται σε σάρκωμα μαλακών μορίων ή οστεοσάρκωμα σε οικογένειες με πρόιμη εμφάνιση καρκίνου του μαστού, γλοιώματος, καρκίνου των επινεφριδίων και άλλες νεοπλασίες. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε ηλικία <30 έτη είναι

υψηλότερος από αυτόν για το BRCA1 και οι φορείς των μεταλλάξεων του γονιδίου έχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση σαρκώματος, όγκων του εγκεφάλου και άλλων νεοπλασιών. Η επίδραση του συνδρόμου Li Fraumeni στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού φαίνεται πως είναι μικρή (27).

Η νόσος του Cowden οφείλεται σε μεταλλάξεις του PTEN (phosphatase and tensin homolog), οι οποίες αποτελούν κληρονομούμενες γενετικές υψηλού κινδύνου, όμως στατιστικές μελέτες δείχνουν ότι δεν ευθύνονται για πολλές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Ανάμεσά στα χαρακτηριστικά της νόσου του Cowden συγκαταλέγονται η εκσεσημασμένη μακροκεφαλία, η οσχεοειδής γλώσσα και χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες. Συνολικά, μόνο το 5-6% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού μπορεί να αποδοθεί άμεσα στην κληρονόμηση ενός γονιδίου που προδιαθέτει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (27,28,29,30,31,32,33).

1.2.2.1.1. Γενετικές εξετάσεις και το μοντέλο BRCAPRO

Οι πληροφορίες που παρέχονται από τον γενετικό έλεγχο κατά τη λήψη τεκμηριωμένων αποφάσεων που σχετίζονται με τη διαχείριση του κινδύνου του καρκίνου του μαστού είναι ανεκτίμητες. Γενικά οι γενετικές δοκιμές έχουν ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος καθώς και ότι η συχνότητα των μεταλλάξεων που συμβαίνουν σε μη επιλεγμένες οικογένειες έχουν πολλές φορές αβέβαιη κλινική σημασία. Η αμερικανική εταιρεία κλινικής ογκολογίας έχει ορίσει κατευθυντήριες οδηγίες και πιστεύεται ότι είναι λογικό να εξετάσει τις δοκιμές των γυναικών, των οποίων η πιθανότητα για μετάλλαξη είναι μεγαλύτερη από 10 %.

Το BRCAPRO είναι ένα πρόγραμμα που υπολογίζει την πιθανότητα για ένα συγκεκριμένο μέλος της οικογένειας να φέρει μια μετάλλαξη βλαστικής σειράς των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 (Πίνακας 1.1.) (<http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/default.asp>).

Οι υπολογισμοί βασίζονται στους κανόνες του Bayes και προσδιορίζουν την πιθανότητα μιας μετάλλαξης δεδομένου του οικογενειακού ιστορικού. Γυναίκες ασθενείς στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο θα πρέπει να παραπέμπονται σε κέντρα γενετικής συμβουλευτικής για μια πιο οριστική αξιολόγηση

του κινδύνου. Η γενετική συμβουλευτική συνιστάται πριν από οποιαδήποτε δοκιμή ανίχνευσης μετάλλαξης. Παρόλα αυτά, τα υπάρχοντα δεδομένα δεν είναι διαθέσιμα για να προσδιοριστεί η πιο ενδεδειγμένη ηλικία για την αρχή μιας γενετικής δοκιμής (34,35).

Πίνακας 1.1 Τα κύρια γονίδια κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού

Γονίδιο	Σύνδρομο	Χρωμόσωμα	Συχνότητα	Διεισδυτικότητα για καρκίνο του μαστού
BRCA1	HBOC	17q21	Σπάνιο	Πολύ υψηλή
BRCA2	HBOC	13q12-13	Σπάνιο	Υψηλή
P53	Li Fraumeni	17p13.1	Πολύ σπάνιο	Υψηλή
ATM		11q22-23	Συχνό	Υψηλή
PTEN	Cowden	10q22-23	Πολύ σπάνιο	Υψηλή
STK11	Peutz-Jeghers	19p13.3	Πολύ σπάνιο	Υψηλή

HBOC: Hereditary breast / Ovarian cancer (Κληρονομούμενος καρκίνος μαστού / ωοθηκών).

1.2.2.1.2. Πρωτότυπο εργαλείο στην αξιολόγηση κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού.

Πρόκειται για ένα διαδραστικό εργαλείο που έχει σχεδιαστεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ και το National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project, (NSABP) για την εκτίμηση του κινδύνου μιας γυναίκας να αναπτύξει διηθητικό καρκίνο του μαστού. Βρίσκεται επίσης διαθέσιμο στην ιστοσελίδα του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (<http://www.cancer.gov/bcrisktool/>).

Το εργαλείο αυτό αναπτύχθηκε από το αρχικό μοντέλο Gail και περιλαμβάνει τους ακόλουθους παράγοντες κινδύνου: την τρέχουσα ηλικία, τη φυλή, την ηλικία εμμηναρχής, την ηλικία όπου μια γυναίκα είχε την πρώτη της γέννα, τον αριθμό των συγγενών πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού, τον αριθμό των προηγούμενων εξετάσεων βιοψίας μαστού και τέλος την παρουσία άτυπης υπερπλασίας

Το μοντέλο προβλέπει την πιθανότητα μιας γυναίκας να λάβει μια διάγνωση για καρκίνο του μαστού μέσα στα επόμενα 5 χρόνια αλλά και κατά τη διάρκεια της ζωής της (μέχρι την ηλικία των 90). Αν και αυτό το μοντέλο πρόβλεψης έχει δοκιμαστεί σε μεγάλους πληθυσμούς, ένας από τους περιορισμούς του είναι ότι δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικό στην πρόβλεψη του ατομικού ρίσκου εμφάνισης της νόσου. Επιπλέον, το συγκεκριμένο μοντέλο δεν λαμβάνει υπόψη το πατρικό οικογενειακό ιστορικό, τους συγγενείς δευτέρου βαθμού ή την ηλικία έναρξης της νόσου στις πληγείσες συγγενείς. Και οι δύο από αυτούς τους τελευταίους παράγοντες είναι σημαντικοί στην πρόβλεψη για τον κληρονομικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού (36,37).

1.2.2.1.3. Μοντέλο Claus.

Το μοντέλο Claus υπολογίζει την πιθανότητα μιας γυναίκας να αναπτύξει καρκίνο του μαστού με βάση το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου της. Ενσωματώνει πιο εκτεταμένα το οικογενειακό ιστορικό και αποκλείει άλλους παράγοντες κινδύνου. Πίνακες κινδύνου έχουν δημοσιευθεί από τους Claus et al. και ο κίνδυνος μπορεί να υπολογιστεί ως η πιθανότητα στη διάρκεια της ζωής μιας ασθενούς για ανάπτυξη καρκίνου ή ως ο εκτιμώμενος κίνδυνος μιας γυναίκας να αναπτύξει καρκίνο επί διάστημα δεκαετίας. Θα πρέπει να τονιστεί ότι το μοντέλο Claus μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε γυναίκες με τουλάχιστον ένα πρώτου ή δεύτερου βαθμού συγγενή με καρκίνο του μαστού. Το συγκεκριμένο μοντέλο δεν λαμβάνει υπόψη άλλους παράγοντες κινδύνου που έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του μαστού, όπως η ηλικία της εμμηναρχής, η ηλικία τεκνοποίησης, ή το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών (38).

(<http://www4.utsouthwestern.edu/breasthealth/cagene/default.asp>)

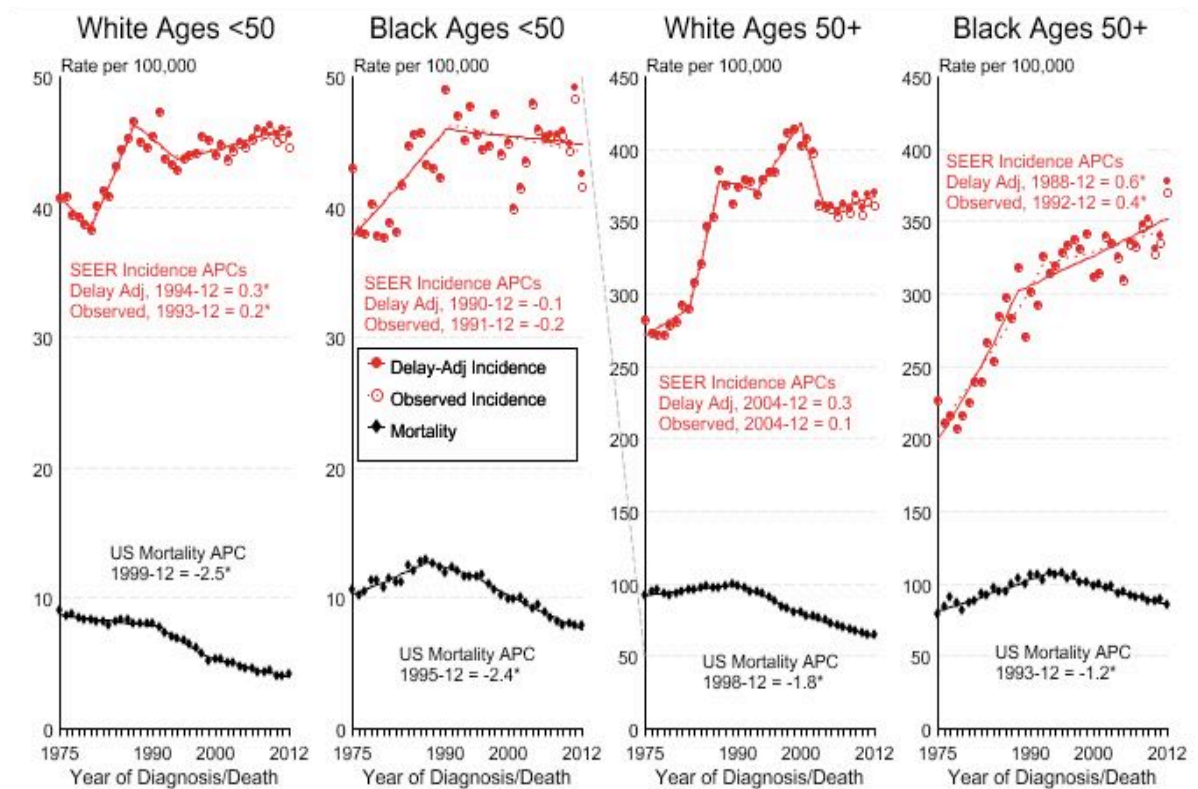
1.2.2.2 Παράγοντες κινδύνου. Βιολογικοί παράγοντες.

1.2.2.2.1. Φύλο-Ηλικία

Ο καρκίνος του μαστού είναι κατ' εξοχήν νόσος του γυναικείου φύλου, με την αναλογία γυναικών προς άνδρες όσον αφορά στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού

να αγγίζει το 200:1 (8,9). Επιπλέον, η ηλικία ανήκει στους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού ανάλογα με την ηλικία αυξάνεται απότομα μέχρι περίπου την ηλικία των 45-50 ετών, όπου η αύξηση είναι λιγότερο απότομη. Η ηλικία των 50 ετών θεωρείται ορόσημο, πιθανώς λόγω της επίδρασης των ορμονικών μεταβολών (εμμηνόπαυση) που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια αυτής της ηλικιακής περιόδου. Μετά την ηλικία των 50 ετών η επίπτωση του καρκίνου του μαστού παρουσιάζει ελαφρά μείωση και στις δύο φυλές (Εικόνα 1.2).

Εικόνα 1.2. Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ στρωματοποιημένη σε γυναίκες λευκής και μαύρης φυλής σε ηλικίες άνω και κάτω των 50 ετών. Στοιχεία 1975-2012. Προσαρμογή από: *SEER CANCER Statistics Review 1975-2012*.



1.2.2.2.2. Ηλικία στην εμμηναρχή και την εμμηνόπαυση.

Οι γυναίκες με πρόωμη εμμηναρχή και καθυστερημένη εμμηνόπαυση έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (39). Γυναίκες που έχουν φυσική εμμηνόπαυση μετά την ηλικία των 55 ετών έχουν δύο φορές περισσότερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού σε σχέση με τις γυναίκες που έχουν εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45 ετών (40).

1.2.2.2.3. Ηλικία πρώτης τελειόμηνης κύησης και τεκνοποίησης-Θηλασμός.

Η απουσία παιδιών και η μεγάλη ηλικία κατά την απόκτηση του πρώτου παιδιού αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ο κίνδυνος για τις γυναίκες που αποκτούν το πρώτο τους παιδί μετά την ηλικία των 30 είναι διπλάσιος απ' αυτόν των γυναικών που αποκτούν το πρώτο τους παιδί πριν την ηλικία των 20 ετών. Τέλος, η προστατευτική δράση του θηλασμού έχει αναδειχθεί σε πολλές προοπτικές και αναδρομικές μελέτες. Το μέγεθός της πιθανώς να εξαρτάται από τη διάρκεια του θηλασμού, καθώς και τον αριθμό των τοκετών (40,41,42).

1.2.2.2.4. Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού - Καλοήθεις νόσοι του μαστού-Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

Θετικό ατομικό ιστορικό διηθητικού ή in situ καρκίνου του μαστού, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου στον άλλο μαστό (Πίνακας 1.2.). Στις ασθενείς με in situ νεοπλασίες, ο κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του μαστού στον άλλο μαστό μέσα στα επόμενα 10 χρόνια υπολογίζεται στο 5% (43). Στις γυναίκες που έχουν διαγνωσθεί στο παρελθόν με διηθητικό καρκίνο του μαστού, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου στον άλλο μαστό υπολογίζεται στο 1% και 0,5% κάθε χρόνο στις προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αντίστοιχα.

Πίνακας 1.2. Χαρακτηριστικά από το ατομικό ιστορικό που συνδέονται και με αυξημένη πιθανότητα μετάλλαξης των γονιδίων BRCA1, BRCA2.

Καρκίνος μαστού σε νεαρή ηλικία
Καρκίνος ωοθηκών σε οποιαδήποτε ηλικία
Αμφοτερόπλευρος καρκίνος μαστού
Ιστορικό καρκίνου μαστού και ωοθηκών

Γυναίκες με ιστορικό σοβαρής άτυπης υπερπλασίας του επιθηλίου έχουν τέσσερις ή πέντε φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού από γυναίκες που δεν έχουν καμία υπερπλαστική αλλαγή στο μαστό. Οι γυναίκες με αυτές τις διεργασίες σε συνδυασμό και με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού (συγγενής πρώτου βαθμού) έχουν 9 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο. Γυναίκες με ψηλαφητές κύστεις, ινοαδενώματα, σκλήρυνση και μέτρια ή αυξημένη επιθηλιακή υπερπλασία (Πίνακας 1.3.) έχουν ελαφρά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (1,53-3 φορές) σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς αυτές τις αλλαγές (44,45,46,47,48). Συνήθως σε γυναίκες με αλλοιώσεις του μαστού που στη συνέχεια αναπτύσσουν καρκίνο του μαστού, η κακοήθης αλλοίωση εντοπίζεται σε διαφορετικό σημείο από αυτό της καλοήθους αλλοίωσης. Το αντίθετο όμως ισχύει για το πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS), όπου το διηθητικό στοιχείο αναπτύσσεται επί ή πολύ κοντά στην πρωτοπαθή αλλοίωση.

Πίνακας 1.3. Σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού που σχετίζεται με καλοήθεις παθήσεις.

Χωρίς αύξηση κινδύνου	Ελαφρώς αυξημένος κίνδυνος (≤ 2)	Μέτρια αυξημένος κίνδυνος (4-6)
Ήπια υπερπλασία	Ψηλαφητές κύστεις	Άτυπη Υπερπλασία
Πορεκτασία	Μέτρια υπερπλασία	
Αποκρινής Μεταπλασία	Θήλωμα	
Απλό ινοαδένωμα	Σύνθετο ινοαδένωμα	
Μικροκύστη	Σκληρυντική Αδένωση	
Περιπορική Μαστίτιδα		
Αδένωση		

Πολλές γυναίκες έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, αλλά στην πλειοψηφία αυτών των γυναικών, ο κίνδυνος δεν αυξάνεται σημαντικά (διπλασιασμός του κινδύνου) κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Μόνο το 1 % έως 2 % των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού προκαλούνται από την κληρονομικότητα ενός αυτοσωματικού κυρίαρχου γονιδίου υψηλής διεισδυτικότητας, η οποία προσδίδει έναν ισόβιο κίνδυνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους έως και 85% εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Σε μερικές οικογένειες υπάρχει επίσης υψηλός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών. Παράμετροι μέσα από το οικογενειακό ιστορικό που υποδηλώνουν πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου μπορούν να προκληθούν από ένα τέτοιο γονίδιο υψηλής διεισδυτικότητας και περιλαμβάνουν:

- Δύο ή περισσότερα πρώτου βαθμού (γονέα, αδελφό ή παιδί) ή δεύτερου βαθμού (γιαγιά, εγγονή, θεία, ανιψιά, ετεροθαλής συγγενής) συγγενείς με καρκίνο του μαστού ή των ωοθηκών.
- Εμφάνισή καρκίνου του μαστού πριν από την ηλικία των 50 ετών (πριν την εμμηνόπαυση) σε ένα στενό συγγενή.

- Οικογενειακό ιστορικό τόσο του μαστού όσο και του καρκίνου των ωοθηκών.
- Ένας ή περισσότεροι συγγενείς με 2 καρκίνους (καρκίνος μαστού και καρκίνος των ωοθηκών ή 2 ανεξάρτητους καρκίνους του μαστού).
- Άνδρες συγγενείς με καρκίνο του μαστού.
- Δύο γονίδια ευαισθησίας του καρκίνου του μαστού έχουν πρόσφατα ταυτοποιηθεί, τα BRCA1 και BRCA2. Αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνα για περίπου 40% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού που κληρονομείται. Σε ασθενείς με μεταλλάξεις BRCA1, ο μέσος αθροιστικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου από την ηλικία των 70 ετών κυμαίνεται μεταξύ 55% και 85% για τον καρκίνο του μαστού και μεταξύ 16% και 60% για τον καρκίνο των ωοθηκών. Σε ασθενείς με μετάλλαξη του γονιδίου BRCA2, οι κίνδυνοι κυμαίνονται 37% και 85% για τον καρκίνο του μαστού, καθώς και μεταξύ 11% και 27% για τον καρκίνο των ωοθηκών (48,49,50).

1.2.2.2.4. Κλινικό ιστορικό και σημασία του ιστορικού βιοψιών μαστού στο παρελθόν - Εκθεση σε ακτινοβολία.

Η ιονίζουσα ακτινοβολία τόσο λόγω πυρηνικών ατυχημάτων όσο και για λόγους διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού με το 1% των καρκίνων στις ΗΠΑ να αποδίδεται στην ετήσια μαστογραφία. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε νεαρά άτομα που έχουν επιβιώσει μετά από θεραπεία με λήψη ακτινοβολίας. Μεταξύ των γυναικών με νόσο του Hodgkin που έλαβαν θεραπεία με ακτινοβολία μανδύα τομέα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνεται σημαντικά 15 με 30 χρόνια μετά την ακτινοθεραπεία (51,52,53,54,55,56,57,58).

Οι πιο καλά χαρακτηρισμένες προκαρκινικές αλλοιώσεις είναι οι εξής: άτυπη πορογενής υπερπλασία (atypical ductal hyperplasia, ADH), άτυπη λοβιακή υπερπλασία (atypical lobular hyperplasia, ALH) και το λοβιακό καρκίνωμα in situ (lobular carcinoma in situ, LCIS). Οι LCIS και ALH μαζί περιγράφονται ως λοβιακή νεοπλασία,

η οποία συνδέεται ουσιαστικά με αυξημένο κίνδυνο μεταγενέστερης εμφάνισης καρκίνου του μαστού, με τις εκτιμήσεις του κινδύνου εμφάνισης κατά τη διάρκεια της ζωής του ασθενή να κυμαίνονται από 10% έως 20%. Η ADH αποτελεί μέρος των παθήσεων του μαστού που προέρχονται εκ του πόρου και κυμαίνονται από τη συνηθισμένη πορογενή υπερπλασία μέχρι το πορογενές καρκίνωμα *in situ* (DCIS). Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας από τους Agrino et al. δείχνει έναν 4 έως 5 φορές αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διηθητικού καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με ADH μετά από μια μέση περίοδο παρακολούθησης 17 ετών, ο οποίος διπλασιάζεται αν η γυναίκα έχει σχετικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού.

Η LCIS, η οποία μόλις αναγνωρίστηκε ως πρόδρομος για την εμφάνιση διηθητικού καρκινώματος, θεωρείται σήμερα ως δείκτης αυξημένου κινδύνου για καρκίνο του μαστού, με εμφάνιση στις περισσότερες περιπτώσεις πολυεστιακή και διμερή. Περισσότερο από το 50% των ασθενών με LCIS εμφανίζουν πολλαπλές εστίες στον ομόπλευρο μαστό και περίπου το 30% των ασθενών εμφανίζουν LCIS στον ετερόπλευρο μαστό. Η LCIS θεωρείται σε κάθε περίπτωση δείκτης αυξημένου κινδύνου καρκίνου του μαστού. Σε αντίθεση, το DCIS (ονομάζεται επίσης ενδοπορογενές καρκίνωμα) αντιπροσωπεύει το στάδιο της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού κατά το οποίο οι περισσότερες από τις μοριακές αλλαγές που χαρακτηρίζουν τον διηθητικό καρκίνο του μαστού είναι ήδη παρούσες, ακόμη και αν η βλάβη δεν έχει παρουσιάσει πλήρως κακοήγη φαινότυπο. Το DCIS είναι λοιπόν ένας πρόδρομος για εμφάνιση διηθητικού καρκίνου του μαστού.

Μια συστηματική ανασκόπηση δημοσιευμένων μελετών που πραγματοποιεί ο Οργανισμός Υγείας, Περίθαλψης, Έρευνας και Ποιότητας στις ΗΠΑ (Agency for Health care Research and Quality) παρουσίασε ότι μέσα σε 5 χρόνια μετά τη διάγνωση LCIS, 4,2% σε 9,3% των ασθενών διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού. Σε μελέτες που ακολούθησαν σε ασθενείς για περισσότερα από 5 χρόνια, η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου ήταν 7,7% σε 26,3% των ασθενών (51,52,53,54).

1.2.2.2.5. Μαστογραφική Πυκνότητα

Η μεγάλη πυκνότητα μαστών στη μαστογραφία συνδέεται στενά με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, μετά την ηλικία και τις μεταλλάξεις στο γονίδιο του καρκίνου του μαστού. Μια μετα-ανάλυση 42 μελετών έδειξε ότι οι γυναίκες στο υψηλότερο τεταρτημόριο μαστογραφικής πυκνότητας εμφανίζουν κίνδυνο καρκίνου του μαστού περίπου 4 έως 6 φορές υψηλότερο από εκείνον των γυναικών παρόμοιας ηλικίας στο χαμηλότερο τεταρτημόριο. Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Boyd et al. υπέδειξαν επίσης μια συσχέτιση μεταξύ του καρκίνου του μαστού και της εκτεταμένης μαστογραφικής πυκνότητας, ακόμη και όταν η μαστογραφική πυκνότητα ήταν παρούσα μέχρι και 8 χρόνια πριν από τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι η συσχέτιση μεταξύ εκτεταμένης μαστογραφικής πυκνότητας και εμφάνισης αυξημένου κινδύνου καρκίνου του μαστού δεν παρουσιάζεται μόνο λόγω του ότι η αυξημένη μαστογραφική πυκνότητα θα μπορούσε να συγκαλύψει έναν καρκίνο, αλλά επίσης και λόγω της βιολογικής σύνδεσης μεταξύ της πυκνότητας του μαστού και του καρκίνου του μαστού (59,60). Σε γενικές γραμμές μαστογραφία υψηλής πυκνότητας –δηλαδή πυκνή μαστογραφική εμφάνιση, η οποία υποδηλώνεται ως >75% της συνολικής μαστικής επιφάνειας, υποδεικνύει μεγαλύτερο από τετραπλάσιο κίνδυνο καρκίνου του μαστού, σε σχέση με μια μαστογραφία χαμηλής πυκνότητας, δηλαδή πυκνή μαστογραφική εμφάνιση <25% της συνολικής μαστικής επιφάνειας. Η πυκνότητα του μαστού δεν χρησιμοποιείται συνήθως σήμερα σαν παράγοντας αξιολόγησης στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Στο μέλλον ωστόσο, η μαστογραφική πυκνότητα θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο παράγοντα στην αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού και στην καθοδήγηση όσον αφορά στα μέτρα για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού (59,60,61). Η ιστολογική ταξινόμηση των επιθηλιακών όγκων του μαστού κατά τον Π.Ο.Υ φαίνεται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4 Ιστολογική ταξινόμηση επιθηλιακών όγκων του μαστού κατά τον Π.Ο.Υ.

Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, μη ειδικού τύπου (Not Otherwise Specified – NOT)
• Μεικτού τύπου • Πλειόμορφο • Με γιγαντοκύτταρα τύπου οστεοκλαστών • Με μελανωτικούς χαρακτήρες
Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα
Σωληνώδες καρκίνωμα
Διηθητικό ηθμοειδές καρκίνωμα
Μυελοειδές καρκίνωμα
Βλεννώδες καρκίνωμα και άλλοι όγκοι πλούσιοι σε βλέννη
• Βλεννώδες • Κυσταδένωμα και βλεννώδες καρκίνωμα από κυλινδρικά κύτταρα • Καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου
Νευροενδοκρινείς όγκοι
• Συμπαγείς νευροενδοκρινείς • Άτυπο καρκινοειδές • Μικροκυτταρικό • Από μεγάλα κύτταρα
Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα
Αποκρινές καρκίνωμα
Μεταπλαστικό καρκίνωμα
• Αμιγή επιθηλιακά μεταπλαστικά καρκινώματα • Μεικτά επιθηλιακά / μεσεγχυματικά μεταπλαστικά καρκινώματα
Καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια
Εκκριτικό καρκίνωμα
Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα
Αδενοκυστικό καρκίνωμα

Κυψελιδικό καρκίνωμα
Καρκίνωμα από διαυγή κύτταρα πλούσια σε γλυκογόνο
Σμηγματογόνο καρκίνωμα
Φλεγμονώδες καρκίνωμα
Λοβιακό <i>in situ</i> καρκίνωμα (LCIS)
Ενδοπορικές υπερπλαστικές αλλοιώσεις • Απλή υπερπλασία πόρων • Επίπεδη επιθηλιακή ατυπία • Άτυπη υπερπλασία πόρων • Πορογενές <i>in situ</i> καρκίνωμα (DCIS) (χαμηλής, μέτριας, υψηλής διαφοροποίησης)
Μικροδιηθητικό καρκίνωμα
Ενδοπορικά θηλώδη νεοπλάσματα • Κεντρικό θηλώδες • Περιφερικό θηλώδες • Άτυπο θηλώδες • Ενδοπορικό θηλώδες καρκίνωμα • Ενδοκυστικό θηλώδες καρκίνωμα
Καλοήθεις υπερπλαστικές αλλοιώσεις • Αδένωση • Αδενώματα • Ακτινωτή ουλή

1.2.2.2.6. Σωματοδομικά χαρακτηριστικά - Σωματική δραστηριότητα - Διαιτητικοί παράγοντες και τρόπος ζωής.

Το βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) έχουν αντίθετη επίδραση στον καρκίνο του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, σε σύγκριση με τον καρκίνο του μαστού στις προεμμηνοπαυσιακές. Η παχυσαρκία σχετίζεται με διπλασιασμό του σχετικού κινδύνου στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ

ανάμεσα στις πρόεμμηνοπαυσιακές σχετίζεται με ελαφρώς μειωμένο σχετικό κίνδυνο. Συνολικά, ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει περίπου 1% για κάθε επιπλέον χιλιόγραμμο βάρους (62,63,64).

Οι μεγάλες διακυμάνσεις στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού ανάμεσα σε γυναίκες διαφορετικών εθνικοτήτων με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, οδήγησε στην υπόθεση ότι η υψηλή κατανάλωση λίπους σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης της νόσου. Ωστόσο, μετα-αναλύσεις σχετικών επιδημιολογικών μελετών δεν επιβεβαίωσαν την παραπάνω υπόθεση. Η παχυσαρκία σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ σε συνδυασμό με την καθιστική ζωή αποτελούν μείζονα παράγοντα κινδύνου. Αντιθέτως, προεμμηνοπαυσιακά η παχυσαρκία φαίνεται να προστατεύει από την εμφάνιση καρκίνου του μαστού πιθανώς επειδή συνδέεται με αυξημένους ανωορρηκτικούς κύκλους (65,66).

Η υιοθέτηση του δυτικού τρόπου ζωής που αποτελεί συνδυασμό αυξημένου δείκτη μάζας σώματος και καθιστικής ζωής από τη μια πλευρά καθώς και προχωρημένης τεκνοποίησης, μικρού αριθμού τέκνων και μειωμένης διάρκειας θηλασμού από την άλλη μπορούν να θεωρηθούν καθοριστικοί παράγοντες για την αυξημένη επίπτωση της νόσου στις αναπτυγμένες χώρες (67,68).

1.2.2.3.Μικροπεριβαλλοντικοί και μακροπεριβαλλοντικοί παράγοντες

1.2.2.3.1. Λήψη Αλκοόλ

Σχετίζεται θετικά με την αύξηση της συχνότητας ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Επίσης, η λήψη αλκοόλ έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς (69,70,71,72).

1.2.2.3.2. Κάπνισμα

Η σχέση μεταξύ καρκίνου του μαστού και του καπνίσματος παραμένει περίπλοκη, καθώς η αλληλεπίδραση του καπνίσματος με ορμονικές αλληλεπιδράσεις και με αλκοόλ

μεταβάλλει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Τελευταίες μελέτες δείχνουν μια σχετική αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης της νόσου (72,73,74).

1.2.2.3.3. Λήψη Αντισυλληπτικών

Κατά την διάρκεια κατά την οποία οι γυναίκες λαμβάνουν αντισυλληπτικά και για 10 χρόνια μετά την διακοπή αυτών εμφανίζεται μικρή αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Οι γυναίκες που έχουν κάνει χρήση αντισυλληπτικών στη ζωή τους σε σχέση με αυτές που δεν έχουν κάνει διαγιγνώσκονται συνήθως με κακοήθεις νεοπλασίες σε πιο προχωρημένο κλινικό στάδιο. Η συνολική επίδραση των αντισυλληπτικών στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι μικρή (75,76).

1.2.2.3.4. Θεραπεία υποκατάστασης με ορμόνες.

Η παρατεταμένη έκθεση και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των ενδογενών οιστρογόνων αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Οι πρώτες αναφορές για αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε άτομα που λαμβάνουν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης υπήρχαν ήδη από το 1970. Μεταξύ των γυναικών που βρίσκονται τώρα σε θεραπεία υποκατάστασης με ορμόνες και αυτών που σταμάτησαν την θεραπεία πριν 1-4 χρόνια, ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει 1023 φορές για κάθε χρόνο χρήσης. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος μετά από συνδυασμένη λήψη οιστρογόνων και προγεστερόνης.

Η ορμονοθεραπεία αυξάνει την πυκνότητα του μαστού και ελαττώνει την ειδικότητα και την ευαισθησία των απεικονιστικών μεθόδων ανίχνευσής του. Οι καρκίνοι που διαγιγνώσκονται σε γυναίκες που λαμβάνουν ορμονοθεραπεία είναι λιγότερο πιθανό να βρίσκονται σε προχωρημένο κλινικό στάδιο σε σχέση με αυτούς που διαγιγνώσκονται σε γυναίκες που δεν έχουν χρησιμοποιήσει ποτέ τέτοιους παράγοντες. Οι τρέχουσες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η ορμονοθεραπεία δεν αυξάνει την θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού (77,78,79).

1.2.3. Προληπτικός έλεγχος για τον καρκίνο του μαστού.

Ο προληπτικός έλεγχος στα πλαίσια της πρωτογενούς πρόληψης του καρκίνου του μαστού παραμένει το κύριο όπλο για την πρόωπη διάγνωση και την αντιμετώπιση του με στόχο τη μείωση της θνησιμότητας από τη νόσο. Ο προληπτικός έλεγχος μπορεί να εφαρμόζεται στους πληθυσμούς σε κίνδυνο ή στις ομάδες με αυξημένο κίνδυνο μέσω διαδικασιών απλών στην εφαρμογή τους, με μικρό κόστος, απόδοση εύκολα ερμηνεύσιμων αποτελεσμάτων και ταυτοποίηση των ασθενών με νόσο.

1.2.3.1. Κλινική εξέταση μαστού.

Η αυτοεξέταση, η κλινική εξέταση από ειδικό καθώς και οι απεικονιστικές μέθοδοι, δηλαδή η κλασική και η ψηφιακή μαστογραφία, η υπερηχοτομογραφία και η μαγνητική μαστογραφία αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο στη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, η οποία φυσικά επιβεβαιώνεται είτε με την αναρρόφηση δια λεπτής βελόνης (FNA, Fine Needle Aspiration) είτε με τη βιοψία με κόπτουσα βελόνη και την ανοιχτή χειρουργική βιοψία.

Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του μαστού (42%) ανιχνεύουν μόνες τους με την αυτοεξέταση κάποιο ύποπτο σημείο και καταφεύγουν σε κάποιο σύμβουλο υγείας, ενώ μόνο σε ένα ποσοστό 24% γυναικών με καρκίνο του μαστού, ανακαλύπτεται αυτός κατά την κλινική εξέταση από τον γιατρό (80).

Γυναίκες σε ηλικία άνω των 20 ετών πρέπει να εξετάζονται μόνες τους κάθε μήνα την 5^η-10^η ημέρα του κύκλου, ώστε να ανακαλύψουν έγκαιρα κάθε ύποπτη ανωμαλία. Σε ηλικίες από 20 έως 39 ετών συνιστάται η κλινική εξέταση των μαστών από ειδικό γιατρό.

1.2.3.2. Μαστογραφία

Ως μαστογραφία ορίζεται η ακτινογραφία των μαστών, η οποία μπορεί να είναι προληπτική ή διαγνωστική. Η προληπτική μαστογραφία πραγματοποιείται σε γυναίκες που δεν έχουν συμπτώματα ή σημάδια της νόσου. Πρόκειται για δύο λήψεις του κάθε μαστού σε κεφαλουραία και πλάγια προβολή, όπου μπορούν να απεικονιστούν

αλλοιώσεις που δεν γίνονται αντιληπτές από την κλινική εξέταση, καθώς η μαστογραφία μπορεί να αναδείξει παθολογικά ευρήματα με μέση διάμετρο τα 8 mm, ενώ μια αλλοίωση πρέπει να έχει διάμετρο της τάξης των 15 mm για να είναι κλινικά ανιχνεύσιμη. Η προληπτική μαστογραφία είναι η εξέταση εκλογής για την ανίχνευση και διερεύνηση των αποτιτανώσεων όταν δε συνοδεύονται από κλινικό εύρημα, που σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ενδεικτικά σημεία κακοήθειας (81,82,83,84,85).

Όταν υπάρχει κλινικό εύρημα ή σύμπτωμα, τότε η μαστογραφία που γίνεται ονομάζεται διαγνωστική. Τα ευρήματα ταξινομούνται συνήθως με το σύστημα BI-RADS ως εξής: 0 Ατελής εξέταση, 1 Φυσιολογικό, 2 Καλόηθες, 3 Μη ειδικό, 4 Ύποπτο, 5 Κακόηθες (Πίνακας 1.5.).

Σε περίπτωση ευρημάτων BI-RADS 4 ή 5 απαιτείται περαιτέρω έλεγχος με στερεοτακτική βιοψία, ενώ σε περίπτωση βλαβών BI-RADS 3 συνιστάται παρακολούθηση στις περισσότερες περιπτώσεις (86,87,88,89,90). Εκτός από την παρουσία ψηλαφητής διόγκωσης, συμπτώματα που σχετίζονται με πιθανή κακοήθεια είναι η πάχυνση του δέρματος, η εισολκή της θηλής, η ερυθρότητα ή ο πόνος που συνήθως εμφανίζονται και σε αρκετές καλοήθεις καταστάσεις, κάτι που καθιστά τη διάκριση δυσχερή. Ως διαγνωστική μαστογραφία αναφέρονται και όλες οι συμπληρωματικές, εξειδικευμένες μαστογραφικές λήψεις με εντόπιση και μεγέθυνση που διενεργούνται για τη διερεύνηση συγκεκριμένων ευρημάτων ή μεταβολών των μαστών που προκύπτουν κατά τη διάρκεια προληπτικών μαστογραφιών (86,87,88).

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του μαστού μέσω της προληπτικής μαστογραφίας σημαίνει ότι η αντιμετώπιση και η θεραπεία μπορούν να αρχίσουν σε πρώιμο στάδιο, πριν συμβεί διασπορά της νόσου. Τελευταίες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η προληπτική μαστογραφία μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του αριθμού των θανάτων από καρκίνο του μαστού σε γυναίκες μεγαλύτερες των 40 ετών.

Πίνακας 1.5. Ταξινόμηση ευρημάτων στη μαστογραφία κατα BI-RADS. Προσαρμογή από: *Sampat, M., Markey, M. and Bovik A. 2005. Computer-aided detection and diagnosis in mammography, Handbook of Image and Video Processing, A.C. Bovik Ed. New York: Academic, 1195-1217.*

Κατηγορία	Σύσταση	Πιθανότητα κακοήθειας
0: Ατελής	Περαιτέρω εκτίμηση	Δεν υπολογίζεται
1: Φυσιολογική	Τακτικός έλεγχος	0%
2: Καλοήθης	Τακτικός έλεγχος	%
3: Πιθανόν καλοήθης	Επανελέγχος σε μικρό χρονικό διάστημα	$\leq 2\%$
4: Ύποπτη για κακοήθεια	Πιθανή σύσταση για βιοψία	$>2\%$, $<95\%$
5: Πολύ ύποπτη για κακοήθεια	Διενέργεια βιοψίας ή χειρουργικής εξαίρεσης	4A : μικρή ατυπία 4B: μέτρια ατυπία 4C: υψηλή ατυπία
6: Τεκμηριωμένη με βιοψία κακοήθεια	Κατάλληλη θεραπεία	$\geq 95\%$

1.2.3.2.1. Πότε γίνεται η μαστογραφία;

Σε αντίθεση με το παρελθόν όπου οι οδηγίες για τον προληπτικό μαστογραφικό έλεγχο ήταν οι ίδιες για όλες τις γυναίκες ανεξάρτητα από τους παράγοντες κινδύνου, στις μέρες μας η SBI (Society of Breast Imaging) και το ACR (American College of Radiology) καθόρισαν διαφορετικό χρονοδιάγραμμα ανάλογα με γενετικούς και κληρονομικούς παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα, λοιπόν, με την SBI και το ACR προτείνεται:

- η ετήσια μαστογραφία σε όλες τις γυναίκες μετά την ηλικία των 40 ετών ή σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα δηλαδή σε γυναίκες με γνωστή μετάλλαξη των γονιδίων BRCA1 ή BRCA2 ή σε γυναίκες που δεν έχουν ελεγχθεί για τέτοιου είδους γονιδιακή προδιάθεση, αλλά

έχουν συγγενείς πρώτου βαθμού (μητέρες, αδελφές ή κόρες) που αποδεδειγμένα έχουν μετάλλαξη των BRCA γονιδίων συνιστάται η ετήσια μαστογραφία μετά την ηλικία των 30 ετών.

- Η διενέργεια μαστογραφίας ενδείκνυται σε γυναίκες που από το ιστορικό τους προκύπτει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο με 20%, λόγω εμφάνισης κακοήθειας του μαστού σε συγγενικά πρόσωπα. Συγκεκριμένα συνιστάται ετήσιος προληπτικός μαστογραφικός έλεγχος 10 χρόνια νωρίτερα από τη μικρότερη από τις ηλικίες διάγνωσης των προσβεβλημένων συγγενών, ποτέ όμως πριν από τα 25 έτη.

Ο κίνδυνος εμφάνισης κακοήθειας στο μαστό όπως έχει προαναφερθεί υπολογίζεται μέσω συγκεκριμένων μεθόδων με σημαντικότερες τις Gail, Claus και BRCAPRO με βάση διαφορετικά δεδομένα του ιστορικού και υπολογίζονται διαφορετικοί παράγοντες κινδύνου που αυξάνουν την πιθανότητα κάθε γυναίκας να εμφανίσει καρκίνο στο μαστό (90,91,92,93,94,95). Συγκεκριμένα:

- Σε γυναίκες με μητέρα ή αδελφές που εμφάνισαν προεμμηνοπαυσιακό καρκίνο συνιστάται ετήσια μαστογραφία στην ηλικία των 30 ετών ή 10 χρόνια πριν από την ηλικία της διάγνωσης στο νεότερο προσβεβλημένο συγγενή (όποιος συγγενής έχει προσβηθεί πιο αργά).
- Σε γυναίκες με ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών, για τις οποίες υπάρχει 3 έως 4 φορές μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης επακόλουθης κακοήθειας στο μαστό συνιστάται ετήσια μαστογραφία από την ηλικία εμφάνισης της κακοήθειας των ωοθηκών.
- Σε γυναίκες που έχουν λάβει ακτινοβολία στο θώρακα (συνήθως μετά την εμφάνιση νόσου Hodgkin) στην ηλικία μεταξύ 10 και 30 ετών συνιστάται ετήσια μαστογραφία 8 χρόνια μετά τη λήξη της ακτινοβολίας, αλλά όχι πριν από τα 25 έτη.
- Σε γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε βιοψία και έχει αποδειχθεί ότι πάσχουν από λοβιακού τύπου νεοπλασία (LCIS ή λοβιακή άτυπη υπερπλασία), άτυπη πορογενή υπερπλασία (ADH), πορογενές ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (DCIS) και τέλος διηθητικό καρκίνο του μαστού συνιστάται ετήσια μαστογραφία από τη στιγμή της διάγνωσης ανεξάρτητα από την ηλικία διάγνωσης.

1.2.3.2.2. Ψηφιακή ή αναλογική μαστογραφία;

Σημαντικές μελέτες δείχνουν αντίστοιχη ευαισθησία των δύο μεθόδων στη συνολική ανίχνευση των καρκίνων του μαστού, παρόλα αυτά η ψηφιακή μαστογραφία χαρακτηρίζεται από υψηλότερη αντίθεση και ανάλυση σε σχέση με την αναλογική, με αποτέλεσμα να είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη για τη διερεύνηση προεμμηνοπαυσιακών ή περιεμμηνοπαυσιακών γυναικών ή γυναικών με πυκνούς μαστούς και επειδή δίνει πολύ περισσότερες πληροφορίες, θεωρείται η εξέταση εκλογής (91).

1.2.3.2.3. Πότε σταματά ο προληπτικός μαστογραφικός έλεγχος;

Καμία από τις στατιστικές μελέτες που αφορούν τη σχέση της μαστογραφίας με τη μείωση της θνητότητας δεν περιλαμβάνουν τις ηλικιακές ομάδες μετά τα 74 έτη. Παρόλα αυτά έχει αποδειχθεί ότι η ευαισθησία και η προγνωστική αξία της μαστογραφίας αυξάνονται ανάλογα με την αύξηση της ηλικίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μελέτη που περιέλαβε περίπου 700.000 γυναίκες ηλικίας 66 ως 79 ετών, όπου η συχνότητα του μεταστατικού καρκίνου του μαστού παρουσίαζε μείωση της τάξης του 43% σε αυτές που ακολουθούσαν πρόγραμμα προληπτικού μαστογραφικού ελέγχου, αποτελέσματα που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει ηλικία πέρα από την οποία πρέπει να σταματά η προληπτική μαστογραφία.

1.2.3.2.4. Προληπτική εξέταση με υπερηχογράφημα

Το υπερηχογράφημα είναι μια απεικονιστική μέθοδος, η οποία εκπέμπει υψηλής συχνότητας ηχητικά κύματα στο μαστό και στη συνέχεια τα μετατρέπει σε εικόνες μέσω μιας ειδικής κεφαλής. Η έλλειψη ακτινοβολίας αποτελεί το κυριότερο πλεονέκτημα της μεθόδου. Το υπερηχογράφημα δεν χρησιμοποιείται ως αποκλειστική μέθοδος πρόληψης, αλλά συμπληρωματικά κυρίως, συνοδευόμενη πάντα με τη μαστογραφία (96,97,98,99).

Αρκετές δημοσιευμένες μελέτες ανέδειξαν τη χρησιμότητα του υπερηχογραφήματος ως προληπτικής διαγνωστικής μεθόδου, ιδιαίτερα σε γυναίκες με πυκνούς μαστούς, δηλαδή

σε ασθενείς στις οποίες ο μαζικός αδένας καταλαμβάνει έκταση μεγαλύτερη του 50%. Όπως είναι γνωστό, η πυκνότητα των μαστών ελαττώνει σημαντικά την ευαισθησία της μαστογραφίας, με αποτέλεσμα να συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου κατά 2-6 φορές. Ως εκ' τούτου η συμπληρωματική χρήση του υπερηχογραφήματος συμβάλλει στην ανίχνευση περισσότερων δυσδιάκριτων από τη μαστογραφία κακοηθειών. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι όταν χρησιμοποιήθηκε το υπερηχογράφημα ως προληπτική διαγνωστική μέθοδος σε ασυμπτωματικές γυναίκες με πυκνούς μαστούς, παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό της ανίχνευσης κακοηθειών από 2,8 ανά 1.000 που ήταν μόνο με τη μαστογραφία σε 4,6 ανά 1.000. Στα μειονεκτήματα όμως συμπεριλαμβάνονται η υποκειμενικότητα της μεθόδου, σε συνδυασμό με τα πολλά ψευδώς θετικά αποτελέσματά της, δηλαδή τη χαμηλή ευαισθησία της και την αδυναμία της να διακρίνει ενδοεπιθηλιακούς όγκους (DCIS). Στην περίπτωση αυτή η MRI (μαγνητική μαστογραφία) του μαστού με εξαιρετικά αυξημένη ευαισθησία, αποτελεί την εξέταση εκλογής.

Αντιθέτως, στην περίπτωση συμπτωματικών ασθενών ενδείκνεται το υπερηχογράφημα έναντι της μαστογραφίας, ιδιαίτερα σε νεαρές γυναίκες με πυκνότερους μαστούς. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται η ικανότητά της εξέτασης να διακρίνει τα κυστικά από τα συμπαγή μορφώματα, τα καλοήγη από τα ύποπτα και να κατευθύνει τις παρακεντήσεις και τις βιοψίες όταν αποφασιστεί η ιστολογική τους διερεύνηση (100,101,102,103,104,105).

1.2.3.2.5. Μαγνητική μαστογραφία (MRM)

Παρότι η μαγνητική μαστογραφία είναι μέθοδος ευρέως αποδεκτή στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, στην Ελλάδα εφαρμόζεται σε λίγα κέντρα λόγω ανεπαρκής ενημέρωση των κλινικών ιατρών σχετικά με τις ενδείξεις και τους περιορισμούς της μεθόδου. Γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας είναι προτιμότερο να υποβάλλονται σε μαγνητική μαστογραφία μεταξύ 7ης και 14ης ημέρας του εμμηνορρυσιακού κύκλου, για να μειωθεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών ευρημάτων. Πρίν την εξέταση πρέπει να αποκλείονται η ύπαρξη καρδιακού βηματοδότη και μεταλλικών ξένων σωμάτων, ενώ σε περίπτωση κλειστοφοβίας των ασθενών μπορεί να δοθεί ήπια νάρκωση.

Συγκριτικά με τις υπόλοιπες τεχνικές απεικόνισης του μαστού (μαστογραφία και υπερηχογράφημα) η μαγνητική μαστογραφία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στο διηθητικό καρκίνο του μαστού. Τα ποσοστά ευαισθησίας κυμαίνονται από 89% έως 100% και είναι μεγαλύτερα από αυτά της ψηφιακής μαστογραφίας. Ο βαθμός στον οποίο η ευαισθησία της μαστογραφίας και μαγνητικής μαστογραφίας διαφέρουν στον ίδιο ασθενή εξαρτάται από την πυκνότητα των μαστών και τον τύπο του καρκίνου, ενώ η ευαισθησία της μαγνητικής μαστογραφίας δεν επηρεάζεται από την πυκνότητα του αδένα και από την ύπαρξη ουλώδη ιστού έπειτα από εγχείρηση, ακτινοβολία ή την παρουσία ενθεμάτων (106,107,108). Επίσης η ευαισθησία της μεθόδου στον πορογενή in situ καρκίνο του μαστού είναι χαμηλότερη συγκριτικά με τον διηθητικό καρκίνο με την εφαρμογή συγκεκριμένων διαγνωστικών κριτηρίων καθώς η μαγνητική μαστογραφία μπορεί να αναδείξει 40% των DCIS (κυρίως των high-grade), τα οποία δεν αναδεικνύονται με τη μαστογραφία.

Συνήθεις περιπτώσεις όπου η συμβολή της μαγνητικής μαστογραφίας είναι σημαντική για τη λήψη αποφάσεων, αποτελούν εκείνες κατά τις οποίες τίθεται ζήτημα:

1. διαφορικής διάγνωσης μεταξύ μεταθεραπευτικής ουλής και υποτροπής καρκίνου
2. διάκρισης άτυπης καλοήθους βλάβης (όπως κύστης είτε με παχύρρευστο περιεχόμενο είτε επιπλακείσας, ινοαδενώματος) από καρκίνο
3. αξιολόγησης εστιακής ή περιοχικής ασυμμετρίας, χωρίς αποτιτανώσεις, στη μαστογραφία,
4. διερεύνησης ευρήματος που είναι εμφανές μόνο σε μια προβολή της μαστογραφίας,
5. αξιολόγησης ύποπτων μικροαποτιτανώσεων στη μαστογραφία.

Επιπροσθέτως κατά τον προεγχειρητικό έλεγχο, το μέγεθος των όγκων του καρκίνου του μαστού είναι δυνατό να υποεκτιμάται στη μαστογραφία και στο υπερηχογράφημα σε αντίθεση με τη μαγνητική μαστογραφία, ειδικά σε όγκους διαμέτρου μεγαλύτερης των 2 εκ. με αποτέλεσμα την εμφάνιση διηθημένων εγχειρητικών ορίων. Επιπλέον, σε ποσοστό 25% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού ο όγκος είναι πολυεστιακός και σε ποσοστό 20% πολυκεντρικός και η ευαισθησία της μεθόδου στην προεγχειρητική σταδιοποίηση εμφανίζεται να είναι 100% ενώ αναδεικνύει επιπλέον εστίες στο 10%-30% των ασθενών. Επίσης, η μαγνητική μαστογραφία αξιολογεί καλύτερα τυχόν ενδοπορικό τμήμα του όγκου. Η προεγχειρητική σταδιοποίηση με μαγνητική μαστογραφία είναι ιδιαίτερα

χρήσιμη σε ασθενείς με πυκνούς μαστούς και σε ασθενείς με ιστολογική επιβεβαίωση διηθητικού λοβιακού καρκίνου, όπου εμφανίζεται ένα διάχυτα διηθητικό (permeative) πρότυπο ανάπτυξης, το οποίο καθιστά δύσκολη τη μέτρηση των διαστάσεων του όγκου, ο οποίος εμφανίζεται σε υψηλότερα ποσοστά πολυκεντρικός και πολυεστιακός (32%).

Η προσυμπτωματική διάγνωση του οικογενούς και κληρονομικού καρκίνου του μαστού είναι πολλές φορές δύσκολη, με τη μαστογραφία να μπορεί να διαγνώσει λιγότερους από τους μισούς καρκίνους που εμφανίζονται στις φορείς γονιδιακών μεταλλάξεων BRCA. Αναμφισβήτητα όλες οι τελευταίες μελέτες συγκλίνουν στο ότι η πρόωπη διάγνωση του καρκίνου του μαστού βελτιώνεται σημαντικά όταν η μαγνητική μαστογραφία περιλαμβάνεται στο ετήσιο πρόγραμμα προσυμπτωματικού ελέγχου με την ευαισθησία της μαγνητικής μαστογραφίας να κυμαίνεται στο 79%-98%. Επιπλέον, η θετική προγνωστική αξία (PPV) της μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ 35%-64% συγκρινόμενη με τη χαμηλότερη αντίστοιχη επίδοση της μαστογραφίας και του υπερηχογραφήματος. Παρόλα αυτά, μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αυξημένη συχνότητα ψευδών θετικών διαγνώσεων, η οποία ωστόσο δύναται να μειωθεί στους επόμενους επανελέγχους (109,110,111).

Σύμφωνα με πρόσφατες οδηγίες της Αμερικανικής Αντικαρκινικής Εταιρείας, συνιστάται ετήσιος προσυμπτωματικός έλεγχος με μαγνητική μαστογραφία όλων των γυναικών που:

1. Είναι αποδειγμένα φορείς μετάλλαξης BRCA1, BRCA2, TP53 ή PTEN είτε έχουν πρώτου βαθμού συγγένεια με φορέα τέτοιας γονιδιακής μετάλλαξης.
2. Έχουν διά βίου πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου μαστού μεγαλύτερη ή ίση του 20%, σύμφωνα με μοντέλα υπολογισμού κινδύνου που στηρίζονται στην παρουσία ισχυρού οικογενειακού ιστορικού καρκίνου μαστού ή ωοθηκών.
3. Υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία θώρακα σε ηλικία 10- 30 ετών για νόσο Hodgkin.

Για τη μεγιστοποίηση της υψηλότερης ευαισθησίας της μεθόδου πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα MR καθοδηγούμενης βιοψίας. Συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για διαδερμική βιοψία (λήψη ιστοτεμαχιδίων ή βιοψία κενού-vacuum biopsy) ή σήμανση αυτών με MR-καθοδήγηση. Η λήψη βιοψίας είναι, γενικά, εφικτή σε βλάβες διαμέτρου μεγαλύτερης του 1 εκ., ενώ για εστίες μικρότερες του 1 εκ. προτείνεται σήμανση με ειδικό σύρμα και χειρουργική εξαίρεση. Επίσης, έχουν περιγραφεί τεχνικές MR

καθοδηγούμενης διαδερμικής κατάλυσης (thermal ablation) μικρών όγκων του μαστού (112,113,114).

Τέλος, όταν υπάρχει κλινική υποψία μεταστατικού καρκίνου του μαστού και αρνητικός μαστογραφικός έλεγχος, τελευταίες μελέτες παρουσιάζουν ότι στο 50% των περιπτώσεων υπάρχουν ευρήματα στη μαγνητική μαστογραφία. Συγκεκριμένα, όταν υπάρχουν διηθημένοι μασχαλιαίοι λεμφαδένες, η μαγνητική μαστογραφία αναδεικνύει τον πρωτοπαθή όγκο στο 75%-85% των ασθενών, επηρεάζοντας την επιλογή κατάλληλης θεραπείας (114).

1.2.3.3 Νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι

Νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι με βελτιωμένη ειδικότητα και ευαισθησία παρουσιάζονται τα τελευταία χρόνια, όπως η ελαστογραφία, η τομοσύνθεση, η μοριακή απεικόνιση του μαστού και η μαστογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Mammography). Προς το παρόν καμμία από αυτές τις μεθόδους δεν συνιστάται ως μέρος της προληπτικής απεικονιστικής εξέτασης για τον καρκίνο του μαστού (115,116).

1.2.3.3.1. Βιοψία

Στο πλαίσιο πραγματοποίησης βιοψίας μαζί με κυτταρολογική/ιστολογική εξέταση, η πιο διαδεδομένη, γρήγορη και λιγότερο επεμβατική μέθοδος για την αξιολόγηση ψηλαφητών μορφωμάτων είναι η αναρρόφηση με λεπτή βελόνη (FNA, Fine Needle Aspiration), με ευαισθησία που κυμαίνεται από 80-90%. Ωστόσο η FNA δε μπορεί να διακρίνει το καρκίνωμα *in situ* από το διηθητικό όσο η βιοψία ιστικού κυλίνδρου και η επακόλουθη παθολογοανατομική εξέταση (117,118,119,120). Για μορφώματα μη αντιληπτά με την ψηλάφηση χρησιμοποιείται βοήθεια υπερηχογραφικής καθοδήγησης ενώ σε περιπτώσεις μικροεπασβεστώσεων χρησιμοποιείται η βιοψία ιστικού κυλίνδρου με στερεοτακτική μαστογραφική καθοδήγηση ή η ανοιχτή χειρουργική βιοψία (121,122).

Συνολικά η FNA μαστού έχει ευαισθησία μεταξύ 80%-100% και ειδικότητα >99%. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του επιπέδου οιστρογονικών/προγεστερονικών υποδοχέων, δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς και για τον καθορισμό προγνωστικών δεικτών όπως την έκφραση Her2neu (117,118). Τα πλεονεκτήματα της FNA συνοψίζονται ως εξής:

1. Αποτελεί εξέταση χαμηλού κόστους,
2. Είναι καλά αποδεκτή από ιατρούς και ασθενείς,
3. Είναι ελάχιστα τραυματική,
4. Παρέχει γρήγορο και αξιόπιστο αποτέλεσμα
5. Βοηθά στον προεγχειρητικό σχεδιασμό της θεραπείας
6. Εκτιμώνται πολλά οζίδια/αλλοιώσεις,
7. Διαφοροδιαγιγνώσκει μαστίτιδα από φλεγμονώδες καρκίνωμα και ενδομαστικούς λεμφαδένες από επιθηλιακές αλλοιώσεις, ιδιαίτερα στην περιοχή της ουράς του μαστού,
8. Μπορούν να εφαρμοστούν ανοσοκυτταροχημικοί ή μοριακοί δείκτες,
9. Αποφεύγεται η ανοιχτή βιοψία σε μη νεοπλασματικές αλλοιώσεις, σε ανεγχείρητους ή υποτροπιάζοντες καρκίνους,
10. Ανακουφίζει την ασθενή μετά την κενωτική παρακέντηση κύστης,
11. Παρέχει ακριβή και γρήγορη εκτίμηση της υποτροπής σε τοπικά αναπτυσσόμενους καρκίνους για καλύτερη σταδιοποίηση του όγκου.

Οι επιπλοκές της FNA είναι σχεδόν ανύπαρκτες. Ανάμεσα σε αυτές συγκαταλέγονται ο πόνος και πολύ σπανιότερα η εμφάνιση πνευμοθώρακα. Άλλες σπάνιες επιπλοκές περιλαμβάνουν αιμορραγία, φλεγμονή, αλλαγές ή artifacts που μπορεί να επηρεάσουν την εκτίμηση των απεικονιστικών (μαστογραφικών) ευρημάτων ή να μιμηθούν διηθητικό

καρκίνο στο χειρουργικό παρασκεύασμα, ενώ οι σημαντικότεροι περιορισμοί της FNA είναι:

1. Δυσκολία στη διάκριση *in situ* από διηθητικό καρκίνο μαστού. 2. Η ακρίβεια συχνά σχετίζεται με το μέγεθος της βλάβης. 3. Χαμηλή ακρίβεια σε όγκους που είναι κυστικοί/νεκρωτικοί, αιμορραγικοί, σε όγκους με δεσμοπλασία ή σε όγκους που βρίσκονται σε μεγάλο βάθος. 4. Δεν υπάρχει δυνατότητα για ακριβή τυποποίηση ιδίως καλοήθων αλλοιώσεων. 5. Ανάγκη για ανοιχτή βιοψία όγκων των λεγόμενων άτυπων διαγνώσεων.

Στην περίπτωση που πρόκειται για φυσιολογικό μαστό αναγνωρίζονται κυτταρολογικά λίγες ομάδες αδενικών κυττάρων με ομοιόμορφους, ομαλούς πυρήνες, ομαλή χρωματίνη, μικρό δυσδιάκριτο πυρήνιο, ενώ οι ομάδες εμφανίζουν καλή συνοχή. Αντίθετα, στις περιπτώσεις καρκίνου μαστού αναγνωρίζονται γενικά και ειδικά χαρακτηριστικά κακοήθειας όπως: μεγάλη κυτταροβρίθεια, αύξηση του μεγέθους των κυττάρων, υπερχρωμασία του πυρήνα, μακροπυρήνια, υψηλή αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, κυτταρικός/πυρηνικός μονομορφισμός, έκκεντρη θέση του πυρήνα, διάσπαση συνοχής παρουσία μεμονωμένων επιθηλιακών κυττάρων, μιτώσεις, κυτταρικός συνωστισμός και αλληλεπικάλυψη, απουσία μυοεπιθηλίων, νέκρωση.

Ακόμα και στα πιο εξειδικευμένα κέντρα αναφέρονται περιστασιακά ψευδώς αρνητικά ή ακόμα σπανιότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Πολλοί ερευνητές θέτουν συχνά λοιπόν το ερώτημα σε ποιες περιπτώσεις ενδείκνυται να γίνει FNA μαστού όταν πρόκειται για ψηλαφητή αλλοίωση; Συγκεκριμένα λοιπόν, παρακεντώνται ψηλαφητές αλλοιώσεις κλινικού ενδιαφέροντος, μορφώματα που κλινικά δεν εξηγούνται από τη φυσιολογία ή την ανατομία, ιδίως νεαρών γυναικών και παρατηρούνται σε 2 μηνιαίους κύκλους, καθώς επίσης και εμμένουσες ή ύποπτες μάζες γυναικών με οικογενειακό ιστορικό. Όσον αφορά για τις μη ψηλαφητές αλλοιώσεις μαστού, αυτές παρακεντώνται με τη βοήθεια απεικονιστικών τεχνικών εφόσον είναι ύποπτες για κακοήθεια και απαιτείται συνεκτίμηση κλινικών, απεικονιστικών και κυτταρολογικών ευρημάτων (119,120,121).

1.2.3.3.2. Η σημασία της FNA

Αν και γενικά η ιστολογική εκτίμηση του μεγέθους του όγκου, της διαφοροποίησης και της διήθησης ή μη λεμφαδένων καθορίζει την πρόγνωση, είναι γνωστή και η σημασία μοριακών δεικτών που επηρεάζουν την πρόγνωση και την ανταπόκριση ή όχι στη συστηματική συμπληρωματική θεραπεία. Οι σημαντικότεροι βιολογικοί δείκτες που προσδιορίζονται σε ιστολογικό υλικό, αλλά και στο υλικό της FNA σε τοπικά αναπτυσσόμενα καρκινώματα συνοψίζονται σε:

1. Οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς: Εφαρμόζονται σε όλα τα πρωτοπαθή διηθητικά καρκινώματα για να προβλεφθεί η ανταπόκρισή τους σε ορμονική θεραπεία, π.χ. ταμοξιφαίνη, αναστολείς αρωματάσης
2. Πρωτοογκογονίδιο HER-2/neu: Η έκφρασή του σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου, καθώς και με μικρότερη συνολικά επιβίωση της ασθενούς. Επίσης καθορίζει την ανταπόκριση στη στοχευμένη θεραπεία π.χ. Trastuzumab
3. Δείκτες πολλαπλασιασμού, π.χ. Ki-67: Υψηλός δείκτης σχετίζεται με προχωρημένο ιστολογικό στάδιο, απουσία ορμονικών υποδοχέων, μεγαλύτερο μέγεθος όγκου και διήθηση λεμφαδένων. Χρησιμοποιείται σε ασθενείς με αμφίβολη πρόγνωση, για να καθορίσει εκείνες που έχουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής ή θανάτου και δυνητικά θα ωφεληθούν από συμπληρωματική θεραπεία.
4. p53: Αδρανοποίηση του ογκοκατασταλτικού αυτού γονιδίου σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Επιπλέον η υπερέκφραση p53 μπορεί να υποδηλώνει ανταπόκριση σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά μοντέλα.

Άλλοι δείκτες που μπορούν να εφαρμοστούν σε κυτταρολογικό υλικό FNA μαστού είναι η E-cadherin ή ακόμα και τεχνικές μοριακής βιολογίας, π.χ. southern blot, FISH, mRNA ανάλυση κ.ά. για να αναδείξουν μεταλλάξεις γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού (123,124).

1.2.3.3.3. Χειρουργική βιοψία μαστού - Προεγχειρητικός εντοπισμός με βελόνη υπό μαστογραφική καθοδήγηση. Βιοψία έπειτα από εντοπισμό με συρμάτινο οδηγό

Από τη στιγμή που οι μικροαποτιτανώσεις θεωρηθούν ύποπτες και ζητηθεί ιστολογική ταυτοποίηση της αλλοίωσης, υπάρχουν διαθέσιμες διάφορες μέθοδοι, ενώ η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από το μέγεθος της βλάβης, τον εντοπισμό της και τα μορφολογικά και απεικονιστικά χαρακτηριστικά της. Η χειρουργική βιοψία των μικροαποτιτανώσεων γίνεται αρχικά μετά από προεγχειρητικό εντοπισμό υπό την καθοδήγηση του μαστογράφου και στη συνέχεια εξαιρείται χειρουργικά η περιοχή που έχει σημανθεί.

Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου έναντι των άλλων διαδερμικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται, είναι η σχεδόν 100% ακρίβεια στη διάγνωση καθώς εξαιρείται όλη η περιοχή ενδιαφέροντος και γι' αυτό προτείνεται ειδικά για τις μικροαποτιτανώσεις υψηλής πιθανότητας για κακοήθεια, για τις οποίες μπορεί να αποτελέσει και την τελική χειρουργική θεραπεία, χωρίς δηλαδή να απαιτηθεί νέα επέμβαση (125).

1.2.4. Ιστολογική κατάταξη

Ο καρκίνος του μαστού, όπως και κάθε νεόπλασμα, διαγιγνώσκεται και ταξινομείται στη βάση των ιστολογικών του χαρακτηριστικών. Ως διηθητικό ορίζεται το καρκίνωμα του οποίου τα κύτταρα έχουν επεκταθεί πέραν της αδενικής δομής, στο συνδετικό υπόστρωμα του μαστού, και διακρίνεται όπως και το *in situ* σε δύο ευρείες κατηγορίες, στο πορογενές και στο λοβιακό. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) κατατάσσει τα επιθηλιακά διηθητικά νεοπλάσματα (αδενοκαρκινώματα) του μαστού ως εξής: (126, WHO).

1.2.4.1. Κλασικό - μη ειδικού τύπου (NOS) πορογενές καρκίνωμα

Αποτελεί το 40%-75% των καρκινωμάτων του μαστού και εμφανίζεται συνήθως μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής. Δεν έχει ειδικά μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, ενώ μικροσκοπικά διακρίνεται για την ποικιλία του κυτταρικού μεγέθους, τα λιγότερο ή περισσότερο εμφανή πυρήνια, τη μικρή ή μεγάλη ατυπία και τα ποικίλα πρότυπα ανάπτυξης. Στο 80% των περιπτώσεων συνυπάρχει σε μικρή ή σε μεγαλύτερη έκταση και *in situ* - DCIS (ενδοπορικό) καρκίνωμα. Για να καταταχθεί ένα διηθητικό καρκίνωμα ως NOS, πρέπει να μην παρουσιάζει ειδικά χαρακτηριστικά σε ποσοστό >50% της συνολικής του έκτασης. Ποσοστό 70%-80% των καρκινωμάτων αυτών έχει θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και ποσοστό 20%-30% υπερεκφράζει την πρωτεΐνη HER2/ NEU (126,127).

1.2.4.2. Μικτό

Μικτό χαρακτηρίζεται το αδενοκαρκίνωμα που παρουσιάζει σε έκταση 10%-49% χαρακτηριστικά του μη ειδικού πορογενούς καρκινώματος και στην υπόλοιπή του έκταση τα χαρακτηριστικά ενός ειδικού τύπου καρκινώματος. Έτσι τα μικτά αδενοκαρκινώματα κατατάσσονται σε μικτά πορογενή με ειδικού τύπου καρκινώματα και σε μικτά πορογενή με λοβιακά καρκινώματα.

1.2.4.3. Πολύμορφο

Πολύμορφο χαρακτηρίζεται το αδενοκαρκίνωμα του οποίου άνω του 50% των

κυττάρων του έχουν γιγάντιους ανώμαλους πυρήνες με πολυάριθμες μιτώσεις. Το μέγεθός του είναι κατά μέσο όρο 5,4 εκ. και παρουσιάζει νεκρώσεις και κυστική εκφύλιση. Αποτελεί χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα (βαθμού 3), αρνητικό στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης και κατά τη διάγνωση εμφανίζεται με μεταστάσεις στους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες.

1.2.4.4. Με οστεοκλαστικού τύπου γιγαντοκύτταρα

Το πορογονές διηθητικό καρκίνωμα με πολυάριθμα γιγαντοκύτταρα οστεοκλαστικού τύπου είναι αγγειοβριθές, παρουσιάζει έντονη ινοβλαστική αντίδραση, φλεγμονώδη στοιχεία και αιμορραγικές διηθήσεις με εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης, που του προσδίδουν καστανέρυθρη χροιά. Τα γιγαντοκύτταρα είναι θετικά στο αντίσωμα έναντι του CD68 και αρνητικά στα αντισώματα έναντι των κυτταροκερατινών, του επιθηλιακού μεμβρανικού αντιγόνου (EMA), της πρωτεΐνης S100 και έναντι των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης. Η πρόγνωση είναι καλή και καθορίζεται από το στοιχείο του καρκινώματος και όχι από το ποσοστό των γιγαντοκυττάρων. Ποσοστό 70% έχει πενταετή επιβίωση, ενώ κατά τη στιγμή της διάγνωσης το 1/3 των περιπτώσεων έχει διηθημένους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες.

1.2.4.5. Με στοιχεία χοριοκαρκινώματος

Είναι ένα πολύ σπάνιο καρκίνωμα που εμφανίζεται σε γυναίκες ηλικίας 50-70 ετών, παρουσιάζει ιστολογικά χαρακτηριστικά διαφοροποίησης προς χοριοκαρκίνωμα, υπάρχει αύξηση της τιμής της β-χοριακής γοναδοτροπίνης στον ορό και με τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο παρατηρούνται ελάχιστα διάσπαρτα κύτταρα θετικά στο αντίσωμα έναντι της βHCG.

1.2.4.6. Με στοιχεία μελανώματος

Αποτελεί επίσης ένα σπάνιο καρκίνωμα, το οποίο προκύπτει ως συνδυασμό πορογενούς καρκινώματος και μελανώματος με τη συμμετοχή και ενδιάμεσων μορφών. Οι περισσότεροι μελανοκυτταρικοί όγκοι του μαστού αποτελούν μεταστατικές εστίες κακοήθους μελανώματος.

1.2.4.7. Λοβιακό καρκίνωμα

Αποτελεί το 5%-15% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού και εμφανίζει υψηλό ποσοστό πολυκεντρικότητας, ενώ περίπου 13% των περιπτώσεων παρουσιάζει εστία και στον άλλο μαστό. Μακροσκοπικά εμφανίζεται συνήθως με τελείως ασαφή όρια, ενώ ποσοστό 70%-95% έχει θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων και υπερεκφράζει σε πολύ χαμηλότερο επίπεδο την πρωτεΐνη HER2/NEU. Στη πλειοψηφία τους τα λοβιακά καρκινώματα είναι διπλοειδή, δηλαδή σχετίζονται με τις λιγότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες και μεταβολές σε σχέση με τα πορογενή καρκινώματα, τα οποία είναι συνήθως υπερδιπλοειδή-ανευπλοειδή. Ποσοστό 80%-100% των λοβιακών καρκινωμάτων δεν εκφράζει ανοσοϊστοχημικά την πρωτεΐνη E-cadherin, σε αντίθεση με τα πορογενή, στα οποία το ποσοστό κυμαίνεται στο 30%-60 (126,127,128,129,130,131).

Οι διάφοροι υπότυποι που αναφέρονται σήμερα είναι οι παρακάτω:

- **Συμπαγής τύπος:** Αποτελείται από μεγάλες καρκινωματώδεις βλάστες ομοιόμορφων μικρών κυττάρων με μικρή συνοχή και περισσότερες μιτώσεις από το κλασικού τύπου. Το υπόστρωμα είναι ελάχιστο.
- **Κυψελιδώδης τύπος:** Μικρές αθροίσεις 20 ή περισσότερων κυττάρων.
- **Σωληνολοβιακό:** Μικροσωληνώδεις σχηματισμοί στο πλαίσιο ενός κλασικού λοβιακού καρκινώματος.
- **Πολύμορφο:** Έχει τον τρόπο ανάπτυξης του κλασικού, αλλά παρουσιάζει μεγαλύτερη κυτταρική πολυμορφία.
- **Ιστοκυτταροειδές:** Χαρακτηρίζεται από διάχυτη ανάπτυξη κυττάρων με άφθονο ηωσινόφιλο ή βασίφιλο αφρώδες κυτταρόπλασμα, ενώ μοιάζουν με μυοβλάστες.

1.2.4.8. Ειδικοί τύποι καρκινώματος μαστού

1.2.4.8.1. Νευροενδοκρινή καρκινώματα

Αποτελούν 2%-5% όλων των καρκινωμάτων του μαστού και εκφράζουν σε ποσοστό >50% των κυττάρων θετική ανοσοϊστοχημική χρώση στα αντισώματα Χρωμογρανίνης Α ή και Συναπτοφυσίνης καθώς και την Ειδική Νευρωνική Ενολάση (NSE). Ο βαθμός κακοήθειας καθορίζεται με βάση την κυτταρική ατυπία και τον αριθμό των μιτώσεων. Οι νευροενδοκρινείς όγκοι με βλεννώδη διαφοροποίηση έχουν καλύτερη πρόγνωση και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Συμπαγές νευροενδοκρινικό καρκίνωμα: Αποτελείται από φωλεές ή δοκιδώδεις αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων που διαχωρίζονται από λεπτά διαφραγμάτια ινώδους συνδετικού ιστού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι ατρακτόμορφα ή πλασματοκυτταροειδή με λεπτοκοκκιώδες ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, ή μεγαλύτερα, με διφυγές κυτταρόπλασμα, αθροίζονται δε κατά τόπους σε ροζετοειδείς σχηματισμούς.

2. Μικροκυτταρικό καρκίνωμα: Είναι μορφολογικά όμοιο με το αντίστοιχο του πνεύμονα. Η διαφορική διάγνωση γίνεται με βάση την έκφραση των κυτταροκερατινών 7 και 20, δηλαδή ενώ το μικροκυτταρικό καρκίνωμα στον πνεύμονα είναι συνήθως αρνητικό και στις δύο, το καρκίνωμα του μαστού είναι αρνητικό μόνο στην 20. Η E-Cadherin δεν εκφράζεται συνήθως στο λοβιακό καρκίνωμα, ενώ το σύνολο των νευροενδοκρινών καρκινωμάτων είναι θετικό στο εν λόγω αντίσωμα.

3. Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα:

Αποτελείται από μεγάλες αθροίσεις καρκινωματωδών κυττάρων με άφθονο κυτταρόπλασμα, πυρήνες μεγάλης πολυμορφίας με λεπτοκοκκιώδη χρωματίνη και πολυάριθμες μιτώσεις. Τα νευροενδοκρινή καρκινώματα πρέπει να διαχωρίζονται από τα καρκινώματα με νευροενδοκρινείς χαρακτήρες. Τα τελευταία εκφράζουν μόνο ανοσοφαινοτυπικά και σε ποσοστό περίπου 10%-20% του συνολικού όγκου τα αντισώματα χρωμογρανίνης Α ή και συναπτοφυσίνης.

1.2.4.9. Μυελοειδές

Παρουσιάζεται σαν περίγραπτος καστανόφαιος, μαλακός ή ελαστικός όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου 2-3 εκ., με περιοχές νέκρωσης ή αιμορραγίας και αποτελείται από αναστομούμενες συγκυτιώδεις μάζες κυττάρων με μεγάλη ατυπία και πολυμορφία, μεγάλο αριθμό μιτώσεων και πυκνή λεμφοπλασματοκυτταρική αντίδραση του υποστρώματος. Όταν ένας όγκος έχει μερικά από τα χαρακτηριστικά του μυελοειδούς ή όλα τα χαρακτηριστικά, αλλά σε έκταση μικρότερη από το 75% της συνολικής, ή συνυπάρχει με ενδοπορικό καρκίνωμα, τότε κατατάσσεται ως άτυπο μυελοειδές. Το μυελοειδές καρκίνωμα δεν εκφράζει τους οιστρογονικούς υποδοχείς και έχει πολύ χαμηλό ποσοστό υπερέκφρασης της πρωτεΐνης HER2/NEU, ενώ παρατηρείται συχνά σε γυναίκες φορείς μεταλλάξεων του γονιδίου BRCA1, έχει όμως καλύτερη πρόγνωση απ' ό,τι το σύνηθες πορογενές διηθητικό καρκίνωμα (126,127,128,129,130).

1.2.4.10. Σωληνώδες

Είναι συνήθως μικρού μεγέθους (0,2-2 εκ.), υψηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα, που αποτελείται από στρογγυλές, ωοειδείς ή γωνιώδεις βλάστες. Το ποσοστό των σωληνωδών βλαστών κυμαίνεται από 100% (Tavassoli) μέχρι 75% (Rosen), ενώ οι όγκοι που παρουσιάζουν ποσοστό σωληνώδους πρότυπου δομής κυμαίνονται μεταξύ 50% και 90% και κατατάσσονται ως μικτά καρκινώματα. Επίσης όταν παρατηρούνται η συνύπαρξη in situ καρκινώματος με υψηλόβαθμη κυτταρική ατυπία, σύνθετων αδενικών σχηματισμών, μεγάλης κυτταρικής ατυπίας και μιτώσεων είναι στοιχεία εναντίον της διάγνωσης του σωληνώδους καρκινώματος. Η πρόγνωση είναι άριστη και το σωληνώδες καρκίνωμα έχει θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και δεν εκφράζει τις πρωτεΐνες HER2/NEU και EGFR.

1.2.4.11. Ηθμοειδές διηθητικό καρκίνωμα

Συνδυάζεται με το σωληνώδες, με το οποίο έχει και τα ίδια κυτταρικά χαρακτηριστικά και αποτελείται από συμπαγείς διάτρητες αθροίσεις (ηθμούς) στο 90% τουλάχιστον της έκτασής του. Σε περίπτωση που κατά 50% είναι ηθμοειδές και στην υπόλοιπη έκταση

σωληνώδες, τότε μπορεί να χαρακτηριστεί ηθμοειδές. Η διάκριση από το χαμηλόβαθμο in situ (ενδοπορικό) πορογενές καρκίνωμα βασίζεται στην ύπαρξη μυοεπιθηλιακών κυττάρων στην περιφέρεια που ανιχνεύονται και ανοσοϊστοχημικά. Όπως και το σωληνώδες, έχει άριστη πρόγνωση (90%-100% δεκαετή επιβίωση) και εκφράζει σε ποσοστό 100% τους υποδοχείς οιστρογόνων και 69% τους υποδοχείς προγεστερόνης.

1.2.4.12. Βλεννοπαραγωγό αδеноκαρκίνωμα μαστού

1.Βλεννώδες:

Εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και αποτελεί το 2% περίπου όλων των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, ενώ χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μεμονωμένων ή σε αθροίσεις καρκινωματοδών κυττάρων μέσα σε λίμνες βλέννης. Για να χαρακτηριστεί βλεννώδες ένα καρκίνωμα, πρέπει να έχει τα χαρακτηριστικά του βλεννώδους στο 90% της έκτασής του. Η δεκαετής επιβίωση κυμαίνεται από 80% έως 100%. Διαφοροδιαγνωστικά εξετάζεται αν υπάρχουν διατεταμένοι πόροι με βλέννη και υπερπλαστικό επιθήλιο, αν μέσα στις λίμνες παρατηρούνται δύο είδη κυττάρων (μυοεπιθήλια και επιθηλιακά), αν συνυπάρχει χαμηλόβαθμη πυρηνική ατυπία ή in situ καρκίνωμα, κυστικό υπερεκκριτικό καρκίνωμα, κυστική υπερεκκριτική υπερπλασία, νεανική θηλωμάτωση και μυξοειδές ινοαδένωμα.

2. Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα - Βλεννώδες καρκίνωμα με υψηλά κυλινδρικά κύτταρα:

Εξαιρετικά σπάνιοι όγκοι μεγαλύτερης διαμέτρου, 0,8 έως 19 εκ., κυστικοί, με ζελατινώδες περιεχόμενο, αποτελούμενοι από βλάστες, τα κύτταρα των οποίων είναι υψηλά, κυλινδρικά, με άφθονη ενδοκυττάρια βλέννη και πυρήνες χωρίς ουσιώδη ατυπία στη βάση των κυττάρων.

1.2.4.13. Καρκίνωμα με κύτταρα σφραγιστήρος δακτυλίου

Διακρίνονται δύο τύποι. Ο πρώτος σχετίζεται με το λοβιακό καρκίνωμα και χαρακτηρίζεται από άφθονη ενδοκυττάρια παραγωγή βλέννης, που απωθείται στο ένα

άκρο του κυττάρου. Ο δεύτερος τύπος προσομοιάζει με το διάχυτου τύπου κατά Lauren καρκίνωμα στομάχου, ενώ τα κύτταρα είναι μεμονωμένα ή διατάσσονται σε δοκίδες ή μικρές αθροίσεις.

1.2.4.14. Θηλώδες διηθητικό καρκίνωμα

Παρουσιάζεται σε μεταεμμηνοεπαυσιακές γυναίκες και θεωρείται ιδιαίτερα σπάνιο. Η ύπαρξη χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης ή αιμορραγίας είναι στοιχείο υποβοηθητικό προς την κατεύθυνση της διήθησης, αλλά κυρίως η ύπαρξη αθροίσεων στο παρακείμενο μαζικό παρέγχυμα ή στο λιπώδη συνδετικό ιστό.

1.2.4.15. Μικροθηλώδες διηθητικό καρκίνωμα

Αντιστοιχεί σε ποσοστό μικρότερο του 2% όλων των καρκινωμάτων του μαστού και αποτελείται από μικρές θηλές ή αθροίσεις σε κενούς χώρους του υποστρώματος, που προσομοιάζουν σε κυστικά διευρυμένα αγγεία. Τα κύτταρα του όγκου είναι μικρά, σχετικά ομοιόμορφα, με ελάχιστες μιτώσεις, ενώ συχνά παρουσιάζονται έμβολα σε αγγεία και λεμφαδενικές μεταστάσεις.

1.2.4.16. Αποκρινές καρκίνωμα

Τα κύτταρα του καρκινώματος έχουν μεγάλους ποικιλόμορφους πυρήνες με προέχοντα πυρήνια και κυτταρόπλασμα ομοιογενές, διαυγές ή κενοτοπιώδες ή κοκκιώδες ηωσινόφιλο. Τα κύτταρα πρέπει να αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% του συνολικού όγκου, ενώ ανοσοϊστοχημικά είναι πάντα θετικό στο αντίσωμα έναντι της GCDFP-15 και αρνητικό στο αντίσωμα έναντι του BCL-2 και στους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης.

1.2.4.17. Μεταπλαστικό καρκίνωμα

Το μεταπλαστικό καρκίνωμα υπολογίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 1% όλων των καρκινωμάτων του μαστού, ενώ είναι σημαντικό να αναγνωρίζονται καρκινώματα που εκδηλώνουν φαινότυπο μεταπλασίας και προέρχονται από τους πόρους, καθώς και να

διακρίνονται από τους μικτούς αδενικούς-στρωματικούς όγκους ή από τους καθαρά στρωματικούς όγκους. Εδώ συμπεριλαμβάνονται πορογενή διηθητικά καρκινώματα με εστίες πλακώδους ή ατρακτοκυτταρικής διαφοροποίησης και τα καρκινώματα με παραγωγή χονδρόμορφου ή οστεοειδούς υποστρώματος, που περικλείουν περιοχές βλεννώδους καρκινώματος. Εμφανίζουν μεγάλο μέγεθος όγκου, συνήθως μεγαλύτερο από 4 εκ. όμως οι λεμφαδενικές μεταστάσεις είναι σχετικά σπάνιες. Είναι συνήθως αρνητικά στους ορμονικούς υποδοχείς, τόσο στο καρκινωματώδες όσο και στο μεταπλαστικό στοιχείο του όγκου. Υποκατηγορίες παρουσιάζονται οι εξής:

- Ακανθοκυτταρικό (εκπλακωδών κυττάρων) καρκίνωμα
- Κερατινοποιούμενο από μεγάλα κύτταρα
- Ατρακτόμορφο
- Ακανθολυτικού τύπου
- Αδενοκαρκίνωμα με ατρακτοκυτταρική διαφοροποίηση ή Αδενοπλακώδες καρκίνωμα
- Αδενοπλακώδες καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας
- Μικτά επιθηλιακά/μεσεγχυματικά μεταπλαστικά καρκινώματα
- Καρκίνωμα με οστική μετάπλαση
- Καρκίνωμα με χονδρική μετάπλαση
- Πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα ή λιποεκκριτικό καρκίνωμα

Το 90% τουλάχιστον των κυττάρων του περιέχει άφθονο ουδέτερο λίπος, ενώ τα κύτταρα έχουν άτυπους πυρήνες και άφθονο, διαυγές, αφρώδες ή κενотоπιώδες κυτταρόπλασμα (132,133,134,135).

1.2.4.18. Κυψελιδικό (acinic cell) καρκίνωμα

Είναι ένα αριστης πρόγνωσης καρκίνωμα, όμοιο με το αντίστοιχο της παρωτίδας.

1.2.4.19. Πλούσιο σε γλυκογόνο - διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα (GRCC)

Αποτελεί ένα καρκίνωμα όπου πρέπει ποσοστό >90% των κυττάρων να έχουν άφθονο, διαυγές κυτταρόπλασμα που περιέχει γλυκογόνο. Η διάγνωση γίνεται ιστοχημικά με τη χρώση PAS, έχει συνήθως το πρότυπο ανάπτυξης του μη ειδικού πορογενούς καρκινώματος και είναι πιο επιθετικό από αυτό.

1.2.4.20. Αποκρινές καρκίνωμα

Είναι ιδιαίτερα σπάνιο, όμοιο με αυτό των σμηγματογόνων αδένων του δέρματος.

1.2.4.21. Εκκριτικό

Είναι ο καρκίνος μαστού της νεανικής και παιδικής ηλικίας και έχει ως πρότυπο ανάπτυξης θηλώδη ή συμπαγή ή ηθμοειδή δομή και απωθητικά όρια. Τα κύτταρα έχουν κυτταροπλασματικά κενोटόπια θετικά στη χρώση PAS και βλεννοκαρμίνης, και χαμηλό μιτωτικό δείκτη, ενώ οι νεκρώσεις παρουσιάζονται σπάνια. Τα καρκινωματώδη κύτταρα είναι θετικά στα αντισώματα έναντι του επιθηλιακού μεμβρανικού αντιγόνου (EMA), της αλφα-λακτοσφαιρίνης και της πρωτεΐνης S-100.

1.2.4.22. Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα

Είναι σποραδικά εμφανιζόμενα καρκινώματα που τα κύτταρά τους σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 70% έχουν άφθονο λεπτοκοκκιώδες κυτταρόπλασμα, που οφείλεται στην άθροιση μιτοχονδρίων.

1.2.4.23. Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα

Αποτελεί το 0,1% όλων των καρκινωμάτων του μαστού και είναι μορφολογικά όμοιο με το αντίστοιχο των σιελογόνων αδένων. Είναι χαμηλής κακοήθειας καρκίνωμα και απαιτεί μόνο απλή μαστεκτομή. Η διαφορική διάγνωση πρέπει να γίνει από την κολλαγονική σφαιριδίωση (collagenous spherulosis - σπάνια, καλοήγη, περίγραπτη

αλλοίωση, αποτέλεσμα μυοεπιθηλιακής υπερπλασίας) και το ηθμοειδές διηθητικό καρκίνωμα. Το τελευταίο είναι θετικό στους ορμονικούς υποδοχείς σε αντίθεση με το αδеноειδές κυστικό.

1.2.4.24. Νόσος Paget

Είναι η εκζεματοειδής αλλοίωση της θηλής και της θηλαίας άλω και αποτελείται από μεμονωμένα ή σε αθροίσεις μεγάλα κύτταρα με άτυπους πυρήνες και διαυγές κυρίως κυτταρόπλασμα, τα οποία αθρίζονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Διαφοροδιαγιγνώσκεται από τη Νόσο του Bowen, το κακόηθες μελάνωμα και τα μεμονωμένα κερατινοκύτταρα με διαυγές ή κενотоπιώδες κυτταρόπλασμα ανοσοϊστοχημικά και με ιστοχημικά ευρημάτα. Σε αντίθεση με το κακόηθες μελάνωμα, τα κύτταρα της Νόσου Paget είναι αρνητικά στα αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης S-100 και HMB-45. Επίσης, στη νόσο του Bowen τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι συνήθως αρνητικά στα αντισώματα έναντι κυτταροκερατινών χαμηλού μοριακού βάρους, του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και HER2/NEU.

1.2.4.25. Φλεγμονώδες καρκίνωμα

Είναι μια μορφή τοπικά προχωρημένου, κακής πρόγνωσης καρκινώματος, ενώ μορφολογικά χαρακτηριστικά της φλεγμονής είναι η ύπαρξη πολλών λεμφαγγειακών καρκινωματοδών εμβόλων στο δέρμα του μαστού. Δεν έχει ειδικά χαρακτηριστικά και είναι συνήθως πορογενές χαμηλής διαφοροποίησης αρνητικό στους υποδοχείς οιστρογόνων και υπερεκφράζει την πρωτεΐνη HER2/NEU.

1.2.4.26. Απροσδιόριστου τύπου καρκίνωμα

Το 3-4% των καρκινωμάτων του μαστού ανήκει σ' αυτήν την κατηγορία. Θεωρούνται απροσδιόριστα τα καρκινώματα που δεν έχουν σαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά πορογενούς ή λοβιακού καρκινώματος.

1.2.4.27. Βαθμός Κακοήθειας

Υπάρχουν διαφορές ως προς τη βιολογική συμπεριφορά του κάθε τύπου, όμως και καρκινώματα του ίδιου τύπου εμφανίζουν σημαντική διαφορά στην κακοήθεια. Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας γίνεται με το σύστημα Scarff Bloom & Richardson που στηρίζεται στο άθροισμα της βαθμολόγησης τριών παραμέτρων, της διαφοροποίησης, του πυρηνικού πολυμορφισμού και του αριθμού των μιτώσεων με βαθμό 1 έως 3. Έτσι προκύπτουν τρεις βαθμοί κακοήθειας (Grades I, II, III), όπου Grade I=3-5, Grade II=6-7, Grade III=8-9 (135,136).

1.2.4.28. Παθολογοανατομική Σταδιοποίηση pTNM

Πίνακας 1.6^α Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού κατά TNM.

Ta: Πρωτοπαθής όγκος

Tx: Αγνώστου μεγέθους πρωτοπαθής όγκος

T0: Δεν υπάρχει απόδειξη ύπαρξης πρωτοπαθούς όγκου

Tis: καρκίνωμα in situ

T1: όγκος μικρότερος ή ίσος με 2 εκατοστά ($\leq 2\text{cm}$)

T1mic: μικροδιήθηση 0,1 cm στη μεγαλύτερη διάσταση

T1a: όγκος μεγαλύτερος από 0.1 μέχρι 0,5cm

T1b: όγκος μεγαλύτερος από 0,5 και μέχρι 1cm

T1c: όγκος μεγαλύτερος από 1 και μέχρι 2 cm

T2: όγκος μεγαλύτερος από 2 και μέχρι 5 cm

T3: όγκος μεγαλύτερος από 5cm

T4a: επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα

T4b: οίδημα, εξέλκωση ή δορυφόρα οζίδια στο δέρμα

T4c: συνδυασμός των T4a και T4b

T4d: φλεγμονώδες καρκίνωμα

T4: όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα

N-ΠΕΡΙΟΧΙΚΟΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ

Nx: δε μπορούν να εκτιμηθούν

N0: δεν υπάρχουν διηθημένοι περιοχικοί λεμφαδένες

N1: μετάσταση σε κινητό/ούς σύστοιχο/ους μασχαλιαίο/ους λεμφαδένα/ες

N2: μετάσταση σε ακίνητο σύστοιχο μασχαλιαίο λεμφαδένα ή κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένος ενδομαστικός λεμφαδένας

N2a: μετάσταση σε ακίνητο σύστοιχο μασχαλιαίο λεμφαδένα

N2b: μετάσταση μόνο σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο ενδομαστικό λεμφαδένα με απουσία κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων

N3: μετάσταση σε σύστοιχο υποκλείδιο λεμφαδένα με ή χωρίς μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μετάσταση σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο ενδομαστικό λεμφαδένα με κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μετάσταση σε σύστοιχο υπερκλείδιο λεμφαδένα

N3a: μετάσταση σε υποκλείδιο/ους λεμφαδένα/ες

N3b: μετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα με διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες.

N3c: μετάσταση σε υπερκλείδιο/ους λεμφαδένα/ες

M-ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Mx: απομακρυσμένες μεταστάσεις δε μπορούν να εκτιμηθούν

M0: απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

M1: ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση απαιτεί εξέταση του πρωτοπαθούς όγκου σε υγιή όρια εκτομής μακροσκοπικά, μπορεί όμως να γίνει αν υπάρχει μόνο μικροσκοπική

διήθηση των ορίων. Οι κατηγορίες pT αντιστοιχούν στις κατηγορίες T (Πίνακας 1.6.β.) (126).

Πίνακας 1.6β. Σταδιοποίηση κατά pTNM

pT: πρωτοπαθής όγκος
pN:περιοχικοί λεμφαδένες
pNx: οι περιοχικοί λεμφαδένες δε μπορούν να εκτιμηθούν (δε μπορούν να εξαιρεθούν ή έχουν εξαιρεθεί στο παρελθόν)
pN0: απουσία μετάστασης σε περιοχικούς λεμφαδένες
pN1mi: μικρομετάσταση μεταξύ 0,2 και 2 mm
pN1: μετάσταση σε 1-3 σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή /και μικρομετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα που όμως δεν είναι κλινικά αντιληπτός
pN1a: μετάσταση σε 1-3 σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες, με έναν τουλάχιστο διηθημένο σε διάσταση μεγαλύτερη των 2 mm
pN1b: μικρομετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα που όμως δεν είναι κλινικά αντιληπτός
pN1c: σε 1-3 σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες και μικρομετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα που όμως δεν είναι κλινικά αντιληπτός
pN2: μετάσταση σε 4-9 σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο σύστοιχο ενδομαστικό λεμφαδένα χωρίς διήθηση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες
pN2a: μετάσταση σε 4-9 σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες με έναν τουλάχιστο διηθημένο σε διάσταση μεγαλύτερη των 2 mm
pN2b: μετάσταση σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο σύστοιχο ενδομαστικό

λεμφαδένα χωρίς διήθηση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες

pN3: μετάσταση σε 10 ή περισσότερους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή υποκλείδιους λεμφαδένες ή σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο σύστοιχο ενδομαστικό λεμφαδένα με θετικό/ους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε περισσότερους από 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες με κλινικά αρνητική μικροσκοπική μετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα ή σύστοιχο υπερκλείδιο λεμφαδένα

pN3a: μετάσταση σε 10 ή περισσότερους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή υποκλείδιους λεμφαδένες

pN3b: μετάσταση σε κλινικά αποδεδειγμένα διηθημένο σύστοιχο ενδομαστικό λεμφαδένα με θετικό/ους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε περισσότερους από 3 μασχαλιαίους λεμφαδένες με κλινικά αρνητική μικροσκοπική μετάσταση σε ενδομαστικό λεμφαδένα

pN3c: μετάσταση σε υπερκλείδιο λεμφαδένα/ες

pM: απομακρυσμένες μεταστάσεις

Οι κατηγορίες pM αντιστοιχούν στις κατηγορίες M.

1.2.4.29. Σύστημα σταδιοποίησης TNM της American Joint Committee on Cancer (AJCC/UICC) (126)

Πίνακας 1.6γ. Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού. Προσαρμογή από: *Lakhani SR, Ellis. I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M.J. (2012) WHO Classification of Tumours. 240 p.*

Ομαδοποίηση σε στάδια			
ΣΤΑΔΙΟ 0	Tis	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ I	T1	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
ΣΤΑΔΙΟ IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1-2	M0

ΣΤΑΔΙΟ III B	T4	όποιο N	M0
ΣΤΑΔΙΟ III C	όποιο T	N3	M0
ΣΤΑΔΙΟ IV	όποιο T	όποιο N	M

1.2.5. Ταξινόμηση και μοριακή βιολογία του καρκίνου του μαστού.

Σε όλες τις τελευταίες έρευνες επισημαίνεται η αναγκαιότητα της εύρεσης και του προσδιορισμού με μεγαλύτερη σαφήνεια των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του καρκίνου του μαστού με την ανάλυση του γονιδιακού προφίλ της νόσου, ώστε η θεραπευτική αντιμετώπιση να είναι στοχευόμενη και αποτελεσματική (136,137). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται ήδη είναι η αυτοματοποιημένη ανοσοϊστοχημεία, η RT PCR, οι μικροσυστοιχίες και ο *in situ* υβριδισμός και η ανάλυση γίνεται με τη μέτρηση της γονιδιακής δραστηριότητας, η οποία καθορίζεται από τον αριθμό των mRNA και την ποσότητα του τελικού προϊόντος που κωδικοποιούν τα γονίδια, δηλαδή τις πρωτεΐνες.

- *In situ* υβριδισμός: Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ιδιότητα των πυρηνικών οξέων να σχηματίζουν σύμφωνα με το νόμο της συμπληρωματικότητας των βάσεων (αδενίνη-θυμίνη, γουανίνη-κυτοσίνη) σταθερά διμερή που ονομάζονται υβρίδια και μπορεί να αποτελούνται από δύο αλυσίδες DNA. Η μία είναι αυτή που προκύπτει από το άνοιγμα της έλικας και η δεύτερη του ιχνηθέτη (probe). Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται είναι σημασμένοι με φθοριόχρωμα ή βασίζονται στην ενζυμική κατάλυση μεταλλικού αργύρου. Ο *in situ* υβριδισμός μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα είδη υλικού.
- Μικροσυστοιχίες: Στο υπό εξέταση δείγμα καρκίνου μαστού μετράται το επίπεδο

των mRNA μιας ομάδας προκαθορισμένων γονιδίων (π.χ. ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού) και συγκρίνεται με το επίπεδο του mRNA των ίδιων γονιδίων σε ένα καθορισμένο δείγμα αναφοράς. Το υπό εξέταση mRNA είναι σεσημασμένο με κόκκινο φθοριόχρωμα και εκείνο της αναφοράς με πράσινο φθοριόχρωμα. Μετά τη μέτρηση της έκφρασης των γονιδίων καθορίζονται οι εσωτερικοί υπότυποι του όγκων.

- Ανοσοϊστοχημεία: Στη βάση της αντίδρασης μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος μελετάται και μετράται με ημιποσοτικές μεθόδους το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών σε επίπεδο πυρήνα, κυτταροπλάσματος ή κυτταρικής μεμβράνης.
- RT PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction): Βασίζεται στην PCR (απομόνωση και πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA) και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει και ταυτόχρονα να μετρήσει την ποσότητα του υπό εξέταση DNA του ιστού, ενώ κάθε αλληλουχία του DNA του δείγματος μετράται σε απόλυτους αριθμούς αντιγράφων.

Οι διαφορετικοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού έχουν καθοριστεί μέσα από μελέτες ως εξής: η ομάδα των ER θετικών καρκίνων, που περιλαμβάνουν τους αυλικού τύπου A (Luminal A) και αυλικού τύπου B (luminal B), και η ομάδα των ER αρνητικών, που περιλαμβάνουν τους τριπλά αρνητικούς (υποκατηγορία των τριπλά αρνητικών αποτελούν και οι βασικού τύπου) και τους Her2 θετικούς. Η έκφραση των ορμονικών υποδοχέων μελετάται με την ανοσοϊστοχημεία και προσδιορίζεται με διαφορετικές μεθόδους, όπως το εκατοστιαίο ποσοστό των θετικών πυρήνων και τα συστήματα διαβάθμισης Allred και H score, που βασίζονται στην ένταση και την έκταση της πυρηνικής χρώσης. Με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί σε τουλάχιστον τέσσερις υποτύπους (52,53).

1.2.5.1. ER θετικοί όγκοι: Αποτελούν το 60% όλων των καρκινωμάτων μαστού και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τους υποδοχείς

οιστρογόνων, χαμηλό βαθμό έκφρασης Her2 clusters και χαμηλό ή υψηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων πολλαπλασιασμού. Διαχωρίζονται στους Luminal A και στους Luminal B υποτύπους.

1.2.5.2. Αυλικού τύπου A (Luminal A): Τα κύτταρα των καρκινωμάτων αυτών εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, οιστρογονικούς (ER) ή/και προγεστερονικούς (PR), δεν εκφράζουν Ki-67, δεν φέρουν μεταλλάξεις του TP53 κι έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση. Οι Luminal A αφορούν στο 40% καρκίνων μαστού, είναι καλής πρόγνωσης και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τους υποδοχείς οιστρογόνων, χαμηλό βαθμό έκφρασης των Her2 clusters και χαμηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων πολλαπλασιασμού.

1.2.5.3. Αυλικού τύπου B (Luminal B): εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ER και/ή PR και Ki-67 αλλά δεν ανταποκρίνονται πάντα στην ορμονοθεραπεία και η βιολογική τους συμπεριφορά πλησιάζει εκείνη των τριπλά αρνητικών όγκων. Οι Luminal B αποτελούν το 20% των καρκίνων μαστού, είναι δυσμενέστερης πρόγνωσης από τους αντιστοίχους που ανήκουν στον τύπο A και χαρακτηρίζονται από μειωμένο βαθμό έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τους υποδοχείς οιστρογόνων, ποικίλλο βαθμό έκφρασης των Her2 clusters και υψηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων πολλαπλασιασμού.

1.2.5.4. Όγκοι που υπερεκφράζουν HER2: Ο HER2 είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας με δράση κινάσης της τυροσίνης και ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια αυξητικών παραγόντων HER (HER1, HER2, HER3, HER4). Ο HER2 είναι το μόνο μέλος της οικογένειας HER, το οποίο δεν έχει γνωστό συνδέτη (ligand). Υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 ή πολλαπλή έκφραση του γονιδίου HER2 παρατηρείται στο 20% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Καρκινώματα, τα κύτταρα των οποίων υπερεκφράζουν HER2, είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος από ότι όγκοι που δεν υπερεκφράζουν HER2, συνυπάρχουν πιο συχνά με διηθημένους λεμφαδένες και συσχετίζονται με συντομότερο διάστημα χωρίς υποτροπή. Περίπου το 50% των όγκων αυτών δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (138,139,140). Οι HER2 θετικοί όγκοι διαιρούνται ανάλογα με την έκφραση ή όχι ορμονικών υποδοχέων σε δύο περαιτέρω υποτύπους:

1.2.5.5. Αυλικού τύπου HER2: Τα κύτταρα των όγκων αυτών εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ER και/ή PR και HER2 και

1.2.5.5.1. Εμπλουτισμένους σε HER2 (HER2 enriched) : Οι όγκοι δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ER και/ή PR. Οι πλούσιοι σε Her2 υπότυποι αποτελούν περίπου το 50% των Her2 θετικών και το 10%-15% του συνόλου των γυναικών με καρκίνο του μαστού, είναι κακής πρόγνωσης και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό έκφρασης των Her2 clusters και των γονιδίων πολλαπλασιασμού και χαμηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων σχετιζόμενων με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Ο προσδιορισμός του Her2 γίνεται ανοσοϊστοχημικά και με in situ υβριδισμό. Ένα καρκίνωμα ορίζεται ως θετικό, με άλλα λόγια υπερεκφράζει την πρωτεΐνη HER2 ανοσοϊστοχημικά, όταν ποσοστό >30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με παχύ δακτύλιο και σημειώνεται ως 3+. Ορίζεται επίσης θετικό όταν τα γονιδιακά αντίγραφα είναι >6 ή ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 είναι >2,2. Ορίζεται ως αμφίσημο/απροσδιόριστο ανοσοϊστοχημικώς όταν ποσοστό $\leq$ 30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με παχύ δακτύλιο ή ποσοστό >30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με λεπτό δακτύλιο και σημειώνεται 2+. Ορίζεται ως αμφίσημο/ απροσδιόριστο με τη μέθοδο FISH ή SISH όταν τα γονιδιακά αντίγραφα είναι 4-6 ή ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 ισούται με 1,8-2,2 και αφορά περίπου στο 2%-3% των περιπτώσεων. Αντίθετα ορίζεται ως αρνητικό ανοσοϊστοχημικά όταν ποσοστό >10% των κυττάρων παρουσιάζει ατελή μεμβρανική χρώση με λεπτό δακτύλιο ή κύτταρα με μεμβρανική χρώση και σημειώνεται 1+ ή όταν δεν παρατηρείται καθόλου μεμβρανική χρώση και σημειώνεται 0. Ορίζεται επίσης αρνητικό (χωρίς γονιδιακή επαύξηση) όταν τα γονιδιακά αντίγραφα είναι <4 ή ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 είναι <1,8.

1.2.5.6. Οι υπότυποι που έχουν χαμηλή έκφραση των Claudins: Αφορούν στο 5-10 % καρκίνων μαστού, είναι κακής πρόγνωσης και χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό έκφρασης Her2 clusters, των γονιδίων πολλαπλασιασμού και των σχετιζόμενων με τους υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων. Επίσης παρατηρείται χαμηλή έκφραση ή απουσία έκφρασης των E-Cadherin & Claudin-3, είναι μορφολογικά ατρακτοκυτταρικά καρκινώματα, παρουσιάζουν λεμφοκυτταρικές διηθήσεις και έχουν χαρακτηριστικά stem cell. Χαρακτηρίζονται από ασταθή έκφραση των basal type κυτταροκερατινών CK5,

CK14, CK17 και από χαμηλό βαθμό έκφρασης των luminal type κυτταροκερατινών CK 18, CK19.

1.2.5.7. Τριπλά αρνητικοί όγκοι: Τα κύτταρα των όγκων αυτών δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, δεν υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη HER2, ούτε εμφανίζουν πολλαπλή έκφραση (amplification) του γονιδίου, ενώ εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις του γονιδίου TP53 κι έχουν κακή πρόγνωση. Σε ποσοστό 60% εκφράζουν EGFR και υψηλού μοριακού βάρους κυτοκερατίνες, ενώ αποτελούν περίπου το 5%-10% καρκίνων μαστού και είναι κακής πρόγνωσης. Χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων πολλαπλασιασμού, υψηλό βαθμό έκφρασης του EGFR και των κυτταροκερατινών CK5, CK14, CK17 και είναι όπως ορίζονται ER -, PR -, HER2 - και παρουσιάζουν το 80% των BRCA1 μεταλλάξεων (141,142, 143,144).

1.2.5.8. Γονιδιακή υπογραφή

Ο γονιδιακός έλεγχος του καρκίνου του μαστού γίνεται με τις δοκιμασίες πολυγονιδιακής έκφρασης και τη γονιδιακή υπογραφή του ορίζεται από έναν κατάλογο γονιδίων που συνδέονται με την πρόγνωση ή την ανταπόκριση σε ορισμένη θεραπεία. Σήμερα χρησιμοποιούνται τεσσάρων ειδών πλατφόρμες.

- Στην ανοσοϊστοχημική πλατφόρμα χρησιμοποιείται το Mammostat, που αναλύει πάνελ 5 αντισωμάτων και χρησιμοποιείται για την κατάταξη των ER+ και LN- ασθενών που λαμβάνουν ταμοξιφαίνη σε υψηλού, μέσου και χαμηλού κινδύνου υποομάδες.
- Στην πλατφόρμα του in situ υβριδισμού χρησιμοποιείται το eXagenBC test, στο οποίο χρησιμοποιούνται τρία αντισώματα για τα ER+ καρκινώματα και ένα δεύτερο πάνελ άλλων τριών αντισωμάτων για τα ER- καρκινώματα για να προσδιοριστεί η ομάδα ασθενών με υψηλό κίνδυνο υποτροπής.
- Στην πλατφόρμα του RTPCR χρησιμοποιείται το Oncotype DX Breast Cancer Assay (Genomic Health Inc. Redwood City, California, USA), τεστ που βασίζεται στην ανάλυση 21 γονιδίων, χωρισμένων σε 7 ομάδες. Μία ομάδα έχει 5 γονίδια πολλαπλασιασμού, μία άλλη 4 γονίδια που αφορούν στην έκφραση των

ορμονικών υποδοχέων, και μία τρίτη δύο γονίδια για το Her2. Κάθε ομάδα έχει ένα δικό της συντελεστή που πολλαπλασιάζεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης των γονιδίων, ενώ το συνολικό άθροισμα όλων των ομάδων λαμβάνει τιμές από 0 έως 100. Τα καρκινώματα με τελικό score <18 θεωρούνται χαμηλού κινδύνου, με τελικό score μεταξύ 18 και 30 θεωρούνται μέσου κινδύνου και με τελικό score >30 θεωρούνται υψηλού κινδύνου.

- Στην πλατφόρμα των μικροσυστοιχιών υπάρχουν το MammaPrint (Agenda BV, Amsterdam, The Netherlands) που βασίζεται σε 70 γονίδια και αφορά σε γυναίκες ηλικίας μικρότερης των 60 ετών, καθώς και τη γονιδιακή υπογραφή του Rotterdam (Erasmus University Cancer Center in Rotterdam, The Netherlands), που βασίζεται σε 76 γονίδια και αφορά σε γυναίκες με αρνητικούς λεμφαδένες ανεξάρτητα από την έκφραση ή μη των ορμονικών υποδοχέων. Σε αυτήν την πλατφόρμα ανήκει και το Cytochrome P450 CYP 2D6 test, που βασίζεται σε ένα και μοναδικό γονίδιο και προβλέπει το όφελος από τους αναστολείς της αρωματάσης σε σχέση με την ταμοξιφαίνη σε ασθενείς με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς.

Χαρακτηριστικό είναι πως οι διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού αντιμετωπίζονται σήμερα διαφορετικά. Συγκεκριμένα, ο υπότυπος Luminal A αντιμετωπίζεται με ενδοκρινική θεραπεία, ο υπότυπος Her2 enriched με στοχευμένη αντιHer2 θεραπεία, ο Luminal B με συνδυασμό ενδοκρινική και χημειοθεραπεία και ο Basal like ή τριπλά αρνητικός υπότυπος με χημειοθεραπεία. Ο προσδιορισμός των υποτύπων αυτών είναι δυνατόν να γίνει μόνο με παθολογοανατομικές παραμέτρους, δηλαδή με εκτίμηση των ER, PgR, Her, τον βαθμό διαφοροποίησης και τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67. Το γονιδιακό προφίλ των καρκινωμάτων του μαστού χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη συνδυαζόμενο με τους κλασικούς παθολογοανατομικούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς παράγοντες, όπου σε γενικές γραμμές καθορίζονται:

- ο μορφολογικός υπότυπος (πορογενές, λοβιακό ή ειδικού τύπου).
- ο βαθμός διαφοροποίησης.

- το μέγεθος του όγκου.
- η ύπαρξη ή όχι λεμφαδενικών μεταστάσεων.
- οι ορμονικοί υποδοχείς (ER και PgR).
- η υπερέκφραση ή ενίσχυση σήματος του Her2, η ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67.
- η σε ειδικές περιπτώσεις, ο κίνδυνος υποτροπής στη βάση γονιδιακής υπογραφής (π.χ. Oncotype Dx).

Οι διαφορετικές αυτές οντότητες φαίνεται ότι προϋπάρχουν ήδη από το στάδιο του *in situ* στο οποίο βρίσκεται ένας εν δυνάμει καρκίνος, ενώ έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον όσον αφορά την δημιουργία των διαφορετικών υποτύπων του καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με την πρώτη θεωρία, το προγονικό βλαστικό κύτταρο φυσιολογικά διαφοροποιείται είτε προς κύτταρο του αυλού (Luminal), είτε προς μυοεπιθηλιακό κύτταρο. Κατά την ογκογένεση από την πρώτη κατηγορία προκύπτουν οι όγκοι Luminal A, Luminal B, HER2 θετικοί, ενώ από το βλαστικό κύτταρο απευθείας προκύπτουν οι τριπλά αρνητικοί όγκοι. Η δεύτερη και λιγότερο αποδεκτή θεωρία περιγράφει ότι από το πολυδύναμο προγονικό κύτταρο προκύπτουν απευθείας όλοι οι υποτύποι ακολουθώντας διάφορα στάδια διαφοροποίησης του βλαστικού κυττάρου (141,142).

Στη διαδικασία της καρκινογένεσης εμπλέκονται παράγοντες που είτε προάγουν την κυτταρική διαίρεση (ογκογονίδια), είτε την αναστέλλουν (ογκοκατασταλτικά γονίδια) και άλλοι που επιδιορθώνουν τις βλάβες του DNA. Επιπλέον παίζουν σημαντικό ρόλο χρωμοσωμικές αλλοιώσεις, όπως η ενίσχυση ή η απάλειψη γονιδίων, οι σημειακές μεταλλάξεις, η απώλεια της ετεροζυγωτίας, οι ανευπλοειδίες και οι πολυπλοειδίες. Μία από τις σημαντικότερες οδούς επιδιόρθωσης είναι αυτή του TP53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου, που όχι μόνο αναστέλλει την πρόοδο από τη φάση G2 στη φάση M της κυτταρικής διαίρεσης σε περίπτωση βλάβης του γονιδιώματος, αλλά φαίνεται να ρυθμίζει τη βιολογική δράση των βλαστοκυττάρων με αποτέλεσμα απώλεια του γονιδίου TP53 να προκαλεί αύξηση των βλαστικών κυττάρων του μαστού (143).

Ένα από τα πιο αναγνωρισμένα μόρια που εμπλέκονται επίσης στη βιολογία του καρκίνου του μαστού είναι η τοποϊσομεράση IIα. Ο ρόλος των τοποϊσομερασών είναι σημαντικός για να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του DNA: κατά τη διάνοιξη (ξεδίπλωμα) της διπλής έλικας συμβαίνει υπερελίκωσή της, με αποτέλεσμα να μη δύναται να προχωρήσει η αντιγραφή. Δημιουργώντας οι τοποϊσομεράσες διασπάσεις στη διπλή έλικα αποφεύγεται η υπερελίκωση (144). Πρωταρχικό ρόλο στην καρκινογένεση επιπρόσθετα διαδραματίζει η ενεργοποίηση της οδού μεταγωγής σήματος του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor EGF). Ο EGF όπως και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ο ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας (Insulin-like Growth Factor, IGF) και ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας, (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), συνδέονται με τον υποδοχέα EGFR (HER1) με αποτέλεσμα τον διμερισμό του EGFR και την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου τμήματος του EGFR. Η φωσφορυλίωση του EGFR έχει σαν συνέπεια την ενεργοποίηση κυρίως δύο κατιουσών οδών μεταγωγής σήματος: α) την οδό Ras → Raf , MEK, mitogen activated protein kinase (MAPK) και ERK , β) την οδό του PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) AKT → m-TOR (mammalian target of rapamycin).

Μέσω των υποδοχέων HER1 (EGFR) και HER2 ενεργοποιείται η οδός μεταγωγής της PI3K. Εκτός του υποδοχέα EGFR, η ενεργοποίηση της PI3K μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω άλλων υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης, όπως ο υποδοχέας του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R), μέσω των μορίων προσκόλλησης κυττάρων όπως οι ιντεγκρίνες και των προϊόντων ογκογονιδίων όπως του Ras. Η Akt υπάρχει ως τρεις δομικές παρόμοιες ισομορφές, Akt1, Akt2 και Akt3, οι οποίες εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς. (145,146,147).

Η φωσφορυλίωση της Akt στο S473 ελέγχεται από μια φωσφατάση (την PHLPP), που ανευρίσκεται σε δυο ισομορφές και καταλύουν την αποφωσφορυλίωση της Akt στο S473 (148,149,150). Στη διαδικασία αυτή εμπλέκεται και η πρωτεΐνη PTEN, γνωστή για την ογκοκατασταλτική της δράση, μέσω αποφωσφορυλίωσης της PI3K. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 και ανευρίσκεται μεταλλαγμένο σε μεγάλο αριθμό καρκινωμάτων (151,152). Ενίσχυση του γονιδίου της Akt1 έχει περιγραφεί στο ανθρώπινο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και ενίσχυση της Akt2 έχει

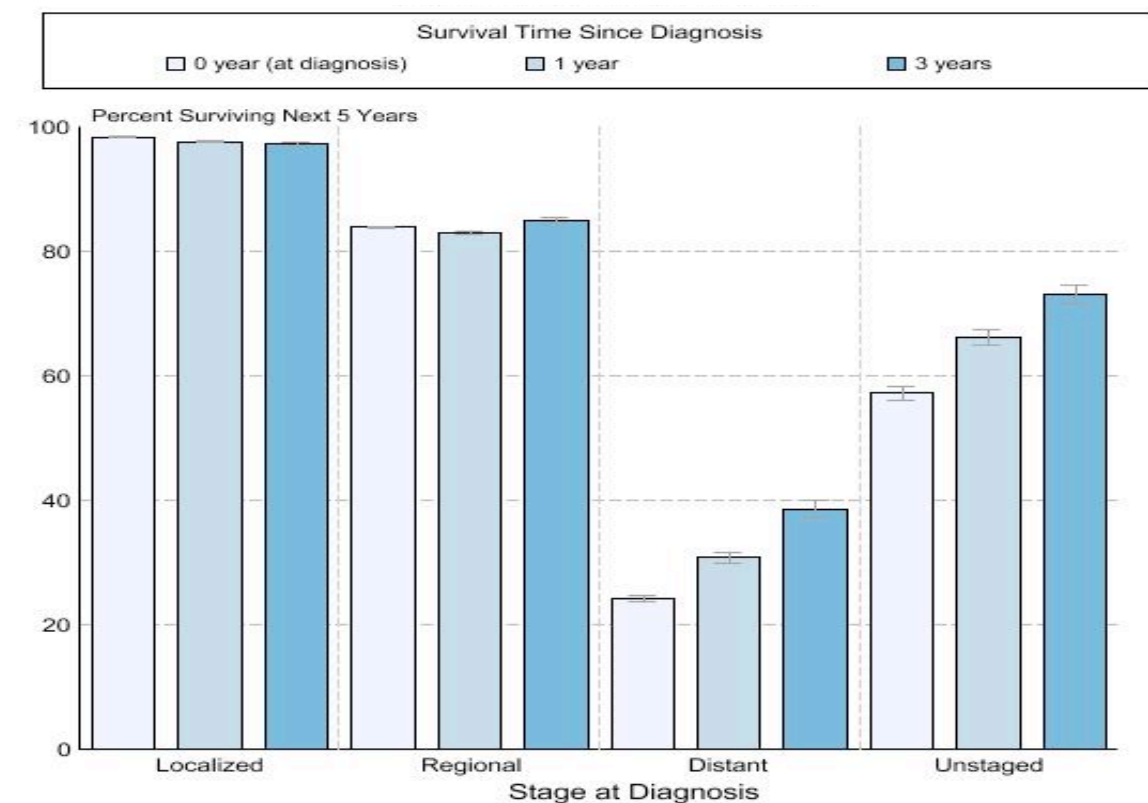
περιγραφεί στο καρκίνωμα των ωοθηκών, του μαστού και του παγκρέατος (153,154,155).

Αν και μεταλλάξεις της Akt είναι σπάνιες, πρόσφατα έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις του Akt1 σε ένα μικρό ποσοστό των καρκινωμάτων του μαστού, των ωοθηκών, και του παχέος εντέρου (155). Ο mTOR είναι ένα μέλος αυτού του μονοπατιού και παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ρύθμιση της απρόσκοπτης εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και των σημείων ελέγχου (checkpoints) της κυτταρικής απάντησης σε περιπτώσεις βλάβης του DNA (71). Έχει διαπιστωθεί από το σύνολο των δημοσιευμένων μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία ότι η οδός αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ογκογένεση του καρκίνου του μαστού. Η αναστολή της ενεργοποίησης του mTOR έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντικού βαθμού καταστολή της μετάδοσης σημάτων διαμέσου της οδού PI3K/Akt και παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1. Ο σημαντικός ρόλος του mTOR φαίνεται από το γεγονός πως η έκφραση της φωσφορυλιωμένης (ενεργοποιημένης) μορφής του σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση (156,157,158,159,160-174). Η οδός PI3K/Akt/mTOR φαίνεται να ενεργοποιείται επίσης από τους ορμονικούς υποδοχείς καθώς και από τον υποδοχέα insulin-like growth factor - 1 (IGF-1R) (160).

1.2.6. Προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο του μαστού - Ιστοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες.

Η σχετική 5ετής επιβίωση για το διηθητικό καρκίνο του μαστού για όλα τα στάδια της νόσου ανέρχεται σε 89,2%. Σε εντοπισμένη κλινικά νόσο κατά τη διάγνωση ανέρχεται σε 98,6% ενώ όταν η νόσος έχει επεκταθεί περιοχικά ή σε απομακρυσμένες θέσεις, η 5ετής επιβίωση μειώνεται σε 84,4% και 24,3% αντίστοιχα. (Εικόνα 1.3) . Η πρόγνωση της νόσου τροποποιείται ευρέως ανάλογα με κλινικούς, ιστολογικούς και βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες.

Εικόνα 1.3 : Σχηματική απεικόνιση 5ετούς επιβίωσης του καρκίνου του μαστού ανάλογα με το στάδιο νόσου. Προσαρμογή από SEER Cancer Statistics Review 1975-2011.



Οι κύριοι μορφολογικοί-ιστοπαθολογικοί παράγοντες που καθορίζουν την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού όπως έχει προαναφερθεί είναι το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας, η ύπαρξη ή όχι μεταστάσεων στους λεμφαδένες και η γενικότερη μεταστατική νόσος, η ηλικία και η εμμηνόπαυση, η ύπαρξη κύησης, ο διηθητικός τύπος του καρκινικού όγκου, ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός κακοήθειας του καρκινώματος. Επίσης βιολογικοί προγνωστικοί παράγοντες όπως το ογκογονίδιο *Cerb2/neu-Her2*, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53*, ο σημαντικός δείκτης και ρυθμιστής απόπτωσης *bcl-2* καθώς και ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού *Ki-67* και το κλάσμα DNA στην S-φάση. Συγκεκριμένα, τροποποιήσεις της πρωτεΐνης *p53* έχουν παρατηρηθεί στο 20-50% των κακοηθών όγκων του μαστού και φαίνεται πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας, κλινικά επιθετικότερη συμπεριφορά του όγκου και χειρότερη πρόγνωση των ασθενών. Επίσης η πρωτεΐνη *bcl-2* εκφράζεται στους επιθετικότερους καρκίνους όπου δείχνει και τον υψηλότερο ρυθμό απόπτωσης αυτών, αποτελώντας ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα, καθώς σχετίζεται με κακή πρόγνωση και μειωμένη ανταπόκριση στην κυτταροτοξική θεραπεία. Η έκφρασή της επίσης έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, μικρο μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου και με χαμηλό βαθμό κακοήθειας (175-180).

1.2.6.1. Βαθμός κακοήθειας

Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας είναι σημαντικό στοιχείο προγνώσεως. Ο τρόπος προσδιορισμού πρέπει να είναι αναπαραγώγιμος, και να ελαττώνει όσο γίνεται περισσότερο τον υποκειμενικό παράγοντα, με δεσμεύσεις και συμμόρφωση σε σαφές πρωτόκολλο. Το ευρέως κοινά αποδεκτό σύστημα αξιολόγησης του καρκίνου του μαστού είναι η τροποποιημένη κατά Elston και Ellis μέθοδος Nottingham του αρχικού κατά Bloom και Richardson συστήματος.

Η μέθοδος περιλαμβάνει την εκτίμηση τριών στοιχείων της μορφολογίας του όγκου: το σχηματισμό σωληναρίων, τη μορφολογία των πυρήνων και τον αριθμό των μιτώσεων. Κάθε στοιχείο βαθμολογείται από 1 έως 3. Η άθροιση των βαθμών παρέχει τον συνολικό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

- Σχηματισμός σωληναρίων: Όταν ο όγκος σχηματίζει σωλήνες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% της έκτασής του, βαθμολογείται ως 1. Όταν το ποσοστό αυτό κυμαίνεται στο 10%-75%, τότε βαθμολογείται ως 2 και, όταν οι σωληνώδεις σχηματισμοί αντιπροσωπεύουν ποσοστό μικρότερο του 10%, τότε βαθμολογείται ως 3.
- Μορφολογία πυρήνων: Μικροί πυρήνες με μικρή αύξηση του μεγέθους σε σύγκριση με τα κανονικά επιθηλιακά κύτταρα, κανονικό περίγραμμα, ομοιόμορφη κατανομή της χρωματίνης και μικρή διακύμανση του μεγέθους βαθμολογούνται ως 1. Κύτταρα μεγαλύτερα από το φυσιολογικό, με φυσσαλιδώδεις αραιοχρωματικούς πυρήνες, ορατά πυρήνια και μικρή διάκυμανση στο μέγεθος και στο σχήμα, βαθμολογούνται ως 2. Φυσσαλιδώδεις πυρήνες, συχνά με εμφανή πυρήνια, που παρουσιάζουν εκσεσημασμένη διακύμανση στο μέγεθος και στο σχήμα, πολλές φορές με πολύ μεγάλες και περίεργες μορφές, βαθμολογούνται ως 3.
- Μιτώσεις: Ο βαθμός εξαρτάται από τον αριθμό των μιτώσεων ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (hpf 40x), που υπολογίζονται στην περιφέρεια του όγκου. Το μέγεθος των οπτικών πεδίων διαφέρει ανάλογα με τον τύπο των

αντικειμενικών φακών με τον οποίο είναι εφοδιασμένο το μικροσκόπιο.

- Ο βαθμός κακοήθειας προκύπτει από την άθροιση των αριθμών για τις σωληνώδεις βλάβες, την πολυμορφία των πυρήνων και τον αριθμό των πυρηνοκινήσιων, ως ακολούθως :

Βαθμός κακοήθειας 1 = άθροισμα 3 ως 5, Βαθμός κακοήθειας 2 = άθροισμα 6 ως 7,

Βαθμός κακοήθειας 3 = άθροισμα 8 ως 9

Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας δεν πρέπει να περιορίζεται στο διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου, αλλά να πραγματοποιείται για όλους τους ιστολογικούς υπότυπους, με εξαίρεση το σωληνώδες και το μυελοειδές καρκίνωμα, όπου ο βαθμός κακοήθειας είναι προφανής. Ο βαθμός κακοήθειας είναι σημαντικός δείκτης επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο μαστού. Ασθενείς με βαθμό κακοήθειας 1 έχουν 85% πιθανότητα δεκαετούς επιβίωσης σε αντίθεση με τις ασθενείς με βαθμό κακοήθειας 3, όπου το ποσοστό είναι μικρότερο του 45% (162-166).

1.3. Η πρωτεΐνη Νεστίνη

1.3.1. Ο κυτταροσκελετός

1.3.1.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Ο κυτταροσκελετός είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο πρωτεϊνικών ινιδίων που εκτείνεται σε όλο το κυτταρόπλασμα και θεωρείται υπεύθυνος για τις κυτταρικές κινήσεις, την οργάνωση των οργανιδίων μέσα στο κύτταρο, την κυτταρική διαίρεση, τη μεταβίβαση της δύναμης και τη μεταγωγή των μηνυμάτων. Τα κύτταρα περιέχουν τρεις τύπους κυτταροσκελετικών ινιδίων: τα μικροϊνίδια της ακτίνης, τα ενδιάμεσα ινίδια και τους μικροσωληνίσκους. Ο κυτταροσκελετός θεωρείται πλέον χαρακτηριστικό γνώρισμα τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών κυττάρων και κάθε κατηγορία κυτταροσκελετικών ινιδίων έχει διαφορετικό ρόλο μέσα στο κύτταρο που προκύπτει από τον πολυμερισμό διαφορετικών πρωτεϊνικών υπομονάδων (181).

Τα μικροϊνίδια της ακτίνης είναι ελικοειδή πολυμερή της πρωτεΐνης ακτίνης. Παρότι τα νημάτια ακτίνης είναι διασκορπισμένα σε ολόκληρο το κύτταρο, εμφανίζουν μεγάλη συγκέντρωση κάτω ακριβώς από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και την ανθεκτική τάση αυτού. Επίσης συμμετέχουν σε ορισμένες διακυτταρικές συνδέσεις καθώς και στην επικοινωνία του κυττάρου με τον εξωκυττάριο χώρο, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική κίνηση και αποτελούν κύριο συστατικό της συσταλτικής συσκευής του σαρκομεριδίου του μυϊκού κυττάρου, ρυθμίζοντας την μυϊκή σύσπαση (182).

Οι μικροσωληνίσκοι είναι επιμήκεις κύλινδροι με διάμετρο 25 nm και μήκος που κυμαίνεται από 200nm έως 25 μ m. Συγκροτούνται από 13 πρωτοϊνίδια που είναι πολυμερή των διμερών α και β τουμπουλίνης, ενώ η περιοχή οργάνωσης τους ονομάζεται κεντροσωμάτιο (183).

Τα ενδιάμεσα ινίδια έχουν κατά μέσο όρο διάμετρο 10-12 nm που είναι ενδιάμεση της διαμέτρου των μικροϊνιδίων ακτίνης και αυτής των μικροσωληνίσκων και δομούνται από διαφορετικές πρωτεϊνικές υπομονάδες που συγκροτούν μια μεγάλη ετερογενή οικογένεια. Οι πρωτεΐνες αυτές σε αντιθεση με τις άλλες ομάδες πρωτεϊνών που

περιγράφησαν παρουσιάζουν αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη έκφραση. Ο πολυμερισμός και η αποδιοργάνωσή τους ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση, ενώ μέλη της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων συμμετέχουν στη συγκρότηση του πυρηνικού σκελετού, καθιστώντας εμφανή την πολυπλοκότητα των διεργασιών στις οποίες συμμετέχουν (184).

1.3.1.2. Κυτταροσκελετός των ενδιάμεσων ινιδίων

Σε αντίθεση με τα φυτά και τους μύκητες, τα κύτταρα των οποίων περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, στα κύτταρα των ζωϊκών οργανισμών δεν εμφανίζεται η συγκεκριμένη δομή. Αντίθετα παρατηρείται σε αυτά η ύπαρξη κυτταροπλασματικών διαφοροποιήσεων που επιτρέπουν την διακυτταρική σύνδεση και επικοινωνία όπως οι χασματοσύνδεσμοι, τα δεσμοσώματα, οι σύνδεσμοι πρόσδεσης και οι στενοσύνδεσμοι. Αυτοί οι σύνδεσμοι, μαζί με τα ενδιάμεσα ινίδια που είναι ένα κυτταροσκελετικό σύστημα ειδικό για τα μετάζωα, αλλά και με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που διασυνδέουν, δημιουργούν ένα διακυτταρικό δίκτυο που συνδέει μεμονωμένα κύτταρα σε ιστούς (184,185). Στον άνθρωπο, στον οποίο οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων κωδικοποιούνται από τουλάχιστον 65 γονίδια, πρόκειται για κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, με εξαίρεση τις λαμίνες B1, B2 και A/C που είναι συγκεντρωμένες στο δίκτυο της πυρηνικής μεμβράνης (186).

Το κύριο χαρακτηριστικό που διακρίνει τα ενδιάμεσα ινίδια από τα άλλα στοιχεία του κυτταροσκελετού είναι η ιστοειδική και αναπτυξιακά ρυθμιζόμενη έκφρασή τους. Οι κερατίνες για παράδειγμα, εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα, η βιμεντίνη (vimentin) στους ινοβλάστες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Η δεσμίνη (desmin), η συνεμίνη (synemin), η συνκοιλίνη (syncollin) και η δεσμουλίνη (desmulin) στα μυϊκά κύτταρα, ενώ οι νεύροϊνδιακές πρωτεΐνες NF-L, NF-M, NF-H (Neurofilament Light, Medium, Heavy) και η α-ιντερνεξίνη (α-internexin) στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα. Επιπλέον, η έλλειψη δομικής ποικιλότητας, ο τρόπος συγκρότησης και ανακύκλωσής τους μέσα στα κύτταρα και η σύνδεσή τους με διακριτές δομές προσκόλλησης, είναι

στοιχεία που ξεχωρίζουν τα ενδιάμεσα ινίδια από τα μικροϊνίδια της ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους (187,188).

1.3.1.3. Δομή των ενδιάμεσων ινιδίων

Οι πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων έχουν ομαδοποιηθεί σε 5 τύπους, βάσει της ομοιότητάς της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Οι όζινες και οι βασικές κερατίνες έχουν κατηγοριοποιηθεί ως ενδιάμεσα ινίδια τύπου I και II αντίστοιχα. Η βιμεντίνη, η δεσμίνη, η GFAP (glial fibrillary acidic protein), η περιφερίνη (periferin) και η συνκοιλίνη είναι τα τύπου III ενδιάμεσα ινίδια, οι νεύροϊνιδιακές πρωτεΐνες NF-L, NF-M, NF-H (Neurofilament Light, Medium and Heavy) και η α-ιντερνεξίνη, η συνεμίνη, η νεστίνη και η δεσμουσλίνη ανήκουν στα ενδιάμεσα ινίδια τύπου IV και τελευταίες οι πυρηνικές λαμίνες τα τύπου V. Πρόσφατα, η φιλεσίνη (filensin) και η φακινίνη (phakinin), ομαδοποιήθηκαν σε ένα νέο τύπο πρωτεΐνων των ενδιάμεσων ινιδίων, διότι με τις ιδιότητες που παρουσιάζουν δεν μπορούν να καταταγούν σε κάποιον από τους προηγούμενους τύπους. Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων παρουσιάζεται στον πίνακα 1.7.

Πίνακας 1.7 Ομαδοποίηση των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων. Από: *Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S.V. Strelkov, and U. Aebi. 2007. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. Nat Rev Mol Cell Biol. 8:562-73.*

Όνομα	Τύπος	Ιστοειδικότητα
Κερατίνες (όξινες) (9-20)	I	Επιθήλιο
Κερατίνες (βασικές) (1-8)	II	Επιθήλιο
Βιμεντίνη	III	Μεσέγχυμα
Δεσμίνη	III	Μυς
GFAP	III	Αστροκύτταρα/γλοία
Περιφερίνη	III	Π.Ν.Σ., Νευρώνες
Συνκοιλίνη	III	Μυς
Νευροινίδια (ελαφριά, μεσαία και βαριλα αλυσίδα, NF-L, NF-M, NF-H)	IV	Κ.Ν.Σ.
α-ιντερνεξίνη	IV	Κ.Ν.Σ.
Νεστίνη	IV	Νευροεπιθήλιο
Συνεμίνη	IV	Μυς
Λαμίνες Α και C	V	(nuclear lamina)
Λαμίνες Β1 και Β2	V	(nuclear lamina)
Πλακοφιλίνη	Ορφανό	Φακός οφθαλμού
Φιλεσίνη	Ορφανό	Φακός οφθαλμού

Παρά τη μεγάλη ετερογένεια που υπάρχει μεταξύ των πρωτεϊνών των ενδιάμεσων ινιδίων, όλες εμφανίζουν παρόμοια δομή όπως μια κεντρική ραβδόμορφη περιοχή μήκους περίπου 45nm, με διαμόρφωση α-έλικας, η οποία περιβάλλεται από τις μη ελικοειδείς άμινο- και καρβόξυ- τελικές περιοχές που χαρακτηρίζονται ως κεφαλή (head) και ουρά (tail) αντίστοιχα. Η ραβδόμορφη περιοχή διακόπτεται από 3 συνδετικές περιοχές και θεωρείται σχετικά συντηρημένη μεταξύ των ενδιάμεσων ινιδίων, ενώ η κεφαλή και η ουρά παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια αναφορικά με το μέγεθος, την αλληλουχία, τη δομή και τη λειτουργία τους (189,190,191).

1.3.1.4. Συγκρότηση ινιδίων

Η απλούστερη δομική μονάδα ενδιάμεσων ινιδίων αποτελείται από ένα τετραμερές το οποίο περιλαμβάνει 2 αντιπαράλληλα διατεταγμένα διμερή. Το κάθε διμερές αποτελείται από δύο μόρια σε παράλληλη διάταξη που σχηματίζουν μια σταθερή δομή σπειροειδούς έλικας. Η αντιπαράλληλη διάταξη είναι ο λόγος που τα ενδιάμεσα ινίδια δεν παρουσιάζουν πόλωση, στοιχείο που τα διακρίνει από τα μικροϊνίδια της ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους (192).

Η διαμόρφωση του δικτύου των ενδιάμεσων ινιδίων εξαρτάται κυρίως από τον τύπο τους και οι κυτταροπλασματικές μονάδες μπορούν να συγκροτήσουν δυο τύπους ινιδίων: αυτά που αποτελούνται από ομοπολυμερή και αυτά που τα συγκροτούν ετεροπολυμερή. Για παράδειγμα, τα ινίδια των κερατινών απαρτίζονται από ετεροπολυμερή ενός βασικού και ενός όξινου διμερούς, ενώ η δεσμίνη και η συνκοιλίνη δεν είναι ικανά να σχηματίσουν δίκτυο αλλά ενσωματώνονται μεταξύ άλλων διμερών, όπως της δεσμίνης και της βιμεντίνης (191).

Η συγκρότηση των κυτταροπλασματικών ινιδίων ακολουθεί τρία στάδια: Στο πρώτο στάδιο σχηματίζονται πλήρους διαμέτρου ινίδια μήκους 60nm και πλάτους 20nm, τα οποία είναι γνωστά ως μονάδα μήκους ινιδίων και είναι ιδιαίτερα σταθερά σε ακραίες καιρικές συνθήκες. Κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η επιμήκυνση των ινιδίων με την κατά μήκος σύνδεση διαφορετικών μονάδων. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται μείωση της διαμέτρου των ινιδίων.

1.3.1.5. Μηχανισμοί ρύθμισης

Τα ενδιάμεσα ινίδια υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση με βάση το πρόγραμμα διαφοροποίησης του κάθε ιστού. Η ενδοκυτταρική οργάνωση και οι λειτουργίες των ενδιάμεσων ινιδίων ρυθμίζονται τόσο από διαφορετικές μεταφραστικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, διαγλουταμίνωση) όσο και από την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών. Τα ενδιάμεσα ινίδια πολυμερίζονται ενώ κατά τη διάρκεια της μίτωσης παρατηρείται αναδιοργάνωση τόσο των κυτταροπλασματικών ενδιάμεσων ινιδίων όσο και των πυρηνικών λαμινών (193,194,195,196).

1.3.1.6. Λειτουργίες των ενδιάμεσων ινιδίων

Είναι γνωστό πως τα ενδιάμεσα ινίδια συμμετέχουν στον καθορισμό του κυτταρικού σχήματος, στη διατήρηση του πυρήνα στη σωστή του θέση και στη κατανομή και μετακίνηση οργανιδίων και πρωτεϊνών. Εμπλέκονται με τη συμμετοχή τους στη δημιουργία του κυτταρικού σκελετού και στη μεταγωγή σημάτων. Λόγω της μεγάλης αναπτυξιακής τους εξειδίκευσης, παίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και συμμετέχουν στα μονοπάτια της απόπτωσης καθώς αποτελούν υποστρώματα πέψης για τις κασπάσες.

Στις πρωταρχικές τους λειτουργίες είναι και η μηχανική στήριξη με καλύτερο παράδειγμα αυτό της επιδερμίδας, στη οποία απαντώνται κερατίνες τύπου I και II, οι οποίες είναι άφθονες στα κερατινοκύτταρα. Επίσης συμβάλουν στη διατήρηση της κυτταρικής αρχιτεκτονικής, στη κυτταρική μετανάστευση, στη μεταγωγή σημάτων και στη γενικότερη τροποποίηση του μηνύματος που λαμβάνεται από τον εξωκυτταρικό χώρο (197,198,199).

1.3.1.7. Ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις των ενδιάμεσων ινιδίων.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί 79 διαφορετικές ασθένειες που σχετίζονται με μεταλλάξεις της οικογένειας των ενδιάμεσων ινιδίων, η κλινική εκδήλωση των οποίων εξαρτάται από την διεισδυτικότητα (penetrance) των μεταλλάξεων. Οι σημαντικότερες από τις μεταλλάξεις αυτές συνοψίζονται στον πίνακα 1.8 (200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214).

Πίνακας 1.8 Ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις των Ενδιάμεσων Ινιδίων.

Γονίδιο που φέρει μετάλλαξη	Ανωμαλία που προκαλεί
Κερατίνες 1,5,10 και 14	Επιδερμολυτικό φυσσαλιδώδες σύμπλοκο (Epidermolysis bullosa simplex)
Κερατίνες 8 και 18	Κίρρωση του ήπατος
Κερατίνη 8	Φλεγμονώδης ασθένεια του εντέρου
Κερατίνη 9	Παλαμοπελματικό κερατόδερμα (επιδερμολυτικό)
Κερατίνες 1 και 16	Τοπική υπερκερατίνωση παλάμης και πέλματος
Κερατίνες 1 και 16	Αλωπεκεία
Κερατίνες 6,16 και 17	Παχυνουχία
Λαμίνες A και C	Charcot-Marie-Tooth ασθένεια
Λαμίνες A και C	Διατατική μυοκαρδιοπάθεια
Λαμίνες A και C	Σύνδρομο προγηρίας Hytchinson-Gilford
Λαμίνες A και C	Λιποδυστροφία
Λαμίνες A και C	Μυϊκή δυστροφία Emery Dreifuss
Λαμίνες A και C	Μυϊκή δυστροφία Limb girdle
	Δεσμινοπάθεια
	Διατατική Μυοκαρδιοπάθεια
GFAP	Ασθένεια Alexander
NF-L	Charcot-Marie-Tooth ασθένεια
	Νεανικός καταρράκτης
NF-H/	Αμυοτροφική πλάγια σκλήρυνση

1.3.2. Μηχανισμός δράσης της πρωτεΐνης νεστίνης - Τελευταίες μελέτες.

Όπως έχει προαναφερθεί η νεστίνη είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο NES και ανήκει στα ενδιάμεσα ινίδια τύπου VI. Τα μέλη

της ομάδας αυτής συναρμολογούνται ως επί το πλείστον κατά προτίμηση ως ετεροπολυμερή στους ιστούς. Οι Steinert et al. έδειξαν ότι μορφές νεστίνης σχηματίζουν ομοδιμερή και ομοτετραμερή αλλά δεν σχηματίζουν ενδιάμεσα ινίδια από μόνες τους *in vitro*. Σε μίγματα, η νεστίνη κατά προτίμηση συγκροτείται μαζί με τη βιμεντίνη ή του τύπου IV ενδιάμεσο ινίδιο ιντερνεξίνη ώστε να σχηματιστούν ετεροδιμερή μόρια διπλής ελίκωσης.

Οι ερευνητές της Ιατρικής Σχολής του Ντάρτμουθ στο Νιου Χαμσάιρ, διαπίστωσαν ότι κύτταρα στον φυσιολογικό μαστικό ιστό εκφράζουν νεστίνη. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι εξαιρετικά υψηλά επίπεδα νεστίνης υπάρχουν στους βασικούς επιθηλιακούς μαστικούς όγκους, οι οποίοι αποτελούν έναν ιδιαίτερα επιθετικό καρκίνο του μαστού, ο οποίος είναι συχνός κυρίως μεταξύ των νέων γυναικών αφροαμερικανικής καταγωγής. Σε μια πρώτη μελέτη, οι ερευνητές εξέτασαν μικρό δείγμα μαστικών όγκων, δεκαέξι εκ' των οποίων ήταν βασικοί επιθηλιακοί. Δεκατέσσερα δείγματα διαπιστώθηκε ότι είχαν υψηλά επίπεδα νεστίνης, ενώ οι όγκοι με ορμονικούς υποδοχείς ή οι HER2 υπότυποι δεν εμφάνισαν ενδείξεις παρουσίας της πρωτεΐνης. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σύμφωνες με παλαιότερες έρευνες που είχαν εξακριβώσει ότι οι βασικοί επιθηλιακοί μαστικοί όγκοι, πηγάζουν από μαστικά βλαστοκύτταρα που έχουν υποστεί γενετική στρέβλωση. Οι όγκοι αυτοί είναι πιο επιθετικοί σε σχέση με άλλους όγκους του μαστού, διότι εξελίσσονται ταχέως και έχουν υψηλό ποσοστό υποτροπής (215,216).

Ένα ουσιαστικό πρόβλημα στην καταπολέμηση της συγκεκριμένης μορφής καρκίνου, σε μοριακό επίπεδο, είναι ότι οι βασικοί επιθηλιακοί μαστικοί όγκοι δεν εκφράζουν κανέναν από τους δείκτες που βοηθούν στην αντιμετώπιση άλλων μορφών καρκίνου του μαστού. Δηλαδή, δεν έχουν ούτε υποδοχείς για οιστρογόνα ή προγεστερόνη ούτε και εκφράζουν υποδοχείς για την πρωτεΐνη HER2. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οι γυναίκες με τη συγκεκριμένη μορφή καρκίνου του μαστού δεν μπορούν να πάρουν φάρμακα που στοχεύουν την προγεστερόνη και τα οιστρογόνα, συμπεριλαμβανομένης της ταμοξιφαίνης και των αναστολέων αρωματάσης ή αντίστοιχα αντι-HER2 θεραπεία. Αυτή λοιπόν η έλλειψη μοριακών δεικτών περιπλέκει και τη διάγνωση, ενώ φαίνεται πως η εύρεση ενός οριστικού και εκλεκτικού δείκτη για τους βασικούς επιθηλιακούς όγκους του μαστού μπορεί να βοηθήσει τους επιστήμονες να διαγνώσουν γρηγορότερα την πάθηση, ενώ μπορεί να είναι χρήσιμος και στην παρακολούθηση της καρκινικής

υποτροπής αφού η ασθενής έχει αποθεραπευτεί.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της νεστίνης συνδέεται με την εξέλιξη της νόσου και την σχετικά κακή πρόγνωση αυτής σε καρκίνους του μαστού, ιδιαίτερα για εκείνους με προχωρημένη λεμφαδενική μετάσταση (215,216). Η νεστίνη είναι γνωστό ότι αποτελεί ένα σημαντικό δείκτη νευρικών βλαστικών κυττάρων και εκφράζεται στα καρκινικά βλαστοκύτταρα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού (217). Σημαντικά ευρήματα από τελευταίες μελέτες σε επέκταση από προηγούμενες παρατηρήσεις όπου μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης της νεστίνης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μελανώματος *in vitro*, και την ανάπτυξη εμφυτευμένων παγκρεατικών όγκων *in vivo*, υποδεικνύουν ότι μπορεί να ενισχύσει η νεστίνη τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων του μαστού (Breast CSC), συμβάλλοντας στην εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνου του μαστού (218,219). Αναμφισβήτητα επίσης υπάρχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον ως προς την προσπάθεια κατανόησης και περαιτέρω διερεύνησης σε σχέση με το πώς η νεστίνη αναστέλλει την ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου του μαστού *in vivo*.

Όπως προαναφέρθηκε η μετάσταση του καρκίνου σχετίζεται με την κακή πρόγνωση των ασθενών με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο στον καρκίνο του μαστού. Ενδιαφέρον λοιπόν παρουσιάζει πως στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα του μαστού, το φαινόμενο της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition) σχετίζεται με αυξημένη ικανότητα διήθησης και μετάστασης (220). Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι *knockdown* στην έκφραση της νεστίνης μετρίασε την διεισδυτικότητα των θετικών σε νεστίνη καρκινικών βλαστοκυττάρων, η οποία συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένα επίπεδα των δεικτών N-καδερίνης, βιμεντίνης και του α -SMA, αλλά αυξημένα επίπεδα της E-καδερίνης στα μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Επιπλέον, σίγηση της νεστίνης μείωσε σημαντικά τα σχετικά επίπεδα των MMP2, MMP9 και VEGF στα μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα (221).

Τελευταίες μελέτες δείχνουν πως *knockdown* στην έκφραση της νεστίνης, με άλλα λόγια σίγηση της νεστίνης, αναστέλλει την αυθόρμητη διαδικασία της επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης στα μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Επίσης, αυξημένα επίπεδα επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετάβασης και ταυτόχρονη έκφραση

δεικτών βλαστικής ικανότητας συνδέονται με την εξέλιξη και τη μετάσταση του διηθητικού καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των τριπλά αρνητικών καρκίνων του μαστού (218,219,220). Περαιτέρω μελέτες πάντως ενδιαφέρονται να δείξουν και εστιάζουν στην περαιτέρω διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους η νεστίνη ρυθμίζει τη διαδικασία της επιθηλιακής μεσεγγυματικής μετάβασης στα μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την ογκογονικότητα των βλαστοκυττάρων. Προφανώς, η επαγωγή της υπερέκφρασης του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης ενισχύει την ογκογονικότητα των μαστικών καρκινικών βλαστοκυττάρων. Έρευνες υποστηρίζουν με σαφήνεια πως η σίγηση της νεστίνης αναστέλλει την ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης στα μαστικά καρκινικά βλαστοκύτταρα, οδηγώντας σε επιθετικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σε αύξηση της διεισδυτικότητας και τέλος στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Ένας πιθανός μηχανισμός για το πώς η νεστίνη ρυθμίζει το μονοπάτι Wnt/β-κατενίνης είναι ότι έμμεσα επηρεάζει τη δραστηριότητα της GSK-3β (Glycogen synthase kinase 3: μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης / θρεονίνης που διαμεσολαβεί στην προσθήκη μορίων φωσφόρου σε υπολείμματα αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης) στα μαστικά καρκινικά βλαστοκύτταρα (221,222,223,224).

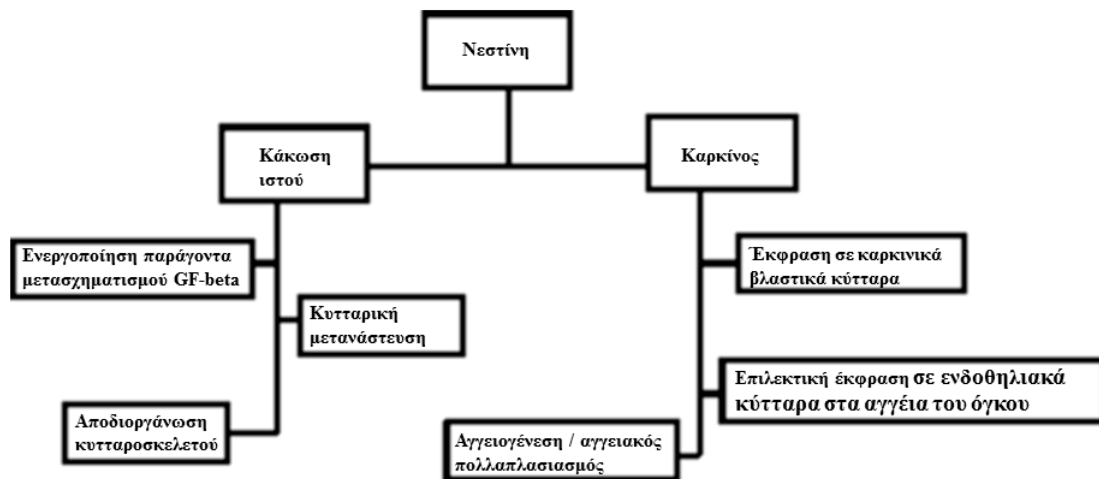
Έκφραση της νεστίνης σε ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί επίσης με κακή επιβίωση Κινέζων ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, «Nestin-high» αλλά όχι «Nestin-low» μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα εμφάνισαν ισχυρή ογκογονικότητα για να σχηματίσουν mammospheres in vitro και να επάγουν συμπαγείς όγκους ίη νίνο. Τέλος, μελέτες στη βιβλιογραφία δείχνουν πως knockdown στην έκφραση της νεστίνης ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και τη διεισδυτικότητα, αλλά ενίσχυσε την αυθόρμητη απόπτωση στα μαστικά καρκινικά βλαστοκύτταρα (221 224,226).

1.3.3. Έκφραση της νεστίνης σε φυσιολογικούς ιστούς, σε φλεγμονή και στον καρκίνο.

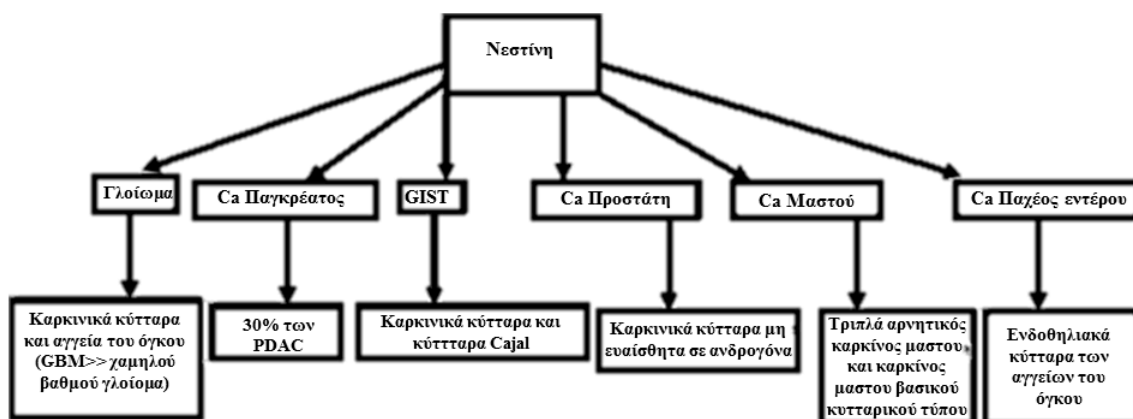
Όπως έχει προαναφερθεί στα ευκαρυωτικά κύτταρα, ο κυτταροσκελετός περιλαμβάνει τρία βασικά νηματοειδή συστατικά: τα μικροϊνίδια ακτίνης, τους μικροσωληνίσκους και τα ενδιάμεσα νημάτια (227). Η νεστίνη αντιπροσωπεύει ένα ενδιάμεσο νημάτιο της κλάσης VI, που αρχικά ανιχνεύθηκε στα νευροεπιθηλιακά βλαστοκύτταρα. Επίσης, περιέχει περισσότερα από 1600 αμινοξέα (228), ένα σύντομο N-τελικό άκρο και ένα ασυνήθιστα μακρύ C άκρο, το οποίο αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσων νηματίων και έχει την ικανότητα να σχηματίζει ετεροδιμερή και μικτά πολυμερή, αλλά όχι ομοπολυμερή, σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες ενδιάμεσα νημάτια (229-231). Το καλά διατηρημένο γονίδιο της νεστίνης περιέχει τέσσερα εξόνια και τρία ιντρόνια (228, 232-233). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) πολλαπλά ρυθμιστικά στοιχεία που συμπεριλαμβάνονται σε μια σχετικά σύντομη εξελικτικά συντηρημένη περιοχή κωδικοποιούν μία περιοχή ενισχυτή εντοπισμένη στο «μισό του δεύτερου εσωνίου στο τρίτο γονίδιο της νεστίνης, η οποία είναι επαρκής για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης σε προγονικά κύτταρα του ΚΝΣ (234- 237). Μία άλλη ιστο-ειδική περιοχή ενισχυτή που βρίσκεται στο πρώτο ιντρόνιο έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της νεστίνης σε μυϊκά προγονικά κύτταρα (234). Επιπλέον, η δέσμευση των παραγόντων μεταγραφής όπως των SOX και POU στον 3ο ενισχυτή του δεύτερου ιντρονίου του γονιδίου της νεστίνης έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί την έκφραση της νεστίνης (238).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η νεστίνη εκφράζεται σε νευρικά βλαστικά κύτταρα (NSCs) και νευρικά προγονικά κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS), που κυμαίνονται από εμβρυϊκά προς ενήλικα στάδια (227) και ως εκ τούτου η νεστίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως δείκτης για τον εντοπισμό και την απομόνωση των NSCs (228-230). Όπως τα NSCs διαφοροποιούνται σε νευρικά και γλοιακά κύτταρα κατά την ανάπτυξη του ΚΝΣ, η έκφραση της νεστίνης μειώνεται σταδιακά και η πρωτεΐνη αντικαθίσταται από νευροϊνίδια σε νευρώνες και σε νευρογλοιακά κύτταρα (231). Η νεστίνη έχει επίσης βρεθεί ότι εκφράζεται σε πρόδρομα μυογονικά κύτταρα (232), και στην ανάπτυξη διαφόρων ιστών όπως της καρδιάς (233), στους όρχεις (234) στον ανθρώπινο οφθαλμό και στα δόντια (235) (Εικόνα 1.4, 1.5).

Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού έκφρασης της νεστίνης σε φλεγμονή και στον καρκίνο. Από: *Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A, Kontzoglou K, Weber WP, Kouraklis G. Nestin involvement in tissue injury and cancer--a potential tumor marker? Cell Oncol (Dordr). 37(5):305-15. (2014).*



Εικόνα 1.5 Έκφραση της νεστίνης σε διαφορετικά είδη καρκίνου. Από: *Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A, Kontzoglou K, Weber WP, Kouraklis G. Nestin involvement in tissue injury and cancer--a potential tumor marker? Cell Oncol (Dordr). 37(5):305-15. (2014)*



1.3.3.1. Έκφραση της νεστίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Σε πειράματα *in vivo*, νευρικά βλαστικά κύτταρα που απομονώνονται από έμβρυα knockout ποντικού για νεστίνη επιδεικνύουν σημαντικά μειωμένη ικανότητα αυτοανανέωσης με ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού απόπτωσης. Διαπιστώθηκε επίσης ότι η νεστίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την ακεραιότητα του κυτταροσκελετού (239). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι σε αυτά τα κύτταρα η νεστίνη εμπλέκεται κυρίως στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αλλά η ακριβής φάση του κυτταρικού κύκλου και το συνακόλουθο μονοπάτι που εμπλέκεται υπόκειται σε περαιτέρω πειραματική διερεύνηση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι θετικά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα στη νεστίνη μπορούν να διαφοροποιηθούν σε άλλους τύπους κυττάρων, όπως οι νευρώνες, υποδεικνύοντας ότι η νεστίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης για την ανταπόκριση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προς εξωγενή σήματα (240).

1.3.3.1.1. Εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία

Σε πειράματα όπου προκλήθηκε εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία σε αρουραίους εμφάνιστηκαν αντιδραστικά αστροκύτταρα θετικά σε νεστίνη στη ζώνη του περιεμφράγματος κατά τις τρεις πρώτες ημέρες του παροξυσμού, ενώ στον ισχαιμικό πυρήνα, η έκφραση της νεστίνης παρατηρήθηκε μόνο στα μικρά αγγεία αλλά και σε μεγαλύτερα σε διάμετρο κύτταρα (241). Μετά από 14 ημέρες η νεστίνη βρέθηκε να εκφράζεται επίσης σε κύτταρα με ιδιότητες ινοβλάστη, υποδηλώνοντας έτσι ότι μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής δομής και αναδιαμόρφωσης μετά την ισχαιμία.

1.3.3.1.2. ΚΝΣ – Καρκίνος

Πρόσφατα δεδομένα ανέδειξαν τα καρκινικά βλαστοκύτταρα ως δείκτες πρόγνωσης της νόσου, καθώς βρέθηκαν να είναι υπεύθυνα για την αντίσταση των γλοιοβλαστωμάτων στην ακτινοθεραπεία και την χημειοθεραπεία, συμβάλλοντας έτσι

στην κακή επιβίωση των ασθενών (242-247). Είναι ενδιαφέρον, ότι οι Dahlrot et al. (248) παρουσίασαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του CD133 και της νεστίνης αυξάνονται με την αύξηση του βαθμού κακοήθειας της νόσου. Επιπλέον, για τους δύο δείκτες παρατηρήθηκε σημαντική προγνωστική σημασία στην πλειονότητα των μελετών που αναφέρθηκαν, και η συνέκφραση του CD133 και της νεστίνης βρέθηκε να έχει μια ακόμη πιο ισχυρή προγνωστική αξία από τους δύο δείκτες μόνους τους. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, διαπιστώθηκε από άλλες μελέτες (249) ότι το ποσοστό επιβίωσης των θετικών σε νεστίνη +/- CD133+ ασθενών ήταν χαμηλότερο, ενώ μια πολυπαραγοντική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι αθροιστικά η έκφραση των “νεστίνη+ /CD133 +” ασθενών και των “Nestin-/CD133-” ασθενών θεωρήθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης σε γλοιώματα ασθενών.

Σε ακόμη μια άλλη μελέτη των Wan et al. (250), στην οποία συμπεριελήφθησαν 382 όγκοι, εκ των οποίων 221 ήταν πολύμορφα γλοιοβλαστώματα (GBM), διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της νεστίνης αυξήθηκε με το βαθμό κακοήθειας της νόσου, και ότι η υψηλή έκφραση της νεστίνης συσχετίστηκε με κακή επιβίωση των ασθενών τόσο με μονοπαραγοντική όσο και με πολυπαραγοντική ανάλυση. Ωστόσο, οι Chinnayan et al. (247) παρουσίασαν ότι η νεστίνη δεν μπορεί να χρησιμεύσει ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν 143 GBMs με χαμηλή, ενδιάμεση ή υψηλή έκφραση της νεστίνης, και δεν διαπιστώθηκε καμία διαφορά στη συνολική επιβίωση (OS) ή στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου μεταξύ των διαφόρων εξεταζόμενων ομάδων με μονοπαραγοντική αλλά και με πολυπαραγοντική ανάλυση.

Σε μια άλλη μελέτη, όπου συμπεριελήφθησαν 40 GBMs (251), η νεοαγγείωση εκτιμήθηκε στην γύρω από τον όγκο περιοχή με εξέταση της ταυτόχρονης έκφρασης των CD105 και νεστίνης σε συνδυασμό με την πυκνότητα των μικρών αγγείων (MVD: Microvessel density). Με σκοπό την εξέταση της πιθανής προγνωστικής σημασίας τους, οι δείκτες CD105 και νεστίνη ανιχνεύθηκαν με ανοσοϊστοχημεία (IHC) σε υπερπλαστικά ενδοθήλια για GBMs και στους ιστούς περιξ του όγκου και περιστασιακά, παρατηρήθηκε συνέκφραση και συνεντοπισμός τους. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η νεοαγγείωση του όγκου μπορεί να συμβεί σε ιστούς GBM και πέριξ του όγκου με την εμπλοκή περικυττάρων, υποστηρίζοντας έτσι την προγνωστική σημασία αυτών των δύο δεικτών.

Μια τελευταία σημαντική ανάλυση 379 δειγμάτων όγκων (252) έδειξε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης νεστίνης μπορεί να σχετίζεται με κακή έκβαση ασθενών με ενδοκρανιακά επενδυώματα. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς με επενδυώματα βαθμού II θετικά σε νεστίνη βρέθηκαν να έχουν την ίδια πρόγνωση με τους ασθενείς με βαθμού III επενδυώματα, ενώ μια πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι ο βαθμός θετικότητας σε νεστίνη μπορεί να ενεργεί ως ανεξάρτητος δείκτης για την ολική και την ελεύθερα νόσου επιβίωση των ασθενών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμα μια ανάλυση σε σχέση με τη μεταγραφή συν-ρυθμιζόμενων γονιδίων, η οποία παρουσίασε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ αναπτυξιακών και επιγενετικών διεργασιών και της έκφρασης της νεστίνης (253). Μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νεστίνη μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη του νευρογλοιακού όγκου και στην εξέλιξή του. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η έκφραση της νεστίνης μπορεί να χρησιμεύσει ως προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με γλοιώματα (254).

1.3.3.2. Έκφραση της νεστίνης στους νεφρούς

Κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης η νεστίνη εκφράζεται σε μεσεγχυματικά κύτταρα που περιβάλλουν τους ουρητήρες. Καθώς προχωρά η ανάπτυξη, η νεστίνη εκφράζεται στο ανώριμο προγονικό σπείραμα και ειδικότερα στο ώριμο σπειράμα το οποίο βρίσκεται βαθιά στο φλοιό του νεφρού (254). Σε ενήλικο νεφρό, η νεστίνη εκφράζεται μόνο στο σπείραμα, και *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι η νεστίνη μπορεί να μετατρέψει επιθηλιακά κύτταρα με ιδιότητα ποδοκυττάρων που προέρχονται από ανθρώπινα ούρα (255).

1.3.3.2.1. Νεφρική βλάβη των ιστών

Σε ένα μοντέλο ενήλικα αρουραίου με μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα, παρατηρήθηκε έκφραση της νεστίνης σε νεφρικά σωληνοειδή κύτταρα και διάμεσους σωληναριακούς μυοϊνοβλάστες. Καθώς προχωρούσε η διαμεσοσωληναριακή ίνωση, σημειώθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης και της ίνωσης,

υπογραμμίζοντας έτσι το ρόλο της νεστίνης στη διαδικασία επούλωσης του ιστού μετά από σωληνοενδιάμεσο τραυματισμό (256). Επιπλέον, οι Liu et al. (257) διαπίστωσαν ότι σε διαβητικούς αρουραίους η έκφραση της νεστίνης σε σπειράματα μειώνει τη νεφρική βλάβη που προκαλείται κατά τη διάρκεια της διαβητικής νεφροπάθειας, υποδεικνύοντας έτσι ένα συσχετισμό μεταξύ της διάσπασης του κυτταροσκελετού και της “ζημίας” του ποδοκυττάρου.

1.3.3.2.2. Καρκίνος του νεφρού

Οι Bussolati et al. (258) μπόρεσαν να εντοπίσουν ένα πληθυσμό αρχέγονων κυττάρων όγκων του νεφρού που θα μπορούσε να ξεκινήσει την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών νεφρικών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα ήταν θετικά για CD105, ένα δείκτη ο οποίος έχει τεκμηριωθεί ως δείκτης των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε φυσιολογικό νεφρό (259-261). Επιπλέον, αυτά τα βλαστικά κύτταρα βρέθηκαν να συνεκφράζουν νεστίνη, Nanog, Oct4 και Mushashi (257). Ο συγκεκριμένος πληθυσμός των κυττάρων βρέθηκε επίσης να σχηματίζει κλώνους, να αναπτύσσεται ως μη κολλητικά σφαιροειδή, να διαφοροποιείται *in vitro* σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα και τέλος, να δημιουργεί *in vivo* σειριακά μεταμοσχεύσιμα καρκινώματα, τα οποία αποτελούνταν από αδιαφοροποίητα CD105- θετικά κύτταρα όγκων και διαφοροποιημένα μη ογκογενή CD105 αρνητικά κύτταρα (257). Σαφώς, τα αποτελέσματα αυτά δικαιολογούν την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της νεστίνης στη νεφρική έναρξη ή και την εξέλιξη ενός καρκινώματος.

1.3.3.3. Έκφραση της νεστίνης στο πάγκρεας.

Σε υγιή παγκρέατα έχει βρεθεί ότι η νεστίνη εκφράζεται στα νησίδια (261), σε πορογενή επιθήλια (262), αγγειακά ενδοθήλια (263), περικύτταρα κυττάρων (264) και μεσεγχυματικά κύτταρα (265). Συγκεκριμένα, ανθρώπινα εμβρυϊκά παγκρεατικά κύτταρα που εκφράζουν νεστίνη έχουν βρεθεί να επιδεικνύουν ισχυρή πολλαπλασιαστική δυνατότητα. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι προγονικά κύτταρα του παγκρέατος μπορεί να μοιράζονται αρκετούς φαινοτυπικούς δείκτες με τα

μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών (266). Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι θετικά κυττάρα σε νεστίνη που βρίσκονται στα νησίδια έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται *in vitro* σε κύτταρα με φαινοτύπους παρόμοιους με παγκρεατικά ενδοκρινή, εξωκρινή και ηπατικά κύτταρα (262), υποστηρίζοντας την ιδέα ότι τα κύτταρα θετικά σε νεστίνη στον ιστό του παγκρέατος μπορούν να κατέχουν ιδιότητες παρόμοιες με τα βλαστικά κύτταρα. Μια τελευταία σημαντική μελέτη παρουσίασε ότι παγκρεατικά ενδοκρινή κύτταρα σε διαβητικά ποντίκια, τα οποία ήταν σε θέση να αναστρέψουν φαινότυπο υπεργλυκαιμίας, προέρχονταν από πρόδρομα κύτταρα θετικά σε νεστίνη που ελήφθησαν απο ανθρώπινο εμβρυϊκό πάγκρεας (267). Ωστόσο, αρκετές αναφορές έχουν δείξει ότι κύτταρα θετικά σε νεστίνη σε ενήλικα και εμβρυϊκά παγκρέατα δεν μπορεί να οδηγήσουν στο σχηματισμό *in vitro* παγκρεατικών β-κυττάρων (268-270). Αυτή η διακύμανση υποδεικνύει ότι παγκρεατικά κύτταρα θετικά σε νεστίνη αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα κυττάρων, ή απλά μπορεί να υποδεικνύεται ότι το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για να επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων εξακολουθεί να απαιτεί βελτιστοποίηση (266-270).

1.3.3.4. Έκφραση της νεστίνης σε ιστό παγκρέατος μετά από τραυματισμό.

Έχει προταθεί ότι μετά από τραυματισμό του παγκρέατος, που επάγεται από χημικούς παράγοντες όπως η αλλοξάνη (271) ή φυσικούς παράγοντες, όπως μετά απο χειρουργείο ημιπαγκρεατεκτομής (272), το ενήλικο ανθρώπινο πάγκρεας διατηρεί την ικανότητα να παράγει β-κύτταρα. Με ενδιαφέρον έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα της νεστίνης αυξάνονται αυτόματα ως απόκριση στον τραυματισμό (273), υποστηρίζοντας την ιδέα ότι στο ενήλικο ανθρώπινο πάγκρεας μπορεί να είναι παρόντα ενεργά βλαστοκύτταρα ή προγονικά κύτταρα. Αν και λίγα είναι γνωστά για τα μοριακά και κυτταρικά χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων, τα δεδομένα που προέρχονται από μελέτες σε διαγονιδιακά ποντίκια με έκφραση νεστίνης και EGFR δείχνουν ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στην εξωκρινή περιοχή είναι θετικά για την νεστίνη, εκφράζουν αμυλάση και δρουν ως πρόδρομοι των παγκρεατικών ενδοκρινικών κυττάρων (265). Αντίθετα, μια άλλη μελέτη έδειξε ότι ενδοκρινικά κύτταρα δεν μπορούν να προέρχονται από προγονικά

κύτταρα θετικά στην έκφρασή τους για νεστίνη, αφού η νεστίνη δεν βρέθηκε να εκφράζεται σε αυτά τα κύτταρα κατά τη διάρκεια είτε της εμβρυογένεσης είτε της ενηλικίωσης, ενώ περαιτέρω ανίχνευση της καταγωγής τους έδειξε ότι νεστίνη εκφράζουν προγονικά κύτταρα που διαφοροποιούνται ως επί το πλείστον σε εξωκρινή κυττάρα (274).

1.3.3.5. Καρκίνος του παγκρέατος.

Αθροιστικά στοιχεία δείχνουν ότι η νεστίνη μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος. Σε πορώδη αδενοκαρκινώματα παγκρέατος, χαρακτηριστικά όγκου όπως ο πολλαπλασιασμός, η εισβολή, η μετάσταση και η ευαισθησία των φαρμάκων βρέθηκε να επηρεάζεται από το αγγειακό σύστημα του όγκου (275,276). Σε σύγκριση με ώριμα αγγεία, η βασική μεμβράνη των νεοσύστατων αγγείων του όγκου είναι διαρρέουσα και, ως εκ' τούτου, μπορεί εύκολα να διαπερνάται από τα καρκινικά κύτταρα (277). Τυπικοί δείκτες ενδοθηλιακών κυττάρων για τα αγγεία του όγκου είναι οι CD34, CD31 και ο παράγοντας VIII οι οποίοι, ωστόσο, εκφράζονται όχι μόνο στα νεοσχηματισμένα καρκινικά αγγεία αλλά και σε προϋπάρχοντα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία (278). Οι τελευταίες μελέτες διαπίστωσαν ότι, σε σύγκριση με την έκφραση του CD34, η έκφραση της νεστίνης ήταν εξαιρετικά ειδική για τα μικρά πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων παγκρεατικών ιστών. Μελέτες παρουσίασαν επίσης ότι ο πολλαπλασιασμός αυτών των ενδοθηλιακών κυττάρων αναστάλη όταν η έκφραση της νεστίνης μειώθηκε χρησιμοποιώντας siRNA. Αυτά τα δεδομένα τονίζουν τον κρίσιμο ρόλο της νεστίνης στην ανάπτυξη του αγγειακού ενδοθηλίου και ως εκ' τούτου, υπογραμμίζουν τη νεστίνη ως δυνητικό θεραπευτικό στόχο για την αναστολή της αγγειογένεσης των όγκων παγκρέατος.

Πρόσθετες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι έκφραση της νεστίνης σε παγκρεατικά κύτταρα όγκου μπορεί να συσχετίζεται με πιθανή περινευρική εισβολή. Οι Kawamoto et al. (274) ήταν οι πρώτοι που προτείνουν ότι μπορεί να υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων που βρίσκονται σε χειρουργικά όρια (PDAC) ιστών παγκρέατος. Οι Matsuda et al. (271) βρήκαν ότι αύξηση της έκφρασης της νεστίνης σε παγκρεατικές κυτταρικές σειρές θα μπορούσε να

αναστείλει τη μετανάστευση και την εισβολή χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ μετά την επαναφορά της έκφρασης της νεστίνης τα καρκινικά κύτταρα ανέκτησαν την αρχική τους ικανότητα να μεταναστεύουν και να εισβάλλουν σε γύρω ιστούς και λεμφαδένες (273). Σε μια άλλη μελέτη έχει παρατηρηθεί ότι κύτταρα επιμολυσμένα με νεστίνη - shRNA εξέφραζαν χαμηλές ποσότητες α-τουμπουλίνης αλλά εξέφρασαν έντονα F-ακτίνη, ενώ έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι η κυτταρική κινητικότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση των νημάτων της ακτίνης (275-279). Μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νεστίνη μπορεί να σχετίζεται με την αγγειογένεση του όγκου και την εισβολή τους σε περινευρικό καρκίνο του παγκρέατος.

1.3.3.4. Έκφραση της νεστίνης στο γαστρεντερικό σύστημα.

1.3.3.4.1. Καρκίνος του στομάχου

Ανοσοϊστοχημική χρώση ανθρώπινων ενηλίκων και εμβρυϊκών γαστρικών ιστών έδειξε ότι η νεστίνη, μαζί με μικροσωληνίσκους πρωτεΐνης που συνδέονται με την MAP-2 (MAP-2: Microtubule associated protein 2), εκφράζεται σε νευρικά κύτταρα και τις ίνες του υποβλεννογόνιου πλέγματος και του ενδομυϊκού νευρικού πλέγματος από αυτούς τους ιστούς, καθώς επίσης σε περιοχές της καρδιάς και του πυλωρού, ενώ η έκφραση της εξαφανίστηκε σε αδενικούς και βλεννογόνους ιστούς καθώς η κύηση προχωρούσε (280). Σε γαστρικά νεοπλάσματα και ειδικότερα γαστρικά αδеноκαρκινώματα και σε εντερικές μεταπλασίες, έχει παρατηρηθεί υψηλή συνέκφραση νεστίνης και CD44 σε σύγκριση με μη νεοπλαστικά κύτταρα γαστρικού βλεννογόνου, υποστηρίζοντας ένα σημαντικό ρόλο των CD44+ καρκινικών βλαστοκυττάρων στην ανάπτυξη αυτών των βλαβών (281). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υψηλή έκφραση της νεστίνης στα αγγεία των γαστρικών αδеноκαρκινωμάτων (282). Αν και απαιτείται προφανώς περαιτέρω έρευνα, φαίνεται ότι η νεστίνη σχετίζεται με την αγγειογένεση και την εντερική μετάπλαση σε γαστρικά αδеноκαρκινώματα.

1.3.3.5. Έκφραση της νεστίνης στο ανθρώπινο κόλον.

1.3.3.5.1. Έντερο

Εντός του ανθρώπινου εντέρου, η νεστίνη έχει παρουσιαστεί να εκφράζεται σε μια συγκεκριμένη ομάδα κυττάρων, τα λεγόμενα κύτταρα θετικά σε νεστίνη που προέρχονται από το εντερικό επιθήλιο (INP) (283). Οι τελευταίοι συγγραφείς καλλιέργησαν επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου σε μια μονοστιβάδα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας και υπό την επίδραση των σημάτων από τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες, τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα επαναπρογραμματίστηκαν μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης Wnt / BMP σε κύτταρα που εκφράζουν νεστίνη. Αυτά τα κύτταρα θετικά σε νεστίνη, που επέδειξαν ένα υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, φάνηκαν να αντιπροσωπεύουν προγονικά κύτταρα παρά βλαστικά κύτταρα, δεδομένου ότι δεν μπορούσαν να συμμετάσχουν στον σχηματισμό ιστού ή να αποτελέσουν ξεχωριστές κλωνικές κυτταρικές γραμμές. Επιπλέον, αυτά τα κύτταρα που προέρχονται από την εντερική επιθηλιακή κρύπτη, εκφράζουν δεσμίνη (280-283).

1.3.3.5.2. Καρκίνος του παχέος εντέρου

Η έκφραση της νεστίνης έχει επίσης αξιολογηθεί σε ορθοκολικό καρκίνο. Για το σκοπό αυτό, η ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του παχέος εντέρου HCT-15 εμφυτεύθηκε στην ράχη γυμνών ποντικών. Όταν οι όγκοι έφτασαν ένα μέγεθος μεγαλύτερο από 3 εκατοστά, αποκόπηκαν και υποβλήθηκαν σε ανάλυση έκφρασης νεστίνης και CD34 χρησιμοποιώντας ανοσοφθορισμό. Κατ' αναλογία, η έκφραση της νεστίνης εξετάστηκε σε πρωτογενείς ανθρώπινους ορθοκολικούς καρκίνους χρησιμοποιώντας ιστούς ανοσοϊστοχημείας και mRNA in situ υβριδισμό. Με αυτόν τον τρόπο, βρέθηκε ότι η νεστίνη εκφράστηκε σε πολλαπλαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα μικρότερων αγγείων σε ισχυρότερο βαθμό από τον δείκτη CD34 των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η νεστίνη δεν βρέθηκε να εκφράζεται σε κύτταρα του όγκου του ορθού. Αυτά τα αποτελέσματα

υποδηλώνουν ότι η νεστίνη μπορεί να εμπλέκεται σε ορθοκολικό καρκίνο μέσω της ανάπτυξης της αγγειογένεσης (284).

1.3.3.6. Έκφραση της νεστίνης σε GISTs, GCTs και νευρινώματα.

Οι όγκοι των γαστρεντερικών στρωμάτων (GISTs) είναι μεσεγχυματικοί όγκοι που βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι οι όγκοι που προέρχονται από λεία μυϊκά ή νευρικά κύτταρα. Τα περισσότερα κύτταρα GIST εκφράζουν τον υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης c-Kit και τον CD34, δύο δείκτες βλαστικών κυττάρων (60-63). Οι Tsujimura et al. (64) ανέφεραν ότι τα GISTs μπορούν να προέρχονται από βλαστικά κύτταρα που διαφοροποιούνται στα λεγόμενα κύτταρα Cajal (ICCs), και βρήκαν ότι η νεστίνη εκφράστηκε σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν για GIST. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, βρέθηκε ότι η νεστίνη εκφράζεται σε μία ποικιλία κυττάρων στην muscularis propria της ώριμης γαστρεντερικής οδού, συμπεριλαμβανομένων του στομάχου, της νήστιδας, του ειλεού και στο κόλον (290).

Κοκκώδεις όγκοι κυττάρων (Granular cell tumors, όγκοι των βλαστικών κυττάρων) της γαστρεντερικής οδού αρχικά θεωρήθηκαν ως καλοήγη νεοπλάσματα που προέρχονται από τα κύτταρα Schwann. Μεγάλοι όγκοι των βλαστικών κυττάρων συνήθως βρίσκονται στο τυφλό και το ορθό (291,292). Σε μια μελέτη το 2005 (293) επί όγκων των βλαστικών κυττάρων, η νεστίνη χρησιμοποιήθηκε ως ανοσοϊστοχημικός δείκτης και με αυτόν τον τρόπο διαπιστώθηκε ότι η νεστίνη εκφράστηκε σε όλους τους όγκους που δοκιμάστηκαν. Οι μισοί από αυτούς τους όγκους προήλθαν από το τυφλό, το ορθό και την περιπρωκτική περιοχή, ενώ το άλλο ήμισυ προήλθε από τον οισοφάγο. Το πρότυπο χρώσης ήταν κυτταροπλασματικό με μεμβρανώδη τονισμό, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι όγκοι των βλαστικών κυττάρων, μαζί με τα GISTs και τα νευρινώματα, μπορεί να προέρχονται από ένα κοινό πολυδύναμο βλαστικό κύτταρο που διαφοροποιείται σε μια διάμεση σειρά κυττάρων Cajal μέσω ενός περιφερικού νευρικού μονοπατιού (290-293).

1.3.3.7. Έκφραση της νεστίνης στον καρκίνο του προστάτη

Σε όγκους με διαφορετικούς φαινοτυπικά πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων, έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του όγκου μπορεί να εξαρτάται από ένα συγκεκριμένο υποπληθυσμό κυττάρων με ιδιότητες βλαστικών κύτταρων (243, 293,294). Στον καρκίνο του προστάτη, υπήρξε αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ταυτοποίηση των υποπληθυσμών των κυττάρων με βλαστικές ιδιότητες επειδή είναι πολυανθεκτικοί σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Οι Liu et al. (295) κατόρθωσαν να προσδιορίσουν έναν τέτοιο υποπληθυσμό από την κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη 22RV1 με CD117+/+ABCG2 φαινότυπο. Αυτός ο υποπληθυσμός είναι πολλαπλασιαστικός και εκφράζει επίσης νεστίνη, Nanog, Oct4, SOX2 και CD133 (295). Με ενδιαφέρον παρουσιάστηκε σε μια άλλη μελέτη ότι σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη μετά από ευνουχισμό τους με παράλληλη στέρηση ανδρογόνων, οι τιμές των δεικτών βλαστικών κυττάρων συμπεριλαμβανομένων και της νεστίνης αυξήθηκαν (296). Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδεικνύουν ότι αυτά τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν ανάλογα με τα επίπεδα της τεστοστερόνης στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ότι εκφράζουν δείκτες βλαστικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της νεστίνης (296). Μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η νεστίνη εκφράζεται σε καρκίνους του προστάτη που είναι πολυανθεκτικοί σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.

1.3.3.8. Έκφραση της νεστίνης στον μαστό

Πρόσφατα, εκτελέστηκε ποσοτικοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε δείγματα αίματος που λαμβάνονται από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με τη χρήση RT- qPCR σε συνδυασμό με εκκινητές ειδικούς για τους δείκτες βλαστοκυττάρων νεστίνη, Nanog, Oct3 / 4, SOX2 και CD34. Μία γραμμική σχέση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης αυτών των δεικτών και τον βαθμό ή το στάδιο της νόσου, υπογραμμίζοντας τη σημασία αυτών των δεικτών σε ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (297). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι «CD44 + / CD24- / low ανθρώπινα καρκινικά μαστικά κύτταρα» είναι ικανά να επάγουν όγκους σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια. Τα συγκεκριμένα κύτταρα βρέθηκαν να συμπεριφέρονται σαν βλαστικά καρκινικά κύτταρα καθώς θα

μπορούσαν να επάγουν «CD44 + / CD24- / low κύτταρα» και επιπλέον, διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων με διαφορετικούς φαινοτύπους (298). Σε μια άλλη μελέτη, όπου «CD44 + / CD24- μη καρκινικά κύτταρα» συγκρίθηκαν με «CD44 + / CD24- κύτταρα», βρέθηκε ότι ιδιαίτερα τα «CD44 + CD24- κύτταρα» με υψηλή έκφραση των δεικτών Oct4 και νεστίνης επέδειξαν υψηλή ογκογόνο δυναμικότητα όπως αυτή μετριέται από την ικανότητα τους να σχηματίζουν mammospheres in vitro. Μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές αναλύσεις συσχέτισαν την έκφραση του Oct4 και της νεστίνης με νεότερη ηλικία έναρξης της νόσου, τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, την μετάσταση στους λεμφαδένες, τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και την μικρότερη επιβίωση. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η νεστίνη παρουσιάζει υψηλότερη έκφραση σε διηθητικά πορώδη αδενοκαρκινώματα σε σύγκριση με in situ πορώδη καρκινώματα μαστού και ότι υπάρχει μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης και της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων / προγεστερόνης (300). Σε μία άλλη μελέτη θετική συσχέτιση σημειώθηκε μεταξύ της αυξανόμενης ρύθμισης της νεστίνης σε διηθητικά καρκινικά κύτταρα του μαστού με ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, καθώς και σε εξαιρετικά επιθετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού, όπως και στους βασικού τύπου και στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού (300-302). Τελικά, φαίνεται ότι σε καρκίνους του μαστού στον άνθρωπο η νεστίνη εκφράζεται σε κύτταρα με ιδιότητες βλαστοκυττάρων.

Οι Rögelsperger et al. (303) αξιολόγησαν τη συνέκφραση της νεστίνης και του υποδοχέα μελατονίνης 1 (MT1) σε ανθρώπινους καρκίνους του μαστού, συμπεριλαμβανομένου και του ρόλου που παίζει ο MT1 στη ρύθμιση της έκφρασης της νεστίνης. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν ότι ο MT1 συνεντοπίζεται με τη νεστίνη σε διηθητικά μέρη του όγκου και πιο συγκεκριμένα, σε μονά καρκινικά κύτταρα και κυτταρικές συστάδες εισβάλλοντας στο στρώμα και στα περιαγγειακά κύτταρα, τα οποία βρέθηκαν επίσης να είναι θετικά στη νεστίνη (300-303). Οι δράσεις της μελατονίνης σχετίζονται με αντιοξειδωτικές διεργασίες ανεξάρτητες από τον υποδοχέα της (304,305) αλλά και με διεργασίες που απαιτούν τη μεσολάβηση υποδοχέων (306). Η μελατονίνη όταν προσκολλάται σε αυτούς τους υποδοχείς δρα ως αναστολέας του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού και αναστέλλει την εξέλιξη

κακόηθων όγκων στο μαστό ποντικών (307), ενδεχομένως μέσω συζευξης αυτής με την πρωτεΐνη O ή και τον υποδοχέα MT1 (308,309).

1.3.3.9. Έκφραση της νεστίνης στον καρκίνο του ήπατος.

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από βλαστικά κύτταρα ανθρώπινου ήπατος και τα εμβρυϊκά ηπατοκύτταρα αρουραίων αποδεικνύουν ότι η νεστίνη εκφράζεται μαζί με άλλους δείκτες μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (310) και μαζί με την άλφα εμβρυϊκή πρωτεΐνη, αλβουμίνη και κυτοκερατίνη 19 σε ηπατοκύτταρα αρουραίου (311). Στα ηπατικά κύτταρα, έχει προταθεί ότι η έκφραση της νεστίνης ρυθμίζεται με μεθυλίωση του DNA σε καλά διαφοροποιημένα κύτταρα όπως τα ηπατοκύτταρα στην κυτταρική σειρά ηπατώματος H4IIE. Άλλες επιγενετικές οδοί χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση της έκφρασης της νεστίνης σε αδιαφοροποίητα κύτταρα όπως τα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα. Στην τελευταία επιγενετική οδό που έχει περιγραφεί, μεθυλίωση της ιστόνης H3 αναφέρεται ως το πιο κοινό επιγενετικό σήμα (312). Σε καρκίνο του ήπατος, οι Luk et al (313) βρήκαν θετική συσχέτιση μεταξύ υπερέκφρασης του συμπλέγματος DLK1-DIO3 miRNA στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και της έκφρασης που συνδέεται με δείκτες αρχέγονων κυττάρων όπως οι νεστίνη, EpCAM, CD133 και CD90 και ορισαν ένα στέλεχος που μοιάζει με υπότυπο ηπατοκυτταρικού καρκινώματος με κακή πρόγνωση (313). Επιπλέον, οι Yang et al. (314) πρότειναν ότι η υπερέκφραση των δεικτών ηπατικών υποθετικών προγονικών/βλαστικών κυττάρων όπως η νεστίνη διαπιστώθηκε όταν η αγγειογένεση των όγκων λαμβάνει χώρα σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, που είναι επίσης ενδεικτική της φτωχής πρόγνωσης (314). Τελικά φαίνεται ότι η έκφραση της νεστίνης σχετίζεται με την αγγειογένεση όγκων και την δυσμενή πρόγνωση σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα.

1.3.3.10. Έκφραση της νεστίνης σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειογένεση.

Έχει ευρέως αναφερθεί ότι τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν νεστίνη (315). Συγκεκριμένα, η έκφραση της νεστίνης έχει παρατηρηθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του ωχρού σωματίου (316) και σε πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα, αλλά όχι σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (317). Επιπλέον, θετική συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και την αγγειογένεση (317,318). Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι η νεστίνη εκφράζεται κυρίως σε νεοσχηματισμένα αιμοφόρα αγγεία σε μία ποικιλία καρκίνων (316, 319). Τόσο η πυκνότητα των μικροαγγείων (MDV) όσο και η ισχυρή έκφραση της νεστίνης έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ορθοκολικό καρκίνο (284) και καρκίνο του προστάτη (318). Σε καρκίνο του παχέος εντέρου έχει βρεθεί ότι η νεστίνη εκφράζεται έντονα σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι σε καρκινικά κύτταρα (284). Σε όγκους του εγκεφάλου, αλληπάλληλες μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ μικροαγγειακής πυκνότητας και θετικών σε νεστίνη καρκινικών κυττάρων. Δηλαδή όγκοι όπως ολιγοδενδρογλοιώματα και γλοιοβλαστώματα παρουσιάζουν την υψηλότερη μικροαγγειακή πυκνότητα και περιείχαν επίσης το μεγαλύτερο αριθμό «σε νεστίνη θετικών καρκινικών κυττάρων». Σε σύγκριση με τα «αρνητικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα», τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» βρέθηκαν να βρίσκονται πιο κοντά στα τριχοειδή αγγεία του όγκου. Επιπλέον, θετικά σε νεστίνη κυττάρων σε ξενομοσχεύματα μυελοβλαστώματος εμφάνισαν χαρακτηριστικά των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου που συνδέονται στενά με τα αγγεία. Ταυτοχρόνως, οι Calabrese et al. (230) ανέφεραν ότι στους όγκους του εγκεφάλου υπάρχει μια περιαγγειακή θέση (perivascular niche) στην οποία τα καρκινικά βλαστοκύτταρα όπου βρίσκονται αλληλεπιδρούν με τα αιμοφόρα αγγεία. Ως αποτέλεσμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να παρέχουν το απαραίτητο μικροπεριβάλλον που προάγει την ανάπτυξη των «θετικών σε νεστίνη κυττάρων» που μοιάζουν με καρκινικά βλαστικά κύτταρα (320). Ένα ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι κατά πόσο υπάρχει επίσης ένας βρόχος

ανάδρασης και σύνδεσης μεταξύ «κυττάρων θετικών σε νεστίνη» με ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Οι Calabrese et al. διαπίστωσαν επίσης ότι η εφαρμογή αντιαγγειογενετικής θεραπείας οδήγησε σε σημαντική μείωση των «θετικών σε νεστίνη και CD133 κυττάρων» του όγκου.

Μαζί, αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός που διέπει την αγγειογένεση των όγκων μέσω αλληλεπιδράσεων των «θετικών σε νεστίνη κυττάρων» με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.

1.3.3.11. Συμπεράσματα και προοπτικές

Τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκφραση της νεστίνης είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία. Κανονικά, η έκφραση της νεστίνης αυξάνεται σε διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και αντίστοιχα μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Κατά τη διάρκεια του τραυματισμού των ιστών (π.χ. στο νευρικό σύστημα, τους νεφρούς, το πάγκρεας) η νεστίνη εκφράζεται σε κύτταρα με ιδιότητες προγονικών κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα φαίνονται να δρουν ως απόθεμα ιστού και ως εκ τούτου, να συμμετέχουν σε διαδικασίες επούλωσης των ιστών. Μετά από πρόκληση ισχαιμίας στο νευρικό σύστημα, η νεστίνη βρέθηκε να ρυθμίζει τη δομή των κυττάρων και την αναδιαμόρφωση τους (241). Μετά από διαμεσοσωληναριακό τραυματισμό ακολουθούμενο από απόφραξη, η νεστίνη βρέθηκε να προκαλεί την ενεργοποίηση του TGFβ και προώθησε τους διάμεσους σωληναριακούς μυοϊνοβλάστες σε ίνωση ως μέρος της διαδικασίας επούλωσης του ιστού (256). Στους νεφρούς, η αλληλεπίδραση μεταξύ νεστίνης και TGFβ μετά από τραυματισμό βρέθηκε να ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση (321). Σε πειράματα σε ποντίκια, διακοπή του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια της διαβητικής νεφροπάθειας έχει προταθεί ότι προκαλείται από την αύξηση της έκφρασης της νεστίνης στο σπειράμα (256). Στο πάγκρεας, η νεστίνη μπορεί να ενεργοποιήσει πρόδρομα εξωκρινή παγκρεατικά κύτταρα μετά από παγκρεατικό τραυματισμό όπως μετά από ένα χειρουργείο ημιπαγκρεατεκτομής (274).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου, η νεστίνη φαίνεται να εμφανίζει διπλό ρόλο. Πρώτον, η νεστίνη έχει βρεθεί να εκφράζεται σε κύτταρα που μοιάζουν με καρκινικά βλαστικά κύτταρα και σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα και ως εκ τούτου μπορεί να συμβάλλει στην επιθετική συμπεριφορά αυτών των κυττάρων. Μια ερώτηση που πρέπει να απαντηθεί είναι αν η νεστίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης αναγνώρισης των συγκεκριμένων υποπληθυσμών καρκινικών κυττάρων και αν μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός θεραπευτικός στόχος. Δεύτερον, η νεστίνη έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην αγγειογένεση των όγκων μέσω της αλληλεπίδρασης των καρκινικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων και ως εκ τούτου, μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη του όγκου. Η επιλεκτική έκφραση της νεστίνης σε π.χ. αιμοφόρα αγγεία του όγκου σε καρκίνους του παχέος εντέρου έθεσε το ζήτημα του πώς η νεστίνη εμπλέκεται ακριβώς στη διαδικασία της αγγειογένεσης των όγκων. Η παρατήρηση ότι σε όγκους εγκεφάλου τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου υπογραμμίζει σαφώς την ιδέα ότι οι διαρθρωτικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον κυτταροσκελετό των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να προκληθούν από τη νεστίνη (Εικόνα 1.6, Πίνακας 1.9, Πίνακας 1.10). Δεδομένου ότι η χρήση της αντιαγγειογόνου θεραπείας σε όγκους του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των «θετικών σε νεστίνη και CD133 κυττάρων» του όγκου, καθιστά επιτακτική την αναγκαιότητα για περαιτέρω έρευνα με στόχο την επίλυση του ζητήματος σε σχέση με το πώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου αλληλεπιδρούν με τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» (320-324).

Εικόνα 1.6. Έκφραση της νεστίνης στον καρκίνο. Από: *Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A, Kontzoglou K, Weber WP, Kouraklis G. Nestin involvement in tissue injury and cancer--a potential tumor marker? Cell Oncol (Dordr). 37(5):305-15. (2014).*

Expression and roles of nestin in cancers		
	Expression patterns	Roles
Glioblastoma ^[66,69]	Tumor cells and tumor vessels	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> growth
	Glioma << glioblastoma	G ₁ /S arrest
Pancreatic cancer ^[87,90]	30% of PDAC	Migration, invasion
		Nerve invasion, migration
		Initiation of PanIN
GIST ^[25,96]	Tumor cells and interstitial cells of Cajal	
Prostate cancer ^[27]	Androgen-insensitive cancer cells	Migration, invasion <i>in vitro</i>
	75% of lethal androgen-independent prostate cancer	Lung metastasis
Breast cancer ^[26,101,103]	Basal breast cancer subtype	Shorter survival
	Triple-negative breast cancer	Independent prognostic factor
	Lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer	
Malignant melanoma ^[24,106,108,112,113]	Tumor cells and endothelial cells	Advanced stage
	Ulceration of primary tumors	Metastasis
	Infiltrating front of tumors	Shorter survival
	Primary tumor << metastatic tumor	
	Stage IV >> III/IV with no evidence of disease in blood	

PanIN: Pancreatic intraepithelial neoplasia; GIST: Gastrointestinal stromal tumor; PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma.

Πίνακας 1.9. Συσχέτιση της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το κλινικό αποτέλεσμα σε διαφορετικούς καρκίνους του παρεγχύματος. Από: *Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A, Kontzoglou K, Weber WP, Kouraklis G. Nestin involvement in tissue injury and cancer--a potential tumor marker? Cell Oncol (Dordr). 37(5):305-15. (2014).*

<u>Όργανα</u>	<u>Έκφραση της νεστίνης</u>
<u>Εγκέφαλος</u>	Ανεξάρτητος δείκτης γλοιώματος (GBM) και αγγειογένεσης στον όγκο.
<u>Κόλον</u>	Ανεξάρτητος δείκτης πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων και μικρότερων αγγείων. Εμπλοκή στην αγγειογένεση όγκων.
<u>Προ- στάτης</u>	Δείκτης για καρκίνους που είναι πολυανθεκτικοί σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα.
<u>Μαστός</u>	Έκφραση σε CD44+ CD24- καρκινικά κύτταρα (υψηλότερης ογκογονικότητας), τριπλά-αρνητικούς και βασικού τύπου καρκίνους του μαστού. Έκφραση σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα και σε μεταστάσεις στους λεμφαδένες.

Πίνακας 1.10. Έκφραση της νεστίνης σε φυσιολογικό ιστό, σε ιστό μετά από τραύμα και σε καρκινικό ιστό. Από: *Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A, Kontzoglou K, Weber*

WP, Kouraklis G. Nestin involvement in tissue injury and cancer-a potential tumor marker? *Cell Oncol (Dordr)*. 37(5):305-15. (2014).

<u>Έκφραση της νεστίνης</u>	<u>Φυσιολογικός Ιστός</u>	<u>Ιστός μετά από τραύμα</u>	<u>Καρκινικός ιστός</u>
Νευρικό Σύστημα	Νευρικά βλαστικά κύτταρα και νευρικά προγονικά κύτταρα.	Δραστικά αστροκύτταρα στη ζώνη περι-εμφράγματος μετά από εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία.	Γλοίωμα
Νεφροί	Ανθρώπινα ποδοκύτταρα.	Διαμεσοσωληναριακοί μυοϊνοβλάστες σε ενήλικες αρουραίους με μονόπλευρη απόφραξη ουρητήρα	Υποπληθυσμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε ασθενείς με καρκίνωμα νεφρού.
Προστάτης αδένας	_____	_____	Πληθυσμός προστατικών καρκινικών εναρκτήριων βλαστοκυττάρων. Ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων του όγκου στον καρκίνο του προστάτη.
Μαστός	_____	_____	Ομοιάζοντα κύτταρα με μαστικά βλαστοκύτταρα. (Breast cancer stem-like

			cells)
Ήπαρ	Ηπατοκύτταρα από άνθρωπο και ποντικό	_____	Ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων ηπατοκυτταρικών όγκων.
Πάγκρεας	Νησίδες, πορογενές επιθήλιο, αγγειακό ενδοθήλιο, περικύτταρα και μεσέγγυμα.	Βλαστικά ή προγονικά κύτταρα.	Ενδοθηλιακά κύτταρα νεοσχηματιζόμενων αιμοφόρων αγγείων παγκρεατικών όγκων.
Στόμαχος	Περιοχή καρδιάς και πυλωρού, νευρικά κύτταρα και οι ίνες του υποβλεννογόνιου πλέγματος, πλέγμα ενδομυϊκών νεύρων στην έκταση της καρδιάς και του πυλωρού.	_____	Πληθυσμός βλαστοκυττάρων σε αδενοκαρκίνωμα στομάχου. Ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων στον καρκίνο στομάχου.
Κόλον	Κύτταρα προερχόμενα από in vitro εντερικό επιθήλιο με ιδιότητες προγονικών κυττάρων.	_____	Ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων σε ορθοπρωκτικό καρκίνο, GIST, GCT, κύτταρα ομοιάζοντα με βλαστοκύτταρα απο schwannoma (schwannoma stem cell-like cells).

Αγγεία	Ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων του ωχρού σωματίου και πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα αλλά όχι σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα.	_____	Ενδοθηλιακά κύτταρα αιμοφόρων αγγείων όγκων όπως έχει υποδειχθεί παραπάνω.

1.4. CD146 ή MCAM: Μόριο προσκόλλησης κυττάρων μελανώματος.

Ο δείκτης CD146 (cluster of differentiation 146), επίσης γνωστός και ως μόριο προσκόλλησης κυττάρων μελανώματος (MCAM) ή αλλιώς γνωστός και ως γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας MUC18, είναι ένα μεγέθους 113kDa μόριο κυτταρικής προσκόλλησης που χρησιμοποιείται σήμερα, μετά από ανάλυση ομολογίας της της αλληλουχίας του, ως δείκτης στην γενεαλογία των ενδοθηλιακών κυττάρων (325). Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη CD146 κωδικοποιείται από το γονίδιο MCAM. Το μόριο κυτταρικής προσκόλλησης CD146 περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1987, λόγω της έκφρασης του στα κακοήγη μελανοκύτταρα και συσχετίστηκε με αρνητική πρόγνωση σε ασθενείς με μελάνωμα.

1.4.1 Λειτουργία του CD146 (MCAM).

Ο MCAM λειτουργεί ως υποδοχέας της λαμινίνης άλφα 4, ενός μορίου μήτρας που εκφράζεται ευρέως εντός του αγγειακού τοιχώματος (326). Κατά συνέπεια ο MCAM εκφράζεται σε κύτταρα τα οποία αποτελούν συστατικά του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων και των περικυττάρων. Η λειτουργία του MCAM είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητή, αλλά τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι εμπλέκεται στην μεταξύ τους σύνδεση αλλά και στην προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων και ειδικότερα συνδέεται με τον κυτταρικό σκελετό ακτίνης. Ο MCAM είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών, αποτελείται από πέντε περιοχές Ig, μία διαμεμβρανική περιοχή, και μια κυτταροπλασματική περιοχή. Εκφράζεται στα εμβρυϊκά κύτταρα στον σπλήνα και τον θύμο αδένα των ποντικών, σε ενεργοποιημένα ανθρώπινα T κύτταρα, σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα όπως οι αγγειοβλάστες και σε μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα. Τέλος εκφράζεται έντονα στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων και των λείων μυών (327,328).

Υπάρχουν δύο ισομορφές (η MCAM μακριά ισομορφή ή αλλιώς MCAM-1 και η MCAM σύντομη ισομορφή, ή αλλιώς MCAM-s) που διαφέρουν στο μήκος των κυτταροπλασματικής περιοχής τους. Η ενεργοποίηση αυτών των ισομορφών φαίνεται να

παράγει και λειτουργικές διαφορές. Φυσικά φονικά κύτταρα (natural killer cells) επιμολυσμένα με MCAM-1 επιδεικνύουν μειωμένη ταχύτητα διαπίδυσης, αυξημένη κυτταρική προσκόλληση σε μια μονοστοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων και αυξάνουν το σχηματισμό μικρολαχνών ενώ τα κύτταρα επιμολυσμένα με MCAM-s δεν έδειξαν καμία αλλαγή στα χαρακτηριστικά πρόσφυσης τους. Δεδομένου ότι αυτά τα χαρακτηριστικά είναι σημαντικά στην διαδικασία εξαγγείωσης των λευκοκυττάρων, πολλές μελέτες δείχνουν πως ο MCAM-1 αποτελεί σημαντικό μέρος της φλεγμονώδους απόκρισης (327,328).

Ο CD146 έχει αποδειχθεί ότι εκφράζεται σε ένα μικρό υποσύνολο T και B λεμφοκυττάρων στο περιφερικό αίμα υγιών ατόμων. Τα CD146+ T κύτταρα εμφανίζουν ένα ανοσοφαινότυπο συνεπή με κύτταρα μνήμης τελεστή και έχουν ένα διακριτό γονιδιακό προφίλ σε σχέση με τα CD146- T κύτταρα. Επιπροσθέτως, τα T κύτταρα που εκφράζουν τον δείκτη CD146 έχει γίνει σαφές από τον Dagur και τους συνεργάτες του ότι παράγουν IL-17 (329).

Επιπλέον ο CD146 θεωρείται δείκτης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων, τα οποία έχουν απομονωθεί από ενήλικο ιστό διαφορετικών οργάνων αλλά και εμβρυϊκό ιστό (330) και η έκφρασή του συνδέεται με πολυδυναμικότητα. Συγκεκριμένα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα του CD146 στην επιφάνεια των κυττάρων τους (331).

1.4.2. Κλινική σημασία του δείκτη CD146 (MCAM).

Ο MCAM αναστέλλει την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Σχετικά πρόσφατα ο CD146 ταυτοποιήθηκε ως αντιγόνο κυτταρικής επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και έγινε δημοφιλής δείκτης των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζονται αυξημένα σε παθολογικές καταστάσεις όπως στις καρδιαγγειακές παθήσεις, στη φλεγμονή, ή και στον καρκίνο, ενώ η εμπλοκή του ως μόριο προσκόλλησης αφορά τόσο στη πρωτοπαθή διηθητική εξεργασία, όσο και στο σχηματισμό των μεταστατικών εστιών. Μέσω αντισωμάτων έναντι μορίων προσκόλλησης, ενεργοποιούνται και αναστέλλονται αναγνωρισμένα και ταυτοποιημένα

ενδοκυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην διαδικασία της CD146 σηματοδότησης. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται η κινάση εστιακής προσκόλλησης και η κινάση p38. Σε αυτό το πλαίσιο, ο CD146 μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων αλλά και στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων διευκολύνοντας το σχηματισμό μεταστατικών εστιών (332,333,334,335).

Οι Jiang et al κατέδειξαν την άμεση συσχέτιση μεταξύ των CD146 και VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) σε πειράματα ταυτόσημης ανοσολογικής καταβύθισης. Επιπλέον, ανακάλυψαν ότι η αλληλεπίδραση τους λαμβάνει χώρα στην εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης, καθώς το αντίσωμα AA98, το οποίο αναγνωρίζει ένα εξωκυτταρικό επιτόπιο πρόσδεσης του CD146 μπορεί να μπλοκάρει την αλληλεπίδραση μεταξύ των VEGFR2 και CD146.

Εισαγωγή μιας μετάλλαξης σε αυτόν τον τομέα της πρωτεΐνης επιβεβαίωσε αυτή την παρατήρηση. Επιπλέον, παρουσιάστηκε ότι η αλληλεπίδραση του CD146 με τον VEGFR2 είναι υποχρεωτική για τη λειτουργική σηματοδότηση του VEGFR2. Μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία δείχνουν πως αναστολή του CD146 είτε χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα έναντι του δείκτη CD146 ή εναλλακτικά CD146 siRNA, καταστέλλει την VEGF-επαγόμενη φωσφορυλίωση του VEGFR2 σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας. Επιπλέον, η αναστολή του CD146 οδήγησε στην κατάργηση πολυάριθμων βιοχημικών και μοριακών “καταρρακτών” επαγωγής σημάτων μέσω των κινασών p38 και Akt. Αντίθετα, η ERK σηματοδότηση δεν επηρεάστηκε μέσω του αντι-CD146 αντισώματος ή του CD146 siRNA.

Ο VEGFR2 μεσολαβεί και επάγει το πλήρες φάσμα των απαντήσεων του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού του, τη ρύθμιση της επιβίωσης, τη μετανάστευση και το σχηματισμό του αγγειακού σωλήνα. Ο VEGFR2 κατέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, οι οποίες εξηγούν και τις πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες του. Αν και οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί του πώς η διέγερση του VEGFR2 επάγει αποκλίνοντα σήματα δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί λεπτομερώς, η πολυμορφία και η διαθεσιμότητα των πολλαπλών μορίων-συνδετών, καθώς και η αλληλεπίδραση με συνυποδοχείς θα μπορούσαν να εξηγήσουν τα περισσότερα από αυτά τα αποτελέσματα. Μόνο ο VEGF-A έχει τουλάχιστον 9 διαφορετικές μορφές ματίσματος που επάγουν διακριτές κυτταρικές λειτουργίες λόγω

διαφορετικών βαθμών συγγένειας δέσμευσης με τους υποδοχείς τους ή με διαφορετικά συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση με τους διαφόρους συνυποδοχείς είναι απαραίτητη στην διαδικασία της συνεργαστικής λειτουργικής σηματοδότησης πολλών κινασών τυροσίνης. Συνυποδοχείς που προσδιορίζονται για VEGFR2 συμπεριλαμβάνουν την νευροπιλίνη-1, τον υποδοχέα CD44 υαλουρονικού οξέος, τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλίου, την καντερίνη και τις β-ιντεγκρίνες (336,337,338,339). Τα παραπάνω αποτελούν μόρια προσκόλλησης και μεσολαβούν με αλληλεπιδράσεις που διακρίνονται με βάση συγκεκριμένο διαχωρισμό σε μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν σε αντιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο (cell-cell adhesion molecules, CAMs) και σε μόρια προσκόλλησης που μεσολαβούν σε αντιδράσεις κυττάρου προς στοιχεία της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (cell-substratum adhesion molecules, SAMs), ενώ η δομή, η μοριακή γενετική υπόστασή τους, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά και ο βιοχημικός τους ρόλος έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Σε μεγάλο βαθμό έχει κατανοηθεί και η φυσιολογική λειτουργία τους καθώς και ο ρόλος που διαδραματίζουν σε διάφορες καταστάσεις, όπως στην εμβρυογένεση, στη φυσιολογική ανάπτυξη, στην εξαγγείωση των λευκών αιμοσφαιρίων, στην επούλωση των τραυμάτων, στη φλεγμονή, στην πήξη του αίματος και την αιμόσταση γενικά, αλλά επιπλέον και στην καρκινική διήθηση και τη μεταστατική διαδικασία. Επιπλέον, διερευνάται συστηματικά ο ρόλος τους και στη διαδικασία της μεταβίβασης ενδοκυτταρικών μηνυμάτων.

Εκτός από την εξωκυτταρική σύνδεση του CD146 με τον VEGFR2, οι Jiang et al. παρουσίασαν σε μελέτες τους ότι στην ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης του CD146 είναι επίσης απαραίτητη η από τον VEGF- επαγόμενη μεταγωγή σήματος. Η ενδοκυτταρική ουρά του CD146 συνδέεται με τις ERM πρωτεΐνες (ezrin-radixin-moesin) του κυτταροσκελετού που προσφύονται στις κυτταρικές μεμβράνες, οδηγώντας στη σταθεροποίηση των νηματίων ακτίνης με τις μεμβράνες του πλάσματος, και ως εκ τούτου μεσολαβώντας στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Μετά από μετάλλαξη της θέσης σύνδεσης των πρωτεϊνών ERM στον CD146, η VEGF-επαγόμενη σηματοδότηση φαίνεται πως καταργείται ανεξάρτητα της διαδικασίας φωσφορυλίωσης του VEGFR2. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν για την αλληλεπίδραση του CD44 με τους VEGFR2 ή το μόριο c-Met (αλλιώς γνωστό και ως MET ή hepatocyte growth factor

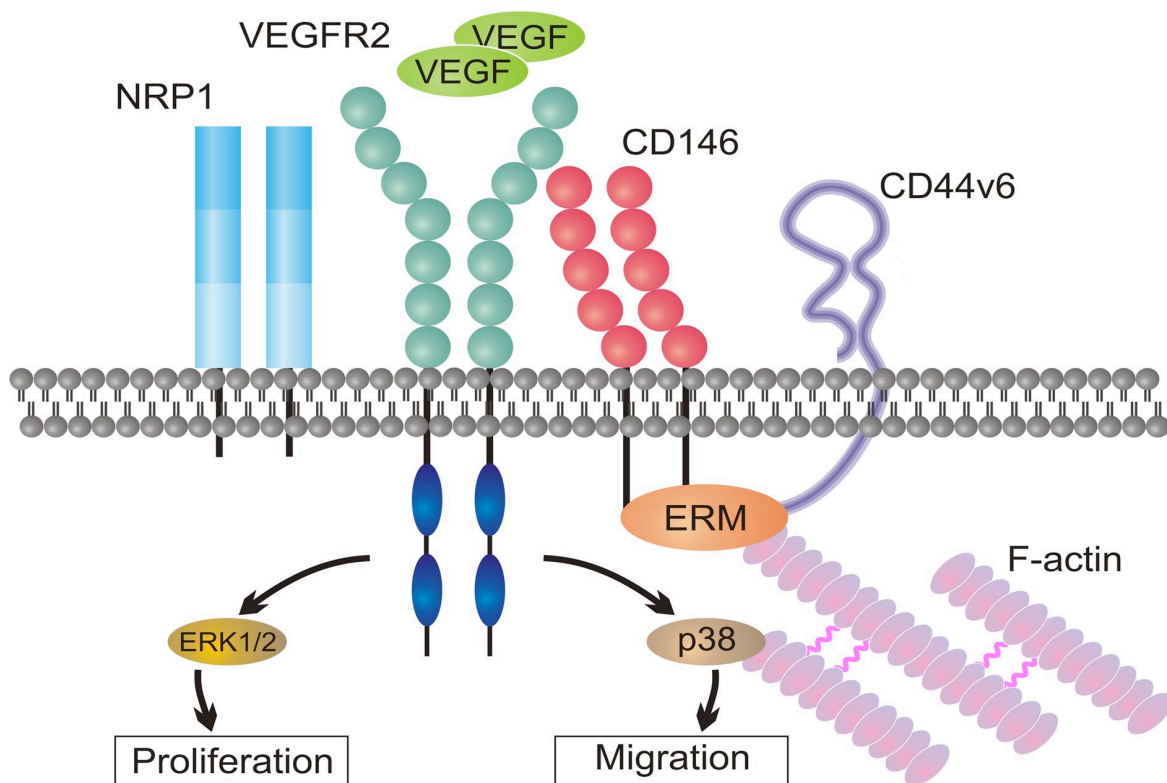
receptor -HGFR), όπου και εκεί παρατηρήθηκε πως απαιτείται η αλληλεπίδραση της κυτταροπλασματικής ουράς του CD44 με τις πρωτεΐνες ERM. Προφανώς, οι VEGFR2 και CD146 αποτελούν μέρος ενός σηματοσώματος στο οποίο οι συνυποδοχείς διευκολύνουν όχι μόνο την δέσμευση διαφόρων μορίων συνδετών με τους υποδοχείς κινάσης αλλά επίσης επιτρέπουν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του ERM (Εικόνα 1.7).

Οι Jiang et al επεκτάθηκαν προκλινικά σε μελέτες *in vitro* βασισμένων σε μοντέλα ποντικών. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν ότι η πυκνότητα των μικροαγγείων (microvessel density) εμφανίστηκε μειωμένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα knockout ποντικών για CD146 σε σύγκριση με ποντίκια άγριου τύπου. Επιπλέον, σε ένα προκλινικό μοντέλο ξеноμοσχεύματος σε καρκίνωμα παγκρέατος, σημειώθηκε πρόσθετη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης θεραπείας του αντι-VEGF αντισώματος bevacizumab και του αντι-CD146 αντισώματος AA98. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση της πυκνότητας των μικροαγγείων στις τομές των όγκων στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά (340,341).

Είναι γεγονός πως οι αντιαγγειακές θεραπείες που στοχεύουν το μονοπάτι VEGF αποτελούν πλέον μια καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση σε πολλές μορφές καρκίνου στον άνθρωπο συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος, του καρκίνου του νεφρού, του παχέος εντέρου και του καρκίνου του πνεύμονα (Εικόνα 1.8). Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη θεραπευτική προσέγγιση εξακολουθεί να έχει συγκεκριμένους περιορισμούς. Η θεραπευτική ανταπόκρισή των ασθενών δεν είναι συχνά ανθεκτική και διάφοροι τύποι καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παγκρέατος, δεν είναι αποτελεσματικά στοχεύσιμοι από αυτές τις θεραπείες. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται από τους Jiang et al αυξάνουν την ελπίδα ότι η κλινική αποτελεσματικότητα της αντι-VEGF θεραπείας μπορεί να καλυτερευτεί με τη βοήθεια αντι-CD146 κατευθυνόμενης θεραπείας στο μέλλον (340,341, 342).

Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση του σηματοσώματος του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα 2 του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGFR2). Από: *Xing Lei, Ce-Wen Guan, Yang Song and Huan Wang. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. Cancer Cell International (2015) 15:3.*

(Εντός της κυτταρικής μεμβράνης, ο VEGFR2 σχετίζεται με αρκετούς συνυποδοχείς όπως η νευροπιλίνη - 1 (NRP1), ο CD146 και ο CD44v6, που αντιπροσωπεύουν από κοινού το λεγόμενο VEGFR2 σηματοσώμα. Συνυποδοχείς επιτρέπουν την σύνδεση του VEGFR2 με εξωκυτταρικά πεδία σύνδεσής αυτών. Επιπλέον, η κυτταροπλασματική ουρά τους δεσμεύει τις πρωτεΐνες εξρίνης-ραδιζίνης-μοεσίνης (ERM) που προσλαμβάνουν κυτταροσκελετικά στοιχεία και λειτουργούν ως ικρίωμα για τα μεταγενέστερα μόρια μεσολαβητές που ενεργοποιούνται από τον VEGFR2. Ανάλογα με το συνδυασμό των VEGFR2 με τους συνυποδοχείς του, ο VEGFR2 μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των αποκλινόντων καταρρακτών σηματοδότησης καθοδικά οδηγώντας σε διακριτές βιολογικές διεργασίες.)

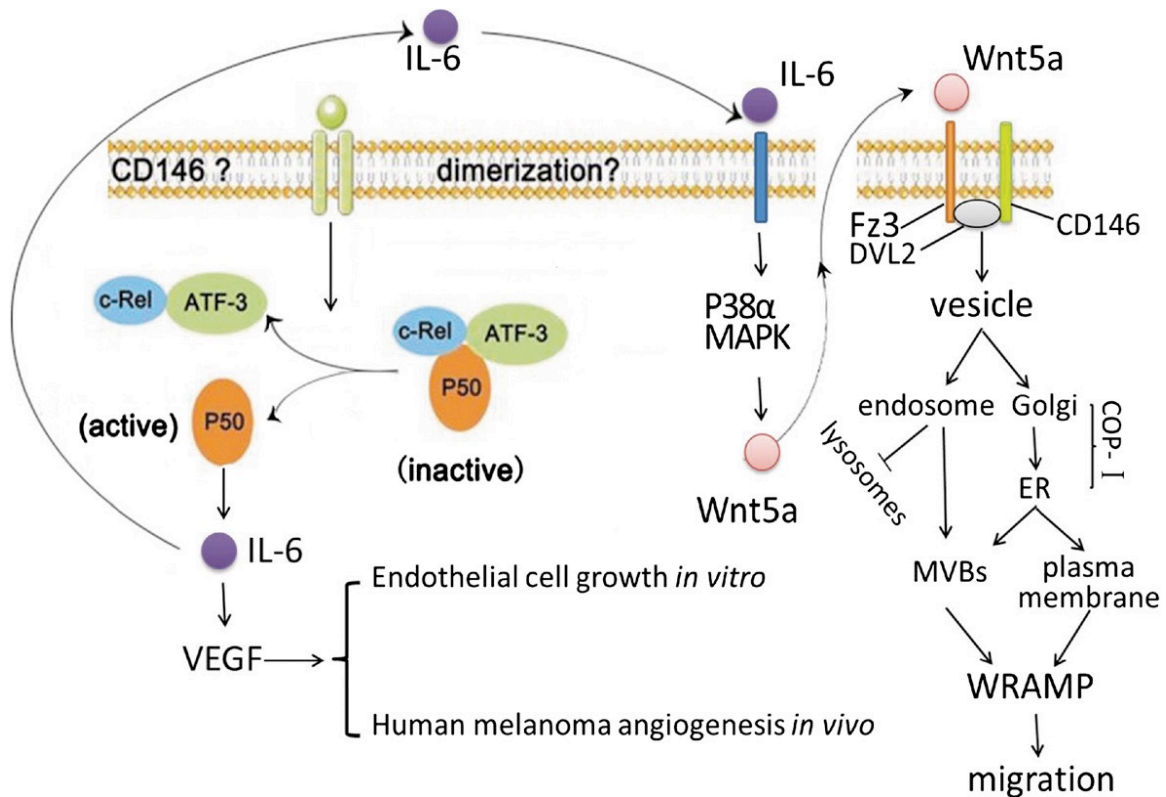


Όπου NRP1: Neuropilin-1, Αποτελεί συνυποδοχέα του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης για τον αυξητικό παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου. P38 mitogen-activated protein kinases: πρωτεϊνικές κινάσες που εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, την απόπτωση και αυτοφαγία. Τέλος απεικονίζεται επίσης το μονοπάτι MAPK/EKK (επίσης

γνωστό ως Ras-Raf-MEK-EKK μονοπάτι), το οποίο αποτελείται από μια αλυσίδα πρωτεϊνών στο κύτταρο, που επικοινωνεί ένα σήμα από έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου με το DNA στον πυρήνα του κυττάρου. F-actin: Actin filaments για τα ινίδια ακτίνης του κυτταρίσκελετού.

Εικόνα 1.8. Σχηματική απεικόνιση ενός προτεινόμενου μοντέλου σε σχέση με το πώς ο CD146 προάγει την αγγειογένεση και την μετανάστευση των μεσεγχυματικών κυττάρων στο ανθρώπινο μελάνωμα. Από: *Xing Lei, Ce-Wen Guan, Yang Song and Huan Wang. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. Cancer Cell International (2015) 15:3*

(Ο CD146 επάγει την αγγειογένεση πιθανώς μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης NF-κB p50 IL-6 - VEGF. Επιπλέον, η επαγόμενη από τον CD146 έκκριση της IL-6 ρυθμίζει θετικά την έκφραση του Wnt5a. Σε απόκριση προς το σήμα Wnt5a, το σύμπλοκο CD146 / Fz3 / DVL2 στρατολογείται στο τέλος της ουράς του κυττάρου μέσω των MVB ή του ER όπου συναρμολογεί νημάτια ακτίνης και μυσσίνης για το σχηματισμό της δομής WRAMP, η οποία κατευθύνει το ουραίο άκρο της μεμβράνης συστολής.)



Κομβικό σημείο του μονοπατιού είναι η ενεργοποίηση των MAPK (Mitogen-activated protein kinases), μεταδίδοντας σήματα μέχρι τον πυρήνα προς αλληλεπίδραση με αυξητικούς παράγοντες με τελικό στόχο είτε τη μεταγραφή γονιδίων είτε την άσκηση ρυθμιστικού ρόλου στα γεγονότα του κυτταρικού κύκλου. Όπου DVL-2: Segment polarity protein dishevelled homolog, το οποίο παίζει ρόλο στην οδό μεταγωγής σήματος που προκαλείται από πολλαπλές πρωτεΐνες Wnt. Αξίζει να αναφερθεί πως το μονοπάτι σηματοδότησης (ή Wnt/ β -κατενίνης μονοπάτι) παίζει κεντρικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην ομοιόσταση, ενώ απορρύθμιση του μονοπατιού Wnt συμβάλλει στην έναρξη και την πρόοδο των ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η ανακάλυψη αυτών των νέων οδών μεταγωγής σήματος δίνει μια νέα διάσταση στη μελέτη της αλληλεπίδρασης των επιτελεστικών μορίων της EMT.

1.4.3. Αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF). Περιγραφή και δράση του VEGF

Όπως είναι γνωστό, σταθερό χαρακτηριστικό όλων των συμπαγών όγκων είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσονται και να συντηρούν αγγειακό δίκτυο ικανό να τους προσφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να εξασφαλίζει την ανάπτυξή τους. Αντίθετα, σε φυσιολογικές καταστάσεις, κατά την ενήλικη ζωή, η δημιουργία νέων αγγειακών δικτύων περιορίζεται στην επούλωση τραυμάτων, ανάπτυξη του πλακούντα, μυϊκή ανάπτυξη και στην εναπόθεση λιπώδους ιστού.

Η δημιουργία νέων αγγείων είναι περίπλοκη διεργασία στην οποία συμμετέχουν πάνω από 50 ανεξάρτητοι αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς, κυτοκίνες και ένζυμα (343) που περιλαμβάνουν τις οικογένειες VEGF, αγγειοποιητινών και εφρινών (ephrins). Μεταξύ αυτών, κυρίαρχος αγγειογενετικός παράγοντας είναι ο VEGF που δρα στους υποδοχείς VEGF-R1 και VEGF-R2 των ενδοθηλιακών κυττάρων, όχι μόνο ως προ-αγγειογενετικός παράγοντας αλλά και ως αυτοκρινής παράγοντας επιβίωσης σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων, ποδοκυττάρων, αιματοποιητικών προγονικών κυττάρων, οστεοβλαστών, οστεοκλαστών και μονοκυττάρων (344).

Η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων VEGF αποτελείται από 7 γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται VEGF-A (ο πρώτος παράγοντας που ανακαλύφθηκε, ονομαζόμενος ως VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, placental growth factor (PlGF) και VEGF-F (345). Τα μόρια αυτά δρουν μέσω της σύνδεσής τους με ειδικούς υποδοχείς με ιδιότητες τυροσινוקινασών. Οι υποδοχείς που μέχρι τώρα αναγνωρίστηκαν και σχετίζονται με την οικογένεια VEGF είναι οι VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Επιπλέον, έχουν αναγνωρισθεί πολλοί ακόμη συνυποδοχείς, όπως οι νευροπιλίνες (neuropilins) NP-1 και NP-2 και διάφορες πρωτεογλυκάνες, οι οποίοι παίζουν ρόλο στην μετάδοση του σήματος μέσω των VEGFR υποδοχέων (346,347).

Η σχέση των συνδετών με τους υποδοχείς τους αποτελεί αντικείμενο συστηματικής έρευνας και παρουσιάζεται αρκετά ως περίπλοκη. Ο VEGFR-1 (ή Flt-1) συνδέεται με τους VEGF, VEGF-B και PlGF και εκφράζεται, εκτός των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και στα μονοκύτταρα, μακροφάγα και διάφορα μη ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο VEGFR-2 (ή Flk-1), είναι ο κυριότερος και καλύτερα μελετημένος υποδοχέας και εκφράζεται κυρίως στα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα αλλά και σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα. Ο VEGFR-3 ρυθμίζει την λεμφαγγειογένεση και η έκφρασή του περιορίζεται στα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα (348,349).

Παρόμοια, και οι συνδέτες του VEGFR διεκπεραιώνουν διαφορετικές λειτουργίες που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την αγγειο- και λεμφαγγειογένεση στο μικροπεριβάλλον του όγκου (350).

Η κυριότερη αγγειογενετική ουσία που εκκρίνεται από τα κύτταρα του όγκου είναι ο VEGF-A (VEGF) και ανακαλύφθηκε το 1983 (351). Ο εκκρινόμενος από τα καρκινικά κύτταρα VEGF επιδρά κυρίως στον υποδοχέα VEGFR-2 της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων (παρακρινής λειτουργία), ή/και των ίδιων των καρκινικών κυττάρων (αυτοκρινής λειτουργία). Πιο συγκεκριμένα, η σύνδεση του VEGF στον υποδοχέα αυτόν, οδηγεί σε διμερισμό του τελευταίου και αυτοφωσφορύλωση των ενδοκυττάρων τμημάτων του σε διάφορες θέσεις τυροσίνης και κυρίως στην τυροσίνη 1175 (Y1175) (352,353). Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες δημιουργούν σημεία σύνδεσης (docking sites) διαφόρων ενδοκυτταρίων μορίων, όπως η PLC-γ, τα οποία κατόπιν καταλύουν μια σειρά ενδοκυτταρικών αντιδράσεων που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό,

μετανάστευση και επιβίωση των κυττάρων και στην αύξηση της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων (349, 354). Τέλος, οι ενδοκυττάρια αυτές αντιδράσεις προάγουν την δημιουργία νέων αγγείων και την διατήρηση – λειτουργία αυτών.

Πρακτικά ο VEGF εκφράζεται σε όλους τους συμπαγείς όγκους και σε μερικο αιματολογικές κακοήθειες, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία του στην δημιουργία του κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος των όγκων που επιτρέπει την επιβίωση και επέκτασή τους (346). Επίσης, έχουν βρεθεί συσχετίσεις των επιπέδων έκφρασης του VEGF με την επιβίωση και πρόοδο της νόσου σε πολλούς τύπους ανθρώπινων όγκων (354).

Με βάση τα παραπάνω, ο VEGF όπως και ο EGFR αποτελεί ελκυστικό στόχο για νέες στοχευμένες θεραπείες αλλά και πιθανό δείκτη επιβίωσης και απάντησης στις θεραπείες αυτές. Η ρύθμιση της έκφρασης, λειτουργίας και σύνδεσης του VEGF και την έκφρασης και λειτουργίας των υποδοχέων του είναι περίπλοκη και αντικείμενο συνεχιζόμενης έρευνας. Σχηματικά η ρύθμιση του συστήματος VEGF–VEGFR και ο τρόπος δράσης των στοχευμένων θεραπειών που έχουν ήδη αναπτυχθεί, φαίνονται στην εικόνα 5 (355).

1.4.4. Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT - Epithelial to mesenchymal transition) – CD146 – Μεταστατικό δυναμικό επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων.

Η μετάσταση είναι ένα σημαντικό βήμα κατά τη διάρκεια της φυσικής ιστορίας και εξέλιξης των καρκίνων, καθώς μετατρέπει μια τοπική ασθένεια σε μια διάχυτη και συχνά ανίατη. Δυστυχώς ακόμα και στις μέρες μας απομένουν πολλά να γίνουν κατανοητά σχετικά με τους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους τα καρκινικά κύτταρα διηθούν στην αρχική περιοχή του ιστού, και στην συνέχεια εντοπίζονται σε απομακρυσμένες περιοχές. Τα πρώτα βήματα της μετάστασης περιλαμβάνουν την μειωμένη ρύθμιση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, την μεταβολή της κυτταρικής πολικότητας και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Αυτό οδηγεί σε αυξημένες μεταναστευτικές ιδιότητες και στην αντοχή των κυττάρων του όγκου. Τέτοιες τροποποιήσεις μοιάζουν με το φαινόμενο της Επιθηλιακής προς Μεσεγχυματική μετατροπής που εμφανίζεται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (356-364).

Συγκεκριμένα, η EMT είναι ένας τύπος επιθηλιακής πλαστικότητας που χαρακτηρίζεται από μακράς διάρκειας φαινοτυπικές και μοριακές αλλαγές στο επιθηλιακό κύτταρο ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας διαφοροποίησης προς κύτταρο μεσεγχυματικού τύπου. Η μοριακή αυτή διεργασία φαίνεται πως είναι θεμελιώδης κατά την μετάσταση επιθηλιακών καρκίνων και αποσκοπεί στην απόκτηση από τα καρκινικά κύτταρα φαινοτυπικών χαρακτήρων που τους δίνουν την δυνατότητα διείσδυσης στους ιστούς. Η EMT, εκτός από την μετάσταση, αποτελεί βασική διεργασία τόσο στην εμβρυική ανάπτυξη όσο και στις παθολογικές καταστάσεις της φλεγμονής και της επούλωσης και έχει ταξινομηθεί σε τρεις διαφορετικούς υποτύπους με τον υπότυπο 3 να συνδέεται με την διαδικασία της ογκογένεσης (265).

Όπως προαναφέρθηκε, η EMT είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία διαφοροποίησης με την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τα χαρακτηριστικά τους για να αποκτήσουν μεσεγχυματικές ιδιότητες, η οποία συμβάλλει στην επούλωση των ιστών, ενώ ευνοεί επίσης τις μεταναστευτικές και επεμβατικές ιδιότητες των νεοπλασματικών κυττάρων, και αυτό μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό με τον οποίο αφήνουν την πρωτεύουσα θέση των επιθηλιακών όγκων και δημιουργούν μεταστάσεις (364,365). Το πρώτο βήμα στη διαδικασία EMT συνεπάγεται την απώλεια των ενδοκυτταρικών συνδέσμων (στενοσύνδεσμοι, ενώσεις προσφύσεως και δεσμοσώματα), ενώ η υπερέκφραση των παραγόντων μεταγραφής μεταξύ των οποίων ο παράγοντας SNAIL, ο παράγοντας Zeb ή μέλη της οικογένειας bHLH καταστέλλουν επιθηλιακούς δείκτες και επάγουν την έκφραση των γονιδίων που οδηγούν σε μεσεγχυματικές κυτταροσκελετικές αλλαγές, αυξημένη κινητικότητα και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (358-363).

Η έκφραση του δείκτη CD146 συνδέεται με τον φαινότυπο EMT. Αρκετά μόρια επηρεάζονται από την έκφραση του CD146 και η άμεση ή έμμεση σηματοδότηση συμβάλλει στην διαδικασία EMT αυξάνοντας την έκφραση του δείκτη Slug. Ο CD146 μπορεί επίσης να εμπλακεί μέσω αλληλεπιδράσεων με την Erb σηματοδότηση τροποποιώντας την έκφραση της κυτταρικής επιφάνειας των ErbB3 και ErbB4 και προσδίδοντας έτσι αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Ανταγωνιστικές επιδράσεις της JAM – A, μιας πρωτεΐνης σχετιζόμενης με tight junctions, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στις πρό-μεταναστευτικές ιδιότητες που επάγονται και ενεργοποιούνται από τον

CD146, υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα του δικτύου μορίων προσκόλλησης στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση .

Όπως έχει προαναφερθεί ο CD146 (ή MCAM, Mel-CAM, MUC18) περιγράφηκε για πρώτη φορά σε κακοήγη μελανώματα ως αντιγόνο προόδου μελανώματος (366). Σε φυσιολογικούς ιστούς, ο CD146 εκφράζεται στα κύτταρα λείων μυών, στους τροφοβλάστες του πλακούντα (367) και σε ένα υποσύνολο των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων (368). Ο CD146 είναι ένα συστατικό της ενδο-ενδοθηλιακής διασταύρωσης (369) και αναγνωρίζεται πλέον ως δείκτης μεσεγχυματικών κυττάρων (370). Μια πρόσφατη έκθεση αναγνωρίζει τη σημασία του CD146 ως δείκτη στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών με σημαντική εμπλοκή και αλληλεπίδρασή του με το αιμοποιητικό μικροπεριβάλλον (371).

Όπως έχει προαναφερθεί ο CD146 είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 113 kDA που ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών. Η παρουσία πολλών θέσεων πρόσδεσης και αναγνώρισης πρωτεϊνικών κινασών στην κυτταροπλασματική περιοχή υποδηλώνει την εμπλοκή του CD146 στην οδό επικοινωνίας των ενδοθηλιακών κυττάρων (372).

Ο CD146 μεσολαβεί ανάμεσα στις ομότυπες και ετερότυπες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων (373). Ο ρόλος του στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει προταθεί επίσης σε πολλές μελέτες και πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε Zebrafish (274). Ο λειτουργικός του ρόλος και η εμπλοκή του στη μετανάστευση των κυττάρων έχει προταθεί επίσης από αρκετούς μελετητές (375,376). Πράγματι, η έκφραση του CD146 σε κυτταρικές γραμμές καρκινώματος μαστού σε ποντικούς αυξάνει τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων όπως έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα ποντικών (379). Επιπλέον, αρκετές εκθέσεις δείχνουν ότι ο CD146 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη και ότι αυτή η CD146 υπερέκφραση αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό των προστατικών καρκινικών κυττάρων σε knockout ποντικούς (380,381). Ομοίως, η έκφραση του CD146 έχει συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια του όγκου σε ανθρώπινους καρκίνους ωοθηκών και σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα, προβλέποντας σχετικά νωρίς την πιθανή υποτροπή του όγκου και την κακή πρόγνωση (382,383).

Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι η έκφραση του CD146 συνδέεται γενικά με υψηλής επιθετικότητας καρκινώματα αλλά και με τους τριπλά αρνητικούς υποτύπους

στον καρκίνο του μαστού. Μάλιστα πρωτογενώς περιλαμβάνεται ο δείκτης σε μια συστάδα γονιδίων και πίο συγκεκριμένα μεσεγγυματικών γονιδίων τα οποία βρίσκονται κάτω απο εντατική έρευνα. Επιπλέον, έχει παρουσιαστεί ότι αυξημένος κίνδυνος θανάτου συνδέεται με την έκφραση του CD146 στο επιθηλιακό διαμέρισμα των όγκων του μαστού (376). Οι διαπιστώσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν πρόσφατα από τους Zeng et al. οι οποίοι επεκτάθηκαν σε μια μελέτη με 505 ιστούς από καρκινώματα του μαστού (384). Συγκεκριμένα οι συγγραφείς επιβεβαιώνουν ότι η έκφραση του CD146 συνδέεται με τον τριπλά αρνητικό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού, με υψηλό στάδιο κακοήθειας και κακή πρόγνωση της νόσου, υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του CD146 θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός δείκτης πρόβλεψης των φτωχών σε ανταπόκριση στη θεραπεία όγκων. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, ερευνήθηκε εάν η έκφραση του CD146 επάγει την έκφραση μεσεγγυματικών γονιδίων σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος του μαστού. Χρησιμοποιώντας τέσσερις κυτταρικές γραμμές καρκινώματος, παρουσιάστηκε ότι η αυξημένη έκφραση του CD146 συνδέεται με την απώλεια της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, τη βελτιωμένη κυτταρική μετανάστευση και την αυξημένη έκφραση συγκεκριμένων μεγγυματικών δεικτών mRNAs. Αντίθετα αποτελέσματα βρέθηκαν σε κύτταρα καρκινώματος που παρουσιάζουν επιθηλιακό φαινότυπο. Έχει αναφερθεί σε περαιτέρω μελέτες ότι η υπερέκφραση του CD146 συνδέεται με αντίθετες μεταβολές στην JAM-A έκφραση και αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία, υποδηλώνοντας ότι η κακή πρόγνωση των θετικών σε CD146 μαστικών όγκων σχετίζεται με την CD146 επαγόμενη διαδικασία EMT και κατα συνέπεια την αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία.

Έχει βρεθεί ότι η αναγκαστική έκφραση του CD146 σε MCF-7 κύτταρικές σειρές στο μαστο δεν αρκούσε από μόνη της ώστε τα καρκινικά κύτταρα να τροποποιήσουν την ικανότητα μετανάστευσης, σε αντίθεση με άλλες κυτταρικές γραμμές, παρόλο που οδήγησε στην επαγωγή μερικών από τις μοριακές και κυτταρικές αλλαγές που σχετίζονται με την διαδικασία EMT. Ένας πιθανός μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του PI3K-Akt μονοπατιού. Το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR είναι ένα ενδοκυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης σημαντικό στην απόπτωση και ως εκ' τούτου στον καρκίνο του μαστού και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ σε πολλές μορφές καρκίνου αυτή η οδός είναι υπερδραστήρια με μείωση της απόπτωσης και

αύξηση της μετάστασης του καρκίνου. Μηχανισμοί για την ενεργοποίηση του μονοπατιού περιλαμβάνουν την απώλεια της λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού ογκογονιδίου PTEN, την ενίσχυση ή μετάλλαξη του PI3K, την ενίσχυση ή μετάλλαξη του Akt, την ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και την έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες. Μόλις ενεργοποιηθεί, η σηματοδότηση μέσω της Akt μπορεί να διαδοθεί σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του mTOR, που είναι ένας βασικό ρυθμιστής της παραγωγής πρωτεϊνών. Αυτή η οδός είναι ένας ελκυστικός θεραπευτικός στόχος για τον καρκίνο, επειδή χρησιμεύει ως σημείο σύγκλισης πολλών ερεθισμάτων ανάπτυξης και κυτταρικών διεργασιών που συμβάλλουν στην έναρξη και διάδοση του καρκίνου. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του Akt / mTOR μονοπατιού προσδίδει αντοχή σε πολλά είδη της θεραπείας του καρκίνου και είναι ένας φτωχός προγνωστικός παράγοντας για πολλούς τύπους καρκίνου. Όπως έχει λοιπόν αποδειχθεί ο CD146 ενεργοποιεί την PI3K-AKT σηματοδοτική οδό σε κύτταρα μελανώματος και συγκεκριμένα η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης JAM-A αυξάνει τον αριθμό των διαθέσιμων μορίων PIP3 (Τριφωσφορική Φωσφατιδυλινοσιτόλη 3,4,5) (385-390). Θα μπορούσε κανείς λοιπόν να υποθέσει ότι η πρωτεΐνη JAM-A εμποδίζει την προμεταναστευτική λειτουργία που προωθείται μέσω του δείκτη CD146 μέσω της παγίδευσης περισσότερων μορίων PIP3. Συνεπώς, η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης JAM-A στις κυτταρικές γραμμές MCF-7 εμποδίζει μέρος της CD146 σηματοδότησης μέσω της σηματοδοτικής οδού PI3K-Akt. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ένα σύνθετο δίκτυο μορίων προσκόλλησης συμβάλλουν στην μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση με παραλλαγές σε διαφορετικά περιβάλλοντα κύτταρα.

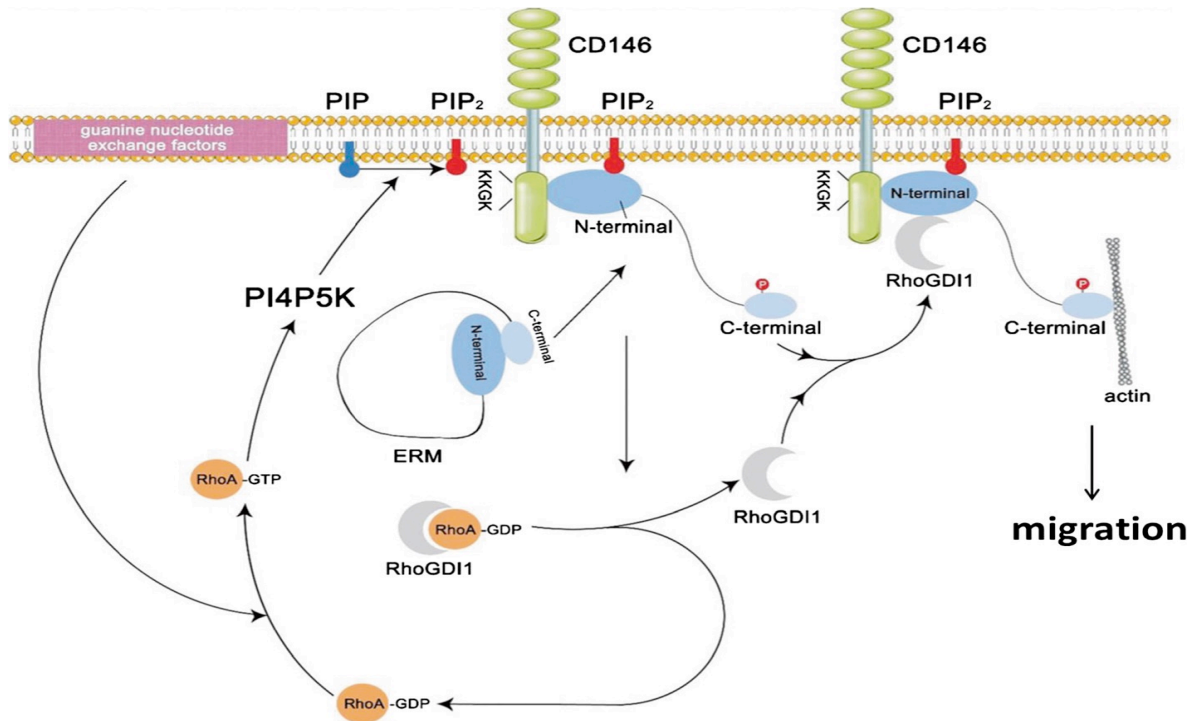
Μαζί με την απώλεια των επαφών επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, και την αυξημένη ανεξάρτητη ανάπτυξη των μεταναστευτικών ικανοτήτων των καρκινικών κυττάρων, η έκφραση του δείκτη CD146 συνδέεται με αύξηση στην έκφραση των δεικτών βιμεντίνης και N-καδερίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τον σημαντικό ρόλο του δείκτη CD146 στην επαγωγή της EMT σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Συγκεκριμένα, Q-RT-PCR αναλύσεις διαφόρων παραγόντων μεταγραφής σε τέσσερις κυτταρικές σειρές στον καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι η έκφραση ορισμένων κλασικών δεικτών της EMT μεταβάλλεται σε σχέση με τις αλλαγές στην έκφραση του

CD146. Κυρίως, η διακύμανση της έκφρασης του δείκτη Slug συσχετίστηκε με το επίπεδο της έκφρασης CD146 στην επιφάνεια των κυττάρων. Μάλιστα περιγράφηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία ότι η επιμόλυνση με Slug κυττάρων NBT II (στο αδενοκαρκίνωμα ουροδόχου κύστης) επάγει το πρώτο βήμα της EMT σε ένα ενδιάμεσο στάδιο που χαρακτηρίζεται από τη διαφοροποίηση της πρόσφυσης μεταξύ των κυττάρων (387-390).

Σε μελέτη ενός ευρέος μεταγραφικού προφίλ του γονιδιώματος ανθρώπινων κυτταρικών σειρών στον καρκίνο του μαστού, οι Blick et al. έδειξαν ότι ο δείκτης Slug εκφράζεται έντονα σε βασικού υποτύπου B κυτταρικές σειρές που επίσης υπερεκφράζουν βιμεντίνη, N- καδερίνη και ινονεκτίνη, ενώ οι τιμές της E-καδερίνης βρέθηκαν μειωμένα ρυθμισμένες. Σε πρωτοπαθείς όγκους, η έκφραση Slug συνδέεται επίσης με τον πολύ επιθετικό βασικού τύπου μοριακό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού (385-390). Έτσι προτάθηκε ότι ο CD146 συμμετέχει στην διαδικασία EMT αυξάνοντας την έκφραση του Slug, αν και δεν μπορούν να βγούν ακόμη ασφαλή συμπεράσματα από την άμεση ή έμμεση σχέση μεταξύ αυτών των δύο μορίων. Πρόσφατα, εκτός από την αυξημένη έκφραση του Slug, οι Zeng et al. (383) πρότειναν ότι η CD146 επαγόμενη EMT σχετίζεται με την ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης RhoA (Εικόνα 1.9).

Εικόνα 1.9. Σχηματική απεικόνιση μιας συντομευμένης γενικής άποψης των οδών σηματοδότησης CD146 - ERM-ακτίνης και K110A PI4P5K-PIP2. Από: *Xing Lei, Ce-Wen Guan, Yang Song and Huan Wang. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. Cancer Cell International (2015) 15:3.*

(Σε απάντηση διεγερτικών σημάτων σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα PIP2 CD146 / μοεσίνη / RhoGDI1, το οποίο ενεργοποιεί το μονοπάτι RhoA - PI4P5K - PIP2. Αυτή η ενεργοποίηση προκαλεί την έκφραση της πρωτεΐνης PIP2 και ενισχύει την σύνδεση του CD146 στον κυτταρικό σκελετό, η οποία τελικά οδηγεί σε κίνηση τον κυτταροσκελετό.)



Ο ρόλος των Rho-A GTPασών φαίνεται πως είναι βασικός στην επαναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, με τη δημιουργία δομών όπως τα φιλοπόδια, που εκτείνονται στη θεμέλια ουσία και εμπλέκονται τόσο στην κίνηση του κυττάρου και τη μετανάστευσή του όσο και στην μεταγραφική ρύθμιση επιδρώντας έτσι στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Το ότι ο D146 είναι σημαντικός ρυθμιστής των EMTs στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού εμφανίζεται ως συμπεράσματα πολλών δημοσιευμένων μελετών. Πρώτον, η CD146 υπερέκφραση σε μη επιθηλιακά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού καταστέλλει

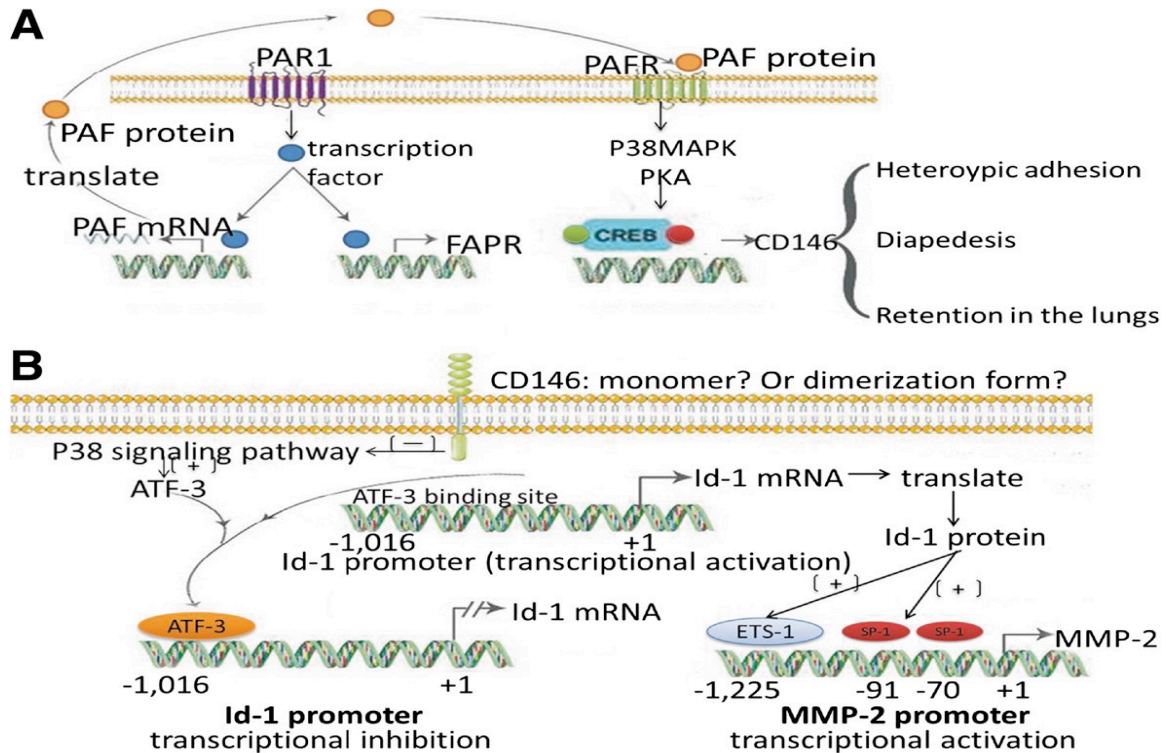
τον επιθηλιακό φαινότυπο ενώ συμβάλλει στην παρουσία μεσεγχυματικού φαινοτύπου και αυξάνει δραματικά τις μεταναστευτικές και επεμβατικές συμπεριφορές και ιδιότητες των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Δεύτερον, έχει βρεθεί ότι η μειωμένη ρύθμιση των τιμών του δείκτη CD146 σε διηθητικά μεσεγχυματικά καρκινώματα του μαστού αντιστρέφει τον κακοήγη φαινότυπο τους. Τέλος, μελετώντας 505 ασθενείς με πρωτοπαθή καρκίνο μαστού, βρέθηκε ότι η έκφραση του CD146 συνδέεται σημαντικά με το υψηλό στάδιο της νόσου και την κακή πρόγνωση των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων, παρέχοντας έτσι υποστήριξη σε πολλές in vitro μελέτες αλλά και μελέτες σε ζώα που διενεργούνται αυτή τη στιγμή και επιβεβαιώνουν το ίδιο αποτέλεσμα.

Εν κατακλείδι, ο CD146 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προώθηση της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού μέσω της ρύθμισης της ενεργοποίησης των παραγόντων RhoA και Slug για την προώθηση του φαινομένου EMT. Επιπλέον, η εντυπωσιακή συσχέτιση της αφύσικα υψηλής έκφρασης του CD146 στους τριπλά επιθετικούς καρκίνους του μαστού, τουλάχιστον εξηγεί εν μέρει τον ρόλο του CD146 ως επαγωγέα EMT στον πιο επιθετικό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού. Επομένως, ο CD146 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας πιθανός αναπτυξιακός δυναμικός θεραπευτικός στόχος στον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα όσον αφορά τους τριπλά αρνητικούς υποτύπους.

Εικόνα 1.10. Σχηματική απεικόνιση σηματοδοτικών μονοπατιών που δείχνουν ότι ο CD146 ρυθμίζει τη μετάσταση και εισβολή των καρκινικών κυττάρων στο ανθρώπινο μελάνωμα. Από: *Xing Lei, Ce-Wen Guan, Yang Song and Huan Wang. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. Cancer Cell International (2015) 15:3.*

(Α. Ένα υποτιθέμενο μοντέλο του άξονα σηματοδότησης του PAR1 - PAFR - CD146 στα ανθρώπινα κύτταρα μελανώματος. Ο PAR1 σε συνεργασία με τον PAFR δρά μέσω της ενεργοποίησης της PAFR - επαγόμενη φωσφορύλιωσης του CREB και στην πρόσληψη των CREB και Sp1 από τον υποκινητή του CD146, η οποία διεγείρει την έκφραση του CD146 στο μεταστατικό μελάνωμα. Β Ο CD146 συμβάλλει στον καθορισμό του φαινοτύπου του μελανώματος. Ο CD146 ρυθμίζει την έκφραση του Id - 1 και

δεσμεύεται με το Id - 1 προαγωγέα. Η Id - 1 υπερέκφραση, με τη σειρά της, οδηγεί σε αυξημένη δέσμευση των δύο Ets - 1 και Sp1 στον MMP- 2 και περαιτέρω στον υποκινητή και προάγει την έκφραση του MMP- 2.)



Ο υποκινητής του CD146 προσλαμβάνει τον μεταγραφικό παράγοντα CREB και οδηγεί στη έκφραση της κυκλίνης D1 συμμετέχοντας σε μηχανισμούς που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, την αγγεογένεση, την κινητικότητα και τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων. Όπου FAPR (Fibroblast activated protein receptor): υποδοχέας ενεργοποίησης ινοβλαστών. Επίσης ο CD146 εμπλέκεται στην έκφραση της MMP-2 (μεταλλοπρωτεΐνάση-2), μορίου πολύ σημαντικού για την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων αλλά και για την έκφραση του παράγοντα αγγειογένεσης, του VEGF (Εικόνα 1.10).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

2.1.1. Υπόθεση της προτεινόμενης έρευνας.

Οι δείκτες CD146 (MCAM) και νεστίνη εκφράζονται σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού. Η έκφραση τους στα παραπάνω κύτταρα ενδέχεται να είναι διαφορετική ανάλογα με δημογραφικούς, κλινικούς, βιοχημικούς, ιστολογικούς, ανοσοφαινοτυπικούς και άλλους παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η έκφραση και η συσχέτιση της έκφρασης των μοριακών δεικτών CD146 και νεστίνης 1. στα καρκινώματα του μαστικού αδένα διαφορετικού ιστολογικού τύπου και ανοσοφαινοτύπου σχετιζόμενου με τους υποδοχείς ορμονών, 2. δειγμάτων μαστικού ιστού, αρνητικών για κακοήθεια που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συσχετίστηκαν με α) την έκφραση κλασικών δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού και απόπτωσης (πχ. P53, Ki67 κτλ) β) Κλασικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ηλικία, εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, μέγεθος όγκου, ιστολογικός τύπος, ιστολογικός βαθμός κακοηθείας, στάδιο της νόσου και ορμονικοί υποδοχείς), γ) Άλλα προβλήματα υγείας (ιστορικό αναμνηστικό, προεγχειρητικές απεικονιστικές εξετάσεις πχ. υπερηχογράφημα, μαστογραφία, CT scanner, FNA, Σπινθηρογράφημα οστών, χειρουργεία). Οι πληροφορίες για τις ανωτέρω παραμέτρους βρίσκονται σε βάση δεδομένων

2.2 ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ

2.2.1. Πληθυσμός ασθενών

Στην παρούσα μελέτη έχουν συμπεριληφθεί 141 γυναίκες που υπεβλήθησαν σε χειρουργική επέμβαση για καρκίνο του μαστού. Το ιστολογικό υλικό μαζικού αδένου αφορά τα έτη 2000 έως 2014 όπως συλλέχθηκε από την Α' και Β' Χειρουργική Κλινική του Γενικού Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών καθώς και σε ιστολογικό υλικό της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών τα έτη 2012 έως 2014 όπως συλλέχθηκε από τα εξής Νοσοκομεία: Γενικό Νοσοκομείο Χανίων, Γενικό Νοσοκομείο Ρόδου, Γενικό Νοσοκομείο Αμαλιάδος, Γενικό Νοσοκομείο Άρτας, Γενικό Νοσοκομείο Πατησίων, Γενικό Νοσοκομείο Χαλκίδας, Γενικό Νοσοκομείο Άργους και Γενικό Νοσοκομείο Ικαρίας. Η επιλογή των ασθενών βασίστηκε σε αρχειακό ιστολογικό υλικό με βάση το σύνολο των ασθενών που προσήλθαν, νοσηλεύθηκαν και έχουν παραπεμφθεί για έλεγχο και θεραπεία νοσημάτων μαζικού αδένου τα έτη 2000 έως 2014. Η διάγνωση των ιστολογικών αλλοιώσεων στηρίχθηκε σε ανατομοπαθολογικά ευρήματα υλικού μαζικού αδένου, το οποίο ελήφθηκε μετά από χειρουργική επέμβαση, η οποία μπορεί να συνδυάστηκε προηγουμένως με λήψη υλικού με λεπτή βελόνη (FNA) ή υπερηχογράφημα ή μαστογραφία.

Η ταξινόμηση των καρκινωμάτων μαστού πραγματοποιήθηκε με βάση το «μοναδικό» ανοσοϊστοχημικό προφίλ του κάθε όγκου και η τελική διανομή του πληθυσμού έγινε με βάση τους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους στον καρκίνο του μαστού δηλαδή διηθητικά πορογενή και λοβιακά καρκινώματα grade I, II, III, καθώς και τούς διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους που προέκυψαν και παρουσιάζονται περίπου ως εξής: 42 τριπλά-αρνητικά [ER(-), PR(-), HER2(-)] καρκινώματα μαστού ανάμεσα στα οποία προέκυψε μια μικρότερη ομάδα 13 βασικού τύπου καρκινωμάτων [EGFR+, CK5/6+], 33 HER2 θετικοί όγκοι [HER2+/ER-/PR-], 33 αυλικού τύπου Β όγκοι [ER+ και/ή PgR+, HER2] και 33 αυλικού τύπου Α όγκοι [ER+ και/ή PgR+, HER2-].

2.2.2. Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνης και του δείκτη CD146 σε ιστολογικά παρασκευάσματα μαζικού αδένου.

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του δείκτη CD146 και της νεστίνης, κόπηκαν συνεχόμενες τομές παραφίνης πάχους 4 μικρομέτρων από κάθε δείγμα ιστού που ελήφθη μετά από χειρουργική επέμβαση, και για τη μελέτη τους χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι της νεστίνης είναι το mouse monoclonal nestin (10c2, Santa Cruz Biochemicals, Santa Cruz, CA, USA), σε αραίωση 1:100. Σαν ενδιάμεσο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το ImmPRESS HRP Anti-Mouse Ig (Peroxidase) Polymer Detection Kit, το οποίο περιλαμβάνει τα ImmPRESSTM (Peroxidase) Polymer Anti-Mouse Ig Reagent καθώς και 2.5% Normal Horse Serum for blocking (VectorLabs, Biodata Hellas LTD, Greek Distributor). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε έναντι του δείκτη CD146 είναι το mouse monoclonal antibody CD146 (MCAM) σε αραίωση 1:100 (κλώνος N1238, product code: NCL-CD146, MENARINI DIAGNOSTICS S.A., Greece). Σαν ενδιάμεσο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το ImmPRESS HRP Anti-Mouse Ig (Peroxidase) Polymer Detection Kit, το οποίο περιλαμβάνει τα ImmPRESSTM (Peroxidase) Polymer Anti-Mouse Ig Reagent καθώς και 2.5% Normal Horse Serum for blocking (VectorLabs, Biodata Hellas LTD, Greek Distributor).

Για την εκτίμηση της έκφρασης του δείκτη CD146 και της νεστίνης στο ιστικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα φυσιολογικού ιστού, φυσιολογικά κύτταρα από το μυοεπιθήλιο και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των φυσιολογικών αγγείων ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες ελέγχου και η εκτίμηση της χρώσης έγινε με ημιποσοτική μέθοδο. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος τριών βημάτων (αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης) για τον προσδιορισμό της έκφρασης της νεστίνης και του CD146 σε τομές παραφίνης από 141 καρκινώματα μαστού.

Η αντιγονική αποκάλυψη έγινε με θέρμανση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 9.0 της εταιρείας Dako (Denmark A/S), σε μηχανήμα αποπαραφίνωσης, ενυδάτωσης και ανάκτησης της αντιγονικότητας της εταιρείας Dako για 20 min. Ακολούθησε το στάδιο εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης για την αποφυγή ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Για το σκοπό αυτό έγινε επώαση των τομών με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (0.3%) σε TBS για 15 min σε σκοτεινό περιβάλλον. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε εξουδετέρωση της μη ειδικής χρώσης με επώαση των τομών σε φυσιολογικό ορό αλόγου (2.5% Normal Horse Serum) για 20 min. Μετά από εκπλύσεις

με ρυθμιστικό διάλυμα, οι τομές επικαλύφθηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα και επώαστηκαν ολονύκτια στους 4 °C. Το σύστημα προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό των συμπλόκων αντιγόνου-αντισώματος ήταν το Polymer Anti-Mouse Ig Reagent, με το οποίο οι τομές επώαστηκαν για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η χρωστική αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επώαση των τομών σε διάλυμα τετραϋδροχλωρικής 3,3' διαμινοβενζιδίνης (DAB) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. Κατόπιν έγινε χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ιστών ή κυττάρων. Ακολούθησε αφυδάτωση, βύθιση των τομών σε ξυλόλη, επίστρωση και παρατήρηση στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο.

Κάθε δείγμα θεωρήθηκε θετικό για έκφραση της νεστίνης στα κύτταρα όταν παρουσιάζει χρώση >5% των ομολόγων κυττάρων και θετικό για έκφραση του δείκτη CD146 στα κύτταρα όταν παρουσιάζει χρώση >10% των ομολόγων κυττάρων. Η χρώση αξιολογήθηκε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων του όγκου. Η ένταση της χρώσης βαθμονομήθηκε ως ακολούθως: 0: απουσία χρώσης των κυττάρων, 1: ηπίου βαθμού χρώση, 2: ενδιαμέσου βαθμού χρώση, 3: έντονου βαθμού χρώση. Ένταση χρώσης 2 ή 3 ορίζεται ως «Αυξημένη ένταση χρώσης». Αντιστοίχως, ποσοστό χρωσθέντων κυττάρων $\geq 50\%$ ορίζεται ως «Υπερέκφραση Nestin και CD146». Η αξιολόγηση της ανοσοχρώσης ολοκληρώθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.2.3. Ανάλυση Δεδομένων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SPSS 21.0. Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση (mean $\pm$ SD) ή διάμεση τιμή (median, interquartile range), ενώ οι κατηγορικές παρουσιάστηκαν ως ποσοστά (%). Για τις συγκρίσεις μεταξύ των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι μονοπαραγοντικές ανάλυσεις χ^2 , Fisher's test, unpaired t-test για τη συσχέτιση με τους βιολογικούς δείκτες. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ειδικές στατιστικές αναλύσεις επιβίωσης (log rank test και Kaplan-Meier καμπύλες επιβίωσης). Για τη διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης των βιολογικών δεικτών με την επιβίωση των ασθενών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση Cox-Regression. Η τιμή του επιπέδου στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p \leq 0.05$.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1. Αριθμός ασθενών για κάθε ανοσοφαινότυπο του δείγματος.

Οι 141 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη κατατάχθηκαν με βάση τους διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους που προέκυψαν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες. Έτσι στην ομάδα Α (n=42) συμπεριελήφθησαν γυναίκες και ένας άντρας με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο [Ανοσοφαινότυπος: ER(-), PR(-), HER2(-)] και διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους του καρκίνου μαστού δηλαδή διηθητικά πορογενή και λοβιακά καρκινώματα grade I, II, III, ανάμεσα στις οποίες συμπεριελήφθη και μια υποομάδα (n=13) με όγκους βασικού τύπου [Ανοσοφαινότυπος: EGFR+, CK5/6 +]. Στην ομάδα Β (n=33) συμπεριελήφθησαν γυναίκες με HER2 θετικό μοριακό υπότυπο [Ανοσοφαινότυπος: HER2+/ER-/PR-] και διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους του καρκίνου μαστού, στην ομάδα Γ (n=33) γυναίκες με αυλικού τύπου Β μοριακό υπότυπο [Ανοσοφαινότυπος: ER+ και/ή PgR+, HER2] και διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους και στην ομάδα Δ (n=33) γυναίκες με αυλικού τύπου Α μοριακό υπότυπο [Ανοσοφαινότυπος: ER+ και/ή PgR+, HER2-] και διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους του καρκίνου μαστού (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Αριθμός ασθενών για κάθε ανοσοφαινότυπο του δείγματος.

Αριθμός ασθενών / Ανοσοφαινότυπος	Ιστολογική Διάγνωση	N
Ομάδα Α	Τριπλά αρνητικός μοριακός υπότυπος [Ανοσοφαινότυπος ER(-),PR(-), HER2(-)]	42
Ομάδα Β	HER2 θετικός μοριακός υπότυπος [Ανοσοφαινότυπος HER2+/ER-/PR-]	33
Ομάδα Γ	Αυλικού τύπου Β μοριακός υπότυπος [Ανοσοφαινότυπος: ER+ και/ή PgR+, HER2]	33
Ομάδα Δ	Αυλικού τύπου Α μοριακός υπότυπος [Ανοσοφαινότυπος: ER+ και/ή PgR+, HER2-]	33

2.3.2 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με μοριακούς υπότυπους τριπλά αρνητικό , HER2 θετικό, αυλικού τύπου Β και αυλικού τύπου Α.

Με βάση τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του χειρουργικού παρασκευάσματος σε σύνολο 137 ασθενών, σε 48 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους < 2 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT1, σε 65 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους μεταξύ 2 εκ έως 5 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT2), σε 24 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους > 2 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT3). Συνολικά σε δείγμα 136 ασθενών, 8 όγκοι ταξινομήθηκαν ως Grade I, 44 ως Grade II και 84 όγκοι ως Grade III. Με βάση τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του χειρουργικού παρασκευάσματος, τα αποτελέσματα από τις βιοψίες του φρουρού λεμφαδένα ήταν θετικά στις 59/137 περιπτώσεις και αρνητικά για τις 78/137 περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα από τους 59 ασθενείς με θετική βιοψία του φρουρού

λεμφαδένα, 20 ασθενείς είχαν μεταστάσεις σε 1 έως 3 λεμφαδένες, 29 ασθενείς είχαν μεταστάσεις σε 4 έως 9 λεμφαδένες και 10 ασθενείς εμφάνισαν μεταστάσεις σε περισσότερους από 10 λεμφαδένες. Σε σύνολο 136 ασθενών, 44 ασθενείς είχαν Στάδιο Νόσου I, 40 Στάδιο Νόσου II, 44 Στάδιο Νόσου III και 8 ασθενείς Στάδιο Νόσου IV. Μόνο 4 ασθενείς είχαν απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά το χρόνο της διάγνωσης.

Όσον αφορά το δείγμα των 42 ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (Ομάδα Α), σε 16 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους < 2 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT1, σε 17 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους μεταξύ 2 εκ έως 5 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT2) και σε 9 ασθενείς η μέση τιμή διαμέτρου του πρωτοπαθούς όγκου ήταν μεγέθους > 2 εκ (παθολογοανατομικό στάδιο κατά TNM pT3). Συνολικά, 7 όγκοι ταξινομήθηκαν ως Grade II και 35 όγκοι ως Grade III, ενώ δεν προέκυψε κανένας Grade I όγκος. Με βάση τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του χειρουργικού παρασκευάσματος, τα αποτελέσματα από τις βιοψίες του φρουρού λεμφαδένα ήταν θετικά στις 23/42 περιπτώσεις και αρνητικά για τις 19/42 περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα από τους 23 ασθενείς με θετική βιοψία του φρουρού λεμφαδένα, 5 ασθενείς είχαν μεταστάσεις σε 1 έως 3 λεμφαδένες, 9 ασθενείς είχαν μεταστάσεις σε 4 έως 9 λεμφαδένες και 5 ασθενείς εμφάνισαν μεταστάσεις σε περισσότερους από 10 λεμφαδένες. Τέλος, 16 ασθενείς είχαν Στάδιο Νόσου I, 7 Στάδιο Νόσου II, 14 Στάδιο Νόσου III και 5 ασθενείς Στάδιο Νόσου IV.

2.3.3. Περαιτέρω αναλύσεις επιδημιολογικών στοιχείων στον υπό μελέτη πληθυσμό.

Στο ολικό δείγμα των ασθενών μας (N=141), όσον αφορά τον δείκτη μάζας σώματος η μέση τιμή BMI (body mass index) ήταν 26,62 (Εύρος: 36,73, Απόκλιση: 5,47785). Δεδομένου ότι ο δείκτης μάζας σώματος είναι ένας αντικειμενικός τρόπος για να υπολογίσει κανείς αν είναι παχύσαρκος ή όχι, ορίζεται ως: ελλιποβαρής: BMI < 18,5 kg/m², «Φυσιολογικό» βάρος: BMI=18,5 – 24,9 kg/m², Υπέρβαρος-η: BMI= 25,0 – 29,9kg/m², α' βαθμού παχυσαρκία: BMI= 30,0 – 34,9 kg/m², β' βαθμού παχυσαρκία: BMI= 35,0 – 39,9 kg/m², Νοσογόνο παχυσαρκία: BMI >40 kg/m². Μελέτες συνδέουν

τον δείκτη μάζας σώματος με τον καρκίνο του μαστού και συγκεκριμένα πριν από την εμμηνόπαυση, σε ασθενείς που είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι μειώνεται ελαφρώς ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού. Ωστόσο μετά την εμμηνόπαυση, ασθενείς που είναι υπέρβαρες ή παχύσαρκες αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ο μέσος όρος των ασθενών μας χαρακτηρίζονται ως παχύσαρκες με μέση τιμή του δείκτη μάζας σώματος 26,62 (Πίνακας 2^α). Στο ολικό δείγμα, 41,7% ήταν πρόεμμηνοπαυσιακές ασθενείς και 58,3% μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς (Πίνακας 2β.)

Πίνακας 2^α. Δείκτης μάζας σώματος στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

N	Σύνολο	141
	Ελλείψεις	0
Μέση τιμή		25,9450
Διάμεση τιμή		26,6200
Στ. Απόκλιση		5,47785
Εύρος		36,73
Ελάχιστη τιμή		,00
Μέγιστη τιμή		36,73

Πίνακας 2β. Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση	Συχνότητα	%	Έγκυρο%	Αθροιστικό Ποσοστό
Ηλικία <50 έτη	58	41,7	41,7	42,6
>50 έτη	81	58,3	58,3	100,0
Σύνολο	139	100,0	100,0	

Πληροφορίες σε σχέση με το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών (Πίνακας 3) δείχνουν πως 78,4% αυτών (109/139) εμφάνισαν στο γενεαλογικό τους δέντρο συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο μαστού ή οωθηκών, δηλαδή είχαν οικογενειακή προδιάθεση στην εκδήλωση της νόσου τους. Αντίστοιχα, 21,6% των ασθενών (30/139) εμφάνισαν καθαρό γενεαλογικό δέντρο σε σχέση με τους συγγενείς πρώτου βαθμού. Η νόσος τους δηλαδή εμφανίστηκε σαν σποραδικό περιστατικό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως το 58,9% (83/141) των ασθενών μας είχε στο παρελθόν ιστορικό καλοήθους μαστοπάθειας σε αντίθεση με 41,1% (53/141) των ασθενών, οι οποίοι είχαν καθαρό ιστορικό, επιβεβαιώνοντας τις μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που συνδέουν την εμφάνιση καποιας μορφής καλοήθους μαστοπάθειας με αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου μαστού σε αυτές τις ασθενείς (Πίνακας 4). Όσον αφορά τη λήψη κάποιας μορφής αντισύλληψης στο παρελθόν από τις ασθενείς, μόλις 11,3% (16/141) εμφάνισαν θετικό ιστορικό, ενώ 88,7% (125/141) δεν είχαν πάρει ποτέ στην ζωή τους αντισύλληψη (Πίνακας 5). Τέλος, 11,3% (16/141) των ασθενών ήταν καπνίστριες, ενώ 88,7% (125/141) δεν κάπνισαν ποτέ στη ζωή τους (Πίνακας 6).

Πίνακας 3. Θετικό οικογενειακό ιστορικό σε σχέση με συγγενείς πρώτου βαθμού στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Οικογενειακό Ιστορικό		Συχνότητα	%	Έγκυρο %
Επίπτωση	Σποραδική	109	74,8	78,4
	Οικογενής	30	21,6	21,6
Σύνολο		139	100,0	100,0

Πίνακας 4. Ιστορικό καλοήθους μαστοπάθειας στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Καλοήθης μαστοπάθεια		Συχνότητα	%	Έγκυρο %	Αθροιστικό Ποσοστό
Ιστορικό	Μή εμφάνιση καλοήθους μαστοπάθειας	58	41,1	41,1	41,1
	Εμφάνιση Καλοήθους μαστοπάθειας	83	58,9	58,9	100,0
	Σύνολο	141	100,0	100,0	

Πίνακας 5. Ιστορικό αντισύλληψης στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Αντισύλληψη		Συχνότητα	%	Έγκυρο %	Αθροιστικό Ποσοστό
Ιστο- ρικό	Μη χρήση Αντισύλληψης	125	88,7	88,7	88,7
	Χρήση Αντισύλληψης	16	11,3	11,3	100,0
	Σύνολο	141	100,0	100,0	

Πίνακας 6. Ιστορικό καπνίσματος στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Κάπνισμα		Συχνότητα	%	Εγκυρο %	Αθροιστικό Ποσοστό
Ιστορικό	Μη καπνιστές	102	72,3	72,3	72,3
	Καπνιστές	39	27,7	27,7	100,0
	Σύνολο	141	100,0	100,0	

Αναφορικά με τον Προληπτικό έλεγχο (Screening) στο ολικό δείγμα των ασθενών μας, δυστυχώς μόλις 17% των ασθενών (24/141) πληροφορήθηκε έγκαιρα τη διάγνωση της νόσου μέσω διενέργειας συστηματικής μαστογραφικής απεικόνισης στο πλαίσιο πρόληψης. Αντίθετα ένα ανησυχητικό 83% (117/141) των ασθενών δήλωσαν πως δεν ήταν ενήμεροι ή δεν είχαν κάνει ποτέ στη ζωή τους μαστογραφία ή υπερηχογράφημα μαστών μέχρι την ημέρα εκδήλωσης της νόσου τους (Πίνακας 7). Το παραπάνω αποτέλεσμα της μελέτης μας υπογραμμίζει την αναγκαιότητα καλύτερης, συνεχούς και έγκαιρης ενημέρωσης των ασθενών καθώς είναι σαφές ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια ασθένεια η οποία είναι απόλυτα θεραπεύσιμη εάν διαγνωσθεί έγκαιρα. Χαρακτηριστικό είναι επίσης πως μόλις 15% των ασθενών μας (20/133) προέβησαν σε διενέργεια πλαστικής αποκατάστασης, σε αντίθεση με 85% (113/133) (Πίνακας 8). Το επιχείρημα των τελευταίων για έναρξη της αποκατάστασης των μαστών μετά απο ένα χειρουργείο μαστεκτομής αφενώς στηρίζεται στην εντύπωση ότι έτσι θα εμφανιστούν στο μεταξύ πιθανές υποτροπές, αφετέρου στην οικονομική κρίση που περνά η χώρα και στην ανέχεια των πολιτών της. Όμως, δυστυχώς, σχεδόν οι μισές υποτροπές εμφανίζονται αρκετά αργά, μετά τα δύο χρόνια, και σε κάθε περίπτωση η αποκατάσταση δεν έχει επιβαρυντική δράση ή μικρότερη επιβίωση των γυναικών που την κάνουν. Αντίθετα υπάρχουν μελέτες που δείχνουν τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της σωματικής εικόνας των γυναικών που κάνουν αποκατάσταση των μαστών τους.

Πίνακας 7. Screening στο ολικό δείγμα των ασθενών μας. Διάγνωση μέσω μαστογραφικής απεικόνισης στο πλαίσιο πρόληψης.

Προληπτικός Έλεγχος (Screening)	Συχνότητα	%	Έγκυρο %	Αθροιστικό Ποσοστό
Μη εφαρμογή screening	117	83,0	83,0	83,0
Διάγνωση μέσω screening	24	17,0	17,0	100,0
Σύνολο	141	100,0	100,0	

Πίνακας 8. Διενέργεια πλαστικής αποκατάστασης των μαστών μετά τη διάγνωση και θεραπευτική προσέγγιση στο ολικό δείγμα των ασθενών μας.

Πλαστική επανορθωτική αποκατάσταση μαστών.	Συχνότητα	%	Έγκυρο %
Μή πλαστική αποκατάσταση	113	85	85
Πλαστική αποκατάσταση	20	15	15
Σύνολο	133	100,0	100

2.3.4. Αποτελέσματα όσον αφορά το ολικό δείγμα των ασθενών μας (N=141)

2.3.4.1. Έκφραση της πρωτεΐνης νεστίνης στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.

Όπως φαίνεται αναλυτικά και στους πίνακες η νεστίνη εκφράζεται σε ποσοστό 47,6% (20/42) στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο, δηλαδή στην πιο επιθετική ομάδα στον καρκίνο του μαστού. Αντίθετα, η νεστίνη εκφράζεται μόλις σε ποσοστό 6,1% (2/42) σε ασθενείς με Her2+ μοριακό υπότυπο, σε ποσοστό 9,1% (3/42) σε ασθενείς με Αυλικού τύπου Β μοριακό υπότυπο και σε ποσοστό 3% (1/42) σε ασθενείς με Αυλικού τύπου Α μοριακό υπότυπο, δηλαδή την λιγότερη επιθετική μας ομάδα. Συνολικά εκφράστηκε στο ολικό δείγμα των ασθενών μας (N=141) σε ποσοστό 18,4% (26/141). Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας είναι **P<0,001** επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του πειράματός μας (Πίνακας 9α και 9β, Γράφημα 1).

Πίνακας 9^α. Συχνότητα έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνης σε ποσοστά στον ιστό σε σχέση με τον μοριακό ανοσοφαινότυπο.

Νεστίνη/Μοριακός Υπότυπος P<0,001		Μοριακός Υπότυπος		Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός υπότυπος	Μη τριπλά αρνητικός υπότυπος	
Νεστί-νη	Συχνότητα	22	93	115
	% της νεστίνης	19,1%	80,9%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	52,4%	93,9%	81,6%
	Συχνότητα	20	6	26
	% της νεστίνης	76,9%	23,1%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	47,6%	6,1%	18,4%
Σύνολο	Συχνότητα	42	99	141
	% της νεστίνης	29,8%	70,2%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square, Στατιστικά πολύ σημαντικό.

Πίνακας 9β. Συχνότητα έκφρασης της πρωτεΐνης νεστίνης σε ποσοστά στον ιστό για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ.

Νεστίνη / Μοριακός Υπότυπος		Μοριακός Υπότυπος				Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός	Her-2 +	Αυλικού Τύπου B	Αυλικού Τύπου A	
P<0,001						
Νεστίνη	Συχνότητα	22	31	30	32	115
	% της	19,1%	27,0%	26,1%	27,8%	100,0%
	Αρνητική					
	Έκφραση					
	% του	52,4%	93,9%	90,9%	97,0%	81,6%
	μοριακού					
	υποτύπου					
	Συχνότητα	20	2	3	1	26
Θετική	% της	76,9%	7,7%	11,5%	3,8%	100,0%
	νεστίνης					
	% του	47,6%	6,1%	9,1%	3,0%	18,4%
	μοριακού					
Σύνολο	υποτύπου					
	Συχνότητα	42	33	33	33	141
	% της	29,8%	23,4%	23,4%	23,4%	100,0%
	νεστίνης					
Σύνολο	% του	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	μοριακού					
Σύνολο	υποτύπου					
	Συχνότητα	42	33	33	33	141

Fisher's exact Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό

Σημειώνεται πως:

TN-Triple negative: Τριπλά αρνητικός Μοριακός Υπότυπος

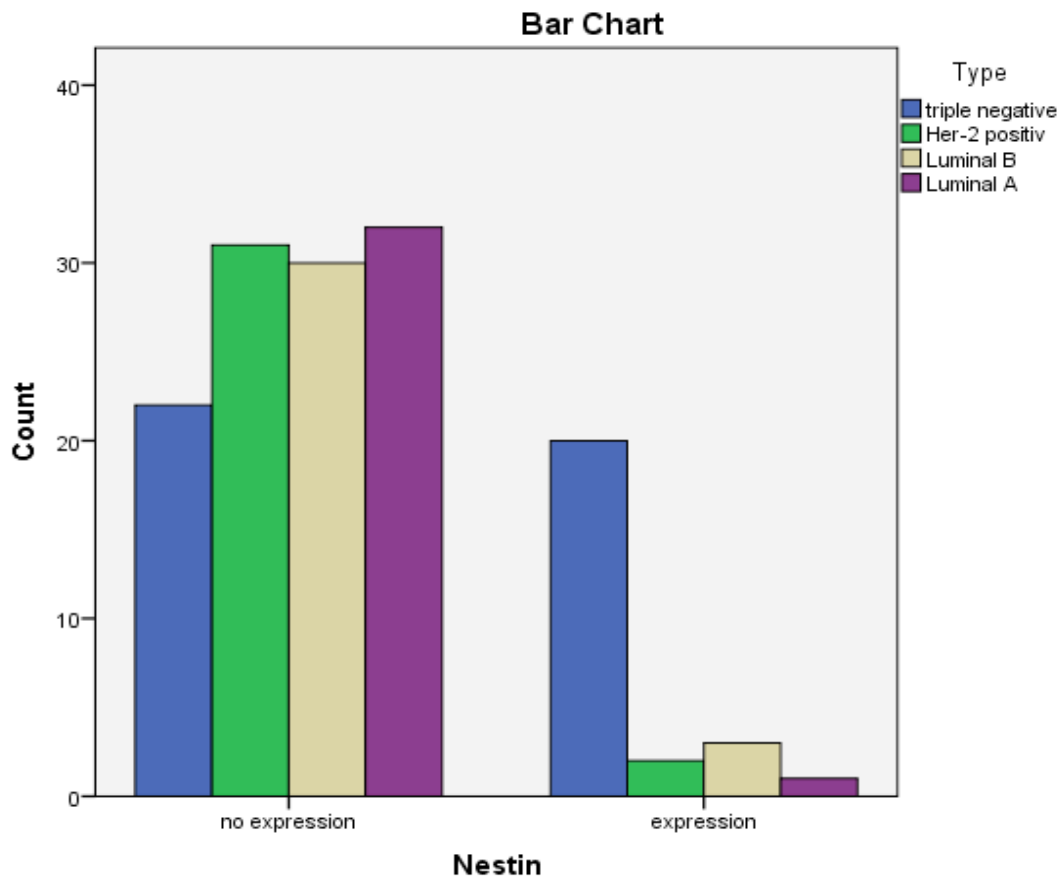
Basal-like: Βασικός κυτταρικός Μοριακός Υπότυπος

HER-2+: HER-2 θετικός Μοριακός Υπότυπος

Luminal B: Αυλικού τύπου Β Μοριακός Υπότυπος

Luminal A: Αυλικού τύπου Α Μοριακός Υπότυπος

Γράφημα 1. Έκφραση της πρωτεΐνης νεστίνης στον ιστό για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ.



2.3.4.2. Έκφραση του δείκτη CD146 (MCAM) στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.

Όπως φαίνεται αναλυτικά και στους πίνακες ο δείκτης CD146 εκφράζεται σε ποσοστό 73,8% (31/42) στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο, δηλαδή στην πιο επιθετική ομάδα στον καρκίνο του μαστού. Σε μικρότερο ποσοστό εκφράζεται μόλις σε 30,3% (10/33) σε ασθενείς με Her2+ μοριακό υπότυπο, σε ποσοστό 18,2% (6/33) σε ασθενείς με αυλικού τύπου Β και σε ποσοστό 9,1% (3/33) σε ασθενείς με αυλικού τύπου Α μοριακό υπότυπο, δηλαδή την λιγότερη επιθετική μας ομάδα. Συνολικά εκφράστηκε στο ολικό δείγμα των ασθενών μας (N=141) σε ποσοστό 35,5% (50/141). Επίσης παρατηρείται μια φθίνουσα κλίση της έκφρασης του δείκτη στις λιγότερες επιθετικές ομάδες.

Πίνακας 10^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά στον ιστό σε σχέση με τον μοριακό ανοσοφαινότυπο.

CD146 / Μοριακός Υπότυπος P<0,001		Μοριακός Υπότυπος		Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός	Μή τριπλά αρνητικός	
CD146	Συχνότητα	11	80	91
	% του CD146	12,1%	87,9%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	26,2%	80,8%	64,5%
	Συχνότητα	31	19	50
	% του CD146	62,0%	38,0%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	73,8%	19,2%	35,5%
Σύνολο	Συχνότητα	42	99	141
	% του CD146	29,8%	70,2%	100,0%
	% του μοριακού υποτύπου	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό

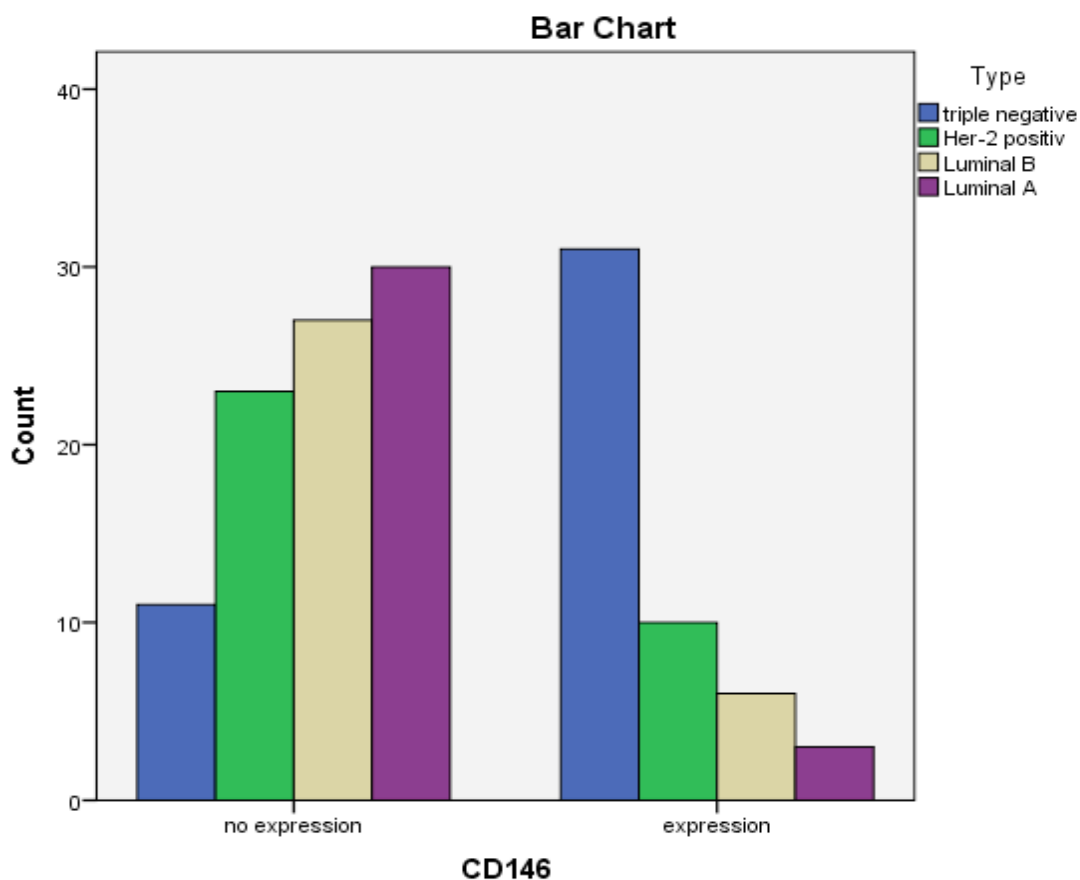
Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας είναι **P<0,001** επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του πειράματός μας (Πίνακας 10α και 10β, Γράφημα 2).

Πίνακας 10β. Συχνότητα έκφρασης του δείκτη CD146 σε ποσοστά στον ιστό για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ

CD146 / Μοριακός Υπότυπος p<0,001		Μοριακός Υπότυπος				Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός	Her-2+	Αυλικού τύπου Β	Αυλικού τύπου Α	
CD146	Συχνότητα	11	23	27	30	91
	% του	12,1%	25,3%	29,7%	33,0%	100,0%
	Αρνητική Έκφραση					
	% του	26,2%	69,7%	81,8%	90,9%	64,5%
	μοριακού υποτύπου					
	Συχνότητα	31	10	6	3	50
	% του	62,0%	20,0%	12,0%	6,0%	100,0%
	Θετική Έκφραση					
Σύνολο	% του	73,8%	30,3%	18,2%	9,1%	35,5%
	μοριακού υποτύπου					
	Συχνότητα	42	33	33	33	141
	% του	29,8%	23,4%	23,4%	23,4%	100,0%
Σύνολο	% του	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	μοριακού υποτύπου					

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό

Γράφημα 2. Έκφραση του δείκτη CD146 στον ιστό για τις ομάδες A, B, Γ, Δ. **P<0,001**



2.3.4.3. Έκφραση του δείκτη P53 στον ιστό των ασθενών σε σύγκριση με τις διαφορετικές ομάδες που προέκυψαν με βάση τον διαφορετικό ανοσοφαινότυπό τους.

Πίνακας 11α. Συχνότητα έκφρασης του δείκτη p53 στον ιστό για τις ομάδες A, B, Γ, Δ.

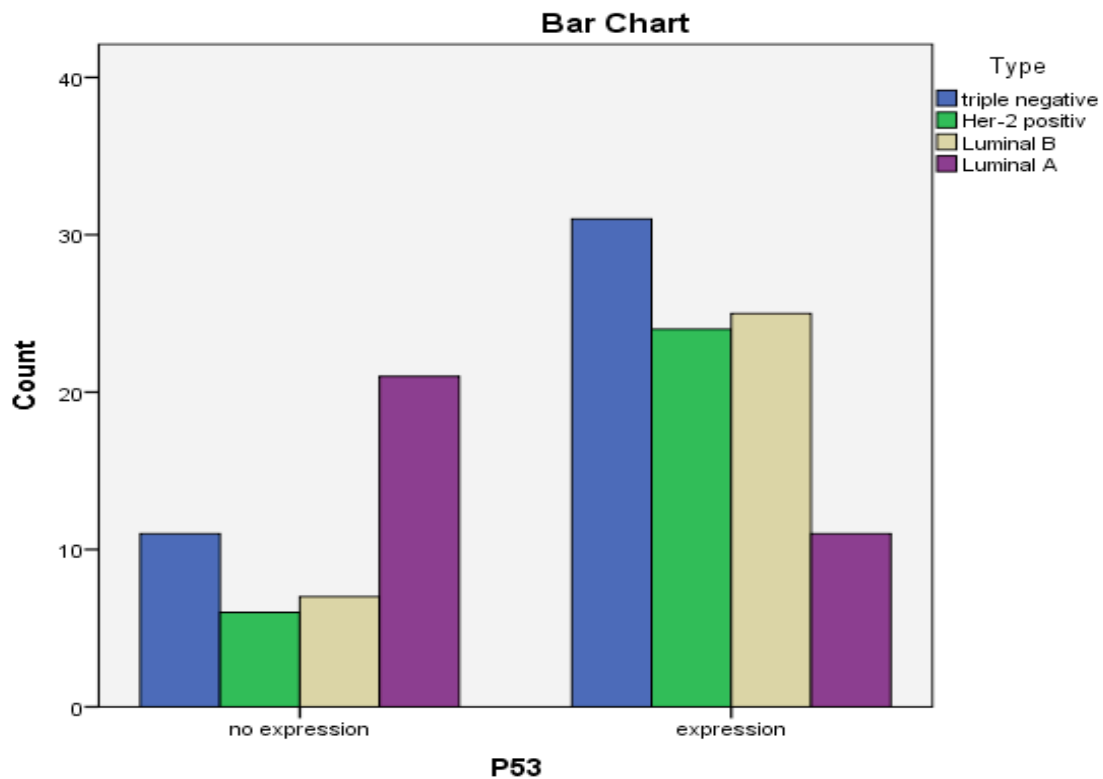
P53 / Μοριακός Υπότυπος P<0,001		Μοριακός Υπότυπος				Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός	HER-2+	Αυλικού τύπου Β	Αυλικού τύπου Α	
Έκφραση P53	Αρνητική	11	6	7	21	45
	Θετική	31	24	25	11	91
Σύνολο		42	30	32	32	136

Pearson's chi-square test, NS: Στατιστικά πολύ σημαντικό.

Πίνακας 11. Συχνότητα έκφρασης του δείκτη p53 σε ποσοστά στον ιστό για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ.

P53 / Μοριακός Υπότυπος		Μοριακός Υπότυπος				Σύνολο
P<0,001		Τριπλά αρνητικός	Her-2+	Αυλικού τύπου Β	Αυλικού τύπου Α	
P53	Συχνότητα	11	6	7	21	45
	Αρνητική					
	% του P53	24,4%	13,3%	15,6%	46,7%	100,0%
	Έκφραση					
	% του	26,2%	20,0%	21,9%	65,6%	33,1%
	υποτύπου					
P53	Συχνότητα	31	24	25	11	91
	Θετική					
	% του P53	34,1%	26,4%	27,5%	12,1%	100,0%
	Έκφραση					
P53	% του	73,8%	80,0%	78,1%	34,4%	66,9%
	υποτύπου					
Σύνολο	Συχνότητα	42	30	32	32	136
	% του P53	30,9%	22,1%	23,5%	23,5%	100,0%
	% του	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	υποτύπου					

Γράφημα 3. Έκφραση του δείκτη P53 στον ιστό για τις ομάδες Α, Β, Γ, Δ.
P<0,001



2.3.4.4. Έκφραση της νεστίνης στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο σε σύγκριση με τους ασθενείς με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.

Το γεγονός πως δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα έκφρασης της νεστίνης στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με μοριακό προφίλ βασικού τύπου είναι απόλυτα κατανοητό, καθώς η νεστίνη εκφράζεται σχεδόν το ίδιο και στις δυο αυτές επιθετικές ομάδες στον καρκίνο του μαστού (Πίνακας 12, Γράφημα 4)

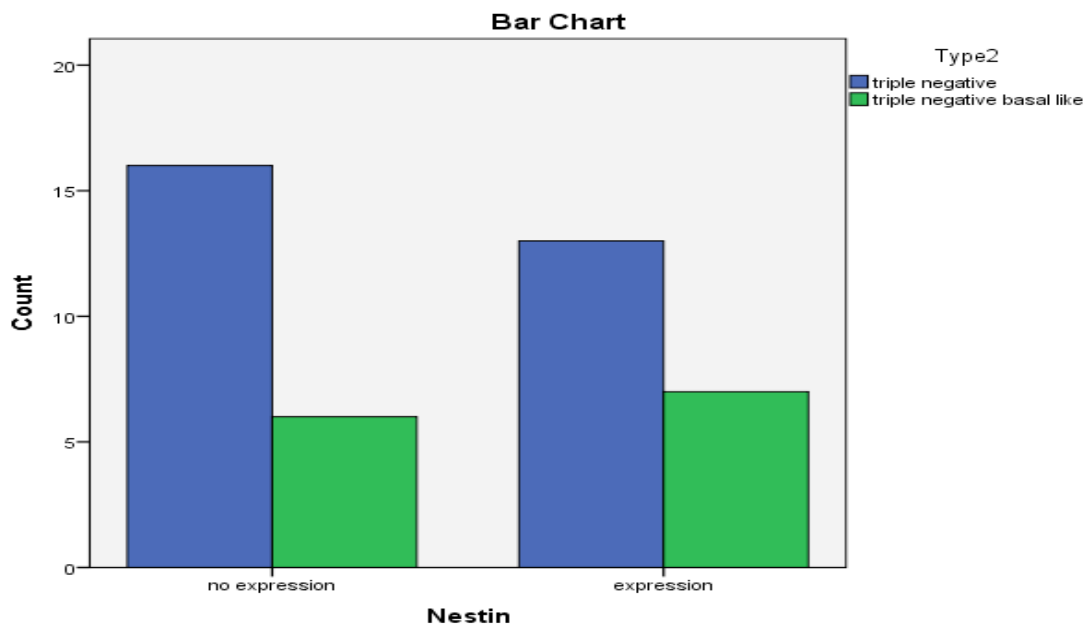
Σημειώνεται πως ΤΑ: Τριπλά αρνητικός ΒΤ: Βασικού τύπου

Πίνακας 12. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.

Νεστίνη σε τριπλά αρνητικούς όγκους / Νεστίνη σε βασικού τύπου όγκους. p=0,741		Μοριακός Υπότυπος		Σύνολο	
		Τριπλά αρνητικός	Βασικού Τύπου		
Νεστίνη	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	16	6	22
		% της νεστίνης	72,7%	27,3%	100,0%
		% του υποτύπου	55,2%	46,2%	52,4%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	13	7	20
		% της νεστίνης	65,0%	35,0%	100,0%
		% του υποτύπου	44,8%	53,8%	47,6%
Σύνολο		Συχνότητα	29	13	42
		% της νεστίνης	69,0%	31,0%	100,0%
		% του υποτύπου	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's Exact Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 4. Έκφραση της νεστίνης στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με μοριακό προφίλ βασικού τύπου. P=0,741



2.3.4.5. Έκφραση του δείκτη CD146 στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο σε σύγκριση με βασικού τύπου μοριακό προφίλ.

Το γεγονός πως δεν βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα έκφρασης του CD146 στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με τους ασθενείς με μοριακό προφίλ βασικού τύπου είναι απόλυτα κατανοητό, καθώς ο CD146 εκφράζεται το ίδιο και στις δυο αυτές επιθετικές ομάδες στον καρκίνο του μαστού (Πίνακας 13, Γράφημα 5).

Πίνακας 13. Συχνότητα έκφρασης σε ποσοστά του CD146 στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.

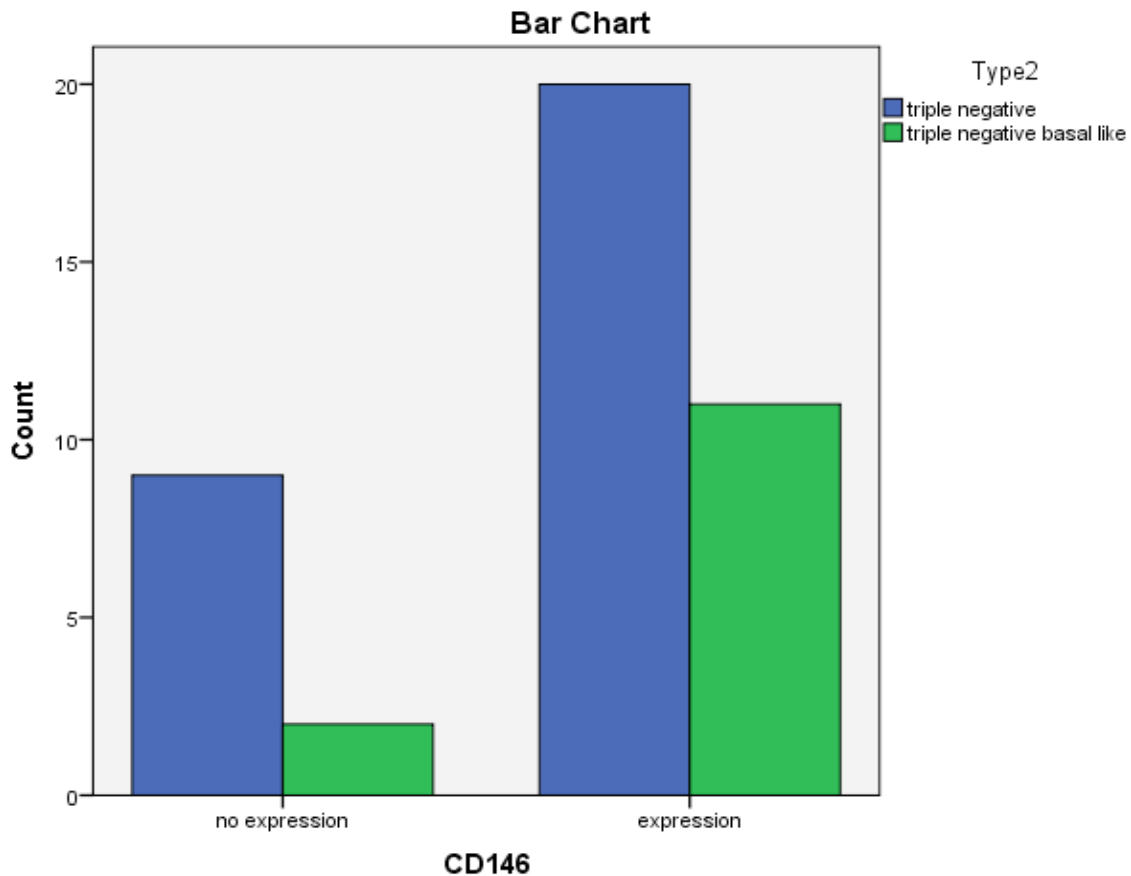
CD146 σε TA όγκους / CD146 σε BT όγκους. p=0,453		Μοριακός Υπότυπος (2)		Σύνολο
		Τριπλά αρνητικός	Βασικού τύπου	
CD146	Συχνότητα	9	2	11
	Αρνητική Έκφραση			
	% του CD146	81,8%	18,2%	100,0%
	% του υποτύπου	31,0%	15,4%	26,2%
	Θετική Έκφραση			
	Συχνότητα	20	11	31
Σύνολο	% του CD146	64,5%	35,5%	100,0%
	% του υποτύπου (2)	69,0%	84,6%	73,8%
	Συχνότητα	29	13	42
	% του CD146	69,0%	31,0%	100,0%
	% του υποτύπου (2)	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's Exact Test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Σημειώνεται πως TA: Τριπλά αρνητικός BT: Βασικού τύπου

Γράφημα 5. Έκφραση του CD146 στον ιστό ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο σε σύγκριση με μοριακό προφίλ βασικού τύπου.

P=0,453



2.3.4.6. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=137).

Τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στο ολικό δείγμα των ασθενών (Πίνακας 14, Γράφημα 6) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικότητα. Με άλλα λόγια δείχνει η νέστίνη να μην σχετίζεται στατιστικά τόσο με την ταξινόμηση κατά TNM όσο με την μοριακή ταξινόμηση στα ολικά αποτελέσματά μας.

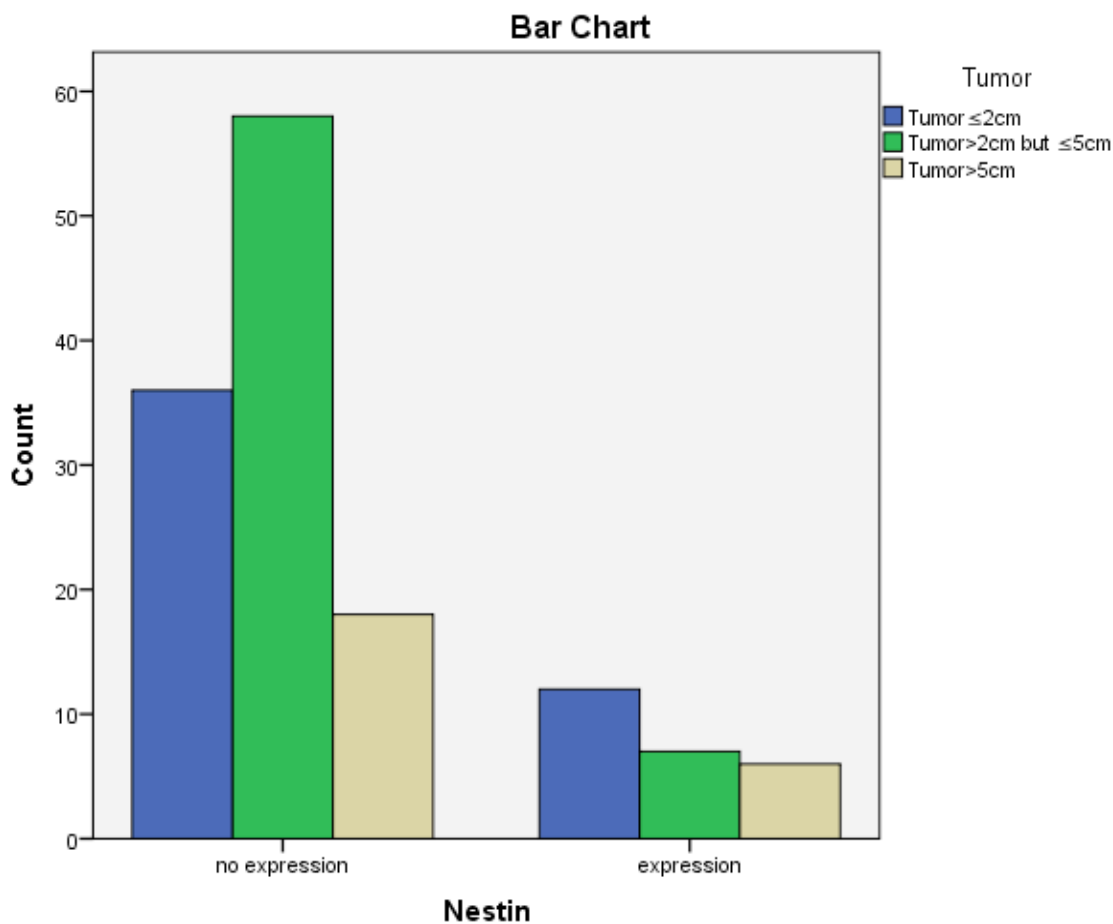
Πίνακας 14. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με το μέγεθος του όγκου.

Νεστίνη / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο
		Όγκος ≤2cm	Όγκος >2cm αλλά ≤5cm	Όγκος >5cm	
P=0,098					
Νεστίνη	Συχνότητα	36	58	18	112
	% της Αρνητική Έκφραση νεστίνης	32,1%	51,8%	16,1%	100,0%
	% στον όγκο	75,0%	89,2%	75,0%	81,8%
	Συχνότητα	12	7	6	25
	% της Θετική Έκφραση νεστίνης	48,0%	28,0%	24,0%	100,0%
	% στον όγκο	25,0%	10,8%	25,0%	18,2%
	Συχνότητα	48	65	24	137
	% της νεστίνης	35,0%	47,4%	17,5%	100,0%
Σύνολο	% στον όγκο	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Γράφημα 6. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου.

P=0,098



2.3.4.7. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου.

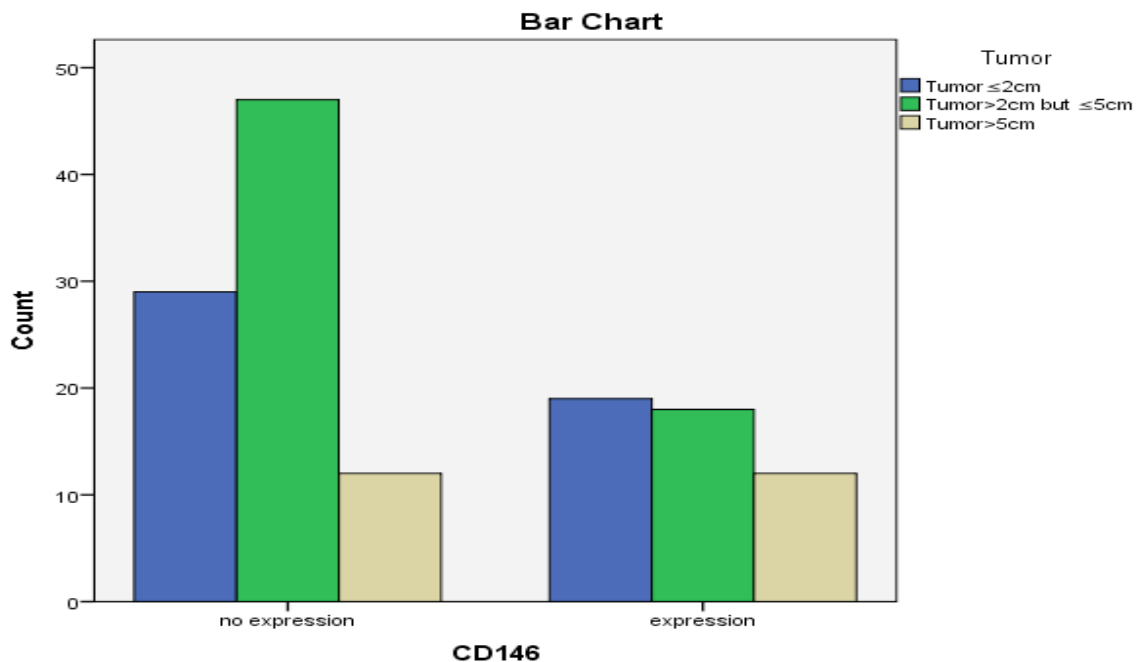
Τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στο ολικό δείγμα των ασθενών (Πίνακας 15, Γράφημα 7) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικότητα. Με άλλα λόγια δείχνει η νέστίνη να μην σχετίζεται στατιστικά τόσο με την ταξινόμηση κατά TNM όσο με την μοριακή ταξινόμηση στα ολικά αποτελέσματά μας.

Πίνακας 15. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά σε σχέση με το μέγεθος του όγκου.

CD146 / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο	
		Μέγεθος όγκου ≤2cm	Μέγεθος όγκου >2cm και ≤5cm	Μέγεθος όγκου >5cm		
P=0,119						
CD146	Αρνητική Έκφραση	Συχνότητα	29	47	12	88
		% του CD146	33,0%	53,4%	13,6%	100,0%
		% του όγκου	60,4%	72,3%	50,0%	64,2%
	Θετική Έκφραση	Συχνότητα	19	18	12	49
		% του CD146	38,8%	36,7%	24,5%	100,0%
		% του όγκου	39,6%	27,7%	50,0%	35,8%
Σύνολο		Συχνότητα	48	65	24	137
		% του CD146	35,0%	47,4%	17,5%	100,0%
		% του όγκου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square, NS: Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα .7 Έκφραση του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του όγκου. P=0,119



2.3.4.8. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση.

Τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση στο ολικό δείγμα των ασθενών (Πίνακας 15, Γράφημα 8) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικότητα. Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμών ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

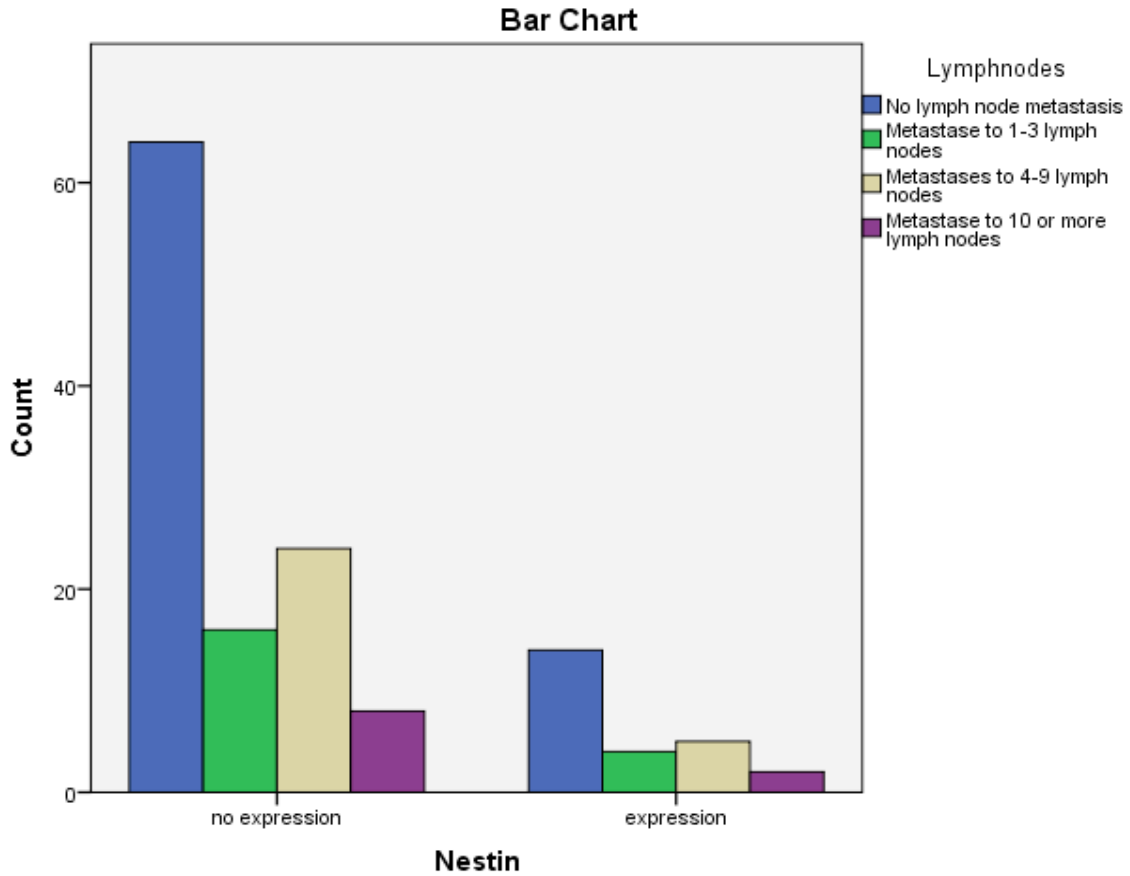
Πίνακας 15. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

Νεστίνη /Λεμφαδενική Διήθηση		Λεμφαδενική Διήθηση				Σύνολο
		Καθόλου λεμφαδενικές μεταστάσεις	Μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες	Μεταστάσεις σε 4-9 λεμφαδένες	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους λεμφαδένες	
P=0,993						
Νεστίνη	Συχνότητα	64	16	24	8	112
	% της νεστίνης	57,1%	14,3%	21,4%	7,1%	100,0%
	% των λεμφαδένων	82,1%	80,0%	82,8%	80,0%	81,8%
	Συχνότητα	14	4	5	2	25
	% της νεστίνης	56,0%	16,0%	20,0%	8,0%	100,0%
	% των λεμφαδένων	17,9%	20,0%	17,2%	20,0%	18,2%
	Συχνότητα	78	20	29	10	137
	% της νεστίνης	56,9%	14,6%	21,2%	7,3%	100,0%
Σύνολο	% των λεμφαδένων	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's exact Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 8. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

P=0,993



2.3.4.9. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση.

Τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση στο ολικό δείγμα των ασθενών (Πίνακας 16, Γράφημα 9) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικότητα.

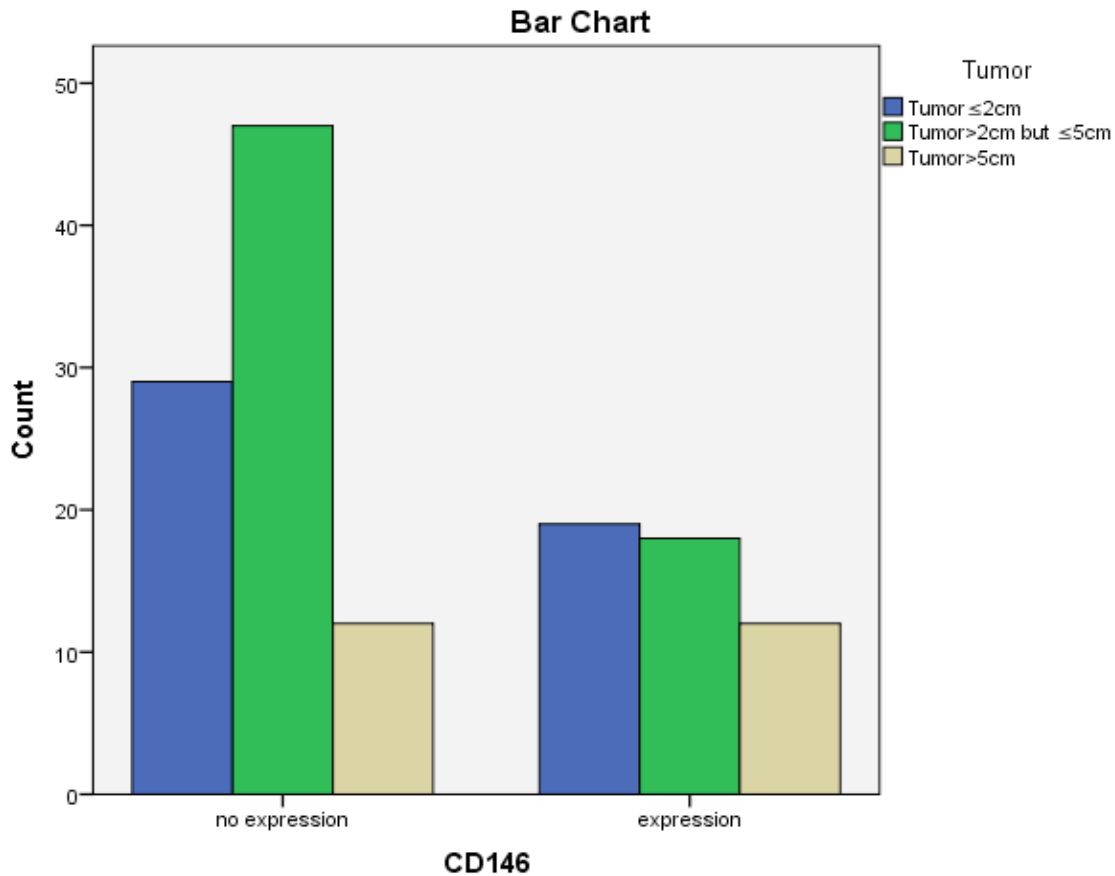
Πίνακας 16. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση

CD146 / Λεμφαδενική Διήθηση		Λεμφαδενική Διήθηση				Σύνολο
P=0,262		Καθόλου λεμφαδενικές μεταστάσεις	Μεταστάσεις 1-3 λεμφαδένες	Μεταστάσεις 4-9 λεμφαδένες	Μεταστάσεις 10 ή περισσότερες λεμφαδένες	
CD146 ⁶	Συχνότητα	54	14	15	5	88
	Αρνητική έκφραση % του CD146	61,4%	15,9%	17,0%	5,7%	100,0%
	έκφραση % των λεμφαδένων	69,2%	70,0%	51,7%	50,0%	64,2%
	Συχνότητα	24	6	14	5	49
	Θετική έκφραση % του CD146	49,0%	12,2%	28,6%	10,2%	100,0%
	έκφραση % των λεμφαδένων	30,8%	30,0%	48,3%	50,0%	35,8%
Σύνολο	Συχνότητα	78	20	29	10	137
	% του CD146	56,9%	14,6%	21,2%	7,3%	100,0%
	% των λεμφαδένων	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 9. Έκφραση του CD146 σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

P=0,262



2.3.4.10. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=136).

Τα αποτελέσματά μας που αφορούν στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών (Πίνακας 17, Γράφημα 10) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικότητα. Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης σε ασθενείς με διαφορετικό στάδιο νόσου υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμών ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

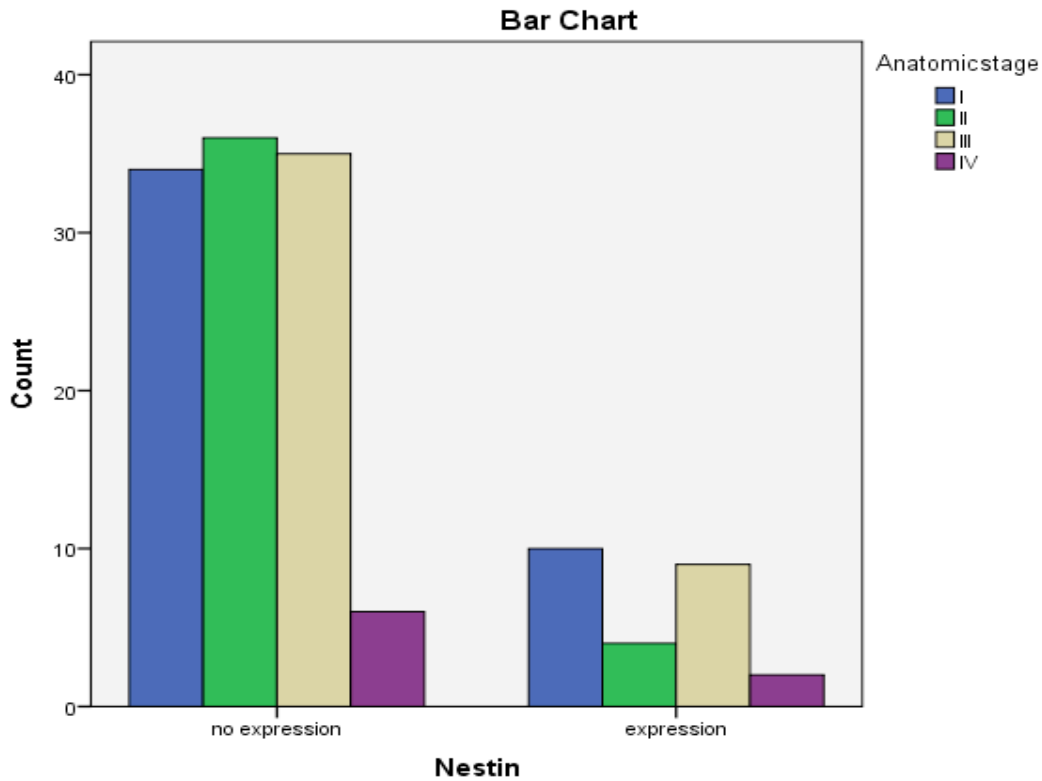
Πίνακας 17. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με το στάδιο νόσου.

Νεστίνη / Στάδιο Νόσου (AJCC)		Στάδιο Νόσου (AJCC)				Σύνολο ο
P=0,426		I	II	III	IV	
Νεστίνη	Συχνότητα	34	36	35	6	111
	Αρνητική % της νεστίνης	30,6%	32,4%	31,5%	5,4%	100,0%
	Έκφραση % του σταδίου νόσου	77,3%	90,0%	79,5%	75,0%	81,6%
	Συχνότητα	10	4	9	2	25
	Θετική % της νεστίνης	40,0%	16,0%	36,0%	8,0%	100,0%
	Έκφραση % του σταδίου νόσου	22,7%	10,0%	20,5%	25,0%	18,4%
Σύνολο	Συχνότητα	44	40	44	8	136
	% της νεστίνης	32,4%	29,4%	32,4%	5,9%	100,0%
	% του σταδίου νόσου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's Exact Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Γράφημα 10. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου.

P=0,426



2.3.4.11. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=136).

Τα παρακάτω αποτελέσματα δείχνουν πως 16/44 περιπτώσεις ασθενών (ποσοστό 36,4%) με στάδιο νόσου stage I εκφράζουν τον δείκτη CD146, 7/40 ασθενείς (ποσοστό 17,5%) με στάδιο νόσου stage II εκφράζουν τον δείκτη CD146, 19/44 ασθενείς (ποσοστό 43,2%) με στάδιο νόσου stage III εκφράζουν τον δείκτη CD146 και 6/8 ασθενείς (ποσοστό 75%) με στάδιο νόσου stage IV εκφράζουν τον δείκτη CD146. Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας είναι **P=0,006** επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του πειράματός μας, δηλαδή ότι ο δείκτης CD146 εκφράζεται σε ασθενείς με υψηλό στάδιο νόσου, στάδιο στο οποίο εκδηλώνεται μεγαλύτερη επιθετικότητα του καρκινώματος (Πίνακας 18α και 18β, Γράφημα 11).

Πίνακας 18^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου.

CD146 / Στάδιο Νόσου (AJCC)		Στάδιο Νόσου (AJCC)				Total
		I	II	III	IV	
p=0,006						
CD146 expression	No	28	33	25	2	88
	Yes	16	7	19	6	48
Total		44	40	44	8	136

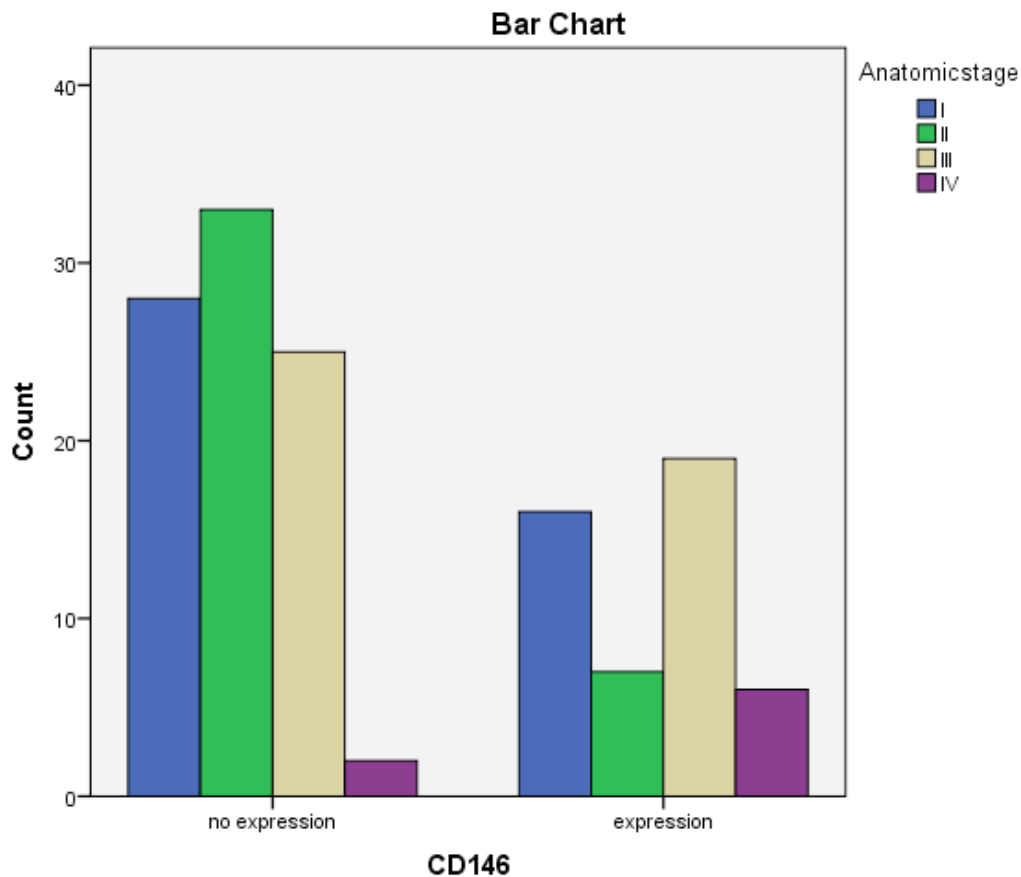
Pearson's chi-square Test. Στατιστικά σημαντικό

Πίνακας 18^β. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά σε σχέση με το στάδιο νόσου.

CD146 / Στάδιο Νόσου (AJCC)		Στάδιο Νόσου (AJCC)				Σύνολο	
p=0,006		I	II	III	IV		
CD146	Συχνότητα	28	33	25	2	88	
	Αρνητική έκφραση	% του CD146	31,8%	37,5%	28,4%	2,3%	100,0%
	% του σταδίου νόσου	63,6%	82,5%	56,8%	25,0%	64,7%	
	Συχνότητα	16	7	19	6	48	
	Θετική έκφραση	% του CD146	33,3%	14,6%	39,6%	12,5%	100,0%
	% του σταδίου νόσου	36,4%	17,5%	43,2%	75,0%	35,3%	
Σύνολο	Συχνότητα	44	40	44	8	136	
	% του CD146	32,4%	29,4%	32,4%	5,9%	100,0%	
	% του σταδίου νόσου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Γράφημα 11. Έκφραση του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου.

P=0,006



2.3.4.12. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=134).

Από τα παρακάτω αποτελέσματα φαίνεται πως η νεστίνη εκφράζεται σε ποσοστό 80% (20/25 περιπτώσεις ασθενών) με Grade III ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και σε ποσοστό 20% (5/25 περιπτώσεις ασθενών) με Grade II και I ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας είναι $P=0,021$ επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του πειράματός μας, δηλαδή ότι η νεστίνη εκφράζεται σε καρκινώματα με υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (χαμηλή διαφοροποίηση), τα οποία αποτελούν και τα πιο επιθετικά καρκινώματα (Πίνακας 19α και 19β, Γράφημα 12).

Πίνακας 19^α. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

Νεστίνη / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας. p=0,021		Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.		Σύνολο
		Υψηλή και Μέση διαφοροποίηση	Χαμηλή διαφοροποίηση	
Έκφραση νεστίνης	Αρνητική	48	61	109
	Θετική	5	20	25
Σύνολο		53	81	134

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά σημαντικό.

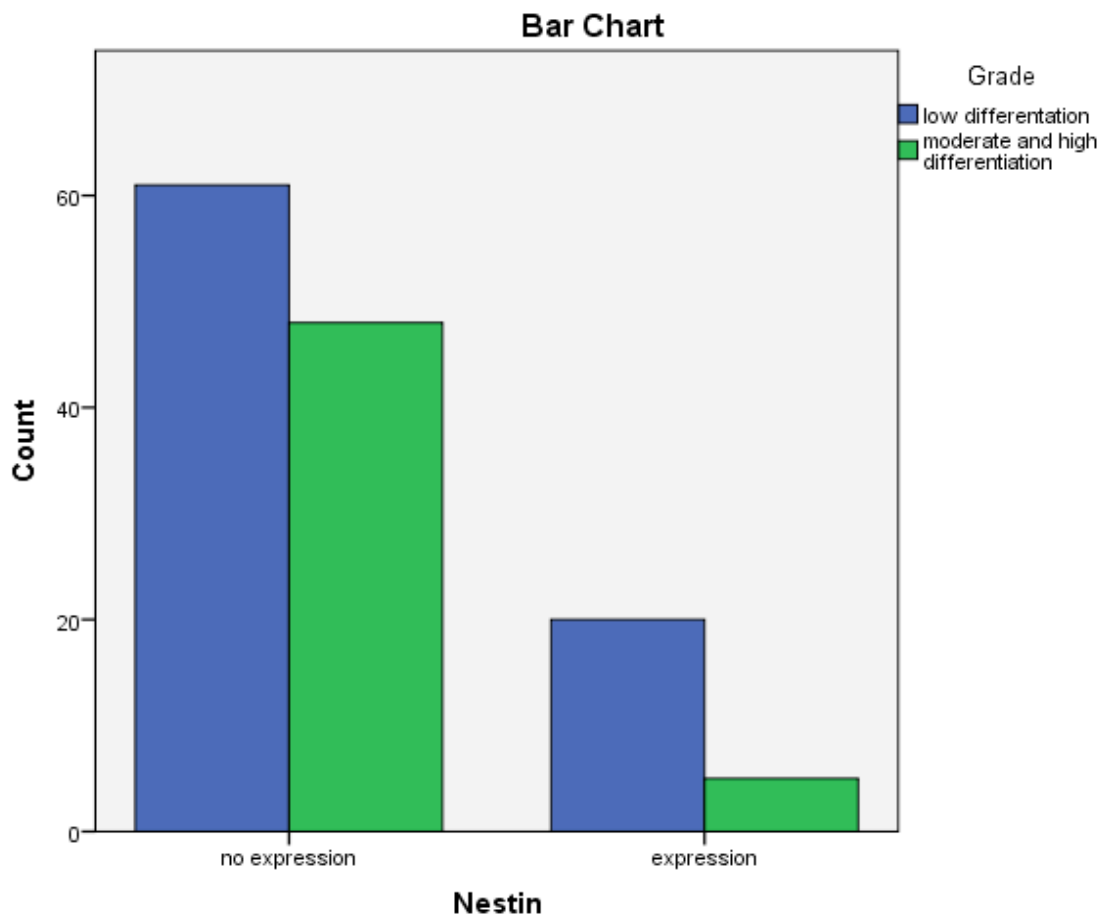
Πίνακας 19^β. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

Νεστίνη / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας. P=0,021			Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας		Σύνολο
			Χαμηλή Διαφοροποίηση	Μέση και Υψηλή Διαφοροποίηση	
Νεστί-νη	Αρνητική Έκφραση	Συχνότητα	61	48	109
		% της νεστίνης	56,0%	44,0%	100,0%
		% του Grade	75,3%	90,6%	81,3%
	Θετική Έκφραση	Συχνότητα	20	5	25
		% της νεστίνης	80,0%	20,0%	100,0%
		% του Grade	24,7%	9,4%	18,7%
Σύνολο	Συχνότητα	81	53	134	
	% της νεστίνης	60,4%	39,6%	100,0%	
	% του Grade	100,0%	100,0%	100,0%	

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά σημαντικό.

Γράφημα 12. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

P=0,021



2.3.4.13. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=134).

Από τα παρακάτω αποτελέσματα φαίνεται πως ο CD146 εκφράζεται σε ποσοστό 75% (36/48 περιπτώσεις ασθενών) με Grade III ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και σε ποσοστό 25% (12/48 περιπτώσεις ασθενών) με Grade II και I ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας είναι **P=0,008** επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση του πειράματός μας, δηλαδή ότι ο CD146 εκφράζεται σε καρκινώματα με υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (χαμηλή διαφοροποίηση), τα οποία αποτελούν και τα πιο επιθετικά καρκινώματα (Πίνακας 20α και 20β).

Πίνακας 20^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

CD146 / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας. p=0,008		Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.		Σύνολο
		Υψηλή και Μέση διαφοροποίηση	Χαμηλή διαφοροποίηση	
Έκφραση CD146	Αρνητική	41	45	86
	Θετική	12	36	48
Σύνολο		53	81	134

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά σημαντικό.

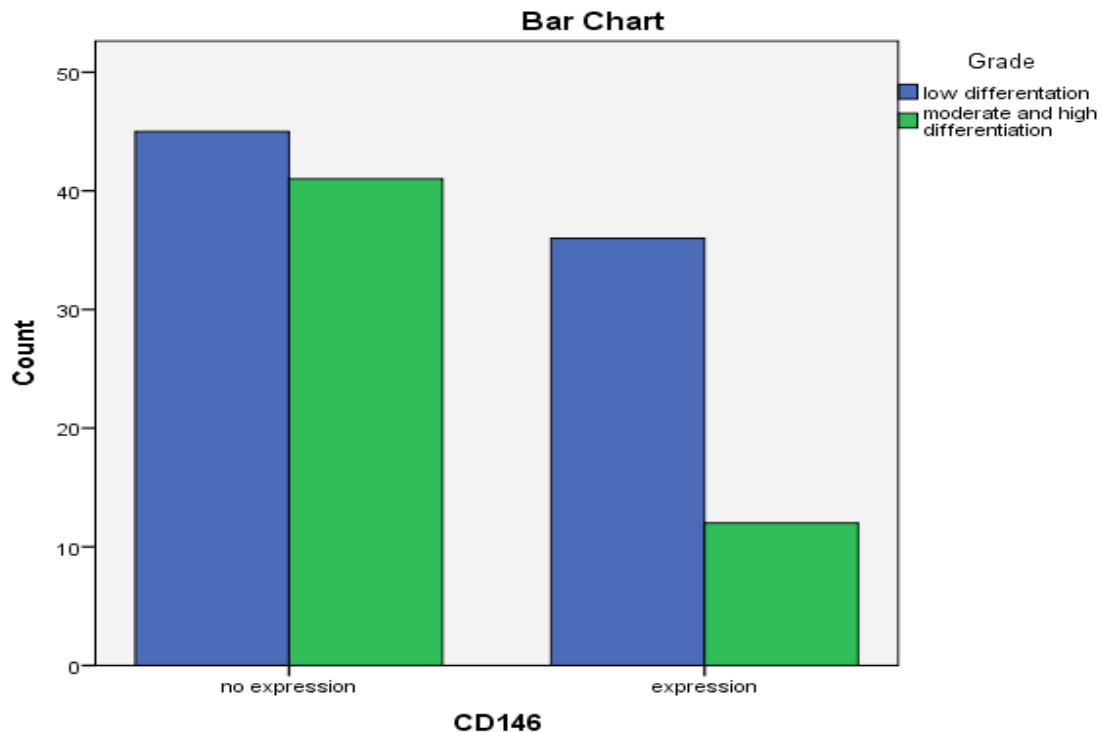
Πίνακας 20^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

CD146 / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας. P=0,008		Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας		Σύνολο	
		Χαμηλή Διαφοροποίηση	Μέση και Υψηλή Διαφοροποίηση		
CD146	Αρνητική Έκφραση	Συχνότητα	45	41	86
		% του CD146	52,3%	47,7%	100,0%
		% του Grade	55,6%	77,4%	64,2%
	Θετική Έκφραση	Συχνότητα	36	12	48
		% του CD146	75,0%	25,0%	100,0%
		% του Grade	44,4%	22,6%	35,8%
Σύνολο		Συχνότητα	81	53	134
		% του CD146	60,4%	39,6%	100,0%
		% του Grade	100,0%	100,0%	100,0%

Pearson's chi-square Test. Στατιστικά σημαντικό.

Γράφημα 13. Έκφραση του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

P=0,008



2.3.4.14. Μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).

Όπως καθίσταται φανερό και από τον παρακάτω πίνακα, η μέση ηλικία των ασθενών που εκφράζουν νεστίνη ήταν τα 54 έτη ενώ αντίστοιχα η ηλικία των ασθενών που δεν εκφράζουν νεστίνη ήταν περίπου τα 64 έτη. Η κατανομή του δείγματος ήταν ομοιόμορφη και γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε το t-test για να ελεγχθεί αν η διαφορά στη μέση τιμή της ηλικίας ανάμεσα στις δύο ομάδες ήταν στατιστικά σημαντική. Το $p=0,029$ υποδηλώνει ότι η νεστίνη εκφράζεται σε νεότερους ασθενείς (μέση ηλικία 54 έτη) σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, δηλαδή σε ασθενείς με μικρότερη ηλικία σε σχέση με το ολικό δείγμα (Μέση ηλικία ολικού δείγματος 62: έτη, Εύρος 29 έτη - 95 έτη). Απο τα παραπάνω γεννιέται και το ερώτημα κατά πόσο η νεστίνη θα μπορούσε να υποδείξει νόσο από καρκίνο του μαστού σε ασθενείς με μικρότερη ηλικία. Φυσικά αυτό θα πρέπει σε κάθε

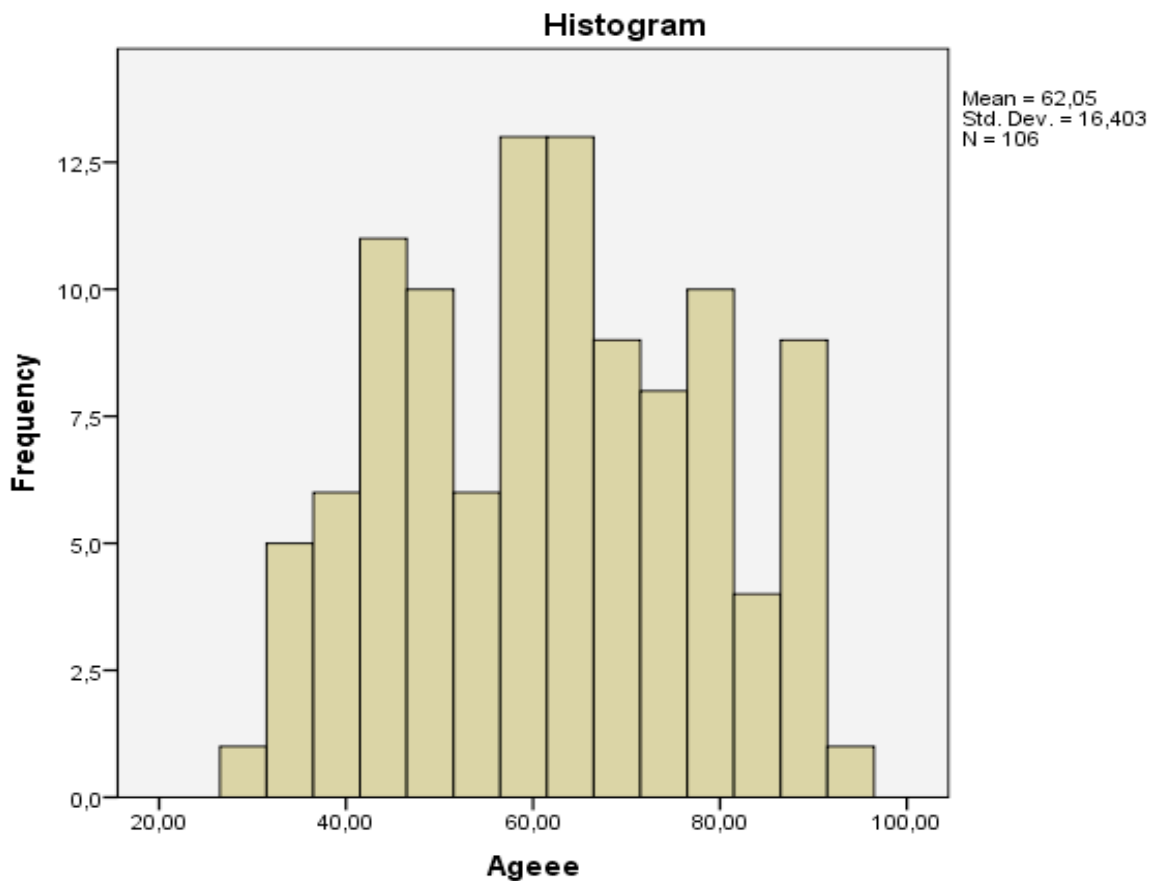
περίπτωση να επιβεβαιωθεί σε μελέτες με πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (Πίνακας 21, Γράφημα 14, Διάγραμμα 1).

Πίνακας 21. Μέση ηλικία έκφρασης της νεστίνης στο ολικό δείγμα ασθενών.

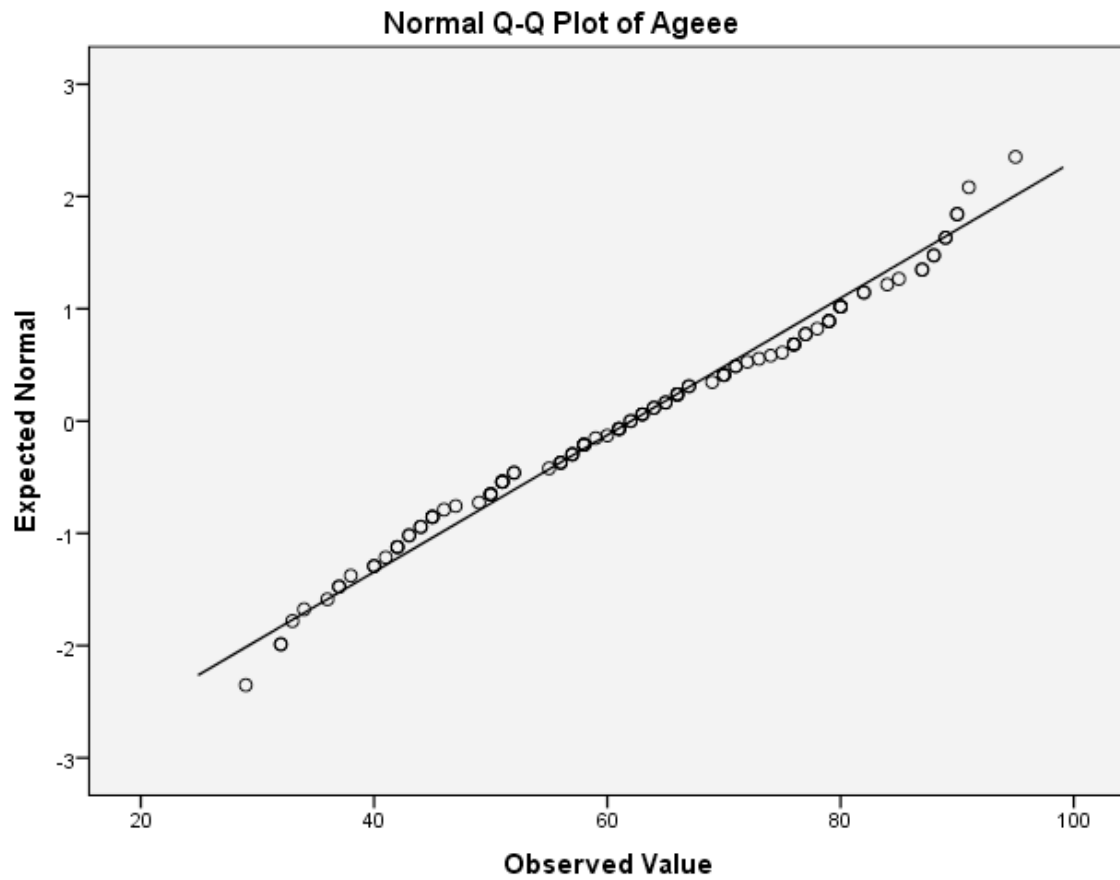
Νεστίνη	N	Μέση Ηλικία
p=0,029		
Αρνητική έκφραση	88	63,6136
Θετική έκφραση	18	54,3889

T-Test. Στατιστικά σημαντικό

Γράφημα 14: Ιστόγραμμα κατανομής της ηλικίας των ασθενών στο ολικό δείγμα.



Διάγραμμα 1: Ελέγχος της ομοιόμορφης κατανομής του ολικού δείγματος.



Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Age	,067	106	,200*	,978	106	,069

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

2.3.4.15. Μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).

Όπως καθίσταται φανερό και από τον πίνακα 22, Ο CD146 δεν εκφράζεται σε μέση ηλικία ασθενών τα 64 έτη, ενώ εκφράζεται σε επίπεδο μη στατιστικά σημαντικό σε ασθενείς με μέση ηλικία τα 59 έτη.

Πίνακας 22. Μέση ηλικία έκφρασης του CD146 στο ολικό δείγμα ασθενών.

CD146 P=0,170	N	Μέση Ηλικία
Αρνητική έκφραση	69	63,65
Θετική έκφραση	37	59,05

T-Test. Στατιστικά μη σημαντικό

2.3.4.16. Μελέτη της έκφρασης του p53 σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106).

Όπως καθίσταται φανερό και από τον πίνακα 23, ο p53 δεν εκφράζεται σε μέση ηλικία ασθενών τα 59 έτη, ενώ εκφράζεται σε επίπεδο μη στατιστικά σημαντικό σε ασθενείς με μέση ηλικία τα 64 έτη

Πίνακας 23. Μέση ηλικία έκφρασης του p53 στο ολικό δείγμα ασθενών.

P53 P=0,222	N	Μέση Ηλικία
Αρνητική έκφραση	36	59,36
Θετική έκφραση	68	63,54

T-Test. Στατιστικά μη σημαντικό

2.3.4.17. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρουσιάζουν ότι σε ολικό δείγμα 135 ασθενών οι 19/25 περιπτώσεις ασθενών (ποσοστό 76%) που εκφράζουν νεστίνη έχουν δείκτη Ki-67 > 20%. Αντίθετα οι 50/110 (ποσοστό 45,5%) που δεν εκφράζουν νεστίνη είχαν τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 >20%. Συγκρίνοντας αυτά τα δύο ποσοστά, δηλαδή τα 76% με το 45,5% συμπεραίνουμε πως οι ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη έχουν στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα με δείκτη Ki-67 >20%, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας **P=0,007** (Πίνακας 24α και 24β, Γράφημα 15).

Πίνακας 24^α. Συχνότητα της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

Νεστίνη / Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67		Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67		Σύνολο
		Ki67≤20%	Ki67>20%	
Έκφραση νεστίνης	Αρνητική	60	50	110
	Θετική	6	19	25
Σύνολο		66	69	135

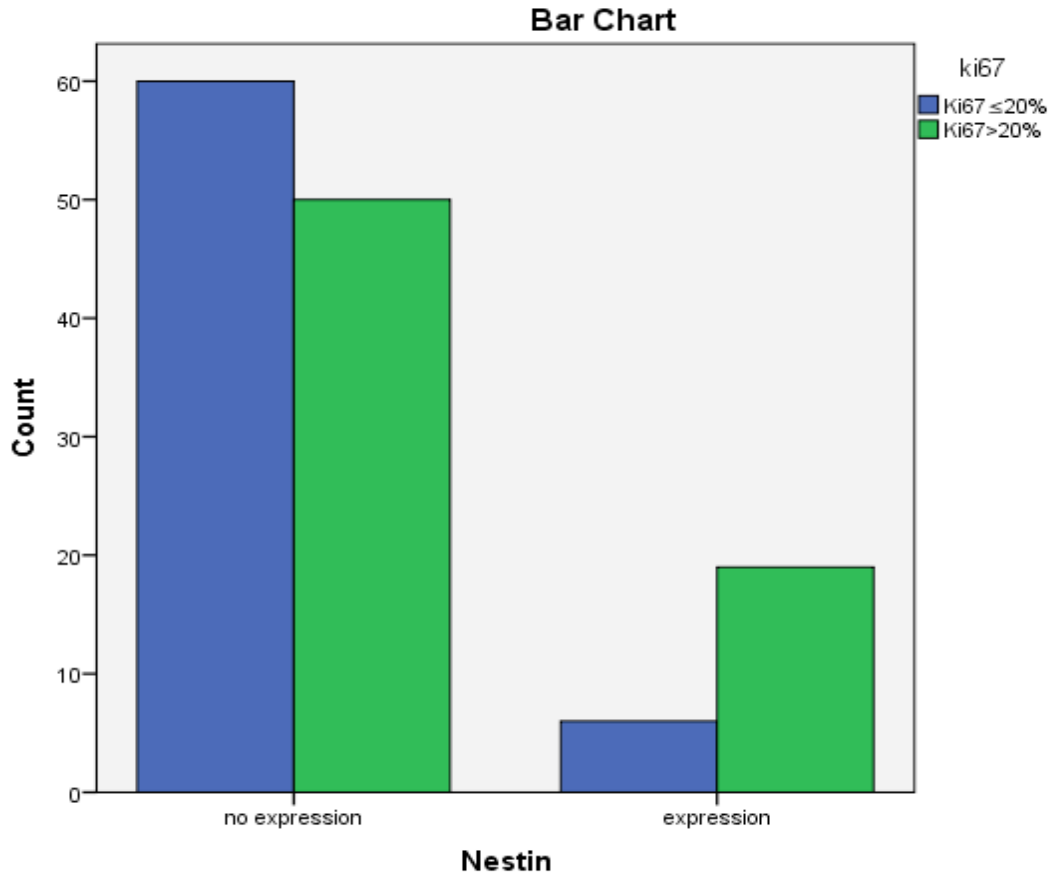
P=0,007

Fisher's Exact Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό.

Πίνακας 24^β. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

Νεστίνη / Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 P=0,007		Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67		Σύνολο	
		Ki67≤20%	Ki67>20%		
Νεστίνη	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	60	50	110
		% της νεστίνης	54,5%	45,5%	100,0%
		% του ki67	90,9%	72,5%	81,5%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	6	19	25
		% της νεστίνης	24,0%	76,0%	100,0%
		% του ki67	9,1%	27,5%	18,5%
Σύνολο		Συχνότητα	66	69	135
		% της νεστίνης	48,9%	51,1%	100,0%
		% του ki67	100,0%	100,0%	100,0%

Γράφημα 15. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. **P=0,007**



2.3.4.18. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του δείκτη CD146 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).

Τα παρακάτω αποτελέσματα παρουσιάζουν πως σε ολικό δείγμα 135 ασθενών οι 36/49 περιπτώσεις ασθενών (ποσοστό 73,5%) που εκφράζουν CD146 έχουν δείκτη Ki-67 > 20%. Αντίθετα οι 33/86 (ποσοστό 38,4%) που δεν εκφράζουν CD146 είχαν τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 >20%. Συγκρίνοντας αυτά τα δύο ποσοστά, δηλαδή τα 76% με το 45,5% συμπεραίνουμε πως οι ασθενείς που εκφράζουν CD146 έχουν στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα με δείκτη Ki-67 >20%, με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $P<0,001$ (Γράφημα 16, Πίνακας 25^α, 25^β).

Πίνακας 25^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

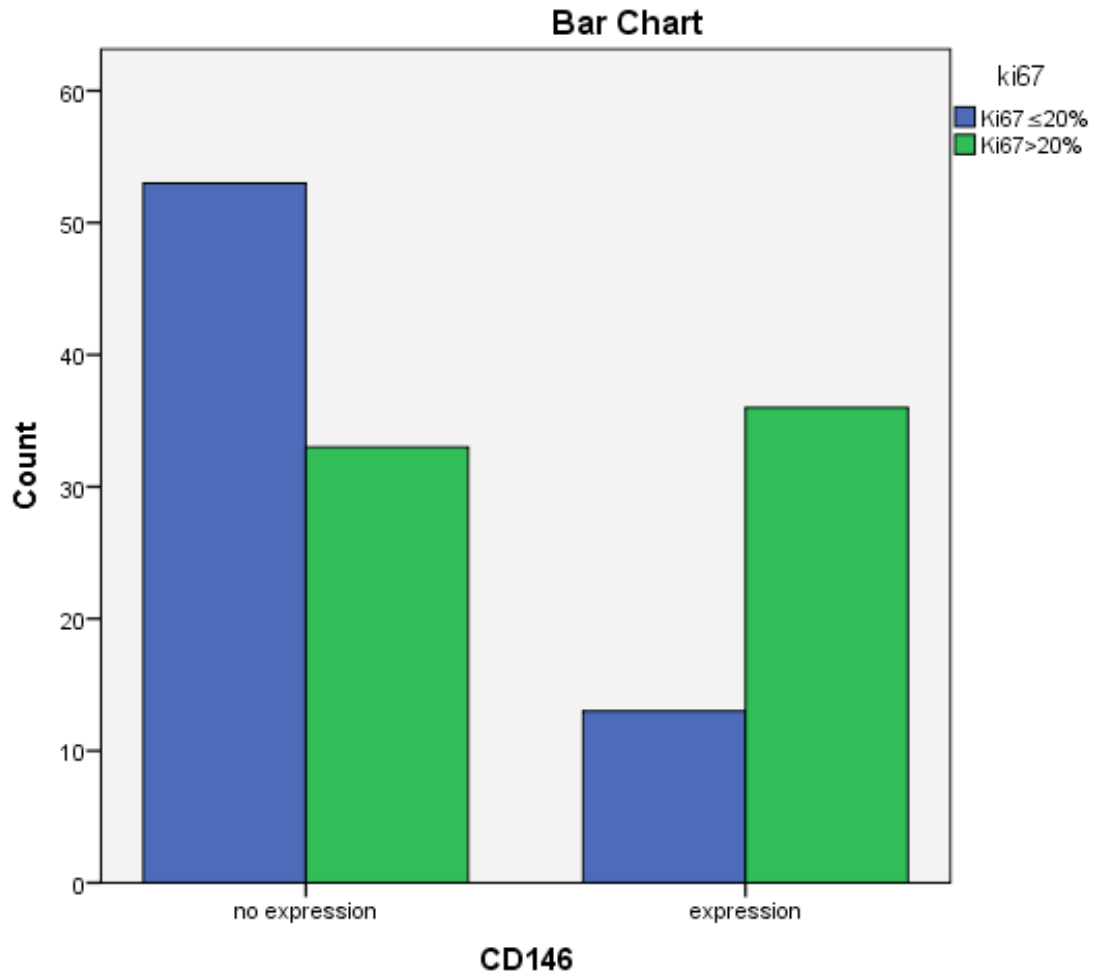
CD146 / Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 P<0,001		Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67		Σύνολο
		Ki67≤20%	Ki67>20%	
Έκφραση CD146	Αρνητική	53	33	86
	Θετική	13	36	49
Σύνολο		66	69	135

Fisher's Exact Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό.

Πίνακας 25^β. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

CD146 / Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 p<0,001		Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67		Σύνολο	
		Ki67≤20%	Ki67>20%		
CD146	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	53	33	86
		% του CD146	61,6%	38,4%	100,0%
		% του ki67	80,3%	47,8%	63,7%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	13	36	49
		% του CD146	26,5%	73,5%	100,0%
		% του ki67	19,7%	52,2%	36,3%
Σύνολο		Συχνότητα	66	69	135
		% του CD146	48,9%	51,1%	100,0%
		% του ki67	100,0%	100,0%	100,0%

Γράφημα 16. Έκφραση του CD146 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. **P<0,001**



2.3.4.19. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του δείκτη p53 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών (N=135).

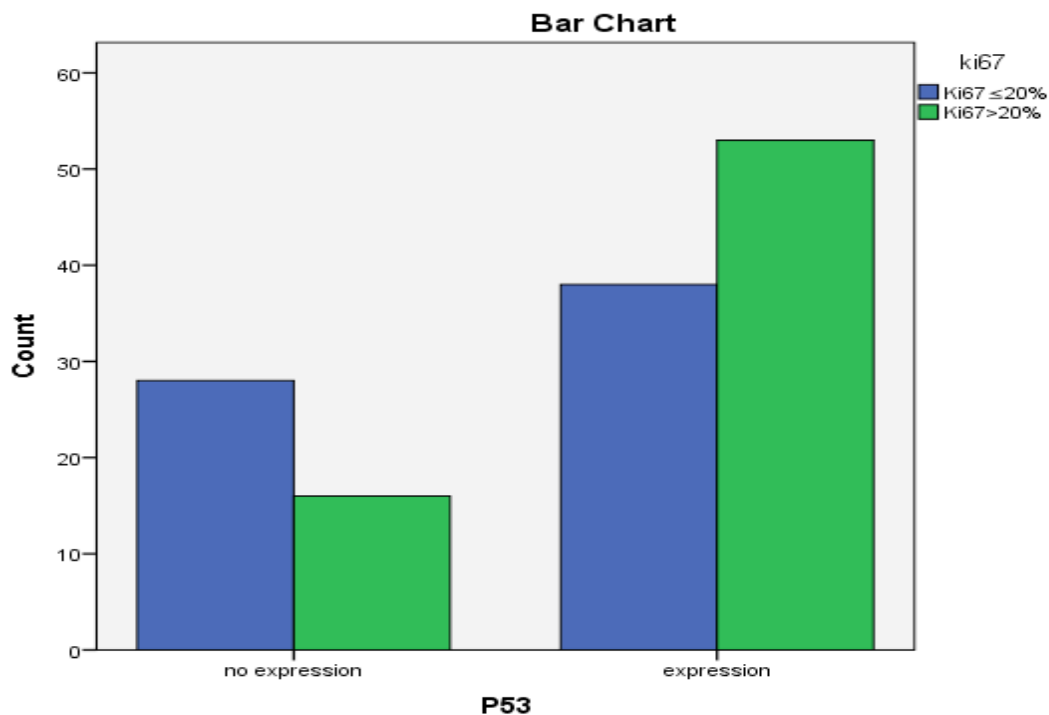
Πίνακας 26. Έκφραση του p53 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

P53 / Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67. P=0,027		Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.		Σύνολο
		Ki67≤20%	Ki67>20%	
Έκφραση p53	Αρνητική	28	16	44
	Θετική	38	53	91
Σύνολο		66	69	135

Fisher's exact Test. Στατιστικά πολύ σημαντικό.

Γράφημα 17. Έκφραση του p53 σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.

P=0,027



2.3.5. Αποτελέσματα στο δείγμα των ασθενών με τον τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).

2.3.5.1. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).

Από τους πίνακες 27α και 27β (Βλέπε και Γράφημα 18) φαίνεται ότι στους τριπλά αρνητικά καρκίνους η νεστίνη εκφράζεται σε υψηλότερο ποσοστό σε ασθενείς με το μεγαλύτερο μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου, δηλαδή $T>5\text{cm}$ σε ποσοστό 66,7% με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p=0,035$. Σε ασθενείς με μέγεθος όγκου $>2\text{cm}$ αλλά $\leq 5\text{cm}$ η νεστίνη εκφράζεται σε ποσοστό 23,5% και σε ασθενείς με μέγεθος όγκου $\leq 2\text{cm}$ σε ποσοστό 62,5%. Το τελευταίο εύρημα για όγκους pT1 θα έπρεπε να έχει την μικρότερη τιμή, καθώς η νεστίνη αναμένεται σε αυτούς τους όγκους να εκφράζεται στην χαμηλότερη τιμή συγκριτικά με τους pT2 και τους pT3 όγκους. Το παραπάνω σφάλμα πιθανώς να οφείλεται στο σχετικά μικρό δείγμα των ασθενών μας $N=42$, γιατί προκύπτει και ως περιορισμός στο πείραμά μας.

Πίνακας 27^α. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά υπότυπο.

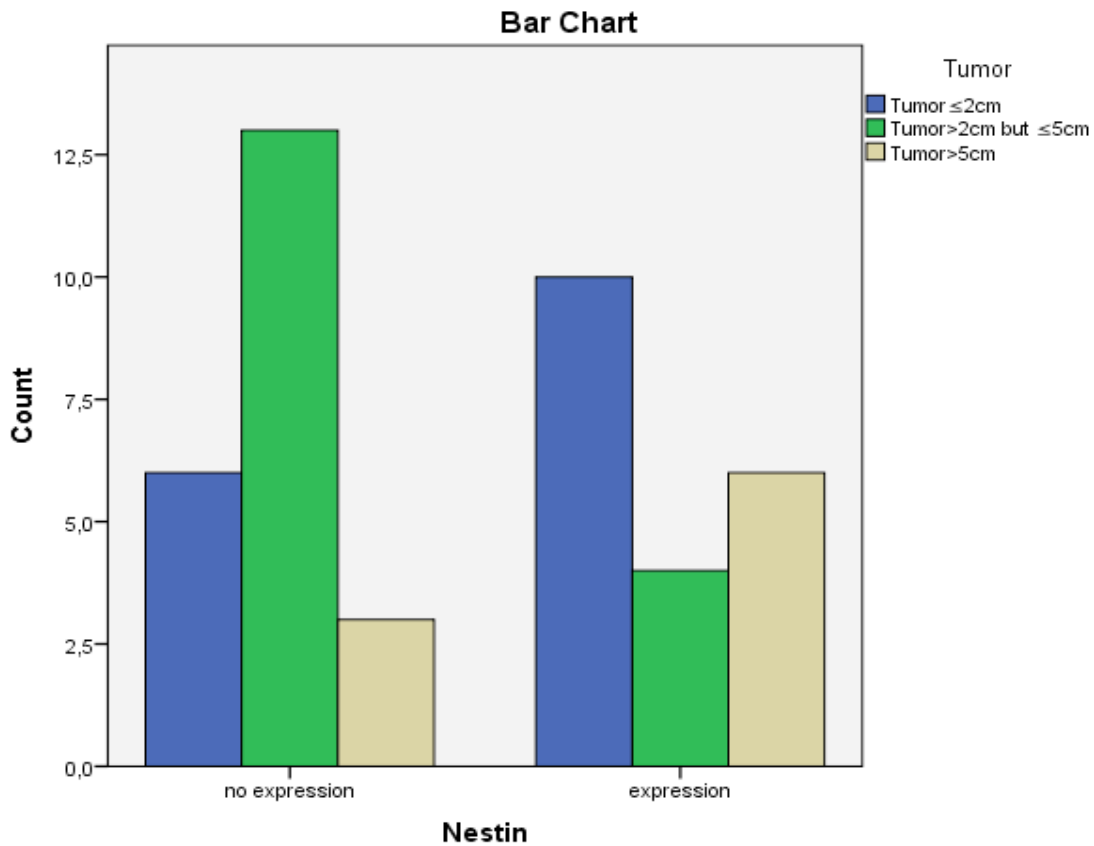
Νεστίνη / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο
P=0,035		Όγκος $\leq 2\text{cm}$	Όγκος $>2\text{cm}$ και $\leq 5\text{cm}$	Όγκος $>5\text{cm}$	
Έκφραση νεστίνης	Αρνητική	6	13	3	22
	Θετική	10	4	6	20
Σύνολο		16	17	9	42

Fisher's exact Test. Στατιστικά σημαντικό

Πίνακας 27^β. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά υπότυπο.

Νεστίνη / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο
P=0,035		Όγκος ≤2cm	Όγκος >2cm και ≤5cm	Όγκος >5cm	
Νεστίνη	Συχνότητα	6	13	3	22
	Αρνητική έκφραση				
	% της νεστίνης	27,3%	59,1%	13,6%	100,0%
	% του όγκου	37,5%	76,5%	33,3%	52,4%
	Συχνότητα	10	4	6	20
	Θετική έκφραση				
	% της νεστίνης	50,0%	20,0%	30,0%	100,0%
	% του όγκου	62,5%	23,5%	66,7%	47,6%
Σύνολο	Συχνότητα	16	17	9	42
	% της νεστίνης	38,1%	40,5%	21,4%	100,0%
	% του όγκου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Γράφημα 18. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά ανοσοφαινότυπο. **P=0,035**



2.3.5.2. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (N=42).

Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 28, Γράφημα 19). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης σε ασθενείς με διαφορετική λεμφαδενική διήθηση υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμού ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

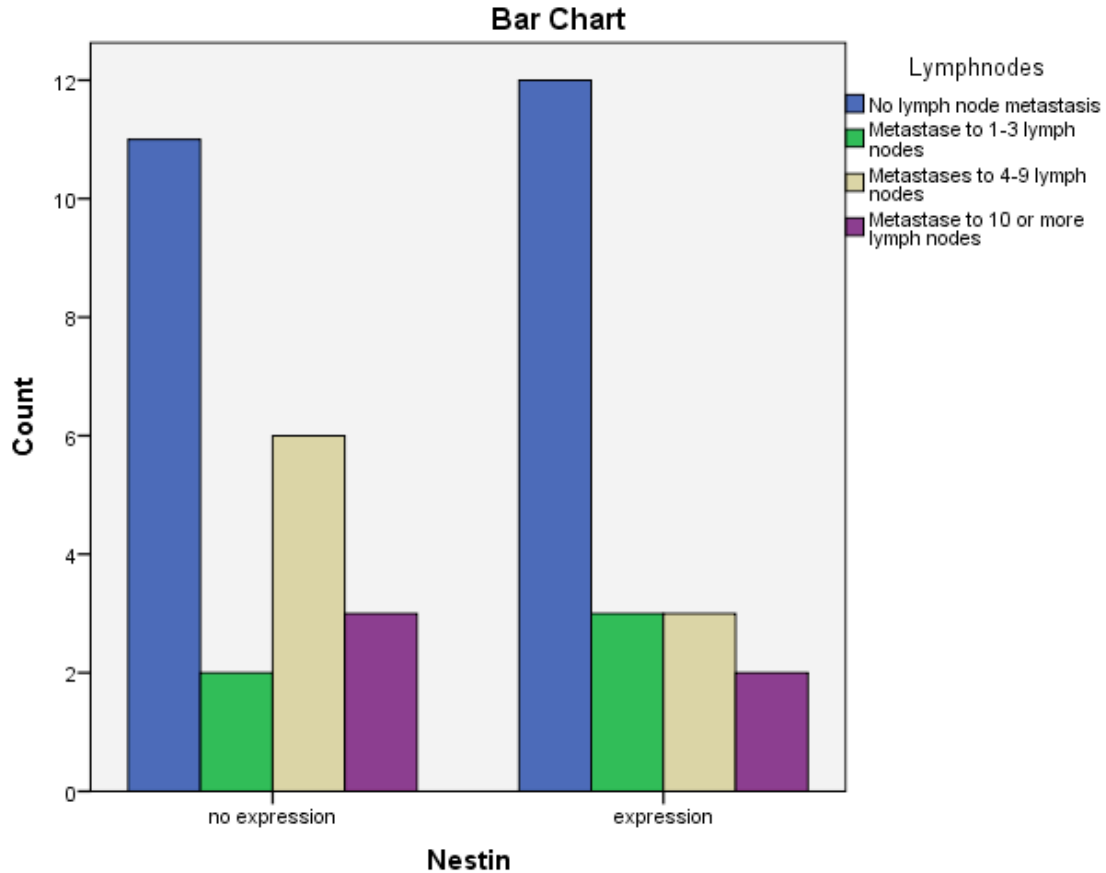
Πίνακας 28. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

Νεστίνη / Λεμφαδενική Διήθηση		Λεμφαδενική Διήθηση				Σύνολο
		Καθόλου λεμφαδενικές μεταστάσεις	Μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένους	Μεταστάσεις σε 4-9 λεμφαδένους	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους λεμφαδένους	
P=0,717						
Νεστί-νη	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα 11	2	6	3	22
	% της νεστίνης	50,0%	9,1%	27,3%	13,6%	100,0%
	% των λεμφαδένων	47,8%	40,0%	66,7%	60,0%	52,4%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα 12	3	3	2	20
	% της νεστίνης	60,0%	15,0%	15,0%	10,0%	100,0%
	% των λεμφαδένων	52,2%	60,0%	33,3%	40,0%	47,6%
Σύνολο	Συχνότητα	23	5	9	5	42
	% της νεστίνης	54,8%	11,9%	21,4%	11,9%	100,0%
	% των λεμφαδένων	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's exact Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 19. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

P=0,717



2.3.5.3. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας σε δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).

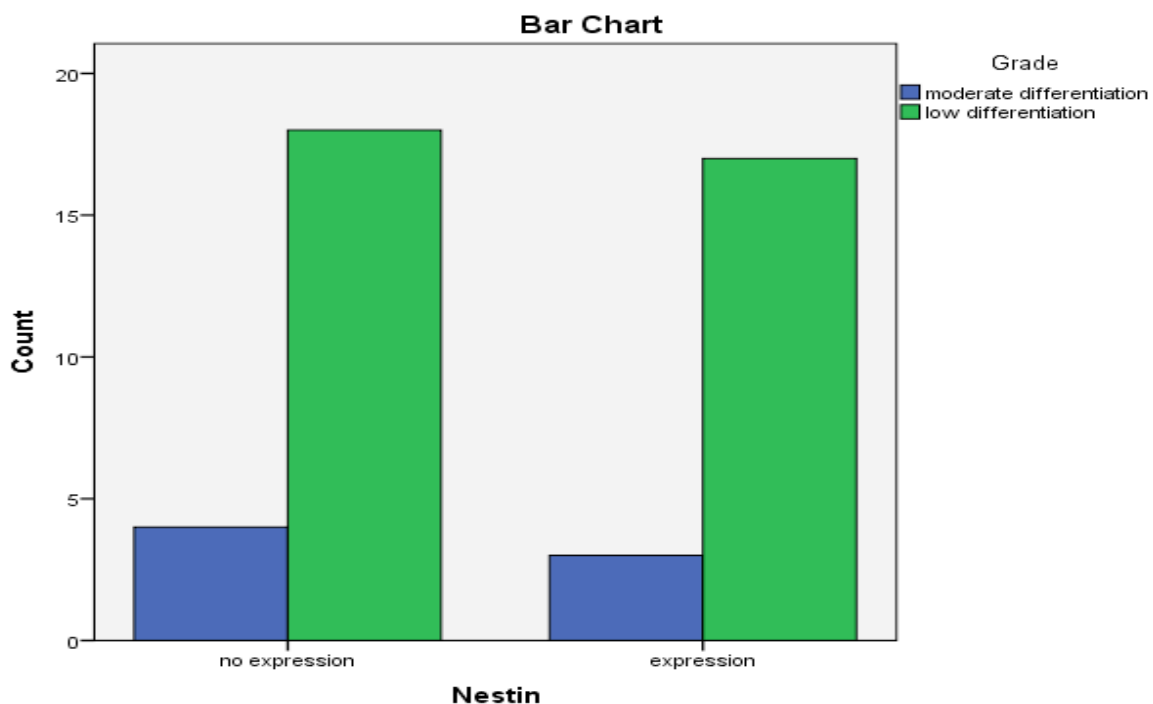
Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 29, Γράφημα 20). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης σε ασθενείς με διαφορετικό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμού ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Πίνακας 29. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας

Νεστίνη / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας. P=0,782		Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.		Σύνολο	
		Μέση διαφοροποίηση	Χαμηλή διαφοροποίηση		
Νεστίνη	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	4	18	22
		% της νεστίνης	18,2%	81,8%	100,0%
		% του Grade	57,1%	51,4%	52,4%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	3	17	20
		% της νεστίνης	15,0%	85,0%	100,0%
		% του Grade	42,9%	48,6%	47,6%
Σύνολο		Συχνότητα	7	35	42
		% της νεστίνης	16,7%	83,3%	100,0%
		% του Grade	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's Exact Test Test. Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 20. Έκφραση της νεστίνης σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό υπότυπο. P=0,782



2.3.5.4. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στο δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).

Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 30, Γράφημα 21). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης σε ασθενείς με διαφορετικό στάδιο νόσου υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμών ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

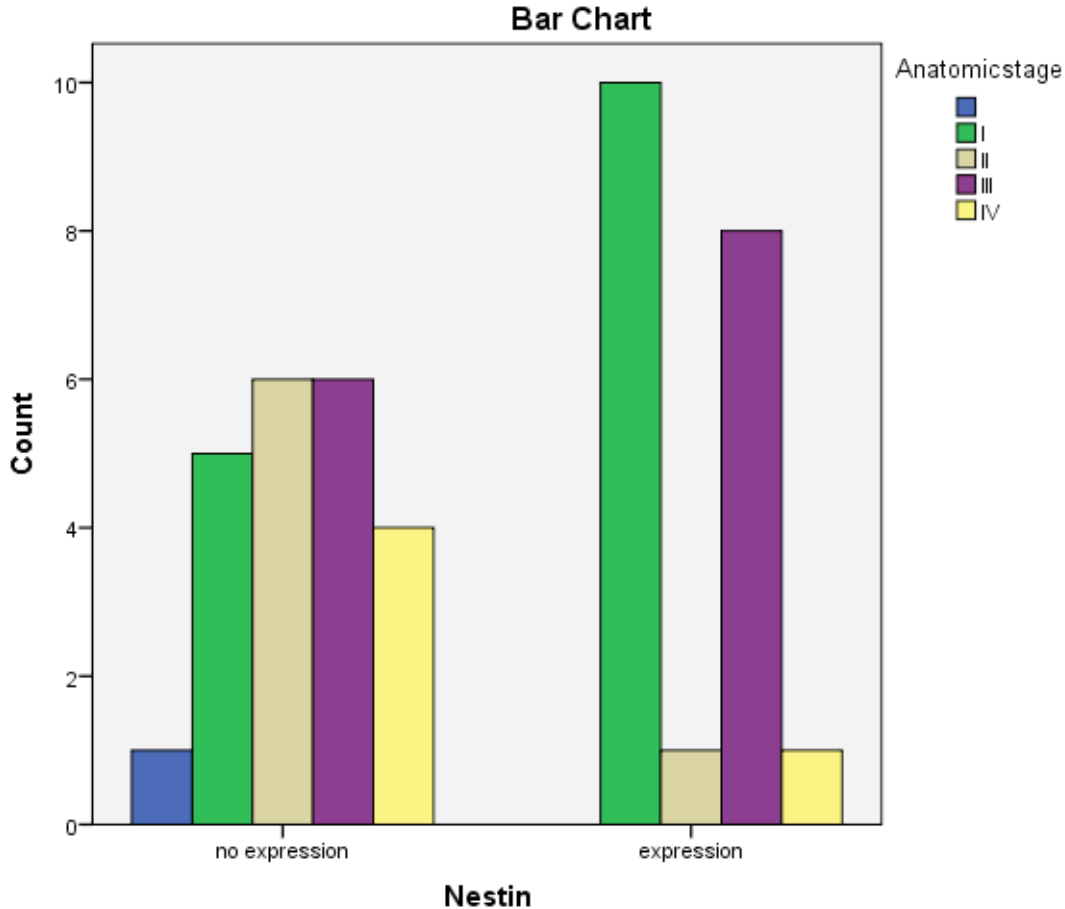
Πίνακας 30. Συχνότητα έκφρασης της νεστίνης σε ποσοστά σε σχέση με το στάδιο νόσου.

Νεστίνη / Στάδιο νόσου (AJCC)		Στάδιο νόσου (AJCC)					Σύνολο	
			I	II	III	IV		
P=0,083								
Νεστίνη	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	1	5	6	6	4	22
		% της νεστίνης	4,5%	22,7%	27,3%	27,3%	18,2%	100,0 %
		% του σταδίου νόσου	100,0%	33,3%	85,7%	42,9%	80,0%	52,4%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	0	10	1	8	1	20
		% της νεστίνης	0,0%	50,0%	5,0%	40,0%	5,0%	100,0 %
		% του σταδίου νόσου	0,0%	66,7%	14,3%	57,1%	20,0%	47,6%
Σύνολο		Συχνότητα	1	15	7	14	5	42
		% της νεστίνης	2,4%	35,7%	16,7%	33,3%	11,9%	100,0 %
		% του σταδίου νόσου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0 %

Fisher's exact Test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Γράφημα 21. Επίπεδα έκφρασης της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου.

P=0,083



2.3.5.5. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικά υπότυπο (N=42).

Από τους πίνακες 31α και 31β (Βλέπε και Γράφημα 22) φαίνεται ότι στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους ο CD146 εκφράζεται σε υψηλότερο ποσοστό σε ασθενείς με το μεγαλύτερο μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου, δηλαδή T>5cm σε ποσοστό 88,9% με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας **p=0,040**. Σε ασθενείς με μέγεθος όγκου >2cm αλλά ≤5cm η νεστίνη εκφράζεται σε ποσοστό 52,9% και σε ασθενείς με μέγεθος όγκου ≤2cm σε ποσοστό 87,5%. Το τελευταίο εύρημα για όγκους pT1 θα έπρεπε να έχει την μικρότερη τιμή, καθώς ο CD146 αναμένεται σε αυτούς τους όγκους να εκφράζεται στην χαμηλότερη τιμή συγκριτικά με τους pT2 και τους pT3 όγκους. Το παραπάνω σφάλμα

πιθανώς να οφείλεται στο σχετικά μικρό δείγμα των ασθενών μας N=42, γιατί προκύπτει και ως περιορισμός στο πείραμά μας.

Πίνακας 31^α. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά υπότυπο.

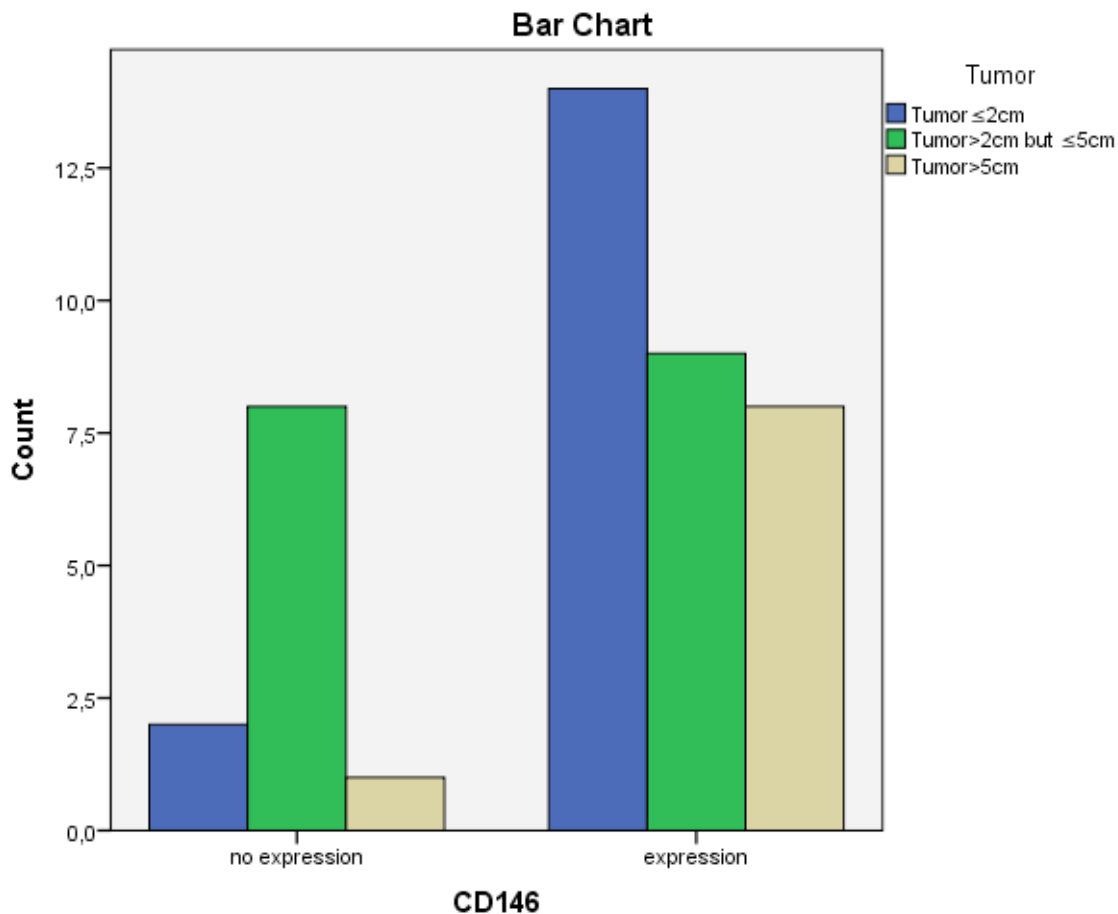
CD146 / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο
		Όγκος ≤2cm	Όγκος >2cm και ≤5cm	Όγκος >5cm	
P=0,040					
Έκφραση νεστίνης	Αρνητική	2	8	1	11
	Θετική	14	9	8	31
Σύνολο		16	17	9	42

Fisher's exact Test. Στατιστικά σημαντικό

Πίνακας 31^β. Συχνότητα έκφρασης του CD146 σε ποσοστά σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά υπότυπο.

CD146 / Μέγεθος όγκου		Μέγεθος όγκου			Σύνολο
		Όγκος ≤2cm	Όγκος >2cm και ≤5cm	Όγκος >5cm	
P=0,040					
CD146	Αρνητική Συχνότητα	2	8	1	11
	% του CD146	18,2%	72,7%	9,1%	100,0%
	% του όγκου	12,5%	47,1%	11,1%	26,2%
	Θετική Συχνότητα	14	9	8	31
	% του CD146	45,2%	29,0%	25,8%	100,0%
	% του όγκου	87,5%	52,9%	88,9%	73,8%
Σύνολο	Συχνότητα	16	17	9	42
	% του CD146	38,1%	40,5%	21,4%	100,0%
	% του όγκου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Γράφημα 22. Έκφραση του CD146 σε σχέση με το μέγεθος του όγκου σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά υπότυπο. **P=0,040**



2.3.5.6. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).

Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον λεμφαδενική διήθηση στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 32, Γράφημα 23). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση του CD146 σε ασθενείς με διαφορετική λεμφαδενική διήθηση υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμών ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

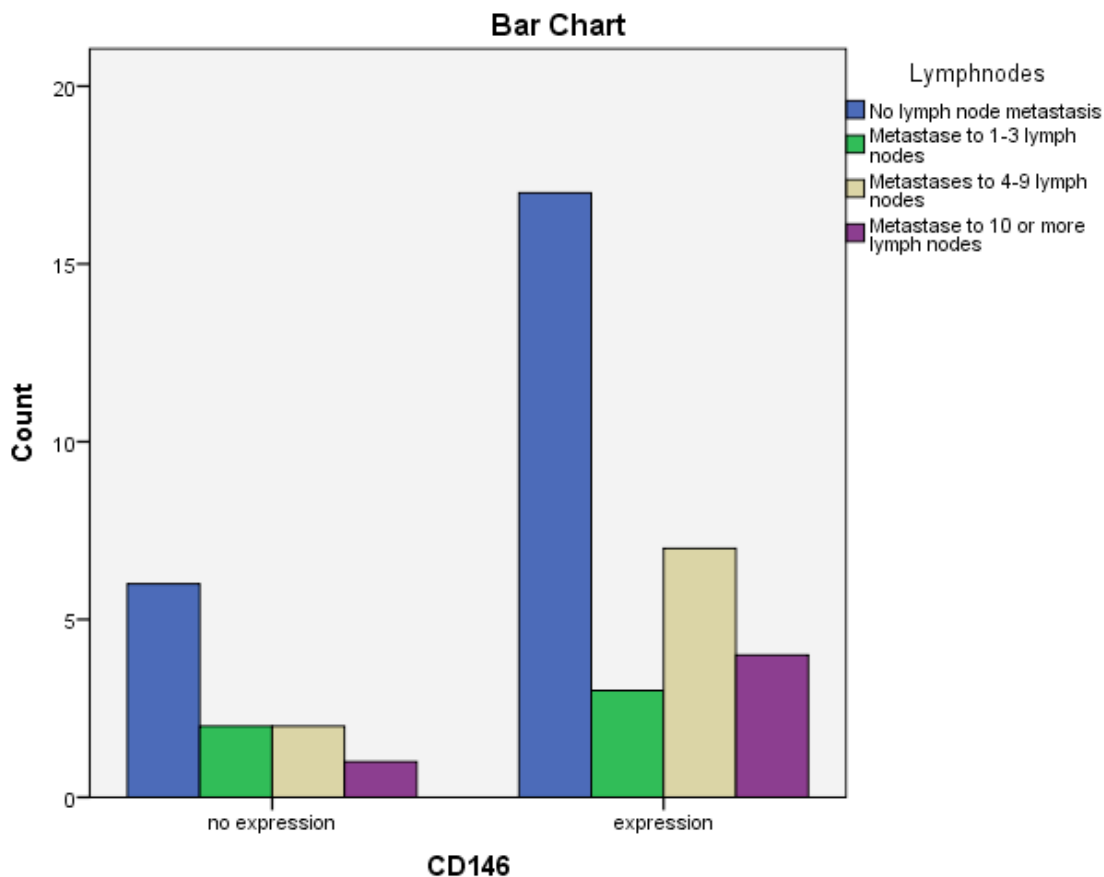
Πίνακας 32. Συχνότητα έκφρασης του C146 σε ποσοστά σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

CD146 / λεμφαδενική διήθηση		Λεμφαδενική διήθηση				Σύνολο- λο	
		Καθόλου λεμφαδενι- κές μεταστά- σεις	Μεταστά- σεις σε 1- 3 λεμφαδέ- νες	Μεταστά- σεις σε 4- 9 λεμφαδέ- νες	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότε- ρους λεμφαδένες		
P=0,881							
CD146	Αρνητι- κή έκφρα- ση	Συχνότητα	6	2	2	1	11
	% του CD146	54,5%	18,2%	18,2%	9,1%	100,0%	
	% των λεμφαδένων	26,1%	40,0%	22,2%	20,0%	26,2%	
	Θετική έκφρα- ση	Συχνότητα	17	3	7	4	31
	% του CD146	54,8%	9,7%	22,6%	12,9%	100,0%	
	% των λεμφαδένων	73,9%	60,0%	77,8%	80,0%	73,8%	
Σύνολο	Συχνότητα	23	5	9	5	42	
	% του CD146	54,8%	11,9%	21,4%	11,9%	100,0%	
	% των λεμφαδέ- νων	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Fisher's exact Test. NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Γράφημα 23. Επίπεδα έκφρασης του C146 σε σχέση με τη λεμφαδενική διήθηση.

P=0,881



2.3.5.7. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου στο δείγμα των ασθενών τριπλά αρνητικό υπότυπο (N=42).

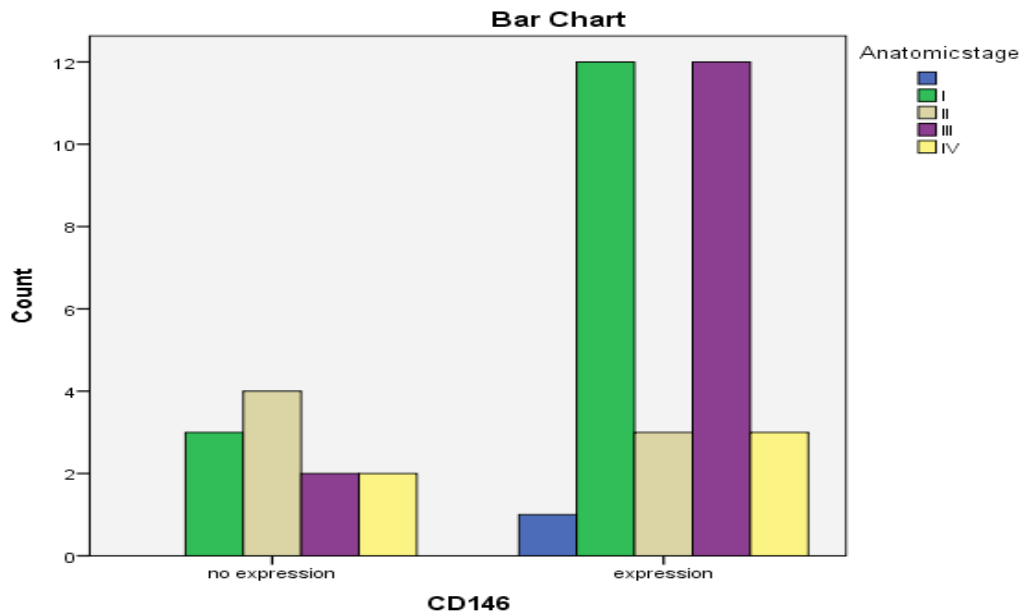
Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 33, Γράφημα 24). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση του CD146 σε ασθενείς με διαφορετικό στάδιο νόσου υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών.

Πίνακας 33. Ποσοστά έκφρασης του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου.

CD146 /Στάδιο νόσου (AJCC)			Στάδιο νόσου (AJCC)					Σύνολο
P=0,228				I	II	III	IV	
CD146	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	0	3	4	2	2	11
		% του CD146	0,0%	27,3%	36,4%	18,2%	18,2%	100,0%
		% του σταδίου νόσου	0,0%	20,0%	57,1%	14,3%	40,0%	26,2%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	1	12	3	12	3	31
		% του CD146	3,2%	38,7%	9,7%	38,7%	9,7%	100,0%
		% του σταδίου νόσου	100,0%	80,0%	42,9%	85,7%	60,0%	73,8%
Σύνολο	Συχνότητα	1	15	7	14	5	42	
	% του CD146	2,4%	35,7%	16,7%	33,3%	11,9%	100,0%	
	% του σταδίου νόσου	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Fisher's exact Test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Γράφημα 24. Έκφραση του CD146 σε σχέση με το στάδιο νόσου. P=0,228



2.3.5.8. Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας σε δείγμα των ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (N=42).

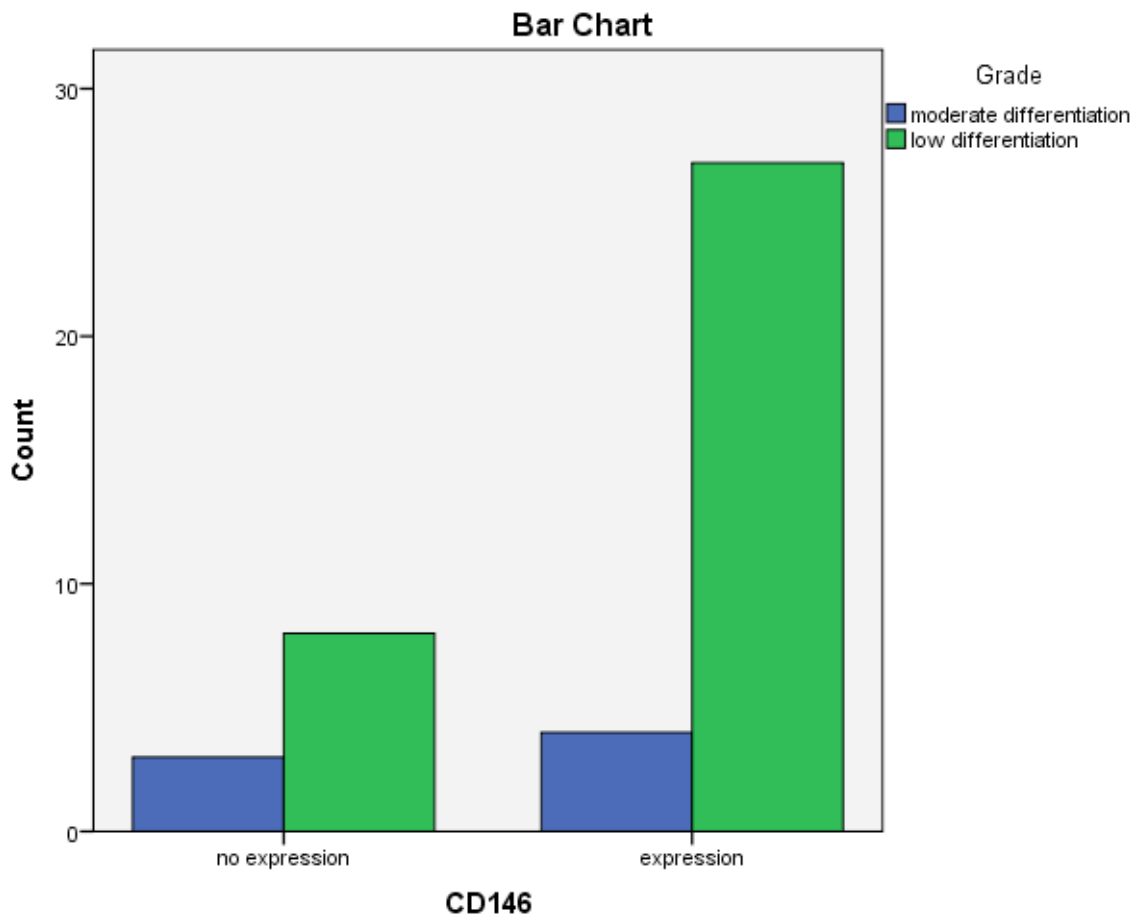
Τα αποτελέσματά μας δεν ανέδειξαν στατιστική σημαντικότητα στην μελέτη της έκφρασης του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο (Πίνακας 34, Γράφημα 25). Στα ευρήματά μας σε σχέση με την έκφραση του CD146 σε ασθενείς με διαφορετικό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας υπάρχει περιορισμός λόγω του περιορισμένου αριθμού ασθενών, γεγονός που δείχνει την ανάγκη σχεδιασμών ερευνητικών μελετών με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.

Πίνακας 34. Συχνότητα έκφρασης και ποσοστά του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.

CD146 / Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.		Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.		Σύνολο	
P=0,272		Μέση διαφοροποίηση	Χαμηλή διαφοροποίηση		
CD146	Αρνητική έκφραση	Συχνότητα	3	8	11
		% του CD146	27,3%	72,7%	100,0%
		% του Grade	42,9%	22,9%	26,2%
	Θετική έκφραση	Συχνότητα	4	27	31
		% του CD146	12,9%	87,1%	100,0%
		% του Grade	57,1%	77,1%	73,8%
Σύνολο		Συχνότητα	7	35	42
		% του CD146	16,7%	83,3%	100,0%
		% του Grade	100,0%	100,0%	100,0%

Fisher's Exact Test Test. Στατιστικά μη σημαντικό.

Γράφημα 25. Έκφραση του CD146 σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας.
P=0,272



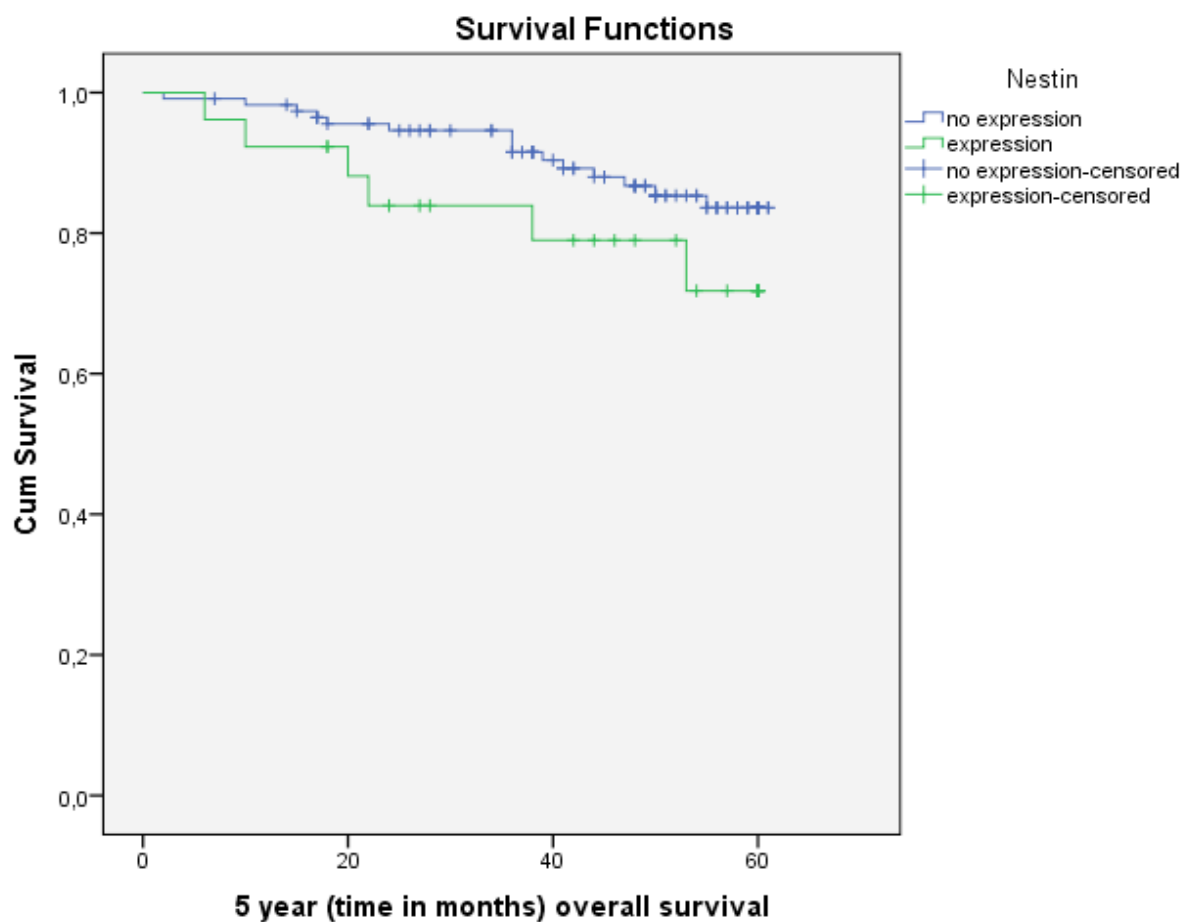
2.3.6. Επιβίωση και υποτροπή των ασθενών στα 5 έτη στο ολικό δείγμα αυτών.

Στα πλαίσια της μελέτης, κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow-up) των ασθενών 37/141 ασθενείς (ποσοστό 26,24%) παρουσίασαν υποτροπή της νόσου μέσα στα 5 έτη μετά την αρχική επέμβαση μαστεκτομής στη οποία υπεβλήθησαν.

2.3.6.1. Πενταετής επιβίωση του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης.

Η μέση τιμή της ολικής επιβίωσης στα πέντε έτη (Διάγραμμα 2) των ασθενών που εκφράζουν νεστίνη ήταν περίπου οι 51 μήνες και αυτών που δεν εκφράζουν νεστίνη περίπου οι 57 μήνες. Η διαφορά του χρόνου ολικής επιβίωσης μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,158$).

Διάγραμμα 2. Καμπύλη Επιβίωσης Ελεύθερης Νόσου σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης στο ολικό δείγμα των ασθενών. $P=0,158$



Overall Comparisons

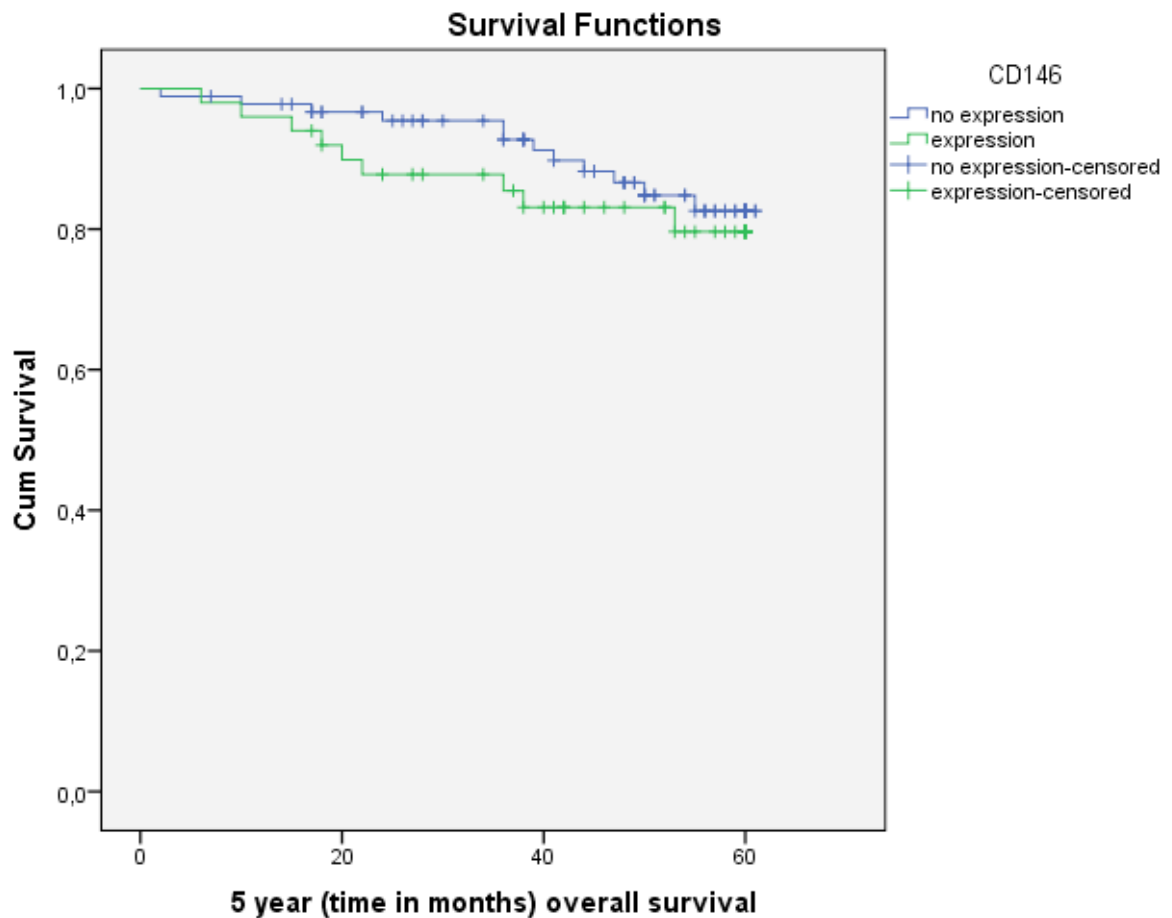
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,995	1	,158

Test of equality of survival distributions for the different levels of Nestin.

2.3.6.2. Πενταετής επιβίωση του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση του δείκτη CD146.

Η μέση τιμή της ολικής επιβίωσης στα πέντε έτη (Διάγραμμα 3) των ασθενών που εκφράζουν CD146 ήταν περίπου οι 53 μήνες και αυτών που δεν εκφράζουν CD146 περίπου οι 57 μήνες. Η διαφορά του χρόνου ολικής επιβίωσης μεταξύ των δύο ομάδων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,457$).

Διάγραμμα 3. Καμπύλη Επιβίωσης Ελεύθερης Νόσου σε σχέση με την έκφραση του CD146 στο ολικό δείγμα των ασθενών. $P= 0,457$



Overall Comparisons

	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,554	1	,457

Test of equality of survival distributions for the different levels of CD146.

2.3.6.3. Εμφάνιση χρόνου υποτροπής στο πλαίσιο της πενταετούς παρακολούθησης του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης.

Από τον πίνακα 35α παρατηρούμε ότι 26/115 ασθενείς που δεν εκφράζουν νεστίνη και 11/26 ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη παρουσιάζουν υποτροπή. Από τον πίνακα 35β παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη είναι οι 39 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν νεστίνη είναι οι 50 μήνες. Η διαφορά του χρόνου υποτροπής ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες ήταν στατιστικά σημαντικός με επίπεδο σημαντικότητας το 0,022 όπως προκύπτει από το Log Rank του πίνακα 35γ. Παρατηρώντας την καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier (Διάγραμμα 4) τη χρονική στιγμή 30 μήνες παρατηρούμε ότι η επιβίωση χωρίς υποτροπή εκτιμάται για τους ασθενείς που δεν εκφράζουν νεστίνη στο 81,1% και για εκείνους που εκφράζουν νεστίνη στο 54,9%. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η έκφραση της νεστίνης συσχετίζεται με το χρόνο εμφάνισης υποτροπής.

Πίνακας 35α. Αριθμός ασθενών που εμφανίζουν υποτροπή σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης.

Νεστίνη	Σύνολο N	N περιστατικών	Censored	
			N	Ποσοστό
Αρνητική έκφραση	115	26	89	77,4%
Θετική έκφραση	26	11	15	57,7%
Ολική έκφραση	141	37	104	73,8%

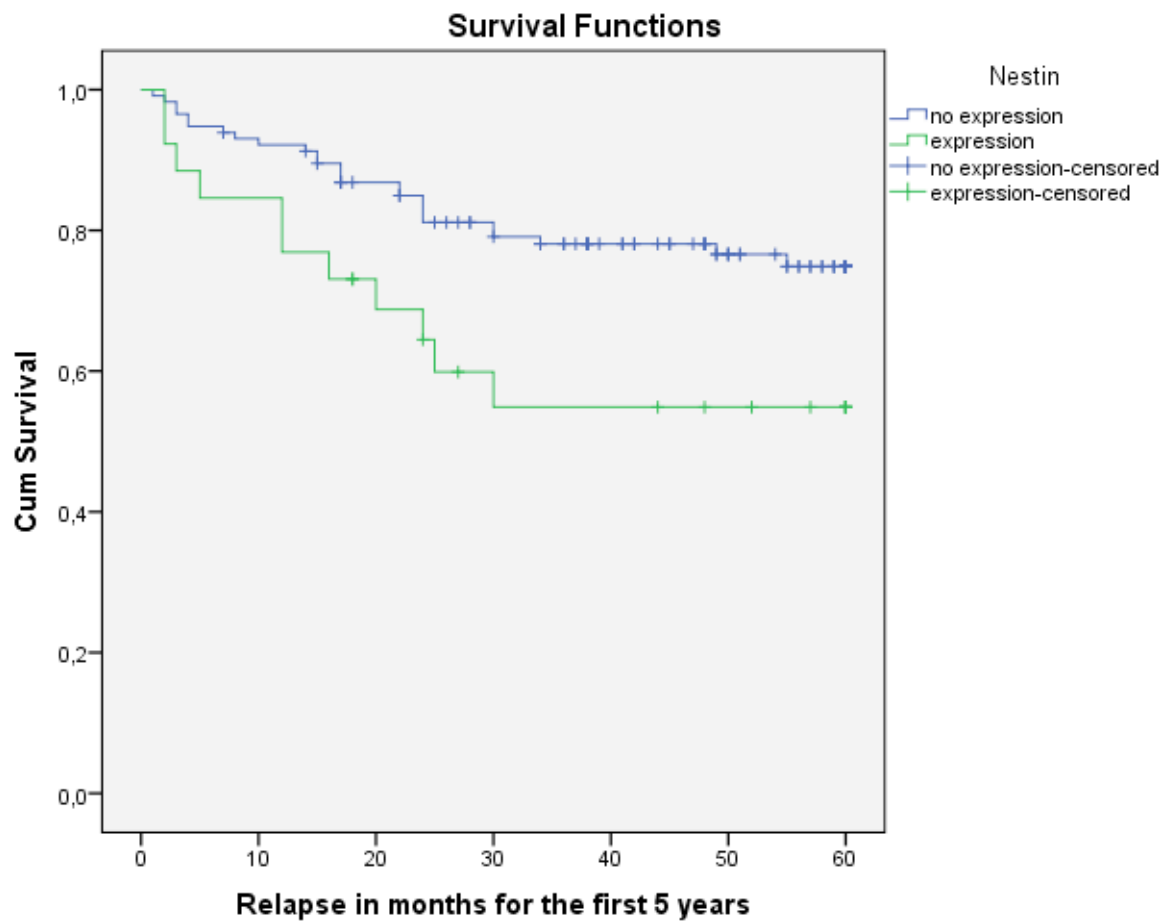
Πίνακας 35β. Μέσος όρος εμφάνισης χρόνου υποτροπής σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης

Νεστίνη	Μέσος χρόνος υποτροπής			
	Προσδοκώμενος χρόνος	Τυπ. Σφάλμα	95% Διάστημα εμπιστοσύνης	
			Ελάχιστο όριο	Μέγιστο όριο
Αρνητική έκφραση	50,096	1,780	46,608	53,585
Θετική έκφραση	38,470	4,752	30,156	48,784
Ολική έκφραση	48,177	1,728	44,791	51,563

Πίνακας 35γ. Επίπεδο σημαντικότητας της εμφάνισης χρόνου υποτροπής σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης

Νεστίνη x Χρόνος Υποτροπής	
Log Rank (Mantel-Cox)	Sig=0,022

Διάγραμμα 4. Καμπύλη Χρόνου Υποτροπής της Νόσου σε σχέση με την έκφραση της νεστίνης στο ολικό δείγμα των ασθενών. **P=0,022**



2.3.6.4. Εμφάνιση χρόνου υποτροπής στο πλαίσιο της πενταετούς παρακολούθησης του ολικού δείγματος των ασθενών σε σχέση με την έκφραση του CD146.

Πίνακας 36α. Αριθμός ασθενών που εμφανίζουν υποτροπή σε σχέση με την έκφραση του CD146.

CD146	Ολικό N	N περιστατικών	Censored	
			N	Ποσοστό
Αρνητική έκφραση	91	16	75	82,4%
Θετική έκφραση	50	21	29	57,7%
Ολική έκφραση	141	37	104	73,8%

Πίνακας 36β. Μέσος όρος εμφάνισης χρόνου υποτροπής σε σχέση με την έκφραση του CD146

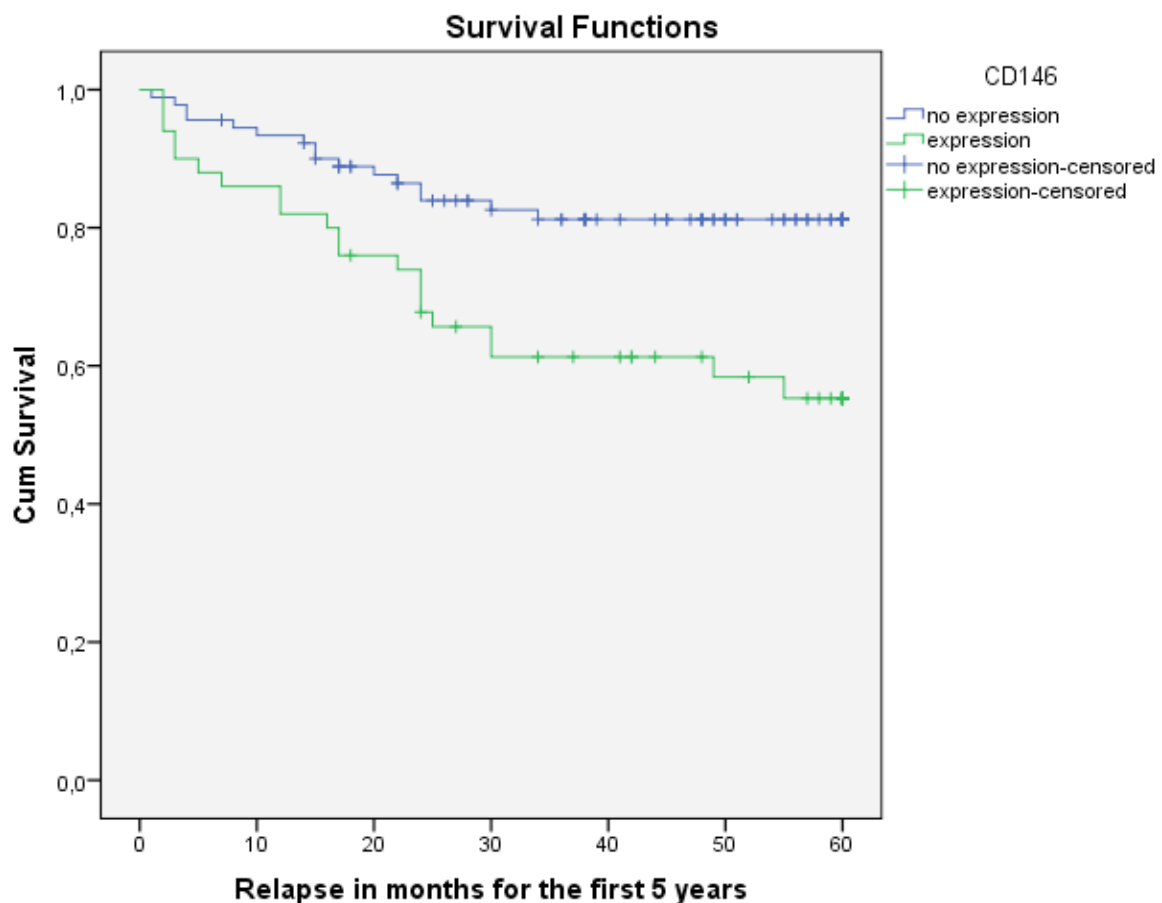
CD146	Μέσος χρόνος υποτροπής			
	Προσδοκώμενος χρόνος	Τυπ. Σφάλμα	95% Διάστημα εμπιστοσύνης	
			Ελάχιστο όριο	Μέγιστο όριο
Αρνητική έκφραση	51,731	1,900	48,006	55,455
Θετική έκφραση	42,032	3,219	35,722	48,341
Ολική έκφραση	48,177	1,728	44,791	51,563

Πίνακας 36γ. Επίπεδο σημαντικότητας της εμφάνισης χρόνου υποτροπής σε σχέση με την έκφραση του CD146

CD146 x Χρόνος Υποτροπής	
Log Rank (Mantel-Cox)	Sig=0,003

Από τον πίνακα 36α παρατηρούμε ότι 16/91 ασθενείς που δεν εκφράζουν CD146 και 21/50 ασθενείς που εκφράζουν CD146 παρουσιάζουν υποτροπή. Από τον πίνακα 36β παρατηρούμε ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν CD146 είναι οι 42 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν CD146 είναι οι 52 μήνες. Η διαφορά του χρόνου υποτροπής ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες ήταν στατιστικά σημαντικός με επίπεδο σημαντικότητας το 0,003 όπως προκύπτει από το Log Rank που φαίνεται στον πίνακα 36γ. Παρατηρώντας την καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier (Διάγραμμα 5) τη χρονική στιγμή 30 μήνες παρατηρούμε ότι η επιβίωση χωρίς υποτροπή εκτιμάται για τους ασθενείς που δεν εκφράζουν CD146 στο 82,6% και για εκείνους που εκφράζουν CD146 στο 58,4%. Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι η έκφραση του CD146 συσχετίζεται με το χρόνο υποτροπής.

Διάγραμμα 5. Καμπύλη Χρόνου Υποτροπής της Νόσου σε σχέση με την έκφραση του CD146 στο ολικό δείγμα των ασθενών. **P=0,003**



2.3.6.5. Ο δείκτης CD146 (MCAM) αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για τον χρόνο υποτροπής σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού P=0,037.

Προκειμένου να ελέγξουμε την ισχύ της νεστίνης και του CD146 ως παράγοντα υποτροπής πραγματοποιήθηκε η ανάλυση με το μοντέλο παλινδρόμησης Cox. Από τους πίνακες 37α και 37β διαπιστώνουμε ότι το μοντέλο που συμπεριλαμβάνει τους δύο παράγοντες που μελετούμε είναι καλύτερο, σε σχέση με το μοντέλο που δεν περιλαμβάνει κανένα παράγοντα, στο να ερμηνεύσει το χρονικό διάστημα μέχρι την εμφάνιση του γεγονότος (όλα τα p του πίνακα 2 δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά). Από τον πίνακα 37γ διαπιστώνουμε ότι η έκφραση του CD146 διαδραματίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο στο χρόνο εμφάνισης υποτροπής ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού. Παρουσιάζει δηλαδή ο CD146 με στατιστική σημαντικότητα **p=0,037** ιδιαίτερη σημασία ως δείκτης υποτροπής. Η έκφραση της νεστίνης αν και στατιστικά σημαντική στην εμφάνιση του χρόνου υποτροπής δεν αποτελεί ωστόσο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα εμφάνισης υποτροπής. Συγκεκριμένα, η αντίστοιχη ανάλυση Cox-Regression για την νεστίνη δεν επιβεβαίωσε την δύναμη της νεστίνης ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα (p=0,545), παρότι στην αντίστοιχη καμπύλη του χρόνου υποτροπής ανάμεσα στους ασθενείς που εξέφρασαν νεστίνη και σε εκείνους που δεν εξέφρασαν νεστίνη παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 37^α. Μηδενικό μοντέλο (Null Model) για το Cox μόντελο χωρίς μεταβλητές.

Omnibus Tests of Model Coefficients
-2 Log Likelihood
350,268

Πίνακας 37β. -2Log Likelihood για το Cox μοντέλο συμπεριλαμβάνοντας τις μεταβλητές νεστίνη και CD146

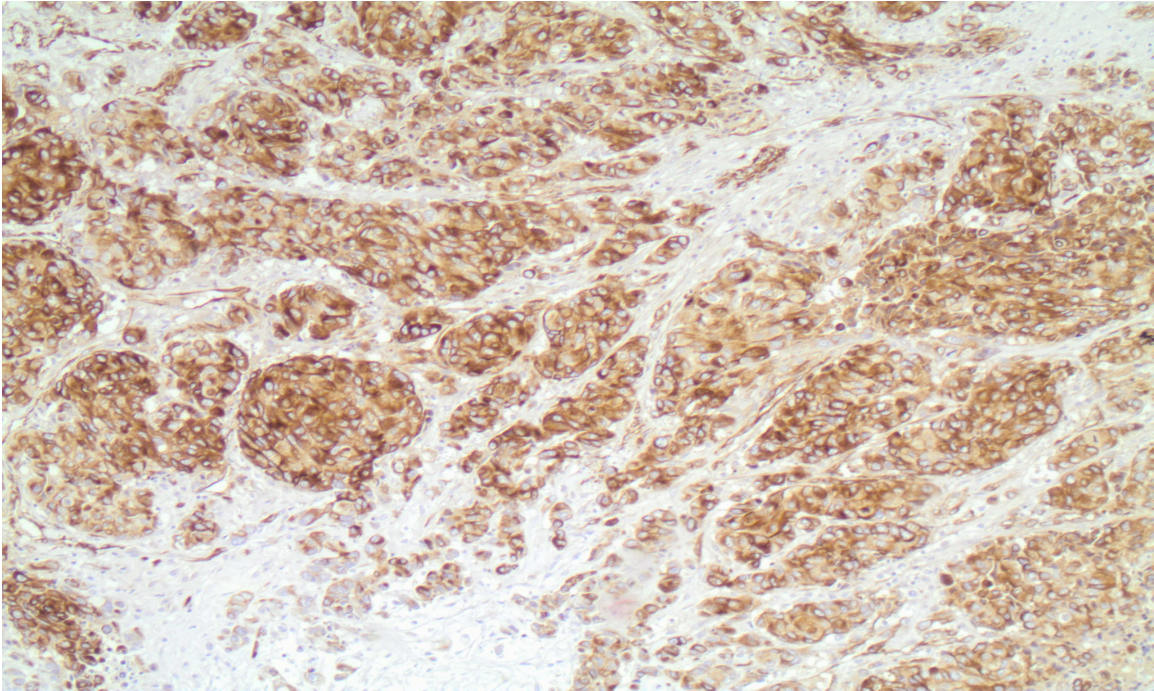
Omnibus Tests of Model Coefficients									
-2 Log Likelihood	Overall (score)			Change From Previous Step			Change From Previous Block		
	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
341,840	9,203	2	0,010	8,429	2	0,015	8,429	2	0,015

Πίνακας 37γ. Αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της κάθε μεταβλητής στο χρόνο εμφάνισης της υποτροπής.

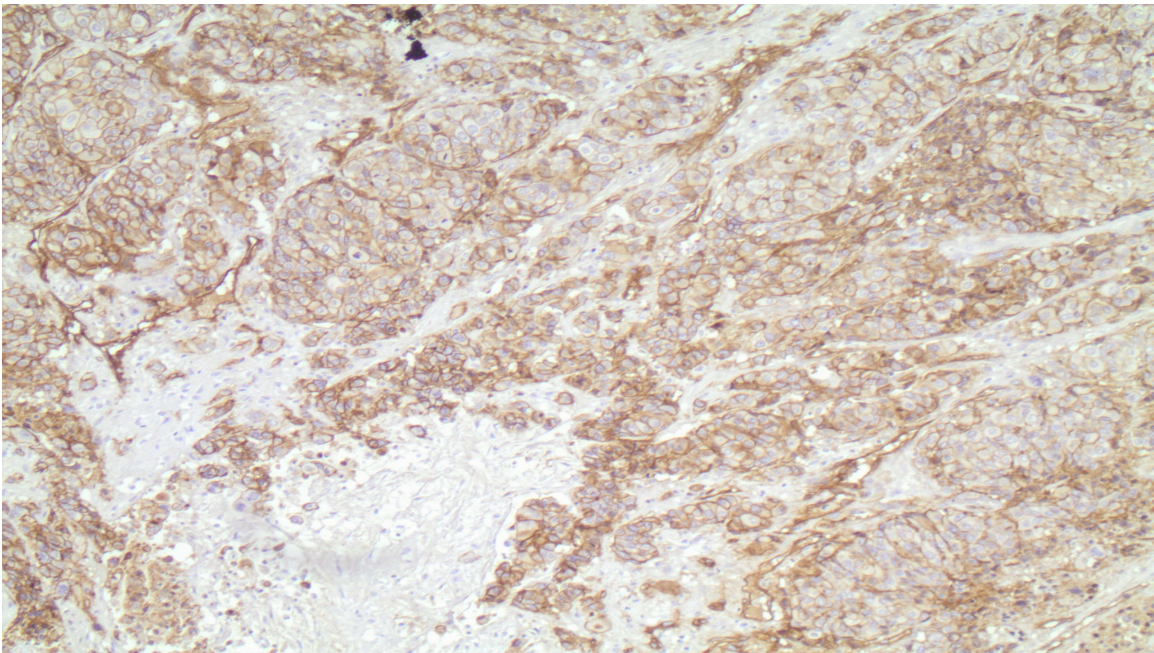
Variables in the Equation						
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Νεστίνη	-,259	0,425	0,371	1	0,542	0,772
CD146	-,820	0,392	4,371	1	0,037	0,440

2.3.7. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

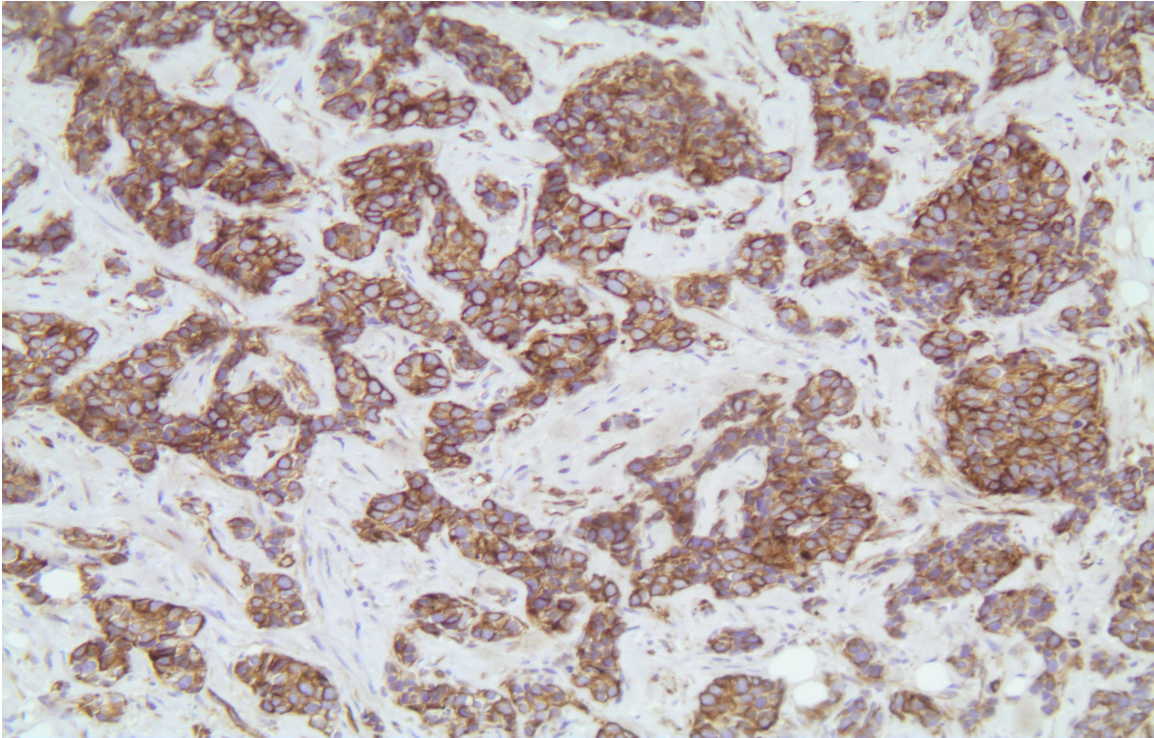
Εικόνα 1. Έντονη κυτταροπλασματική έκφραση της νεστίνης σε ασθενή με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο (Μεγέθυνση: x100) (Όμοια απεικόνιση και για εικόνες 2,3).



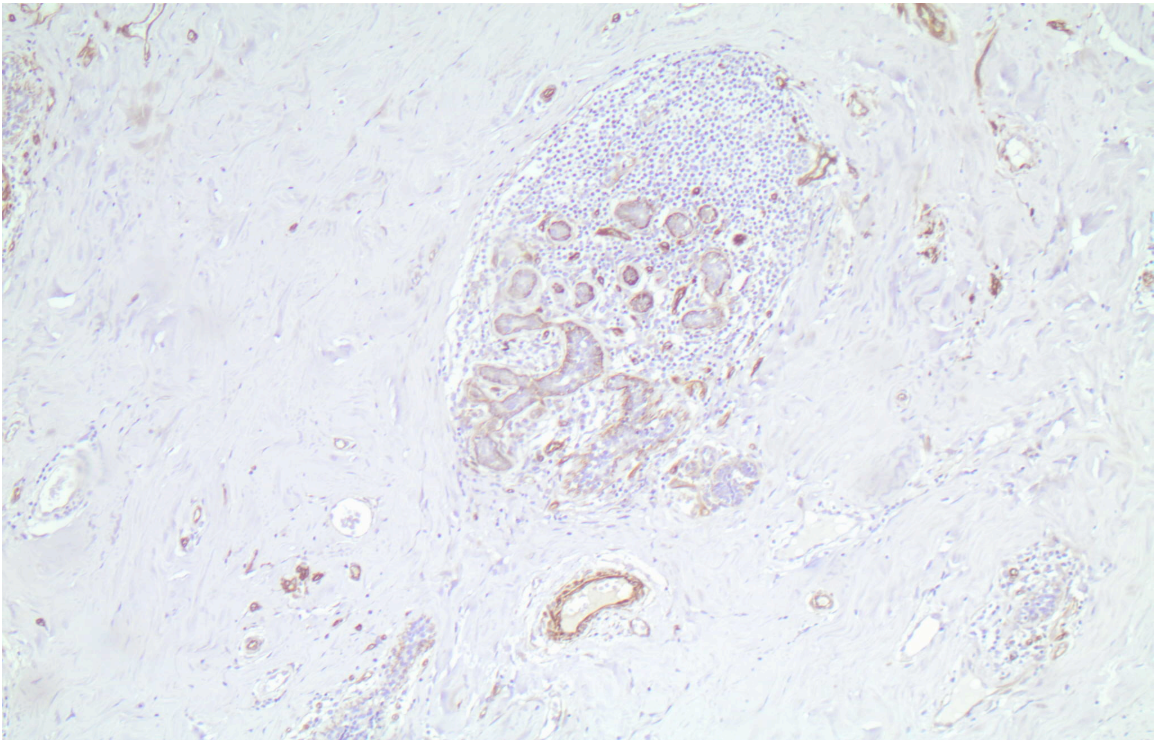
Εικόνα 2 (Μεγέθυνση: x100)



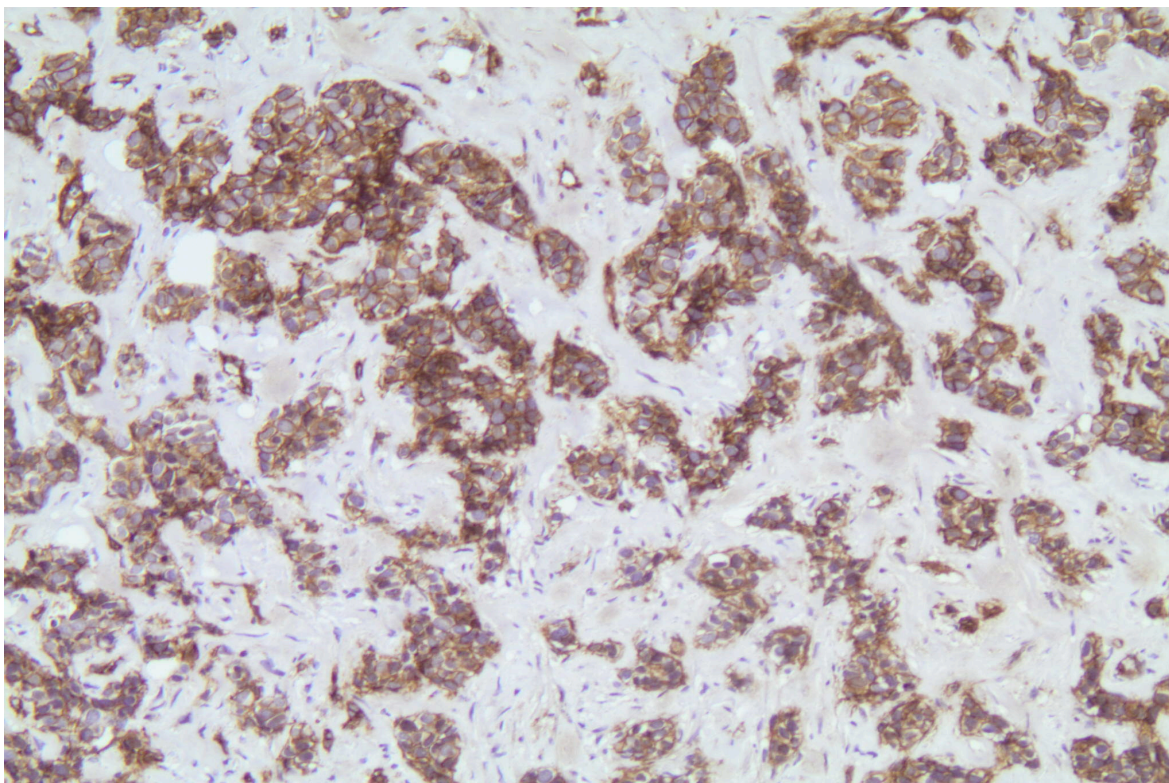
Εικόνα 3. (Μεγέθυνση: x200)



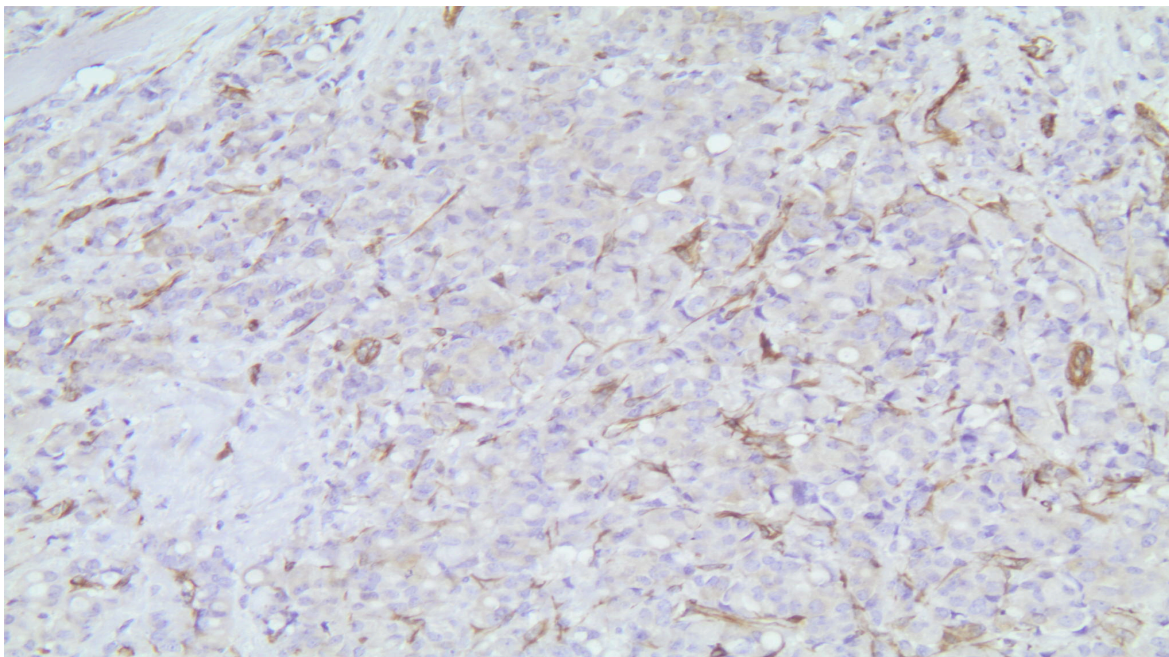
Εικόνα 4. Έκφραση της νεστίνης σε φυσιολογικό ιστό γύρω από όγκο ασθενούς με τριπλά αρνητικό υπότυπο (Εσωτερικός μάρτυρας) (Μεγέθυνση: x100).



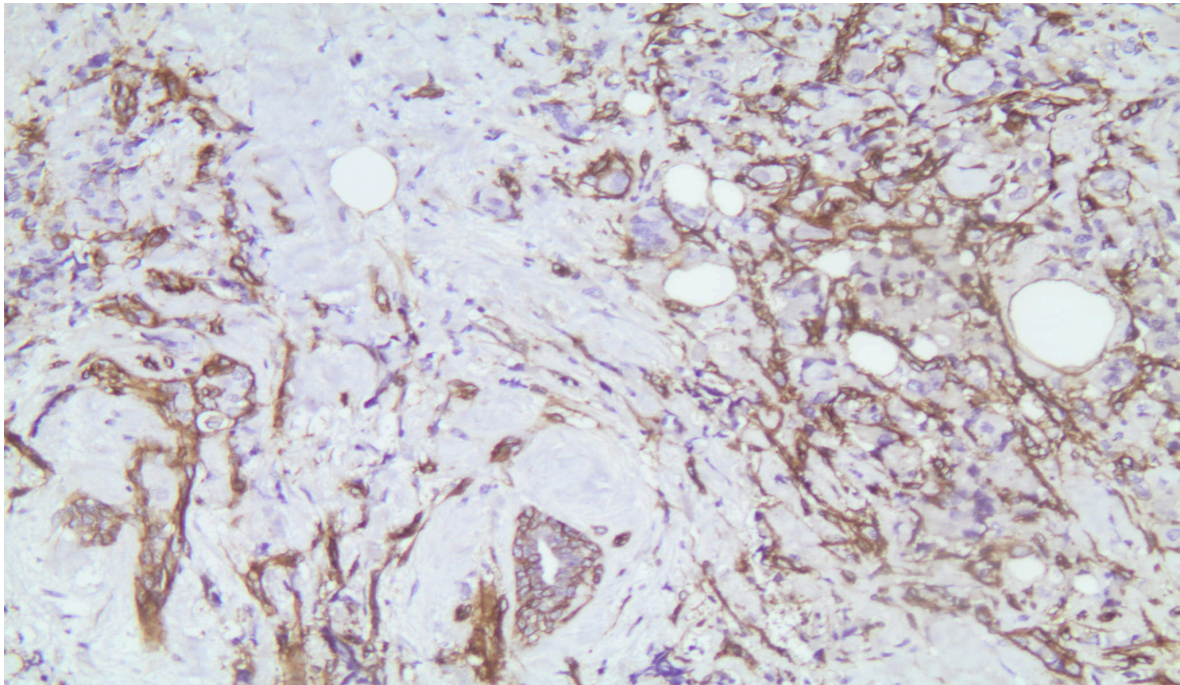
Εικόνα 5. Έντονη κυτταροπλασματική έκφραση του CD146 σε ασθενή με τριπλά αρνητικό υπότυπο (Μεγέθυνση: x200).



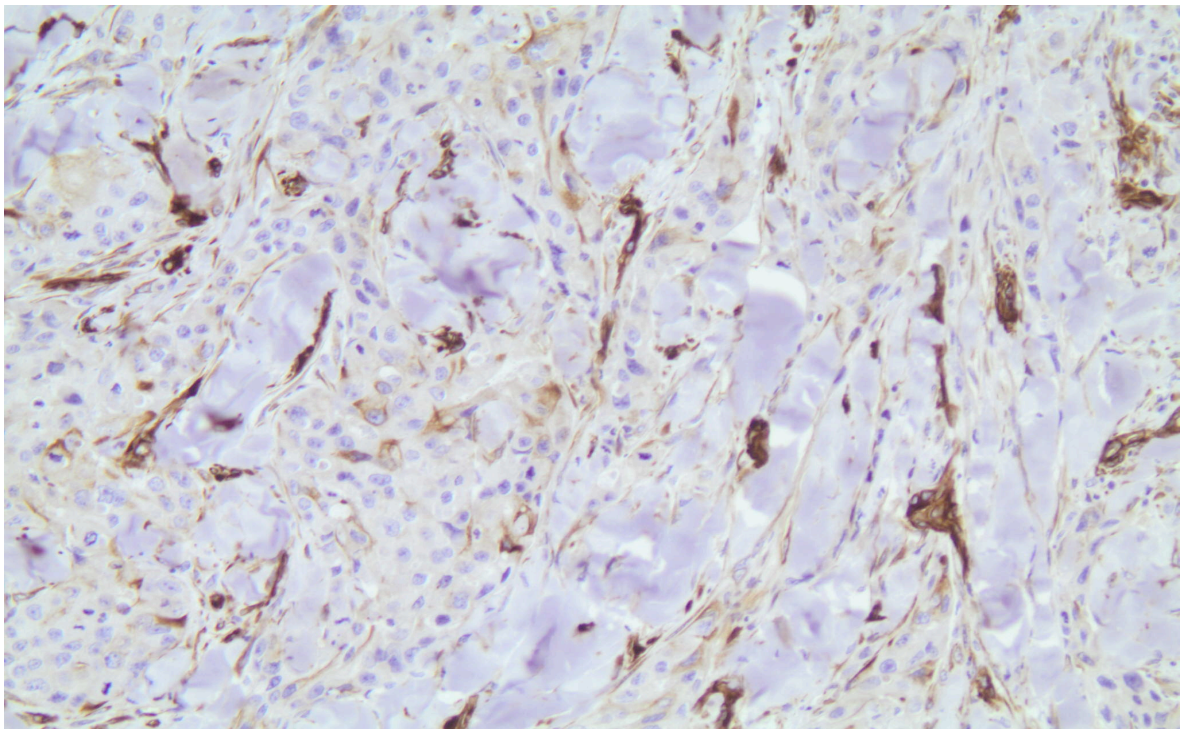
Εικόνα 6: Ασθενής κυτταρική έκφραση της νεστίνης σε ασθενή με αυλικού τύπου Α μοριακό υπότυπο (Μεγέθυνση: x200).



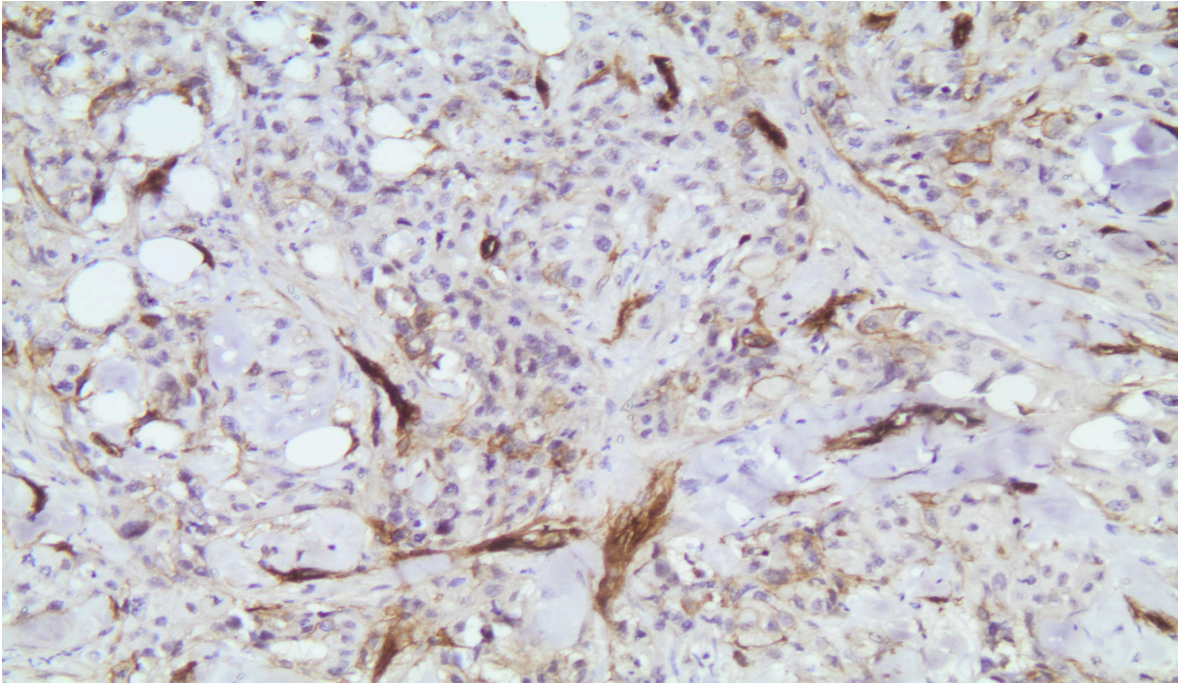
Εικόνα 7: Ασθενής έκφραση του CD146 σε ασθενή με αυλικού τύπου Α υπότυπο. Απεικόνιση και φυσιολογικού ιστού ως εσωτερικού μάρτυρα (Μεγέθυνση: x200).



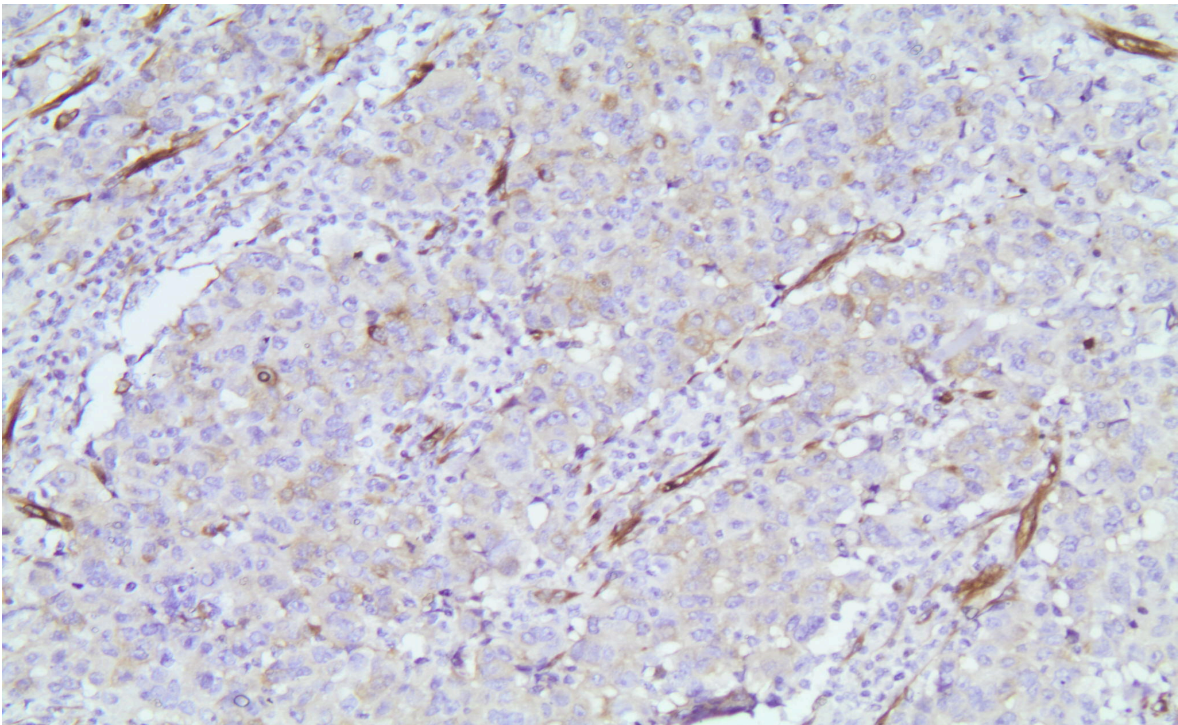
Εικόνα 8 Έκφραση της νεστίνης σε ασθενή με αυλικού τύπου Β υπότυπο (Μεγέθυνση: x200).



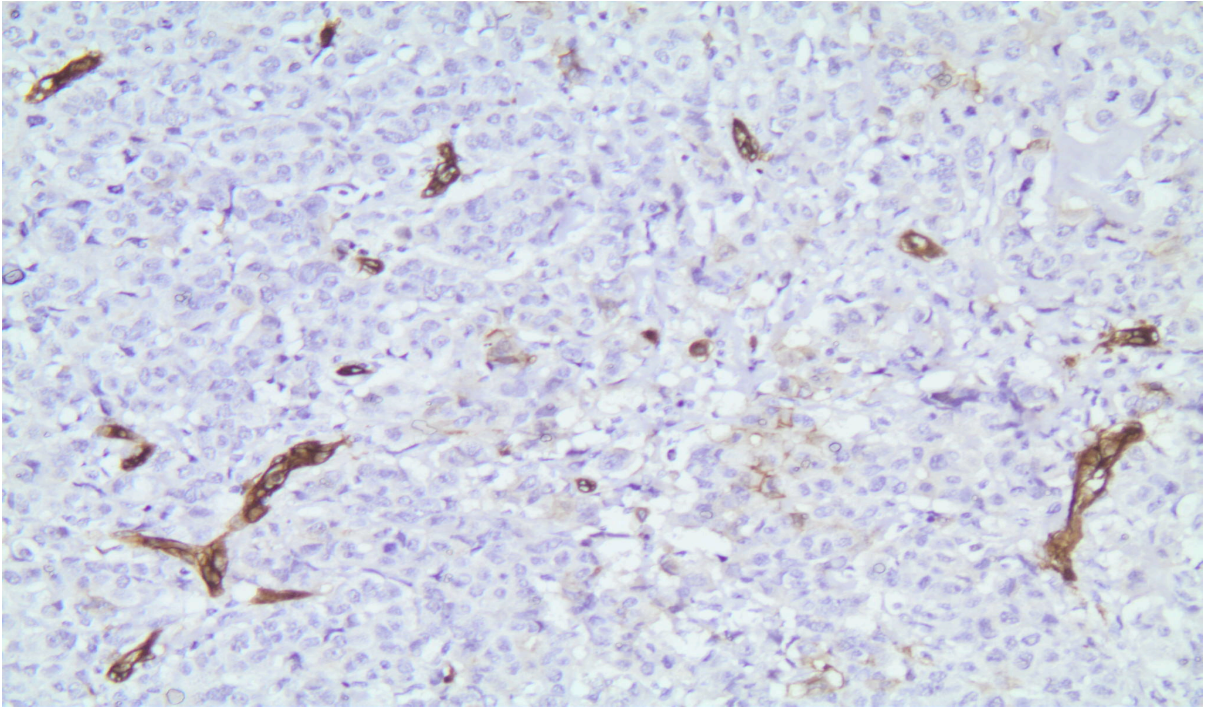
Εικόνα 9. Έκφραση του CD146 σε ασθενή με αυλικού τύπου Β υπότυπο (Μεγέθυνση: x200).



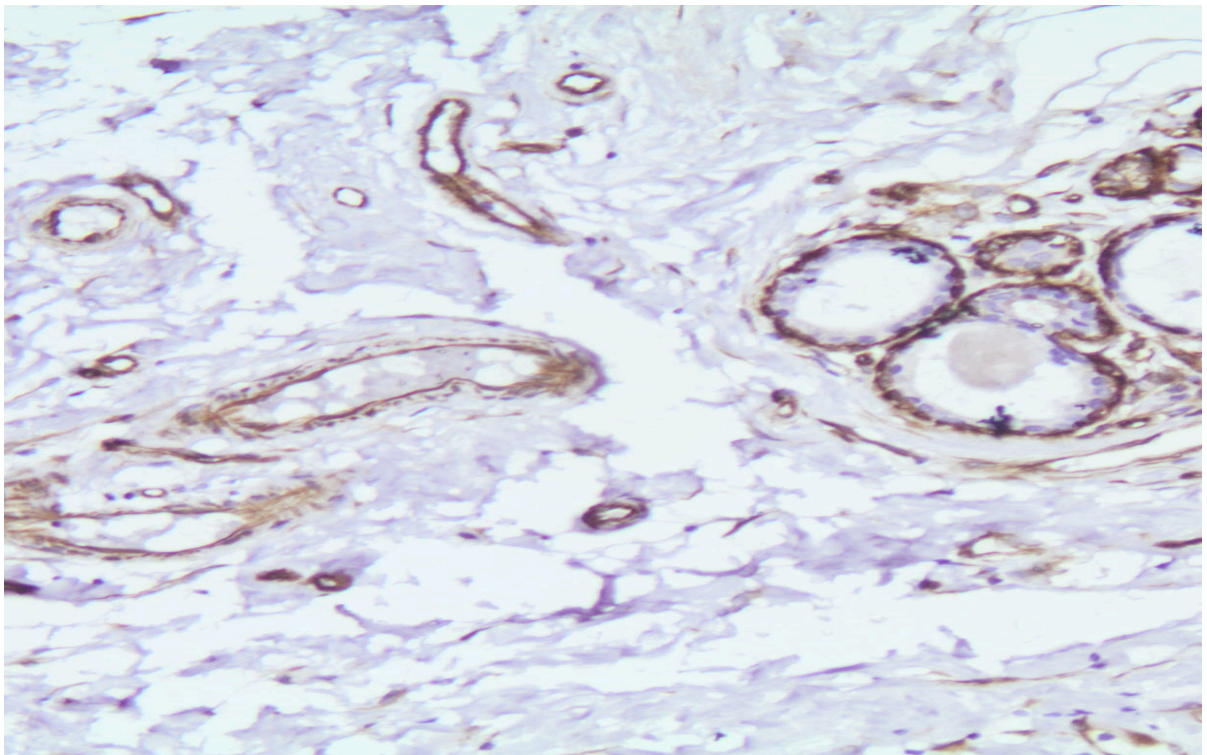
Εικόνα 10. Ασθενής εκφραση της νεστίνης σε ασθενή με Her2+ υπότυπο. Απεικόνιση λοβίων, μυοεπιθηλίου και αγγείων (Μεγέθυνση: x200).



**Εικόνα 11. Έκφραση του CD146 σε ασθενή με Her2+ μοριακό υπότυπο.
(Μεγέθυνση: x200).**



**Εικόνα 12. Έκφραση του CD146 σε φυσιολογικό ιστό (Εσωτερικός μάρτυρας)
(Μεγέθυνση x200).**



2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύγχρονη αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού προσανατολίζεται τόσο προς την πρόωπη διάγνωση όσο και προς την εξατομικευμένη θεραπεία, αξιοποιώντας τα τελευταία τεχνολογικά επιτεύγματα στην απεικόνιση των βλαβών του μαστού, και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Οι προσπάθειες για την κατανόηση, ανάλυση και ταξινόμηση των όγκων του μαστικού αδένου οδήγησε στην μοριακή ταξινόμηση των καρκίνων του μαστού και στην κατηγοριοποίηση τους σε διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους πχ. αυλικού τύπου A, αυλικού τύπου B, τριπλά αρνητικός (βασικού τύπου), Her2+ (392,393). Οι παραπάνω μοριακοί υπότυποι αποτελούν και τις πιο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού λόγω έλλειψης αποτελεσματικής θεραπείας αλλά και λόγω κακής πρόγνωσης τους.

Έχει αποδειχθεί ότι οι περισσότεροι επιθετικοί κακοήθεις όγκοι συμπεριλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό ιδιαίτερων κυττάρων με δυνατότητα αυτοσυντηρούμενης ανάπτυξης και διαφοροποίησης που αναγνωρίζονται μόνο βάσει ειδικών επιφανειακών αντιγόνων, των λεγόμενων δεικτών καρκινικών βλαστικών κυττάρων (392, 401-405). Τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα καρκινικά βλαστοκύτταρα έχουν την ικανότητα να διαιρούνται συμμετρικά, δίνοντας γένεση σε πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Μπορούν επίσης να διαιρούνται ασύμμετρα, δημιουργώντας ένα βλαστοκύτταρο και ένα προγονικό κύτταρο, το οποίο υφίσταται περεταίρω διαφοροποίηση. Αυτή η ασύμμετρη διαίρεση διευκολύνει την υγιή ανάπτυξη στα φυσιολογικά κύτταρα, χάρη στην πολικότητα της κυτταρικής διαίρεσης. Όταν όμως αυτή η πολικότητα χάνεται, τα βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν όγκο. Η αυτο-ανανέωση των βλαστοκυττάρων ελέγχεται από διακυτταρικούς μηχανισμούς, μέσω επικοινωνίας με τα γειτονικά κύτταρα (σηματοδότηση), και από ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς, μέσα από τη διαφορική γονιδιακή έκφραση που βρίσκεται κάτω από τον επιγενετικό, μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό έλεγχο (406-408). Για παράδειγμα, η πολικότητα της κυτταρικής διαίρεσης στα βλαστοκύτταρα των θηλαστικών ρυθμίζεται από πολλά γονίδια, περιλαμβανομένου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, η απώλεια του οποίου οδηγεί σε περισσότερες συμμετρικές διαιρέσεις, γεγονός που βοηθάει στην ανάπτυξη του όγκου (409).

Ο κακοήθης μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, οι οποίες επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και το θάνατο των κυττάρων, ενώ σε μεταγενέστερα στάδια της ογκογένεσης, επιπρόσθετες μεταβολές ενδέχεται να επάγουν την αγγειογένεση, τη διήθηση σε γειτονικούς ιστούς και τη μετάσταση σε απομακρυσμένα σημεία. Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο είναι συνήθως μεταλλαγμένες μορφές φυσιολογικών γονιδίων που έχουν ενεργοποιηθεί ή απενεργοποιηθεί και είναι γνωστά ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια, αντίστοιχα. Η κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών των σχετικών γονιδίων έχει οδηγήσει στην αναγνώριση μοριακών μονοπατιών και δικτύων με πιο χαρακτηριστικά τα Wnt, Notch, Hedgehog, η απορρύθμιση των οποίων είναι υπεύθυνη για την έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (406-408).

Τα πιο γνωστά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ η αναγνώριση και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο έγινε δυνατή με την ταυτοποίηση των γενετικών και των επιγενετικών αλλαγών που επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνικών προϊόντων τους. Συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού, ένας όγκος αποτελείται από έναν ετερογενή πληθυσμό κυττάρων που διαφέρουν ως προς το σχετικό στάδιο διαφοροποίησής τους. Συγκεκριμένα, το εξωτερικό ενός όγκου περιλαμβάνει πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στην ακτινοβολία και τη χημειοθεραπεία. Αυτό οφείλεται στη θέση τους που βρίσκονται κοντά στο μη ογκογόνο μικροπεριβάλλον και στην επαρκή ροή αίματος λόγω της επαγόμενης αγγειογένεσης ή της ανάπτυξης των αιμοφόρων αγγείων. Η επόμενη προς το κέντρο του όγκου περιοχή περιλαμβάνει προγονικά κύτταρα (progenitor cells) που μπορούν να υποστούν έναν περιορισμένο αριθμό μιτωτικών διαιρέσεων για να σχηματίσουν αρκετά θυγατρικά κύτταρα. Αυτά τα θυγατρικά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν στη συνέχεια σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων βάσει των μικροπεριβαλλόντων τους. Στο κέντρο του όγκου βρίσκονται τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs), που είναι τόσο δομικά όσο και λειτουργικά διακριτά από τα υπόλοιπα κύτταρα μέσα στον όγκο (410-414).

Σύμφωνα με την θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, κάθε CSCs έχει την ικανότητα να υφίσταται αυτο-ανανεωτική μίτωση, όπου το ένα ή και τα δύο από τα θυγατρικά κύτταρα διατηρούν την ταυτότητα του βλαστοκυττάρου. Το άλλο θυγατρικό κύτταρο μπορεί να γίνει προγονικό κύτταρο που υφίσταται ορισμένους μιτωτικούς

κύκλους, μέχρι να καταστεί διαφοροποιημένο καρκινικό κύτταρο. Τα CSCs εμφανίζουν ταχύτατους ρυθμούς διαφοροποίησης όταν καλλιεργούνται και είναι δύσκολη η διατήρηση ενός πληθυσμού *in vitro* που να είναι εμπλουτισμένος σε CSCs. Τέτοιοι πληθυσμοί εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά *in vitro*: (α) Μπορούν να απομονωθούν με τη χρήση των προφίλ των δεικτών της κυτταρικής επιφάνειας, (β) σχηματίζουν σφαιρικές αποικίες σε υγρές καλλιέργειες (tumorspheres, ογκοσφαίρια) και (γ) έχουν αυξημένη αντίσταση τόσο σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες όσο και σε ιονίζουσα ακτινοβολία (410-414).

Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα που μοιάζουν με καρκινικά βλαστικά κύτταρα (cancer stem like cells-CSCs, ονομάζονται επίσης tumor-initiating cells) αποτελούν έναν ιδιαίτερο τύπο ογκογόνων κυττάρων που υπάρχουν ως μειονότητα σε αναπτυξιακά διαφορετικούς όγκους και κυτταρικές σειρές, ενώ έχουν απομονωθεί χρησιμοποιώντας κάθε φορά διαφορετικούς δείκτες κυτταρικής επιφάνειας. Λειτουργικά, τα CSCs εμφανίζονται σε μελέτες συνήθως ως πολύ ογκογόνα κύτταρα, όπως έχει παρατηρηθεί μετά από μεταμόσχευσή τους σε ανοσοεπαρκή ποντίκια, καθώς επίσης και πολύ ανθεκτικά στα κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα (π.χ. δοξορουβικίνη). Συνήθως, τα CSCs μπορούν να αναπτυχθούν ως σφαίρες (π.χ. mammospheres για τα μαστικά CSCs) υπό συνθήκες μη διαφοροποίησής τους, αλλά μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν και σε non-stem καρκινικά κύτταρα (NSCCs). Παρά το γεγονός ότι τα CSCs έχουν μοριακές ομοιότητες με τα εμβρυϊκά και τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα ενηλίκων (embryonic and normal adult stem cells), τα μαστικά CSCs (BCSCs) δεν είναι επιγενετικώς σταθερά και δεν συμπεριφέρονται ούτε και προκύπτουν από τα κλασικά βλαστικά κύτταρα. Αντ'αυτού, μαστικά καρκινικά βλαστικά κύτταρα (BCSCs) και μαστικά καρκινικά κύτταρα non-stem (BNSCCs) υπάρχουν σε μια δυναμική ισορροπία που διαμεσολαβείται από την έκκριση IL6. Αυτή η δυναμική ισορροπία μεταξύ BCSCs και BNSCCs μοιάζει με το φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετάβασης (EMT), ένα φαινόμενο που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και μπορεί να προσομοιωθεί σε καρκινικά κύτταρα (410-414). Οι ιδιότητες των CSCs μας ενδιαφέρουν καθώς εμπλέκονται στη θεραπεία του καρκίνου. Συγκεκριμένα αποτελεί κοινή παρατήρηση ότι οι όγκοι υποτροπιάζουν ακόμη και μετά από μια αποτελεσματική πρωτογενή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Βασισμένη πάνω στην θεωρία των CSC, η

χημειοθεραπεία σκοτώνει τη συντριπτική πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων εντός του όγκου, αλλά τα CSCs επιβιώνουν και μετά τη θεραπεία προωθούν την αναγέννηση των διαφόρων κυτταρικών τύπων στον όγκο, οδηγώντας έτσι σε εκ' νέου παρέλευση της νόσου. Μάλιστα ο σχηματισμός και η λειτουργία των CSC ενισχύονται από ένα ολοκληρωμένο ρυθμιστικό κύκλωμα που αποτελείται από miRNAs, μεταγραφικούς παράγοντες και δραστηριότητας που τροποποιούν τη χρωματίνη και μπορούν να λειτουργήσουν ως ένας διακόπτης, ο οποίος οδηγεί τα κύτταρα είτε σε CSC είτε σε non-stem κατάσταση μέσα στον πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων. Σε πρότυπες κυτταρικές καλλιέργειες, τα CSCs και NSCCs δεν είναι επιγενετικώς σταθερά αλλά μάλλον υπάρχουν σε μια δυναμική ισορροπία που προκαλείται από την έκκριση IL6 εντός του μέσου. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα CSCs διαφοροποιούνται πάλι σε NSCCs, και το παραπάνω οφείλεται στην υψηλή έκκριση της IL-6 στο μέσο από τα CSCs. Ως εκ' τούτου, συμπεραίνεται ότι πρέπει να υπάρχει ένα κρίσιμο βήμα IL6 που διαμεσολαβείται και λειτουργεί ως διακόπτης καθώς έκκριση της IL6 θα μπορούσε να επηρεάσει ένα ή περισσότερα στάδια στο κύκλωμα μέσω μεταβολής της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεταγραφικών ρυθμιστικών πρωτεϊνών (409,410-414).

Όλες οι θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο προς το παρόν συμβάλλουν στη μείωση του μεγέθους του όγκου, όμως δεν οδηγούν σε μακροπρόθεσμη υποχώρηση της νόσου, όσο δεν στοχεύονται τα CSCs. Ωστόσο, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα είναι δύσκολο να στοχευτούν λόγω των ενδογενών τους ιδιοτήτων. Χαρακτηρίζονται από την ανθεκτικότητά τους σε αντικαρκινικές θεραπείες και τη δυνατότητά τους να επαναδημιουργούν πληθυσμούς, ενώ μπορούν να αναγεννήσουν έναν όγκο μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοβολία. Το χαρακτηριστικό της ανθεκτικότητάς τους σε πολλαπλά φάρμακα συσχετίζεται με την υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες λειτουργούν ως αντλίες εκροής και ρυθμίζονται από ενεργές ρίζες οξυγόνου μέσα στο κύτταρο, που ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του ιστού και μεταξύ των ιστών. Έτσι, οποιαδήποτε θεραπευτική προσέγγιση, προκειμένου να στοχεύει τα CSCs, θα πρέπει να παρουσιάζει εξαιρετική ειδικότητα. Καθώς μάλιστα ο ρυθμός διαίρεσής τους είναι σχετικά αργός και άρα είναι ανθεκτικά σε θεραπείες που στοχεύουν κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα, αναπτύσσουν εξειδικευμένους μηχανισμούς άμυνας απέναντι στην τοξική δράση των θεραπειών. Κατά αυτόν τον

τρόπο, παρόλο που η αρχική ανταπόκριση ενός ασθενούς στην θεραπεία μπορεί να είναι καλή, τελικά δεν επιτυγχάνεται ίαση, η νόσος υποτροπιάζει και η συνολική επιβίωση δεν αυξάνει (392, 394,397,403,404). Δεδομένου μάλιστα του ότι η μετάσταση και η υποτροπή εμπλέκονται σε περισσότερο από το 90% των θανάτων από καρκίνο του μαστού, είναι απόλυτα κατανοητό πως κάθε στρατηγική για την εξάλειψη των ανθεκτικών μαστικών βλαστικών καρκινικών κυττάρων αποτελεί θέμα επείγουσας σημασίας στην έρευνα για τον καρκίνο του μαστού.

Εισαγωγή νέων φαρμάκων που στοχεύουν τα CSCs σε συνδυασμό με συμβατική χημειοθεραπεία, η οποία στοχεύει τα μη-CSCs, μπορεί να χρησιμεύσει ως μια αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση των επιθετικών μοριακών υποτύπων στον καρκίνο του μαστού. Για την αποτελεσματική αντιμετώπιση προτείνεται μέσα από μια πληθώρα μελετών 1) η συγχορήγηση παραγόντων που στοχεύουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα με παράγοντες που στοχεύουν τα κύτταρα της καρκινικής μάζας 2) η εναλλαγή θεραπευτικής στρατηγικής με σκοπό τη αποφυγή ανάπτυξης ανθεκτικότητας των κυττάρων (Νάνο-φάρμακα, αντι-VEGF θεραπεία, στόχευση επιφανειακών δεικτών μέσω αντισωμάτων-τοξινών, στόχευση κυτταρικών μονοπατιών Wnt, Hedgehog, Notch, PI3K/Akt προς καταστολή της κυτταρικής ανανέωσης, ενίσχυση με ABC μεταφορείς προς αποφυγή πολυφαρμακευτικής αντίστασης) (410-414).

Σήμερα ένας ταχύτατα αναπτυσσόμενος τομέας στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι η στόχευση miRNA που εμφανίζουν απορρυθμισμένα επίπεδα στα καρκινικά κύτταρα (410). Μελέτες λειτουργικότητας συγκεκριμένων miRNAs σε διάφορα καρκινικά κύτταρα, ιδιαίτερα στα CSCs, είναι απαραίτητες για να βρεθεί ένας θεραπευτικός στόχος. Επίσης η έρευνα εστιάζεται σε συντονισμένες προσπάθειες ανεύρεσης ειδικών επιφανειακών αντιγόνων-δεικτών που εκφράζονται σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα και που αναμένονται να συμβάλλουν στην καλύτερη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών αυτών. Μεταξύ των δεικτών που μελετώνται, είναι οι δείκτες που έχουν σχέση με διάφορες οδούς μηνυματοδότησης που σχετίζονται με την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Καθώς η έρευνα καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού έχει γίνει εφικτή μέσα από την καλλιέργεια και την ανάλυση των βλαστοκυττάρων που εκφράζονται φυσιολογικά στο συγκεκριμένο όργανο σε σχέση με πληθυσμούς καρκινικών κυττάρων,

οδηγούμαστε στην εξακρίβωση συνεχώς νέων επιφανειακών αντιγόνων, δηλαδή ειδικών μορίων δεικτών, που εκφράζονται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των εν' λόγω καρκινικών κυττάρων, τα οποία βοηθούν στην απομόνωσή τους και στην *in vitro* και *in vivo* μελέτη τους (403,404,405). Τέτοιοι δείκτες βλαστικής κυτταρικής επιφάνειας (stem cell surface markers) αποτελούν η νεστίνη ενδεικτική για καρκινικά νευρικά βλαστοκύτταρα αλλά και η πρωτεΐνη CD146 (MCAM), γνωστή και ως μόριο επιφανείας σχετιζόμενο με μετάσταση από ανθρώπινο μελάνωμα.

2.4.1. CD146 (MCAM)

Ο CD146 (MCAM) είναι ένας δείκτης σχετιζόμενος με την ανάπτυξη, τη μετάσταση και την εξάπλωση καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με μελάνωμα. Αποτελεί μόριο προσκόλλησης κλειδί και δρά στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου προάγοντας την αγγειογένεση, γι αυτό και έχει βρεθεί πως παίζει ρόλο στην ανάπτυξη πολλών καρκίνων συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του προστάτη και του μελανώματος (395,399). Επίσης, ο CD146 είναι ενεργοποιητής της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπής (EMT-Epithelial to mesenchymal Transition) (394,395) ενός τύπου επιθηλιακής πλαστικότητας που χαρακτηρίζεται από μακράς διάρκειας φαινοτυπικές και μοριακές αλλαγές στο επιθηλιακό κύτταρο ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας διαφοροποίησης του προς κύτταρο μεσεγχυματικού τύπου. Η μοριακή αυτή διεργασία φαίνεται πως είναι θεμελιώδης κατά την μετάσταση επιθηλιακών καρκίνων και αποσκοπεί στην απόκτηση από τα καρκινικά κύτταρα φαινοτυπικών χαρακτήρων που τους δίνουν την δυνατότητα διείσδυσης στους ιστούς, καθώς επιτελείται στα απώτερα στάδια της εξέλιξης ενός καρκίνου και μοντελοποιεί όλες εκείνες τις μοριακές διεργασίες της ιδιαίτερης ομοιοστασίας του καρκινικού κυττάρου που του προσδίδουν ένα επιθετικό μεταστατικό δυναμικό. Στους επιθηλιακούς καρκίνους αναφέρεται η εμπλοκή της στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην αποφυγή της απόπτωσης, στην νεοαγγεογένεση, στην απώλεια των δομών συνοχής του κυττάρου και στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, ενώ εκτός από την μετάσταση, αποτελεί βασική διεργασία τόσο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στις παθολογικές καταστάσεις της φλεγμονής και της επούλωσης (394,395).

Σχετικά πρόσφατα ο CD146 ταυτοποιήθηκε ως αντιγόνο κυτταρικής επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και έγινε δημοφιλής δείκτης των κυκλοφορούντων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζονται αυξημένα σε παθολογικές καταστάσεις όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η φλεγμονή ή ο καρκίνος. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει τεκμηριωθεί πως ο MCAM μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και στην μετανάστευση τους (332,333,334,335).

Ο CD146 έχει αναδειχθεί επίσης δείκτης των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων που έχουν απομονωθεί από όργανα ενηλίκων ασθενών αλλά και εμβρύων (330) και η έκφρασή του συνδέεται με πολυδυναμικότητα. Μάλιστα, μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα με μεγαλύτερο δυναμικό διαφοροποίησης εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα του CD146 στην επιφάνεια των κυττάρων τους (331). Επίσης ο MCAM λειτουργεί ως υποδοχέας της λαμινίνης άλφα 4, ενός μορίου μήτρας που εκφράζεται ευρέως εντός του αγγειακού τοιχώματος (326). Κατά συνέπεια ο MCAM εκφράζεται σε κύτταρα τα οποία αποτελούν συστατικά του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών κυττάρων και των περικυττάρων. Η λειτουργία του MCAM είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητή, αλλά τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι αποτελεί μέρος του συστήματος προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων και συνδέεται επίσης με τον κυτταρικό σκελετό της ακτίνης (326).

Οι Jiang et al κατέδειξαν την άμεση σύνδεση μεταξύ των CD146 και VEGFR2 σε πειράματα ταυτόσημης ανοσολογικής καταβύθισης. Κάνοντας μάλιστα χρήση ενός αντισώματος αντι-CD146 ή του CD146 siRNA, η VEGF-επαγόμενη φωσφορυλίωση του VEGFR2 κατεστάλη σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας. Οι Jiang et al επεκτάθηκαν επίσης προκλινικά με μελέτες *in vitro*, σε μοντέλα ποντικών και παρουσίασαν ότι η πυκνότητα των μικροαγγείων (microvessel density) σε βύσματα Matrigel αναμεμειγμένα με VEGF ήταν μειωμένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα knockout ποντικών για CD146 σε σύγκριση με ποντίκια άγριου τύπου. Επιπλέον, σε ένα προκλινικό μοντέλο ξеноμοσχέυματος σε καρκίνωμα παγκρέατος σημειώθηκε πρόσθετη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης θεραπείας του αντι-VEGF αντισώματος bevacizumab και του αντι-CD146 αντισώματος AA98. Ενδιαφέρον στην παραπάνω μελέτη παρουσιάζει επίσης το γεγονός πως η πυκνότητα των μικροαγγείων

στις τομές των όγκων βρέθηκε μειωμένη στην ομάδα συνδυασμένης θεραπείας σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά (340,341).

Όπως είναι γνωστό, σταθερό χαρακτηριστικό όλων των συμπαγών όγκων είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσουν και να συντηρούν αγγειακό δίκτυο ικανό να τους προσφέρει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά και να εξασφαλίζει την ανάπτυξή τους, την γρηγορότερη μετάσταση και εξάπλωσή τους. Η δημιουργία νέων αγγείων είναι περίπλοκη διεργασία και οι αντιαγγειακές θεραπείες που στοχεύουν το μονοπάτι VEGF είναι πλέον μια καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση σε πολλές ανθρώπινες κακοήθειες συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του νεφρού, του παχέος εντέρου, ή του καρκίνου του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται από την μελέτη μας συνηγορούν υπέρ του ερωτήματος που γεννάται κατά πόσο η κλινική αποτελεσματικότητα της αντι-VEGF θεραπείας μπορεί να αυξηθεί με αντι-CD146 κατευθυνόμενη θεραπεία και στον καρκίνο του μαστού στο μέλλον (340,341).

Όπως προαναφέρθηκε ο δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο καθιστάται τόσο σημαντικό ρόλο μπορεί να παίζει ο MCAM στην διαδικασία μετάστασης ενός όγκου αφορά στο φαινόμενο της επιθηλιακής προς μεσεγχυματική μετατροπής που κατ'επέκταση σχετίζεται τόσο με την πρωτοπαθή διηθητική εξεργασία, όσο και με το σχηματισμό των μεταστατικών εστιών. Συγκεκριμένα, η έκφραση του CD146 συνδέεται με τον φαινότυπο EMT καθώς αυξάνει την έκφραση του παράγοντα Slug και μπορεί να αλληλεπιδράσει με μόρια που εμπλέκονται στην Erb σηματοδότηση, τροποποιώντας την έκφραση της κυτταρικής επιφάνειας των ErbB3 και ErbB4 και προσδίδοντας έτσι αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία. Πράγματι, η αναγκαστική έκφραση του CD146 σε κυτταρικές γραμμές καρκινώματος μαστού σε ποντικούς παρουσιάστηκε να αυξάνει τη μεταστατική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων (379). Επιπλέον, αρκετές εκθέσεις δείχνουν ότι ο CD146 υπερεκφράζεται σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του προστάτη και ότι αυτή η CD146 υπερέκφραση αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό των προστατικών καρκινικών κυττάρων σε πειραματικές μελέτες με knockout ποντίκια (380,381). Ομοίως, η έκφραση του CD146 έχει συσχετιστεί με προχωρημένο στάδιο της νόσου σε ασθενείς με καρκίνους ωοθηκών και σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα, προβλέποντας σχετικά νωρίς πιθανή υποτροπή του όγκου και κακή πρόγνωση (382,383). Το τελευταίο είναι κάτι που επιβεβαιώθηκε και στα δικά μας αποτελέσματα, καθώς η

έκφραση του CD146 βρέθηκε να επηρεάζει την εμφάνιση του χρόνου υποτροπής της νόσου ($p=0,003$) και ο δείκτης επιβεβαιώθηκε στατιστικώς σημαντικά να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση του χρόνου υποτροπής της νόσου ($p=0,037$).

Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι η έκφραση του CD146 συνδέεται με υψηλής επιθετικότητας καρκίνους αλλά και με τον τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού, παρατήρηση που επιβεβαιώθηκε και στην δική μας πειραματική μελέτη ($p<0,001$) και επιπλέον, έχει παρουσιαστεί ότι αυξημένος κίνδυνος θανάτου συνδέεται με την έκφραση CD146 στο επιθηλιακό διαμέρισμα όγκων του μαστού (376). Οι διαπιστώσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν πρόσφατα και επεκτάθηκαν σε μια μελέτη με 505 πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού από τους Zeng et al. (384). Συγκεκριμένα, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η έκφραση του CD146 συνδέεται με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, υψηλό στάδιο νόσου και κακή πρόγνωση υποδηλώνοντας ότι η έκφραση του CD146 θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός δείκτης πρόβλεψης των φτωχών σε ανταπόκριση στη θεραπεία όγκων. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, ερευνήθηκε εάν η έκφραση του CD146 επάγει την έκφραση μεσεγχυματικών γονιδίων σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος του μαστού. Χρησιμοποιώντας τέσσερις κυτταρικές γραμμές καρκινώματος, παρουσιάστηκε ότι η αυξημένη έκφραση του CD146 συνδέεται με την απώλεια των συνδέσμων επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, βελτιωμένη κυτταρική μετανάστευση και αυξημένη έκφραση μεγχυματικών δεικτών mRNAs. Αντίθετα αποτελέσματα βρέθηκαν σε κύτταρα καρκινώματος με επιθηλιακό φαινότυπο (394,395,396,397). Επίσης σημαντική παρατήρηση, η οποία έχει παρουσιαστεί σε περαιτέρω μελέτες είναι ότι η υπερέκφραση του CD146 συνδέονται με αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία, επιβεβαιώνοντας ότι η κακή πρόγνωση των “θετικών σε CD146 όγκων” στο μαστό σχετίζεται με την CD146 επαγόμενη EMT και κατα συνέπεια την αυξημένη αντίσταση στη χημειοθεραπεία (340,341).

Όπως έχει προαναφερθεί σε πολλές τελευταίες μελέτες αποδεικνύεται ότι ο D146 είναι σημαντικός ρυθμιστής των EMTs στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Πρώτον, η CD146 υπερέκφραση στα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του μαστού καταστέλλει τον επιθηλιακό φαινότυπο ενώ προάγει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο και αυξάνει δραματικά τις μεταναστευτικές και επεμβατικές συμπεριφορές και ιδιότητες των καρκινικών

βλαστοκυττάρων που αφορούν τόσο στην πρωτοπαθή διηθητική εξεργασία, όσο και στο σχηματισμό των μεταστατικών εστιών. Δεύτερον, μείωση των τιμών του δείκτη CD146 σε διηθητικούς μεσεγχυματικούς καρκίνους του μαστού αντιστρέφει τον κακοήθη φαινότυπο τους. Τέλος, εξετάζοντας 505 ιστούς ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού, βρέθηκε ότι η έκφραση CD146 συνδέεται σημαντικά με το υψηλό στάδιο της νόσου, την κακή πρόγνωση των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων του μαστού, παρέχοντας υποστήριξη σε πολλές *in vitro* μελέτες αλλά και μελέτες σε ζώα που διενεργούνται αυτή τη στιγμή. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και στη δική μας πειραματική μελέτη.

Εν κατακλείδι, ο CD146 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην προώθηση της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού μέσω της ρύθμισης της ενεργοποίησης των παραγόντων RhoA και Slug για την προώθηση της EMT. Επιπλέον, η εντυπωσιακή συσχέτιση μεταξύ της αφύσικα υψηλής έκφρασης του CD146 στους τριπλά επιθετικούς καρκίνους του μαστού, τουλάχιστον εξηγεί εν μέρει τον ρόλο του CD146 ως επαγωγέα EMT σε αυτόν τον πιο επιθετικό μοριακό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού (394,395).

Στη μελέτη μας, η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης CD146 ιδιαίτερα σε χαμηλά διαφοροποιημένους ανοσοφαινοτύπους φαίνεται να υποστηρίζει την υπόθεση πως ο MCAM προάγει την διαφοροποίηση, την έκφραση και τον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στο μαστό (396,397,398) και σχετίζεται ιδιαίτερα με τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους παίζοντας σημαντικό ρόλο σε σχέση με την εμφάνιση του χρόνου υποτροπής που σχετίζεται και με τη μετάσταση στον καρκίνο του μαστού. Πράγματι και στη μελέτη μας επιβεβαιώθηκαν οι αναφορές στη βιβλιογραφία, καθώς η συχνότητα της έκφρασης του MCAM παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αυξημένη στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικό και βασικού τύπου μοριακό υπότυπο, δηλαδή στις πιο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού. Επίσης αυξημένη ήταν η έκφραση του MCAM στους ασθενείς με Her2 θετικό μοριακό υπότυπο σε μικρότερο όμως βαθμό από τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους. Μικρότερη ήταν και η έκφρασή του δείκτη στους ασθενείς με αυλικού τύπου B και ακόμα μικρότερη σε αυτούς με αυλικού τύπου A μοριακό υπότυπο, ακολουθώντας συνολικά μια φθίνουσα πορεία στις λιγότερο επιθετικές ομάδες ανοσοφαινοτύπων. Η έκφραση δηλαδή του MCAM βρέθηκε στατιστικώς σημαντικά να συνδέεται με επιθετικό μοριακό υπότυπο στον μαστό

(βασικού τύπου και τριπλά αρνητικό) ($p<0,001$), με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς ($p=0,04$), με υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας ($p=0,008$) στο ολικό δείγμα των ασθενών, με υψηλό στάδιο της νόσου ($p=0,006$) στο ολικό δείγμα καθώς και με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p<0,001$) δείχνοντας πως οι περιπτώσεις ασθενών που εκφράζουν τον MCAM έχουν στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα με δείκτη Ki-67 $>20\%$. Παρότι η έκφραση του CD146 δεν βρέθηκε να επηρεάζει την ολική επιβίωση στα πεντε έτη των ασθενών, ωστόσο το πιο σημαντικό εύρημα της μελέτης αφορά στον χρόνο υποτροπής της νόσου, καθώς η έκφραση του MCAM επηρεάζει την εμφάνιση του χρόνου υποτροπής ($p=0,003$) και βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση χρόνου υποτροπής ($p=0,037$). Συγκεκριμένα, 16/91 από τους ασθενείς μας που δεν εκφράζουν CD146 και 21/50 από τους ασθενείς μας που εκφράζουν CD146 παρουσιάζουν υποτροπή, ενώ ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν CD146 είναι οι 42 μήνες και για αυτούς που δεν εκφράζουν CD146 είναι οι 52 μήνες.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ της ανάδειξης του MCAM σε αξιόπιστο δείκτη επιθετικής συμπεριφοράς στον καρκίνο του μαστού, υπογραμμίζοντας την ανάγκη εμπειριστατωμένης μελέτης της έκφρασης του MCAM σε μεγαλύτερες μελέτες ασθενών. Καθώς πολλές μελέτες τονίζουν ολοένα και περισσότερο την πρόσθετη θεραπευτική αποτελεσματικότητα της συνδυασμένης θεραπείας του αντι-VEGF αντισώματος bevacizumab και του αντι-CD146 αντισώματος AA98, αφού βρέθηκε να μειώνει την πυκνότητα των μικροαγγείων στους όγκους της ομάδας που έλαβε συνδυασμένη θεραπεία σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν τον κάθε παράγοντα ξεχωριστά (340,341), θα μπορούσε να ισχυριστεί κανείς πως ο CD146 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας πιθανός αναπτυξιακός δυναμικός θεραπευτικός στόχος στον καρκίνο του μαστού, ιδιαίτερα όσον αφορά στους τριπλά αρνητικούς μοριακούς υποτύπους. Ένα ερώτημα μάλιστα που γεννάται είναι κατά πόσο η κλινική αποτελεσματικότητα της αντι-VEGF θεραπείας θα μπορούσε να αυξηθεί με αντι-CD146 κατευθυνόμενη θεραπεία και στον καρκίνο του μαστού στο μέλλον (340,341).

2.4.2. Νεστίνη

Πέραν του δομικού της ρόλου, η έκφραση της νεστίνης στο νευρικό σύστημα σχετίζεται άμεσα με το στάδιο διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων αφού έχει αναδειχθεί σε δείκτη νευροεπιθηλιακών βλαστοκυττάρων και καρκινικών ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επίσης εκφράζεται στους μυοβλάστες στα αρχικά στάδια μυογένεσης συμβάλλοντας στην μυϊκή ανάπτυξη (239,241). Έχει παρουσιαστεί πως η νεστίνη εκφράζεται σε ποικίλους τύπους καρκινικών κυττάρων και προωθεί την αγγειογένεση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την μετάσταση στον αναπλαστικό καρκίνο του θυροειδή αδένα, στο κακοήθες μελάνωμα, στον καρκίνο του προστάτη, του γαστρεντερικού σωλήνα και του παγκρέατος. Σε σχέση με τον μαστό φαίνεται πως η νεστίνη εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό σε τριπλά αρνητικούς καρκίνους, φλεγμονώδη καρκινώματα και καρκίνους σταδίου T4. Ειδικότερα, αναλύσεις Kaplan-Meyer δείχνουν πως η παρουσία νεστίνης σε κύτταρα όγκων σχετίζεται με άσχημη πρόγνωση όσον αφορά στην πενταετή επιβίωση των ασθενών με στάδιο νόσου T4 (237,238,241).

Τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκφραση της νεστίνης είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία. Κανονικά, η έκφραση της νεστίνης αυξάνεται στους διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και αντίστοιχα μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Μετά από τραυματισμό ιστών (π.χ. στο νευρικό σύστημα, στους νεφρούς και στο πάγκρεας) η νεστίνη εκφράζεται σε κύτταρα με ιδιότητες προγονικών κυττάρων. Τα συγκεκριμένα κύτταρα φαίνεται ότι δρουν ως απόθεμα ιστού και ως εκ τούτου συμμετέχουν σε διαδικασίες επούλωσης των ιστών. Μετά από πρόκληση ισχαιμίας στο νευρικό σύστημα, η νεστίνη βρέθηκε να εμπλέκεται στη ρύθμιση της δομής των κυττάρων και την αναδιαμόρφωση τους (241). Σε μελέτες στους νεφρούς, μετά από διάμεσο σωληναριακό τραυματισμό ακολουθούμενο από απόφραξη, η νεστίνη σχετίζεται με την ενεργοποίηση του TGFβ και την ενεργοποίηση των διάμεσων σωληναριακών μυοϊνοβλαστών προωθώντας την νεφρική ίνωση ως μέρος της διαδικασίας επούλωσης του ιστού (256). Στους νεφρούς μάλιστα, η αλληλεπίδραση μεταξύ νεστίνης και TGFβ μετά από τραυματισμό του ιστού βρέθηκε να ενισχύει την κυτταρική μετανάστευση (321), ενώ τελευταίες πειραματικές μελέτες σε ποντίκια επιβεβαιώνουν πως αλλαγές

στην οργάνωση του κυτταροσκελετού κατά τη διάρκεια της διαβητικής νεφροπάθειας προκαλούνται από την αύξηση της έκφρασης της νεστίνης στο σπειράμα (256). Όσον αφορά σε μελέτες σε παγκρέατα ασθενών, βρέθηκε πως η νεστίνη μπορεί να ενεργοποιήσει πρόδρομα εξωκρινή παγκρεατικά κύτταρα μετά από παγκρεατικό τραυματισμό όπως μετά από ένα χειρουργείο ημιπαγκρεατεκτομής (274).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου, η νεστίνη φαίνεται να εμφανίζει διπλό ρόλο. Πρώτον, η νεστίνη έχει βρεθεί να εκφράζεται σε κύτταρα που μοιάζουν με καρκινικά βλαστικά κύτταρα και σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα και ως εκ τούτου, μπορεί να συμβάλλει στην επιθετική συμπεριφορά αυτών των κυττάρων. Μια ερώτηση που απομένει να απαντηθεί αφορά στο εάν η νεστίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης στη διαδικασία αναγνώρισης αυτών των υποπληθυσμών καρκινικών κυττάρων και εάν η νεστίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός θεραπευτικός στόχος. Δεύτερον, η νεστίνη έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην αγγειογένεση των όγκων μέσω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων και ως εκ τούτου, μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη του όγκου. Η επιλεκτική έκφραση της νεστίνης π.χ. σε αιμοφόρα αγγεία σε καρκίνους του παχέος εντέρου έθεσε το ζήτημα σε σχέση με το πώς η νεστίνη εμπλέκεται ακριβώς στη διαδικασία της αγγειογένεσης των όγκων (320). Η παρατήρηση ότι σε κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου, υπογραμμίζει σαφώς την ιδέα ότι οι διαρθρωτικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον κυτταροσκελετό των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορούν να προκληθούν από τη νεστίνη. Δεδομένου ότι η χρήση της αντι-αγγειογόνου θεραπείας σε κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των «θετικών σε νεστίνη και CD133 κυττάρων» του όγκου, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με στόχο την επίλυση του ερωτήματος σε σχέση με το πώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων του όγκου αλληλεπιδρούν με τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» (320).

2.4.2.1. Έκφραση της νεστίνης σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και αγγειογένεση.

Έχει ευρέως αναφερθεί ότι τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν νεστίνη (315). Συγκεκριμένα, η έκφραση της νεστίνης έχει παρατηρηθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του ωχρού σωματίου (316) και σε πολλαπλασιαζόμενα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι σε ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα (317). Επιπλέον, θετική συσχέτιση έχει βρεθεί μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και την αγγειογένεση (318,319). Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τελευταία στοιχεία δείχνουν ότι η νεστίνη εκφράζεται κυρίως σε νεοσχηματισμένα αιμοφόρα αγγεία σε μία ποικιλία καρκίνων (316,319). Τόσο η πυκνότητα των μικροαγγείων (MDV: Microvessel Density) όσο και η ισχυρή έκφραση της νεστίνης έχουν συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ορθοκολικό καρκίνο (284) και καρκίνο του προστάτη (318). Σε καρκίνο του παχέος εντέρου έχει παρουσιαστεί ότι η νεστίνη εκφράζεται έντονα σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι σε καρκινικά κύτταρα (284). Σε κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου, συσσωρευμένες μελέτες υποστηρίζουν την ιδέα ότι υπάρχει ένας συσχετισμός μεταξύ μικροαγγειακής πυκνότητας και «θετικών σε νεστίνη καρκινικών κυττάρων». Με άλλα λόγια, όγκοι όπως ολιγοδενδρογλοιώματα και γλοιοβλαστώματα βρέθηκε να παρουσιάζουν την υψηλότερη μικροαγγειακή πυκνότητα ενώ περιείχαν ταυτοχρόνως τον υψηλότερο αριθμό «θετικών σε νεστίνη καρκινικών κυττάρων». Σε σύγκριση με τα «αρνητικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα», τα «θετικά σε νεστίνη καρκινικά κύτταρα» βρέθηκαν να βρίσκονται πιο κοντά και να αναπτύσσουν περισσότερες επαφές με τα τριχοειδή αγγεία των όγκων. Επιπλέον, μελέτες σε ξενομοσχεύματα μυελοβλαστώματος παρουσίασαν ότι «κυττάρα θετικά σε νεστίνη» εμφάνιζαν χαρακτηριστικά καρκινικών βλαστικών κυττάρων και συνδέονταν στενά με τα αγγεία. Ταυτοχρόνως, οι Calabrese et al. (320) ανέφεραν ότι σε κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου υπάρχει μια περιαγγειακή ζώνη (perivascular niche), στην οποία τα καρκινικά βλαστοκύτταρα όπου βρίσκονται αλληλεπιδρούν με τα αιμοφόρα αγγεία. Ως αποτέλεσμα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να παρέχουν το απαραίτητο μικροπεριβάλλον που προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων που είναι θετικά σε νεστίνη και ομοιάζουν με καρκινικά βλαστικά κύτταρα (320). Ένα ερώτημα που απομένει να απαντηθεί επίσης είναι κατά πόσο υπάρχει ένας βρόχος ανάδρασης και σύνδεσης μεταξύ

«κυττάρων θετικών σε νεστίνη» με ιδιότητες καρκινικών βλαστικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Οι Calabrese et al. διαπίστωσαν επίσης ότι η εφαρμογή αντιαγγειογενετικής θεραπείας οδήγησε σε σημαντική μείωση των κυττάρων του όγκου που ήταν θετικά σε νεστίνη και CD133 (320). Τα συγκεκριμένα δεδομένα υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένας κοινός μηχανισμός που διέπει την αγγειογένεση των όγκων μέσω των αλληλεπιδράσεων των «θετικών σε νεστίνη κυττάρων» με ιδιότητες όμοιες με αυτές των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.

2.4.2.2. Έκφραση της νεστίνης στον μαστό

Πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη παρουσίασε την ποσοτικοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων σε δείγματα αίματος που λαμβάνονταν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με τη χρήση RT- qPCR σε συνδυασμό με εκκινητές ειδικούς για τους δείκτες βλαστοκυττάρων νεστίνη, Nanog, Oct3/4, SOX2 και CD34. Μία γραμμική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης αυτών των δεικτών και του βαθμού κακοήθειας καθώς και του σταδίου της νόσου, υπογραμμίζοντας τη σημασία αυτών των δεικτών σε σχέση με την εμπλοκή τους στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (297). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι «CD44+/CD24-/low ανθρώπινα καρκινικά μαστικά κύτταρα» είναι ικανά να επάγουν όγκους σε ανοσοανεπαρκείς ποντικούς. Τα συγκεκριμένα κύτταρα παρουσιάζονται να συμπεριφέρονται σαν βλαστικά καρκινικά κύτταρα καθώς είναι σε θέση να προωθούν CD44+/CD24-/low κύτταρα και διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων με διαφορετικούς φαινοτύπους (298). Σε μια άλλη μελέτη, όπου «CD44+/CD24- μη καρκινικά κύτταρα» συγκρίθηκαν με «CD44+/CD24- κύτταρα», παρουσιάστηκε ότι ιδιαίτερα τα «CD44+CD24- κύτταρα» με υψηλή έκφραση των δεικτών Oct4 και νεστίνης επέδειξαν υψηλή ογκογόνο δυναμικότητα, όπως αυτή μετριέται από την ικανότητα τους να σχηματίζουν mammospheres in vitro. Μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές αναλύσεις συσχέτισαν την έκφραση των Oct4 και νεστίνης με νεότερη ηλικία έναρξης της νόσου, τον ιστολογικό βαθμό βαθμό κακοήθειας, τη λεμφαδενική διήθηση, τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και την

μικρότερη επιβίωση των ασθενών, κάτι που με εξαίρεση τη λεμφαδενική διήθηση επιβεβαιώθηκε και στην δική μας μελέτη. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η νεστίνη παρουσιάζει υψηλότερη έκφραση σε διηθητικά πορώδη αδenoκαρκινώματα σε σύγκριση με *in situ* πορώδη καρκινώματα μαστού και ότι υπάρχει μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της νεστίνης και της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων/προγεστερόνης (300). Σε μία άλλη μελέτη σημειώθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της αύξησης των τιμών της νεστίνης σε διηθητικά καρκινικά κύτταρα του μαστού που παρουσίαζαν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, καθώς και σε εξαιρετικά επιθετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού, όπως στους βασικού τύπου καρκίνους και τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού (301,302). Αθροιστικά από τα παραπάνω δημοσιευμένα δεδομένα φαίνεται ότι σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού η νεστίνη εκφράζεται σε κύτταρα με ιδιότητες βλαστοκυττάρων.

Από την μελέτη μας επιβεβαιώθηκαν με εξαίρεση τη λεμφαδενική διήθηση όλες οι παραπάνω συσχετίσεις. Η ανοσοϊστοχημεία έδειξε πως η νεστίνη εκφράστηκε στα κύτταρα του όγκου και βρέθηκε στατιστικά σημαντική:

1. σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό ιστικό δείγμα των ασθενών ($p=0,021$)
2. σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών δείχνοντας πως η νεστίνη δεν εκφράζεται σε μέση ηλικία ασθενών τα 65 έτη, ενώ εκφράζεται σε σημαντικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε ασθενείς με μέση ηλικία τα 54 έτη ($p=0,029$). Απο τα παραπάνω γεννιέται και το ερώτημα κατα πόσο η νεστίνη θα μπορούσε να δείξει νόσο από καρκίνο του μαστού σε ασθενείς με μικρότερη ηλικία. Φυσικά αυτο θα πρέπει σε κάθε περίπτωση να επιβεβαιωθεί σε μελέτες με πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών.
3. σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών δείχνοντας πως οι περιπτώσεις ασθενών που εκφράζουν νεστίνη έχουν στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα με δείκτη Ki-67 $>20\%$ ($p=0,07$) και
- 4 σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στους ασθενείς με τριπλά αρνητικό ανοσοφαινότυπο ($p=0,035$), αλλά όχι με λεμφαδενική διήθηση ή με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους τόσο στο ολικό δείγμα όσο και στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους.

Παρότι η έκφραση της νεστίνης δεν βρέθηκε στη μελέτη μας να επηρεάζει την ολική επιβίωση στα πεντε έτη των ασθενών, ωστόσο σημαντικό εύρημα αποτελεί ότι επηρεάζει το χρόνο εμφάνισης υποτροπής της νόσου ($p=0.022$), χωρίς όμως να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ($p=0,545$). Συγκεκριμένα βρήκαμε ότι, 26/115 ασθενείς που δεν εκφράζουν νεστίνη και 11/26 ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη παρουσιάζουν υποτροπή και ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη είναι οι 39 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν νεστίνη είναι οι 50 μήνες

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν υπέρ της ανάδειξης της νεστίνης σε αξιόπιστο δείκτη επιθετικής συμπεριφοράς στον καρκίνο του μαστού. Επίσης, η νεστίνη βρέθηκε να εκφράζεται σε τριπλά αρνητικά καρκινώματα ($p<0,001$), αλλά όχι σε Her2 θετικά καρκινώματα και ούτε σε αυλικού τύπου B ή αυλικού τύπου A μοριακούς υποτύπους, δηλαδή στις λιγότερο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού. Στην παρούσα δηλαδή μελέτη, η νεστίνη βρέθηκε κατα προτίμηση να εκφράζεται σε όγκους τριπλά αρνητικούς και σχετίζεται να με την έλλειψη ER και PR υποδοχέων, ενώ ήταν ελάχιστα εκφρασμένη σε αυλικού τύπου καρκινώματα. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν ότι παρόλο που η συμμετοχή της νεστίνης σε μοριακούς μηχανισμούς των τριπλών αρνητικών καρκίνων στο μαστό είναι ακόμα ασαφής, θα μπορούσε να αναδειχθεί σε έναν επιλεκτικό δείκτη καρκίνων με τριπλά αρνητικό και βασικού τύπου μοριακό υπότυπο στον καρκίνο του μαστού, που σχετίζονται με επιθετική ανάπτυξη και κακή πρόγνωση. Κατόπιν αξιολόγησης αυτών των παρατηρήσεων, εμείς εικάζουμε ότι η έκφραση της νεστίνης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στον χαρακτηρισμό όγκων με μια επιθετική κλινική συμπεριφορά, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της νεστίνης στα καρκινικά κύτταρα και τα αιμοφόρα αγγεία των όγκων μπορεί να θεωρηθεί ως σημαντικός παράγοντας που οδηγεί σε κακή πρόγνωση. Περαιτέρω μελέτες αναμένονται και καθίστανται επιτακτική ανάγκη για να καθορίσουν τον βιολογικό ρόλο της νεστίνης στην αιτιολογία αυτών των υποομάδων των καρκίνων του μαστού, σε μία προσπάθεια εντοπισμού επιλεκτικότερων δεικτών και θεραπευτικών στόχων που θα βελτιώσουν την ανίχνευση, διάγνωση και θεραπεία των καρκινωμάτων του μαστού.

2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό της συχνότητας έκφρασης δύο μοριακών δεικτών βλαστικής κυτταρικής επιφάνειας και συγκεκριμένα της νεστίνης και του CD146 (MCAM) στις διαφορετικές ομάδες ασθενών και στους διαφορετικούς μοριακούς υποτύπους που προέκυψαν και παρουσιάζονται περίπου ως εξής: 42 τριπλά-αρνητικά καρκινώματα μαστού ανάμεσα στα οποία προέκυψε μια μικρότερη ομάδα 13 βασικού τύπου όγκων, 33 HER2+ καρκινώματα, 33 αυλικού τύπου B και 33 αυλικού τύπου A όγκοι και τα συμπεράσματα της μελέτης μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

1. Η συχνότητα της έκφρασης της νεστίνης παρατηρείται αυξημένη στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο και στους όγκους με μοριακό προφίλ βασικού τύπου, που αποτελούν και τις πιο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού (**p<0,001**). Αντίθετα η έκφραση της νεστίνης δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με Her2 θετικό μοριακό υπότυπο, ενώ μικρή ήταν και η έκφρασή της στους ασθενείς με αυλικού τύπου B και ακόμα μικρότερη σε αυτούς με αυλικού τύπου A μοριακό υπότυπο, δηλαδή στις λιγότερο επιθετικές μορφές. Αντίστοιχα, τα επίπεδα της έκφρασης του CD146 (MCAM) παρατηρούνται ιδιαίτερα αυξημένα στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικό υπότυπο και στα καρκινώματα με μοριακό προφίλ βασικού τύπου, δηλαδή στις πιο επιθετικές μορφές στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα η έκφραση του MCAM ήταν εμφανώς πιο αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη της νεστίνης τόσο στους ασθενείς με τριπλά αρνητικούς όγκους όσο και στις άλλες υποομάδες ανοσοφαινοτύπων που προέκυψαν (**p<0,001**). Αντίθετα με την έκφραση της νεστίνης, η έκφραση του MCAM παρατηρήθηκε επίσης αυξημένη στους ασθενείς με Her2+ μοριακό υπότυπο σε μικρότερο όμως βαθμό από τους τριπλά αρνητικούς καρκίνους. Μικρότερη ήταν και η έκφρασή της στους ασθενείς με αυλικού τύπου B και ακόμα μικρότερη σε αυτούς με αυλικού τύπου A μοριακό υπότυπο, δηλαδή στις λιγότερο επιθετικές μορφές, ακολουθώντας συνολικά μια φθίνουσα πορεία στις λιγότερο επιθετικές ομάδες ανοσοφαινοτύπων. Ακριβώς την ίδια φθίνουσα πορεία ακολουθεί και η έκφραση του δείκτη P53 από την πιο

- επιθετική στην λιγότερο επιθετική ομάδα ανοσοφαινοτύπου με στατιστική σημαντική διαφορά ($p<0,001$).
2. Μεταξύ των δύο πιο επιθετικών μας ομάδων, δηλαδή στην υπο-ομάδα των καρκινωμάτων με τον βασικού τύπου υπότυπο (την πιο επιθετική μας ομάδα) και στην ομάδα των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην έκφραση της νεστίνης ($p=0,741$) και του MCAM ($p=0,453$).
 3. Η έκφραση τόσο της νεστίνης (**$p=0,021$**) όσο και του MCAM (**$p=0,008$**) βρέθηκε στατιστικά σημαντική σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας στο ολικό ιστικό δείγμα των ασθενών ($N=134$). Από τα παρακάτω αποτελέσματα φαίνεται πως τόσο η νεστίνη όσο και ο MCAM εκφράζεται σε υψηλότερο ποσοστό σε ασθενείς με Grade III ιστολογικό βαθμό κακοήθειας και σε μικρότερο ποσοστό σε ασθενείς με Grade II και Grade I ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση του πειράματός μας, δηλαδή ότι η νεστίνη και ο MCAM εκφράζονται σε καρκινώματα με τον υψηλότερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (χαμηλή διαφοροποίηση), τα οποία αποτελούν και τα πιο επιθετικά καρκινώματα.
 4. Η έκφραση του MCAM (**$p=0,006$**) βρέθηκε στατιστικά σημαντική σε σχέση με το στάδιο νόσου στο ολικό δείγμα των ασθενών ($N=136$). Η μελέτη μας έδειξε πως οι ασθενείς (ποσοστό 36,4%) με στάδιο νόσου stage I εκφράζουν τον δείκτη MCAM στο μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με ασθενείς, οι οποίοι είχαν στάδιο νόσου stage II αλλά και σε σύγκριση με ασθενείς με στάδιο νόσου stage III, οι οποίοι εκφράζουν τον δείκτη CD146 στο υψηλότερο ποσοστό. Το ποσοστό στατιστικής σημαντικότητας επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση του πειράματός μας, δηλαδή ότι ο δείκτης CD146 εκφράζεται σε ασθενείς με υψηλό στάδιο νόσου. Η έκφραση της νεστίνης σε σχέση με το στάδιο νόσου δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,426$).
 5. Η έκφραση τόσο της νεστίνης (**$p=0,007$**) όσο και του MCAM (**$p=0,000$**) σε σχέση με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα των ασθενών βρέθηκε στατιστικά σημαντική. Η μελέτη μας παρουσιάζει πως σε ολικό δείγμα 135 ασθενών οι περιπτώσεις ασθενών που εκφράζουν νεστίνη έχουν

στατιστικά μεγαλύτερη συχνότητα με δείκτη Ki-67 >20%, με σημαντικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Το ίδιο ισχύει ακριβώς ξεχωριστά και για τον δείκτη MCAM.

6. Η έκφραση της νεστίνης σε σχέση με την ηλικία των ασθενών στο ολικό δείγμα αυτών (N=106) βρέθηκε στατιστικά σημαντική (**p=0,029**). Συγκεκριμένα η μελέτη μας έδειξε πως η νεστίνη δεν εκφράζεται σε μέση ηλικία ασθενών τα 64 έτη, ενώ εκφράζεται σε σημαντικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας σε ασθενείς με μέση ηλικία τα 54 έτη. Απο τα παραπάνω γεννιέται και το ερώτημα κατα πόσο η νεστίνη θα μπορούσε να δείξει νόσο από καρκίνο του μαστού σε ασθενείς με μικρότερη ηλικία. Η έκφραση του MCAM σε σχέση με τη ηλικία των ασθενών δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική (p=0,170).
7. Η έκφραση τόσο της νεστίνης (**p=0,035**) όσο και του CD146 (**p=0,04**) βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές σε σχέση με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου στον ιστό των ασθενών με τριπλά αρνητικά μοριακό υπότυπο (N=42). Η μελέτη μας έδειξε ότι στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους, η νεστίνη και ο MCAM εκφράζονται σε υψηλότερο ποσοστό σε ασθενείς με το μεγαλύτερο μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου, δηλαδή για όγκους >5cm με σημαντικό επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας. Σε ασθενείς με μέγεθος όγκου >2cm και ≤5cm η νεστίνη εκφράζεται σε αρκετά μικρότερο ποσοστό. Αντίθετα σε ασθενείς με μέγεθος όγκου ≤2cm εκφράστηκαν και οι δύο δείκτες σε μη αναμενόμενο πολύ υψηλό ποσοστό. Το τελευταίο εύρημα για όγκους pT1 θα έπρεπε να έχει την μικρότερη τιμή, καθώς τόσο η νεστίνη όσο και ο CD146 αναμένεται σε αυτούς τους όγκους να εκφράζεται στην χαμηλότερη τιμή συγκριτικά με τους pT2 και τους pT3 όγκους. Το παραπάνω σφάλμα πιθανώς να οφείλεται στο σχετικά μικρό δείγμα των ασθενών μας N=42 με τριπλά αρνητικό μοριακό υπότυπο, γι αυτό προκύπτει και ως περιορισμός στο πείραμά μας.
8. Η μελέτη της έκφρασης τόσο της νεστίνης (p=0,993) όσο και του MCAM (p=0,262) σε σχέση με την λεμφαδενική διήθηση στο ολικό ιστικό δείγμα των ασθενών μας αλλά και στην υποομάδα των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική (p=0,717 και p=0,881 αντίστοιχα). Επίσης η συχνότητα έκφρασης τόσο της νεστίνης όσο και του MCAM στο ολικό δείγμα

- των ασθενών μας δεν σχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου ($p=0,098$ και $p=0,119$ αντίστοιχα) και την έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Στην υποομάδα των τριπλά αρνητικών καρκίνων τόσο η έκφραση της νεστίνης όσο και του MCAM δεν σχετίζονται στατιστικώς με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας ($p=1$ και $p=0,353$ αντίστοιχα), το στάδιο νόσου ($p=0,083$ -NS και $p=0,228$ αντίστοιχα) και τον δείκτη p53.
9. Η έκφραση της νεστίνης και του CD146 δεν επηρεάζουν την ολική επιβίωση στα πεντε έτη των ασθενών ($p=0,158$ και $p=0,457$ αντίστοιχα).
10. Η νεστίνη επηρεάζει το χρόνο εμφάνισης υποτροπής (**$p=0.022$**). Ωστόσο δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα ($p=0,545$). Συγκεκριμένα, 26/115 ασθενείς που δεν εκφράζουν νεστίνη και 11/26 ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη παρουσιάζουν υποτροπή και ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν νεστίνη είναι οι 39 μήνες ενώ για αυτούς που δεν εκφράζουν νεστίνη είναι οι 50 μήνες.
11. Η έκφραση του CD146 (MCAM) επηρεάζει την εμφάνιση του χρόνου υποτροπής (**$p=0,003$**) και αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την εμφάνιση χρόνου υποτροπής (**$p=0,037$**). Συγκεκριμένα, 16/91 ασθενείς που δεν εκφράζουν CD146 και 21/50 ασθενείς που εκφράζουν CD146 παρουσιάζουν υποτροπή, ενώ ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς υποτροπή για τους ασθενείς που εκφράζουν CD146 είναι οι 42 μήνες και για αυτούς που δεν εκφράζουν CD146 είναι οι 52 μήνες.

Πίνακας 38. Συνολικά στοιχεία του υπό μελέτη ολικού δείγματός μας.

Κλασικά κλινικοπαθολογοανατομικά στοιχεία του υπό μελέτη Πληθυσμού		
Παράμετρος	Στατιστική Σημαντικότητα P	
	Νεστίνη	CD146 (MCAM)
Μοριακός υπότυπος: Τριπλά αρνητικός, HER2 θετικός, Αυλικού τύπου B, Αυλικού τύπου A	P<0,001	P<0,001
Ιστολογικό Grade στο ολικό δείγμα ασθενών	P=0,0021	P=0,008
Ιστολογικό Grade στους τριπλά-αρνητικούς ασθενείς.	P=1-NS	P=0,353-NS
Παθολογοανατομικό στάδιο pTNM-Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου στο ολικό δείγμα ασθενών.	P=0,098-NS	P=0,119-NS
Παθολογοανατομικό στάδιο pTNM-Μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου στους τριπλά-αρνητικούς ασθενείς	P=0,035 (περιορισμός)	P=0,04 (περιορισμός)
Λεμφαδενική διήθηση στο ολικό δείγμα ασθενών.	P=0,993-NS	P=0,262-NS
Λεμφαδενική διήθηση στους τριπλά-αρνητικούς ασθενείς.	P=0,717-NS	P=0,881-NS
Στάδιο Νοσου (AJCC) στο ολικό δείγμα ασθενών	P=0,426-NS	P=0,006
Στάδιο Νοσου (AJCC) στους τριπλά-αρνητικούς	P=0,083-NS	P=0,228-NS

ασθενείς.		
Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο ολικό δείγμα ασθενών	P=0,007	P<0,0001
Μικρότερη Ηλικία	P=0,029	P=0,170-NS
Πενταετής Επιβίωση	P=0,158-NS	P=0,457-NS
Πενταετής Χρόνος Υποτροπής	P=0,022	P=0,003
Ανεξάρτητος Προγνωστικός Δείκτης για την εμφάνιση χρόνου υποτροπής.	P=0,542-NS	P=0,037

Βιβλιογραφία

1. Καμμάς Αντώνης: Μαθήματα Ανατομικής. Βήτα Ιατρικές Εκδόσεις, 2010.
2. Agur A.M.R., Dalley A.F. : Grant's atlas of anatomy. 13th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
3. Netter Frank H.: Atlas of Human Anatomy. 5th Ed. Saunders, 2011.
4. A. G. Parks (1959). The Micro-Anatomy of the Breast. Hunterian Lecture delivered at the Royal College of Surgeons of England. Ann R Coll Surg Engl. 25(4): 235–251.
5. M. H. Ross & W. Pawlina.: Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 18th ed., Lippincott Wiliams & Wilkins. 2006
6. Αποστολάκης Γ.: Ανατομική του ανθρώπου. Εκδόσεις Παπαζήση, 1968.
7. WHO (2008). The global burden of disease: 2004 update.
8. IARC (2008). World cancer report 2008. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
9. U.S. Breast Cancer Statistics 2015.
http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics
10. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F et al (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol 9: 730-756.
11. Downing A, Prakash K, Gilthorpe MS et al (2007). Socioeconomic background in relation to stage at diagnosis, treatment and survival in women with breast cancer. Br J Cancer 96: 836-840.
12. American Cancer Society Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010, American Cancer Society, Inc: Atlanta.
13. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N et al (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. N Engl J Med 356: 1670-1674.
14. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P et al (2001). Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. N Engl J Med 345: 1378-1387.
15. Berry, D. A., Cronin, K.A., Plevritis, S.K. et al (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. N England J Med. 353 (17): p.1784-92
16. World Health Organisation (WHO), <http://www.who.int/en/>.

17. Ford D, Easton DF, Stratton M et al (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62: 676-689.
18. Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD et al (1999). A systematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 843-854.
19. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66-71.
20. King MC, Marks JH, Mandell JB (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302: 643- 646.
21. Roa BB, Boyd AA, Volcik K et al (1996). Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 14: 185-187.
22. Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L et al (1997). BRCA1 sequence variations in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. Institut Curie Breast Cancer Group. *Am J Hum Genet* 60: 1021-1030.
23. Pierce LJ, Strawderman M, Narod SA et al (2000). Effect of radiotherapy after breast-conserving treatment in women with 93 breast cancer and germline BRCA1/2 mutations. *J Clin Oncol* 18: 3360- 3369.
24. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002a). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536.
25. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002b). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536.
26. van de Vijver MJ, He YD, van de Vijver MJ et al (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*, 347(25), 1999- 2009.
27. Kinzler K, Vogelstein B (1994). Clinical implications of basic research: cancer therapy meets p53. *N Engl J Med* 331: 49-53.
28. Kurose, K., Gilley, K., & Matsumoto, S. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature genetics*. Retrieved from <http://www.nature.com/ng/journal/v32/n3/abs/ng1013.html>
29. Lynch, HT, Lynch J, Conway T et al (1994). Hereditary breast cancer and family cancer syndromes. *World J Surg* 18(1): 21-31.

30. Bennett IC, Gattas M, Teh BT et al (1999). The genetic basis of breast cancer and its clinical implications. *Aust N Z J Surg* 69(2): 95-105.
31. Anderson, D. E. (1974). Genetic study of breast cancer: identification of a high risk group. *Cancer* 34(4): 1090-7.
32. Anderson, D. E. (1977). Breast cancer in families. *Cancer* 40(4 Suppl):1855-60.
33. Hoskins K, Stopfer J, Calzone K, et al (1995). Assessment and counselling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. *JAMA* 273: 577-585.
34. Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility, adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1730–6.
35. Berry DA, Iversen ES, Gudbjartsson DF et al (2002). BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*; 20: 2701–12.
36. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al (1989). Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst*; 81: 1879–86.
37. Costantino JP, Gail MH, Pee D, et al (1999). Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*; 91: 1541–8.
38. Claus EB, Risch N, Thompson WD (1994). Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: Implications for risk prediction. *Cancer*; 73:643–51. CrossRefMedline.
39. Hamilton, A.S. and Mack, T.M. (2003). Puberty and genetic susceptibility to breast cancer in a case control study in twins. *N Engl J Med*; 348 (23): p.2313-22.
40. MacMahon B, D. Trichopoulos, et al (1982). Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer* 29(1): 13-6.
41. Newcomb PA, BE Storer, et al (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 330(2): 81-7.
42. Stuebe AM, Willett WC, Xue F et al (2009). Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med*, 2009. 169(15): p.1364-71

43. Fisher B, Dignam J, Wolmark N et al (1999). Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet*.353(9169)
44. Dupont W.D. and Page, D.L (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*. 312(3):p. 146-51
45. Dupont, W.D., Page, D.L., Parl, F.F (1994). Vnencak-Jones, C.L., Plummer, W.D., Jr., Rados, M.S., and Schuyler, P.A., Long term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *N Engl J Med*.331 (1):p. 10-5
46. Henderson IC (1993). Risk factors for breast cancer development. *Cancer*, 71(6 Suppl): p.2127-40
47. Degnim, A.C., Visscher, D.W., Berman, H.K. et al (2007). Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol*. 25(19): p.2671-7
48. Poola I, Abraham J, Marshalleck JJ et al. (2008) Molecular risk assessment for breast cancer development in patients with ductal hyperplasia. *Clin Cancer Res* 15: 1274-1280.
48. Palomaki GE, McClain MR, Steinort K, et al (2006). Screen-positive rates and agreement among six family history screening protocols for breast/ovarian cancer in a population-based cohort of 21- to 55-year-old women. *Genet Med*; 8: 161–8
49. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*; 378: 789–92
50. US Preventive Services Task Force (2005). Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: recommendation statement. *Ann Intern Med*; 143: 355–61
51. Wahner-Roedler DL, Nelson DF, Croghan IT et al (2003). Risk of breast cancer and breast cancer characteristics in women treated with supradiaphragmatic radiation for Hodgkin lymphoma: Mayo Clinic experience. *Mayo Clin Proc*; 78: 708–15
52. Arpino G, Laucirica R, Elledge RM (2005). Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications. *Ann Intern Med*; 143: 446–57
53. Urban J (1967). Bilaterality of cancer of the breast: Biopsy of the opposite breast. *Cancer*; 20: 1867–70

54. Rosen PP, Kosloff C, Lieberman PH et al (1978). Lobular carcinoma in situ of the breast. Detailed analysis of 99 patients with average follow-up of 24 years. *Am J Surg Pathol*; 2: 225–51
55. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med* 2004; 350: 1430–41
56. Agency for Healthcare Research and Quality. Diagnosis and Management of Specific Breast Abnormalities. AHRQ Publication No. 01-E045, April 2001. Available from: <http://www.ahrq.gov/clinic/epcsums/abnorsum.htm>. Accessed 26 June 2008.
57. Evans JS, Wennberg JE, McNeil BJ (1986). The influence of diagnostic radiography on the incidence of breast cancer and leukemia. *N Engl J Med* 315: 810-815.
58. Bhatia S, Yasui Y, Robison LL et al (2003). High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol* 21: 4386-4394.
59. McCormack VA, dos Santos Silva I. (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15: 1159–69
60. Boyd NF, Guo H, Martin LJ et al (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med*; 356: 227–36
61. Boyd NF, Dite GS, Stone J et al. (2002) Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med* 347: 886-894
62. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B et al (2006). Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *Jama*, 2006. 296(2):p. 193-201
63. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N et al (2004). Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 111(5): p. 762-71.
64. Mertens AJ, Sweeney C, Shahar E et al (2006). Physical activity and breast cancer incidence in middle-aged women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 97 (2): p.209-14
65. Morimoto LM, White E, Chen Z et al. (2002) Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* 13: 741-751.

66. Singletary KW, Gapstur SM (2001). Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 286: 2143-2151.
67. Peto J (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-395.
68. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD et al (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366: 1784-1793.
69. Longnecker, MP (1994). Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer: meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* 5(1): 73-82.
70. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE et al (2011). Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA*, 2011. 306 (17): p. 1884-90
71. Bao, PP, Shu XO, Gao YT et al (2011). Association of hormone-related characteristics and breast cancer risk by estrogen receptor/progesterone receptor status in the shanghai breast cancer study. *Am J Epidemiol.* 174 (6): p.661-71
72. Hamajima, N, K. Hirose, et al (2002). 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* 87(11): 1234-45.
73. Band PR, Le ND, Fang R et al (2002). Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet.* 360 (9339): p.1044-9
74. Chaturvedi P (2003). Does smoking increase the risk of breast cancer? *Lancet Oncol.* 4 (11): p.657-8; discussion 8
75. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53297 women with breast cancer and 100239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. (1996). Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 347 (9017): p.1713-27
76. Rosenberg L, Zhang Y, Coogan PF, et al (2009). A case control study of oral contraceptive use and incidence of breast cancer. *Am J Epidemiol* 169: 473-479.
77. Collaborative group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and

Hormonal replacement therapy. Lancet 350: 1047-1059.

78. Breast cancer and hormone replacement therapy: a 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 (9084): p. 1047-59

79. Van Leeuwen FE and Rookus MA (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. Lancet. 362 (9392): p.1330; author reply-1

80. Wiecha, JM and Gann P (1993). Provider confidence in breast examination. Fam Pract Res J. 13 (1): p. 37-41

81. Lee CH, Dershaw DD, Kopans D et al (2010). Breast cancer screening with imaging recommendations from the Society of Breast Imaging and the ACR on the use of mammography, breast MRI, breast ultrasound, and other technologies for the detection of clinically occult breast cancer. J Am Coll Radiol 2010; 7:1 8.

82. Yaghjyan L, Colditz GA, Collins LC et al (2011). Mammographic breast density and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women according to tumor characteristics. J Natl Cancer Inst; 103: 1.179-1.189. doi: 10.1093/jnci/djr225. Epub 2011 Jul 27.

83. American College of Radiology (ACR) 2009. ACR Breast Imaging Reporting and Data System, Breast Imaging Atlas, 5th Edition, Reston, VA. USA.

84. Cuzick J, Powles T, Veronesi U (2003). Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. Lancet. 361 (9354): p.296-300

85. Barlow WE, Chi C, Carney PA et al (2004). Accuracy of screening mammography interpretation by characteristics of radiologists, J.Natl. Cancer Inst., 9624, 1840–1850.

86. Giannakopoulou G, Spyrou G, Andreadis I et al (2010). Downgrading BIRADS 3 to BIRADS 2 category using a computer-aided microcalcification analysis and risk assessment system for early breast cancer, Computers in Biology and Medicine, 40 (11-12), pp. 853-859.

87. Σκυλακάκη, Μ. Γ., 2007. Σύγχρονη ταξινόμηση των μαστογραφικών ευρημάτων (birads κριτήρια). Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, 24 (1), 280-283.

88. Sampat M, Markey M and Bovik A (2005). Computer-aided detection and diagnosis in mammography, Handbook of Image and Video Processing, A.C. Bovik Ed. New York:

Academic,1195-1217.

89. Moore MM, Hargett CW 3rd, Hanks JB et al (1997). Association of breast cancer with the finding of atypical ductal hyperplasia at core breast biopsy. *Ann Surg* 225: 726-731; discussion 731-723.

90. Gotzsche PC, Nielsen M (2011). Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*: CD001877

90. Major Cancer Agencies Respond to USPSTF's. New mammography guidelines. Available at: www.cancernetwork.com

91. Bick U and Dieckmann F (2007). Digital mammography: what do we and what don't we know? *Eur. Radiol*, 17, 1931–1942.

92. Birdwell RL, Bandodkar P and Ikeda DM (2005). Computer-aided detection with screening mammography in a university hospital setting, *Radiology*, 236, 451–457.

93. Cupples TE, Cunningham JE and Reynolds JC (2005). Impact of computer-aided detection in a regional screening mammography program, *AJR, Am. J. Roentgenol.*, 185, 944–950.

94. Dean JC and Ilvento CC (2006). Improved cancer detection using computer aided detection with diagnostic and screening mammography: Prospective study of 104 cancers, *AJR, Am. J. Roentgenol.*, 187, 20–28.

95. Freer TW and Ulissey MJ (2001). Screening mammography with computer aided detection: Prospective study of 12,860 patients in a community breast center, *Radiology*, 220, 781–786.

96. Berg WA, Zhang Z, Lehrer D et al (2012). Detection of breast cancer with addition of annual screening ultrasound or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk. *JAMA*; 307: 1.394-1.404. doi:10.1001/jama. 2012. 388.

97. Hooley RJ, Greenberg KL, Stackhouse RM et al (2012). Screening US in patients with mammographically dense breasts: initial experience with Connecticut Public Act 09-41. *Radiology*; 265: 59.

98. Berg WA, Zhang Z, Lehrer D et al (2012). Detection of breast cancer or a single screening MRI to mammography in women with elevated breast cancer risk. *JAMA*; 507: 5.355.

99. Woods RW, Sisney GS, Salkowski LR et al (2011). The mammographic density of a mass is a significant predictor of breast cancer. *Radiology*; 258: 417.
100. Taplin SH, Abraham L, Geller BM et al (2010). Effect of previous benign breast biopsy on the interpretive performance of subsequent screening mammography. *J Natl Cancer Inst*; 102: 1.040.
101. Loving VA, DeMartini WB, Eby PR et al (2010). Targeted ultrasound in women younger than 30 years with focal breast signs or symptoms: outcomes analyses and management implications. *AJR Am J Roentgenol*; 195: 1.472.
102. Stomper PC, D'Souza DJ, DiNitto PA et al (1996). Analysis of parenchymal density on mammograms in 1353 women 25-79 years old. *AJR Am J Roentgenol*; 167: 1.261–1.265.
103. Smith DN (2001). Breast ultrasound. *Radiol Clin North Am* 39: 485-497.
104. Berg WA, Blume JD, Cormack JB et al (2008). Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA* 299: 2151-2163.
105. Mehta TS (2003). Current uses of ultrasound in the evaluation of the breast. *Radiol Clin North Am* 41: 841-856.
106. Ρουσάκης Α. Μαγνητική Μαστογραφία, στο Σύγχρονη Μαστολογία. Ιωαννίδου - Μουζάκα Α, εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα 2007: 347-387.
107. Kuhl CK (2007). The current status of breast MR imaging: part I. Choice of technique, image interpretation, diagnostic accuracy, and transfer to clinical practice. *Radiology*; 244: 356-378.
108. Kuhl CK (2007). The current status of breast MR imaging: part 2. Clinical Applications. *Radiology*; 244 (3): 672-691.
109. Warner E, Causer PA (2005). MRI surveillance for hereditary breast-cancer risk. *Lancet* 365: 1747-1749.
110. Bigenwald RZ, Warner E, Gunasekara A et al (2008). Is mammography adequate for screening women with inherited BRCA mutations and low breast density? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 706-711.

111. Sardanelli F, Giuseppetti GM, Canavese G et al (2007). Indications for breast magnetic resonance imaging. Consensus document *Attualità in senologia, La radiologia medica*, 2008; 113: 1.085-1.095.
112. Causer P, Jong R, Warner E et al (2007). Breast cancers detected with imaging screening in the BRCA population: emphasis on MR imaging with histopathologic correlation. *RadioGraphics*; 27: s165-S182.
113. Mann RM, Kuhl CK, Kinkel K et al (2008). Breast MRI: guidelines from the European Society of Breast Imaging. *Eur Radiol*; 18: 1.307-1.318.
114. Smith RA (2007). The evolving role of MRI in the detection and evaluation of breast cancer. *N Engl J Med*; 356: 1.362-1.364.
115. Kalles V, Zografos G., Provatopoulou X et al (2013). The current status of positron emission mammography in breast cancer diagnosis. *Breast Cancer*. 20(2): p.123-30
116. Itoh A, Ueno E, Tohno E, et al (2006). Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology*; 239: 341-50
117. Hammond S, Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV (1987). Statistical analysis of fine needle aspiration cytology of the breast. A review of 678 cases plus 4,265 cases from the literature. *Acta Cytol* 31: 276-280.
118. Ariga R, Bloom K, Reddy VB et al (2002). Fine-needle aspiration of clinically suspicious palpable breast masses with histopathologic correlation. *Am J Surg* 184: 410-413.
119. Ishikawa T, Hamaguchi Y, Tanabe M et al (2007). False-positive and false-negative cases of fine-needle aspiration cytology for palpable breast lesions. *Breast Cancer* 14: 388-392.
120. Yu YH, Wei W, Liu JL (2012). Diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy for breast mass: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 12: 41.
121. Wong AY, Salisbury E, Bilous M (2000). Recent developments in stereotactic breast biopsy methodologies: an update for the surgical pathologist. *Adv Anat Pathol* 7: 26-35.
122. Wiratkapun C, Treesit T, Wibulpolprasert B et al (2010). Diagnostic accuracy of ultrasonography-guided core needle biopsy for breast lesions. *Singapore Med J* 53: 40-45.

123. Romero Q, Bendahl PO, Klintman M et al (2011). Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples-a model for neo-adjuvant breast cancer studies. *BMC Cancer*; 11: 341.
124. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al (2010). American Society of Clinical oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28 (16): 2.784-2.795.
125. Gisvold JJ, Goellner JR, Grant CS et al (1994). Breast biopsy: A comparative Study of Stereotaxically Guided Core and Excisional Techniques. *AJR*; 162: 815-820.
126. Lakhani SR, Ellis. IO, Schnitt SJ et al (2012). WHO Classification of Tumours. 240 p.
127. Κ Π (1990). Ειδική Παθολογική Ανατομική (Συστηματική Παθολογία); Λίτσας ΙΕ, editor. Θεσσαλονίκη.
128. Rosen PP (2001). Rosen's breast pathology. 2nd ed; Wilkins LW, editor. Philadelphia.
129. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL et al. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 90: 1371-1388.
130. Claus EB, Stowe M, Carter D (2001). Breast carcinoma in situ: risk factors and screening patterns. *J Natl Cancer Inst* 93: 1811-1817.
131. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K et al (1996). Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA* 275: 913-918.
132. Fisher B, Dignam J, Wolmark N et al (1998). Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. *J Clin Oncol* 16: 441-452.
133. Fisher B, Land S, Mamounas E et al (2001). Prevention of invasive breast cancer in women with ductal carcinoma in situ: an update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *Semin Oncol* 28: 400-418.
134. Houghton J, George WD, Cuzick J et al (2003). Radiotherapy and tamoxifen in women with completely excised ductal carcinoma in situ of the breast in the UK, Australia, and New Zealand: randomised controlled trial. *Lancet* 362: 95-102.

135. De Vita H, Rosenberg AS (2005). *Cancer Principles and Practice of Oncology*, Breast Cancer. 7th ed.; Wilkins LW, editor. Philadelphia.
136. Bloom HJ, Richardson WW (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11: 359-377.
137. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747-752.
138. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S et al (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*;28(10):1684-91
139. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A et al (1992). Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10: 1049-1056.
140. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673-1684.
141. Sting J, Caldas C (2007). Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 7: 791-799.
142. Polyak K (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117: 3155-3163.
143. Cui XS, Donehower LA (2000). Differential gene expression in mouse mammary adenocarcinomas in the presence and absence of wild type p53. *Oncogene* 19: 5988-5996.
144. Gelfand VI, Bershadsky AD (1991). Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Biol* 7: 93-116.96
145. Liang J, Slingerland JM (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2: 339-345.
146. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM et al (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.
147. Whitman M, Downes CP, Keeler M et al (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332: 644-646.

148. Brognard J, Newton AC (2008). PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab* 19: 223-230.
149. Gao T, Furnari F, Newton AC (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18: 13-24.
150. Brognard J, Sierrecki E, Gao T et al (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 25: 917-931.
151. Liu J, Weiss HL, Rychahou P et al (2009). Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 28: 994-1004.
152. Chu EC, Tarnawski AS (2004). PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit* 10: RA235-241.
153. Philp AJ, Campbell IG, Leet C et al (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 61: 7426-7429.
154. Takeda A, Osaki M, Adachi K et al (2004). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas* 28: 353-358.
155. Ye B, Jiang LL, Xu HT et al (2012). Expression of PI3K/AKT pathway in gastric cancer and its blockade suppresses tumor growth and metastasis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 25: 627-636.
156. Morgensztern D, McLeod HL (2005). PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16: 797-803.
157. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V et al (2004). Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 10: 6779-6788.
158. Bose S, Chandran S, Mirocha JM et al (2006). The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol* 19: 238- 245.
159. Generali D, Fox SB, Brizzi MP et al (2008). Down-regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/molecular target of rapamycin metabolic pathway by primary letrozole-based therapy in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 14: 2673-2680.

160. Prueitt RL, Boersma BJ, Howe TM, et al (2007). Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer. *Int J Cancer* 120: 796-805.
161. Weidner N. *Breast Diseases. The Difficult Diagnosis in Surgical Pathology*. 1st ed. Saunders, Philadelphia USA 1996: 625-679.
162. Rosen PP. *Breast Pathology*. 1st ed., Lippincott-Raven Philadelphia USA 1997.
163. Ομάδα εργασίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Οδηγίες για την παθολογοανατομική εξέταση των μαστών σε προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου για καρκίνο του μαστού. *Αρχεία Παθολογοανατομικής Τόμος 12, Παράρτημα 1*, 1998: 22-25.
164. Rosen PP, Oberman HA. Tumor of the mammary gland. Third series Fascicle 7 In *Atlas of the Pathology*. AFIP Washington USA 1993.
165. Rosai J. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8th ed. Mosby ST. Louis Missouri USA, 1996.
166. Someren, Sewell CW. *Differential diagnosis in Pathology: Breast Disorders*. 1st ed. Igaku Shoin New York, 1997.
167. Sloane JP. *Biopsy Pathology of the breast*. 1st ed. Chapman and Hall Medical London, 1985.
168. Paik S, Shak S, Tang G et al (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2.817.
169. Mamounas EP, Tang G, Fisher B et al (2010). Association between the 21-gene recurrence score assay and risk of locoregional recurrence in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *J Clin Oncol*; 28: 1.677.
170. Dowsett M, Cuzick J, Wale C et al (2010). Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study. *J Clin Oncol*; 28: 1.829.
171. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*; 20: 1.319.
172. Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer *Nature*; 415: 530.

173. Vande Vijver MJ, He Y D, van't Veer LJ et al (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*;347: 1999.
174. Greene, FL, & Sobin, LH (2008). The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA: a cancer journal for clinicians*, 58(3), 180-190.
175. Paik S, Kim C, and Wolmark N (2008) HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med*, 358(13): p.1794-800
176. Slamon, D, Eiermann, W, Robert N et al (2011). Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N. Engl J Med*, 365 (14): p1272-83
177. Gasparini, G, Weidner NM, Bevilacqua P et al (1994). Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 12(3): p 454-66
178. Marks JR, Humphrey PA, Wu K et al (1994). Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg*, 219(4): p.332-41
179. Elledge RM, Green S, Howes L et al (1997). Bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 15(5): p 1916-22
180. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A (1990). Indicators of prognosis in node-negative breast cancer, *N Engl J Med*, 322(15): p.1045-53
181. Pogliano J (2008). The bacterial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 20:19-27.
182. Delon I, and Brown NH (2007). Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 19:43-50.
183. Wittmann T and Desai A (2005). Microtubule cytoskeleton: a new twist at the end. *Curr Biol*. 15:R126-9.
184. Lazarides E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*. 283:249-256.
185. Goldman RD, Grin B, Mendez MG et al (2008). Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol*. 20:28-34.
186. Karabinos A, Schmidt H, Harborth J et al (2001). Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7863-8.

187. Fuchs E and Weber K (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63:345-82.
188. Coulombe PA, Ma L, Yamada S et al (2001). Intermediate filaments at a glance. *J Cell Sci.* 114:4345-7.
189. Coulombe PA and Wong P (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat Cell Biol.* 6:699-706.
190. Kim S and Coulombe PA (2007). Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes Dev.* 21:1581- 97.
191. Herrmann H, Bar H, Kreplak L et al (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:562-73.
192. Omary MB, Coulombe PA and McLean WH (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med.* 351:2087-100
193. Foeger N, Wiesel N, Lotsch D et al (2006). Solubility properties and specific assembly pathways of the B-type lamin from *Caenorhabditis elegans*. *J Struct Biol.* 155:340-50.
194. Toivola DM, Tao GZ, Habtezion A et al (2005). Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15:608-17.
195. Sihag RK, Inagaki M, Yamaguchi T et al (2007). Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res.* 313:2098-109.
196. Izawa I and Inagaki M (2006). Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 97:167-74.
197. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A et al (2007). Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 313:2063-76.
198. Marceau N, Schutte B, Gilbert S et al (2007). Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp Cell Res.* 313:2265-81.
199. Reichelt S and Magin TM (2002). Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci.* 115:2639-50.

200. Pekny M., Johansson CB, Eliasson C et al (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.* 145:503-14.
201. Yoneda A, Akatsuka M, Kumagai F et al (2004a) Disruption of actin microfilaments causes cortical microtubule disorganization and extra- phragmoplast formation at M/G1 interface in synchronized tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 45:761-9.
202. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J et al (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res.* 313:2050-62.
203. Coulombe PA, Hutton ME, Letai A et al. (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell.* 66:1301-11.
204. Coulombe PA and Omary MB. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14:110-22.
205. Denk H, Stumptner C, Fuchsbichler A et al (2001). Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Histopathologic and pathogenetic considerations. *Pathologe.* 22:388-98.
206. Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV et al (2000). A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet.* 67:37-46.
207. Gros-Louis F, Lariviere R, Gowing G et al (2004). A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 279:45951-6.
208. Worman HJ and Courvalin JC (2004). How do mutations in lamins A and C cause disease? *J Clin Invest.* 113:349-51.
209. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S et al (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 21:285-8.
210. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T et al (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med.* 341:1715-24.
211. Hutchison CJ (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:848-58.

212. Hegele RA (2003). Lamin mutations come of age. *Nat Med*. 9:644-5.
213. Krimm I, Ostlund C, Gilquin B (2002). The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure*. 10:811-23.
215. Liu C, Chen B, Zhu J et al (2010). Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer. *Cancer Sci*, 101:815–819.
216. Krüger K, Stefansson IM, Collett K et al (2013). Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. *Breast*, 22:282–288.
217. Macas J, Ku MC, Nern C et al (2014). Generation of neuronal progenitor cells in response to tumors in the human brain. *Stem Cells*, 32:244–257.
218. Wagner N, Wagner KD, Scholz H et al (2006). Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291:R779–R787.
219. Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T et al (2012). Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol*, 40:1345–1357.
220. Ahmad A, Sarkar SH, Bitar B et al (2012). Garcinol regulates EMT and Wnt signaling pathways in vitro and in vivo, leading to anticancer activity against breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 11:2193–2201.
221. Zhao Z, Lu P, Zhang H et al (2014). Nestin positively regulates the Wnt/ β -catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Research*, 16:408
222. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17:9–26.
223. Choi CH, Lee BH, Ahn SG et al (2012). Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Biochem Biophys Res Commun*, 418:759–764.
224. Zhu Y, Xu L, Zhang J et al (2013). Klotho suppresses tumor progression via inhibiting PI3K/Akt/GSK3 β /Snail signaling in renal cell carcinoma. *Cancer Sci*, 104:663–671.

225. Liu BY, McDermott SP, Khwaja SS et al (2004). The transforming activity of Wnt effectors correlates with their ability to induce the accumulation of mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101:4158–4163.
226. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD et al (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 10(1) doi: 10.1186/bcr1855. Epub 2008 Feb 1.
227. Chang L, Goldman RD (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(8), 601-13
228. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 60(4), 585-95
229. Marvin J, Dahlstrand U, Lendahl RD et al (1998). A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci*. 111 (14), 1951-61
230. Sjöberg G, Edström L, Lendahl U (1994). Myofibers from Duchenne/Becker muscular dystrophy and myositis express the intermediate filament nestin. *J Neuropathol Exp Neurol*. 53(4), 416-23
231. Steinert PM, Chou YH, Prahlad V et al (1990). A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly in vitro to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. *J Biol Chem*. 274(14), 9881-90
232. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD et al (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci*. 103 (2), 589-97
233. Jin ZG, Liu L, Zhong H et al (2006). Second intron of mouse nestin gene directs its expression in pluripotent embryonic carcinoma cells through POU factor binding site. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 38(3), 207-12
234. Zimmerman L, Parr B, Lendahl U et al (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron*. 12(1), 11-24 (1994).
235. Josephson R, Müller T, Pickel J et al (1998). POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development*. 125(16), 3087-100

236. Lothian C, Lendahl U(1997). An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci.* 9(3), 452-62
237. Yaworsky PJ, Kappen C(1999). Heterogeneity of neural progenitor cells revealed by enhancers in the nestin gene. *Dev Biol.* 205(2), 309-21
238. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A et al (2004). Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol.* 24(20), 8834-46
239. Park D, Xiang AP, Mao FF et al (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 28(12), 2162-71
240. Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P et al (2005). Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 23(3), 392-402 (2005).
241. Shin YJ, Kim HL, Park JM et al (2013). Characterization of nestin expression and vessel association in the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats. *Cell Tissue Res.* 351(3),p. 383-95
242. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med.* 353(8), 811-22
243. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414(6859), 105-11
244. Brustle O, McKay RD (1995). The neuroepithelial stem cell concept: implications for neuro-oncology. *J Neurooncol.* 24(1), 57-9
245. Bao S, Wu Q, Li Z et al (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* 68(15), 6043-8
246. Dean M, Fojo T, Bates T (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 5(4), 275-84
247. Chinnaiyan P, Wang M, Rojiani AM et al (2008). Report from the Radiation Therapy Oncology Group. *Radiat Oncol.* 3,32
248. Dahlrot RH, Hermansen SK, Hansen S et al (2013). What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol.* 6(3),334-48

249. Zhang M, Song T, Yang L (2008). Valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 27, 85
250. Wan F, Herold-Mende C, Campos B et al (2011). Association of stem cell-related markers and survival in astrocytic gliomas. *Biomarkers.* 16(2), 136-43
251. Sica G, Lama G, Anile C et al (2011). Assessment of angiogenesis by CD105 and nestin expression in peritumor tissue of glioblastoma. *Int J Oncol.* 38(1), 41-9 (2011).
252. Milde T, Hielscher T, Witt H et al (2012). Nestin expression identifies ependymoma patients with poor outcome. *Brain Pathol.* 22(6), 848-60
253. Stojnik T, Røsland GV, Sakariassen PO et al (2007). Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol.* 68(2), 133-43
254. Wagner N, Wagner KD, Scholz H et al (2006). Intermediate filament protein nestin is expressed in developing kidney and heart and might be regulated by the Wilms' tumor suppressor Wt1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(3), R779-87
255. Chen J, Boyle S, Zhao M et al (2006). Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 17(5), 1283-91
256. Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S (2007). Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int.* 72(3), 307-18
257. Liu W, Zhang Y, Liu S et al (2013). The expression of intermediate filament protein nestin and its association with cyclin-dependent kinase 5 in the glomeruli of rats with diabetic nephropathy. *Am J Med Sci.* 345(6), 470-7
258. Bussolati B, Bruno S, Grange S et al (2008). Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas. *FASEB J.* 22(10), 3696-705
259. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D et al (2006). Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 17(11), 3028-40 (2006).
260. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi ND (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 119(11), 2204-13
261. Plotkin MD, Goligorsky MS (2006). Mesenchymal cells from adult kidney support angiogenesis and differentiate into multiple interstitial cell types including erythropoietin-producing fibroblasts. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291(4), F902-12

262. Hunziker E, Stein M (2000). Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun.* 271(1), 116-9
263. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ et al (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes.* 50(3), 521-33
264. Klein T, Ling Z, Heimberg H et al (2003). Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem.* 51(6), 697-706
265. Lardon J, Rooman I, Bouwens L (2002). Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol.* 117(6), 535-40
266. Ueno H, Yamada Y, Watanabe R et al (2005). Nestin-positive cells in adult pancreas express amylase and endocrine precursor Cells. *Pancreas.* 31(2), 126-31
267. Zhang L, Hong TP, Hu J et al (2005). Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol.* 11(19), 2906-11
268. Huang H, Tang X (2003). Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest.* 83(4), 539-47
269. Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA et al (2003). Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes.* 52(8), 2007-15
270. Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL et al (2003). Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes.* 52(10), 2503-12
271. Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM et al (2003). Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes.* 52(10), 2519-25
272. Bardeesy N, DePinho N (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2(12), 897-909
273. Gilles C, Polette M, Zahm JM et al (1999). Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci.* 112 (24), 4615-25

274. Matsuda Y, Naito Z, Kawahara K et al (2011). Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. *Cancer Biol Ther.* 11(5), 512-23
275. Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K et al (2009). Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum Pathol.* 40(2),189-98
276. Ikeda N, Adachi M, Taki T et al (1999). Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 79(9-10),1553-63
277. Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y et al (2003). Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas.* 26(4),344-9
278. Yamahatsu K, Matsuda Y, Ishiwata T et al (2012). Nestin as a novel therapeutic target for pancreatic cancer via tumor angiogenesis. *Int J Oncol.* 40(5), 1345-57
279. Meert AP, Paesmans M, Martin B et al (2002). The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 87(7), 694-701
280. Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 96(7), 379-86
281. Liu X, Zhang Y et al (2012). Microtubule-associated protein 2 and nestin expressions in human embryonic and fetal gastric tissues]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 32(9), 1328-31
282. Dhingra S, Feng W, Brown RE et al (2011). Clinicopathologic significance of putative stem cell markers, CD44 and nestin, in gastric adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 4(8),733-41
283. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z (2011). Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 17(4), 409-18
284. Wiese C, Rolletschek A, Kania G et al (2006). Signals from embryonic fibroblasts induce adult intestinal epithelial cells to form nestin-positive cells with proliferation and multilineage differentiation capacity in vitro. *Stem Cells.* 24(9), 2085-97
285. Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T et al (2007). Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 30(3), 593-603

286. Hirota S, Ohashi A, Nishida T et al (2003). Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*. 125(3), 660-7
287. Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A et al (1998). CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol*. 11(8), 728-34
288. van de Rijn M, Hendrickson RM, Rouse RV (1994). CD34 expression by gastrointestinal tract stromal tumors. *Hum Pathol*. 25(8), 766-71
289. Miettinen M, Lasota J (2001). Gastrointestinal stromal tumors--definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch*. 438(1), 1-12
290. Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J et al (2001). Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*. 158(3), 817-23
291. Vanderwinden JM, Gillard K, De Laet KM et al (2002). Distribution of the intermediate filament nestin in the muscularis propria of the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res*. 309(2), 261-8
292. Johnston J, Helwig EB (1981). Granular cell tumors of the gastrointestinal tract and perianal region: a study of 74 cases. *Dig Dis Sci*. 26(9), 807-16
293. Rossi GB, de Bellis M, Marone P et al (2000). Tempesta, Granular cell tumors of the colon: report of a case and review of the literature. *J Clin Gastroenterol*. 30(2), 197-9
294. Parfitt JR, McLean CA, Joseph MG et al (2006). Granular cell tumours of the gastrointestinal tract: expression of nestin and clinicopathological evaluation of 11 patients. *Histopathology*. 48(4), 424-30
295. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 3(12), 895-902
296. Marx J (2003). Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*. 301(5638), 1308-10
297. Liu T, Xu F, Du X et al (2010). Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol Cell Biochem*. 340(1-2), 265-73

298. Pfeiffer MJ, Smit FP, Sedelaar JP et al (2011). Steroidogenic enzymes and stem cell markers are upregulated during androgen deprivation in prostate cancer. *Mol Med.* 17(7-8),657-64
299. Apostolou P, Toloudi M, Chatziioannou M et al (2012). Cancer stem cells stemness transcription factors expression correlates with breast cancer disease stage. *Curr Stem Cell Res Ther.* 7(6), 415-9
300. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7), 3983-8
301. Liu C, Cao X, Zhang Y et al (2012). Co-expression of Oct-4 and Nestin in human breast cancers. *Mol Biol Rep.* 39(5), 5875-81
302. Liu C, Chen B, Zhu J et al (2010). Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer. *Cancer Sci.* 101(3), 815-9
303. Parry S, Savage K, Marchiò C et al (2008). Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. *J Clin Pathol.* 61(9), 1045-50
304. Li H, Cherukuri P, Li N et al (2007). Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res.* 67(2), 501-10
305. Rogelsperger O, Ekmekcioglu O, Jäger W et al (2009). Coexpression of the melatonin receptor 1 and nestin in human breast cancer specimens. *J Pineal Res.* 46(4), 422-32
306. Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al (2007). One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 42(1), 28-42
307. Peyrot F, Ducrocq C (2008). Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.* 45(3), 235-46
308. Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS et al (2006). Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors: potential clinical uses in the prevention of osteoporosis, cancer and as an adjuvant therapy. *J Pineal Res.* 41(4), 297-305
309. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR et al (2008). Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther.* 7(3), 189-203

310. Korkmaz A, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX et al (2009). Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 115(1), 13-27
311. Lai L, Yuan L, Chen Q et al (2008). The Galphai and Galphaq proteins mediate the effects of melatonin on steroid/thyroid hormone receptor transcriptional activity and breast cancer cell proliferation. *J Pineal Res.* 45(4), 476-88
312. Lee JH, Park HJ, Kim YA et al (2012). The phenotypic characteristic of liver-derived stem cells from adult human deceased donor liver. *Transplant Proc.* 44(4), 1110-2
313. Bin WT, Ma LM, Xu Q et al (2012). Embryonic hepatocyte transplantation for hepatic cirrhosis: efficacy and mechanism of action. *World J Gastroenterol.* 18(4), 309-22
314. Reister S, Kordes C, Sawitza I et al (2011). The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells. *Stem Cells Dev.* 20(10), 1687-99
315. Luk JM, Burchard J, Zhang C et al (2011). DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem.* 286(35), 30706-13
316. Yang XR, Xu Y, Yu B et al (2010). High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut.* 59(7), 953-62
317. Aihara M, Sugawara K, Torii S et al (2004). Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest.* 84(12), 1581-92
318. Mokry J, Cízková D, Filip S et al (2004). Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 13(6), 658-64
319. Suzuki S, Namiki J, Shibata S et al (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 58(8), 721-30
320. Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA et al (2009). Proliferation of immature tumor vessels is a novel marker of clinical progression in prostate cancer. *Cancer Res.* 69(11), 4708-15
321. Matsuda Y, Hagio M, Ishiwata T (2013). Nestin: a novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 19(1), 42-8

322. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 11(1), 69-82
323. Wen D, Ni L, You L et al (2012). Upregulation of nestin in proximal tubules may participate in cell migration during renal repair. *Am J Physiol Renal Physiol*. 303(11), F1534-44
324. Tampaki EC, Nakopoulou L, Tampakis A et al (2014). Nestin involvement in tissue injury and cancer--a potential tumor marker? *Cell Oncol (Dordr)*. 37(5):305-15.doi: 10.1007/s13402-014-0193-5. Epub 2014 Aug 28. Review.
325. Kuske MD, Johnson JP (1999). Assignment of the human melanoma cell adhesion molecule gene (MCAM) to chromosome 11 band q23.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet. Cell Genet*. 87 (3–4): 258.
326. Flanagan K, Fitzgerald K, Baker J et al (2012). Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PLoS One*;7(7):e40443.
327. Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y et al (2005). CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 106 (8): 2923–4. doi:10.1182/blood-2005-06-2307. PMID 16204154.
328. Elshal MF, Khan SS, Raghavachari N et al (2007). A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. *BMC Immunol*. 8: 29.
329. Dagur PK, Biancotto A, Wei L et al (2011). MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J. Autoimmun*. 37 (4): 319–27.
330. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM et al (May 2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp. Hematol*. 36 (5): 642–54.
331. Russell KC, Phinney DG, Lacey MR et al (April 2010). "In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment". *Stem Cells* 28 (4): 788–98.

332. Ouhtit A, Gaur RL, Abd Elmageed ZY et al (April 2009). "Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146". *Biochim. Biophys. Acta* 1795 (2): 130–6.
333. Jiang T, Zhuang J, Duan H, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 2012;120(11): 2330-2339.
334. Ouhtit A, Gaur RL, AbdElmageed ZY et al (2009). Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim Biophys Acta.*; 1795(2):130-136.
335. Koch S, Tugues S, Li X et al (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.*;437(2):169-183.
336. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K et al (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.*;20(11):2768-2778.
337. Lamalice L, Houle F, Huot J (2006). Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem.*;281(45):34009-34020.
338. Chen TT, Luque A, Lee S et al (2010). Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.*;188(4):595-609.
339. Orian-Rousseau V, Ponta H (2008). Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res*;101:63-92.
340. Tremmel M, Matzke A, Albrecht I et al (2009). ACD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood*;114(25):5236-5244.
341. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D et al (2010). Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol*;28(22):3617-3622.
342. Xing Lei, Ce-Wen Guan, Yang Song et al (2015). The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell International*; 15:3 DOI 10.1186/s12935-014-0147-z

343. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z et al (2011). Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol*.28;17(4):409-18.
344. Carmeliet P (2000). VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med*. Oct;6(10):1102-3.
345. Bachelder RE, Crago A, Chung J et al (2001).Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin- expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001 Aug 1;61(15):5736-40.
346. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*. May- Jun;38(3):258-68.
347. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*;9(6):669-76.
348. Roskoski R Jr (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*;62(3):179-213.
349. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T et al (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*. ;28(9):488-94.
350. Yamazaki Y, Morita T. (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*.;10(4):515-27.
351. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*.25;219(4587):983-5.
352. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K et al (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*;20(11):2768-78.
353. Kowanetz M, Ferrara N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*;12(17):5018-22.
354. Ferrara N (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*;29(6 Suppl 16):10-4.
355. Mac Gabhann F, Popel AS (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*;15(8):715-38.

356. Zabouo G, Imbert AM, Jacquemier J et al. (2009). CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 11:R1.
357. Gulhati P, Bowen KA, Liu J et al. (2011). mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res* 71:3246–3256.
22. Martín-Villar E, et al. (2006) Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 119:4541–4553.
358. Alves CC, Carneiro F, Hoefler H et al (2009). Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front Biosci* 14:3035–3050.
359. Leong KG, Niessen K, Kulic I et al. (2007). Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 204:2935–2948.
360. Luo Y, Zheng C, Zhang J et al. (2011). Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene*, 10.1038/onc.2011.244.
361. Anders CK, Carey LA (2009). Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 9(Suppl 2):S73–S81.
362. Bidlingmaier S, He J, Wang Y et al. (2009). Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma. *Cancer Res* 69:1570–1577.
363. Sato A, Torii I, Okamura Y et al. (2010). Immunocytochemistry of CD146 is useful to discriminate between malignant pleural mesothelioma and reactive mesothelium. *Mod Pathol* 23:1458–1466.
364. Thiery JP, Acloque H, Huang RY et al (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871–890.
365. Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420–1428.
366. Lehmann JM, Riethmuller G, Johnson JP (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9891–9895.

367. Shih IM (1999). The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 189:4–11.
368. Pickl WF, Majdic O, Fischer GF et al. (1997). MUC18/ MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol* 158:2107–2115.
369. Bardin N, Anfosso F, Masse JM et al. (2001). Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 98:3677–3684.
370. Delorme B, Ringe J, Gallay N et al. (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111:2631–2635.
371. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S et al (2007). Self- renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hemato- poietic microenvironment. *Cell* 131:324–336.
372. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U et al (1993). Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18):8514–8518.
373. Shih IM, Speicher D, Hsu MY et al (1997). Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res* 57:3835–3840.
374. Chan B, Sinha S, Cho D et al (2005). Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. *Dev Dyn* 232:232–244.
375. Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N et al (2007). Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol* 179:6673–6685.
376. Zabouo G, Imbert AM, Jacquemier J et al. (2009). CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. Available: <http://breast-cancer-research.com/content/11/1/R1>.
377. Zeng G, Cai S, Wu GJ et al (2011). Up-regulation of METCAM/MUC18 Promotes Motility, Invasion, and Tumorigenesis of Human Breast Cancer Cells. *BMC Cancer* 11:113.

378. Zeng G, Cai S, Liu Y et al (2012). METCAM/MUC18 augments migration, invasion, and tumorigenicity of human breast cancer SK-BR-3 cells. *Gene* 492: 229–238.
379. Tsukamoto Y, Sakaiuchi T, Hiroi S et al. (2003). Expression of gicerin enhances the invasive and metastatic activities of a mouse mammary carcinoma cell line. *Int J Oncol* 23:1671–1677.
380. Wu GJ, Fu P, Chiang CF et al (2005). Increased expression of MUC18 correlates with the metastatic progression of mouse prostate adenocarcinoma in the TRAMP model. *J Urol* 173:1778–1783.
381. Wu GJ, Peng Q, Fu P et al (2004) Ectopical expression of human MUC18 increases metastasis of human prostate cancer cells. *Gene* 327:201–213.
382. Aldovini D, Demichelis F, Doglioni C et al (2006) M- CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 119:1920–1926.
383. Kristiansen G, Yu Y, Schluns K et al (2003). Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 25:77–81.
384. Zeng Q, Li W, Lu D et al (2012). CD146, an epithelial- mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1127–1132.
385. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137:1403–1419.
386. Li G, Kalabis J, Xu X et al (2003). Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. *Oncogene* 22:6891–6899.
387. Nava P, Capaldo CT, Koch S et al (2011). JAM-A regulates epithelial proliferation through Akt/beta-catenin signalling. *EMBO Rep* 12:314–320.
388. Blick T, Widodo E, Hugo H et al (2008). Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 25:629–642.
389. Storci G, Sansone P, Trere D et al (2008). The basal- like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression. *J Pathol* 214:25–37.
390. AM Imbert, C Garulli, E Choquet et al (2012). CD146 Expression in Human Breast Cancer Cell Lines Induces Phenotypic and Functional Changes Observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. *Plos One* 7:437522

391. Böcker, Denk, Heitz. Παθολογική Ανατομική. Ευστράτιος Σ. Πατσούρης. 3η Έκδοση, 2007 Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
392. Hensel M, Schneeweiss A, Sinn HP et al (2002). Stem cell dose and tumorbiologic parameters as prognostic markers for patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell support. *Stem Cells*;20(1):32-40.
393. Perou CM (2011). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*;16 Suppl 1:61-70.
394. Kassimir Bauer S, Hoffmann O et al. (2012). Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 20;14(1):R15.
395. Zeng Q, Li W, Lu D et al (2012). CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*;109(4):1127-32. Epub 2011 Dec 30.
396. Li W, Yang D, Wang S et al (2011). Increased expression of CD146 and microvessel density (MVD) in invasive micropapillary carcinoma of the breast: Comparative study with invasive ductal carcinoma-not otherwise specified. *Pathol Res Pract*;207(12):739-46. Epub 2011 Nov 1.
397. Mostert B, Kraan J et al (2011). Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res Treat*;127(1):33-41. Epub 2010 Apr 9.
398. Yabouo G, Imbert AM et al (2009). CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*;11(1):R1. Epub 2009 Jan 5.
399. Ouhtit A, Gaur RL et al (2009). Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim Biophys Acta*;1795(2):130-6. Epub 2009 Jan 29.
400. Fürstenberger G, von Moos R et al (2005). Real-time PCR of CD146 mRNA in peripheral blood enables the relative quantification of circulating endothelial cells and is an indicator of angiogenesis. *Br J Cancer*;93(7):793-8.

401. Piras F, Ionta MT, Lai S et al (2011). Nestin expression associates with poor prognosis and triple negative phenotype in locally advanced (T4) breast cancer. *Eur J Histochem*;55(4):e39. doi: 10.4081/ejh.2011.e39.
402. Liu C, Chen B, Zhu J et al (2010). Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer. *Cancer Sci*;101(3):815-9. Epub 2009 Oct 31.
403. Liu C, Cao X, Zhang Y et al (2012). Co-expression of Oct-4 and Nestin in human breast cancers. *Mol Biol Rep*;39(5):5875-81. Epub 2011 Dec 30.
404. Sheila K Singh, Ian D Clarke et al (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23, 7267-7273
405. Kirsten B. Moysich, Gregory P et al (2008). Use of common Medications and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17 (7). July 2008. Review.
406. Zimmerman Al, Wu S (2011). MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Lett*, 300:10–19
407. Cimmino A, Calin Ga, Fabri M et al (2005). MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:13944–13949
408. Wang S, Olson EN (2009). AngiomiRs – key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 19:205–211
409. Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE et al (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell*, 138:1083–1095
410. Iliopoulos D, Hirsch HA, Stuhl K (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 25;108(4):1397-402.
411. Lu J, Getz G, Miska EA et al (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435:834–838
412. Shimono Y et al (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell*;138:592–603.
413. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*;139:693–706.
414. Iliopoulos D et al (2009). MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. *Sci Signal*;2:ra62

