



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ Π.Γ.Ν.Α.

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ Κ. ΖΩΓΡΑΦΟΣ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ – ΣΤΕΦΑΝΟΣ ΚΑΛΛΕΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2014

«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 ΑΙΤΗΣΕΩΣ 27/4/2009
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 29/7/2009
- ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ
ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΠΡΑΜΗΣ, ΟΜ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΑΦΡΟΔΙΤΗ ΝΟΝΝΗ, ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ 23/10/2009
- ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ 16/4/2014
- ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΕΛΕΤΙΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ
- ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
ΜΑΡΙΑ ΛΥΜΠΕΡΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ
ΜΑΡΙΑ ΓΑΖΟΥΛΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΟΥΤΟΥΖΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΒΑΘΜΟΣ: ΑΡΙΣΤΑ

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ-
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ-
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΉΓΗΣΑΣΘΕ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ-
ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ-
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΞΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ
ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ-
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ-
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ-
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ-
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ-
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ-
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΟΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ Υ-
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ὈΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΟΣΩ. ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ-
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΝ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ-
ΙΛΝΤΑΣ, ΕΚΧΟΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ-
ΗΪΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ὈΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ-
ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ-
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ Ύ-
ΝΔΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ-
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Δ Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β-
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ-
ΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ-
Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ-
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π-
ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ-
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩΝ.

Στους γονείς μου, Χρήστο και Έφη

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στη Μονάδα Μαστού της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή και Διευθυντή της Κλινικής Δρ. Γεωργίου Ζωγράφου, κατά τη χρονική περίοδο 2009 – 2013.

Για την ολοκλήρωσή της, συνεργάστηκαν επίσης το Ερευνητικό Κέντρο του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου και το Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρώτα απ' όλους, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμότες μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητή Δρ. Γεώργιο Ζωγράφο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλο το διάστημα της συνεργασίας μας, τη συνεχή και ουσιαστική καθοδήγησή του, και κυρίως την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ τόσο μαζί του όσο και με το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό της Μονάδας Μαστού και της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής.

Ακόμη, ευχαριστώ εκ βάθους καρδιάς την Διευθύντρια του Ερευνητικού Κέντρου του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου κ. Αντωνία Γούναρη, για την πολύπλευρη στήριξη που μου παρείχε, την αμέριστη συμπαράστασή της, την πίστη της στην εκπονηθείσα μελέτη και την σημαντική προσφορά της, όχι μόνο μέσω του Ερευνητικού Κέντρου αλλά κυρίως με την προσωπική της συμβολή στην περάτωση της διατριβής. Παράλληλα, στο σημείο αυτό θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Πρόεδρο του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου κ. Ευστάθιο Φραγκούλη, για την έμπρακτη υποστήριξή του μέσω της διάθεσης των πόρων και του εξοπλισμού του Ερευνητικού Κέντρου, χωρίς την οποία η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης δεν θα ήταν δυνατή.

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 καθοδήγησή της και την συνεργασία της εν γένει.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ θερμά τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ιωάννη Μπράμη για τη στήριξή του, την απόλυτα επιτυχή συνεργασία του, τις πολύτιμες συμβουλές του, και τη γενικότερη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχε.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Αναστασία Καστανιά και τον εξαιρετικό φίλο Ηλία Μαμούρα για τη συμβολή τους στη διεκπεραίωση των στατιστικών αναλύσεων που παρουσιάζονται εντός της παρούσης διατριβής, αλλά και των αναλύσεων που δημοσιεύθηκαν ή παρουσιάστηκαν ως ανακοινώσεις σε εθνικά και διεθνή συνέδρια.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τους εξαιρετικούς συναδέλφους Ιωάννη Παπαπαναγιώτου, Wasim Al – Harethee, Γεωργία Γεωργίου και Μάιρα Ματιάτου, και τις βιολόγους Ξένια Προβατοπούλου και Ελένη Καλογερά, που με τη σημαντική τους βοήθεια, συνεργασία και πολύπλευρη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής συνεισέφεραν στην επιτυχή περάτωσή της, και αποτέλεσαν ιδανικούς συνεργάτες και φίλους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα επίσης να εκφράσω στα μέλη της επιστημονικής ομάδας της Μονάδας Μαστού της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου: την κα Παρασκευή Λιάκου, τον κο Πέτρο Γρηγορόπουλο, την κα Δήμητρα Κουλοχέρη, την κα Ελένη Λυκάκη, τον κο Γεώργιο Φιλιππάκη, τον κο Νίκο Μιχαλόπουλο, τον κο Δήμο Χρυσικό, την κα Ευφροσύνη Πανοπούλου και την κα Νέλλη Μπλέτσα, καθώς χωρίς τη συνεισφορά τους δεν θα ήταν δυνατή η περάτωση της μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την προϊσταμένη, τις τεχνολόγους ακτινολόγους και το επιστημονικό προσωπικό της Μονάδας Μαστού του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου, των οποίων η συνεργασία απέδειξε τη σημασία της συμμετοχής σε μια ομάδα, και την αποτελεσματικότητά της τόσο σε κλινικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο.

Βασίλειος – Στέφανος Καλλές

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	3
ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	4
ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ	6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	37
ABSTRACT	39
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	42
1.1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ	42
1.1.2 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	59
1.1.3 ΤΟ <i>IN SITU</i> ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ Η ΛΟΒΙΑΚΗ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ	67
1.1.4 ΤΟ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	75
1.1.5 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	91
1.2. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ	102
1.2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ	102
1.2.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	109
1.2.3 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΣ ΝΕΟΠΛΑΣΙΕΣ	125

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	135
2.1 ΣΚΟΠΟΣ	136
2.2 ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	138
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	143
2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	175
2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	182
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	184
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α: ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	215
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β: ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	223
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ	

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Βασίλειος – Στέφανος Καλλές

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμος

Υπηκοότητα: Ελληνική

Ημερομηνία γεννήσεως: 17 Μαρτίου 1985

Τόπος γεννήσεως: Αθήνα

Διεύθυνση κατοικίας: Π. Περιμένη 1-2, 17121, Νέα Σμύρνη

Τηλέφωνο – fax: 6973746477 – 2117105090

Email: vassilis_kalles@yahoo.gr, vkalles@med.uoa.gr

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1. Απολυτήριο Λυκείου: Αμπέτειος Σχολή Καΐρου, Βαθμός Απολυτηρίου «Άριστα» 19,5/20 (2002).
2. Ιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Βαθμός Αποφοίτησης: «Λίαν Καλώς» 7,63 (2008).

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΕ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΑ ΙΔΡΥΜΑΤΑ ΤΟΥ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΥ

1. Visiting Student του Baylor College of Medicine, Houston, U.S.A. στο course: Surgical Emergency Room (code: 600-503), Michael E. DeBakey Department of Surgery, Head Professor: Dr. Mattox. Βαθμός αξιολόγησης: Honors. (08/2008)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1. Υποψήφιος Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. Θέμα Διατριβής:
«Συγκριτική Μελέτη του Συστήματος των Ενδοθηλινών στον Καρκίνο του Μαστού». Επιβλέπων: Δρ. Γ. Ζωγράφος, Καθηγητής Χειρουργικής (6/2009 – Σήμερα)
2. Μεταπτυχιακός Φοιτητής στο Π.Μ.Σ. «Ελάχιστα Επεμβατική Χειρουργική, Ρομποτική Χειρουργική και Τηλεχειρουργική» της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Χ. Τσιγκρής, Καθηγητής Χειρουργικής (1/2012 – Σήμερα)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

- 4/2013 – σήμερα Ειδικευόμενος Χειρουργός – Β' Χειρουργική Κλινική,
Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών
- 1/2012 – 4/2013 Διοίκηση Υποβρυχίων Καταστροφών (ΔΥΚ), Αξιωματικός
Γραφείου Καταδυτικής και Υπερβαρικής Ιατρικής.
- 4/2010 – 1/2012 Φ/Γ ΥΔΡΑ (F-452), Αξιωματικός Υγειονομικού.
- 1/2009 – 2/2009 ΤΠΚ ΚΑΒΑΛΟΥΔΗΣ, Αξιωματικός Υγειονομικού.
- 11/2008 – 4/2010 Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών – Εκπαιδευόμενος Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

- 2011-2012 Εργαστήριο Ανατομίας, Νοσηλευτική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών – Επιστημονικός Συνεργάτης. *Συντονιστής και διδάσκων στο επιλεγόμενο μάθημα «Χειρουργική Κεφαλής και Τραχήλου»*
- 2010 – 2011 Εργαστήριο Ανατομίας, Νοσηλευτική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών – Επιστημονικός Συνεργάτης. *Διδάσκων στο επιλεγόμενο μάθημα «Κλινική Νευροανατομική»*
- 2009 – σήμερα Εργαστήριο Ανατομίας, Νοσηλευτική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών – Επιστημονικός Συνεργάτης.
- 2010 – σήμερα Advanced Cardiac Life Support (ACLS) Instructor
- 12-16/7/2010 Διδάσκων στη Σχολή Φρεγατών Πολεμικού Ναυτικού: Σχολείο
- 7-9/9/2010 Αντιμετώπισης Επειγόντων Περιστατικών – Παροχής Α' Βοηθειών

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1. Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών, Εκπαιδευτικά έτη: 2009 – 2010, 2010 – 2011, 2011 – 2012, 2012 – 2013.

2. Advanced Cardiac Life Support – Instructors’ Course: Νοσ. Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα, 2010
3. Advanced Cardiac Life Support: Νοσ. Ερρίκος Ντυνάν, Αθήνα, 2009
4. Κλινικό Σεμινάριο: Αγγειακή – Φλεβική Προσπέλαση με ή χωρίς την Καθοδήγηση Υπερήχων – Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, 2009
5. 32^ο Σεμινάριο Καταδυτικής – Υπερβαρικής Ιατρικής – Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, 2009
6. 13^ο Σεμινάριο Ναυτικής Ιατρικής – Ναυτικό Νοσοκομείο Αθηνών, 2009
7. Advanced Trauma Life Support – Mediterraneo Hospital, Αθήνα, 2009
8. Σχολή Υγειονομικού Πολεμικού Ναυτικού – Κέντρο Εκπαίδευσης «ΠΑΛΑΣΚΑΣ», 2009

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. «Γονιδιακό Ντόπινγκ», Καλλές Β., Μάντζιος Χ., Παντελίδου Β., Μπουτζιούκας Σ. *11^ο ΕΣΦΙΕ, Αλεξανδρούπολη, 2005*
2. «Η επίδραση των στρεσογόνων ερεθισμάτων και του άγχους στον καταμήνιο κύκλο», Καλλές Β., Παντελίδου Β., Κυριακίδης Ι., Καραδήμας Ε., Μπουτζιούκας Σ., *12^ο ΕΣΦΙΕ, Λάρισα, 2006*
3. «Ο λόγος του μήκους του δείκτη προς του παράμεσου (2D : 4D), από τη χειρομαντεία... στην πρόγνωση», Κυριακίδης Ι., Καλλές Β., Παντελίδου Β., Παπαϊωαννίδου Π., *12ο ΕΣΦΙΕ, Λάρισα, 2006*
4. «Η εποχή των ενδοθηλινών», Καλλές Β., Παντελίδου Β., Μπουτζιούκας Σ., *12^ο ΕΣΦΙΕ, Λάρισα, 2006*
5. «Ηπατίτιδα Β: Νεότερα Επιστημονικά Δεδομένα», Καλλές Β., Παντελίδου Β., *8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιολογίας, Θεσσαλονίκη, 2006*

6. «Νέες Τεχνολογίες Στην Εγχειρητική του Ορθού», Μπασδάνης Γ., Ζαταγιάς Α., Τζεβελέκη Ι., Καλλές Β., Παντελίδου Β., Χαρλαύτης Ν., *21^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη 2006*
7. «Σύγκριση του λόγου 2D:4D σε δύο ηλικιακές ομάδες του ελληνικού πληθυσμού», Ι. Κυριακίδης, Β. Παντελίδου, Β. Καλλές, Π. Παπαϊωαννίδου, *4^ο Ε.Σ.Ι.Σ. ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη 2007.*
8. «Το σύστημα των Ενδοθηλινών στην Χρόνια Καρδιακή Ανεπάρκεια», Καλλές Β., Παντελίδου Β., Στυλιάδης Ι., *13^ο ΕΣΦΙΕ, Αθήνα, 2007*
9. «Αντιμετώπιση πρωτοπαθών και μεταστατικών όγκων ήπατος με ραδιοσυχνότητες», Μπασδάνης Γ., Μέκρας Α., Καλλές Β., Τζεβελέκη Ι., Καραμανλής Α., Μέκρας Δ., *23^ο Βορειοελλαδικό Ιατρικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2008*
10. «Η εμπειρία μας από τη χειρουργική αντιμετώπιση των επιπλοκών της νόσου του Crohn», Μπασδάνης Γ., Παπαδόπουλος Β., Μιχαλόπουλος Α., Παραμυθιώτης Δ., Μέκρας Δ., Τζεβελέκη Ι., Μέκρας Α., Καλλές Β., Χαρλαύτης Ν., *7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Κέρκυρα 2008*
11. «Συγκριτική Μελέτη Ασθενών με ολική πρωκτοκολεκτομή για ελκώδη κολίτιδα με ή χωρίς προστατευτική ειλεοστομία» Μέκρας Α., Μέκρας Δ., Τζεβελέκη Ι., Καλλές Β., Καραμανλής Ε., Μιχαλόπουλος Α., Μπασδάνης Γ., *9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Νοσημάτων του Εντέρου, Λεμεσός, Κύπρος, 2010*
12. «Ενδαγγειακή Αντιμετώπιση Τραυματικών Κακώσεων Έσω Καρωτίδας» Καλλές Β., Μέκρας Α., Γεωργίου Γ., Παπαπαναγιώτου Ι., Μέκρας Δ., *23^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη, 2010*

13. «Επείγοντα Περιστατικά εν πλω σε μικρές μονάδες του Πολεμικού Ναυτικού σε Διεθνείς Αποστολές», Καλογερόπουλος Α., Καλλές Β., Παπαγεωργίου Φ., Καλογεράκης Ι., Καββάδας Ο., *23^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη, 2010*
14. «Έκφραση της Ενδοθηλίνης-1 σε ασθενείς με μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις», Καλλές Β., Προβατοπούλου Ξ., Καλογερά Ε., Νόννη Α., Γούναρη Α., Ζωγράφος Γ., *23^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων, Θεσσαλονίκη, 2010*
15. «Έκφραση της Προενδοθηλίνης-1 σε ασθενείς με μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις», Καλλές Β., Καλογερά Ε., Προβατοπούλου Ξ., Χρυσικός Δ., Παπαπαναγιώτου Ι., Γρηγορόπουλος Π., Νόννη Α., Γούναρη Α., Ζωγράφος Γ., *27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, Αθήνα, 2010*
16. «Ανάπτυξη Οστεώματος Μαστού σε έδαφος μη ψηλαφητών μαστογραφικών αλλοιώσεων», Χρυσικός Δ., Ζαγουρή Φ., Χατζηκαλής Μ., Νόννη Α., Σεργεντάνης Θ., Καλλές Β., Μπλέτσα Γ., Γρηγορόπουλος Π., Λιάκου Π., , *27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, Αθήνα, 2010*
17. «Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση», Χρυσικός Δ., Φλέσσας Ι., Ζαγουρή Φ., Αποστόλου Κ., Σεργεντάνης Θ., Θεοδωρόπουλος Γ., Μαριόλης-Σαυάκος Θ., Καλλές Β., Μιχαλόπουλος Ν., Ζωγράφος Γ., *27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, Αθήνα, 2010*
18. «Breast Lesion Excision System: Μια νέα μέθοδος βιοψίας μη ψηλαφητών μαστογραφικών αλλοιώσεων», Παπαπαναγιώτου Ι, Al-Harethee W, Καλλές Β, Γεωργίου Γ, Ματιάτου Μ, Νόννη Α, Κουλοχέρη Δ, Λυκάκη Ε, Γρηγορόπουλος

- Π, Λιάκου Π, Φιλιππάκης Γ, Θεοδωρόπουλος Γ, Μενενάκος Ε, Ζαγουρή Φ,
Ζωγράφος Γ. *37^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2011*
19. «Σύγχρονες Τάσεις στη Χειρουργική Αντιμετώπιση του Καρκίνου του Ορθού: Η
Θέση της Χαμηλής Προσθίας Εκτομής», Μέκρας Α., Μέκρας Δ., Τζεβελέκη Ι.,
Καλλές Β., Νταμπάκης Γ., Μιχαλόπουλος Α., Μπασδάνης Γ., *4^ο Πανελλήνιο
Συνέδριο ΕΕΧΠΕΠ, Θεσσαλονίκη, 2011*
20. «Άμεσες και Απώτερες Επιπλοκές της Αιμορροϊδεκτομής με Κυκλικό
Αναστομοωτήρα: Η δετής μας Εμπειρία», Γρηγορόπουλος Π., Καλλές Β.,
Παπαπαναγιώτου Ι., Μέκρας Α., Αργυρού Α., Παπαγεωργίου Κ., Ντεριάν Α., *4^ο
Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΕΧΠΕΠ, Θεσσαλονίκη, 2011*
21. «Λαπαροσκοπική Αντιμετώπιση Γιγαντιαίων Διαφραγματοκηλών με Χρήση
Πλέγματος: τα Υπέρ και τα Κατά», Σταυρόπουλος Γ., Ματιάτου Μ., Γεωργίου
Γ., Φλέσσας Ι., Καλλές Β., Τσάμης Δ., Κωνσταντίνου Ε., Πιπέρος Θ., Μενενάκος
Ε., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., Ζωγράφος Γ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό
Συνέδριο, Κύπρος, 2011*
22. «Βραχυπρόθεσμες Επιπτώσεις στην Ποιότητα Ζωής από την Εφαρμογή της
Ελάχιστα Επεμβατικής Βιοψίας Μαστού με το Σύστημα B.L.E.S. (Breast Lesion
Excision System)», Ματιάτου Μ., Γεωργίου Γ., Al-Harethee W.,
Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Φλέσσας Ι., Μιχαλόπουλος Ν., Αλεξάκης Ν.,
Μενενάκος Ε., Λιάκου Π., Ζωγράφος Γ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό
Συνέδριο, Κύπρος, 2011*
23. «B.L.E.S. (Breast Lesion Excision System) – Μια Νέα Ελάχιστα Επεμβατική
Μέθοδος Βιοψίας Μαστού», Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Al-Harethee W.,
Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Φλέσσας Ι., Μιχαλοπουλος Ν., Μενενάκος Ε.,

Λιάκου Π., Ζωγράφος Γ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Κύπρος, 2011*

24. «Ξένα Σώματα σε Διαφορετικά Τμήματα του Γαστρεντερικού Σωλήνα: Θεραπευτική Προσέγγιση», Τσάμης Δ., Φλέσσας Ι., Μιχαλόπουλος Ν., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Al-Harethee W., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Λιάκου Π., Θεοδωρόπουλος Γ., Ζωγράφος Γ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Κύπρος, 2011*
25. «Ουροδόχος Κύστη υπό Μορφήν Βουβωνοκήλης. Παρουσίαση Ενδιαφέροντος Περιστατικού», Παπαπαναγιώτου Ι., Αγγελόπουλος Χ., Παπακόστας Κ., Γεράνιος Α., Κωνσταντινίδου Ε., Πλιακοστόμος Κ., Γερόπαπας Ε., Al-Harethee W., Καλλές Β., Ματιάτου Μ., Γεωργίου Γ., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Κύπρος, 2011*
26. «Οξεία σκοληκοειδίτιδα σε κήλη de Garengot: Κλινική και Διαγνωστική Προσέγγιση», Καλλές Β., Μέκρας Α., Παπαπαναγιώτου Ι., Al-Harethee W., Μέκρας Δ., Πιπέρος Θ., Γρηγορόπουλος Π., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *10^ο Συνέδριο Χειρουργικής Εταιρίας Βορείου Ελλάδος, Θεσσαλονίκη, 2011*
27. «Επιφανειακή κήλη Spiegel με οξεία εμφάνιση: παρουσίαση σπάνιου περιστατικού», Μαριόλης-Σαψάκος Θ., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Al-Harethee W., Μπίμπας Κ., Κακλαμάνος Ι., Μπονάτσος Γ., *38^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2012*
28. «Αποκατάσταση βουβωνοκήλης με χρήση του κτενιαίου συνδέσμου ως σημείο στήριξης – τεχνική McVay: 20ετής εμπειρία», Ορφανός Φ., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Μυλωνάς Α., Τσίγκος Ε., Ορφανός Ν., Παπακωνσταντίνου Ε., Παπαθεοδώρου Κ., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *38^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2012*

29. «Έκφραση της Προενδοθηλίνης – 1 σε ασθενείς με διηθητικές και προδιηθητικές μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις», Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Προβατοπούλου Ξ., Καλογερά Ε., Ματιάτου Μ., Ζωγράφος Γ., Γούναρη Α., *1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΔΕΜΓΙΕ, Βόλος, 2012*
30. «Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική στη βιοψία υπόπτων μαστογραφικών αλλοιώσεων (Σύστημα BLES). Διάρκεια και Πόνος της Επεμβάσεως», Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Al-Harethee W., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Φλέσσας Ι., Λιάκου Π., Νόννη Α., Κουλοχέρη Δ., Παζαΐτη Α., Λυκάκη Ε., Γρηγορόπουλος Π., Θεοδωρόπουλος Γ., Μενενάκος Ε., Ζωγράφος Γ., *1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΔΕΜΓΙΕ, Βόλος, 2012*
31. «Έκφραση της Ενδοθηλίνης – 1 και των υποδοχέων της στον καρκίνο του παχέος εντέρου», Λιάκου Π., Τεπετές Κ., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Τσαγκάρη Ε., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Χατζηθεοφίλου Κ., Ρασιδιάκης Γ., *1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΔΕΜΓΙΕ, Βόλος, 2012*
32. «Ανατομικές παραλλαγές του δεξιού ηπατικού πόρου: ανατομική μελέτη με χειρουργικές προεκτάσεις», Μαριόλης-Σαψάκος Θ., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Παπαθεοδώρου Κ., Γούτας Ν., Φλέσσας Ι., Κακλαμάνος Ι., Μπονάτσος Β., Κωνσταντίνου Ε., Σγάντζος Μ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
33. «Υποδόρια σπλήνωση του κοιλιακού τοιχώματος: παρουσίαση σπάνιου περιστατικού», Παπακωνσταντίνου Ε., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Πιπέρος Θ., Καρακαξιάς Δ., Μάτζιου Β., Τσουμάκας Κ., Σωτηρόπουλος Γ., Ορφανός Φ., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*

34. «Αντιμετώπιση γάγγραινας Fournier με συνδυασμό χειρουργικής θεραπείας και επικουρικής θεραπείας με υπερβαρικό οξυγόνο: παρουσίαση περιστατικού», Δεληγιάννης Δ., Καλλές Β., Μικρός Γ., Γκουλιάμας Σ., Καραστεργίου Π., Βιτάλης Α., Παπαπαναγιώτου Ι., Ματιάτου Μ., Τζωρτζίνης Α., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
35. «Σπάνια περίπτωση μικροκυτταρικού νευροενδοκρινούς καρκινώματος στη χοληδόχο κύστη: αναφορά περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας», Αλ-Αχουάλ Ι., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Μποτσιώτη Ε., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Φλέσσας Ι., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
36. «Σύγκριση ελάχιστα επεμβατικών μεθόδων βιοψίας μαστού», Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Παπαπαναγιώτου Ι., Al-Harethee W., Καλλές Β., Φλέσσας Ι., Μιχαλόπουλος Ν., Μενενάκος Ε., Λιάκου Π., Ζωγράφος Γ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
37. «Έκφραση της Ενδοθηλίνης-1 και των υποδοχέων της στον καρκίνο του παχέος εντέρου», Λιάκου Π., Τεπετές Κ., Γερμενής Α., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Τσαγκάρη Ε., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Χατζηθεοφίλου Κ., Ρασιδιάκης Γ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
38. «Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική στη βιοψία ύποπτων μαστογραφικών αλλοιώσεων (σύστημα BLES). Διάρκεια και πόνος της επεμβάσεως», Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Al-Harethee W., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Λιάκου Π., Νόννη Α., Κουλοχέρη Δ., Παζαίτη Α., Λυκάκη Ε., Γρηγορόπουλος Π., Θεοδωρόπουλος Γ., Μενενάκος Ε., Ζωγράφος Γ., *28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*

39. «Αντιμετώπιση αμφοτερόπλευρου χυλοθώρακα σε έδαφος σαρκώματος Kaposi»,
Σωτηρόπουλος Γ., Καλλές Β., Χουντή Μ., Χουντής Π., Μωραΐτης Σ., 28^ο
Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα
40. «Ογκομειωτική χειρουργική πνεύμονος σε ασθενή με αμφοτερόπλευρες,
ευμεγέθεις, πολλαπλές εμφυσηματικές φυσαλίδες πνεύμονα μετά δεύτερη
υποτροπή πνευμοθώρακος», Σωτηρόπουλος Γ., Καλλές Β., Χουντή Μ., Χουντής
Π., Μωραΐτης Σ., 28^ο *Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό
Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
41. «Χειρουργική αποκατάσταση βουβονοκήλης – παραλλαγή της τεχνικής McVay
με χρήση συνθετικού πλέγματος», Ορφανός Ν., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι.,
Πιπέρος Θ., Παπακωνσταντίνου Ε., Φλέσσας Ι., Μυλωνάς Α., Μαριόλης-
Σαψάκος Θ., Ορφανός Φ., 28^ο *Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές
Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
42. “Novel diagnostic imaging for improved detection of breast cancer”, Zografos G.,
Koulocheri D., Liakou P., Sofras M., Hadjiagapis S., Papapanagiotou I., Kalles
V., Marmarelis V., 28^ο *Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό
Φόρουμ, 2012, Αθήνα*
43. «Παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων σε επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών:
Μια πιθανή ένδειξη για έλεγχο των BRCA1/2;», Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι.,
Ηρακλέους Α., Μπαλαμώτη Σ., Ζουλάμογλου Μ., Γραμματικάκης Ι., Βάρρας Μ.,
Μαριόλης-Σαψάκος Θ., 7^ο *Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας,
2013, Αθήνα*
44. «Συχνότητα φλεγμονωδών αλλοιώσεων τραχήλου μήτρας και HPV λοίμωξης στο
Thin-Prep test», Ηρακλέους Α., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Γιαννακούρος

Π., Καρακίτσος Π., 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 2013,
Αθήνα

45. «Ελάχιστα επεμβατική χειρουργική στη βιοψία ύποπτων μαστογραφικών αλλοιώσεων (σύστημα BLES): Διάρκεια και πόνος της επεμβάσεως», Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Al-Harethee W., Γεωργίου Γ, Ματιάτου Μ., Λιάκου Π., Νόννη Α., Κουλοχέρη Δ., Οικονόμου Β., Φώτου Μ., Γραμματικάκης Ι., Θεοδωρόπουλος Γ., Μενενάκος Ε., Ζωγράφος Γ., 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γυναικολογικής Ογκολογίας, 2013, *Αθήνα*
46. «Περινεϊκή ορθοσιγμοειδεκτομή για αντιμετώπιση πρόπτωσης ορθού: 5ετής εμπειρία», Μαριόλης – Σαψάκος Θ., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Μέκρας Α., Κακλαμάνος Ι., Θεοδούλου Κ., 5^ο Συνέδριο ΕΕΧΠΕΠ, 2013, *Αλεξανδρούπολη*
47. «Περιεδρική φλεγμονή μετά από κλειστή κάκωση πρωκτού», Σταματιάδης Α., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Φλέσσας Ι., Γρηγορόπουλος Π., Μαριόλης – Σαψάκος Θ., 5^ο Συνέδριο ΕΕΧΠΕΠ, 2013, *Αλεξανδρούπολη*

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. “The Use of Resorbable Plates and Screws in the Fixation of LeFort Fractures”, Kalles V., Savvidou D., Sakellaropoulos O., Tsodoulos S., 12th Congress of the BaSS, April 2007, *Istanbul, Turkiye*
2. “Sexual Dimorphism of Second to Fourth digit ratio (2D:4D) in Greek Population”, Pappaiouannidou P., Kyriakidis I., Pantelidou V., Kalles V., 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, September 2007, *Amsterdam, The Netherlands*
3. “The Second to Fourth Digit Ratio (2D:4D) and Predisposition to Myocardial Infraction in Greek Population”, Pappaiouannidou P., Kyriakidis I., Pantelidou V.,

Kalles V., Gemitzis K., *South Eastern Europe Congress of Clinical Pharmacology and Pharmacotherapy in Health Care, June 2008, Novi Sad, Serbia*

4. “Medical Incidents in Greek Naval Forces During United Nations Interim Force in Lebanon (UNIFIL)”, Kalogeropoulos A., Kavvadas O., Kalles V. , Kalogerakis I., Papageorgiou F., Kotsalas N., *15th Congress of the Balkan Military Medical Committee, June 2010, Pieria, Greece*
5. “Serum expression of endothelin-1 (ET-1) in women with mammographic abnormalities.” Kalles V, Provatopoulou X, Kalogera E, Nonni A, Gounaris A, Zografos GC. *22nd International Congress on Anti-Cancer Treatment, 2011, Paris, France*
6. “Pain in stereotactic vacuum assisted breast biopsy with the use of radiofrequency.” Kalles V, Papapanagiotou I, Al-Harethee W, Matiatou M, Georgiou G, Koulocheri D, Theodoroopulos G, Nonni A, Liakou P, Zografos GC. *12th St Gallen International Breast Cancer Conference, 2011*
7. “Stereotactic vacuum assisted breast biopsy system (BLES) with the use of radiofrequency: a matter of time.” Papapanagiotou I, Georgiou G, Kalles V, Al-Harethee W, Matiatou M, Koulocheri D, Nonni A, Theodoropoulos G, Filippakis G, Zografos GC. *12th St Gallen International Breast Cancer Conference, 2011*
8. “Health-related quality of life after breast biopsy with the use of radiofrequency: the Greek initial experience.” Matiatou M, Georgiou G, Al-Harethee W, Kalles V, Papapanagiotou I, Flessas I, Maniou I, Giannios P, Filippakis G, Zografos GC. *12th St Gallen International Breast Cancer Conference, 2011*
9. “What impact do tobacco policies, clean indoor air laws, have on the use of tobacco by navy personnel?” Kalogeropoulos A., Trikola A., Kalogeropoulou M.,

Psochias P., Kalles V. *16th Congress of the Balkan Military Medical Committee, June 2011, Bucharest, Romania*

10. “The knowledge of hygiene practices among navy personnel” Kalogeropoulos A., Trikola A., Kalogeropoulou M., Kalles V., *16th Congress of the Balkan Military Medical Committee, June 2011, Bucharest, Romania*
11. “Breast Lesion Excision System (BLES): A novel stereotactic vacuum assisted breast biopsy system for non-palpable mammographic lesions”, Papapanagiotou I., Al-Harethee W., Kalles V., Grammatikakis I., Matiatou M., Georgiou G., Nonni A., Koulocheri D., Lykaki E., Zagouri F., Liakou P., Zografos G., *8th Congress on Women’s Health and Disease, 2011, Kos, Greece*
12. “Role of Big Endothelin-1 in the early diagnosis of Lobular Neoplasia of the breast”, Gounaris A., Kalles V., Kalogera E., Provatopoulou X., Kastania A., Liakou P., Nonni A., Zografos G.C.. *8th European Breast Cancer Conference, 2012, Vienna, Austria*
13. “Breast Lesion Excision System for diagnosis of suspicious non-palpable mammographic lesions: Does thermal tissue damage affect diagnosis and outcome?”, Al-Harethee W., Papapanagiotou I., Kalles V., Matiatou M., Georgiou G., Nonni A., Liakou P., Theodoropoulos G., Zografos G.C. *8th European Breast Cancer Conference, 2012, Vienna, Austria*
14. “Comparison of different vacuum-assisted breast biopsy methods – a time-based analysis”, Georgiou G., Matiatou M., Papapanagiotou I., Kalles V., Al-Harethee W., Michalopoulos N., Koulocheri D., Menenakos E., Liakou P., Zografos G.C. *8th European Breast Cancer Conference, 2012, Vienna, Austria*
15. “Pain in stereotactic breast biopsy for non-palpable mammographic lesions – comparison of two biopsy methods”, Papapanagiotou I., Kalles V., Al-Harethee

- W., Georgiou G., Matiatou M., Provatopoulou X., Zagouri F., Grigoropoulos P., Liakou P., Zografos G.C.. *8th European Breast Cancer Conference, 2012, Vienna, Austria*
16. “Health-related quality of life after stereotactic vacuum assisted breast biopsy system utilizing radio frequency – Breast Lesion Excision System (BLES)”, Matiatou M., Georgiou G., Al-Harethee W., Papapanagiotou I., Kalles V., Flessas I., Alexakis N., Menenakos E., Liakou P., Zografos G.C.. *8th European Breast Cancer Conference, 2012, Vienna, Austria*
17. “Breast Lesion Excision System for Diagnosis of Suspicious Nonpalpable Breast Lesions: Does Thermal Tissue Damage Affect Diagnosis and Outcome?”, Al-Harethee W., Papapanagiotou, I. Matiatou M., Kalles V., Georgiou G., Nonni A., Liakou P., Manouras A., Theodoropoulos G., Zografos G.C.. *13th Annual Meeting of the American Society of Breast Surgeons, 2012, Phoenix, AZ, USA*
18. “Correlation between mammographic findings and prognostic factors of intraductal carcinoma”, Lykaki E., Chatoupis K., Tserpes N., Papapanagiotou I., Kalles V., Koulocheri D., Liakou P., Tzagari E., Nonni A., Zografos G.C.. *14th Milan Breast Cancer Conference, 2012, Milan, Italy*
19. “Oct-4 gene expression and absence of DAZL gene expression in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer”, Varras M., Stefanidis K., Griva T., Kalles V., Papadopoulos Z., Akrivis C., Mavrogianni D., Loutradis D. *XX FIGO World Congress of Gynecology and Obstetrics, 2012, Rome, Italy*
20. “Heterotopic pancreatic tissue located in the subserosa of the jejunum: a case report”, Barkolias C, Orfanos N, Georgiou G, Kalles V, Papapanagiotou I,

Flessas I, Vrakopoulou G-Z, Kaklamanos I, Mariolis – Sapsakos T. *10th Annual ENETS Conference, 2013, Barcelona, Spain*

21. “Small-cell carcinoma of the gallbladder: case report and review of the literature”, Georgiou G, Al-Ahwal J, Matiatou M, Papapanagiotou I, Zoulamoglou M, Piperos T, Goutas N, Kalles V, Menenakos E, Mariolis – Sapsakos T. *10th Annual ENETS Conference, 2013, Barcelona, Spain*
22. “Increased serum levels of HGF in response to surgical management of breast cancer patients”, Georgiou GP, Provatopoulou X, Kalegera E, Matiatou MA, Kalles V, Papapanagiotou IK, Zografos GC, Gounaris A. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*
23. “Plasma expression of endothelin in patients with ductal carcinoma of the breast”, Kalles V, Kalogera E, Provatopoulou X, Papapanagiotou IK, Georgiou GP, Gounaris A, Zografos GC. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*
24. “Stereotactic breast biopsy with the use of BLES: Analysis of procedure characteristics”, Papapanagiotou IK, Kalles V, Liakou P, Al-Harethee W, Georgiou GP, Matiatou M, Koulocheri D, Nonni A, Theodoropoulos G, Zografos GC. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*
25. “MUT: A novel diagnostic imaging technology for improved detection of breast cancer”, Zografos GC, Koulocheri D, Liakou P, Sofras M, Hadjiagapis S, Papapanagiotou IK, Kalles V, Marmarelis V. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*
26. “Intraductal carcinoma: mammographic findings and prognostic factors”, Papapanagiotou IK, Chatoupis K, Lykaki E, Kalles V, Tserpes N, Koulocheri D,

Nonni A, Zografos GC. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*

27. “Breast cancer in elderly: our experience”, Grigoropoulos P, Danielis M, Papapanagiotou IK, Kalles V, Tsikkinis C, Ammari S, Gounaris A, Nisiotis A. *13th St Gallen Breast Cancer Conference, 2013, St Gallen, Switzerland*
28. “Breast Lesion Excision System (BLES) State of Art”, Al-harethee W., Katselis C., Matiatou M., Kalles V., Papapanagiotou I., Georgiou G., Golbakhshi B., Zografos G. *14th Annual Meeting of the American Society of Breast Surgeons, 2013, Chicago, IL, USA*
29. “Endothelin plasma and tissue expression in ductal carcinoma of the breast: Correlation with clinicopathological characteristics and VEGF”, Provatopoulou X, Kalles V, Kalogera E, Nonni A, Matiatou M, Papapanagiotou I, Zografos GC. *13th International Conference on Endothelin, 2013, Tokyo, Japan*

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. Comparison of the 2D:4D ratio in two age groups in Greek population. Kyriakidis I, Pantelidou V, Kalles V, Papaioannidou P. *Scientific Annals of the Medical School of Thessaloniki*, 2007;34S:157
2. Sexual dimorphism of second to fourth digit ratio (2D:4D) in Greek population. Papaioannidou P, Kyriakidis I, Pantelidou V, Kalles V. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology* 2007, 101 (S1):158-207
3. Pain in stereotactic vacuum assisted breast biopsy with the use of radiofrequency. Kalles V, Papapanagiotou I, Al-Harethee W, Matiatou M, Georgiou G, Koulocheri D, Theodoropoulos G, Nonni A, Liakou P, Zografos GC. *The Breast* 2011;20(S1):S35

4. Stereotactic vacuum assisted breast biopsy system (BLES) with the use of radiofrequency: a matter of time. Papapanagiotou I, Georgiou G, Kalles V, Al-Harethee W, Matiatou M, Koulocheri D, Nonni A, Theodoropoulos G, Filippakis G, Zografos GC. *The Breast* 2011;20(S1):S34
5. Health-related quality of life after breast biopsy with the use of radiofrequency: the Greek initial experience. Matiatou M, Georgiou G, Al-Harethee W, Kalles V, Papapanagiotou I, Flessas I, Maniou I, Giannios P, Filippakis G, Zografos GC. *The Breast* 2011;20(S1):S35
6. Pain in stereotactic breast biopsy for non-palpable mammographic lesions – comparison of two biopsy methods. Papapanagiotou I, Kalles V., Al-Harethee W., Georgiou G., Matiatou M., Provatopoulou X., Zagouri F., Grigoropoulos P., Liakou P., Zografos G.C.. *European Journal of Cancer* 2012; 48, S64
7. Breast Lesion Excision System for diagnosis of suspicious non-palpable mammographic lesions: Does thermal tissue damage affect diagnosis and outcome?. Al-Harethee W., Papapanagiotou I, Kalles V., Matiatou M., Georgiou G., Nonni A., Liakou P., Theodoropoulos G., Zografos G.C.. *European Journal of Cancer* 2012; 48, S59
8. Comparison of different vacuum-assisted breast biopsy methods – a time-based analysis. Georgiou G., Matiatou M., Papapanagiotou I, Kalles V., Al-Harethee W., Michalopoulos N., Koulocheri D., Menenakos E., Liakou P., Zografos G.C.. *European Journal of Cancer* 2012; 48, S61
9. Role of Big Endothelin-1 in the early diagnosis of Lobular Neoplasia of the breast. Gounaris A., Kalles V., Kalogera E., Provatopoulou X., Kastania A., Liakou P., Nonni A., Zografos G.C.. *European Journal of Cancer* 2012; 48, S65

10. Health-related quality of life after stereotactic vacuum assisted breast biopsy system utilizing radio frequency – Breast Lesion Excision System (BLES). Matiatou M., Georgiou G., Al-Harethee W., Papapanagiotou I., Kalles V., Flessas I., Alexakis N., Menenakos E., Liakou P., Zografos G.C.. *European Journal of Cancer* 2012; 48, S60
11. Oct-4 gene expression and absence of DAZL gene expression in luteinized ovarian granulosa cells of women undergoing IVF or ICSI and embryo transfer. Varras M., Stefanidis K., Griva T., Kalles V., Papadopoulos Z., Akrivis C., Mavrogianni D., Loutradis D., *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2012;119, S534
12. Increased serum levels of HGF in response to surgical management of breast cancer patients. Georgiou GP, Provatopoulou X, Kalegera E, Matiatou MA, Kalles V, Papapanagiotou IK, Zografos GC, Gounaris A. *The Breast* 2013;22(S1):S23
13. Plasma expression of endothelin in patients with ductal carcinoma of the breast. Kalles V, Kalogera E, Provatopoulou X, Papapanagiotou IK, Georgiou GP, Gounaris A, Zografos GC. *The Breast* 2013;22(S1):S24
14. Stereotactic breast biopsy with the use of BLES: Analysis of procedure characteristics. Papapanagiotou IK, Kalles V, Liakou P, Al-Harethee W, Georgiou GP, Matiatou M, Koulocheri D, Nonni A, Theodoropoulos G, Zografos GC. *The Breast* 2013;22(S1):S44
15. MUT: A novel diagnostic imaging technology for improved detection of breast cancer. Zografos GC, Koulocheri D, Liakou P, Sofras M, Hadjiagapis S, Papapanagiotou IK, Kalles V, Marmarelis V. *The Breast* 2013;22(S1):S45

16. Intraductal carcinoma: mammographic findings and prognostic factors. Papapanagiotou IK, Chatoupis K, Lykaki E, Kalles V, Tserpes N, Koulocheri D, Nonni A, Zografos GC. *The Breast* 2013;22(S1):S69
17. Breast cancer in elderly: our experience. Grigoropoulos P, Danielis M, Papapanagiotou IK, Kalles V, Tsikkinis C, Ammari S, Gounaris A, Nisiotis A. *The Breast* 2013;22(S1):S81
18. Endothelin plasma and tissue expression in ductal carcinoma of the breast: Correlation with clinicopathological characteristics and VEGF. Provatopoulou X, Kalles V, Kalogera E, Nonni A, Matiatou M, Papapanagiotou I, Zografos GC. *Life Sciences* 2013;93:e7-e24

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Hybrid procedures in the treatment of thoracoabdominal aneurysms – a systematic review. Bakoyiannis C, Kalles V, Economopoulos K, Georgopoulos S, Tsigris C, Papalambros E. *Journal of Endovascular Therapy*, 2009;16(4):443-450
2. Concurrent versus two-stage hybrid procedures in the treatment of thoracoabdominal aortic aneurysms. Bakoyiannis C, Economopoulos K, Kalles V, Papalambros E. *Journal of Endovascular Therapy*, 2009;16(6):755-759
3. Digit ratios and relation to myocardial infarction in Greek men and women. Kyriakidis I, Papaioannidou P, Pantelidou V, Kalles V, Gemitzis K. *Gender Medicine* 2010;7(6):628-636
4. Serum levels of HSP90 in the Continuum of Breast Ductal and Lobular Lesions. Zagouri F, Sergeantanis TN, Provatopoulou X, Kalogera E, Chrysikos D, Lymperi M, Papadimitriou CA, Zografos E, Bletsas G, Kalles V, Zografos GC, Gounaris A. *In Vivo*, 2011 Jul-Aug;25(4):669-72

5. Changes in treatment of rectal cancer: increased use of low anterior resection. Mekras A, Michalopoulos A, Papadopoulos VN, Mekras D, Kalles V, Tzeveleki I, Dabakis G, Netta S, Basdanis G. *Techniques in Coloproctology* 2011 Oct;15 Suppl 1:S51-54
6. Early and late complications of stapled haemorrhoidopexy: a 6-year experience from a single surgical clinic. Grigoropoulos P, Kalles V, Papapanagiotou IK, Mekras A, Argyrou A, Papageorgiou K, Derian A. *Techniques in Coloproctology* 2011 Oct;15 Suppl 1:S79-81
7. Complications of stereotactic vacuum assisted breast biopsy system utilizing radiofrequency. Al-Harethee W, Theodoropoulos G, Filippakis GM, Papapanagiotou I, Matiatou M, Georgiou G, Kalles V, Koulocheri D, Nonni A, Konstadoulakis MM, Manouras A, Zografos GC. *Eur J Radiol* 2012 [Epub ahead of print]
8. Clinical significance of De Garengeot's hernia: A case of acute appendicitis and review of literature. Piperos T, Kalles V, Al Ahwal Y, Konstantinou E, Skarpas G, Mariolis-Sapsakos T. *Int J Surg Case Rep.* 2012;3(3):116-7
9. Circulating levels of Endothelin-1 (ET-1) and its precursor (Big ET-1) in breast cancer early diagnosis. Kalles V, Zografos GC, Provatopoulou X, Kalogera E, Liakou P, Georgiou G, Sagkriotis A, Nonni A, Gounaris A. *Tumor Biology* 2012 Aug;33(4):1231-6
10. De Garengeot's hernia: a comprehensive review. Kalles V, Mekras A, Mekras D, Papapanagiotou I, Al-Harethee W, Sotiropoulos G, Liakou P, Kastania A, Piperos T, Mariolis-Sapsakos T. *Hernia* 2012 [Epub ahead of print]
11. Anatomic variations of the right hepatic duct: results and surgical implications from a cadaveric study. Mariolis-Sapsakos T, Kalles V, Papatheodorou K, Goutas

- N, Papapanagiotou I, Flessas I, Kaklamanos IG, Arvanitis D, Konstantinou EA, Sgantzios M. *Anatomy Research International* 2012 [Epub ahead of print].
12. Markers of stem cells in human ovarian granulosa cells: is there a clinical significance in ART? Varras M, Griva T, Kalles V, Akrivis C, Papanagiotou I, Paparisteidis N. *Journal of Ovarian Research* 2012 Nov 20;5(1)36
13. The current status of Positron Emission Mammography in breast cancer diagnosis. Kalles V, Zografos GC, Provatopoulou X, Koulocheri D, Gounaris A. *Breast Cancer* 2012 Dec 13 [Epub ahead of print]
14. Subcutaneous splenosis of the abdominal wall: report of a case and review of literature. Papakonstantinou E, Kalles V, Papapanagiotou I, Piperos T, Karakaxas D, Bonatsos V, Tsoumakas K, Orfanos F, Mariolis-Sapsakos T, *Case Reports in Surgery*, 2012
15. Thermal damage of the specimen during breast biopsy with the use of Breast Lesion Excision System: does it affect diagnosis? Al-Harethee WA, Kalles V, Papapanagiotou I, Matiatou M, Georgiou G, Nonni A, Koulocheri D, Liakou P, Theodoropoulos G, Zografos GC. *Breast Cancer* 2013 Mar 16 [Epub ahead of print]
16. Bilateral aberrant origin of the inferior thyroid artery from the common carotid artery. Mariolis – Sapsakos T, Kalles V, Papapanagiotou I, Bonatsos V, Orfanos N, Kaklamanos IG, Manolis E. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2013 [Epub ahead of print]

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. The role of endothelins in heart failure. Kalles V, Pantelidou V, Styliadis I. *Cardiologia* 2007, 1:7-11
2. The role of endothelins in arterial hypertension. Kalles V, Pantelidou V, Kyriakidis I, Styliadis I. *Arterial Hypertension* 2008, Vol 17; 2-3:109-116
3. The endothelin axis and its role in glaucoma. Kalles V, Papayiannis A, Papapanagiotou I, Skarpas G, Mariolis – Sapsakos T. *Medical Annals*, 2010;5:245-248
4. The human pubic symphysis: anatomic marbles. Kalles V, Papapanagiotou I, Chryssikos D, Skarpas G, Mariolis – Sapsakos T. *Medical Annals*, 2010;6:274-281

ΒΡΑΒΕΙΑ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1. Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης για την ανακοίνωση: «“Novel diagnostic imaging for improved detection of breast cancer”», Zografos G., Koulocheri D., Liakou P., Sofras M., Hadjiagapis S., Papapanagiotou I., Kalles V., Marmarelis V., 28^ο Πανελλήνιο Χειρουργικό Συνέδριο και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ, 2012, Αθήνα
2. Έπαινος για την ανακοίνωση: «Έκφραση της Ενδοθηλίνης – 1 και των υποδοχέων της στον καρκίνο του παχέος εντέρου», Λιάκου Π., Τεπετές Κ., Παπαπαναγιώτου Ι., Καλλές Β., Τσαγκάρη Ε., Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Χατζηθεοφίλου Κ., Ρασιδάκης Γ., 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο ΕΔΕΜΓΓΕ, Βόλος, 2012
3. Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης για την ανακοίνωση: «Αποκατάσταση βουβωνοκήλης με χρήση του κτενιαίου συνδέσμου ως σημείο

στήριξης – τεχνική McVay: 20ετής εμπειρία», Ορφανός Φ., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Μυλωνάς Α., Τσίγκος Ε., Ορφανός Ν., Παπακωνσταντίνου Ε., Παπαθεοδώρου Κ., Μαριόλης-Σαψάκος Θ., *38^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2012*

4. Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης για την ανακοίνωση: «B.L.E.S. (Breast Lesion Excision System) – Μια Νέα Ελάχιστα Επεμβατική Μέθοδος Βιοψίας Μαστού», Γεωργίου Γ., Ματιάτου Μ., Al-Harethee W., Καλλές Β., Παπαπαναγιώτου Ι., Φλέσσας Ι., Μιχαλοπουλος Ν., Μενενάκος Ε., Λιάκου Π., Ζωγράφος Γ., *10^ο Ελλαδοκυπριακό Χειρουργικό Συνέδριο, Κύπρος, 2011*
5. 1st Best Poster Presentation Award for “Breast Lesion Excision System (BLES): A novel stereotactic vacuum assisted breast biopsy system for non-palpable mammographic lesions”, I. Papapanagiotou, W.Al-Harethee, V.Kalles , I.Grammatikakis, M.Matiatou, G.Georgiou, A. Noni, D.Koulocheri, E.Lykaki, F.Zagouri, P.Liakou, G. Zografos, *8th Congress on Women’s Health and Disease, Kos, 2011*
6. Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης για την ανακοίνωση: «Breast Lesion Excision System: Μια νέα μέθοδος βιοψίας μη ψηλαφητών μαστογραφικών αλλοιώσεων», Παπαπαναγιώτου Ι, Al-Harethee W, Καλλές Β, Γεωργίου Γ, Ματιάτου Μ, Νόννη Α, Κουλοχέρη Δ, Λυκάκη Ε, Γρηγορόπουλος Π, Λιάκου Π, Φιλιππάκης Γ, Θεοδωρόπουλος Γ, Μενενάκος Ε, Ζαγουρή Φ, Ζωγράφος Γ. *37^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, 2011*
7. Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Ανακοίνωσης για την ανακοίνωση: «Εκφραση της Προενδοθελίνης-1 σε ασθενείς με μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις», Καλλές Β., Καλογερά Ε., Προβατοπούλου Ξ., Χρυσικός Δ., Παπαπαναγιώτου Ι., Γρηγορόπουλος Π., Νόννη Α., Γούναρη Α., Ζωγράφος Γ.,

27^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής και Διεθνές Χειρουργικό Φόρουμ 2010, Αθήνα, 2010

8. Έπαινος για την ανακοίνωση: «Η επίδραση των στρεσογόνων ερεθισμάτων και του άγχους στον καταμήνιο κύκλο», Καλλές Β., Παντελίδου Β., Κυριακίδης Ι., Καραδήμας Ε., Μπουτζιούκας Σ., *12^ο ΕΣΦΙΕ, Λάρισα, 2006*
9. Έπαινος για την ανακοίνωση: «Ο λόγος του μήκους του δείκτη προς του παράμεσου (2D : 4D), από τη χειρομαντεία... στην πρόγνωση», Κυριακίδης Ι., Καλλές Β., Παντελίδου Β., Παπαϊωαννίδου Π., *12ο ΕΣΦΙΕ, Λάρισα, 2006*

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΤΑΙΡΙΩΝ

European Society for Medical Oncology (ESMO)

Ελληνική και Διεθνής Εταιρεία Μοριακής και Γονιδιακής Ιατρικής και Έρευνας

Σύλλογος Νέων Ιατρών

ΕΞΩΤΕΡΙΚΟΣ ΚΡΙΤΗΣ (REVIEWER) ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ

Case Reports In Medicine

ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΕΚΔΟΤΙΚΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΟΔΙΚΩΝ

OA Case Reports

World Research Journal of Anatomy

ΜΕΛΟΣ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

1. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο κατ' Οίκον Νοσηλείας, Αθήνα 15-17/12/2010
2. Ιατρική Έρευνα και Εκπαίδευση στην Ελλάδα, Αθήνα, 15/3/2012
3. Εθνικές Κατευθυντήριες Οδηγίες (Guidelines) στη Χειρουργική Ογκολογία του Μαστού, Αθήνα, 25-26/5/2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Το σύστημα των ενδοθηλινών εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη ποικίλων νεοπλασιών, συμμετέχοντας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την κυτταρική διήθηση και τη νεοαγγειογένεση. Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση της Ενδοθηλίνης-1 (ET-1) και των υποδοχέων της έχει συσχετισθεί με την μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στο διηθητικό καρκίνωμα, ενώ τα επίπεδα της πρόδρομου μορίου της (Προενδοθηλίνη-1, Big ET-1) έχουν βρεθεί αυξημένα σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο μαστού. Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η εκτίμηση της έκφρασης των ενδοθηλινών στη συστηματική κυκλοφορία και σε ιστικά δείγματα βιοψίας γυναικών με κακοήθεις και καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού, και η συσχέτιση με καθιερωμένες παραμέτρους εκτίμησης της νεοπλασίας

Υλικό και Μέθοδος: Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 124 γυναίκες που υπεβλήθησαν σε στερεοτακτική βιοψία μαστού για ύποπτες μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις, και 30 υγιείς γυναίκες ως ομάδα ελέγχου. Μετρήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο περιφερικό αίμα με χρήση ELISA, ενώ η μελέτη της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα έγινε με ανοσοϊστοχημική ημιποσοτική μέθοδο. Διερευνήθηκε η συσχέτιση των ευρημάτων μεταξύ τους και με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου.

Αποτελέσματα: Τα επίπεδα της Big ET-1, ανευρέθησαν σημαντικά αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με IDC και DCIS σε σχέση με ασθενείς με Υπερπλαστικές Αλλοιώσεις και την ομάδα ελέγχου. Δεν αναδείχθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ET-1, τόσο στο πλάσμα όσο και στον ιστό μεταξύ των παραπάνω ομάδων ασθενών. Στις ασθενείς με IDC, τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 δεν συσχετίστηκαν με το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, την έκφραση ορμονικών υποδοχέων, την υπερέκφραση του Her2, την παρουσία

λεμφαδενικών μεταστάσεων, το στάδιο της νόσου και την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό. Επίσης, στις ασθενείς με DCIS, τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 δεν συσχετίστηκαν με το πυρηνικό grade του όγκου. Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα της Big ET-1 ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα ασθενών με LN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς να παρατηρείται αύξηση της έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα και τον ιστό.

Συμπεράσματα: Η σημαντική αύξηση της Big ET-1 σε ασθενείς με IDC, DCIS και LN επιβεβαιώνει την υπόθεση της διαταραχής του συστήματος των ενδοθηλινών στις νεοπλαστικές αλλοιώσεις του μαστού, αναδεικνύοντάς την ως πιθανό βιοδείκτη της νόσου. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση του ρόλου των ενδοθηλινών μπορεί να συμβάλλει σε νέες διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις των νεοπλασματικών παθήσεων του μαστού.

ABSTRACT

Aim: Endothelins are involved in the evolution of multiple malignancies, participating in the proliferation of cancer cells, tumor invasion and neoangiogenesis. In breast cancer, the expression of Endothelin-1 (ET-1) and its receptors has been associated with the transition from benign breast tissue to invasive carcinoma, while the expression of its precursor (Big Endothelin-1, Big ET-1) has been observed to be elevated in patients with invasive breast cancer. The purpose of the present study is to determine the circulating levels and tissue expression of endothelin in patients with benign or malignant breast lesions, and the possible correlation with established neoplasia characteristics.

Materials and Methods: 124 women that underwent stereotactic breast biopsy for the assessment of suspicious non-palpable breast lesions, and 30 healthy women who comprised the control group, were included in the study. Circulating levels of ET-1 and Big ET-1 were measured using ELISA, while the expression of ET-1 and VEGF in biopsy tissue samples was assessed using semi-quantitative immunohistochemical staining. The correlation of these results with the clinicopathologic characteristics of the disease was also investigated.

Results: The plasma levels of Big ET-1 were found to be significantly increased in patients with IDC and DCIS compared to patients with Proliferative Lesions and controls. There was no significant difference in the plasma or tissue expression of ET-1 between the patient groups. In patients with IDC, plasma expression of ET-1 and Big ET-1 did not correlate with tumor size, tumor grade, ER/PR status, Her2 overexpression, axillary lymph node invasion, TNM stage or tissue ET-1 and VEGF expression. Moreover, in patients with DCIS, plasma expression of ET-1 and Big ET-1 did not correlate with the nuclear grade. Plasma expression of Big ET-1, was

significantly elevated in patients with LN compared to controls. However, there was no difference in plasma or tissue expression of ET-1 in these patients.

Conclusions: The elevated expression of Big ET-1 in patients with IDC, DCIS and LN confirms the hypothesis of deregulation of the endothelin system in neoplastic lesions of the breast, highlighting the potential use of Big ET-1 as a biomarker of the disease. The clarification of the exact role of the endothelin system in breast cancer might contribute to new diagnostic, prognostic and therapeutic approaches in breast cancer patients.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

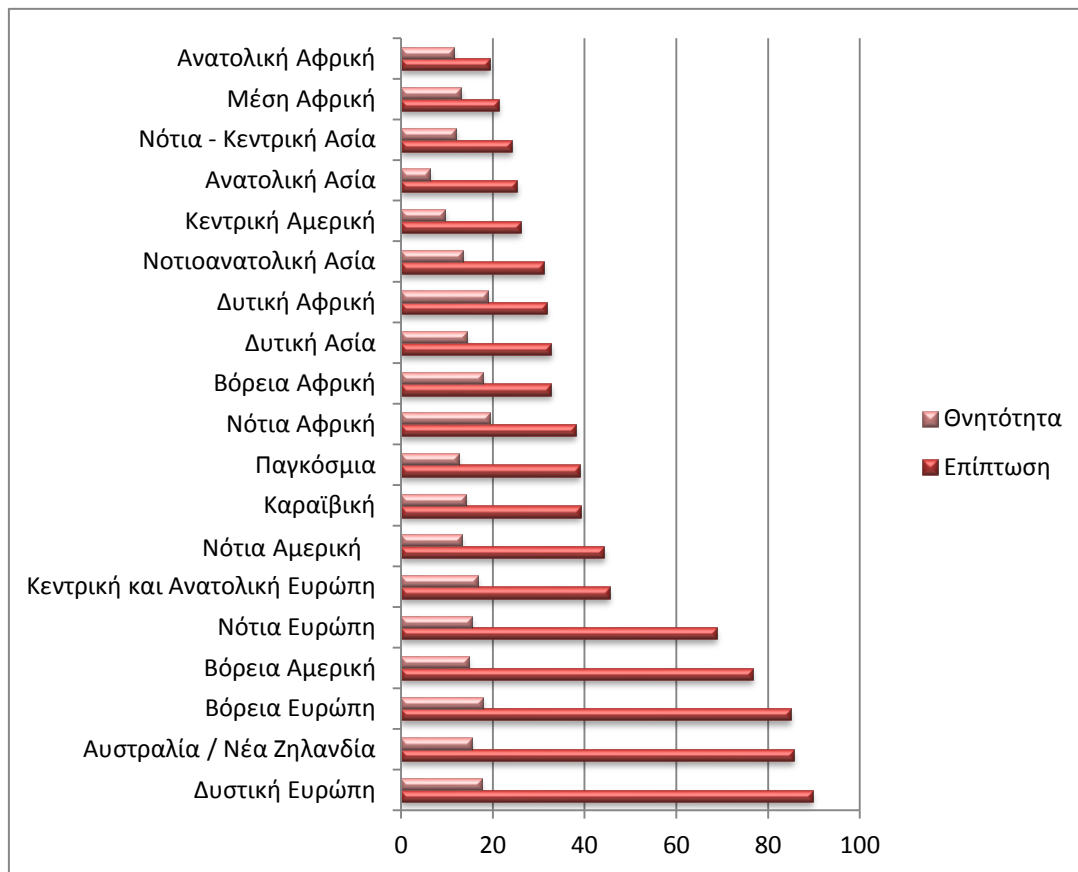
1.1 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.1.1 Επιδημιολογία, Παράγοντες Κινδύνου και Γενετική

1.1.1.1 Επιδημιολογία του Καρκίνου του Μαστού

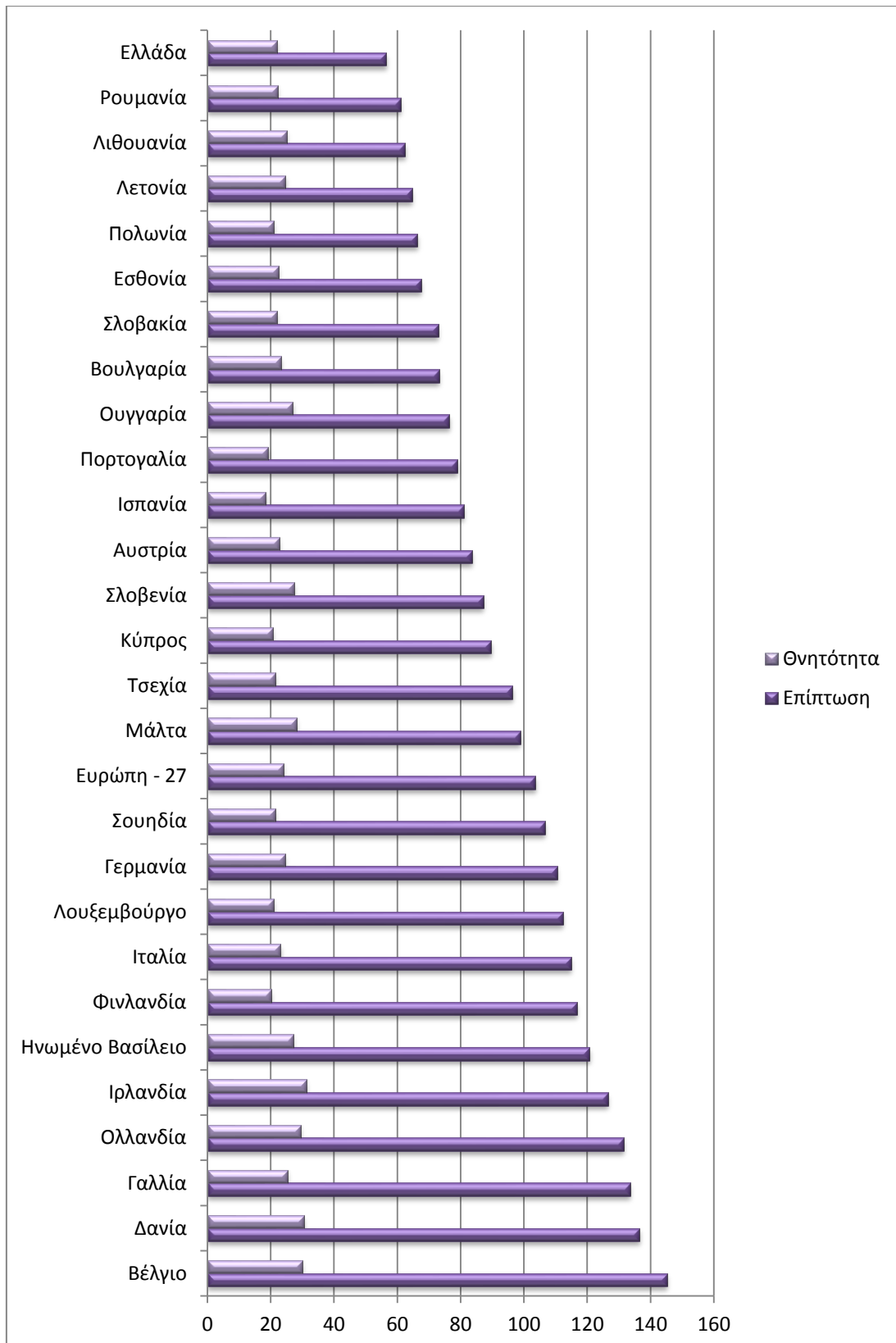
Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια στο θήλυ φύλο, με ποσοστό 18% επί του συνόλου των κακοηθειών και περισσότερες από 1.400.000 νέες περιπτώσεις κατ' έτος παγκοσμίως. Αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες και την κυριότερη αιτία θανάτου στις γυναίκες ηλικίας 40-59 ετών [1]. Με βάση τα στοιχεία της περιόδου 2007 – 2009 στις ΗΠΑ, 12,38% των γυναικών που γεννιούνται σήμερα θα διαγνωστούν με καρκίνο του μαστού σε κάποια στιγμή στη ζωή τους [2], ποσοστό που αντιστοιχεί σε 1 στις 8 γυναίκες περίπου.

Παγκοσμίως, η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού είναι μεγαλύτερη στη Βόρεια Αμερική και τη Βόρεια Ευρώπη, και μικρότερη στην Ασία και την Αφρική (Σχήμα 1.1) [3]. Η συχνότητα της νόσου στις ΗΠΑ είχε αυξηθεί σταθερά από το 1930 έως το 1980, και η αύξηση αυτή κυμαινόταν σε 1,2% ετησίως, ενώ την περίοδο 1980 – 1987 η αύξηση αυτή ήταν 3,8% ετησίως, και σταθεροποιήθηκε έως το 1998 [4-6]. Το 2010, υπολογίζεται ότι στις ΗΠΑ διαγνώστηκαν 210.000 νέες περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού, και 40.000 γυναίκες απεβίωσαν από την ασθένεια αυτή [1]. Στην Ευρώπη, τα νέα κρούσματα υπολογίζονται περί τις 130.000 κάθε χρόνο, ενώ στην Ελλάδα η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού υπολογίζεται σε 3.500 – 4.000 νέες περιπτώσεις ετησίως (Σχήμα 1.2).

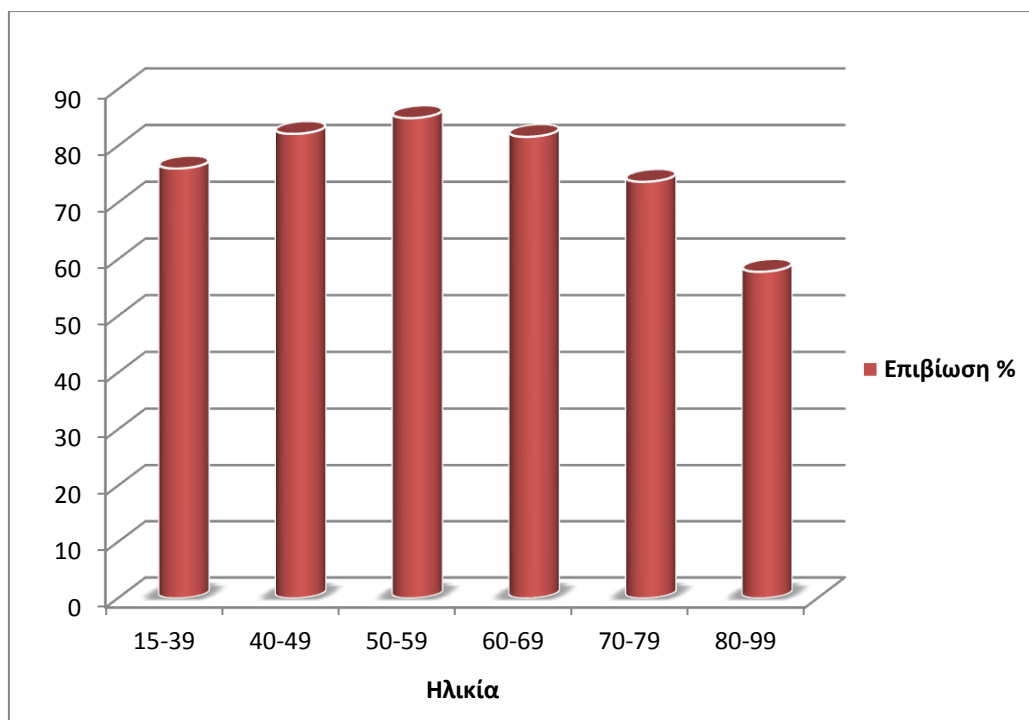


Σχήμα 1.1 Παγκόσμια επίπτωση και θνητότητα του καρκίνου του μαστού ανά 100.000 γυναικείου πληθυσμού. (Προσαρμοσμένο από Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10)

Στις Δυτικές Χώρες, η θνησιμότητα εξ αιτίας του καρκίνου του μαστού έχει μειωθεί από το 1975, γεγονός που αποδίδεται κυρίως στην εισαγωγή του προληπτικού ελέγχου με τη χρήση της μαστογραφίας και στην ευρύτερη χρήση και βελτίωση των επικουρικών θεραπειών [7]. 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 αναλόγως της ηλικίας διάγνωσης. Έτσι, οι γυναίκες που βρίσκονται στην 5^η ή 6^η δεκαετία της ζωής τους όταν διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (Σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.2 Θνητότητα και Επίπτωση του Καρκίνου του Μαστού στην Ευρώπη των 27, στοιχεία 2008 (Προσαρμοσμένο από Cancer Research UK)



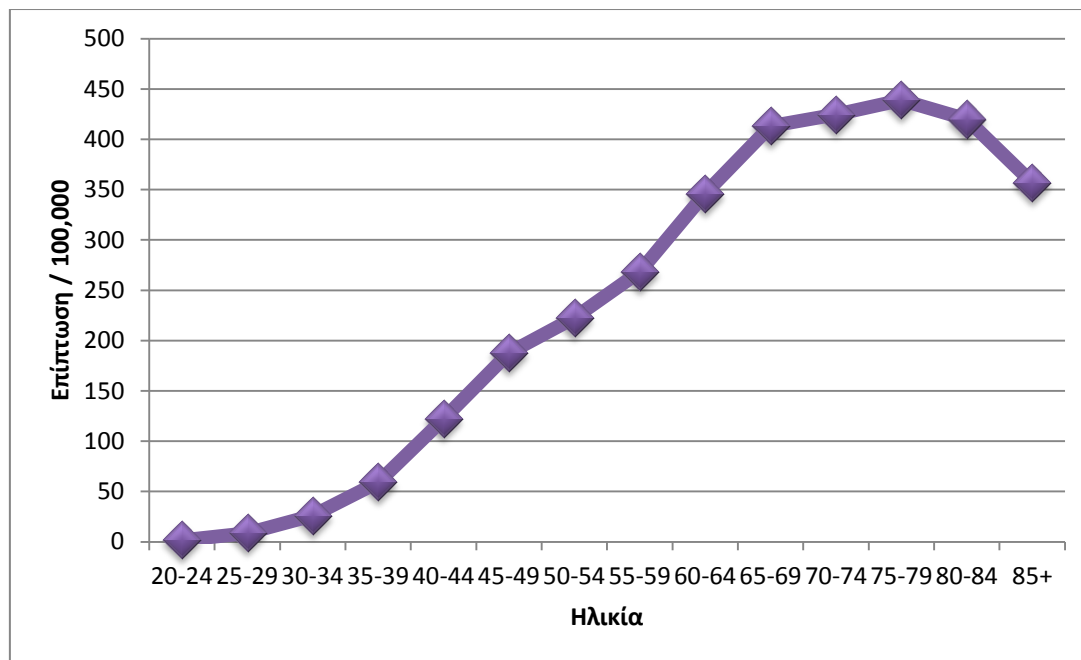
Σχήμα 1.3 5-ετής επιβίωση ασθενών με καρκίνο του μαστού στρωματοποιημένη ανά ηλικιακή ομάδα (Προσαρμοσμένο από Cancer Research UK).

1.1.1.2 Παράγοντες Κινδύνου και Γενετική του Καρκίνου του Μαστού

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 [1]. 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 με την αύξηση της ηλικίας μέχρι περίπου την ηλικία των 45-50 ετών, όπου η αύξηση είναι λιγότερο απότομη (Σχήμα 1.4) [8]. Η αλλαγή στην κλίση της καμπύλης πιθανότατα να αντανακλά την επίδραση των ορμονικών αλλαγών (εμμηνόπαυση) που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια αυτής της ηλικιακής περιόδου. Στις ηλικίες 75-80 η καμπύλη επιπεδώνεται και στη συνέχεια η επίπτωση παρουσιάζει ελαφρά μείωση στις περισσότερες χώρες.



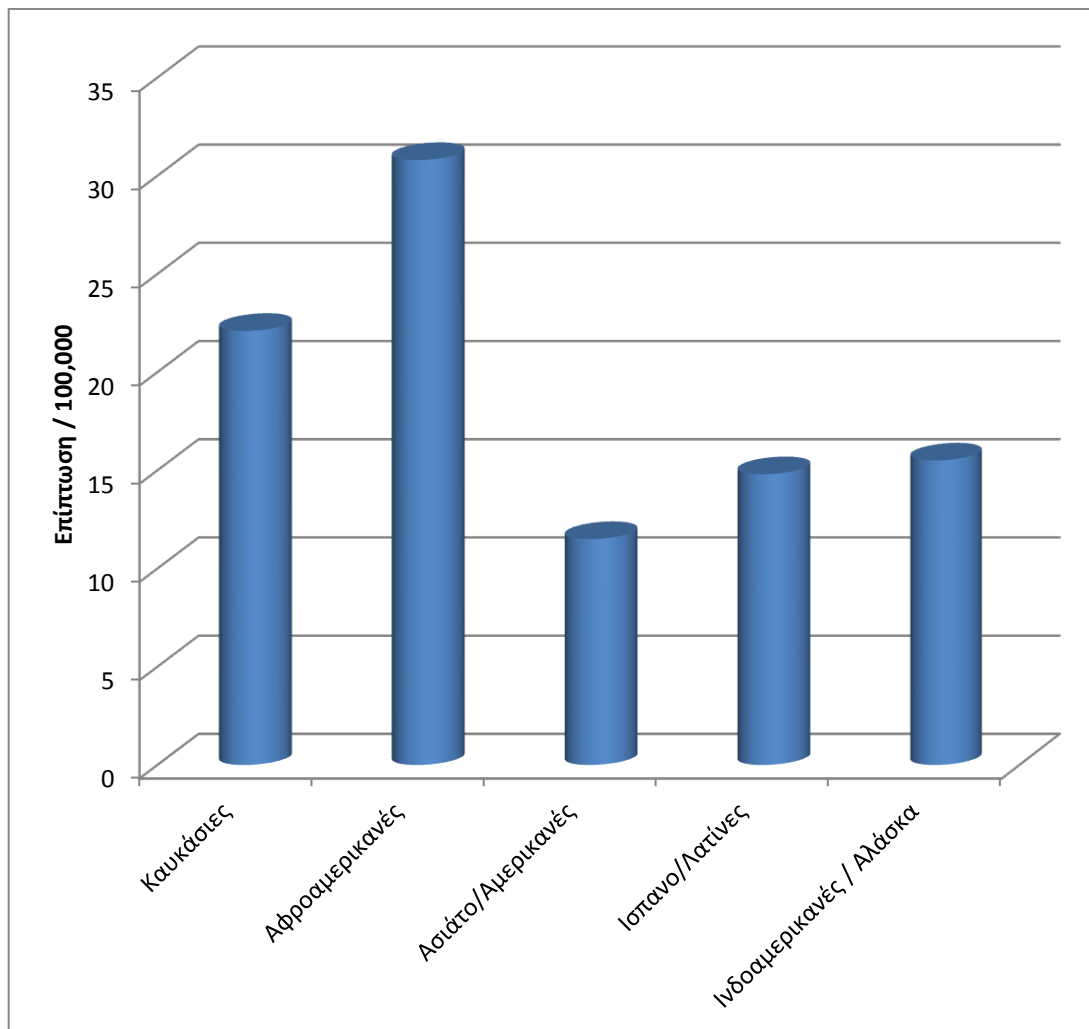
Σχήμα 1.4 Επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ στρωματοποιημένη ανά ηλικία, στοιχεία 2006 – 2010 (Προσαρμοσμένο από SEER Cancer Statistics Review 1975 – 2010).

Γεωγραφική κατανομή

Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι παρόμοια στις προεμμηνοεπαυσιακές γυναίκες παγκοσμίως. Μετά την ηλικία των 50 ετών όμως, η επίπτωση της νόσου στον πληθυσμό των Καυκασίων της Βορείου Αμερικής, της Δυτικής Ευρώπης και της Αυστραλίας είναι μέχρι και 5 φορές υψηλότερη από τις άλλες περιοχές της Γης (Εικόνα 1.1). Για παράδειγμα, η επίπτωση του καρκίνου του μαστού στα Δυτικά κράτη είναι τριπλάσια ή τετραπλάσια σε σύγκριση με τα κράτη της Άπω Ανατολής.

Όσον αφορά τη φυλετική προέλευση, η επίπτωση του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες ηλικίας κάτω των 50 ετών είναι παρόμοια ανάμεσα στους Καυκάσιους πληθυσμούς και την Ασία και την Αφρική, αλλά υψηλότερη στους Καυκάσιους στις ηλικίες άνω των 50 ετών. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, σύμφωνα με στοιχεία από την American Cancer Society, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού

παρουσιάζονται σε γυναίκες της λευκής φυλής [9]. Τα ποσοστά είναι χαμηλότερα στις Αφροαμερικανές, στις Ασιατο-Αμερικανές/πολίτες των νησιών Ειρηνικού Ωκεανού, τις Ισπανο/Λατίνες γυναίκες και στις Ινδο-Αμερικανές/πολίτες Αλάσκας (Σχήμα 1.5) [9]. Εντούτοις, η θνησιμότητα είναι υψηλότερη στις Αφροαμερικανές και τις Ισπανο/Λατίνες, συμβάν που ως επί το πλείστον οφείλεται στην μικρότερη ηλικία εμφάνισης της νόσου, όπου η πρόγνωση είναι γενικά δυσμενέστερη, ενώ άλλοι παράγοντες όπως κοινωνικοοικονομικοί, διαφορές στον τρόπο ζωής και πρόσβαση σε πρωτοβάθμια περίθαλψη συμβάλλουν στην εμφάνιση αυτών των διαφορών [9].



Σχήμα 1.5 Επίπτωση του καρκίνου του μαστού ανάλογα με την εθνικότητα την περίοδο 2006 – 2010 (Προσαρμοσμένο από SEER Cancer Statistics Review 1975 – 2010)

Ηλικία στην εμμηναρχή και την εμμηνόπαυση

Οι γυναίκες με πρόωμη εμμηναρχή ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [10, 11]. Για κάθε καθυστέρηση δύο ετών στην έναρξη της εμμήνου ρύσεως, έχει αναφερθεί 10% μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού [10]. Ακόμη, γυναίκες με φυσιολογική εμμηνόπαυση περί την ηλικία των 55 έχουν διπλάσια πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με γυναίκες που εισέρχονται στην εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45.

Η ηλικία εμμηναρχής πιθανώς να σχετίζεται και με τη βιολογία του καρκίνου του μαστού. Η υπόθεση αυτή ελέγχθηκε σε μια μελέτη με μονοζυγωτικά δίδυμα που ανέδειξε ότι η δίδυμη γυναίκα με πρωιμότερη έναρξη της εμμήνου ρύσεως παρουσίαζε πέντε φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού σε μικρότερη ηλικία από την άλλη [12]. Αντίθετα, άλλοι ορμονικοί παράγοντες (δηλαδή, μεγαλύτερη ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, μικρότερη τεκνοποίηση, καθυστερημένη εμμηνόπαυση), δεν προμήνυαν πρωιμότερη εμφάνιση σε περιπτώσεις που και τα δύο δίδυμα είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού.

Τεκνοποίηση – ηλικία κατά την πρώτη εγκυμοσύνη – θηλασμός

Οι άτεκνες γυναίκες βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού συγκριτικά με γυναίκες που έχουν τεκνοποιήσει, με τον σχετικό κίνδυνο να κυμαίνεται από 1.2 έως 1.7 (Πίνακας 1.1) [11, 13, 14]. Η προστατευτική επίδραση της εγκυμοσύνης δεν καταγράφεται άμεσα, αλλά 10 χρόνια μετά τον πρώτο τοκετό, ενώ ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού παρατηρείται να αυξάνεται προσωρινά μετά από μια τελειόμηνη εγκυμοσύνη [15].

Σχετικά με την ηλικία κατά την πρώτη εγκυμοσύνη, όσο νεότερη είναι μια γυναίκα κατά την πρώτη τελειόμηνη κύηση, τόσο χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού εμφανίζει [13, 14]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης “Nurses' Health Study”, η αθροιστική συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών για τις γυναίκες που έχουν τεκνοποιήσει - σε σχέση με άτεκνες γυναίκες - ήταν 20% χαμηλότερη στην περίπτωση που ο πρώτος τοκετός έγινε πριν την ηλικία των 20 ετών, 10% χαμηλότερη για τον πρώτο τοκετό πριν την ηλικία των 25 ετών, και 5% μεγαλύτερη εάν ο πρώτος τοκετός πραγματοποιήθηκε στην ηλικία των 35 ετών και άνω [14].

Τέλος, η προστατευτική επίδραση του θηλασμού έχει αναδειχθεί σε πολλές προοπτικές και αναδρομικές μελέτες. Το μέγεθός της πιθανώς να εξαρτάται από τη διάρκεια του θηλασμού, καθώς και από τον αριθμό των τοκετών [16-18]. Η προστατευτική επίδραση του θηλασμού πάντως φαίνεται να είναι μεγαλύτερη κατά τη διάρκεια των προεμμηνόπαυσιακών ετών, καθώς και σε γυναίκες με συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού [16, 17].

Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού

Αν και το θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, η παρουσία του αναφέρεται μόλις σε 15 – 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Ο κίνδυνος που σχετίζεται με την ύπαρξη πρώτου ή δευτέρου βαθμού συγγενή με καρκίνο του μαστού, είτε από τη μητέρα είτε από τον πατέρα, επηρεάζεται από την ηλικία, τόσο του εν λόγω ασθενούς όσο και του μέλους της οικογένειας κατά τη διάγνωση, καθώς και από τον αριθμό των συγγενών γυναικών πρώτου βαθμού με και χωρίς καρκίνο. Έτσι, ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι διπλάσιος στις

γυναίκες που έχουν ένα συγγενή πρώτου βαθμού (μητέρα, αδελφή, κόρη) με καρκίνο του μαστού σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών, και σχεδόν τριπλάσιος όταν οι συγγενείς πρώτου βαθμού που διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού είναι δυο [19, 20].

Πίνακας 1.1 Οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού

Παράγοντας	Σχετικός Κίνδυνος	Ομάδα Υψηλού Κινδύνου
Ηλικία	>10	Ηλικία >55
Γενετική προδιάθεση	10	Φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA1/2
Ιστορικό καλοήθους πάθησης	4-5	Άτυπη υπερπλασία / Λοβιακό καρκίνωμα <i>in situ</i>
Γεωγραφική κατανομή	4	Ανεπτυγμένες χώρες
Έκθεση σε ακτινοβολία	3	Υψηλή έκθεση σε ακτινοβολία σε ηλικία 10-25 ετών
Οικογενειακό ιστορικό	≥2	Εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε συγγενή πρώτου βαθμού σε ηλικία μικρότερη των 50 ετών
Συνδυασμένη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης	2,3	Χρήση κατά τον παρόντα χρόνο
Ηλικία στην εμμηνόπαυση	2	Μετά την ηλικία των 55
Ηλικία στην πρώτη τελειόμηνη κύηση	2	Πρώτο παιδί μετά τα 30 έτη, άτεκνη
Βάρος	2	ΔΜΣ > 30 σε μετεμμηνοπαυσιακές
Κατανάλωση αλκοόλ	1,3	Υπέρμετρη κατανάλωση
Λήψη αντισυλληπτικών	1,3	Χρήση κατά τον παρόντα χρόνο

Ιστορικό καλοήθους πάθησης του μαστού

Οι καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα παθολογικών οντοτήτων. Το ιστορικό μη υπερπλαστικής καλοήθους πάθησης του μαστού (π.χ. ινώδης κυστική μαστοπάθεια, αδένωμα, ινοαδένωμα, πορεκτασία) δεν συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [21-23]. Αντιθέτως, οι υπερπλαστικές αλλοιώσεις του μαστού μπορεί να σχετίζονται με χαμηλό, μέτριο ή αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Έτσι, ο κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του μαστού είναι ελαφρώς αυξημένος (σχετικός κίνδυνος 1,3 - 2) όταν ανευρεθεί μια υπερπλαστική βλάβη χωρίς ατυπία (σύνθετο ινοαδένωμα, μέτρια ή άτυπη υπερπλασία, σκληρυντική αδένωση, ενδοπορικό θήλωμα), και αυξάνεται (σχετικός κίνδυνος 4 έως 6) στην παρουσία μιας υπερπλαστικής βλάβης με ατυπία (άτυπη λοβιακή υπερπλασία, άτυπη πορογενής υπερπλασία) (Πίνακας 1.2). Ο σχετικός κίνδυνος είναι ακόμη πιο αυξημένος, όταν η ατυπία είναι πολυεστιακή [24].

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. Το αντίθετο όμως ισχύει για το πορογενές καρκίνωμα *in situ* (DCIS), όπου το διηθητικό στοιχείο αναπτύσσεται επί ή πολύ κοντά στην πρωτοπαθή αλλοίωση.

Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού

Ένα θετικό ατομικό ιστορικό διηθητικού ή *in situ* καρκίνου του μαστού, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου στον άλλο μαστό. Στις ασθενείς με *in situ* νεοπλασίες, ο κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του μαστού στον άλλο μαστό μέσα στα επόμενα 10 χρόνια υπολογίζεται στο 5% [25]. 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 προ-εμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αντίστοιχα.

Πίνακας 1.2 Σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του μαστού που σχετίζεται με καλοήθειες 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		

Έκθεση σε ακτινοβολία

Η έκθεση σε ακτινοβολία είναι γνωστό ότι αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης πολλών τύπων καρκίνου, αλλά οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε ασθενείς που έχουν δεχθεί υψηλές δόσεις ακτινοβολίας. Ένας συγκεκριμένος προβληματισμός αφορά ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία για λέμφωμα Hodgkin σε ηλικία περίπου 20 ετών. Οι γυναίκες αυτές έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και ο κίνδυνος για αυτές είναι περίπου ο ίδιος με τις γυναίκες που έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού. Μελέτες από επιβιώσαντες από εκρήξεις ατομικών βομβών και άλλες πληθυσμιακές μελέτες υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε ακτινοβολία στην εφηβική και νεανική ηλικία είναι

πολύ πιο επικίνδυνη για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού απ' ό τι η έκθεση σε μεγαλύτερη ηλικία.

Σωματοδομικά χαρακτηριστικά – Σωματική δραστηριότητα

Το βάρος και ο δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) έχουν αντίθετη επίδραση στον καρκίνο του μαστού στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, σε σύγκριση με τον καρκίνο του μαστού στις προεμμηνόπαυσιακές. Η παχυσαρκία σχετίζεται με διπλασιασμό του σχετικού κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, ενώ ανάμεσα στις προεμμηνόπαυσιακές σχετίζεται με ελαφρώς μειωμένο σχετικό κίνδυνο [26-28]. Συνολικά, ο σχετικός κίνδυνος αυξάνει περίπου 1% για κάθε επιπλέον χιλιόγραμμο βάρους [29].

Η τακτική σωματική άσκηση φαίνεται ότι παρέχει μια μέτριου βαθμού προστασία έναντι της ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, αλλά η σχέση είναι περίπλοκη, ιδιαίτερα στις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες [30-32]. Μερικές μελέτες έχουν δείξει μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού πριν την εμμηνόπαυση στις γυναίκες που γυμνάζονται περισσότερο, ιδιαίτερα κατά την εφηβεία [30], ενώ άλλες δεν είχαν αντίστοιχα αποτελέσματα [33, 34]. Αυτά τα αντιφατικά ευρήματα μπορεί να αντανακλούν αντισταθμιστικές επιπτώσεις σε άλλους παράγοντες κινδύνου. Στις προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, ακόμα και η μέτρια σωματική δραστηριότητα μπορεί να συσχετιστεί με ανωορρηκτικούς κύκλους, οι οποίοι συνδέονται με μειωμένο κίνδυνο. Από την άλλη πλευρά, πιο λεπτές προεμμηνόπαυσιακές γυναίκες έχουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού από τις γυναίκες με μεγαλύτερο βάρος.

Ανάμεσα σε μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες, τα δεδομένα δείχνουν με μεγαλύτερη συνέπεια μια προστατευτική επίδραση της τακτικής φυσικής

δραστηριότητας σχετικά με την επίπτωση του καρκίνου του μαστού [32, 34]. Όπως καταγράφεται στη μελέτη “Women’s Health Initiative Observational Study”, το όφελος της σωματικής δραστηριότητας ήταν πιο μεγάλο στις γυναίκες που ασκούσαν εντατικά στην ηλικία των 35 σε σύγκριση με νεότερες γυναίκες (18 ετών) ή μεγαλύτερες γυναίκες (ηλικίας 55 ετών), και σε γυναίκες που ασκούσαν 10 ή περισσότερες ώρες την εβδομάδα με ζωηρό περπάτημα, ιδίως αν κατατάσσονταν στο χαμηλότερο τριτημόριο του ΔΜΣ (σχετικός κίνδυνος 0,63 για τον συνδυασμό) [34].

Η μείωση του κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού που σχετίζεται με την σωματική άσκηση μπορεί να εξηγείται εν μέρει μέσω του ελέγχου του σωματικού βάρους. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες δεν ανέδειξαν κάποια επίδραση του ΔΜΣ στη σχέση μεταξύ δραστηριότητας και κινδύνου καρκίνου του μαστού [35, 36]. Επιπλέον, άλλες υποστηρίζουν την άποψη ότι η αυξημένη σωματική δραστηριότητα μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού μέσω της μείωσης των οιστρογόνων στον ορό του αίματος, τουλάχιστον στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες [37, 38].

Δίαιτα και λήψη αλκοόλ

Με εξαίρεση την κατανάλωση αλκοόλ, η οποία μπορεί να καταγραφεί με αρκετή ακρίβεια με τη χρήση ερωτηματολογίων, τα μεθοδολογικά ζητήματα που αφορούν στη μέτρηση της διατροφικής πρόσληψης και της ανάλυσης της σχέσης της με τον καρκίνο περιπλέκουν την ερμηνεία των μελετών σχετικά με την επίδραση της δίαιτας στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Έτσι, μολονότι σε πληθυσμιακό επίπεδο είναι αποδεκτό ότι υπάρχει συσχέτιση της πιθανότητας εμφάνισης του καρκίνου του μαστού και της πρόσληψης λίπους, δεν έχει βρεθεί κάποια σαφής συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης λίπους και της εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε

ατομικό επίπεδο. Έτσι, η κατανάλωση αλκοόλ είναι ο διατροφικός παράγοντας με τις ισχυρότερες αποδείξεις συσχέτισης με την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης της νόσου [39]. Επίσης, η λήψη αλκοόλ έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς [40].

Κάπνισμα

Η σχέση μεταξύ καπνίσματος και καρκίνου του μαστού είναι υπό αμφισβήτηση και παραμένει περίπλοκη όσον αφορά την αλληλεπίδραση του καπνίσματος με το αλκοόλ και των ενδογενών ορμονικών επιδράσεων που μεταβάλλουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [41-43]. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ελαφρά αύξηση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με το κάπνισμα [41, 44, 45].

Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

Η παρατεταμένη έκθεση και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των ενδογενών οιστρογόνων αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η παραγωγή των διαφόρων ομάδων των οιστρογόνων (οιστραδιόλη, οιστριόλη, οιστρόνη) ρυθμίζεται με βάση τις φάσεις λειτουργίας των ωοθηκών: εμμηναρχή, εγκυμοσύνη και εμμηνόπαυση. Μετά την εμμηνόπαυση, η κύρια πηγή των οιστρογόνων είναι η δεϋδροεπιανδροστερόνη (DHEA), η οποία παράγεται στα επινεφρίδια και μεταβολίζεται στον περιφερικό λιπώδη ιστό σε οιστραδιόλη και οιστρόνη. Ο ρόλος των προγεσταγόνων, της προλακτίνης, και του insulin-like αυξητικού παράγοντα είναι λιγότερο ξεκαθαρισμένος σε σχέση με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.

Οι πρώτες αναφορές για αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε άτομα που λαμβάνουν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (Hormone replacement

therapy, HRT) υπήρχαν ήδη από το 1970 [46]. Οι αρχικές μελέτες ανέδειξαν έναν αυξημένο κίνδυνο τόσο για την θεραπεία με οιστρογόνα όσο και για τη συνδυασμένη θεραπεία με οιστρογόνα – προγεσταγόνα. Το 1998, ωστόσο, μια μεγάλη μελέτη του Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer ανέφερε ότι η αύξηση του σχετικού κινδύνου περιοριζόταν στις γυναίκες υπό αγωγή, και ότι ο κίνδυνος αυξανόταν ανάλογα με τη διάρκεια της HRT, οδηγώντας σε αύξηση του κινδύνου κατά 2,3% επιπλέον για κάθε έτος HRT [47]. Οι μεταγενέστερες μελέτες “Million Women Study” και “Women’s Health Initiative” ανέδειξαν επίσης την αύξηση του σχετικού κινδύνου κατά τη λήψη HRT, η οποία αφορούσε όμως μόνο τις γυναίκες που λάμβαναν συνδυασμένη HRT με οιστρογόνα – προγεσταγόνα και όχι αυτές που λάμβαναν μόνο σκευάσματα οιστρογόνων [48, 49]. Τα αποτελέσματα της δεύτερης μελέτης μάλιστα έδειξαν ότι οι όγκοι που διαγνώστηκαν στις γυναίκες που βρίσκονταν υπό HRT είχαν αυξημένο μέγεθος και ήταν πιο πιθανό να συνοδεύονται από λεμφαδενικές μεταστάσεις, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι η HRT επηρεάζει και τη διακριτική ικανότητα της μαστογραφίας. Μετά την ανακοίνωση των αποτελεσμάτων της μελέτης αυτής, παρατηρήθηκε μια μεγάλη μείωση στη χρήση της HRT στις Ηνωμένες Πολιτείες, με άμεση επίδραση στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού σε γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών.

Λήψη αντισυλληπτικών

Η χρήση αντισυλληπτικών σχετίζεται με μια μικρή αύξηση του σχετικού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ακόμα και 10 έτη μετά τη διακοπή τους. Εντούτοις, η αύξηση αυτή δεν παρατηρείται μετά τα 10 έτη διακπής λήψης αντισυλληπτικών δισκίων. Οι κακοήθεις νεοπλασίες που διαγιγνώσκονται σε γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτικά φαίνεται να είναι λιγότερο συχνά σε

προχωρημένο κλινικό στάδιο σε σχέση με γυναίκες που δεν έχουν χρησιμοποιήσει ποτέ αντισυλληπτικά [50]. Τέλος, ο υψηλότερος σχετικός κίνδυνος αφορά γυναίκες στις οποίες ούτως ή άλλως ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι μικρός, έτσι η συνολική επίδραση της χρήσης αντισυλληπτικών στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι μικρή.

Γενετική Προδιάθεση – Κληρονομικός Καρκίνος του Μαστού

Υπάρχει πληθώρα γονιδίων που σχετίζονται με εμφάνιση καρκίνου του μαστού, και θεωρείται πως δεν έχουν ταυτοποιηθεί όλα. Δυο γονίδια υψηλού κινδύνου, τα BRCA1 και BRCA2 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 για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού θεωρείται ότι είναι μεταξύ 60 – 85% για καρκίνο του μαστού και 40 – 60% για καρκίνο των ωοθηκών για το BRCA1, και μεταξύ 50 – 85% και 10 – 30% αντίστοιχα για το BRCA2.

Το γονίδιο TP53 στο χρωμόσωμα 17p προδιαθέτει επίσης για πρόωμη εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού σχετίζονται με πάνω από 70% των περιπτώσεων συνδρόμου Li Fraumeni. Στο σύνδρομο αυτό, παρατηρείται σάρκωμα μαλακών μορίων ή οστεοσάρκωμα σε οικογένειες με πρόωμη 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 συνολική επίδραση του συνδρόμου Li Fraumeni στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι μικρή.

Η νόσος του Cowden οφείλεται σε μεταλλάξεις του PTEN (phosphatase and tensin homolog), οι οποίες αποτελούν κληρονομούμενες γενετικές υψηλού κινδύνου, αλλά δεν ευθύνονται για πολλές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Η νόσος του Cowden μπορεί να αναγνωριστεί από την εκσεσημασμένη μακροκεφαλία, την οσχεοειδή γλώσσα και τις χαρακτηριστικές δερματικές βλάβες. Συνολικά πάντως, μόνο το 5 – 6 % των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού μπορεί να αποδοθεί άμεσα στην κληρονόμηση ενός γονιδίου που προδιαθέτει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3 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	Εξαιρετικά σπάνιο	Υψηλή
PTEN	Cowden	10q22-23	Εξαιρετικά σπάνιο	Υψηλή
ATM	Αταξία – Τηλαγγειεκτασία	11q22-23	Συχνό	Χαμηλή – Μέτρια
STK11	Peutz-Jeghers	19p13.3	Εξαιρετικά σπάνιο	Υψηλή

HBOC: Hereditary breast / ovarian cancer (κληρονομούμενος καρκίνος μαστού / ωοθηκών)

1.1.2 Προληπτικός έλεγχος για τον καρκίνο του μαστού

Η πρωτογενής πρόληψη του καρκίνου του μαστού παραμένει προς το παρόν μια απόμακρη πιθανότητα, κυρίως λόγω της ελλιπούς κατανόησης των παθογενετικών μηχανισμών της νόσου. Για το λόγο αυτό, ο προληπτικός έλεγχος παραμένει το κύριο όπλο για την πρόωμη διάγνωση και την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, με στόχο τη μείωση της θνησιμότητας από τη νόσο.

Ο προληπτικός έλεγχος μπορεί να εφαρμόζεται στους πληθυσμούς σε κίνδυνο (π.χ. γυναίκες >50 ετών) ή τις ομάδες με αυξημένο κίνδυνο (νεότερες γυναίκες με θετικό οικογενειακό ιστορικό ή γενετικό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου). Οι μέθοδοι προληπτικού ελέγχου πρέπει να είναι απλές στην εφαρμογή τους, με μικρό κόστος, να αποδίδουν εύκολα ερμηνεύσιμα αποτελέσματα και να μπορούν να ταυτοποιούν τις ασθενείς με νόσο.

Κλινική εξέταση μαστού

Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του μαστού (42%) αντιλαμβάνονται μόνες τους με την αυτοεξέταση κάποιο ύποπτο σημείο και αναζητούν ιατρική συμβουλή, ενώ μόνο σε ένα ποσοστό 24% των γυναικών με καρκίνο του μαστού οι ψηλαφητές μάζες ανακαλύπτονται για πρώτη φορά κατά την κλινική εξέταση από τον γιατρό [51, 52, 53, 54].

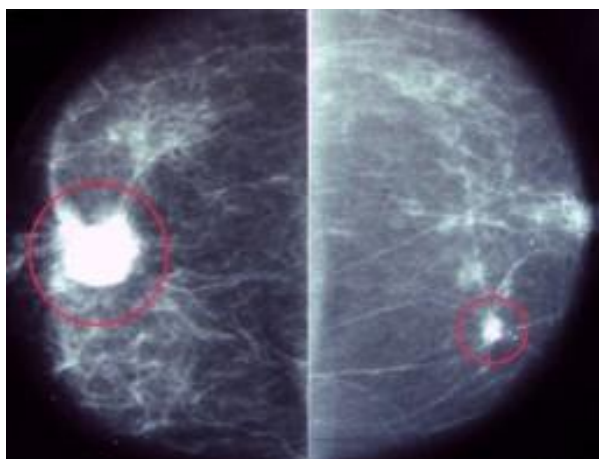
Όλες οι γυναίκες από την ηλικία των 20 ετών πρέπει να εξετάζονται μόνες τους (αυτοεξέταση) κάθε μήνα την 5η - 10η ημέρα του κύκλου, ώστε να ανακαλύψουν έγκαιρα κάθε ύποπτη ανωμαλία [55]. Επιπρόσθετα, οι γυναίκες μεταξύ 20 και 39 ετών συνιστάται να υποβάλλονται σε κλινική εξέταση των μαστών τους από ειδικό ιατρό. Ωστόσο, στο 25% των περιπτώσεων δεν υπάρχει κανένα σύμπτωμα

ή ψηλαφητή μάζα, και η διάγνωση αποτελεί τυχαίο εύρημα κατά τη διάρκεια προληπτικού μαστογραφικού ελέγχου.

Μαστογραφία

Η μαστογραφία (Εικόνα 1.5) αποτελεί το καλύτερο εργαλείο προληπτικού ελέγχου του καρκίνου του μαστού που διατίθεται σήμερα. Η μαστογραφία μπορεί να απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, καλά εκπαιδευμένο προσωπικό για την ερμηνεία της και εξειδικευμένους κλινικούς ιατρούς για την συνεκτίμησή της, όμως είναι η πρώτη προληπτική εξέταση για κακοήθεια που αναδείχθηκε επωφελής σε τυχαιοποιημένες μελέτες [56].

Η εκτίμηση της μαστογραφίας γίνεται από ακτινολόγο, ο οποίος και συνοψίζει τα μαστογραφικά ευρήματα χρησιμοποιώντας τις διαγνωστικές κατηγορίες κατά BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System), που είναι ενδεικτικές της σχετικής πιθανότητας ύπαρξης καλοήθους ή κακοήθους ευρήματος [57]. Οι κατηγορίες κατά BI-RADS τυποποιούν τόσο την έκθεση των μαστογραφικών ευρημάτων όσο και τις συστάσεις για περαιτέρω αντιμετώπιση (π.χ. συνήθης τακτικός έλεγχος, έλεγχος μετά από μικρό χρονικό διάστημα ή βιοψία). Οι εκθέσεις είναι είτε ατελείς (κατηγορία 0) είτε τελικές (κατηγορίες 1 έως 6) (Πίνακας 1.4). Εάν μια μαστογραφία κατηγοριοποιείται ως BI-RADS 0, χρειάζεται περαιτέρω εκτίμηση για τον χαρακτηρισμό της που μπορεί να περιλαμβάνει επιπρόσθετες μαστογραφικές λήψεις, υπέρηχογραφικό έλεγχο, και σπανίως MRI.



Εικόνα 1.1 Κεφαλουραία λήψη μαστογραφίας με τυπικούς χαρακτήρες κακοήθειας.

Πίνακας 1.4. Ταξινόμηση των ακτινολογικών ευρημάτων κατά BI-RADS

[57].

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

Η μαστογραφία μπορεί να ανιχνεύσει τον καρκίνο σε πρώιμο και προσυμπτωματικό στάδιο. Σύμφωνα με δεδομένα που προέρχονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες, από περισσότερες από 1.5 εκατομμύριο μαστογραφίες οι οποίες

πραγματοποιήθηκαν τη χρονική περίοδο 1996-2001, αλλοιώσεις που έχρηζαν βιοψίας εντοπίστηκαν και ελέγχθησαν σε ποσοστό 1,6% των μαστογραφιών, και διαγνώσθηκε κακοήθης βλάβη στο 0.53% των μαστογραφιών [58].

Σημαντικό κλινικό ερώτημα ωστόσο παραμένει το εάν ο προληπτικός έλεγχος με τη χρήση της μαστογραφίας μειώνει τη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού. Πράγματι, με το πέρασμα του χρόνου, οι μελέτες έδειξαν ότι η θνησιμότητα μειώνεται όταν οι γυναίκες προβαίνουν σε προληπτική μαστογραφία στην ηλικία των 40 ετών.

Συγκεντρωτικά στοιχεία από τον προληπτικό έλεγχο σε γυναίκες ηλικίας 40–69 ετών αναφέρθηκαν σε Σουηδική μελέτη, όπου παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού, συγκριτικά με τα ποσοστά θνησιμότητας για τις ίδιες ηλικίες κατά τη διάρκεια της περιόδου όπου δεν υπήρχε πρόγραμμα προληπτικού ελέγχου (1968- 1977) [59, 60]. Μία συστηματική ανασκόπηση για τη χρήση της προληπτικής μαστογραφίας, η οποία περιελάμβανε 8 μελέτες, συμπέρανε ότι, με τουλάχιστον 11 χρόνια παρακολούθησης, η θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού μειώνεται τουλάχιστον κατά 15% στις ηλικίες 39-69 ετών [61]. Άλλες αναλύσεις έχουν επίσης καταλήξει στο συμπέρασμα πως ο προληπτικός μαστογραφικός έλεγχος μειώνει τη θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού σε γυναίκες μεταξύ 40 και 69 ετών [62-64].

Το βέλτιστο χρονικό διάστημα επαναληπτικού προληπτικού μαστογραφικού ελέγχου είναι συνάρτηση δύο παραγόντων: (α) της ταχύτητας εξέλιξης του καρκίνου του μαστού και (β) της συχνότητας εμφάνισης αυτού σε κάθε ηλικιακή ομάδα του εξεταζόμενου πληθυσμού. Οι Pelikan et al [65] υποστηρίζουν ότι ο μέσος χρόνος διπλασιασμού της νεοπλασματικής μάζας είναι περίπου 260 ημέρες, και οι Tabar et al [66] διαπίστωσαν ότι το μέσο προκλινικό διάστημα ανίχνευσης του όγκου είναι 1,25

έτη για τις γυναίκες 40 ετών και 3,03 έτη για τις γυναίκες 50 ετών. Εντούτοις, τα δεδομένα σχετικά με την ιδανική συχνότητα πραγματοποίησης μαστογραφιών είναι περιορισμένα, και η εφαρμογή του προγράμματος προληπτικού μαστογραφικού ελέγχου επηρεάζεται άμεσα από κοινωνικοοικονομικούς ή εθνικούς παράγοντες. Οι τρέχουσες οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network για την πρόληψη του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν ετήσιο μαστογραφικό έλεγχο για τις γυναίκες ηλικίας >40 ετών, που συνδυάζεται με κλινική εξέταση μαστού (Πίνακας 1.5).

Τυχαιοποιημένες μελέτες που αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της προληπτικής μαστογραφίας, έχουν χρησιμοποιήσει διάφορα χρονικά διαστήματα μεταξύ ελέγχων, χωρίς εμφανή επίδραση στα αποτελέσματα της μελέτης. Σε μία μελέτη όπου συγκρίθηκε η χρήση προληπτικής μαστογραφίας κάθε χρόνο ή κάθε δύο χρόνια, κυρίως για Καυκάσιες γυναίκες ηλικίας από 50 μέχρι 69 ετών στο Βέρμοντ, των ΗΠΑ (ετήσια), και στη Νορβηγία (κάθε δύο χρόνια), δε βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποσοστών διάγνωσης του καρκίνου του μαστού και του προγνωστικού σταδίου κατά τη διάγνωση [67].

Πίνακας 1.5 Κατευθυντήριες οδηγίες για τον προληπτικό έλεγχο για καρκίνο του μαστού σε γυναίκες χωρίς αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Προσαρμοσμένο από NCCN Breast Cancer Screening and Diagnosis Guidelines, 2012).

Ηλικία (έτη)	Είδος εξέτασης / Συχνότητα		
	Αυτοεξέταση μαστού	Κλινική εξέταση μαστού	Μαστογραφία
20-39	Κάθε μήνα	Ανά 3 έτη	-
≥40	Κάθε μήνα	Ανά 1 έτος	Ανά 1 έτος

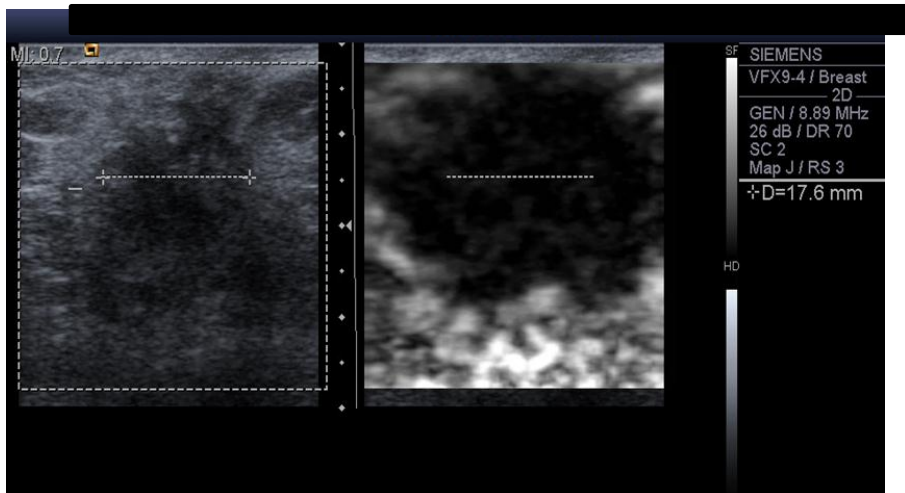
Η μαστογραφία εκθέτει σε ελάχιστη δόση ακτινοβολίας, ίση με 2 mGy για κάθε μία λήψη του ενός μαστού [68-70], και η δόση εξαρτάται από την πυκνότητα του μαστού και τους παράγοντες έκθεσης που εφαρμόζονται. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού λόγω έκθεσης στην ionίζουσα ακτινοβολία μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας της εξεταζόμενης [71]. Έτσι, σε ασθενείς μεγαλύτερες των 50 ετών, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου είναι περίπου 1:100.000 ανά μία μαστογραφική λήψη [70, 72-75]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δράση της ακτινοβολίας είναι αθροιστική. Ο καρκίνος του μαστού μετακτινικής αιτιολογίας εμφανίζεται τουλάχιστον 10 χρόνια μετά από την έκθεση. Παρόλο ότι δεν έχει περιγραφεί ανάπτυξη καρκίνου του μαστού μετά από μαστογραφία ή μετά από επανειλημμένους μαστογραφικούς επανελέγχους επί σειρά ετών, ο κίνδυνος αυτός υφίσταται και το άθροισμα αυτό, σε 100.000 γυναίκες για δέκα συνεχόμενα έτη, με έναρξη μαστογραφικού ελέγχου στην ηλικία των 40 ετών, έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση τουλάχιστον 8 θανάτων από καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους (8/100.000) [76].

Υπερηχογράφημα και Μαγνητική Μαστογραφία

Το υπερηχογράφημα (Εικόνα 1.6), όταν διενεργείται με μηχάνημα υψηλής διακριτικής ικανότητας, αποτελεί χρήσιμη, και συμπληρωματική της μαστογραφίας εξέταση για επιλεγμένες περιπτώσεις. Παρόλο που η υπερηχογραφία δεν έχει αποδειχθεί επωφελής στον προληπτικό έλεγχο γυναικών για καρκίνο του μαστού, αποτελεί εντούτοις χρήσιμο διαγνωστικό μέσο, ιδίως για τη διαφοροδιάγνωση κυστικών μορφωμάτων από συμπαγείς μάζες [77-79]. Επίσης, αποτελεί την εξέταση εκλογής σε νεαρές γυναίκες κάτω των 30 ετών με ψηλαφητό μόρφωμα. Ακόμη, το υπερηχογράφημα ενδείκνυται σε γυναίκες που θηλάζουν, που βρίσκονται στη

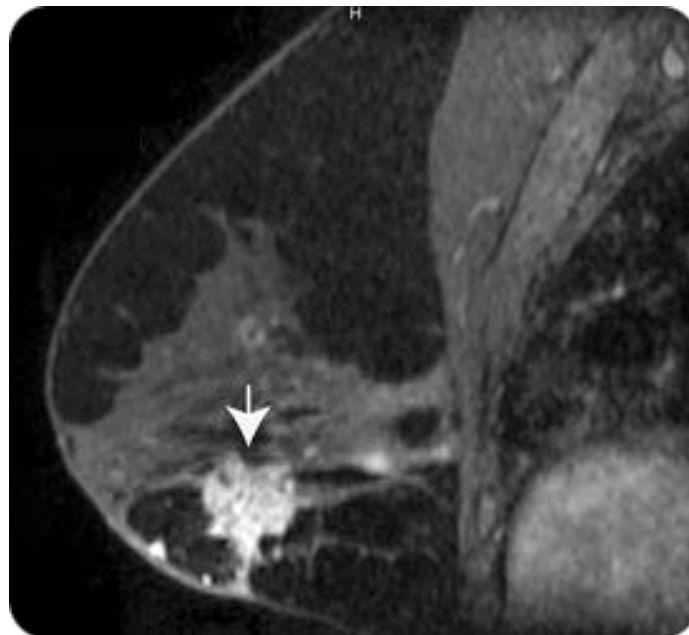
διάρκεια της κύησης, και σε γυναίκες με μαστοδυνία [80, 81]. Εάν η αλλοίωση αποδειχθεί κυστική, ο περαιτέρω έλεγχος δεν κρίνεται απαραίτητος. Αντίθετα, εάν η αλλοίωση είναι συμπαγής ή δεν απεικονίζεται στην υπερηχογραφία, η ασθενής στη συνέχεια υποβάλλεται σε μαστογραφία (μόνο μία προβολή) για τον έλεγχο τυχόν υπαρξής μικροαποτιτανώσεων. Σε γυναίκες ηλικίας 30 ετών και άνω με ψηλαφητό μόρφωμα προτιμάται η μαστογραφία, ενώ το υπερηχογράφημα έχει συμπληρωματικό ρόλο. Σε περίπτωση φλεγμονής, παρόλο που η διάγνωση είναι κλινική, η υπερηχογραφία συμβάλλει στην επιβεβαίωση των κλινικών ευρημάτων, την εκτίμηση του είδους της φλεγμονής, τον καθορισμό της έκτασης αυτής και την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπευτική αγωγή.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η δυνατότητα διενέργειας μαγνητικής μαστογραφίας με ειδικό πηνίο του μαγνητικού τομογράφου (Εικόνα 1.7). Η μαγνητική μαστογραφία εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα συγκριτικά με την κλασική μαστογραφία [82]. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μαγνητικής μαστογραφίας είναι η υψηλή ευαισθησία της στην ανίχνευση διηθητικού καρκίνου σε γυναίκες με πυκνό μαζικό παρέγχυμα. Ακόμα, παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης όγκων πλησίον του θωρακικού τοιχώματος και επιτρέπει τον έλεγχο γυναικών με ένθεμα σιλικόνης. Το υψηλό κόστος της εξέτασης, αλλά και της παραμαγνητικής ουσίας, αποτελούν λίγα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου έναντι της μαστογραφίας και της υπερηχοτομογραφίας, ενώ σημαντικό μειονέκτημα είναι και η χαμηλή σχετικά ειδικότητά της, που μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση των αλλοιώσεων που απεικονίζονται, λόγω ενίσχυσης του σήματος σε έδαφος καλοήθων αλλοιώσεων [83].



Εικόνα 1.2 Υπερηχογράφημα μαστού που απεικονίζει κυστική αλλοίωση.

Έτσι, σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες της EUSOMA για τη χρήση της μαγνητικής μαστογραφίας στην προληπτική εξέταση του καρκίνου του μαστού, η χρήση της ενδείκνυται μόνο σε γυναίκες υψηλού κινδύνου, όπως φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA1, BRCA2, και TP53 (και τους πρώτου βαθμού συγγενείς τους), και γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία στην περιοχή του μεσοθωρακίου για λέμφωμα Hodgkin [84].



Εικόνα 1.3 Μαγνητική μαστογραφία που απεικονίζει ύποπτη βλάβη με παθολογική ένταση σήματος

Νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι

Τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα της διαρκούς προσπάθειας για βελτίωση της ειδικότητας και της ευαισθησίας των απεικονιστικών μεθόδων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες απεικονιστικές τεχνικές, όπως η ελαστογραφία, η τομοσύνθεση, η μοριακή απεικόνιση του μαστού και η μαστογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Mammography). Εντούτοις, προς το παρόν, καμιά από αυτές τις μεθόδους δεν συνίσταται ως μέρος της προληπτικής απεικονιστικής εξέτασης για τον καρκίνο του μαστού [85-88].

1.1.3 Το *in situ* καρκίνωμα του μαστού και η λοβιακή νεοπλασία

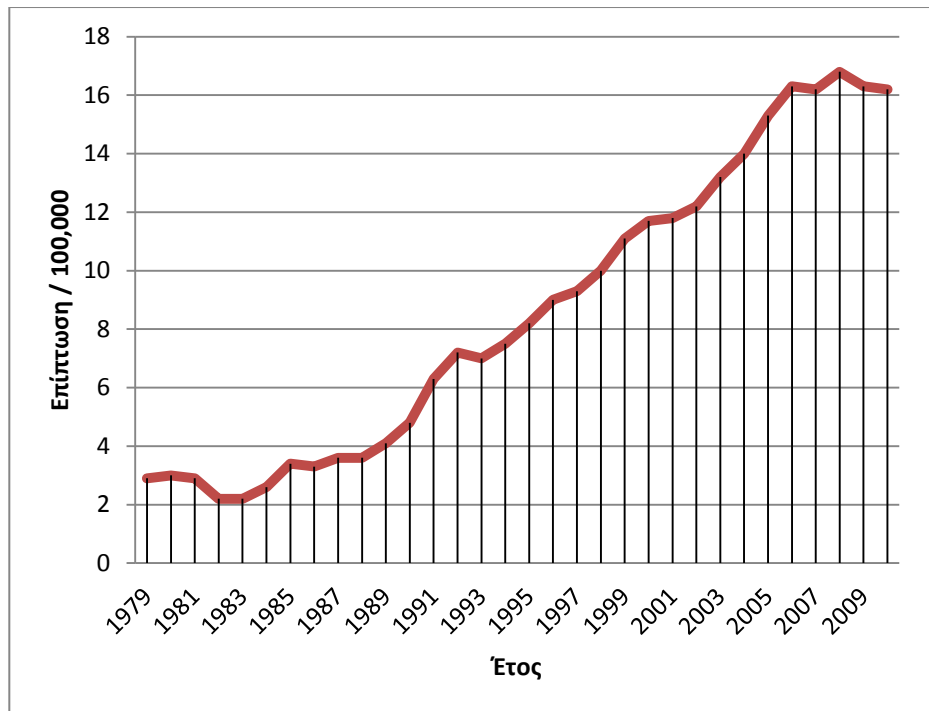
Υπάρχουν δυο κύριες κατηγορίες *in situ* καρκινώματος του μαστού, ανάλογα με την ιστολογική ταξινόμηση της βλάβης και τον τύπο των κυττάρων (Πίνακας 1.6). Το πορογενές καρκίνωμα *in situ* είναι ο πιο κοινός τύπος μη διηθητικού καρκινώματος, αποτελώντας το 3 – 4% των συμπτωματικών καρκίνων και το 20 – 25% των καρκίνων που διαγιγνώσκονται μέσω του προληπτικού ελέγχου. Η συχνότητά του έχει αυξηθεί λόγω της αύξησης της χρήσης της προληπτικής μαστογραφίας ελέγχου (Σχήμα 1.6). Η αύξηση αυτή αφορά όλες τις ηλικιακές ομάδες.

Το πορογενές καρκίνωμα *in situ* χαρακτηρίζεται από παραμόρφωση, διάταξη και επινέμεση των παρακείμενων πόρων και λοβιακών μονάδων από έναν ομοιογενή νεοπλαστικό πληθυσμό κυττάρων. Αντίθετα, το λοβιακό καρκίνωμα *in situ*, ευρύτερα γνωστό

Πίνακας 1.6. Χαρακτηριστικά του πορογενούς και λοβιακού in situ καρκινώματος

	DCIS	LCIS
Μέση ηλικία	50-60	40-50
Εμμηνόπαυση	70% μετεμμηνοπαυσιακές	70% προεμμηνοπαυσιακές
Κλινικά σημεία	Ογκίδιο μαστού, νόσος Paget, έκκριμα από τη θηλή	Κανένα
Μαστογραφικά σημεία	Μικροαποτιτανώσεις	Κανένα
Κίνδυνος ανάπτυξης καρκινώματος	30 – 50% στα 10 – 18 έτη	25 – 30% στα 15 – 20 έτη
Θέση ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος		
Σύστοιχος μαστός	99%	50 – 60%
Αντίστοιχος μαστός	1%	40 – 50%

ως λοβιακή νεοπλασία (Lobular Neoplasia, LN), είναι πιο σπάνιο (<1% των καρκίνων που διαγιγνώσκονται με προληπτικό έλεγχο). Ο όρος λοβιακή νεοπλασία πλέον ενσωματώνει τόσο το λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS), όσο και την άτυπη λοβιακή υπερπλασία (Atypical Lobular Hyperplasia, ALH) και έχει χαρακτήρες σχετικά ομοιόμορφης διόγκωσης ενός ολόκληρου λοβίου από κύτταρα με κανονικούς, στρογγυλούς ή ωοειδείς πυρήνες. Παρά το γεγονός ότι κάθε λοβιακή μονάδα που εμπλέκεται στη νεοπλασία έχει ένα σχετικά ομοιόμορφο πληθυσμό κυττάρων, υπάρχει συχνά διαφοροποίηση ως προς την ιστολογική εικόνα ανάμεσα στις λοβιακές μονάδες, με τις ενδιάμεσες μονάδες να συμμετέχουν λιγότερο ή περισσότερο στη νόσο.



Σχήμα 1.6. Επίπτωση του πορογενούς in situ καρκινώματος στο Ηνωμένο Βασίλειο, έτη 1979 – 2010 (Προσαρμοσμένο από Cancer Research UK).

1.1.3.1 Το πορογενές καρκίνωμα in situ

Ταξινόμηση του DCIS

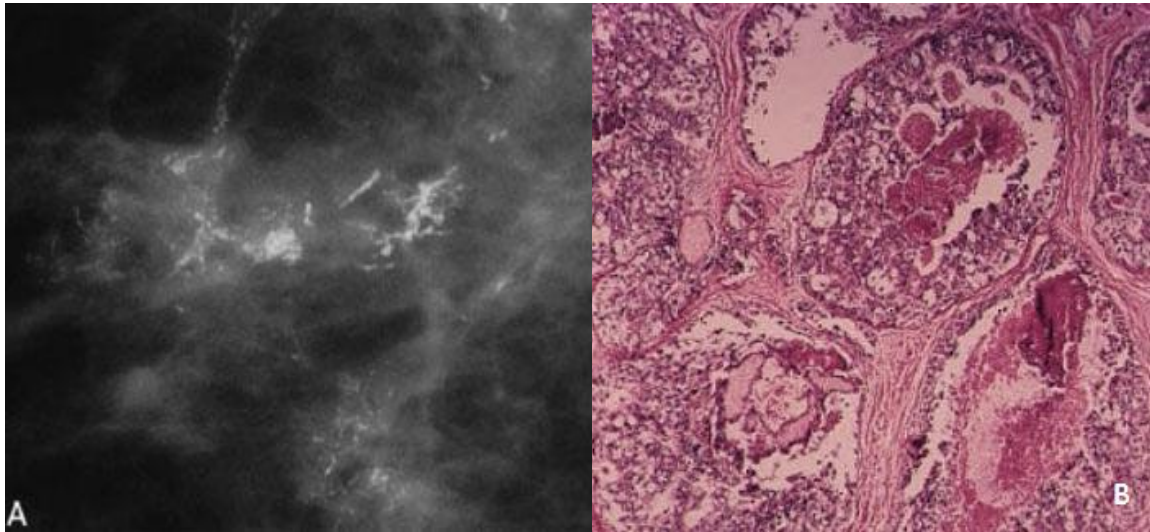
Υπάρχουν διάφορες ταξινομήσεις του πορογενούς in situ καρκινώματος, και αυτές συνήθως σχετίζονται σε κάποιο βαθμό με τη μορφολογία των μικροαποτιτανώσεων (Πίνακας 1.7) [89].

Πίνακας 1.7. Ταξινόμηση του DCIS

<i>Ιστολογικά</i>	<i>Κυτταρολογικά</i>	<i>Νέκρωση</i>	<i>Αποτιτανώσεις</i>
Comedo	Υψηλό grade	Εκτεταμένη	Διακλαδούμενες
Ενδιάμεσο	Ενδιάμεσο grade	Περιορισμένη	Περιορισμένες
Non – comedo	Χαμηλό grade	Απουσιάζει	Μικροεστιακές

Εμφάνιση της νόσου

Οι ασθενείς με συμπτωματικό *in situ* καρκίνωμα των πόρων συνήθως προσέρχονται με ένα ψηλαφητό ογκίδιο, έκκριμμα από τη θηλή ή νόσο Paget. Οι όγκοι που διαγιγνώσκονται κατά τη διάρκεια του προληπτικού ελέγχου σχετίζονται συνηθέστερα με παρουσία μικροαποτιτανώσεων (Πίνακας 1.6, Εικόνα 1.4), οι οποίες μπορεί να είναι συρρέουσες ή διάσπαρτες και διακλαδίζονται χαρακτηριστικά εντός του πόρου που συμμετέχει στη νεοπλασματική εξεργασία.



Εικόνα 1.4. Παρουσία μικροαποτιτανώσεων στη μαστογραφία (A) που αντιστοιχεί σε high grade DCIS με κεντρική νέκρωση και αποτιτανώσεις (B).

Φυσική πορεία της νόσου

Πολλές διαφορετικές μελέτες έχουν αξιολογήσει τον κίνδυνο της μετέπειτα εμφάνισης διηθητικού καρκινώματος σε ασθενείς που ο παθολογοανατόμος δεν διέγνωσε πορογενές καρκίνωμα *in situ* ή, παρ' όλο που η διάγνωση τέθηκε, δεν πραγματοποιήθηκε μαστεκτομή. Οι μελέτες αυτές εστιάζουν κυρίως στο χαμηλού grade καρκίνωμα *in situ* και δείχνουν ότι ένα ποσοστό περίπου 40% των ασθενών αυτών θα εμφανίσουν διηθητικό καρκίνο εντός 30 ετών, με την πλειονότητα των

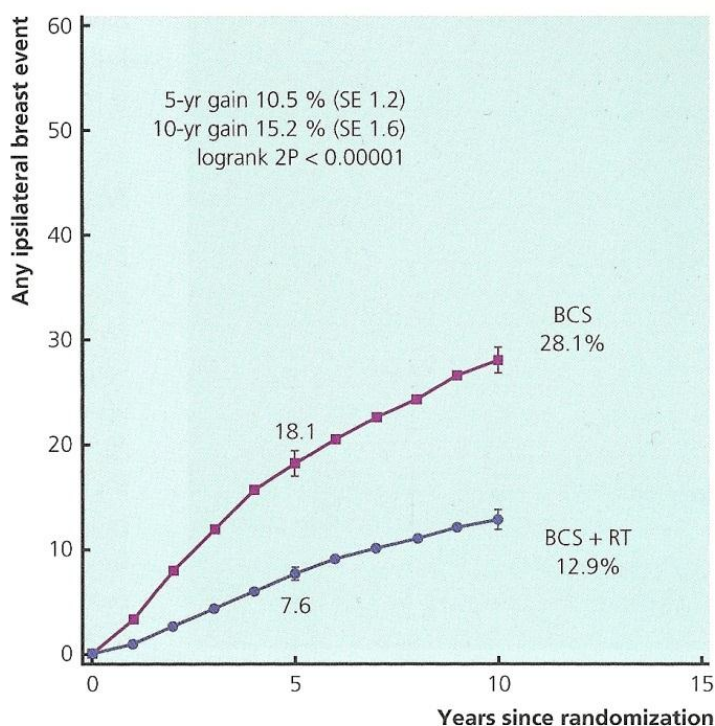
περιπτώσεων να εμφανίζεται την πρώτη δεκαετία [90]. Το διηθητικό καρκίνωμα θα αναπτυχθεί στο σημείο της παρουσίας του *in situ* καρκινώματος. Παράλληλα, όσον αφορά το ενδιάμεσου και υψηλού grade πορογενές καρκίνωμα *in situ*, τα αποτελέσματα από μελέτες σχετικά με την τοπική υποτροπή του DCIS και την μετέπειτα ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος, δείχνουν ότι η φυσική εξέλιξη της νόσου είναι η επέκταση της νεοπλασίας και εμφάνιση διηθητικού καρκινώματος [90].

Τα πορογενή *in situ* καρκινώματα αποτελούν μια ιδιαίτερα ετερογενή ομάδα αλλοιώσεων, που διαφέρουν ως προς την ανάπτυξη και τους κυτταρολογικούς χαρακτήρες, και οι διαφορετικοί αυτοί τύποι έχουν και ανάλογα σημαντικές βιολογικές και εξελικτικές διαφορές. Έως και 80% των υψηλού grade DCIS υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο HER2, ενώ το ποσοστό αυτό για τα χαμηλού grade DCIS είναι περίπου 10%. Η παρουσία ικανού αριθμού υποδοχέων οιστρογόνων επίσης ποικίλλει ανάμεσα στους τύπους του DCIS, με το 50% περίπου των υψηλού grade DCIS να είναι θετικά για οιστρογονικούς υποδοχείς (ER) σε σύγκριση με το 70% των χαμηλού και ενδιάμεσου grade [89].

Θεραπευτική προσέγγιση

Τα συμπτωματικά DCIS συνήθως επινέμονται πολύ μεγαλύτερες περιοχές του μαστού από τον όγκο που γίνεται αντιληπτός στη μαστογραφία, και αυτές οι βλάβες συνήθως αντιμετωπίζονται με μαστεκτομή. Η θεραπευτική αυτή επιλογή συνοδεύεται με εξαιρετικά μακροχρόνια αποτελέσματα (5-ετής επιβίωση 99%). Με την πρόοδο του προληπτικού ελέγχου του πληθυσμού και τη χρήση των τεχνικών διατήρησης του μαστού στη χειρουργική θεραπεία του διηθητικού καρκινώματος, η ευρεία τοπική εκτομή χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο για το πορογενές *in situ* καρκίνωμα. Η κάθε θεραπευτική επιλογή θα πρέπει να συζητείται με την ασθενή, ενώ υπάρχει και

μια αυξανόμενη τάση να εκτελείται ευρεία τοπική εκτομή σε όλους τους DCIS όγκους, ανεξαρτήτως του grade και του μεγέθους τους, και αυτή να συνοδεύεται με ανάλογη μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία [91]. Τέσσερις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες, η NSABP B-17 [92], η EORTC 10853 [93], η SweDCIS [94] και η UK/ANZ DCIS [95] ανέδειξαν τη σημαντική μείωση στην υποτροπή της νόσου που προσφέρει η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με DCIS που αντιμετωπίστηκαν με ευρεία τοπική εκτομή (Σχήμα 1.7). Όφελος ως προς την τοπική υποτροπή προκύπτει και από τη χρήση της ταμοξιφαίνης σε ασθενείς κάτω των 50 ετών με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (ER positive) [25].



Σχήμα 1.8. Επίδραση της ακτινοθεραπείας (RT) μετά από επέμβαση με διατήρηση του μαστού (BCS): τοπική υποτροπή στο σύστημα μαστό (υποτροπιάζον DCIS ή διηθητικό καρκίνωμα) (Προσαρμοσμένο από Fisher B. et al [92]).

Προγνωστικοί παράγοντες υποτροπής μετά από ευρεία εκτομή

Οι τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν αναδείξει ότι οι αλλοιώσεις υψηλού grade, η παρουσία comedo νέκρωσης και η ατελής εκτομή της αλλοίωσης σχετίζονται με μεγαλύτερη πιθανότητα τοπικής υποτροπής (Πίνακας 1.8). Επιπρόσθετα, η νεαρή ηλικία (<50 έτη) θεωρείται επίσης αρνητικός προγνωστικός παράγοντας. Η τοπική υποτροπή αφορά περίπου στις μισές περιπτώσεις την ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος και στις υπόλοιπες την επανεμφάνιση DCIS. Σύμφωνα με τη μελέτη EORTC, το διηθητικό καρκίνωμα που αναπτύσσεται σε έδαφος προηγηθείσας ευρείας εκτομής για υψηλού grade DCIS είναι πιο πιθανό να διηθεί τους λεμφαδένες της μασχάλης, ανεξάρτητα από την χρήση μετεγχειρητική ακτινοθεραπείας [93].

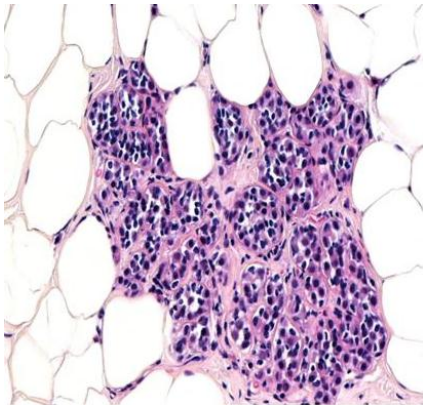
Πίνακας 1.7. Προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου υποτροπής του DCIS

Παράγοντας κινδύνου	Χαρακτηριστικό κακής πρόγνωσης
Όρια εκτομής	Όρια <1mm μετά από επέμβαση διατήρησης του μαστού
Grade	Υψηλό grade
Comedo νέκρωση	Παρούσα
Ιστολογικός τύπος	Χαμηλής διαφοροποίησης
Ηλικία ασθενούς	Ηλικία ≤ 40 κατά τη διάγνωση
Βιολογικοί δείκτες	ER (-), PR (-), Bcl2 (-), CerbB4 (-) Her2 (+), P21 (+), P53 (+), Ki67 (+)
Συμπτώματα κατά την προσέλευση	Παρουσία
Μέγεθος όγκου	Μη σημαντικό

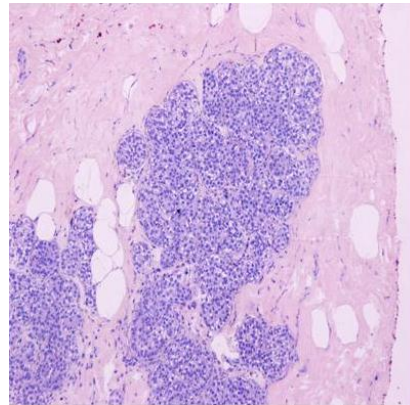
1.1.3.2. Η λοβιακή νεοπλασία

Οι αλλοιώσεις που συμπεριλαμβάνονται στον όρο Λοβιακή Νεοπλασία (LN), δεν έχουν τη χαρακτηριστική για το DCIS κατά συνέχεια πόρου (και αναλόγως, λοβίου) επινέμεση του μαζικού αδένου. Έτσι, δεν υπάρχουν αποδείξεις για την υπόθεση ότι ασθενείς με μεγαλύτερες αλλοιώσεις τύπου LN ή πλειόμορφη κυτταρολογία έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος σε σχέση με ασθενείς που έχουν μικρότερους όγκους ή αλλοιώσεις τύπου *in situ* λοβιακού καρκινώματος (LCIS).

Οι λοβιακές νεοπλασίες συνήθως ανιχνεύονται ως τυχαίο εύρημα σε βιοψία και δεν έχουν ιδιαίτερα μαστογραφικά ή κλινικά χαρακτηριστικά. Αυτό που μπορεί να ανιχνευθεί στη μαστογραφία είναι η αυξημένη πυκνότητα του μαστού και οι μεγεθυμένες λοβιακές μονάδες που περικλείουν αποτιτανώσεις.



A



B

Εικόνα 1.5 . Άτυπη Λοβιακή Υπερπλασία (A) και Λοβιακό Καρκίνωμα *in situ* (B).

Φυσική πορεία

Περίπου 15-20% των γυναικών με διάγνωση λοβιακής νεοπλασίας θα αναπτύξουν διηθητικό καρκίνο του μαστού στον ίδιο μαστό, και ένα επιπλέον 10-15% στον αντίστοιχο μαστό.

Θεραπευτική προσέγγιση

Υπάρχουν τέσσερις πιθανές προσεγγίσεις στην παρακολούθηση της λοβιακής νεοπλασίας: ο ετήσιος μαστογραφικός έλεγχος, η προληπτική χημειοθεραπεία, η ένταξη της ασθενούς σε πρωτόκολλο παρακολούθησης και η αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή. Η χρήση της αμφοτερόπλευρης μαστεκτομής θα πρέπει να περιορίζεται στις γυναίκες που ανησυχούν σημαντικά για τη νόσο τους και αυτό υποβαθμίζει την ποιότητα ζωής τους. Στη μελέτη NSABP, η χορήγηση ταμοξιφαίνης μείωσε κατά 56% τον κίνδυνο εμφάνισης διηθητικού καρκίνου σε ασθενείς με λοβιακό καρκίνωμα *in situ* [25].

1.1.4 Το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού προέρχεται από τα επιθηλιακά κύτταρα που βρίσκονται στην τελική πορολοβιακή μονάδα. Εάν τα καρκινικά κύτταρα δεν παραμένουν εντός της βασικής μεμβράνης των στοιχείων, αλλά τη διηθούν και διασπείρονται στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό, τότε προκύπτει το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Invasive Ductal Carcinoma, IDC).

1.1.4.1 Ιστολογική ταξινόμηση του διηθητικού καρκίνου του μαστού

Η ταξινόμηση των όγκων του μαστού εξελίχθηκε σε μία μακρά περίοδο με αποτέλεσμα να συμπεριλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα κριτηρίων, όπως ο τύπος των κυττάρων (π.χ. αποκρινικό καρκίνωμα), ο τύπος και το είδος των εκκρίσεων από τα κύτταρα (π.χ. βλεννώδες), η αρχιτεκτονική μορφή του όγκου (π.χ. θηλώδες), ή η μορφή επέκτασης (π.χ. φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού). Επίσης, ορισμένοι όγκοι

έχουν ιδιαίτερη κυτταρική μορφολογία και τύπο ανάπτυξης, οπότε μπορούν να διακριθούν από άλλους. Έτσι, οι όγκοι με ειδικά χαρακτηριστικά ονομάζονται διηθητικά καρκινώματα «ειδικού τύπου», ενώ οι υπόλοιποι ονομάζονται «μη ειδικού τύπου» (Πίνακας 1.8). Η ταξινόμηση αυτή έχει και κλινικές συσχετίσεις, καθώς διάφοροι ειδικοί τύπου διηθητικού καρκινώματος σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση ή διαφορετικά κλινικά χαρακτηριστικά από τους όγκους μη ειδικού τύπου.

Πίνακας 1.8. Ταξινόμηση των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού

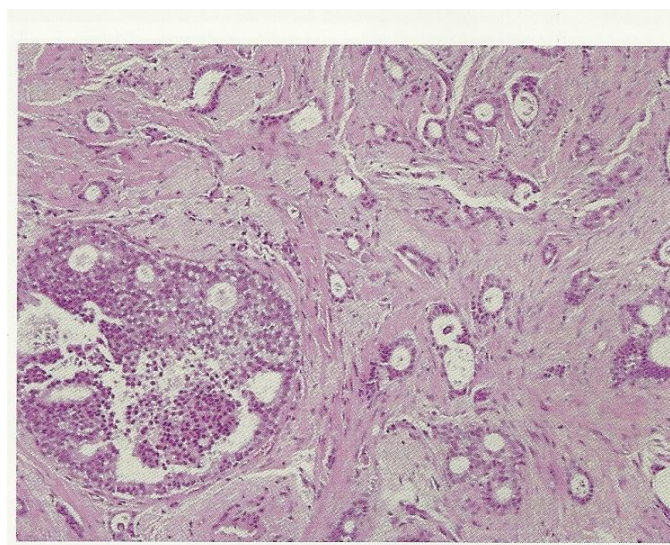
Ειδικού Τύπου	Μη Ειδικού Τύπου
Σωληνώδεις	Είναι γνωστοί και ως «μη αλλιώς ταξινομούμενοι» (NST)
Βλεννώδεις	Η πρόγνωση μπορεί να προβλεφθεί από το grade του όγκου
Ηθμοειδές	
Μυελοειδές	
Λοβιακό	

Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων

Το διηθητικό καρκίνωμα των πόρων είναι ο πιο κοινός τύπος διηθητικού καρκίνου του μαστού, και είναι υπεύθυνο για 70 έως 80% των διηθητικών βλαβών. Ονομάζεται επίσης και διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου ή διηθητικό καρκίνωμα που δεν ορίζεται διαφορετρόπως (Non Specific Type, NST).

Σε μια αδρή παθολογοανατομική εκτίμηση, μακροσκοπικά οι βλάβες αυτές είναι συνήθως σκληρές, γκριζωπές, κοκκώδεις μάζες που διηθούν τον παρακείμενο ιστό με τυχαίο τρόπο και δημιουργούν ένα χαρακτηριστικό, ακανόνιστο αστεροειδές σχήμα. Χαρακτηρίζονται μικροσκοπικά από χορδές και κρύπτες καρκινικών κυττάρων με διάφορες ποσότητες σχηματισμού αδένων, και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά που ποικίλλουν από την ήπια μέχρι την υψηλή κακοήθεια [96]. Τα κακοήθη κύτταρα επάγουν μια ινώδη απάντηση καθώς διεισδύουν στο μαζικό παρέγχυμα και η αντίδραση αυτή είναι, σε μεγάλο βαθμό, υπεύθυνη για την κλινικά ψηλαφητή μάζα, την ακτινοσκιερότητα και τα συμπαγή υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά των διηθητικών καρκινωμάτων.

Παρακείμενο in situ καρκινώμα των πόρων (DCIS) μπορεί να συνυπάρχει στις περισσότερες περιπτώσεις σε άλλοτε άλλη έκταση (Εικόνα 1.6). Η έκταση του DCIS αλλά όχι του LCIS είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς όπου επιλέγεται πιο συντηρητική θεραπεία, όπου ο στόχος της χειρουργικής θεραπείας είναι η ολοκληρωτική εξαίρεση τόσο του ενδοπορικού όσο και του διηθητικού καρκινώματος [97].

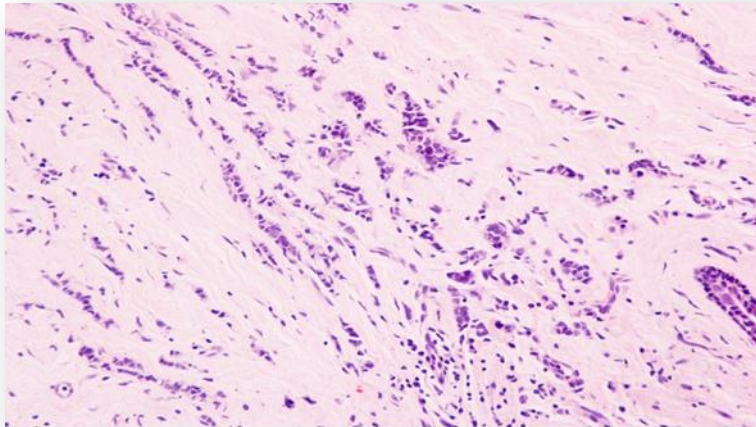


Εικόνα 1.6. Διηθητικό καρκίνωμα του μαστού με παρακείμενο DCIS (αριστερά).

Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα

Τα διηθητικά καρκινώματα των λοβίων είναι ο δεύτερος πιο συχνός τύπος διηθητικού καρκίνου του μαστού, υπεύθυνος για 5-10% των διηθητικών όγκων (Εικόνα 1.7).

Η επίπτωση του λοβιακού καρκίνου αυξάνεται ταχύτερα από αυτή του πορογενούς καρκινώματος στις ΗΠΑ. Ορισμένοι τύποι διηθητικού λοβιακού καρκινώματος έχουν μακροσκοπική εμφάνιση ίδια με αυτή των πορογενών διηθητικών καρκίνων. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις, δεν είναι εμφανής κάποια σαφής βλάβη ή μάζα, και ο εκτιμηθείς μαζικός ιστός μπορεί να έχει φυσιολογική όψη. Έτσι, το μικροσκοπικό μέγεθος ενός διηθητικού λοβιακού καρκινώματος μπορεί να είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτό που μετράται μακροσκοπικά.



Εικόνα 1.7. Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα

Επιπλέον των διαφορετικών ιστολογικών και μαστογραφικών χαρακτηριστικών, υπάρχουν ποικίλες προγνωστικές και βιολογικές διαφορές ανάμεσα στους διηθητικούς καρκίνους των πόρων και των λοβίων: Τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα έχουν μεγαλύτερη συχνότητα αμφοτερόπλευρης εντόπισης και

πολυεστιακότητας από τα πορογενή [98, 99], είναι συνήθως πιο μεγάλοι και πιο καλά διαφοροποιημένοι όγκοι και εμφανίζονται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας [98].

Σωληνώδες Καρκίνωμα

Τα σωληνώδη καρκινώματα ήταν σχετικά πιο σπάνια στην προ-μαστογραφίας εποχή, και υπολογίζονταν στο 2% ή και λιγότερο των διηθητικών καρκίνων του μαστού. Εντούτοις, σε πληθυσμούς που ελέγχονται με μαστογραφία, η επίπτωση ήταν υψηλότερη, καλύπτοντας το 10-20% των διηθητικών καρκίνων.

Το σωληνώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία καλά σχηματισμένων σωληνωδών ή αδενικών δομών που διεισδύουν στο στρώμα. Οι βλάβες αυτές έχουν άριστη πρόγνωση σε σύγκριση με τα διηθητικά καρκινώματα των πόρων. Η φυσική πορεία του όγκου είναι καλή και οι μεταστάσεις σπάνιες [100-102].

Βλενώδες Καρκίνωμα

Τα βλενώδη καρκινώματα είναι υπεύθυνα για το 1 έως 2% των διηθητικών καρκίνων του μαστού και φαίνεται να είναι πιο συχνά στους γηραιότερους ασθενείς. Παρόμοια με τα σωληνώδη καρκινώματα, οι βλάβες αυτές επίσης αποτελούν ένα είδος διηθητικού καρκίνου του μαστού με καλή πρόγνωση [100, 101, 103].

Μυελώδες Καρκίνωμα

Τα μυελώδη καρκινώματα είναι υπεύθυνα για το 1 έως 10% των διηθητικών καρκίνων του μαστού. Εντούτοις, υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των μελετών για τη διάγνωση αυτού του τύπου του καρκίνου η οποία, εν μέρει, εξαρτάται από το σύστημα ταξινόμησης που ακολουθείται [104, 105]. Ο όγκος αυτός είναι στην πραγματικότητα πολύ σπάνιος αν ακολουθηθούν αυστηρά τα διαγνωστικά κριτήρια.

Τα μυελοειδή και τα μυελόμορφα καρκινώματα είναι πιο συχνά σε νέους ασθενείς σε σχέση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Είναι επίσης πιο συχνά σε νέες γυναίκες που κληρονομούν μεταλλάξεις του BRCA-1 γονιδίου (10% των καρκίνων του μαστού είναι μυελοειδή σε αυτό τον πληθυσμό, σε σύγκριση με το <1% σε καρκίνους που δεν σχετίζονται με το BRCA1). Εντούτοις, η πλειονότητα των καρκίνων του μαστού σε ασθενείς με μεταλλάξεις του BRCA-1 (90%) δεν είναι μυελοειδείς [106].

Η πρόγνωση των μυελοειδών καρκινωμάτων φαίνεται να είναι πιο καλή από αυτή των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων, παρά την επιθετική ιστολογική τους μορφή [100, 101, 107].

Άλλοι ιστολογικοί τύποι

Υπάρχει ένας αριθμός άλλων ιστολογικών τύπων που είναι υπεύθυνοι για το υπόλοιπο ποσοστό των διηθητικών καρκίνων του μαστού. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται το διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα, το μεταπλαστικό καρκίνωμα, το αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα, και άλλα .

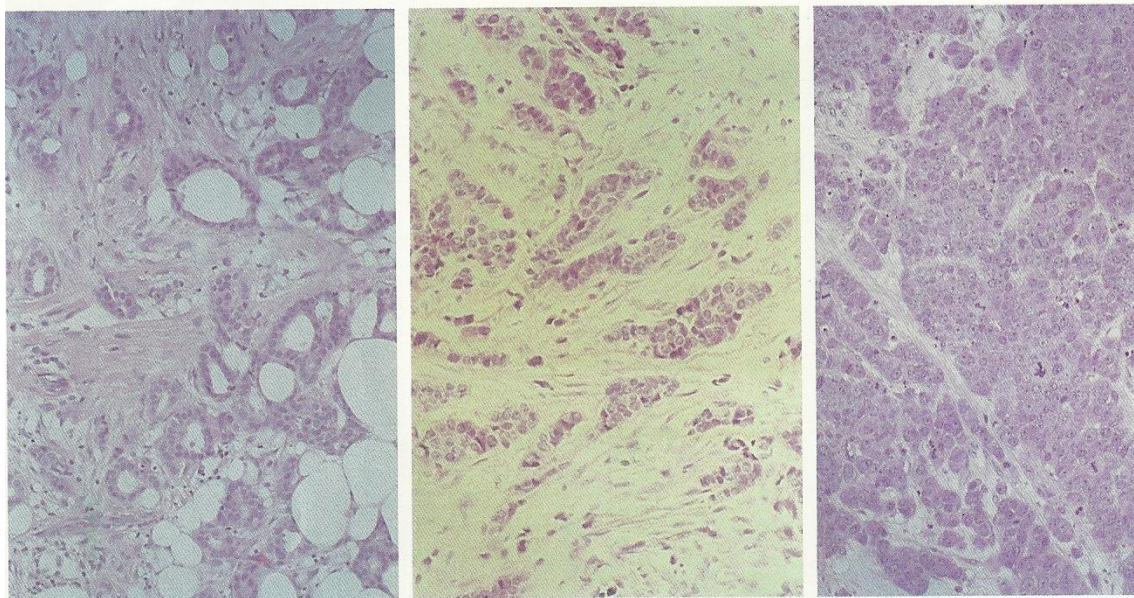
1.1.4.2 Ταξινόμηση του Διηθητικού Καρκινώματος του Μαστού με βάση τη διαφοροποίηση

Τα διηθητικά καρκινώματα χωρίζονται σε τρία grades με βάση ένα συνδυασμό αρχιτεκτονικών και κυτταρολογικών χαρακτηριστικών. Η ταξινόμηση αυτή του βαθμού διαφοροποίησης μπορεί να δώσει πληροφορίες για την πρόγνωση της νόσου. Η ταξινόμηση γίνεται με τη χρήση βαθμολόγησης που βασίζεται σε τρεις παραμέτρους: τον βαθμό σχηματισμού αδένων, τον πλειομορφισμό των πυρήνων και

τη συχνότητα των μιτώσεων [96]. Η κάθε κατηγορία βαθμολογείται στην κλίμακα από 1 έως 3 και το grade του όγκου προκύπτει από την συνολική βαθμολόγησή του. Έτσι τα τρία grades των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού συνοψίζονται ως εξής:

- Grade I (Σκορ 3-5) – Οι καλά διαφοροποιημένοι όγκοι έχουν κύτταρα που διεισδύουν στο στρώμα σαν συμπαγείς σωληνώδεις σχηματισμοί. Οι πυρήνες είναι σχετικά ομοιογενείς με λίγα ή καθόλου στοιχεία μιτωτικής δραστηριότητας (Εικόνα 1.8 Α).
- Grade II (Σκορ 6-7) – Οι μέτρια διαφοροποιημένοι (grade II) όγκοι έχουν κύτταρα που διεισδύουν με μερική αδενική διαφοροποίηση. Υπάρχει κάποια πυρηνική πολυμορφία και ένα μέτριο επίπεδο μιτωτικής δραστηριότητας (Εικόνα 1.8 Β).
- Grade III (Σκορ 8-9) – Οι χαμηλής διαφοροποίησης (grade III) όγκοι συντίθενται από συμπαγείς αθροίσεις νεοπλαστικών κυττάρων χωρίς στοιχεία σχηματισμού αδένων. Υπάρχει εκσεσημασμένη πυρηνική ατυπία και αξιοσημείωτη μιτωτική δραστηριότητα (Εικόνα 1.8 Γ).

Το grade του όγκου είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας τόσο για την ελεύθερη νόσου επιβίωση, όσο και για την συνολική επιβίωση. Η εισαγωγή της μοριακής διαγνωστικής έχει αλλάξει σημαντικά τον τρόπο αναφοράς των παθολογοανατομικών ευρημάτων του καρκίνου του μαστού. Έτσι, δείκτες όπως η παρουσία ορμονικών υποδοχέων και η υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης Her2/neu πλέον συμπεριλαμβάνονται στην παθολογοανατομική έκθεση.



A

B

Γ

Εικόνα 1.8. Διθητικό καρκίνωμα του μαστού, Grade I (A), Grade II (B) και Grade III (Γ).

1.1.4.3 Οιστρογονικοί υποδοχείς, Προγεστερονικοί υποδοχείς και έκφραση του Her2

Οιστρογονικοί – Προγεστερονικοί υποδοχείς

Περίπου το 75% των καρκινωμάτων του μαστού εκφράζει σημαντική ποσότητα υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ER). Η έκφραση αυτή μπορεί να αξιολογηθεί με ανοσοϊστοχημική μέθοδο και συμπεριλαμβάνεται στην παθολογοανατομική έκθεση εξέτασης του παρασκευάσματος.

Οι περισσότεροι όγκοι που εκφράζουν τους ER, εκφράζουν και τους προγεστερονικούς υποδοχείς (Progesterone Receptors, PR). Οι όγκοι που εκφράζουν τόσο τους ER όσο και τους PR έχουν αυξημένη πιθανότητα να ανταποκριθούν στην ορμονοθεραπεία. Η συχνότητα ανεύρεσης PR (+)/ER (-) όγκων είναι μικρή [56].

Έκφραση του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης 2 (Her2)

Υπάρχουν τέσσερα είδη υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης. Αυτά είναι ο Her1 (επίσης γνωστός ως EGFR), ο Her2 (επίσης γνωστός ως *cerb2*), και οι λιγότερο γνωστοί Her3 και Her4. Προς το παρόν, ο Her2 είναι ο μοναδικός υποδοχέας που αξιολογείται κατά την παθολογοανατομική εξέταση υλικού καρκινώματος του μαστού. Η αρχική αξιολόγηση γίνεται με αντίσωμα ανοσοϊστοχημείας και ταξινομείται ως 0, + (αρνητικό), ++ (αμφίβολο) και +++ (θετικό). Όλες οι περιπτώσεις με έκφραση ++ του Her2 μελετώνται με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό (FISH) όπου μετράται ο λόγος των αντιγράφων του Her2 στο χρωμόσωμα 17 και στο παρασκεύασμα. Λόγος μεγαλύτερος ή ίσος του 2 θεωρείται θετικός.

Περίπου 15-20% των διηθητικών καρκίνων του μαστού υπερεκφράζουν τον Her2. Οι όγκοι που δεν εκφράζουν κανέναν από τους υποδοχείς ER, PR και Her2 ονομάζονται «τριπλά αρνητικοί» (triple negative). Περίπου μισοί από τους τριπλά αρνητικούς όγκους ανταποκρίνονται καλά στη χημειοθεραπεία, αλλά κάποιοι είναι ανθεκτικοί. Οι Her2 θετικοί όγκοι είχαν αρχικά αρνητική πρόβλεψη, ωστόσο με την εισαγωγή της στοχευμένης βιολογικής θεραπείας έναντι του Her2, η επιβίωση των ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού που υπερεκφράζει το Her2 έχει βελτιωθεί σημαντικά [56].

1.1.4.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Οι μελέτες του καρκίνου του μαστού που διερεύνησαν τη γενετική υπογραφή του όγκου, κατέληξαν στο να διακρίνουν ορισμένους κύριους υπότυπους καρκίνου

του μαστού, πέρα από την κλασική ταξινόμησή τους με βάση την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων. Η πιο σημαντική και κοινά αποδεκτή ταξινόμηση ανάμεσα στους θετικούς για ορμονικούς υποδοχείς όγκους είναι οι Luminal A και Luminal B όγκοι. Από την άλλη, οι Her2 θετικοί και basal – like είναι οι κύριοι υπότυποι μεταξύ των αρνητικών για ορμονικούς υποδοχείς όγκων. Οι μοριακοί υπότυποι αυτοί διαφέρουν τόσο ως προς την τυπική έκφραση γονιδίων, όσο και ως προς τα κλινικά χαρακτηριστικά, την απόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση (Πίνακες 1.9, 1.10) [108-110].

Πίνακας 1.9. Γονιδιακά χαρακτηριστικά για κάθε μοριακό υπότυπο διηθητικού καρκινώματος του μαστού.

Υπότυπος	Χαρακτηριστικά	Επίπτωση
Luminal A	ER+ ή/και PR+, HER2-, χαμηλό Ki67	40%
Luminal B	ER+ ή/και PR+, HER2+ (ή HER2- με υψηλό Ki67)	20%
Triple negative basal-like	ER-, PR-, HER2-, cytokeratin 5/6 + ή/και HER1+	15-20%
HER2	ER-, PR-, HER2+	10-15%

Πίνακας 1.10. Μοριακοί υπότυποι διηθητικού καρκινώματος και κλινικά χαρακτηριστικά

<i>Μοριακός Υπότυπος</i>			
	<i>Luminal</i>	<i>HER2</i>	<i>Basal-like</i>
Κλινικά	~70% των διηθητικών όγκων, ER/PR (+). Οι luminal B τείνουν να έχουν υψηλότερο grade από τους luminal A. Κάποιοι υπερεκφράζουν το HER2 (luminal B)	~15% των διηθητικών καρκίνων, ER/PR (-). Συνήθως υψηλού grade με αρνητικούς ΔΦ	~15% των διηθητικών καρκίνων. Συνήθως ER/PR/HER2 (-) ('triple negative'). μεταλλάξεις του <i>BRCA1</i> . Απαντώνται συχνά στις Αφροαμερικανές
Απόκριση στη Θεραπεία - Πρόγνωση	Ανταποκρίνονται στην ορμονική θεραπεία (η ανταπόκριση μπορεί να είναι διαφορετική για luminal A και luminal B). Ανταποκρίνονται ποικίλως στη χημειοθεραπεία (περισσότερο οι luminal B παρά οι luminal A). Πρόγνωση καλύτερη για τους luminal A από τους luminal B	Ανταποκρίνονται στο trastuzumab (Herceptin). Ανταποκρίνονται σε σχήματα με ανθρακυκλίνες. Γενικά πτωχή πρόγνωση	Δεν ανταποκρίνονται σε ορμονοθεραπεία ή trastuzumab (Herceptin). Φαίνεται να είναι ευαίσθητοι σε σχήματα με πλατίνη και αναστολείς του PARP. Γενικά πτωχή πρόγνωση (αλλά όχι ομοιόμορφα πτωχή)

1.1.4.5 Σταδιοποίηση του διηθητικού καρκινώματος του μαστού

Η έκταση της διήθησης για τον διηθητικό καρκίνο του μαστού αξιολογείται και εκφράζεται ως το στάδιο της νόσου. Το ευρύτερα αποδεκτό σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού είναι εκείνο της American Joint Committee

on Cancer (AJCC) (Σχήμα 1.9), που στην κλινική πρακτική αναφέρεται σαν ‘Σύστημα TNM’ (Πίνακας 1.11). Η σταδιοποίηση του International Union Against Cancer (UICC) ενσωματώνει επίσης το σύστημα TNM (Πίνακας 1.12). Για την βελτίωση του συστήματος TNM, έχει προστεθεί μια ξεχωριστή παθολογοανατομική ταξινόμηση που αφορά στο μέγεθος του όγκου και την λεμφαδενική διήθηση [111]. Η πρόγνωση του καρκίνου του μαστού σχετίζεται άμεσα με το στάδιο της νόσου κατά το χρονικό διάστημα της διάγνωσης.

Πίνακας 1.11. Σταδιοποίηση του καρκίνου το μαστού κατά TNM.

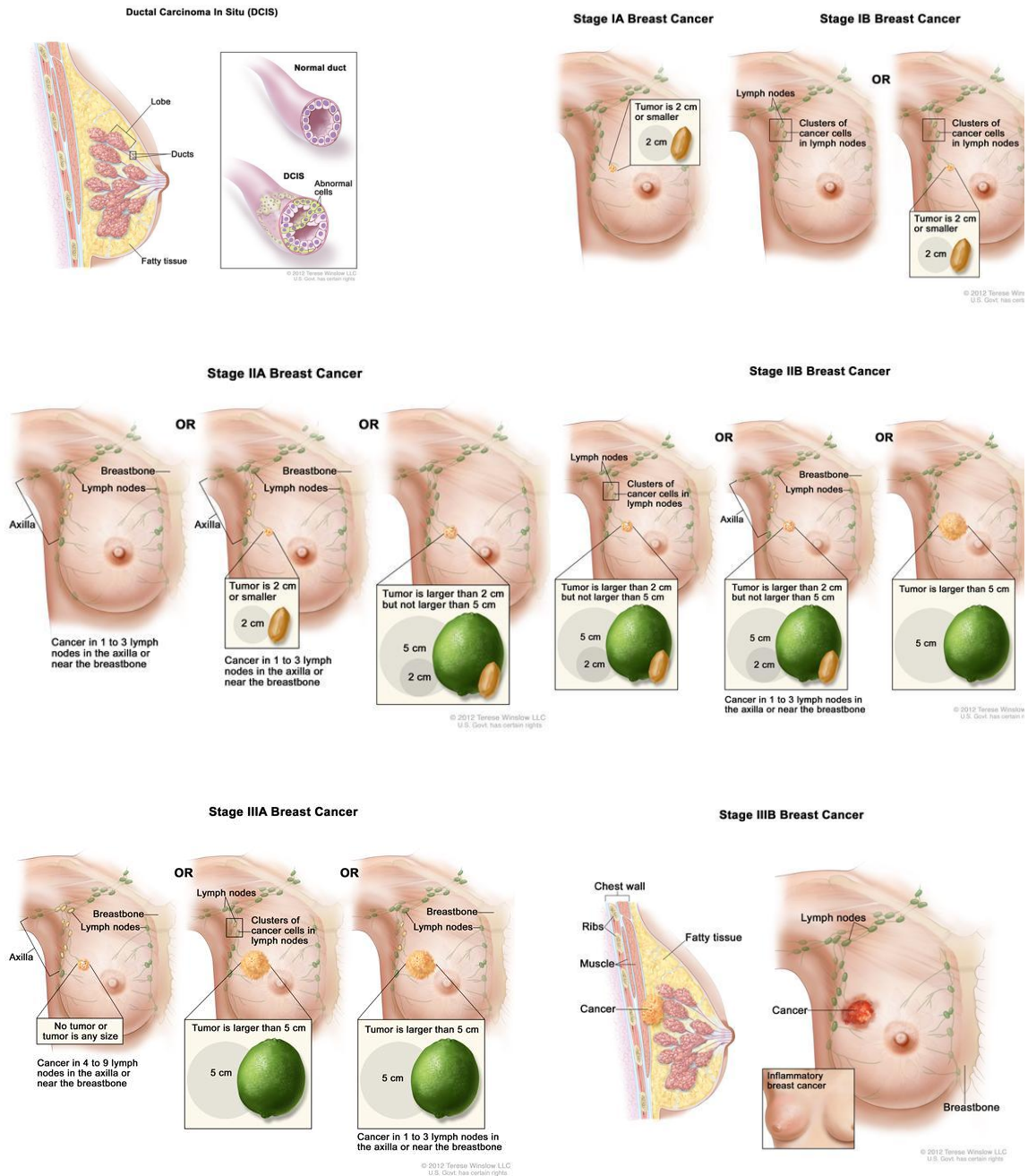
Πρωτοπαθής Όγκος	
TX	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί
T0	Χωρίς σημεία πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Καρκίνωμα <i>in situ</i> . Ενδοπορικό καρκίνωμα, λοβιακό καρκίνωμα <i>in situ</i> , ή νόσος Paget της θηλής χωρίς όγκο Σημ: Η νόσος Paget που σχετίζεται με όγκο σταδιοποιείται ανάλογα με το μέγεθος του όγκου
T1	Όγκος μεγέθους έως 2 cm στη μέγιστη διάμετρό του
T1mic	Μικροδιήθηση 0,1 cm ή μικρότερη στη μέγιστη διάμετρο
T1a	Όγκος μεταξύ 0,1 cm και 0,5 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1b	Όγκος μεταξύ 0,5 cm και 1,0 cm στη μέγιστη διάμετρο
T1c	Όγκος μεταξύ 1,0 cm και 2,0 cm στη μέγιστη διάμετρο
T2	Όγκος μεγαλύτερος από 2,0 cm αλλά μικρότερος από 5,0 cm στη μέγιστη διάμετρο
T3	Όγκος μεγαλύτερος από 5,0 εκατοστά στη μέγιστη διάμετρο
T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση α) στο θωρακικό τοίχωμα ή β) στο δέρμα Σημ: Στο θωρακικό τοίχωμα συμπεριλαμβάνονται οι πλευρές, οι μεσοπλεύριοι μύες και ο οδοντωτός μυς
T4a	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα
T4b	Οίδημα (συμπεριλαμβάνεται η όψη φλοιού πορτοκαλιού) ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή περιφερικοί όζοι στο δέρμα του μαστού
T4c	Συνδυασμός του T4a και T4b
T4d	Φλεγμονώδες καρκίνωμα*
Περιοχικοί Λεμφαδένες (N)	
NX	Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν (π.χ. έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί)
N0	Χωρίς περιοχικές λεμφαδενικές μεταστάσεις
N1	Μετάσταση σε κινητούς σύστοιχους μασχαλαίους λεμφαδένες
N2	Μετάσταση σε σύστοιχους μασχαλαίους λεμφαδένες που είναι

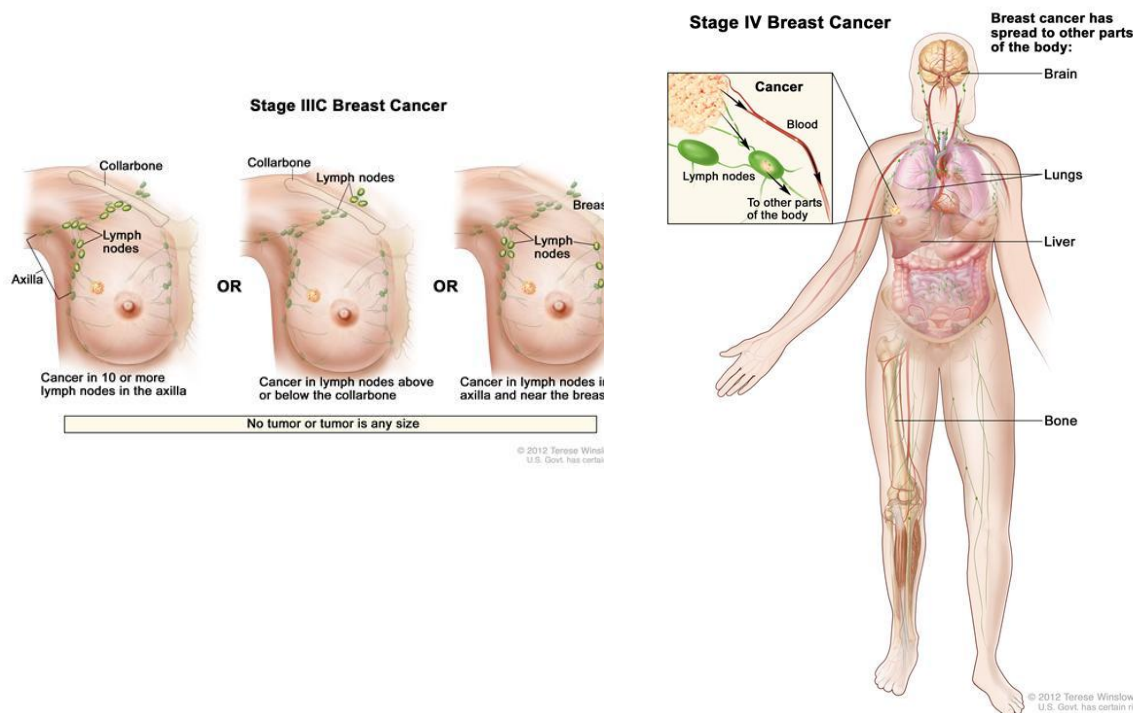
N3	καθηλωμένοι ο ένας στον άλλον ή σε παρακείμενες δομές Μετάσταση σε σύστοιχους λεμφαδένες της έσω μαστικής
Παθολογοανατομική Ταξινόμηση (pN)	
pNX	Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν (δεν έχουν προηγουμένως αφαιρεθεί ή δεν έχουν αφαιρεθεί για παθολογοανατομική μελέτη)
pN0	Χωρίς περιοχικές λεμφαδενικές μεταστάσεις
pN0(i-)	Χωρίς περιοχικές λεμφαδενικές μεταστάσεις ιστολογικά, αρνητική ανοσοϊστοχημεία
pN0(i+)	Καρκινικά κύτταρα σε περιοχικούς λεμφαδένες με μέγιστη διάμετρο 0,2 mm (που ανιχνεύθηκαν με χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης ή ανοσοϊστοχημεία, συμπεριλαμβανομένων των μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων – ITC)
pN0(mol-)	Χωρίς περιοχικές λεμφαδενικές μεταστάσεις ιστολογικά, αρνητικά μοριακά ευρήματα (RT-PCR)
pN0(mol+)	Θετικά μοριακά ευρήματα (RT-PCR) αλλά χωρίς περιοχικές λεμφαδενικές μεταστάσεις στην ιστολογία ή την ανοσοϊστοχημεία
pN1	Μικρομεταστάσεις ή μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες της μασχάλης και/ή μεταστάσεις σε λεμφαδένες της έσω μαστικής που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά όχι κλινικά
pN1mi	Μικρομεταστάσεις (μεγαλύτερες από 0,2 mm και/ή πάνω από 200 κύτταρα, αλλά όχι πάνω από 2,0 mm)
pN1a	Μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες της μασχάλης, τουλάχιστον μια μετάσταση μεγαλύτερη από 2,0 mm
pN1b	Μεταστάσεις στους λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά όχι κλινικά
pN1c	Μεταστάσεις σε 1-3 λεμφαδένες της μασχάλης και σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά όχι κλινικά
pN2	Μεταστάσεις σε 4-9 λεμφαδένες της μασχάλης ή σε κλινικά ανιχνεύσιμους λεμφαδένες της έσω μαστικής με απουσία διήθησης των λεμφαδένων της μασχάλης
pN2a	Μεταστάσεις σε 4-9 λεμφαδένες της μασχάλης (τουλάχιστον μια εναπόθεση όγκου μέγιστης διαμέτρου μεγαλύτερης των 2,0 mm)
pN2b	Μεταστάσεις σε κλινικά ανιχνεύσιμους Metastases in clinically detected λεμφαδένες της έσω μαστικής με απουσία διήθησης των λεμφαδένων της μασχάλης
pN3	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους λεμφαδένες της μασχάλης; ή σε υποκλειδίους (επίπεδου III) λεμφαδένες; ή κλινικά ανιχνεύσιμοι λεμφαδένες της έσω μαστικής σύστοιχα με παρουσία ενός ή περισσότερων θετικών λεμφαδένων στο επίπεδο I ή II της μασχάλης; ή σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες της μασχάλης και σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά δεν είναι κλινικά ανιχνεύσιμες; ή σε σύστοιχους υπερκλειδίους λεμφαδένες
pN3a	Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους λεμφαδένες της μασχάλης

	(τουλάχιστον μια εστία διήθησης μεγαλύτερη των 2,0 mm); ή σε υποκλειδίου (επιπέδου III) λεμφαδένες
pN3b	Μεταστάσεις σε κλινικά ανιχνεύσιμους λεμφαδένες της έσω μαστικής σύστοιχα με παρουσία ενός ή περισσότερων θετικών λεμφαδένων της μασχάλης ή σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες της μασχάλης και σε λεμφαδένες της έσω μαστικής με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις που ανιχνεύθηκαν με βιοψία λεμφαδένα φρουρού αλλά δεν είναι κλινικά ανιχνεύσιμες
pN3c	Μεταστάσεις σε σύστοιχους υπερκλειδίου λεμφαδένες
Απομακρυσμένες Μεταστάσεις (M)	
MX	Παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης που δεν μπορεί να αξιολογηθεί
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης (συμπεριλαμβάνονται μεταστάσεις στους σύστοιχους υποκλειδίου λεμφαδένες)

*Το φλεγμονώδες καρκίνωμα είναι μια κλινικοπαθολογική οντότητα που χαρακτηρίζεται από διάχυτη καφεοειδή σκλήρυνση του δέρματος του μαστού με ερυσιπελατοειδές όριο, συνήθως χωρίς ψηλαφητή υποκείμενη μάζα. Ακτινολογικά μπορεί να ανευρεθεί μάζα και χαρακτηριστική πάχυνση του δέρματος του μαστού. Η κλινική αυτή εικόνα οφείλεται στην εμβολή καρκινικών κυττάρων στα λεμφαγγεία του δέρματος με διήθηση των επιπολής τριχοειδών αγγείων.

Σχήμα 1.9. Τα στάδια του καρκίνου του μαστού [112].



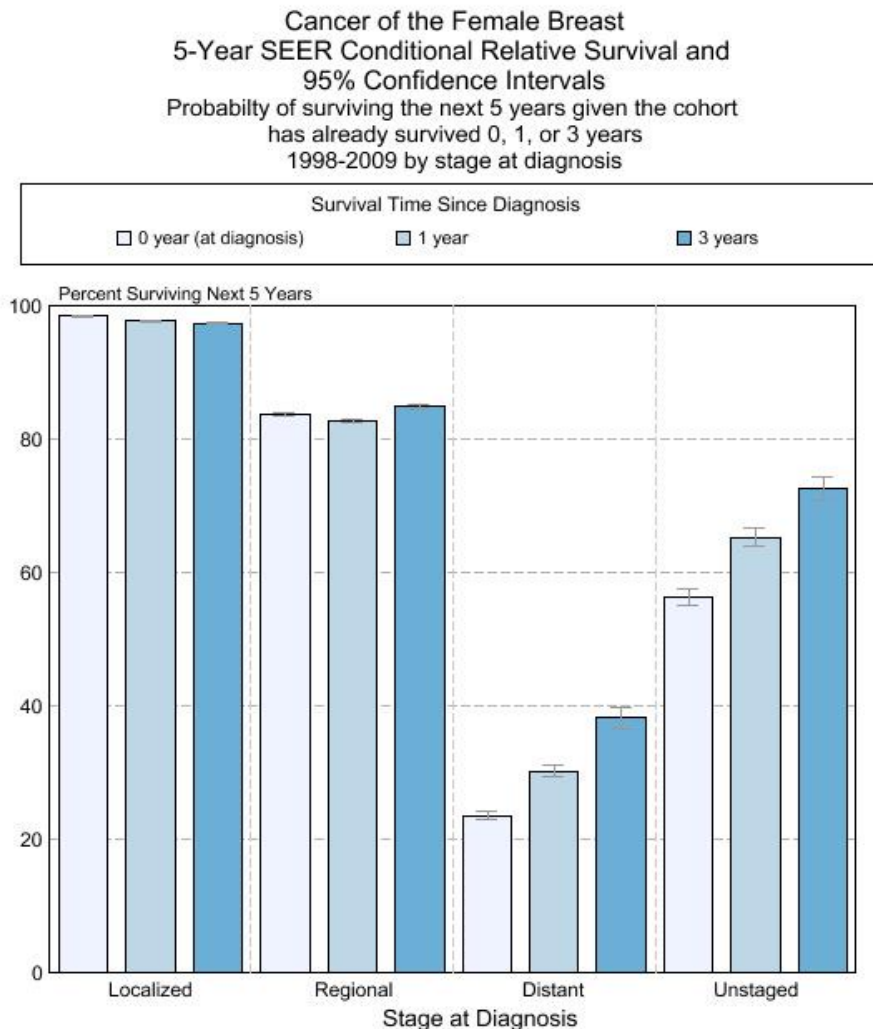


Πίνακας 1.12. Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού κατά AJCC/UICC

Στάδιο	Ταξινόμηση κατά TNM
Στάδιο 0	Tis, N0, M0
Στάδιο I	T1,* N0, M0 *Το T1 συμπεριλαμβάνει το T1mic
Στάδιο IIΑ	T0, N1, M0 T1,* N1,** M0 T2, N0, M0 *Το T1 συμπεριλαμβάνει το T1mic **Η πρόγνωση ασθενών με νόσο pN1a είναι παρόμοια με αυτή ασθενών με νόσο pN0
Στάδιο IIΒ	T2, N1, M0 T3, N0, M0
Στάδιο IIIΑ	T0, N2, M0 T1,* N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0 *Το T1 συμπεριλαμβάνει το T1mic
Στάδιο IIIΒ	T4, Οποιοδήποτε N, M0 Οποιοδήποτε Τα, N3, M0
Στάδιο IV	Οποιοδήποτε T, Οποιοδήποτε N, M1

1.1.5 Προγνωστικοί παράγοντες του καρκίνου του μαστού

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 (Σχήμα 1.10). Η πρόγνωση της νόσου τροποποιείται ευρέως ανάλογα με κλινικούς, ιστολογικούς και βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες [113-120].



Σχήμα 1.10. 5-ετής επιβίωση του καρκίνου του μαστού ανάλογα με το στάδιο (Προσαρμοσμένο από SEER Cancer Statistics Review 1975 – 2010)

1.1.5.1 Κλινικοί προγνωστικοί παράγοντες

Μέγεθος πρωτοπαθούς εστίας

Η μέγιστη διάμετρος του πρωτοπαθούς όγκου συσχετίζεται άμεσα με την συχνότητα εμφάνισης των λεμφαδενικών μεταστάσεων, έχει προγνωστική σημασία στον καθορισμό της επικουρικής θεραπείας και σχετίζεται με τα ποσοστά επιβίωσης [121, 122]. Το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους προγνωστικούς παράγοντες για την πρόβλεψη της διασποράς και την πιθανότητα υπότροπης του καρκίνου του μαστού είτε με είτε χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις. Επίσης, αποτελεί καθοριστική προγνωστική παράμετρο στον καρκίνο με αρνητικούς λεμφαδένες [123], καθώς και κριτήριο για την χορήγηση ή όχι επικουρικής θεραπείας στους ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Όσον αφορά στους όγκους που έχουν *in situ* και διηθητικό στοιχείο, το μέγεθος του τελευταίου αποτελεί καλύτερο προγνωστικό παράγοντα συγκριτικά με το συνολικό μέγεθος του όγκου [124]. Στατιστικά, περίπου 20% των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες και όγκο μεγίστης διαμέτρου μικρότερης από 2 εκ. θα εμφανίσουν μεταστάσεις εντός 20 ετών [125-128]. Οι ασθενείς με όγκους 1εκ. ή μικρότερο έχουν εξαιρετική πρόγνωση, με λιγότερο από 10% πιθανότητα υποτροπής στα 10 έτη, και μόνο 12% στα 20 έτη [121, 129, 130].

Μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις

Η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων στη μασχάλη αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους και πιο αξιόπιστους προγνωστικούς παράγοντες [131-135]. Υπάρχει μεγάλη διαφορά στην επιβίωση μεταξύ ασθενών με θετικούς ή αρνητικούς λεμφαδένες, αλλά τα ποσοστά επιβίωσης εξαρτώνται και από το επίπεδο που

βρίσκονται οι διηθημένοι λεμφαδένες (I, II, ή III) [136], τον απόλυτο αριθμό τους (0, 1-3, ≥ 4) [113, 133, 137], τις διαστάσεις του μεταστατικού όγκου [138, 139], την παρουσία ή απουσία εξω-λεμφαδενικής διασποράς [113, 140-144], καθώς και την παρουσία ή απουσία νεοπλασματικών κυττάρων στα απαγωγά αγγεία [113, 114, 135, 145-147]. Γενικά, 50%-70% των ασθενών με μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες υποτροπιάζουν, ενώ μόνο 20%-35% των ασθενών χωρίς μεταστατική νόσο στους μασχαλιαίους λεμφαδένες θα υποτροπιάσουν μετά από τοπική και περιοχική θεραπεία. Η παρουσία μικρομεταστάσεων, που πλέον ορίζεται απόλυτα από το σύστημα ταξινόμησης TNM, όπως και η παρουσία μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων εντός μασχαλιαίων λεμφαδένων, αντιμετωπίζονται ως N0, με ανάλογο θεραπευτικό πλάνο. Ασθενείς με μεταστάσεις στους έσω μαστικούς λεμφαδένες έχουν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με εκείνους που έχουν μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις [148].

Μεταστατική νόσος

Οι ασθενείς με μεταστατική νόσο κατά την διάγνωση, και ειδικότερα το ποσοστό εκείνο με εμφανείς μεταστάσεις (M1 – Στάδιο IV) έχουν σαφώς χειρότερη πρόγνωση από τις ασθενείς με εντοπισμένη νόσο. Η επιβίωση διαφέρει ανάλογα με την εντόπιση των μεταστάσεων. Ειδικότερα, οι ασθενείς με διηθημένους υπερκλείδιους λεμφαδένες έχουν καλύτερη επιβίωση από ασθενείς με μεταστάσεις σε άλλα σημεία του σώματος, και ασθενείς με οστικές αλλά χωρίς σπλαγχνικές μεταστάσεις έχουν επίσης καλύτερη επιβίωση από τις ασθενείς με σπλαγχνικές μεταστάσεις.[149]

Ηλικία και εμμηνόπαυση

Όταν συνυπάρχουν άλλα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά του όγκου, η ηλικία καθώς και η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση της ασθενούς δεν αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες. Οι γυναίκες που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού σε ηλικία 45-49 ετών έχουν την καλύτερη πρόγνωση [150, 151]. Η σχετική επιβίωση μειώνεται μετά το 50^ο έτος της ηλικίας και είναι πρακτικά χαμηλή σε ηλικιωμένες ασθενείς [150]. Όσον αφορά όμως τις νεαρές ηλικίες (<35 ετών), τόσο η επιβίωση (σύμφωνα με ορισμένες μελέτες), όσο και ο κίνδυνος υποτροπής και εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων είναι σημαντικά υψηλότερος [152].

Κύηση

Ο καρκίνος του μαστού που εκδηλώνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ή της γαλουχίας έχει γενικά χειρότερη πρόγνωση και η 5ετης επιβίωση στις περισσότερες μελέτες κυμαίνεται μεταξύ 15% και 35% [153]. Ωστόσο αυτή η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική όταν οι ασθενείς εκτιμώνται ανάλογα με το στάδιο της νόσου [154, 155].

1.1.5.2. Ιστολογικοί προγνωστικοί παράγοντες

Διηθητικός τύπος του καρκινικού όγκου

Είναι αυτονόητο ότι η διήθηση αποτελεί τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για τον καρκίνο του μαστού. Όλα τα *in situ* καρκινώματα είναι σχεδόν 100% θεραπεύσιμα με την μαστεκτομή. Επίσης τα μη διηθητικά καρκινώματα (DCIS και LCIS) έχουν πολύ μικρό κίνδυνο ανάπτυξης λεμφαδενικών μεταστάσεων και ουσιαστικά μηδενική πιθανότητα να αναπτύξουν απομακρυσμένες μεταστάσεις [114,

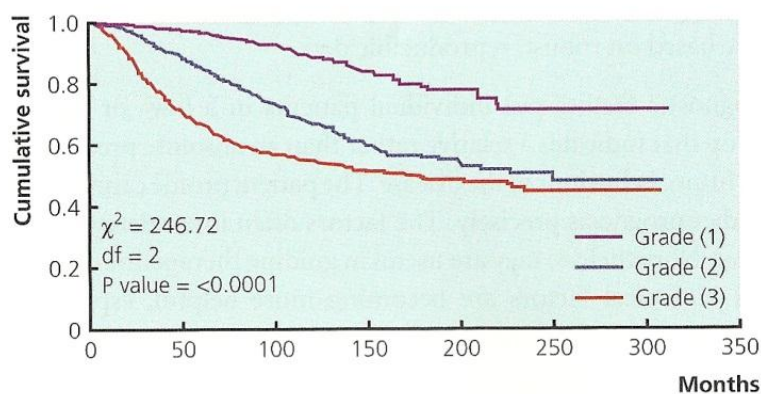
156]. Όσον αφορά τα πορογενή καρκινώματα που έχουν *in situ* και διηθητικό στοιχείο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του διηθητικού στοιχείου και της πιθανότητας ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων. Η έκταση του *in situ* στοιχείου συσχετίζεται με την εμφάνιση πολυκεντρικότητας του όγκου και έμμεσα με την πιθανότητα ύπαρξης μικροσκοπικής διήθησης [157, 158]. Έχουν αναφερθεί ωστόσο, περιπτώσεις ασθενών με *in situ* πορογενές καρκίνωμα φαγεσωρικού τύπου και λεμφαδενικές μεταστάσεις ακόμα και επί απουσίας ανιχνεύσιμης διήθησης [139].

Ιστολογικός Τύπος

Δεν υπάρχει γενικά σημαντική προγνωστική διαφορά μεταξύ πορογενούς και λοβιακού διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Υπάρχουν ορισμένες μορφολογικές παραλλαγές του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος που έχουν καλύτερη πρόγνωση και αυτές είναι το καρκίνωμα με σωληνώδη ή με ηθμοειδή διαμόρφωση, το μυελοειδές καρκίνωμα, το βλεννώδες, το θηλώδες και το αδενοκυστικό [114, 159, 160]. Οι καλώς διαφοροποιημένοι ιστολογικοί υπότυποι όπως ο σωληνώδης, ο θηλώδης ή ο βλεννώδης έχουν μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης λεμφαδενικών μεταστάσεων και χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστάσεων συγκριτικά με το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Μία παραλλαγή του λοβιακού (και μερικές φορές του πορογενούς) καρκινώματος του μαστού με εξαιρετικά κακή πρόγνωση είναι το καρκίνωμα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring). Η πρόγνωση του φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού είναι επίσης πολύ πτωχή. Τέλος όγκοι οι οποίοι αναφέρεται ότι είναι πιο επιθετικοί συγκριτικά με το πορογενές καρκίνωμα αλλά στην πραγματικότητα εμφανίζουν μικρή διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης, είναι το καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου, το μεταπλαστικό καρκίνωμα, και οι καρκινοειδείς όγκοι [161].

Ιστολογικό grade

Σύμφωνα με το σύστημα Bloom και Richardson [162] με την τροποποίηση του Nottingham [163, 164], ο βαθμός κακοήθειας των όγκων του μαστού καθορίζεται από τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά (έκταση σωληνώδους στοιχείου), τον πυρηνικό πλειομορφισμό και τον αριθμό μιτώσεων στα 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης (βλέπε και 1.1.4.2 Ταξινόμηση του Διηθητικού Καρκινώματος του Μαστού με βάση τη διαφοροποίηση). Η προγνωστική σημασία του συστήματός αυτού είναι τόσο σημαντική (Σχήμα 1.11) ώστε απαιτείται και συμπεριλαμβάνεται σε κάθε ιστολογική εξέταση [156, 165]. Λιγότερες από 20% των ασθενών με αρνητικούς μασχαλαίους και με καλώς ή μέτρια διαφοροποιημένους όγκους (grade I ή II) υποτροπιάζουν εντός 5 ετών, συγκριτικά με αυτούς που έχουν χαμηλής διαφοροποίησης όγκους, και οι οποίοι υποτροπιάζουν σε ποσοστό 30% [166, 167]. Η διαφοροποίηση του όγκου σχετίζεται επίσης με το μέγεθος της πρωτοπαθούς εστίας καθώς και με άλλες προγνωστικές παραμέτρους όπως, η έκφραση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, η πλοειδία και το κλάσμα DNA στην S φάση (SPF).



Σχήμα 1.11. Συνολική επιβίωση σε σχέση με το ιστολογικό grade της νόσου (Προσαρμοσμένο από [168])

Λεμφαγγειακή διήθηση

Στο μαστό, δεν είναι πάντα εφικτό να διακριθούν τα λεμφαγγεία από τα αιμοφόρα αγγεία στην κλασική χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης. Έτσι χρησιμοποιείται ο όρος «αγγειακή διήθηση». Η παρουσία νεοπλασματικών εμφράκτων στα λεμφαγγεία του μαστού, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής του όγκου [169-171].

Πέραν των προαναφερθέντων ιστολογικών παραμέτρων, υπάρχει μια πληθώρα παραγόντων που έχουν διερευνηθεί ως προς την προγνωστική τους αξία, εντούτοις δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία που να αναδεικνύουν μια σταθερή συσχέτιση με την πρόγνωση της ασθενούς. Στους παράγοντες αυτούς συγκαταλέγονται η νέκρωση του όγκου, η παρουσία αντίδρασης στρώματος και αγγειακών νεοπλασματικών εμβόλων, καθώς και η μικροαγγειακή πυκνότητα του όγκου, κ.α.

Η νέκρωση του όγκου σχετίζεται πιο συχνά με λεμφαδενικές μεταστάσεις καθώς και μειωμένα ποσοστά επιβίωσης [172-175]. Η νέκρωση του όγκου ωστόσο συνδυάζεται συνήθως με όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας. Όσον αφορά την αντίδραση του στρώματος, έχει βρεθεί ότι όγκοι με απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης στην περιφέρεια τους, παρουσιάζουν σε μικρότερο ποσοστό λεμφαδενικές μεταστάσεις και επομένως καλύτερη πρόγνωση [147]. Η ανεύρεση νεοπλασματικών εμβόλων συσχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του όγκου, τον βαθμό κακοηθείας και τον τύπο του όγκου, τη διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων, την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, και εν τη τέλει πτωχή πρόγνωση [160, 176-178].

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι η αγγειογένεση παίζει ουσιώδη ρόλο στην ανάπτυξη και διασπορά του καρκίνου. Ο έλεγχος της μικροαγγείωσης του όγκου

επιτυγχάνεται ανοσοϊστοχημικά με χρώση του παράγοντα VIII και έχει μεγάλη προγνωστική αξία. Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού που εμφανίζουν κυρίαρχο το αγγειακό στοιχείο στο στρώμα γύρω από τον όγκο, συμπεριφέρονται με επιθετικότερο τρόπο [179-182] συγκριτικά με όγκους με μικρή νέο-αγγείωση, που οποία παρουσιάζουν μικρότερο μεταστατικό δυναμικό και έχουν καλύτερη πρόγνωση [179, 182-184]. Αξιοσημείωτο είναι ότι η πυκνότητα της μικροαγγείωσης του όγκου αποτελεί ανεξάρτητο φαινόμενο από την ενδοθηλιακή υπερπλασία εντός του όγκου [185] και ότι αυξημένη μικροαγγείωση έχει παρατηρηθεί επίσης στα ενδοπορικά καρκινώματα, και ειδικότερα αυτά που ανήκουν στο φαγεσωρικό τύπο [186].

1.1.5.3 Βιολογικοί προγνωστικοί παράγοντες

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών παραγόντων που έχει σχετιστεί με την πρόγνωση, που όμως δεν τεκμηριώνονται σε μελέτες με μεγάλο αριθμό ασθενών. Μεταξύ αυτών ο Her2, όταν υπερεκφράζεται αποτελεί ισχυρό αρνητικό προγνωστικό παράγοντα αλλά θετικό προβλεπτικό παράγοντα. Η ανταπόκριση όμως των ασθενών στη στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς του (trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, T-DM1), τον καθιστά ταυτόχρονα και θετικό προβλεπτικό παράγοντα.

*Ογκογονίδιο *CerbB2/neu* - Her2*

Η ενίσχυση αυτού του ογκογονιδίου υπάρχει σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ενδοπορικού καρκινώματος φαγεσωρικού τύπου, σε 10% με 20% των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων και μόνο σε λίγες περιπτώσεις διηθητικού λοβιακού καρκίνου [187, 188]. Μπορεί να ανιχνευτεί ανοσοϊστοχημικά είτε με ανίχνευση του πρωτεϊνικού προϊόντος του, είτε με *in situ* υβριδισμό του mRNA [189]. Η ενίσχυση

της έκφρασης του γονιδίου αυτού προσδιορίζει μια υποομάδα ασθενών με πτωχή πρόγνωση, ειδικά εάν συνυπάρχουν μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις [148, 190, 191]. Επίσης, η ενίσχυση ή η υπερέκφραση του C-erbB-2 έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα που σχετίζεται με την ευαισθησία ή την ανθεκτικότητα σε ορισμένες μορφές επικουρικής θεραπείας. Υπάρχει επίσης η άποψη ότι οι ασθενείς με καρκίνο που υπερεκφράζει το C-erbB-2 έχουν καλύτερη ανταπόκριση στην επικουρική χημειοθεραπεία [192]. Ωστόσο σε πολυπαραγοντικές μελέτες που έχουν γίνει, φαίνεται ότι η προγνωστική αξία του C-erbB-2 επισκιάζεται από την παρουσία διαφόρων μορφολογικών παραμέτρων [193, 194]. Επιπλέον, σχετίζεται με τον υψηλό βαθμό κακοηθείας του όγκου [195], με την έντονη κυτταρική ατυπία, την αυξημένη μεταστατική ικανότητα και γενικώς την επιθετική βιολογική συμπεριφορά του καρκίνου του μαστού.

Το trastuzumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα Her2, που χορηγείται συμπληρωματικά με χημειοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο μαστού που υπερεκφράζει το Her2. Τέσσερις μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες με περίπου 11,500 ασθενείς κατέληξαν ότι η συγχορήγηση του trastuzumab ταυτόχρονα με την κλασική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού βελτιώνει το διάστημα ελεύθερο νόσου κατά 40% – 50% και τη συνολική επιβίωση κατά 30% [196-200]. Σημαντικό κλινικό πρόβλημα με τη χορήγηση του trastuzumab είναι ο κίνδυνος καρδιαγγειακών προβλημάτων σε ορισμένες ομάδες ασθενών [201]. Άλλο σκεύασμα που αναστέλλει τον Her2 είναι το lapatinib, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων της τυροσινικής κινάσης, και του οποίου η θέση στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού παραμένει υπό διερεύνηση.

Άλλοι βιολογικοί προγνωστικοί παράγοντες

p53: Τροποποιήσεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο ή την πρωτεΐνη p53 έχουν παρατηρηθεί στο 20-50% των κακοήθων όγκων του μαστού. Σύσσωρευση της πρωτεΐνης p53 (ως αποτέλεσμα γονιδιακής μετάλλαξης) φαίνεται να σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοηθείας, κλινικά επιθετικότερη συμπεριφορά του όγκου και χειρότερη πρόγνωση των ασθενών [202-205]. Από τις μελέτες σε μεγάλες σειρές ασθενών όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική έκφραση της p53 και την συσχέτιση της με την πρόγνωση, ορισμένες καταλήγουν ότι η p53 έχει προγνωστική αξία [202, 203, 206-212], ιδίως σε ασθενείς χωρίς διηθημένους μασχαλαίους λεμφαδένες, ενώ μελέτες σε καρκίνο μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες δεν επιβεβαιώνουν τον προγνωστικό ρόλο της p53 [213-216]. Ωστόσο έχει διατυπωθεί και η άποψη ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση του p53 δεν αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό παράγοντα [206, 213]. Αντίθετα, η εκτίμηση της p53 σε επίπεδο DNA φαίνεται ότι έχει μεγαλύτερη αξιοπιστία ως προγνωστικός παράγοντας [214, 217-221].

Bcl-2: Από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της απόπτωσης είναι τα μέλη της οικογένειας Bcl-2. Στους υψηλής κακοηθείας όγκους του μαστού παρατηρείται αυξημένος ρυθμός απόπτωσης, ο οποίος αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα [222, 223]. Η Bcl2 συχνά υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού και συχνά σχετίζεται με κακή πρόγνωση και μειωμένη ανταπόκριση στην κυτταροτοξική θεραπεία [224-226]. Ωστόσο, σε κάποιες μελέτες έχει βρεθεί και συσχέτιση της έκφρασης της Bcl-2 με καλή πρόγνωση [227, 228]. Υπάρχουν επίσης δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η έκφραση του Bcl-2 μπορεί να προβλέπει καλή θεραπευτική ανταπόκριση. Έχει προταθεί ότι η απώλεια έκφρασης μιας αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης όπως είναι η Bcl-2 σε όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας, καθώς και η θετική συσχέτιση της Bcl-2 με λιγότερο επιθετικούς όγκους μαστού, οφείλεται

πιθανά στη σχέση της Bcl-2 με την διαφοροποίηση και όχι στην αντι-αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης αυτής. Η έκφρασή της έχει αναφερθεί επίσης ότι σχετίζεται με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, μικρό μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου και με χαμηλό βαθμό κακοηθείας [229]. Πιθανολογείται ότι τα αντιοιστρογόνα ελαττώνουν την έκφραση της Bcl-2 στα νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία έτσι οδηγούνται σε απόπτωση. Αντίθετα, δεν έχει διαπιστωθεί η προγνωστική αξία της Bcl-2 σε καρκίνο του μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες [230].

Ki-67 και κλάσμα DNA στην S-φάση: Ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθορίζεται με την μέτρηση των μιτώσεων [231-233], ή με τον ανοσοϊστοχημικό δείκτη Ki-67 [234-239], ή με τον καθορισμό του κλάσματος DNA που βρίσκεται στην S-φάση με κυτταρομετρία ροής [240], και αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα [241-244]. Το ποσοστό του Ki-67 θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στην αξιολόγηση του βαθμού κακοήθειας του όγκου, και συμμετέχει στη μοριακή ταξινόμηση των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού (βλέπε και 1.1.4.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού).

1.2 ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΩΝ

1.2.1 Βιολογία του Συστήματος των Ενδοθηλινών

1.2.1.1 Οι Ενδοθηλίνες

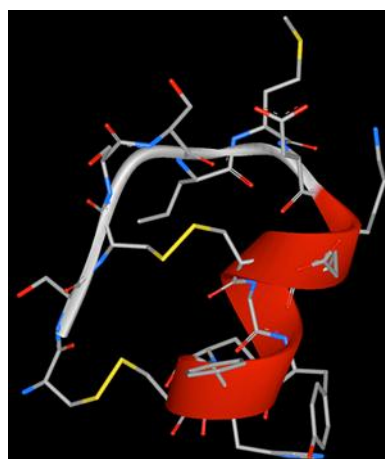
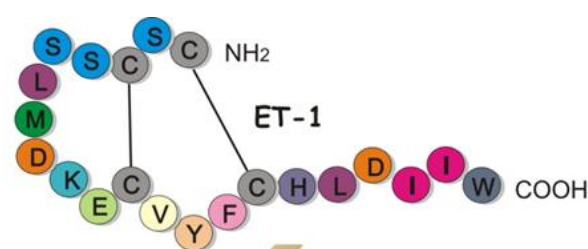
Το ενδοθήλιο είναι μια ιδιαίτερα ενεργή πηγή αγγειοδραστικών ουσιών και μείζων ρυθμιστής του αγγειακού τόνου. Στις αγγειοσυσταλτικές ουσίες του ενδοθηλίου περιλαμβάνεται και η οικογένεια των ενδοθηλινών και κυρίως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1).

Ο ισχυρότατος αυτός ενδογενής αγγειοσυσταλτικός παράγοντας απομονώθηκε το 1988 από τον Yanagisawa και συν [245]. Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές της ενδοθηλίνης που ορίζονται ως ET-1, ET-2 και ET-3 και δυο υπότυποι υποδοχέων τους, οι ET_AR και ET_BR.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα έχει τρία ξεχωριστά γονίδια ενδοθηλίνης (ET) σε διαφορετικά χρωμοσώματα που κωδικοποιούν τις συναφείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες ET-1, ET-2 και ET-3 [246]. Το γονίδιο της ET-1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 6, ενώ το 2^ο εξόνιο αυτού κωδικοποιεί τη λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης [247]. Και οι τρεις ενδοθηλίνες αποτελούνται από 21 αμινοξέα και περιέχουν δυο δισουλφιδικούς δεσμούς στις θέσεις 1-15 και 3-11. Η ET-1 (Εικόνα 1.9) είναι η κύρια βιοδραστική πρωτεΐνη και οι ET-2 και ET-3 διαφέρουν από την ET-1 κατά δυο και έξι αμινοξέα αντίστοιχα [248].

Τα πεπτίδια των ET παράγονται στο κύτταρο ως μεγάλες πρόδρομες πολυπεπτιδικές αλυσίδες 212 αμινοξέων, που ονομάζονται προ-προενδοθηλίνες. Τα πρόδρομα αυτά πρωτεϊνικά μόρια μετατρέπονται από μια ουδέτερη ενδοπεπτιδάση με

πρωτεολυτική δράση, και σχηματίζουν ένα ανενεργό πρόδρομο μόριο, την προενδοθηλίνη, η οποία τελικά μετατρέπεται σε ενεργό πεπτίδιο από το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης, ECE (Endothelin Converting Enzyme) [249]. Σήμερα, γνωρίζουμε πως υπάρχουν 7 ισομορφές του ECE [250]. Επιπλέον των πρωτεασών αυτών, φαίνεται ότι και άλλα ένζυμα, όπως η non-ECE μεταλλοπρωτεϊνάση, συνεισφέρουν στο τελευταίο βήμα πρωτεϊνοσύνθεσης [251].



Εικόνα 1.9. Το μόριο της Ενδοθηλίνης – 1 σε δισδιάστατη και τρισδιάστατη δομή

Η ET – 1 συντίθεται κυρίως στο ενδοθήλιο των αγγείων ώστε να επιδράσει στις υποκείμενες λείες μυϊκές ίνες, όμως η έκκρισή της έχει ανιχνευτεί και σε άλλους ιστούς και κύτταρα, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα του αεραγωγού, τα μακροφάγα, τους ινοβλάστες, τα καρδιακά μυοκύτταρα, τους νευρώνες του εγκεφάλου και τα νησίδια του παγκρέατος [252, 253]. Η ET -2 από την άλλη, εκφράζεται στις ωοθήκες και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν εμπλοκή της στην κυψελιδοποίηση του πνεύμονα, την θερμορρύθμιση, την ωορρηξία, την ομοιόσταση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, και πιθανώς και τις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου [253]. Τέλος, η ET -3 ανιχνεύεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τους νευρώνες του εγκεφάλου, τα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σπειραμάτων και του εντέρου, και ενεργεί ως μεσολαβητής στην έκκριση

αγγειοδιασταλτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένου του NO και της προστακυκλίνης [249].

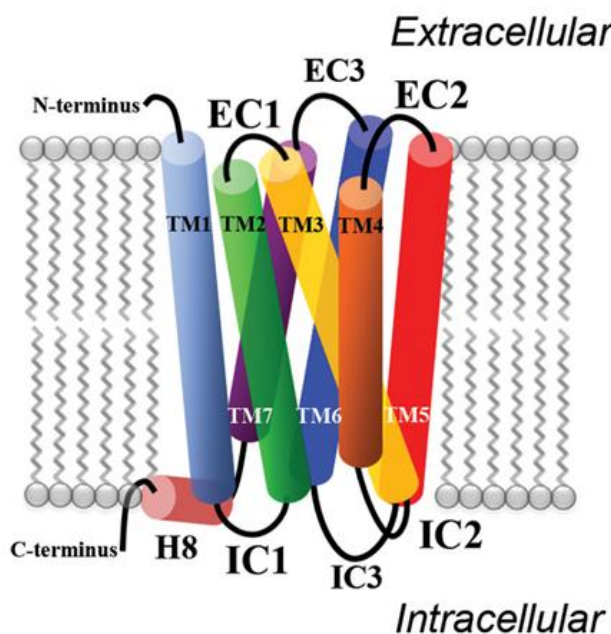
Υπάρχουν ποικίλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκκριση της ET -1, είτε επαγωγικά είτε ανασταλτικά. Ο υποκινητής του γονιδίου έχει τυπικές ακολουθίες CAAT και TATA (σημείο εκκίνησης), καθώς και διάφορα σημεία σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων (transcriptional factors), όπως η GATA-2 πρωτεΐνη, η AP-1 καθώς και σειρά άλλων ουσιών που παίζουν ρόλο είτε στη μεταγραφή του γονιδίου, είτε στη σίγασή του. Ως παράγοντες που ενισχύουν τη μεταγραφή έχουν χαρακτηριστεί η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β), ο Transforming Necrosis Factor α (TNFα), ο Transforming Growth Factor β (TGF β), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), η βαζοπρεσίνη, η ισχαιμία και η τάση (Shear Stress), ενώ ανασταλτικοί έχουν χαρακτηριστεί το Οξίδιο του Αζώτου, η προστακυκλίνη και ο κολπικός νατριουρητικός παράγοντας [248, 254].

Τα συνήθη επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα είναι από 1-10 pmol/L, χαμηλότερα από αυτά που απαιτούνται ώστε να επιτευχθεί αγγειοσύσπαση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ET-1 στον άνθρωπο είναι περίπου 90 δευτερόλεπτα ενώ αυτός της προενδοθηλίνης (Big-ET-1) περίπου 20 λεπτά. Η ET-1 του ορού απομακρύνεται από την κυκλοφορία σε ποσοστό 80-90%, κατά τη διάρκεια του πρώτου περάσματος της από τους πνεύμονες (βλέπε και 1.2.1.2 Οι υποδοχείς των ενδοθηλινών και η κάθαρση της ενδοθηλίνης) [255].

1.2.1.2 Οι υποδοχείς των ενδοθηλινών και η κάθαρση της ενδοθηλίνης

Οι ETs είναι υδρόφιλες πρωτεΐνες και συνεπώς ανίκανες να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Για να εξασκήσουν τη δράση τους πρέπει να προσδεθούν σε

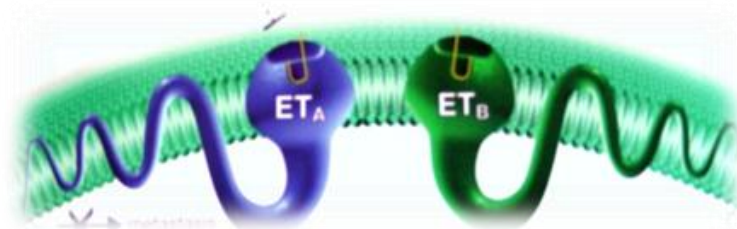
διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Εικόνα 1.10), η έκφραση των οποίων ρυθμίζει την κυτταρική απάντηση. Υπάρχουν δυο τύποι δεσμευμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων, οι ET_AR και οι ET_BR (Εικόνα 1.11) [256-258], των οποίων η κατανομή στους διάφορους ιστούς ποικίλλει.



Εικόνα 1.10. Διαμεμβρανικός υποδοχέας

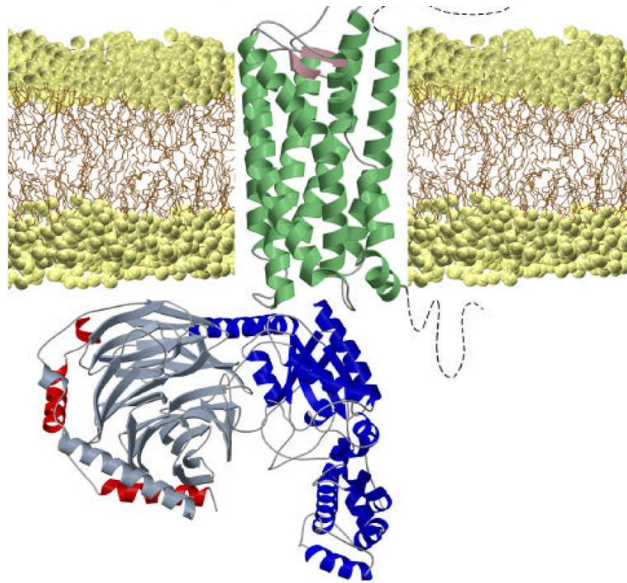
Ο ανθρώπινος ET_A υποδοχέας αποτελείται από 427 αμινοξέα και συνδέεται με τις ET με διαφορετικό βαθμό εκλεκτικότητας: ET-1>ET-2>ET-3. Ο ET_BR αποτελείται από 442 αμινοξέα και συνδέεται με τις ETs με την ίδια συγγένεια. Το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 45.000 έως 50.000 daltons σε διάφορους ιστούς και η σύνθεσή τους είναι ίδια κατά 50% περίπου, ενώ έχει διατηρηθεί σε υψηλό ποσοστό (85-90%), κατά την εξέλιξη των περισσότερων θηλαστικών [259]. Οι υποδοχείς ET_A και ET_B ανήκουν στην οικογένεια των διαμεμβρανικών GPC υποδοχέων, των συνδεόμενων δηλαδή με την πρωτεΐνη G (Guanine- nucleotide binding protein). Αποτελούνται από 7 υδρόφοβες περιοχές, αυτές που διασχίζουν τη

μεμβράνη (transmembrane sites, TMS), ένα εξωκυττάριο τμήμα - το συνδεδεμένο με την ET-1, και ένα ενδοκυττάριο, που συνδέεται με την G πρωτεΐνη [260, 261].



Εικόνα 1.11. Οι υποδοχείς της ενδοθηλίνης

Οι ίδιες οι G πρωτεΐνες αποτελούν ετεροτριμερή (απαρτίζονται από 3 διαφορετικές υπομονάδες α , β και γ) (Εικόνα 1.12). Η υπομονάδα α ανευρίσκεται με 4 ισομορφές: G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_q} και $G_{\alpha_{12}}$. Η σύνδεση καθεμιάς από αυτές οδηγεί και σε διαφορετικό κυτταρικό μονοπάτι. Ειδικότερα, η σύνδεση της G_{α_s} ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (cAMP), ενώ της G_{α_i} την αναστέλλει και ενεργοποιεί τους διαύλους Ca^{2+} . Η σύνδεση της G_{α_q} οδηγεί σε υδρόλυση (ενεργοποίηση) της φωσφολιπάσης C, η οποία καταλύει την παραγωγή, από φωσφολιπίδια της μεμβράνης (διφωσφορική φωσφατιδιλοϊνοσιτόλη PIP_2), διακετυλογλυκερόλης και 1,4,5- τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3). Η IP_3 κινητοποιεί ιόντα Ca^{2+} από κυτταροπλασματικές αποθήκες ενώ η διακετυλογλυκερόλη, μαζί με ιόντα Ca^{2+} , ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C [262]. Επίσης, η σύνδεση των G_{α_q} και $G_{\alpha_{12}}$ παίζει ρόλο στην δράση πολλών ενδοκυττάρων αγγελιοφόρων μορίων, όπως η ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (mitogen-activated protein kinase MAPK) [263].



Εικόνα 1.12. Η G πρωτεΐνη συνδεδεμένη με τον GPC διαμεμβρανικό υποδοχέα (οι 3 υπομονάδες σημαίνονται με κόκκινο, γκρι και μπλε χρώμα).

Ο ET_A R θεωρείται πως διαμεσολαβεί στη σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ενεργοποίησή του ET_B R επιφέρει περιορισμένη αγγειοδιαστολή μέσω της απελευθέρωσης αγγειοδιασταλτικών παραγόντων [264], και αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [253]. Τέλος, όταν η ET-1 συνδέεται στους υποδοχείς της, έχει μεγάλη διάρκεια δράσης λόγω της σχεδόν μη αντιστρεπτής σύνδεσής της [252].

Η κάθαρση της ET-1 επιτελείται είτε μέσω φαγοκυττάρωσης και αποικοδόμησης με τη μεσολάβηση του ET_B R, είτε από το ένζυμο Νεπριλυσίνη (NEP), η οποία αναφέρεται και ως ουδέτερη ενδοπεπτιδάση 24.11, EC 3.3.24.11, Αντιγόνο της Κοινής Οξείας Λεμφοκυτταρικής Λευχαιμίας (CALLA) ή CD 10 [265-267]. Η κάθαρση μέσω του υποδοχέα ET_B R είναι ιδιαίτερα σημαντική στους πνεύμονες, όπου και επιτελείται το 80% της κάθαρσης της ET-1 [268].

1.2.1.3 Οι δράσεις των ενδοθηλινών

Οι ενδοθηλίνες θεωρούνται ρυθμιστές που εκφράζονται σε απάντηση στο στρες, δρουν με παρακρινή ή αυτοκρινή τρόπο και έχουν και ωφέλιμες αλλά και επιβλαβείς δράσεις [249]. Οι φυσιολογικές δράσεις των ενδοθηλινών ποικίλουν ευρέως [252]. Στο καρδιαγγειακό σύστημα, μέσω ενεργοποίησης των ET_A υποδοχέων, η ενδοθηλίνη έχει ένα «βασικό» (τονικό) αγγειοσυσταλτικό ρόλο και συνεισφέρει στην ανάπτυξη της αγγειακής νόσου λόγω υπέρτασης, και στην αθηροσκλήρωση [269, 270]. Οι ενδοθηλίνες επίσης συνεισφέρουν στη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου [271], την αρρυθμογένεση και την αναδόμηση του μυοκαρδίου που συμβαίνει στην συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια [272, 273]. Στους πνεύμονες, το σύστημα των ενδοθηλινών ρυθμίζει τον βρογχικό τόνο [274] και τον πολλαπλασιασμό των πνευμονικών αιμοφόρων αγγείων, προάγοντας έτσι την ανάπτυξη της πνευμονικής υπέρτασης [275]. Επίσης, η ενδοθηλίνη ελέγχει την έκκριση ύδατος και νατρίου και την οξεοβασική ισορροπία στο νεφρό υπό φυσιολογικές συνθήκες [276], και επιταχύνει την ανάπτυξη νεφροσκλήρυνσης [277-279]. Στον εγκέφαλο, το σύστημα των ενδοθηλινών επηρεάζει τα καρδιοαναπνευστικά κέντρα και την έκκριση ορμονών και συνεισφέρει στην εξέλιξη των αναπτυσσόμενων νευρώνων του συμπαθητικού [249]. Επιπρόσθετα, οι ενδοθηλίνες επηρεάζουν τη φυσιολογία και παθοφυσιολογία του ανοσοποιητικού συστήματος, του ήπατος, των μυών, των οστών, του δέρματος, του προστάτη, του λιπώδους ιστού και εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης [253].

1.2.2 Το Σύστημα των Ενδοθηλινών στις Παθήσεις του Ανθρώπου

Υπέρταση και αγγειακή νόσος

Η ταυτοποίηση της ενδοθηλίνης ως αγγειοσυσταλτικής ουσίας και η ανακάλυψη της έκκρισής της από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα υπέδειξαν ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεση της υπέρτασης και της αγγειακής νόσου [280]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε περαιτέρω από αναφορές περιστατικών ασθενών με αιμαγγειοθηλώμα οι οποίοι εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα και υπέρταση. Τα αυξημένα αυτά επίπεδα της ET-1 και η αυξημένη αρτηριακή πίεση επέστρεφαν εντός φυσιολογικών ορίων μετά την εκτομή του όγκου [281]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα επίπεδα της ET-1 εμφανίζονται γενικά εντός φυσιολογικών ορίων σε ασθενείς με πρωτοπαθή υπέρταση. Παρ' όλα αυτά, τα τοπικά επίπεδα της ET-1 αυξάνονται στο αγγειακό τοίχωμα σε ασθενείς με υπέρταση [282].

Τη δεκαετία του 1990, ερευνήθηκε εκτενώς ο ρόλος της ενδοθηλίνης σε πειραματικά μοντέλα υπέρτασης λόγω υψηλών επιπέδων αγγειοτενσίνης II ή αλάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρές αντιυπερτασικές επιδράσεις των ανταγωνιστών των υποδοχέων ενδοθηλίνης [270, 282-285]. Η έκφραση της ενδοθηλίνης επίσης αυξάνεται στην αθηροσκληρωτική πλάκα των ανθρώπινων στεφανιαίων αγγείων [286] και έχει προταθεί ορισμένες φορές η εμπλοκή της στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης, καθώς παρατηρήθηκε αναστολή του σχηματισμού της αθηροσκληρωτικής πλάκας μετά την αναστολή της οδού αυτής σε ζωικά μοντέλα [287-289]. Επιπρόσθετα, η οξεία αναστολή των ET_A υποδοχέων βρέθηκε ότι βελτιώνει την μυοκαρδιακή ισχαιμία και τις βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται από έμφραγμα του μυοκαρδίου σε ποντίκια με στεφανιαία νόσο [290]. Πράγματι, η ενδοθηλίνη έχει ισχυρή αυξητική δράση στο αγγειακό τοίχωμα, και τόσο οι

ενδοθηλίνες όσο και οι υποδοχείς τους εκφράζονται στα μακροφάγα, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και τους ινοβλάστες [268]. Μια κοινή παρατήρηση σε σχεδόν όλες τις μελέτες που διερεύνησαν τον αποκλεισμό των υποδοχέων ενδοθηλίνης και την αγγειακή λειτουργία σε ζωικά μοντέλα υπέρτασης, υπερχοληστερολαιμίας ή αθηροσκλήρωσης ήταν ότι η χρόνια αγωγή με ανταγωνιστές ET_A R σχετιζόταν με βελτιωμένη, ενδοθηλινο-εξαρτώμενη και μεσολαβούμενη από το NO αγγειοδιαστολή [269]. Η βελτίωση αυτή της αγγειοδιαστολής μετά από αποκλεισμό των ET_A R έχει επίσης παρατηρηθεί και σε κλινικές μελέτες και μπορεί να ανασταλεί με τη χορήγηση ET_B R ανταγωνιστών [291].

Ταυτόχρονα, τα προκλινικά δεδομένα σχετικά με την υπέρταση έχουν υπερτονιστεί από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους με πρωτοπαθή υπέρταση. Πράγματι, η θεραπευτική χορήγηση είτε του μη εκλεκτικού ανταγωνιστή των υποδοχέων της ET bosentan [292] είτε του εκλεκτικού ET_A R ανταγωνιστή darusentan [293, 294] μειώνει την αρτηριακή πίεση σε ασθενείς με πρωτοπαθή ή ανθεκτική πρωτοπαθή υπέρταση. Προς το παρόν δεν είναι σαφές εάν οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές προσφέρουν κάποιο πλεονέκτημα έναντι των μη εκλεκτικών σκευασμάτων. Η εκλεκτικότητα φαίνεται να είναι ένα ζήτημα μεγάλης σημασίας, καθώς ο αποκλεισμός των ET_B υποδοχέων, οι οποίοι επάγουν την αγγειοδιαστολή, μπορεί να εξασθενήσει την μείωση της πίεσης και να παρέμβει στην εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή [295].

Στο πλαίσιο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι η εκλεκτικότητα και η ειδικότητα των φαρμάκων μπορεί να εξαρτάται από το είδος της ανάλυσης αλλά και των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της εκλεκτικότητας. Οι περισσότερες πρόσφατες σχετικές μελέτες υποδεικνύουν ότι τα προφίλ εκλεκτικότητας των ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης από διάφορες

φαρμακευτικές εταιρίες διαφέρουν σημαντικά από την δημοσιευμένη βιβλιογραφία, προφανώς με βάση το αν χρησιμοποιούνται ανθρώπινα ή ζωικά κύτταρα [296]. Η διαφοροποίηση αυτή επιβάλλει προσοχή κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων πειραματικών μελετών που εξετάζουν την εκλεκτικότητα μεμονωμένων συστατικών.

Πρόσφατα, το *darusentan* αποδείχθηκε ότι είναι δραστικό στην θεραπεία της ανθεκτικής υπέρτασης, μειώνοντας την πίεση, όταν χορηγείται επιπλέον τριπλής αντιυπερτασικής θεραπείας, στην οποία συμπεριλαμβάνεται και διουρητικό [293]. Η ανθεκτική υπέρταση παρατηρείται συχνά στους Αφροαμερικανούς ή σε παχύσαρκους ασθενείς, οι οποίοι έχουν αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής και νεφρικής νόσου και εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα [297, 298]. Απαιτούνται κλινικές μελέτες με μεγάλο χρονικό ορίζοντα ώστε να καθοριστεί τελικά αν η θεραπεία με *darusentan* ή άλλους ανταγωνιστές υποδοχέων των ενδοθηλινών έχει την ικανότητα να μειώσει την θνητότητα και τη νοσηρότητα στους ασθενείς αυτούς, μέσω της προστασίας των οργάνων – στόχων από την αυξημένη αρτηριακή πίεση [299, 300].

Πνευμονική Υπέρταση

Τόσο οι πνεύμονες όσο και η καρδιά είναι σημαντικές πηγές της ET-1 αλλά και στόχοι της δράσης της. Ασθενείς με πνευμονική υπέρταση εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ET-1 στις πνευμονικές αρτηρίες έναντι των πνευμονικών φλεβών, υποδηλώνοντας ότι είτε υπάρχει αυξημένη παραγωγή είτε μειωμένη κάθαρση της ET-1 στους πνεύμονες [249]. Στο πνευμονικό αγγειακό δένδρο, Η ET-1 επάγει εξαρτώμενη από τον ET_AR αγγειοσυστολή, και ίσως δρα ως ισχυρός αυξητικός παράγοντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των λείων μυϊκών ινών των πνευμονικών αρτηριών [275]. Η επίδραση αυτή είναι πολύ πιθανό να είναι ένας από τους σημαντικούς παράγοντες που συνεισφέρουν στην ωφέλιμη επίδραση του

αποκλεισμού των υποδοχέων των ενδοθηλινών σε βάθος χρόνου, επεμβαίνοντας στην ανακατασκευή των πνευμονικών αγγείων [301]. Η δραστικότητα τόσο των εκλεκτικών ET_A ανταγωνιστών όσο και του μη εκλεκτικού αποκλειστή bosentan έχει αποδειχθεί με την μείωση της αρτηριακής πίεσης στους πνεύμονες, τη μείωση της υπερτροφίας της δεξιάς κοιλίας και τη μείωση της αναδόμησης των πνευμονικών αρτηριών σε διάφορα πειραματικά μοντέλα [301-303]. Αντίθετα, οι εκλεκτικοί ανταγωνιστές των ET_BR που χορηγήθηκαν σε πειραματόζωα με πνευμονική υπέρταση αύξησαν την πνευμονική αγγειακή αντίσταση και πίεση [249]. Αυτό υποδεικνύει ότι ο εκλεκτικός ανταγωνισμός των ET_AR θα μπορούσε να είναι πλεονεκτικός στη θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης.

Τα τελευταία δέκα και πλέον χρόνια, πολλοί ερευνητές μελέτησαν εκτενώς την πνευμονική υπέρταση ως κλινικό στόχο για τον ανταγωνισμό υποδοχέων των ενδοθηλινών, και οι πρώτες τυχαιοποιημένες μελέτες έδειξαν σαφή οφέλη αναφορικά με την μείωση των συμπτωμάτων και την ποιότητα ζωής σε σύγκριση με εικονικό φάρμακο [304, 305]. Το 2002, το bosentan ήταν ο πρώτος ανταγωνιστής υποδοχέων ενδοθηλίνης που έλαβε έγκριση από τον FDA για χρήση στη θεραπεία ασθενών με πνευμονική υπέρταση. Η έγκριση αυτή αποτέλεσε ορόσημο για τη θεραπεία της νόσου, καθώς η πνευμονική αρτηριακή υπέρταση είναι μια σοβαρή νόσος με δυσμενή πρόγνωση και απαντάται συχνά σε ασθενείς με νοσήματα του συνδετικού ιστού, καρδιακή ανεπάρκεια ή λοίμωξη HIV. Εν τω μεταξύ, διάφοροι άλλοι ανταγωνιστές των υποδοχέων των ενδοθηλινών αναπτύχθηκαν και εγκρίθηκαν από τον FDA και άλλες υπηρεσίες έγκρισης παγκόσμια για την θεραπεία της πνευμονικής υπέρτασης, συμπεριλαμβανομένων και εκλεκτικών ET_AR ανταγωνιστών όπως το ambrisentan και το sitaxsentan. Το ambrisentan είναι ένα σύμπλοκο που βασίζεται στο προπιονικό οξύ, ενώ το sitaxsentan ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμίδων.

Στο σημείο αυτό, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι ακόμα εξακριβωμένο εάν ο εκλεκτικός ανταγωνισμός υπερτερεί του μη εκλεκτικού όσον αφορά την κλινική βελτίωση, τις ανεπιθύμητες ενέργειες ή την επιβίωση σε ασθενή με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, και το ίδιο ερώτημα ισχύει και για τις δυο κατηγορίες ανταγωνιστών (προπιονικό οξύ – σουλφοναμίδες). Χρειάζονται κλινικές μελέτες που θα διερευνήσουν τα ερωτήματα αυτά, ενώ υπάρχουν σε εξέλιξη και δοκιμές που συνδυάζουν τον ανταγωνισμό υποδοχέων ενδοθηλίνης με άλλα αγγειοδιασταλτικά των πνευμονικών αγγείων όπως η σιλδεναφίλη και η προστακυκλίνη [306].

Μια πρώτη τέτοια μελέτη έδειξε ότι το bosentan, χορηγούμενο μόνο του υπερτερεί συγκριτικά με την συνδυασμένη χορήγησή του με προστακυκλίνη σε ασθενείς με πνευμονική υπέρταση και ηπατική κίρρωση [307]. Τέλος, νέες θεραπευτικές επιλογές, όπως η χορήγηση ανταγωνιστών ETRs μέσω αερολύματος, φαίνεται να είναι εξίσου δραστικές και με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες [308]. Διαφαίνεται λοιπόν ότι η θεραπεία ασθενών με πνευμονική αρτηριακή υπέρταση με ανταγωνιστές υποδοχέων ενδοθηλίνης θα επικρατήσει στο μέλλον και θα προσφέρει μεγαλύτερη επιβίωση και ποιότητα ζωής στους ασθενείς αυτούς.

Καρδιακή Ανεπάρκεια

Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι μια παθολογική κατάσταση με μεγάλη θνησιμότητα και ένα μεγάλο εύρος αιτιοπαθογενετικών παραγόντων, όπως η υπέρταση και η στεφανιαία νόσος. Στην καρδιά, το σύστημα των ενδοθηλινών συνεισφέρει τόσο στην φυσιολογία της καρδιάς όσο και στην παθοφυσιολογία της [303, 309]. Σε μια υγιή καρδιά, οι ενδοθηλίνες έχουν ινότροπη, χρονότροπη και αρρυθμογόνο δράση, ενώ συνεισφέρουν και στην συσταλτική λειτουργία των καρδιακών μυϊκών κυττάρων. Πρώιμες μελέτες έδειξαν ότι η εξασθένιση της

λειτουργίας της καρδιάς έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης ET-1 ή Big ET-1 στην συστηματική κυκλοφορία, τα οποία αποτελούν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες της επιβίωσης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [310, 311]. Τα αυξημένα επίπεδα της ET-1 θεωρήθηκε ότι προέρχονται από την πνευμονική συμφόρηση, η οποία παραβλάπτει την καθαριστική ικανότητα του πνεύμονα [312].

Ο ρόλος των ενδοθηλινών στην μετεμφραγματική περίοδο παραμένει αμφιλεγόμενος. Παρά το γεγονός ότι αρκετές πειραματικές μελέτες έδειξαν όφελος από τον χρόνιο αποκλεισμό των υποδοχέων των ενδοθηλινών όσον αφορά την επιβίωση και την αναδόμηση της αριστερής κοιλίας μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, τη στιγμή αυτή δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν κάποιο προστατευτικό ρόλο της χρήσης ανταγωνιστών των ETRs για το μυοκάρδιο σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια [313, 314]. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί ότι σε όλες σχεδόν τις πειραματικές μελέτες, η θεραπεία ξεκίνησε πριν ή αμέσως μετά την έμφραξη των στεφανιαίων αγγείων των υπό μελέτη πειραματόζωων, δηλαδή σε καρδιά με ανεπάρκεια. Επίσης, η θεραπεία χορηγήθηκε σε πειραματόζωα τα οποία δεν είχαν καμία προηγούμενη βλάβη στα στεφανιαία αγγεία, στα οποία όμως παρουσιάζουν βλάβες πολλοί ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Γενικά, υπάρχει ένδεια μελετών που να αντιστοιχούν στην κλινική πράξη.

Μελέτες σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια έδειξαν ότι η χορήγηση του μη εκλεκτικού ανταγωνιστή bosentan για 2 εβδομάδες οδήγησε σε μείωση της πνευμονικής και συστηματικής αρτηριακής πίεσης, μείωση των πνευμονικών και συστηματικών αντιστάσεων κατά 10-30% και αύξηση του καρδιακού δείκτη κατά 13% [315]. Παρόμοιες επιδράσεις παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που έλαβαν εκλεκτικό ανταγωνιστή των ET_A υποδοχέων, όπου η θεραπεία είχε ως αποτέλεσμα μειωμένες

αρτηριακές και πνευμονικές πιέσεις, μειωμένες συστηματικές αλλά όχι πνευμονικές αντιστάσεις και αύξηση του καρδιακού δείκτη.

Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα από τις πρώτες μελέτες ήταν ενθαρρυντικά, όλες οι μακροχρόνιες κλινικές μελέτες που διερεύνησαν την χρόνια θεραπεία με ανταγωνιστές υποδοχέων ενδοθηλίνης σε ασθενείς με χρόνια ή οξεία καρδιακή ανεπάρκεια ήταν αρνητικές χωρίς καμία εξαίρεση. Στις μελέτες αυτές συμπεριλαμβάνονται η ENABLE (Bosentan), η HEAT-CHF (darusentan), η EARTH (darusentan), η ENCOR (entrasentan) και οι RITZ-1 έως RITZ-4 (tezosentan) [306]. Ένα κοινό πρόβλημα είναι το γεγονός ότι δεν δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα από όλες τις παραπάνω μελέτες, και όσα δημοσιεύθηκαν δεν περιείχαν ολοκληρωμένα στοιχεία, με συνέπεια η επιστημονική κοινότητα να μην έχει πλήρη πρόσβαση σε δεδομένα και αποτελέσματα. Επιπλέον, λόγω των περιορισμών του FDA, οι ασθενείς έπρεπε να λαμβάνουν τον ανταγωνιστή των υποδοχέων ενδοθηλίνης επιπρόσθετα της θεραπείας που μέχρι στιγμής ελάμβαναν, πράγμα το οποίο μπορεί να συνετέλεσε στην καταγραφή απογοητευτικών αποτελεσμάτων. Είναι επίσης πιθανό, συγκεκριμένες προδιαθεσικές παθολογικές καταστάσεις στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, όπως λ.χ. το περιφερικό οίδημα, που παρατηρείται συχνά σαν ανεπιθύμητη ενέργεια κατά τη λήψη ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης, να καθόρισε σημαντικά την πορεία της μελέτης και την επιτυχία ή αποτυχία της θεραπείας. Ακόμη, οι δοσολογίες των φαρμάκων σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια μπορεί να είναι ένα μεγάλο πρόβλημα, ειδικά σε αυτούς με δεξιά καρδιακή ανεπάρκεια και δευτεροπαθή ηπατική συμφόρηση. Μέχρι τα υπάρχοντα δεδομένα να αναλυθούν και να δημοσιευθούν στο σύνολό τους, δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το αν οι ανταγωνιστές των ενδοθηλινών συγχρησιμοποιούνται με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ή

αναστολείς του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II αποτελούν ένα δραστικό συνδυασμό για συγκεκριμένους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Επιπρόσθετα, λόγω κυρίως των ισχυρότων περιορισμών του FDA, οι οποίοι σε κάθε περίπτωση τείνουν να αποφεύγουν την έκθεση ασθενών, είναι δύσκολο να σχεδιαστούν και να εκπονηθούν οι κατάλληλες μελέτες που θα αξιολογήσουν την χρησιμότητα των ανταγωνιστών των ενδοθηλινών στη νόσο αυτή. Συμπεραίνεται ότι ότι δύσκολα η καρδιακή ανεπάρκεια θα αποτελέσει άλλη μια ένδειξη για χορήγηση των ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης, εκλεκτικών ή μη, στο εγγύς μέλλον [316, 317].

Νεφρική νόσος, Διαβήτης και Παχυσαρκία

Όλοι οι παράγοντες του συστήματος των ενδοθηλινών εκφράζονται στο νεφρό και εμπλέκονται στην ρύθμιση της αιματικής ροής, την επαναρρόφησης ύδατος και νατρίου και την οξεοβασική ισορροπία [276, 318]. Το νεφρικό αγγειακό δίκτυο είναι ένα από τα πιο ευαίσθητα αγγειακά υποστρώματα, και συστέλλεται σε παρουσία ενδοθηλίνης σε συγκεντρώσεις της τάξης pmol, που φαίνεται να μεσολαβείται κυρίως από τους ET_A υποδοχείς [319]. Η ενδοθηλίνη στο νεφρό έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη αλατοεξαρτώμενης υπέρτασης, η οποία μπορεί να εμπλέκει τόσο φλεγμονώδη NOS (iNOS), τα οποία εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο νεφρό, όσο και τον ET_B υποδοχέα [320, 321].

Πράγματι, αναστολή του συστήματος των ενδοθηλινών με έναν εκλεκτικό ανταγωνιστή των ET_A υποδοχέων, σε πειραματόζωα με γενετική αλατοεξαρτώμενη υπέρταση αυξάνει την ασυνήθιστα χαμηλή ενεργότητα της συνθάσης του NO στο νεφρό και μειώνει σημαντικά την αύξηση της αρτηριακής πίεσης κατά τη χορήγηση άλατος [322, 323]. Πιο πρόσφατες μελέτες επίσης υποδεικνύουν ότι τα NOS επάγουν

την εξαρτώμενη από ET-1 αύξηση της πίεσης και την απέκκριση νατρίου στο νεφρώνα [324]. Κατά περίεργο τρόπο, η έλλειψη ενδοθηλίνης στους νεφρώνες είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της αύξησης της ενεργότητας και των 3 ισομορφών του NOS στον έσω μυελό σε απάντηση στη φόρτιση με νάτριο [324, 325]. Επίσης, γενετική έλλειψη του ET_BR οδηγεί σε νατριοεξαρτώμενη υπέρταση που μπορεί να αντιμετωπισθεί με αποκλεισμό των διαύλων νατρίου με αμιλορίδη [321, 326]. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι η ευαισθησία στο άλας, ένα συχνό εύρημα σε ασθενείς με ανθεκτική υπέρταση, έχει πολλούς υποκείμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και μπορεί να είναι εν μέρει αντιμετωπίσιμη με τους ανταγωνιστές των υποδοχέων ενδοθηλίνης.

Διάφοροι ερευνητές κατά την δεκαετία του 1990 απέδειξαν ότι το σύστημα των ενδοθηλινών συνεισφέρει στις παθολογοανατομικές αλλαγές που οδηγούν στην σπειραματοσκλήρυνση σε μοντέλα υπέρτασης ή νεφρεκτομής [327, 328]. Οι ευνοϊκές για τη σκλήρυνση επιδράσεις της ενδοθηλίνης στο νεφρό επιβεβαιώθηκαν με ένα μοντέλο υπερέκφρασης της ανθρώπινης ET-1 σε ποντίκια, τα οποία στη συνέχεια ανέπτυξαν σπειραματοσκλήρυνση ακόμα και απουσία υπέρτασης [278]. Ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών μελετών επικεντρώθηκε στην επίδραση του χρόνιου αποκλεισμού των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στην εξέλιξη της σπειραματοσκλήρυνσης λόγω υπέρτασης, υφολικής νεφρεκτομής, χρόνιας ανεπάρκειας νιτρικού οξέος, διαβητικής νεφροπάθειας και εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης [279, 327, 329]. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες βρήκαν σημαντικές νεφροπροστατευτικές επιδράσεις που ήταν ή εν μέρει ή εντελώς ανεξάρτητες από την συστηματική αρτηριακή πίεση [246, 327, 328, 330-332]. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η ενδοθηλίνη συμβάλλει στη σπειραματική βλάβη μετά την βλάβη των ποδοκυττάρων, τα οποία σχηματίζουν τον σπειραματικό

διηθητικό φραγμό, είναι μέσω των πρωτεϊνών που επάγουν την ενδοθηλίνη στα ποδοκύτταρα, η οποία με τη σειρά της προκαλεί αναδιοργάνωση στο σκελετό ακτίνης των ποδοκυττάρων [333]. Η επίδραση αυτή μεσολαβείται από τους ET_AR και μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση εκλεκτικών ανταγωνιστών του ET_A υποδοχέα αλλά όχι με τη χορήγηση μη εκλεκτικού ανταγωνιστή [334]. Αυτό καταδεικνύει και έναν ιδιαίτερο ρόλο για τους ET_B υποδοχείς, οι οποίοι εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα ποδοκύτταρα. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από πρόσφατη μελέτη στην οποία παρατηρήθηκε ότι οι ανταγωνιστές του ET_A υποδοχέα προστατεύουν τον ορό ασθενών με πρωτεϊνουρία από την αυξανόμενη πειραματική σύνθεση ενδοθηλίνης και τον διασκορπισμό της - ειδικής για τα ποδοκύτταρα πρωτεΐνης – νεφρίνης [335].

Οι προαναφερθείσες μελέτες συνολικά υποδεικνύουν ότι η απώλεια πρωτεϊνών στο νεφρώνα, η οποία προκαλείται από τη βλάβη των ποδοκυττάρων, αλλά και την επιδεινώνει, εξαρτάται από μηχανισμούς που εξαρτώνται ή διαμεσολαβούνται, τουλάχιστον εν μέρει, από την ενδοθηλίνη. Αυτό φαίνεται να είναι ακόμα πιο σημαντικό αφού η πρωτεϊνουρία και η αλβουμινουρία είναι ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες για μελλοντικά καρδιαγγειακά συμβάματα σε ασθενείς με ή χωρίς νεφρική νόσο [329, 336].

Σχετικά λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει την επίδραση της αναστολής των υποδοχέων ενδοθηλίνης σε καταστάσεις όπου η νεφρική νόσος έχει ήδη εγκατασταθεί. Έχει μελετηθεί η αντι-πρωτεϊνουρική δράση των ανταγωνιστών των υποδοχέων ενδοθηλίνης σε φυσιολογικά ή εξαιρετικά υπερτασικά πειραματόζωα [327, 332, 337, 338]. Στις μελέτες αυτές, η θεραπεία όχι μόνο ανέστρεψε την πρωτεϊνουρία, αλλά και οδήγησε σε επούλωση των σπειραμάτων και ποδοκυττάρων που ήδη είχαν υποστεί κάποια βλάβη, υποδεικνύοντας ότι η νεφρική νόσος είναι ένα ιδιαίτερα γόνιμο έδαφος για κλινική εφαρμογή των ανταγωνιστών των υποδοχέων

ενδοθηλίνης, με ισχυρή δυναμική για αναστροφή της εγκατεστημένης νόσου [277, 332, 338, 339] .

Πράγματι, τα πρώτα αποτελέσματα από μια μικρή κλινική μελέτη με 10 διαβητικούς ασθενείς έδειξαν ότι η θεραπεία με τον εκλεκτικό ανταγωνιστή του ET_A υποδοχέα atrasentan για 12 εβδομάδες μειώνει την πρωτεϊνουρία και την αρτηριακή πίεση [340]. Παρομοίως, κατά την μελέτη ASCEND, διαπιστώθηκε μείωση της αλβουμινουρίας σε ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια στους οποίους χορηγήθηκε ένας άλλος ανταγωνιστής των ET_A υποδοχέων, το avosentan [341]. Και στις δυο μελέτες, τα αποτελέσματα ήταν τελείως ανεξάρτητα από τη συστηματική αρτηριακή πίεση. Σε πολλούς από τους ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο που συμμετείχαν στη μελέτη ASCEND παρατηρήθηκε κατακράτηση υγρών, πράγμα που οδήγησε τους ερευνητές στο να επανασχεδιάσουν το πρωτόκολλο της μελέτης και να επιλέξουν χαμηλότερες δόσεις του ανταγωνιστή. Η κατακράτηση υγρών είναι μια συχνή ανεπιθύμητη παρενέργεια, χωρίς όμως ο ακριβής παθογενετικός μηχανισμός να είναι γνωστός. Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί από τους ασθενείς που συμμετέχουν σε τέτοιες τυχαιοποιημένες μελέτες που συμπεριλαμβάνουν υπερτασικούς ή ασθενείς με διαβητική νεφροπάθεια, είναι υπέρβαροι ή παχύσαρκοι, καταστάσεις που αποδεδειγμένα σχετίζονται με κακή λειτουργία απέκκρισης νατρίου από τους νεφρούς. Έτσι, είναι πιθανόν ότι οι ανεπιθύμητες ενέργειες του ανταγωνισμού των υποδοχέων ενδοθηλίνης να εξαρτώνται περισσότερο από τη συνολική κατάσταση της υγείας του ασθενή και τις συνυπάρχουσες νόσους, παρά από την ίδια τη λήψη του σκευάσματος, παρατήρηση που ενισχύεται και από τα χαμηλά ποσοστά επίπτωσης της κατακράτησης υγρών σε ασθενείς με φυσιολογικό βάρος σώματος και νεφρική νόσο.

Τελευταία, αρκετές μελέτες επικεντρώνονται στην αξιολόγηση της αντιπρωτεϊνουργικής δράσης των ανταγωνιστών των υποδοχέων ενδοθηλίνης. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα οφέλη παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που ήδη ελάμβαναν αγωγή με αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης ή αναστολείς του υποδοχέα τύπου 1 της αγγειοτενσίνης II (AT1). Με τον τρόπο αυτό, φαίνεται ότι ο διπλός ανταγωνισμός των ET_A/AT1 υποδοχέων, ο οποίος βρίσκεται υπό αξιολόγηση σε κλινικές δοκιμές σήμερα, μπορεί να είναι μια ελκυστική επιλογή στη θεραπεία της νεφρικής νόσου στο άμεσο μέλλον.

Η παχυσαρκία, η οποία συχνά σχετίζεται με υπέρταση, είναι μια κατάσταση που συχνά συνυπάρχει με διαβήτη και/ή αντίσταση στην ινσουλίνη και οδηγεί στην ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης – αγγειοτενσίνης. Πρόσφατα κλινικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η πρωτεϊνουρία στο διαβήτη σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση του συστήματος των ενδοθηλινών [342]. Στο νεφρό, η ενεργοποίηση αυτή μεσολαβείται από την ενεργοποίηση των ET_A υποδοχέων. Ο αγγειακός τόνος που ρυθμίζεται από την ενδοθηλίνη και η μεταβολική λειτουργία είναι παθολογικά στην παχυσαρκία και τον διαβήτη [343-345]. Η ενδοθηλίνη επίσης παίζει ρόλο στην λιπογένεση και τη λιπόλυση [346], άρα ο ανταγωνισμός των υποδοχέων ενδοθηλίνης μπορεί να βρει πεδίο εφαρμογής και στην πρόληψη καρδιαγγειακών και νεφρικών επιπλοκών στους ασθενείς αυτούς, ή θα μπορούσε να είναι κατάλληλος για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και των επιπλοκών της, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η ενδοθηλίνη συνεισφέρει στον γλυκαιμικό έλεγχο και την πρόσληψη γλυκόζης καθώς και την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου I, αναδεικνύοντας τις μεταβολικές ασθένειες και την παχυσαρκία σε έναν ελκυστικό κλινικό στόχο για εφαρμογή των ανταγωνιστών υποδοχέων ενδοθηλίνης [347-350].

Αυτοάνοσα Νοσήματα και Μεταμοσχεύσεις

Σύντομα μετά την ανακάλυψή τους, οι ενδοθηλίνες παρατηρήθηκε ότι έχουν αυξητικές και προφλεγμονώδεις ιδιότητες [351, 352]. Αυτή η προφλεγμονώδης δραστικότητα μπορεί επίσης να εξηγεί το γιατί η ενδοθηλίνη εμπλέκεται στην εξέλιξη νόσων όπως η αθηροσκλήρωση, η σπειραματοσκλήρυνση και η υπερτασική αγγειακή νόσος, οι οποίες μοιράζονται κάποιο φλεγμονώδες στοιχείο [353-355]. Η ενδοθηλίνη συντίθεται από κύτταρα που διαμεσολαβούν στην ανοσολογική απάντηση όπως τα λεμφοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα, και επίσης επάγει τον σχηματισμό κυτοκινών όπως οι ιντερλευκίνες και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων – α (TNF- α) [356]. Όπως και στις κακοήθειες νεοπλασίες, το ανοσολογικό σύστημα παίζει ένα μείζονα ρόλο στην παθοφυσιολογία νοσημάτων του συνδετικού ιστού, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η συστηματική σκλήρυνση, το σκληρόδερμα, το σύνδρομο Sjogren και άλλα [357, 358]. Στα νοσήματα αυτά έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση του συστήματος των ενδοθηλινών και συχνά συνδυάζεται με την ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης [359]. Έτσι, ασθενείς με νοσήματα του συνδετικού ιστού είναι πιθανό να χρειαστούν θεραπεία με κάποιο ανταγωνιστή υποδοχέων ενδοθηλίνης σε κάποια μεταγενέστερη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ο ανταγωνισμός των υποδοχέων ενδοθηλίνης μπορεί να ανακουφίσει τους ασθενείς με νοσήματα του συνδετικού ιστού και από άλλα συμπτώματα που σχετίζονται με αγγειακές διαταραχές, όπως τα έλκη και το σύνδρομο Raynaud, ενώ υπάρχουν κλινικές μελέτες που διερευνούν αυτή ακριβώς τη δράση [360-362]. Ο ανταγωνισμός των υποδοχέων ενδοθηλίνης έχει φανεί σε ένα βαθμό αποτελεσματικός στην αντιμετώπιση συστηματικών και καρδιονεφρικών αλλαγών σε προκλινικά μοντέλα νοσημάτων του συνδετικού ιστού [363, 364], καθώς και σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως ο διαβήτης τύπου Ι. Σε ένα

πειραματικό μοντέλο, η θεραπεία με εκλεκτικό ανταγωνιστή του ET_AR σε μη παχύσαρκα ποντίκια καθυστέρησε την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου I [347].

Συνολικά, όλα τα παραπάνω στοιχεία είναι ενδεικτικά των ανοσοτροποποιητικών επιδράσεων της ενδοθηλίνης, οι οποίες υποδεικνύονται και από μελέτες σε πειραματικά μοντέλα λοιμώξεων, όπου ο αποκλεισμός των υποδοχέων ενδοθηλίνης επιδείνωσε την μεσολαβούμενη από παράσιτα φλεγμονώδη μυοκαρδιακή βλάβη, την περιτονίτιδα ή την σχετιζόμενη με φλεγμονή απομυελινωτική διαδικασία των νευραξόνων [365, 366].

Ανοσοτροποποιητικός ρόλος των ενδοθηλινών έχει παρατηρηθεί και σε διάφορα μοντέλα οξείας ή χρόνιας απόρριψης μοσχευμάτων μετά από μεταμόσχευση [367]. Ακόμα και σε απουσία συνήθους ανοσοκαταστολής, ο αποκλεισμός των ET_A υποδοχέων ήταν ικανός να αποτρέψει την αύξηση των επιπέδων TNF-α και ιντερλευκινών στην κυκλοφορία μετά από αλλομεταμόσχευση καρδιάς. Το εύρημα αυτό είναι συμβατό με ένα άμεσο ρόλο της ενδογενούς ενδοθηλίνης στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή. Έτσι, η θεραπεία με ανταγωνιστές των υποδοχέων της ενδοθηλίνης παρεμβάλλεται δραστικά στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης στο μόσχευμα ή την ανάπτυξη ίνωσης ή σπειραματοσκλήρυνσης που σχετίζεται με μεταμόσχευση ήπατος, πνευμόνων, αορτής, καρδιάς ή και νεφρού, ακόμα και χωρίς τη συνήθη ανοσοκατασταλτική θεραπεία [356, 368-372].

Μέχρι σήμερα, δεν έχουν διεξαχθεί κλινικές μελέτες που να διερευνούν την πιθανότητα χρήσης ανταγωνιστών των υποδοχέων ενδοθηλίνης για θεραπευτικούς σκοπούς στην ιατρική των μεταμοσχεύσεων. Παρ' όλα αυτά, είναι ελπιδοφόρο να υποθέσει κανείς ότι η προσθήκη τέτοιων σκευασμάτων στη συνήθη ανοσοκατασταλτική θεραπεία θα μπορούσε υπό προϋποθέσεις να οδηγήσει σε μείωση

των ποσοστών απόρριψης ή σε νέες στρατηγικές θεραπείας. Επίσης, θα μπορούσε να επιτρέψει την μείωση της δοσολογίας των ανοσοκατασταλτικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται σήμερα, τα οποία είναι υπεύθυνα για πολλές από τις ανεπιθύμητες συνέπειες της μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων, όπως η νευροτοξικότητα, η νεφρική νόσος και η δευτεροπαθής υπέρταση από κυκλοσπορίνη.

Αγγειακή Εγκεφαλική Νόσος, Σήψη, Γλαύκωμα και άλλα νοσήματα

Σε ασθενείς με ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, έχουν ανευρεθεί αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα αλλά και τον εγκεφαλικό ιστό [246, 373-375]. Παρόμοια ευρήματα έχουν περιγραφεί και σε ζωικά μοντέλα εγκεφαλικών επεισοδίων. Επιπρόσθετα της επίδρασής της στον αγγειακό τόνο, η ET-1 φαίνεται να αυξάνει τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [374], να επάγει τη νευρωνική βλάβη [374] και να συνεισφέρει στον αγγειόσπασμο που σχετίζεται με την υπαραχνοειδή αιμορραγία [375]. Έτσι, σε πειραματικά ζωικά μοντέλα αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, η χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων των ενδοθηλινών φάνηκε να έχει προστατευτικές δράσεις [246, 376]. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ET-1 μπορεί να εμπλέκεται ευθέως στην παθογένεση τέτοιων καταστάσεων όπως τα Αγγειακά Εγκεφαλικά Επεισόδια (ΑΕΕ).

Σε σηπτικούς ασθενείς, έχουν ανευρεθεί αυξημένα επίπεδα τόσο της ET-1 όσο και της Big ET-1 στο πλάσμα, ενώ έχει επίσης προταθεί ότι κάποιες από τις επιπλοκές της σήψης μπορεί να επάγονται ή να διαμεσολαβούνται από τις ενδοθηλίνες [377-379]. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη παραγωγή της ET-1 που παρατηρήθηκε σε σηπτικούς ασθενείς ίσως συμβάλλει στην κατά περιοχές αύξηση των αγγειακών αντιστάσεων, την υπερδιήθηση και την ανάπτυξη, εν τέλει, του Συνδρόμου Αναπνευστικής Ανεπάρκειας των Ενηλίκων [377-379]. Παρομοίως, τα

επίσης αυξημένα επίπεδα της Big ET-1 στο πλάσμα ασθενών με σήψη βρέθηκαν να σχετίζονται με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτοκινών IL-6 και IL-8, καθώς και με τη νεφρική λειτουργία αλλά και τον πνευμονικό αγγειακό τόνο [377-379].

Οι ενδοθηλίνες κι οι υποδοχείς τους εμπλέκονται σε πολλές οπτικές νευροπάθειες που μελετήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζωικά μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου και του γλαυκώματος. Στον οφθαλμό, οι δράσεις της ενδοθηλίνης περιλαμβάνουν τον έλεγχο του αγγειακού τόνου, τη διέγερση της αστρογλοίωσης και την αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου δικτύου [380]. Παρόλο που η ενδοθηλίνη είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία του οφθαλμού, μπορεί να έχει και βλαπτικές επιδράσεις μέσω μηχανισμών των οποίων ο πλήρης τρόπος αλληλεπίδρασης δεν είναι ακόμα σαφής.

Οι ακριβείς μηχανισμοί εμπλοκής του συστήματος των ενδοθηλινών τόσο στις αγγειακές εγκεφαλικές νόσους όσο και στη σήψη και το γλαύκωμα δεν είναι ακόμα πλήρως εξακριβωμένοι. Οι νόσοι αυτές είναι απλά ένα παράδειγμα της πολυπλοκότητας και της ποικιλίας των δράσεων του συστήματος των ενδοθηλινών στις διάφορες νόσους, και χρειάζονται περαιτέρω έρευνες ώστε να κατανοηθεί τόσο ο πλήρης ρόλος των ενδοθηλινών σε αυτές, όσο και η πιθανή χρησιμότητα των ανταγωνιστών των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στην θεραπευτική τους αντιμετώπιση. Στη μεγάλη κατηγορία των παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία εμπλοκής του συστήματος των ενδοθηλινών, χωρίς όμως αυτή να είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (Νόσος Crohn και ελκώδης κολίτις) [381], η πνευμονική ίνωση [382], το άσθμα [383], το ηπατοπνευμονικό σύνδρομο [384], η περιφερική αγγειακή νόσος [385], και η οξεία παγκρεατίτιδα [386].

1.2.3 Το σύστημα των ενδοθηλινών στις κακοήθεις νεοπλασίες

Καθώς η ET-1 χαρακτηρίστηκε αρχικά ως αγγειοσυσπαστικό πεπτίδιο, 100 φορές μάλιστα ισχυρότερο από την νορεπινεφρίνη [387], η μελέτη της φυσιολογίας του μορίου επικεντρώθηκε στην παραγωγή και τη δράση του στο αγγειακό σύστημα και τη συνεπακόλουθη παθοφυσιολογία του τελευταίου. Σταδιακά, ωστόσο, διαπιστώθηκε η παρουσία της ET-1 και σε άλλους ιστούς και άρχισε η διερεύνηση του ρόλου της σε διαφορετικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Διαπιστώθηκε ότι ασκεί ποικίλες και σημαντικές δράσεις στην παθογένεια της καρκινογένεσης σε πολλά όργανα. Και ως παθογένεια, θεωρούνται τα ενεργοποιούμενα από ποικίλα ερεθίσματα, κυτταρικά μονοπάτια και η αλληλεπίδρασή τους, με σκοπό την καθοδήγηση της γονιδιακής έκφρασης και της πρωτεϊνικής παραγωγής, τον έλεγχο σε μεταμεταφραστικό και λειτουργικό επίπεδο των παραγόμενων πρωτεϊνών, τον καθορισμό του κυτταρικού φαινοτύπου και εν τέλει τη ρύθμιση της λειτουργίας του κυττάρου.

Η δράση αυτή της ET-1 ασκείται μέσω των προαναφερθέντων υποδοχέων ET_AR και ET_BR, η ενεργοποίηση των οποίων θέτει σε λειτουργία ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο εντοπισμός των ερεθισμάτων και η χαρτογράφηση των συνδέσεων αυτών των κυκλωμάτων, με στόχο την αποσαφήνιση του πολύπλοκου τρόπου αλληλεπίδρασης, αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας. Ανάμεσα στις νεοπλασίες που έχουν μελετηθεί ως προς τη σχέση τους με το σύστημα των ενδοθηλινών συγκαταλέγονται το μεταστατικό μελάνωμα, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, αλλά και γυναικολογικοί όγκοι όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος των ωοθηκών, της μήτρας και του τραχήλου [388]. Τέλος, η πλήρης κατανόηση των

σηματοδοτικών οδών των ενδοθηλινών θα μπορούσε να βοηθήσει και στη διαλεύκανση του ρόλου τους στις κακοήθειες νεοπλασίες, οι οποίες εν γένει χαρακτηρίζονται και από αλλαγές στην ανοσολογική απάντηση, την ενεργοποίηση της φλεγμονής και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

ET-1 και κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Η σύνδεση της ET-1 με τους υποδοχείς της ενεργοποιεί ένα δίκτυο διαφορετικών οδών με αποτέλεσμα συνεργική και συνδυαστική ενίσχυση των μιτογόνων σημάτων [389]. Η σύνδεση της ET-1 με τον G-protein coupled receptor (GPCR) της και η ενεργοποίηση των μονοπατιών της φωσφολιπάσης C με αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , της PI3K/Akt, της πρωτεϊνικής κινάσης C και της MAPK σηματοδοτεί την κινητοποίηση ενός δικτύου πολλαπλών συνεργικών σημάτων, παρά γραμμικών μεταδόσεων. Αυτή οδηγεί σε άφιξη στον πυρήνα του κυττάρου μηνυμάτων σύνθεσης DNA και κατ' επέκταση κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η εν λόγω αυξητική δράση της ET-1 έχει αποδειχθεί σε σειρά επιθηλιακών καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, των ωοθηκών και του τραχήλου μήτρας: η προσθήκη ET_A R ανταγωνιστών - αλλά όχι ET_B R ανταγωνιστών - οδήγησε σε διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γεγονός που υποστηρίζει τον αυτοκρινή μηχανισμό λειτουργίας της ET-1 [389, 390].

Επιπλέον, η μιτωτική δράση της ET-1 ενισχύεται και από άλλους αυξητικούς παράγοντες, όπως οι EGFR, FGF, IGF, PDGF, TGF- β και η IL-6 [391]. Είναι γνωστό ότι οι GPCR ασκούν μέρος της δράσης τους μέσω ταυτόχρονης ενεργοποίησης του EGFR. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών, η ET-1 μέσω ET_A R οδηγεί σε ενεργοποίηση του EGFR, και μέσω αυτού των MAPK και Akt μονοπατιών [392, 393]. Η ταυτόχρονη χρήση ανταγωνιστών και των δύο μορίων

(ET_AR και EGFR), μείωσε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε ωοθηκικές καρκινικές σειρές, όχι μόνο αποδεικνύοντας την διασύνδεση τους αλλά και υποστηρίζοντας τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των ET_AR ανταγωνιστών στην αντικαρκινική θεραπεία, για την αντιμετώπιση της αντοχής στους αντι-EGFR ανταγωνιστές [394].

ET-1 και νεοαγγειογένεση

Οι ενδοθηλίνας, εκτός από την μιτογόνο τους δράση στα επιθηλιακά κύτταρα, συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και των ινοβλαστών, εκφράζοντας αγγειογενετική δράση. Η ET-1 φαίνεται να εμπλέκεται σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης *in vitro* και *in vivo*, και ο ρόλος αυτός της ET-1 στην νεοαγγείωση που πραγματοποιείται στο περιβάλλον του όγκου, έχει αναδειχθεί στον καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού κ.α.[395, 396]. Ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού, έχει βρεθεί συσχέτιση του άξονα της ET-1 με τη μικροαγγειακή πυκνότητα (MicroVessel Density MVD), που αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης [397].

Εκτός όμως από τη δράση της ως αγγειογενετικός παράγοντας, η ET-1 παίζει έμμεσα ρόλο και στην έκφραση του Αγγειοδραστικού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ρυθμιστικού μορίου τόσο της φυσιολογικής όσο και της καρκινικής νεοαγγειογένεσης.

Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται σχεδόν αποκλειστικά από τον ενεργοποιούμενο από την υποξία μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1), ο οποίος συνδεόμενος στο αντίστοιχο τμήμα του επαγωγέα (promoter) του γονιδίου του VEGF (Hypoxia-Responsive Element, HRE), δίνει το έναυσμα της μεταγραφής και κατ' επέκταση της δημιουργίας του ανίστοιχου πρωτεϊνικού μορίου. Ο ίδιος ο HIF-1 αποτελείται από 2 υπομονάδες: τη β, παρούσα σε όλα τα κύτταρα,

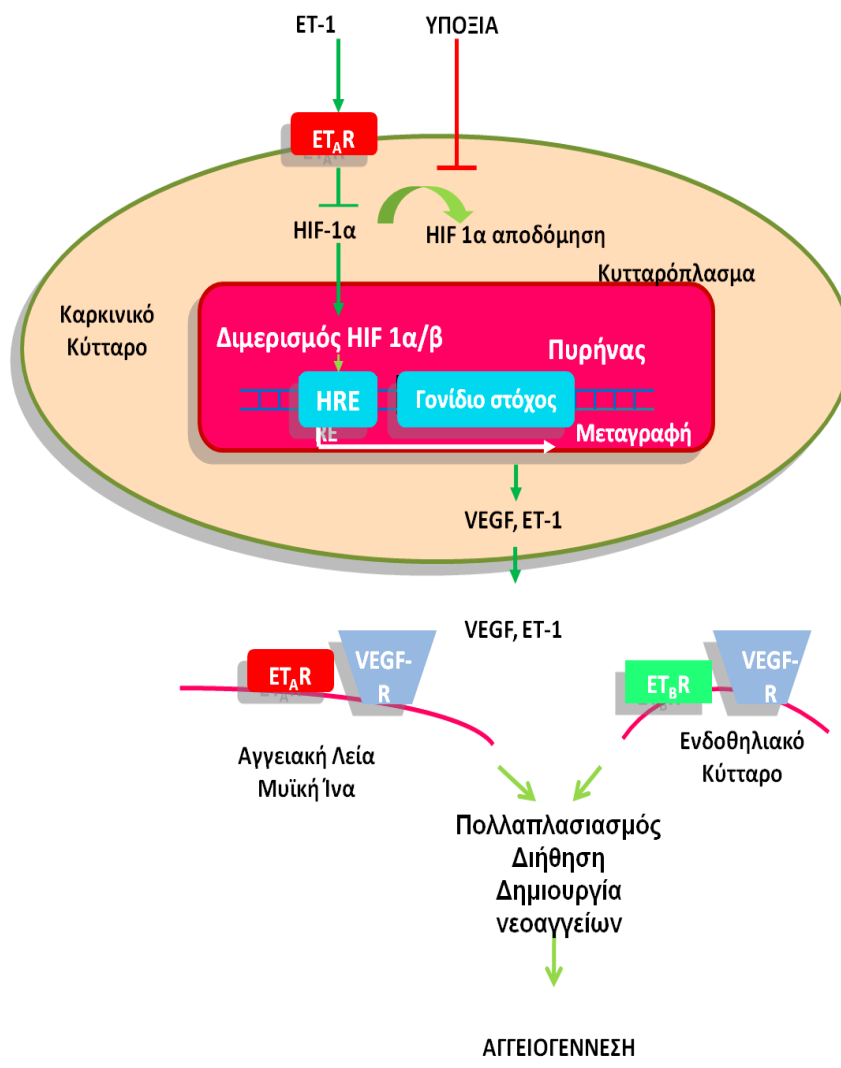
που παραμένει σταθερή σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης, και την α η οποία δεν είναι λειτουργική (αποδομείται μέσω του συστήματος της ubiquitin) σε κατάσταση φυσιολογικής οξυγόνωσης αλλά σταθεροποιείται σε συνθήκες υποξίας και διμερίζεται, διαμορφώνοντας έτσι το λειτουργικό σύμπλεγμα του HIF 1, το οποίο και ενεργοποιεί τα γονίδια που περιέχουν στον υποκινητή τους HRE τμήμα, όπως αυτό του VEGF [398].

Έχει βρεθεί ότι σε συνθήκες φυσιολογικής οξυγόνωσης η ET-1, μέσω του $ET_{A}R$, προκαλεί συσσώρευση της υπομονάδας α του HIF-1, εμποδίζοντας την αποδόμησή της, και μάλιστα σταθεροποιεί στον πυρήνα το διμερές σύμπλεγμα αυτού και επιτρέπει τη σύνδεσή του στο HRE του VEGF, προάγοντας έτσι την έκφραση του τελευταίου. Έτσι, σε συνθήκες υποξίας ουσιαστικά πολλαπλασιάζει και ενισχύει το μήνυμα του HIF-1 και συνεπώς την έκφραση του VEGF [393, 399]. Η δράση αυτή καταδεικνύεται σε πειραματικά ζωικά μοντέλα καρκίνου ωοθηκών, όπου η χρήση ανταγωνιστών των $ET_{A}R$ οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του VEGF και της μικροαγγειακής πυκνότητας [400].

Επιπλέον, η σχέση της ET-1 με τον HIF-1 είναι αμφίδρομη, καθώς όχι μόνο η ET-1 ενισχύει τη δράση του HIF-1 αλλά και ο HIF-1 προάγει την παραγωγή της ET-1, μέσω του HRE τμήματος στον υποκινητή του γονιδίου της ET-1 (Εικόνα 1.13) [401]. Αντίστοιχο HRE τμήμα δεν έχει απομονωθεί στους υποκινητές των γονιδίων των $ET_{A}R$ και $ET_{B}R$, αλλά η αυξημένη παραγωγή των υποδοχέων της ET-1 σε συνθήκες υποξίας μπορεί να αποδοθεί στην αυτοκρινή δράση της ίδιας, που αυξάνει όπως αναφέρθηκε παραπάνω σε καταστάσεις μειωμένης οξυγόνωσης [402, 403].

Η δράση της ET-1 στο πεδίο της νεοαγγείωσης στους όγκους ασκείται και μέσω του συστήματος των κυκλοοξυγενασών - προσταγλανδινών, καθώς αυξάνει σημαντικά την παραγωγή των κυκλοοξυγενάση-1 (COX-1) και -2 (COX-2), τόσο σε

επίπεδο mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, με αντίστοιχη έκφραση της προσταγλανδίνης PGE₂. Ασκεί δε τη λειτουργία αυτή πιο έντονα κάτω από συνθήκες υποξίας, συνδέοντας με τον τρόπο αυτό και την επίδρασή της στον HIF-1. Ειδικότερα, ανταγωνιστές του ET_AR, αναστέλλουν την επίδραση της ET-1 στην παραγωγή προσταγλανδινών, ενώ η αναστολή του HIF-1 με μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNAs- siRNA), επίσης καταστέλλει την προκαλούμενη από την ET-1 παραγωγή προστανοειδών σε συνθήκες υποξίας [404].



Εικόνα 1.13. Η αμφίδρομη σχέση ET-1 και HIF1-a [405]

Τέλος, έχει παρατηρηθεί η δημιουργία καρκινικών νεοαγγείων de novo (με κυτταρική στρωμάτωση σε αντίθεση με τα συνήθη καρκινικά νεοαγγεία που στερούνται της φυσιολογικής αγγειακής κυτταρικής διαστρωμάτωσης) σε επιθετικό καρκίνο ωοθηκών, εύρημα που σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο νόσου, μεταστάσεις και χαμηλή συνολική επιβίωση. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία αυτών των αγγείων φαίνεται να παίζει το σύστημα των μεταλοπρωτεασών MMPs (matrix metalloproteinase MMP-2 και Membrane Type-1 MT1-MMP) του στρώματος [406]. Αξιοσημείωτη επίσης είναι η παρατήρηση της έκφρασης ET-1 και ET_AR σε συνδυασμό με τις MMPs, σε επιθετικούς όγκους της ωοθήκης. Η εφαρμογή ET_AR ανταγωνιστών οδήγησε σε αναστολή της δημιουργίας νεοαγγείων σε αυτούς τους όγκους [390, 406]. Έτσι, όσον αφορά στην νεοαγγείωση στον καρκίνο, η ET-1 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό και πολυποίκιλο ρόλο, που αξίζει να αποτελέσει αντικείμενο εντατικής και ελπιδοφόρας έρευνας.

ET-1 και κυτταρική απόπτωση

Η ET-1 είναι αντιαποπτωτικός παράγοντας σε διάφορους τύπους κυττάρων. Η ET-1 παρατηρείται ότι συμμετέχει σε κυτταρικές οδούς που ελέγχουν τον κυτταρικό θάνατο. Σε ποικίλες κυτταρικές καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων, η έγχυση ET-1 εμπόδισε την οφειλόμενη στην πακλιταξέλη (μέσω φωσφορύλιωσης του Bcl-2) απόπτωση, ενώ η χρήση συγκεκριμένου ET_AR ανταγωνιστή εμπόδισε την δράση αυτή της ET-1. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ET-1 συμμετέχει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων στην πακλιταξέλη μέσω των ET_A υποδοχέων και της ενεργοποίησης αντιαποπτωτικών οδών [407, 408].

ET-1 και κυτταρική διεισδυτικότητα

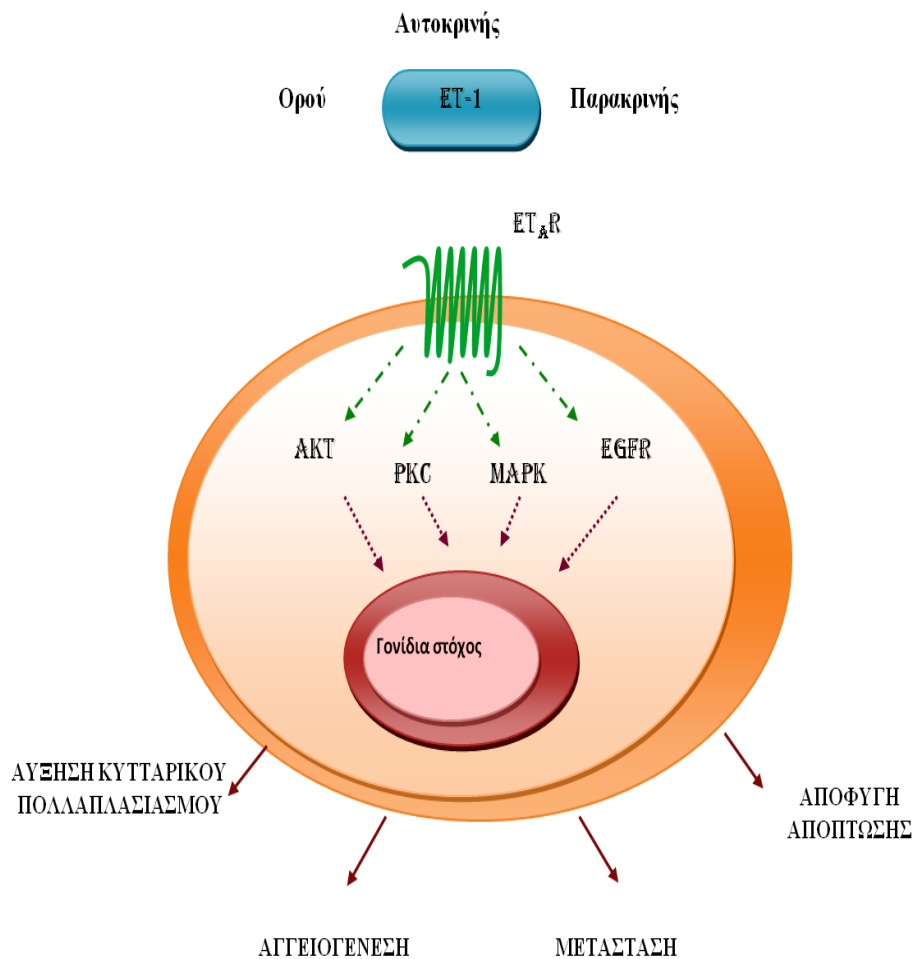
Κατά την εξέλιξη ενός όγκου, σημαντικό ρόλο παίζουν οι αλλαγές στην έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs), cadherins, connexins και integrins. Στο επίπεδο αυτών των αλλαγών κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης, το σύστημα των ενδοθηλινών επάγει δυο τύπους πρωτεϊνών που σχετίζονται με την μεταστατική δραστηριότητα: τις MMPs και το σύστημα του uPA (urokinase-type plasminogen activator). Η επαγωγή αυτή συμβαίνει σε διάφορα επίπεδα, όπως της μεταγραφής, της ενεργοποίησης των προενζύμων και της έκκρισης ζυμογόνου, με αποτέλεσμα την αύξηση της διεισδυτικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, στα νεοπλασματικά αυτά κύτταρα, η ET-1 παρατηρήθηκε ότι διεγείρει την κίνηση εστιών προσκόλλησης (FAK) και την φωσφορυλίωση της paxillin, υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι το σύστημα των ενδοθηλινών θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο, με σκοπό την αναχαίτιση της κυτταρικής μετανάστευσης και πιθανώς την παρεμπόδιση της μετάστασης [409].

ET-1 και ανοσολογική ρύθμιση

Οι ενδοθηλίνες συμμετέχουν στην διακίνηση, την διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση ανοσοκυττάρων, με πιο ειδικό ρόλο στο να προσελκύουν τα μακροφάγα. Τα μακροφάγα εκφράζουν και τους δυο τύπους υποδοχέων ενδοθηλίνης και όχι μόνο αντιδρούν στις ενδοθηλίνες αλλά και τις παράγουν, σε αντίθεση με τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα [410]. Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν ότι το σύστημα των ενδοθηλινών είναι σημαντικός ρυθμιστής της στόχευσης των λεμφοκυττάρων και ότι η υπερέκφραση των υποδοχέων ET_B από τα καρκινικά κύτταρα εμποδίζει την στόχευσή τους από τα T-κύτταρα [411].

Κλινική εφαρμογή

Όπως καθίσταται αντιληπτό από τα παραπάνω, η ET-1 διατηρεί σημαίνοντα ρόλο στις περισσότερες από τις διαδικασίες της καρκινογένεσης. (Εικόνα 1.14). Η έκφραση δε και η δράση της ET-1 καθώς και των υποδοχέων της μελετάται σε πληθώρα καρκίνων, όπως ωοθηκών, ενδομητρίου, τραχήλου μήτρας, νεφρού, ουροδόχου κύστεως, προστάτη, μαστού, πνεύμονα, οστών, παχέος εντέρου, νευρικού συστήματος, στοματοφάρυγγα κ.α.



Εικόνα 1.14. ET-1 και κυτταρικά μονοπάτια καρκινογένεσης [405]

Έτσι, ένα μέρος της ιατρικής έρευνας, όσον αφορά στη θεραπεία του καρκίνου, στρέφεται και προς την κατεύθυνση της αναστολής της δράσης της ET-1. Η προσπάθεια αυτή έχει προσεγγίσει όλα τα στάδια παραγωγής και διακίνησης του ενεργού μορίου: το στάδιο της έναρξης βιοσύνθεσης της ET-1 (αναστολή με πολυφαινόλες - κόκκινο κρασί και πράσινο τσάι), το στάδιο παραγωγής της από τη προενδοθηλίνη (αναστολή του ενζύμου ECE), το στάδιο αποδόμησής της (χρήση μεταλλοπρωτεϊνάσης NEP), και τέλος το στάδιο της δράσης της στους υποδοχείς της (χρήση ανταγωνιστών ET_AR και ET_BR) [412-415]. Ειδικότερα, έχει αναφερθεί μείωση των επιπέδων έκφρασης της ET-1 μέσω της κατανάλωσης κόκκινου κρασιού, η οποία όπως είναι γνωστό σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [412]. Παράλληλα, στον καρκίνο των ωθηκών, οι πολυφαινόλες του πράσινου τσαγιού έχει αναφερθεί ότι αναστέλλουν την έκφραση της ET-1 και του ET_AR, μειώνοντας τον επαγόμενο από την ET-1 κυτταρικό πολλαπλασιασμό [413]. Τέλος, σε πρόσφατη μελέτη αναδείχθηκε ότι, στον καρκίνο των ωθηκών, με την υπερέκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης NEP, μειώθηκε τόσο η έκφραση της ET-1 όσο και ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων [415].

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Από το 1988, οπότε και ταυτοποιήθηκε η ET-1, ο ρόλος του συστήματος των ενδοθηλινών έχει μελετηθεί εκτενώς σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στη φυσιολογία του ανθρώπου όσο και στην παθοφυσιολογία διαφόρων νοσημάτων [410]. Από τότε, αρκετοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν τον τρόπο μεταβολής της έκφρασης των ενδοθηλινών και των υποδοχέων τους σε διαφόρους τύπους όγκων του μαστού, στις καλοήθειες βλάβες και τον φυσιολογικό μαζικό ιστό. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πλέον θεωρείται ότι τόσο η ET-1 όσο και οι υποδοχείς της παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη ποικίλων νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων αυτών του παχέος εντέρου, του προστάτη, των ωοθηκών και του μαστού [416-419]. Η εμπλοκή του συστήματος των ενδοθηλινών στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την κυτταρική διήθηση, και τη νεοαγγειογένεση έχει αναδειχθεί τόσο σε προκλινικές όσο και σε κλινικές μελέτες [388, 409, 418, 420-424].

Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση της ET-1 και των υποδοχέων της έχει συσχετισθεί με την μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στο διηθητικό καρκίνωμα [389]. Η υπερέκφραση της ET-1 στον καρκίνο του μαστού έχει μελετηθεί με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων όπως ραδιοανοσολογικές, ανοσοϊστοχημικές και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) [425-428]. Έτσι, οι πρώτες αναφορές για την παρουσία αυξημένης έκφρασης της ET-1 σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού υπάρχουν ήδη από την προηγούμενη δεκαετία [427]. Αυξημένη έκφραση της ET-1 και των υποδοχέων της ET_AR και ET_BR φαίνεται να σχετίζεται με πιο επιθετικές μορφές καρκίνου του μαστού, πτωχότερη πρόγνωση, και μειωμένη συνολική επιβίωση [428].

Πρόσφατα, μελετήθηκαν τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, αλλά τα δεδομένα παραμένουν ανεπαρκή [429, 430]. Στην πρώτη μελέτη, η ET-1 εμφανίζεται αυξημένη στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού και λεμφαδενικές μεταστάσεις σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς επινέμεση των λεμφαδένων [429]. Από την άλλη, στη δεύτερη μελέτη, τα επίπεδα της Big ET-1 βρέθηκαν αυξημένα σε ασθενείς με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα σε σύγκριση με ομάδα ελέγχου [430].

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ταυτόχρονη εκτίμηση της έκφρασης των ενδοθηλινών στη συστηματική κυκλοφορία γυναικών με νεοπλασίες μαστού, η σύγκριση με την έκφρασή τους στο ιστικό δείγμα και η συσχέτιση με την έκφραση του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGF) στο ιστικό δείγμα καθώς και με κλινικοεργαστηριακά και διαγνωστικά δεδομένα των γυναικών αυτών.

Η εκτίμηση της έκφρασης των ενδοθηλινών στα διάφορα εξελικτικά στάδια των νεοπλασματικών παθήσεων του μαστού με την ταυτόχρονη μελέτη παραγόντων που αποδεδειγμένα εμπλέκονται στη νόσο θα βοηθήσει στην πληρέστερη κατανόηση της συμμετοχής του συστήματος των ενδοθηλινών στον καρκίνο του μαστού. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση του ρόλου των ενδοθηλινών στη νόσο θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες διαγνωστικές, προγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις των νεοπλασματικών παθήσεων του μαστού.

2.2 ΥΛΙΚΟ - ΜΕΘΟΔΟΣ

Πληθυσμός Ασθενών

Στην παρούσα μελέτη έχουν συμπεριληφθεί 124 γυναίκες με μέση ηλικία $53,69 \pm 11,06$ έτη (εύρος 33-81 έτη) που υπεβλήθησαν σε στερεοτακτική βιοψία μαστού για μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις, και 30 υγιείς γυναίκες, με μέση ηλικία $55,07 \pm 11,59$ έτη (εύρος 36-77 έτη) που αποτέλεσαν την ομάδα αναφοράς.

Οι ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη εμφάνιζαν ύποπτες μη ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις, όπως μικροαποτιτανώσεις, οζίδια ή διαταραχές της αρχιτεκτονικής του μαζικού αδένου, ταξινομημένες ως $BIRADS \geq 4$. Οι βιοψίες πραγματοποιήθηκαν από την ίδια ομάδα χειρουργού – ακτινολόγου, υπό στερεοτακτική ακτινολογική καθοδήγηση, με τη χρήση της στερεοτακτικής τράπεζας Fischer's Mammotest® (Fischer Imaging, Denver, CO, USA). Οι ασθενείς που δεν ήταν κατάλληλες για το είδος αυτό της βιοψίας, λόγω βάρους μεγαλύτερου από 120 kg, σοβαρής οστεοαρθρίτιδας, σοβαρής χρόνιας αναπνευστικής νόσου ή σοβαρής καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και ασθενείς με ιστορικό αυτοάνοσων ή μεταβολικών νοσημάτων αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν γυναίκες που προσήλθαν στη Μονάδα Μαστού του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου για τον ετήσιο μαστογραφικό και κλινικό τους έλεγχο, κατά τον οποίο ελέγχθηκε και αποκλείστηκε η παρουσία ύποπτων ευρημάτων και κακοήθειας.

Προσδιορισμός της έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στον ορό του αίματος

Πριν από τη διαδικασία της βιοψίας, συλλέχθηκαν δυο δείγματα περιφερικού αίματος σε φιαλίδια με και χωρίς αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) για την απομόνωση πλάσματος και ορού αντίστοιχα, κατόπιν φυγοκέντρησης. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους -80 °C σε κλάσματα του 1 mL.

Τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα μετρήθηκαν με τη χρήση ενζυμοσυνδεδεμένου ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay, ELISA). Η μέθοδος ELISA είναι μια διαδεδομένη μορφή αναλυτικής βιοχημικής δοκιμασίας που χρησιμοποιεί ένα είδος ετερογενούς και στερεάς φάσης ενζυματικής ανοσοανίχνευσης με σκοπό την ανίχνευση μιας ουσίας (αντιγόνου) σε υγρό δείγμα. Η υλοποίηση της δοκιμασίας προϋποθέτει την ύπαρξη τουλάχιστον ενός αντισώματος με εξειδίκευση στο συγκεκριμένο αντιγόνο. Η ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα προσδιορίζεται με μέτρηση του ορατού σήματος που παράγεται από την πρόσθεση του ενζυματικού υποστρώματος. Πρόκειται για μια μεθοδολογία η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, επιτρέποντας τον ποσοτικό προσδιορισμό του υπό μελέτη βιομορίου με ακρίβεια, χαρακτηριστικό το οποίο την καθιστά μέθοδο εκλογής για τον έλεγχο πληθώρας και μεγάλης ποικιλίας πρωτεϊνικών βιομορίων στη συστηματική κυκλοφορία. Υψηλής σημασίας βιομόρια με προγνωστικό και προβλεπτικό χαρακτήρα ανιχνεύθηκαν και αναλύθηκαν με ELISA προτού εξελιχθούν σε εξαιρετικής χρησιμότητας βιοδείκτες στην καθημερινή κλινική πράξη.

Οι μετρήσεις της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα των ασθενών του δείγματος πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αντίστοιχα εμπορικά διαθέσιμα kits (Endothelin 1-21 και big Endothelin), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Biomedica Gruppe, Wien), ενώ όλες οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της ET-1 και του VEGF

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της ET-1 και του VEGF, κόπηκαν συνεχόμενες τομές παραφίνης πάχους 4 μικρομέτρων από κάθε δείγμα ιστού που ελήφθη κατά τη βιοψία, και χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της ET-1 (mouse anti-Endothelin-1, clone TR.ET.48.5, 1:400, ολονύκτια επώαση, Pierce Antibodies, Thermo Fisher Scientific, IL, USA) και του VEGF (purified mouse anti-human VEGF monoclonal antibody, 1:300, επώαση 1h, BD Pharmingen, BD Biosciences, NJ, USA) αντίστοιχα.

Για την εκτίμηση της έκφρασης της ET-1 στο ιστικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν τα ενδοθηλιακά κύτταρα φυσιολογικών αγγείων ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες ελέγχου και η εκτίμηση της χρώσης έγινε με ημιποσοτική μέθοδο. Η απουσία κυτταροπλασματικής χρώσης των κυττάρων βαθμολογήθηκε με 0. Στις περιπτώσεις που η κυτταροπλασματική χρώση των κυττάρων στην πλειονότητα των κυττάρων της εκάστοτε αλλοίωσης ήταν ασθενέστερη αυτής των ενδοθηλιακών κυττάρων, τότε η έκφραση θεωρήθηκε «ασθενής» (1+). Θετική θεωρήθηκε η μετρίου βαθμού (2+) και η έντονη (3+) ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική χρώση στο μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων.

Αντίστοιχα, για την εκτίμηση της έκφρασης του VEGF στο ιστικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα ενδοθηλιακά κύτταρα φυσιολογικών αγγείων ως εσωτερικοί θετικοί μάρτυρες ελέγχου και η εκτίμηση της χρώσης έγινε με ημιποσοτική μέθοδο. Η απουσία κυτταροπλασματικής χρώσης των κυττάρων βαθμολογήθηκε με 0. Στις περιπτώσεις που η κυτταροπλασματική χρώση των κυττάρων ήταν ασθενέστερη αυτής των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά ωστόσο υπήρχε, τότε η έκφραση θεωρήθηκε «ασθενής» (1+). Θετική θεωρήθηκε η μετρίου

βαθμού (2+) η έντονη (3+) ανοσοϊστοχημική χρώση σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10% των κυττάρων της εκάστοτε αλλοίωσης.

Μέτρηση των επιπέδων των καρκινικών δεικτών CEA και CA 15-3

Η μέτρηση των επιπέδων των καρκινικών δεικτών CEA και CA 15-3 στον ορό των ασθενών του δείγματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του υπεραυτόματου ανοσολογικού αναλυτή ADVIA Centaur (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Ο αναλυτής χρησιμοποιεί τη μέθοδο της άμεσης χημειοφωταύγειας (direct chemiluminescence) με ιχνηθέτη τον εστέρα ακριδίνης, ο οποίος αποδίδει άμεσο σήμα χωρίς ανάγκη για ενίσχυση και εξασφαλίζει υψηλή ευαισθησία.

Ανάλυση Δεδομένων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA v. 10 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Ο έλεγχος κανονικότητας των τιμών των υπό μελέτη μεταβλητών έγινε με τη δοκιμασία Kolmogorov – Smirnov. Η σύγκριση των επιπέδων της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ανάμεσα στις ομάδες ασθενών έγινε με τα κριτήρια Kruskal – Wallis και Mann – Whitney. Ο έλεγχος της συσχέτισης των επιπέδων της ET-1 και της Big ET-1 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ασθενών και την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό έγινε με τα κριτήρια Kruskal – Wallis, Mann Whitney και Pearson's correlation coefficient, αναλόγως των παραμέτρων που ελέγχθησαν. Ο έλεγχος της συσχέτισης της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στον ιστό και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων των ασθενών έγινε με τις δοκιμασίες Fischer's exact και Pearson's χ^2 . Ο έλεγχος της συσχέτισης της έκφρασης της ET-1 στον ιστό με την έκφραση του VEGF στον ιστό έγινε με το κριτήριο χ^2 . Οι τιμές του p κάτω από 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δημογραφικά Χαρακτηριστικά Ομάδων Ασθενών

Οι 124 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη κατατάχθηκαν με βάση το αποτέλεσμα του ιστολογικού ελέγχου σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες. Έτσι, στην Ομάδα Α (n=30) περιελήφθησαν οι γυναίκες με Διηθητικό Πορογενές Καρκίνωμα (IDC), στην Ομάδα Β (n=30) οι γυναίκες με Ενδοπορικό (in situ) Καρκίνωμα (DCIS), στην Ομάδα Γ (n=34) οι ασθενείς με Υπερπλαστικές Αλλοιώσεις Χωρίς Ατυπία (ΥΑ), στην Ομάδα Δ (n=30) οι ασθενείς με Λοβιακή Νεοπλασία (LN), ενώ η Ομάδα Ε (n=30) αποτέλεσε την ομάδα αναφοράς (Υγιείς) (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Δημογραφικά στοιχεία και χαρακτηριστικά του δείγματος

	Ιστολογική Διάγνωση	N	Μέση Ηλικία (Εύρος)
Ομάδα Α	Διηθητικό Πορογενές Καρκίνωμα (IDC)	30	58,6 (35-80)
Ομάδα Β	Ενδοπορικό (in situ) Καρκίνωμα (DCIS)	30	55,7 (37-76)
Ομάδα Γ	Υπερπλαστικές Αλλοιώσεις Χωρίς Ατυπία (ΥΑ)	34	50,4 (33-81)
Ομάδα Δ	Λοβιακή Νεοπλασία (LN)	30	52,5 (41-80)
Ομάδα Ε	Υγιείς	30	55,1 (36-77)

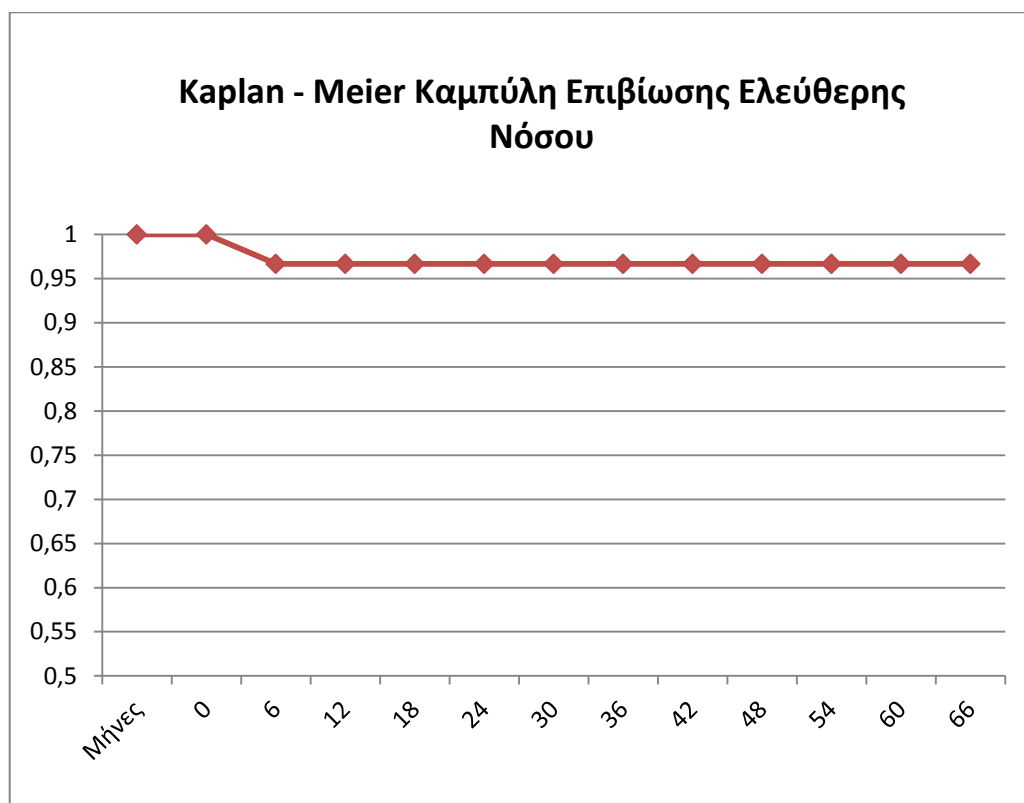
Κλινικοπαθολογικά Χαρακτηριστικά Ασθενών με IDC, DCIS και LN

Με βάση τα ευρήματα της ιστολογικής εξέτασης των ιστοτεμαχίων που ελήφθησαν από τη βιοψία των μαστογραφικών αλλοιώσεων των ασθενών της Ομάδας Α (IDC), 9 όγκοι ταξινομήθηκαν ως Grade I, 15 ως Grade II, και 6 ως Grade III. Ακόμη, 24/29 όγκους ήταν ER θετικοί, 24/29 ήταν PR θετικοί, ενώ 3/29 ήταν θετικοί για υπερέκφραση του ογκογονιδίου Her2 (Πίνακας 2.2).

Όλες οι ασθενείς με IDC υποβλήθηκαν σε ανάλογη χειρουργική εξαίρεση του όγκου. 8 ασθενείς υποβλήθηκαν σε ογκεκτομή, ενώ 22 ασθενείς υπεβλήθησαν σε μαστεκτομή. Με βάση τα αποτελέσματα της ιστολογικής εξέτασης του χειρουργικού παρασκευάσματος, η μέση τιμή διαμέτρου το πρωτοπαθούς όγκου ήταν $10,7 \pm 0,77$ mm, με την πλειοψηφία των όγκων (27/30) να είναι μεγέθους < 2 εκ. (Κατάταξη κατά TNM: pT1). Όλες οι ασθενείς με IDC υπεβλήθησαν σε βιοψία φρουρού λεμφαδένα, η οποία ήταν θετική στις 8/30 περιπτώσεις. Έτσι, οι ασθενείς αυτές υπεβλήθησαν και σε λεμφαδενικό καθαρισμό μασχάλης. Συνολικά, 21 ασθενείς είχαν νόσο Σταδίου I και 9 ασθενείς νόσο Σταδίου II (Πίνακας 2.2). Καμιά ασθενής δεν είχε απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά το χρόνο της διάγνωσης.

Στα πλαίσια της μελέτης, η μέση διάρκεια μετεγχειρητικής παρακολούθησης (follow up) για τις ασθενείς με IDC ήταν 53,8 μήνες (εύρος 36 – 72 μήνες). Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής, μια ασθενής (ποσοστό 3,3%) παρουσίασε τοπική υποτροπή της νόσου, 12 μήνες μετά την αρχική επέμβαση μαστεκτομής στην οποία υπεβλήθη (Σχήμα 2.1). Καμιά ασθενής δεν ανέπτυξε απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά την περίοδο της μετεγχειρητικής παρακολούθησης.

Σχήμα 2.1. Καμπύλη Επιβίωσης Ελεύθερης Νόσου στις ασθενείς με IDC (Ομάδα Α).



Πίνακας 2.2. Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της Ομάδας Α (IDC).

Παράμετρος	n (%)
Ιστολογικό Grade	
Grade I	9 (30%)
Grade II	15 (50%)
Grade III	6 (20%)
Οιστρογονικοί Υποδοχείς (ER)	
ER (+)	25 (83,3%)
ER (-)	5 (16,7%)
Προγεστερονικοί Υποδοχείς (PR)	
PR (+)	24 (80%)
PR (-)	6 (20%)

Υπερέκφραση Her2	
Her2 (+)	3 (10%)
Her2 (-)	27 (90%)
Μέγεθος Όγκου (TNM)	
pT1	27 (90%)
pT1A	11 (36,6%)
pT1B	11 (36,6%)
pT1C	5 (16,6%)
pT2	3 (10%)
Λεμφαδενική Διήθηση (TNM)	
N0	22 (73,3%)
N1	8 (26,7%)
Στάδιο Νόσου (AJCC)	
Στάδιο I	21 (70%)
Στάδιο II	9 (30%)
Στάδιο IIA	7 (23,3%)
Στάδιο IIB	2 (6,7%)

Όσον αφορά στις ασθενείς που διαγνώστηκαν με DCIS με βάση την ιστολογική εξέταση του υλικού βιοψίας των μαστογραφικών αλλοιώσεων, το 65,2% των όγκων ταξινομήθηκαν ως υψηλού πυρηνικού grade (“high grade”) ενώ 35,8% ταξινομήθηκαν ως μη υψηλού πυρηνικού grade (“non-high grade:”) (Πίνακας 2.3).

Τέλος, σχετικά με τις ασθενείς που διεγνώστηκαν με LN, η μέση διάρκεια μετεπεμβατικής παρακολούθησης ήταν 55,8 μήνες (εύρος 37-72 μήνες). Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, καμιά από τις ασθενείς δεν ανέπτυξε διηθητικό καρκίνωμα του μαστού.

Πίνακας 2.3. Ταξινόμηση των ασθενών της Ομάδας Β (DCIS) με βάση το πυρηνικό grade.

Πυρηνικό Grade	n (%)
High grade	15 (65,2%)
Non-high grade	8 (35,8%)

Επίπεδα έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα

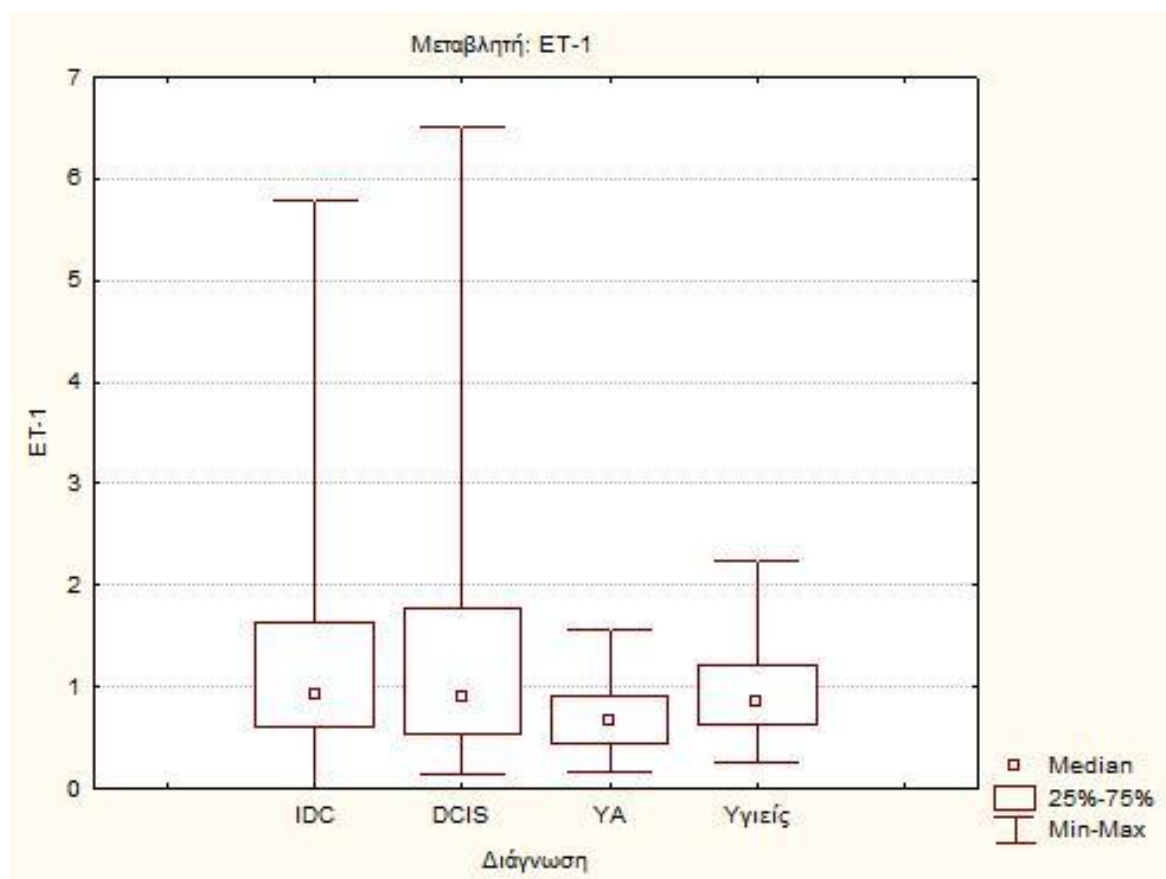
Τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα προσδιορίστηκαν στις 118/124 ασθενείς και τις 29/30 υγιείς. Η διάμεση τιμή της ET-1 στο πλάσμα ήταν 0,913fmol/L στην Ομάδα Α (IDC), 0,904fmol/L στην Ομάδα Β (DCIS), 0,661fmol/L στην Ομάδα Γ (YA), 0,870fmol/L στην Ομάδα Δ (LN), και 0,857fmol/L στην Ομάδα Ε (Υγιείς). Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα τόσο ανάμεσα στις Ομάδες Α, Β, Γ, Ε (Kruskal – Wallis Chi Square=7,436, df=3, $p=0,059$) (Σχήμα 2.2, Πίνακας 2.4), όσο και ανάμεσα στις Ομάδες Δ και Ε (Mann – Whitney U test, $p=0,934$) (Σχήμα 2.3, Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.4. Επίπεδα έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα για τις Ομάδες Α, Β, Γ, Ε.

Διάγνωση	N	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
IDC	30	0,913	NS
DCIS	30	0,904	
YA	34	0,661	
Υγιείς	30	0,857	

NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Σχήμα 2.2. Box & Whisker plot, έκφραση της ET-1 στο πλάσμα, Ομάδες Α, Β, Γ, Ε.



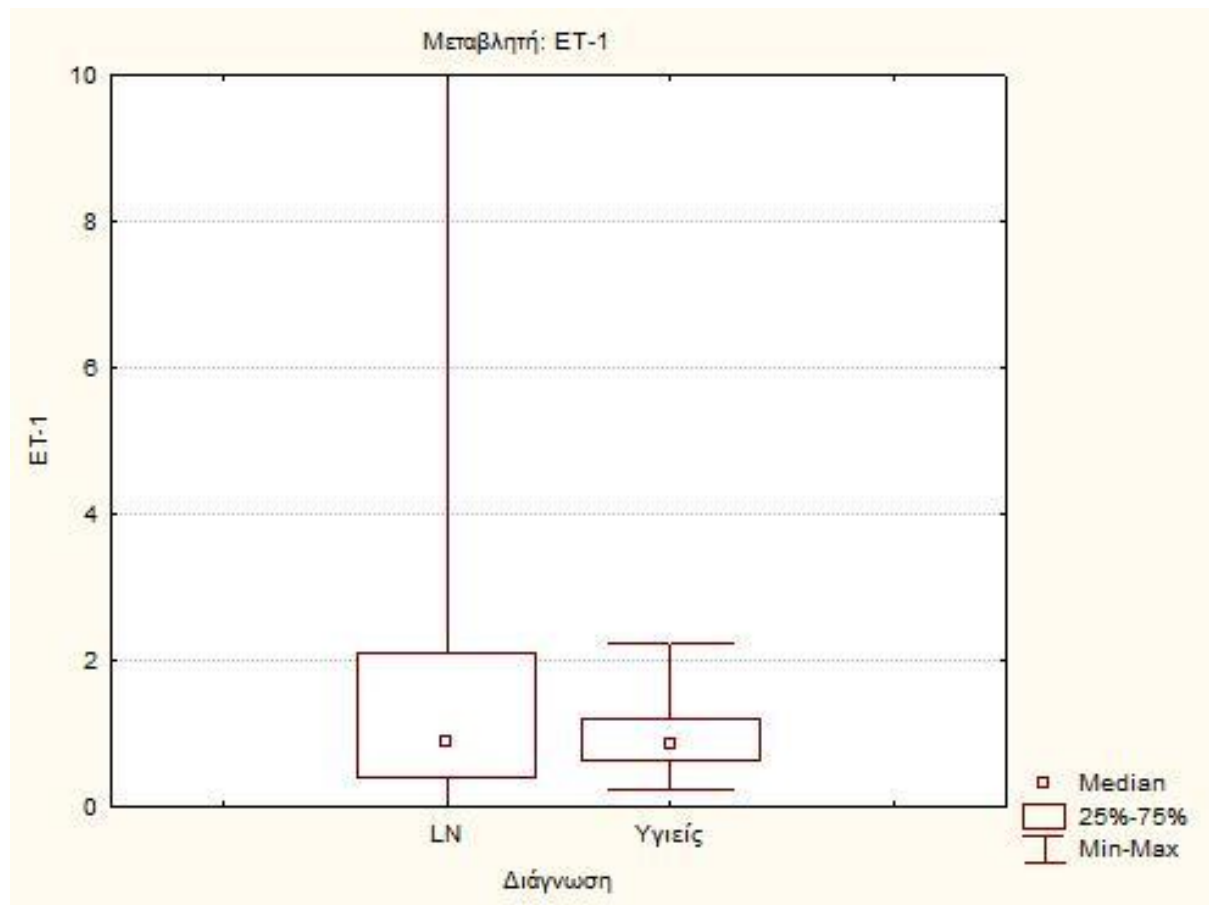
Πίνακας 2.5. Επίπεδα έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα για τις Ομάδες Δ, Ε.

Διάγνωση	N	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
LN	30	0,870	NS
Υγιείς	30	0,857	

NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Σχήμα 2.3. Box & Whisker plot, έκφραση της ET-1 στο πλάσμα, Ομάδες Δ,

Ε.



Επίπεδα έκφρασης της Big ET-1 στο πλάσμα

Τα επίπεδα έκφρασης της Big ET-1 στο πλάσμα προσδιορίστηκαν σε όλες (124/124) τις ασθενείς και όλες (30/30) τις υγιείς. Η διάμεση τιμή της Big ET-1 στο πλάσμα ήταν 0,690fmol/mL στην Ομάδα Α, 0,620fmol/mL στην Ομάδα Β, 0,640fmol/mL στην Ομάδα Γ, 0,715fmol/mL στην Ομάδα Δ, και 0,325fmol/mL στην Ομάδα Ε (Πίνακας 2.6).

Πίνακας 2.6. Επίπεδα έκφρασης της Big ET-1 στο πλάσμα για την κάθε ομάδα ασθενών

Διάγνωση	n	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)
IDC	30	0,690
DCIS	30	0,620
YA	34	0,640
LN	30	0,715
Υγιείς	30	0,325

Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα της Big ET-1 στο πλάσμα ανάμεσα στις τέσσερις Ομάδες (Kruskal-Wallis Chi Square=17.857, df=3, $p=0,0005$). Η πολλαπλή σύγκριση των μέσων τιμών για κάθε Ομάδα ανέδειξε ότι οι τιμές της Big ET-1 ήταν σημαντικά υψηλότερες στις ασθενείς με IDC ($p=0,001$) και DCIS ($p=0,01$) σε σύγκριση με την Ομάδα E (Υγιείς) (Πίνακας 2.7, Σχήμα 2.4).

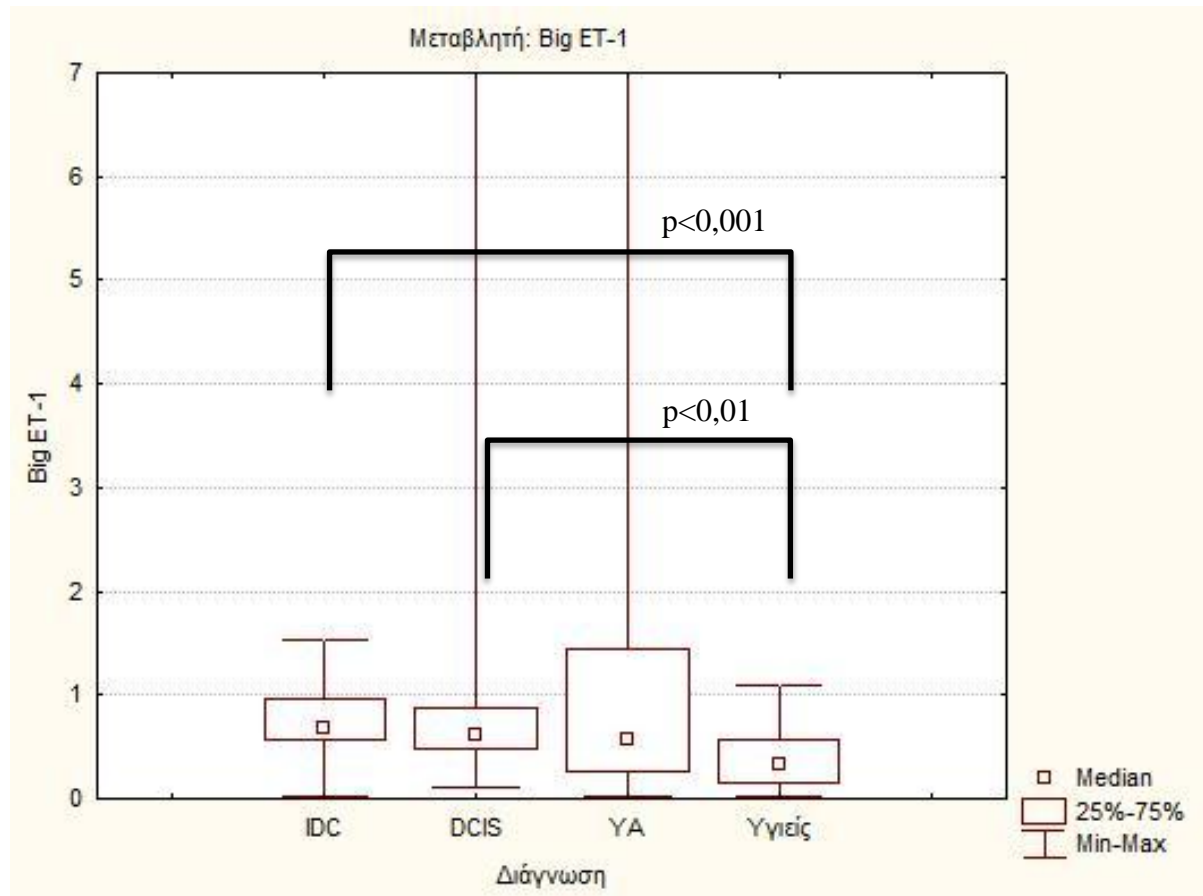
Πίνακας 2.7. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της Big ET-1 στο πλάσμα ανάμεσα στις Ομάδες A, B, Γ, E (τιμές *p value*).

Διάγνωση	IDC	DCIS	YA	Υγιείς
IDC	*	NS	NS	0,001
DCIS	NS	*	NS	0,01
YA	NS	NS	*	NS
Υγιείς	0,001	0,01	*	NS

NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Σχήμα 2.4. Box & Whisker plot, έκφραση της Big ET-1 στο πλάσμα, Ομάδες

A, B, Γ, E.

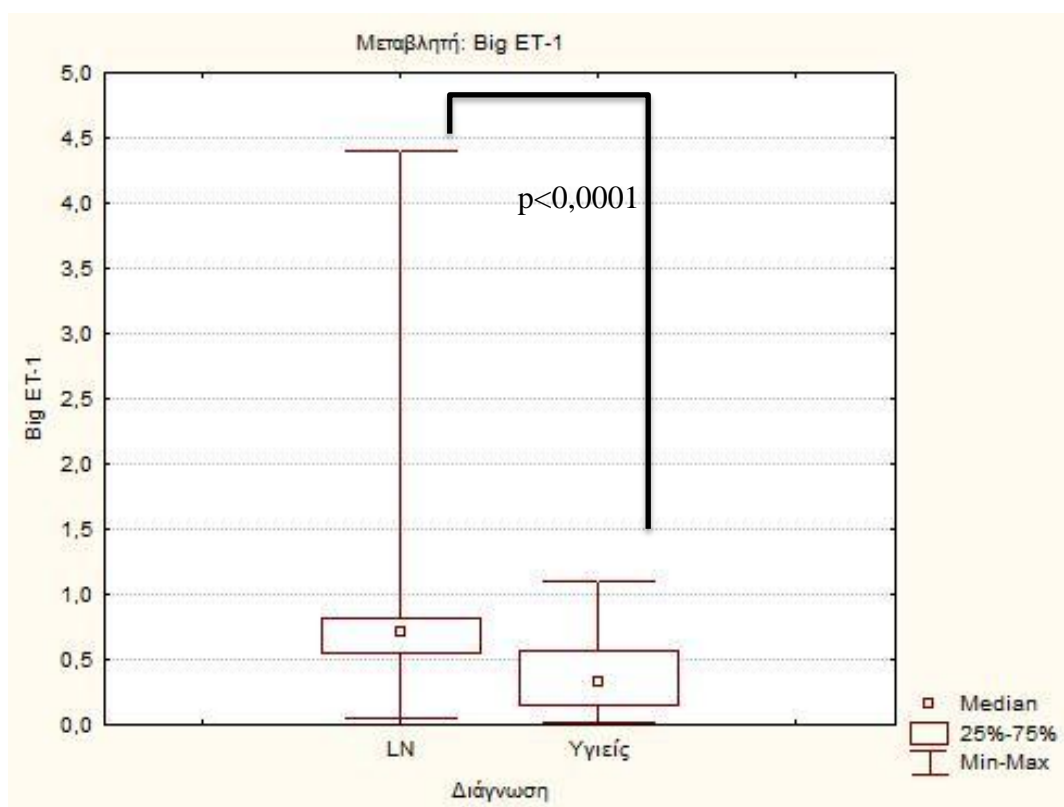


Ακόμη η στατιστική ανάλυση ανέδειξε ότι οι τιμές της Big ET-1 ήταν σημαντικά υψηλότερες στις ασθενείς με Λοβιακή Νεοπλασία (LN, Ομάδα Δ) σε σύγκριση με την Ομάδα E (Υγιείς) (Mann-Whitney U test, $p=0,0001$) (Πίνακας 2.8, Σχήμα 2.5).

Πίνακας 2.8. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της Big ET-1 στο πλάσμα ανάμεσα στις Ομάδες Δ – Ε.

Διάγνωση	N	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
LN	30	0,715	0,0001
Υγιείς	30	0,325	

Σχήμα 2.5. Box & Whisker plot, έκφραση της Big ET-1 στις Ομάδες Δ, Ε.

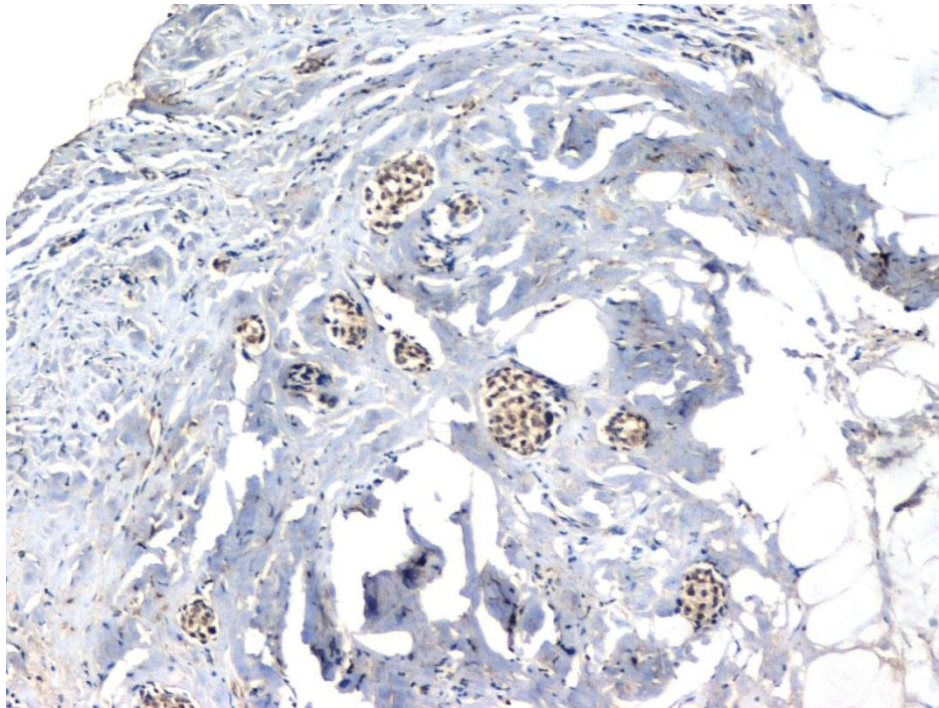


Έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό

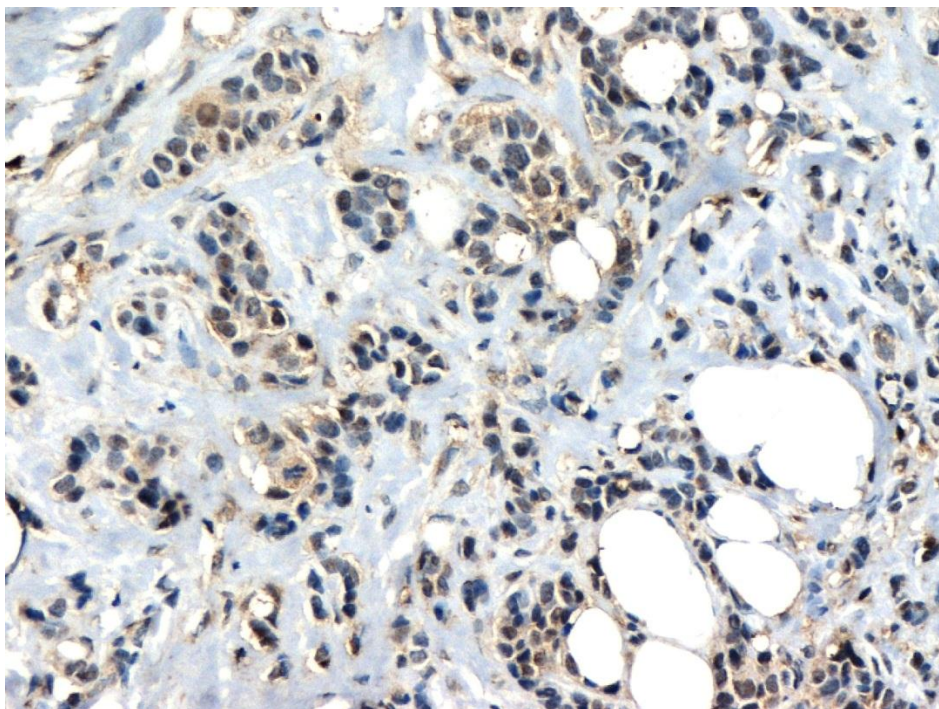
Η μελέτη της έκφρασης της ET-1 στα ιστικά δείγματα των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη ολοκληρώθηκε στις 26/30 ασθενείς της Ομάδας Α (IDC), τις 23/30 ασθενείς της Ομάδας Β (DCIS), τις 29/30 ασθενείς της Ομάδας Γ (YA) και 29/30 ασθενείς της Ομάδας Δ (LN). Από τις ασθενείς της Ομάδας Α (IDC), 3/26 δείγματα (11,5%) χαρακτηρίστηκαν ως θετικά ενώ 23/26 δείγματα (88,5%) ανέδειξαν καθόλου ή ασθενή χρώση (Εικόνες 2.1, 2.2). Από τις ασθενείς με DCIS (Ομάδα Β), 7/23 δείγματα (30,4%) χαρακτηρίστηκαν ως θετικά για την ET-1 (Εικόνα 2.3), ενώ τα υπόλοιπα 16/23 δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά (Εικόνα 2.4). Το αντίστοιχο ποσοστό θετικών ιστικών δειγμάτων ήταν 34,5% για την Ομάδα Γ (YA) (Εικόνες 2.5, 2.6) και 24,1 % για την Ομάδα Δ (LN) (Εικόνες 2.7, 2.8, Πίνακας 2.9). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της ET-1 τόσο μεταξύ των Ομάδων Α, Β και Γ όσο και μεταξύ των Ομάδων Γ και Δ.

Πίνακας 2.9. Έκφραση της ET-1 στον ιστό για την κάθε ομάδα ασθενών

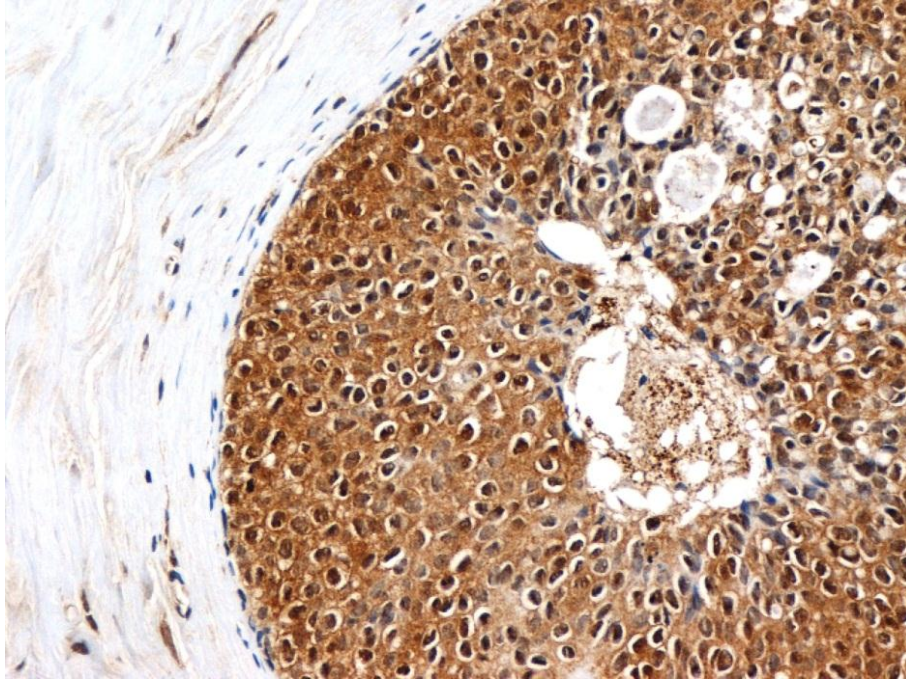
	IDC (n=26)	DCIS (n=23)	YA (n=29)	LN (n=29)
Αρνητικό (Score 0-1)	23 (88,5%)	16 (69,6%)	19 (65,5%)	22 (75,9%)
Θετικό (Score 2-3)	3 (11,5%)	7 (30,4%)	10 (34,5%)	7 (24,1%)



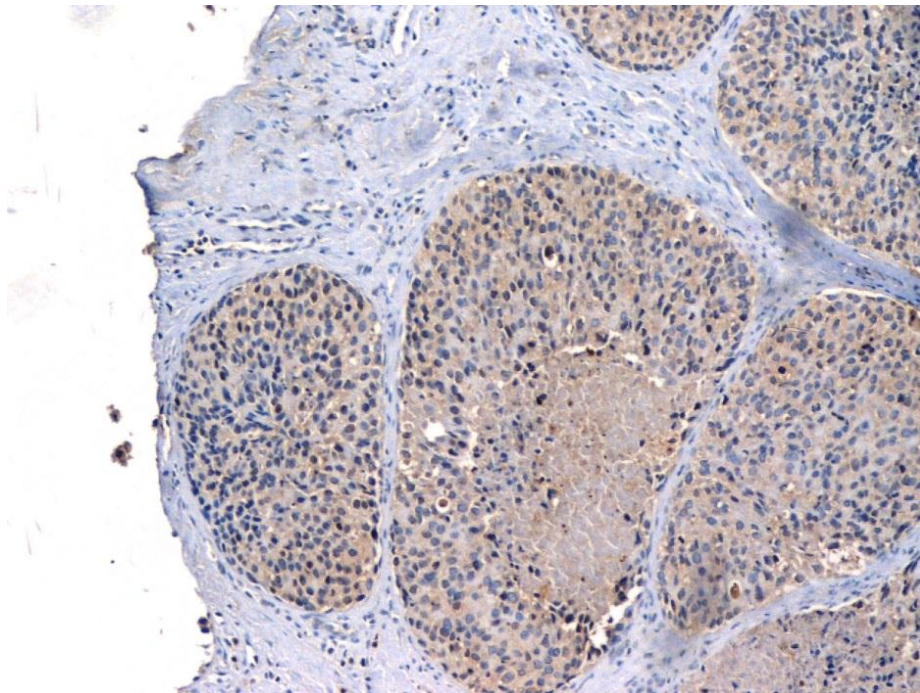
Εικόνα 2.1 Διθητικό πορογενές καρκίνωμα, ασθενής ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X100.



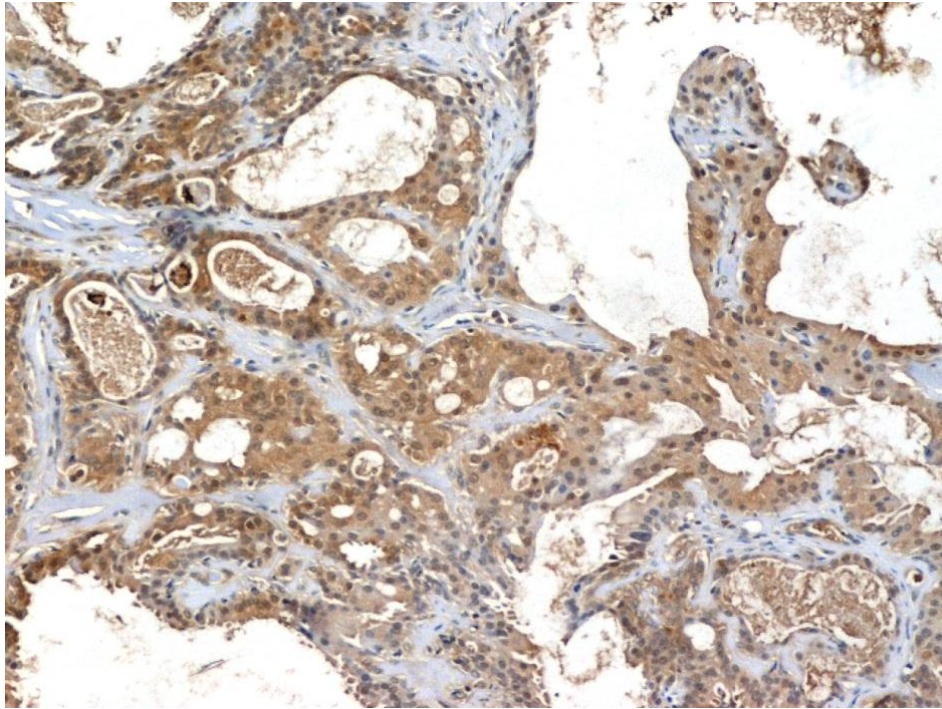
Εικόνα 2.2 Διθητικό πορογενές καρκίνωμα, ασθενής ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X200.



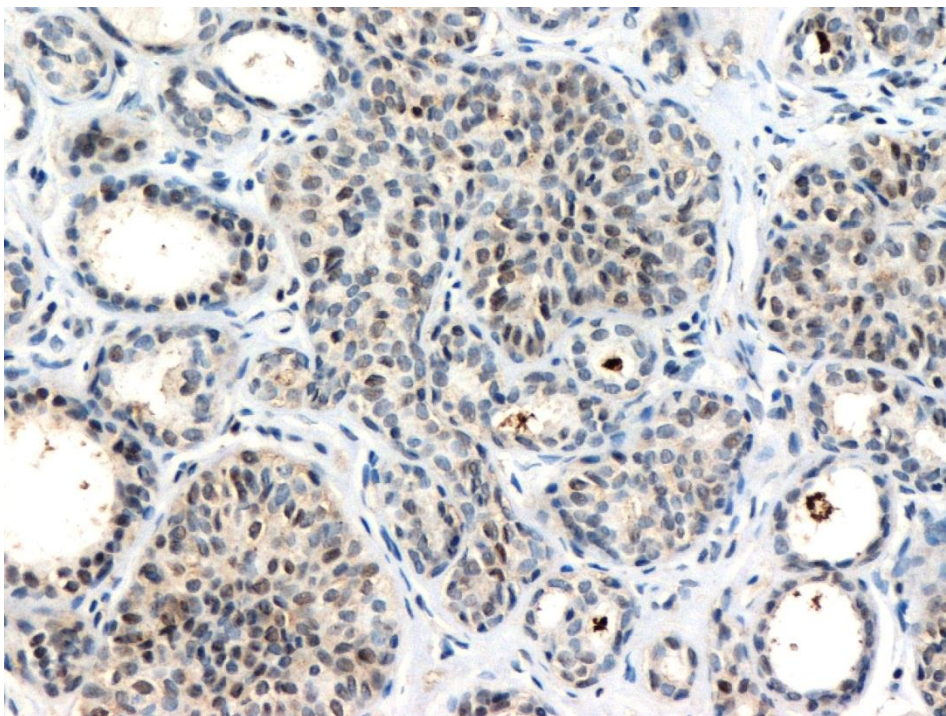
Εικόνα 2.3 Ενδοπορικό (*in situ*) καρκίνωμα, με έντονη κυτταροπλασματική ανοσοέκφραση της ET-1. Άνω αριστερά διακρίνεται μικρό λεμφαγγείο. Μεγέθυνση X200.



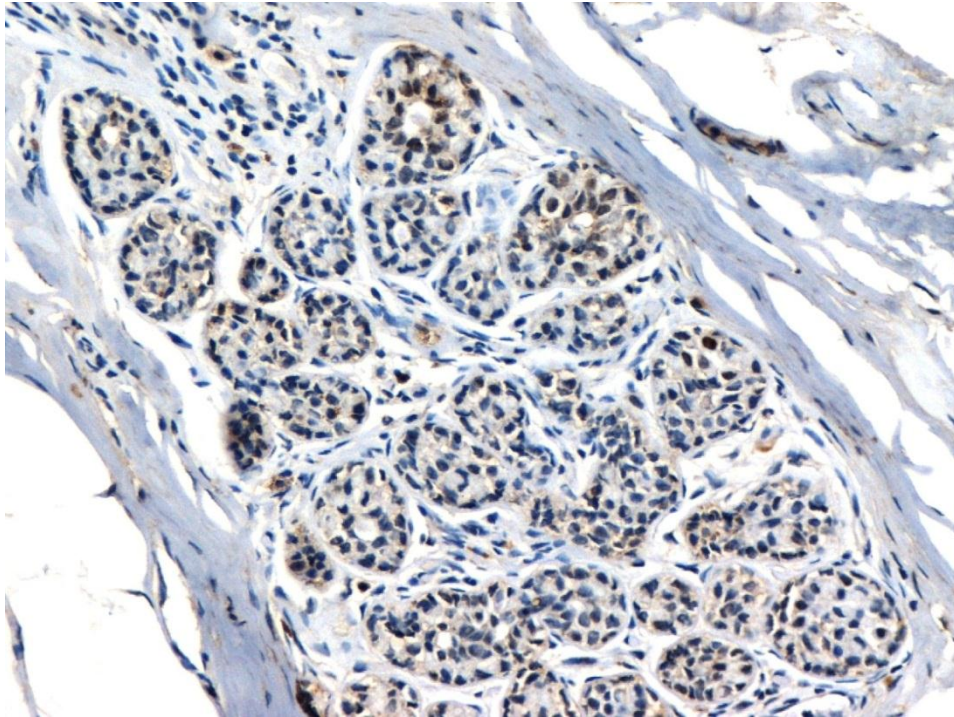
Εικόνα 2.4 Ασθενής ανοσοέκφραση της ET-1 σε ενδοπορικό (*in situ*) καρκίνωμα. Μεγέθυνση X100.



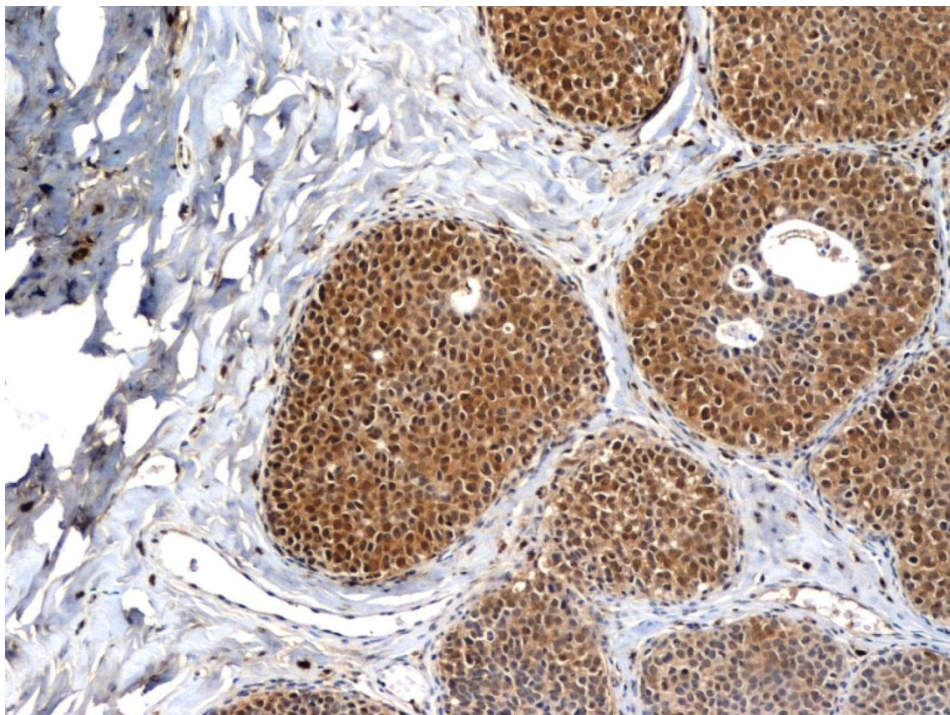
Εικόνα 2.5 Ενδοπορικό θήλωμα, με έντονη ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X100.



Εικόνα 2.6 Έντονη απλή υπερπλασία των πόρων με ασθενή ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X100.



Εικόνα 2.7 Λοβιακή νεοπλασία με ασθενή ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X200.



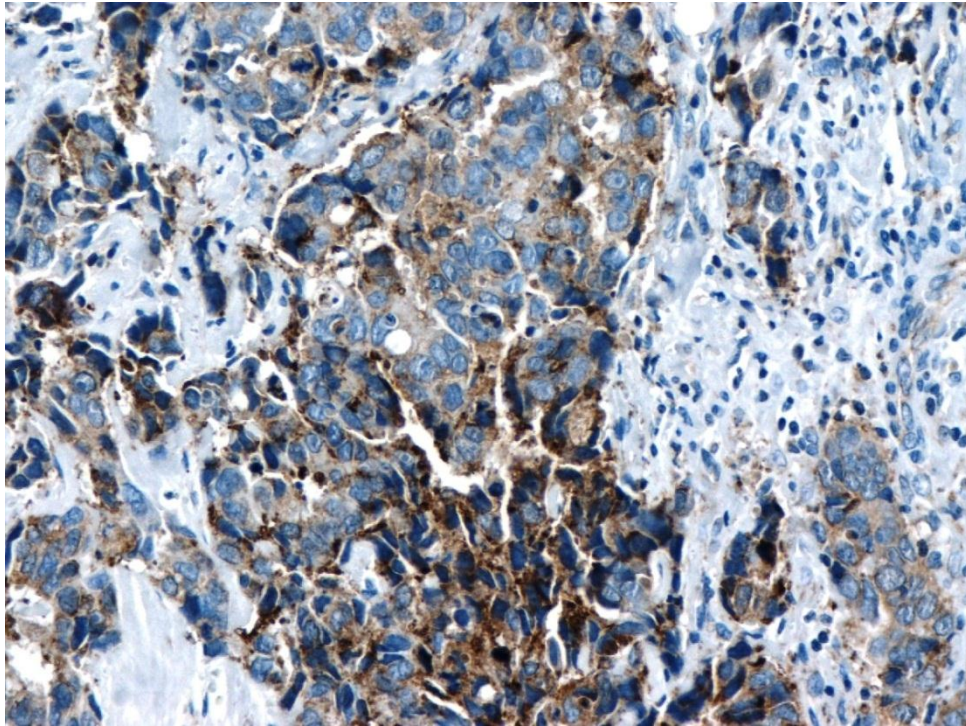
Εικόνα 2.8 Μη διηθητικό (*in situ*) λοβιακό καρκίνωμα με έντονη ανοσοέκφραση της ET-1. Μεγέθυνση X100.

Παράλληλα, η μελέτη της έκφρασης του VEGF ολοκληρώθηκε στις 27/30 ασθενείς της Ομάδας Α (IDC), τις 23/30 ασθενείς της Ομάδας Β (DCIS), τις 29/30 ασθενείς της Ομάδας Γ (YA) και τις 27/30 ασθενείς της Ομάδας Δ (LN). Από τα 27 δείγματα ασθενών με IDC, 19 χαρακτηρίστηκαν ως θετικά για τον VEGF (ποσοστό 70,3%) (Εικόνες 2.9, 2.10), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα δείγματα ασθενών με DCIS ήταν 65,2% (Εικόνα 2.11). Επίσης, θετικά για τον VEGF χαρακτηρίστηκαν το 62,1% των δειγμάτων με Υπερπλαστικές Αλλοιώσεις (Εικόνα 2.12) και το 68,9% των δειγμάτων με LN (Εικόνα 2.13) (Πίνακας 2.10).

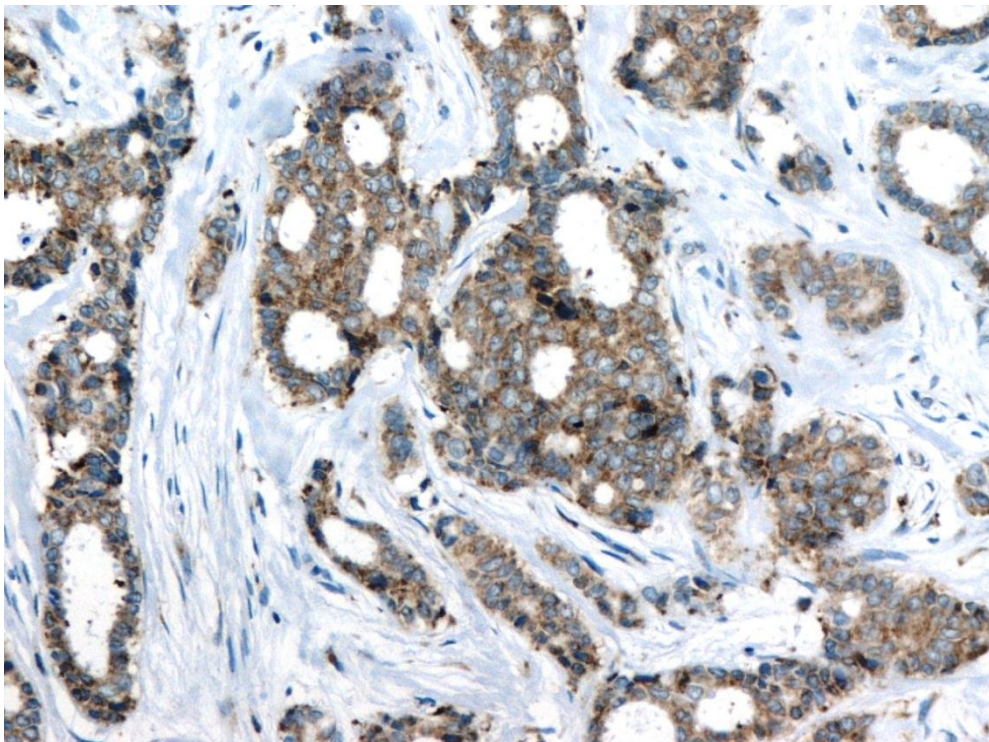
Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF τόσο μεταξύ των Ομάδων Α, Β και Γ όσο και μεταξύ των Ομάδων Γ και Δ.

Πίνακας 2.10. Έκφραση του VEGF στον ιστό για την κάθε ομάδα ασθενών

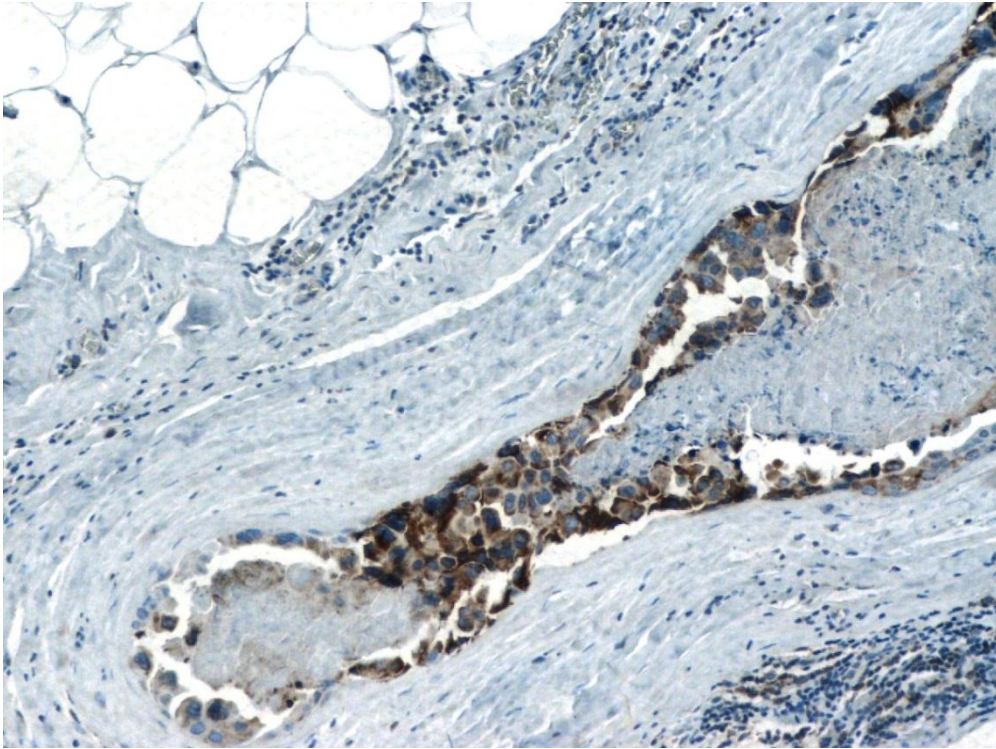
	IDC (n=27)	DCIS (n=23)	YA (n=29)	LN (n=29)
Αρνητικό	8	8	11	9
Θετικό	19	15	18	20



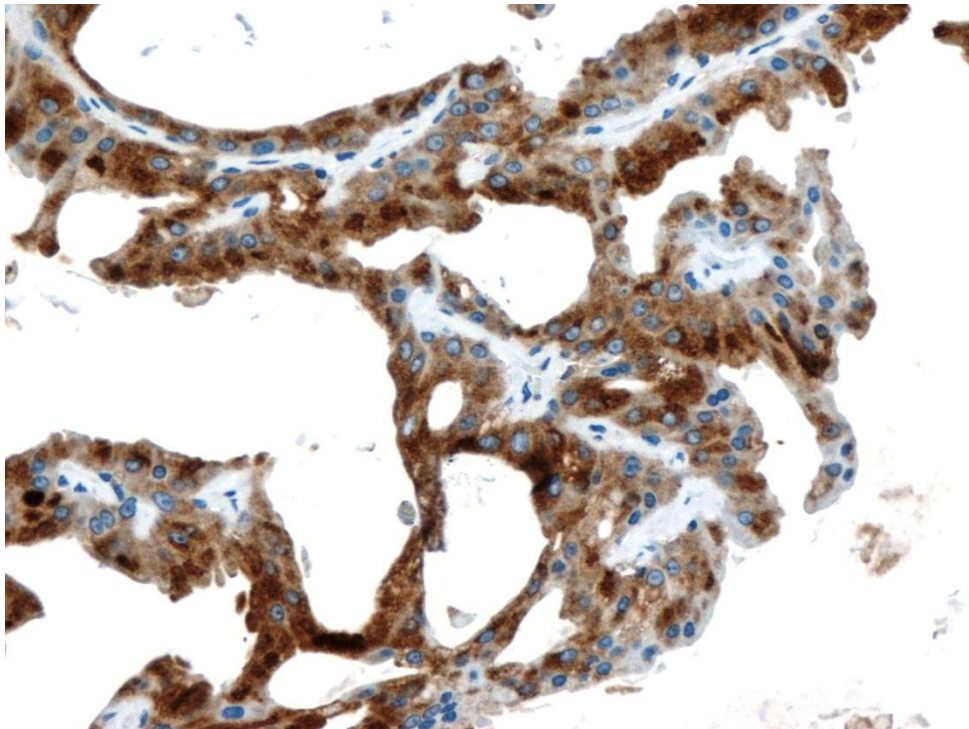
Εικόνα 2.9 Διθητικό πορογενές καρκίνωμα με έντονη ανοσοέκφραση του VEGF.
Μεγέθυνση X200.



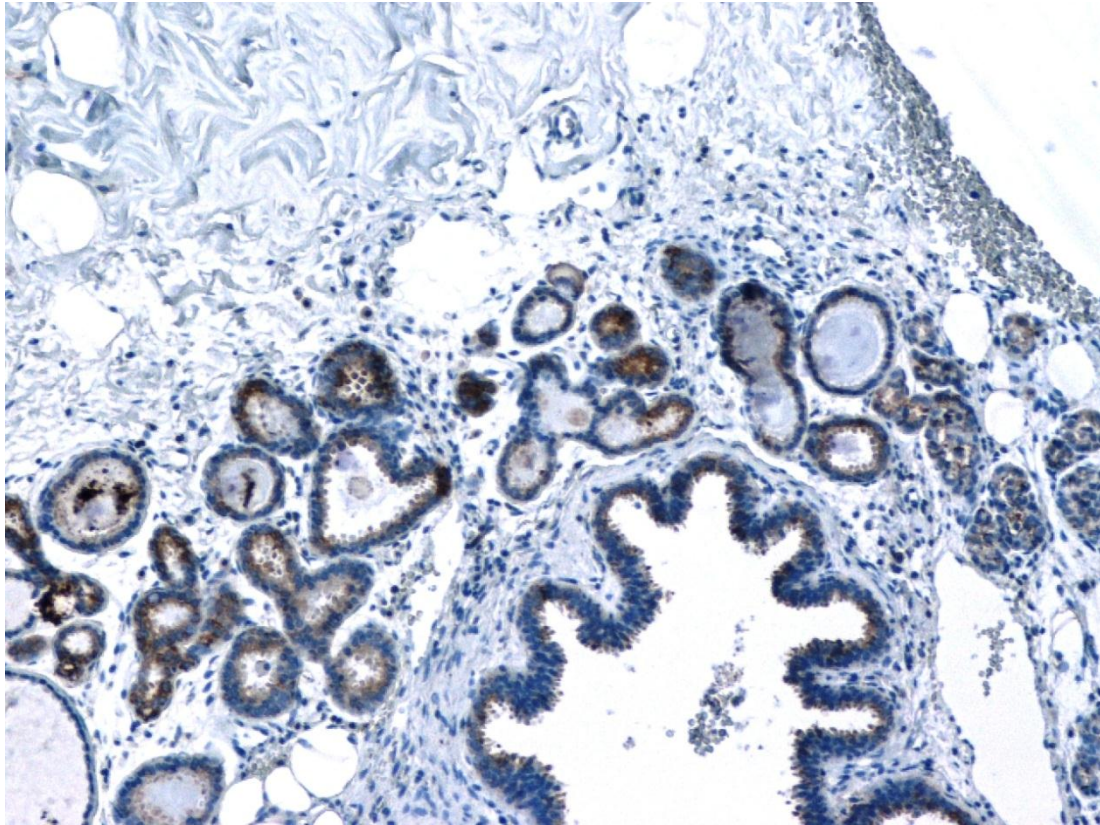
Εικόνα 2.10 Διθητικό πορογενές καρκίνωμα με μέτρια ανοσοέκφραση του VEGF.
Μεγέθυνση X100.



Εικόνα 2.11 Ενδοπορικό (*in situ*) καρκίνωμα φαγεσωρικού τύπου με έντονη έκφραση του VEGF. Μεγέθυνση X100.



Εικόνα 2.12 Ενδοπορικό θήλωμα με αποκρινή μετάπλαση του επιθηλίου και έντονη έκφραση του VEGF. Μεγέθυνση X200.



Εικόνα 2.13 Άτυπη λοβιακή υπερπλασία (δεξιά) με μέτρια ανοσοέκφραση του VEGF, συνυπάρχει με αλλοιώσεις κυλινδρικών κυττάρων (αριστερά). Στις τελευταίες η ανοσοέκφραση του VEGF είναι έντονη. Μεγέθυνση X100.

Μελέτη των τιμών του CEA και του CA 15-3

Οι τιμές του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του CA 15-3 προσδιορίστηκαν για όλες τις ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη καθώς και για την ομάδα ελέγχου. Οι αντίστοιχες τιμές των CEA και CA 15-3 παρατίθενται στον Πίνακα 2.11. Παθολογικές τιμές του CEA δεν παρατηρήθηκαν σε καμία ασθενή. Παθολογικές τιμές του CA 15-3 παρατηρήθηκαν σε 1 ασθενή της Ομάδας Α (IDC), 3 ασθενείς της Ομάδας Β (DCIS), καμία ασθενή της Ομάδας Γ (YA), 1 ασθενή της Ομάδας Δ (LN) και 5 ασθενείς της Ομάδας Ε (Υγιείς).

Πίνακας 2.11. Μέσες τιμές του CEA και του CA 15-3 για την κάθε ομάδα ασθενών.

Διάγνωση	CEA (εύρος) ng/mL	CA 15-3 (εύρος) U/mL
IDC	1,065 (0 – 3,17)	16,01 (1,4 – 37,5)
DCIS	1,18 (0 – 3,03)	20,1 (2,2 – 69,6)
YA	1,584 (0 – 8,32)	13,92 (3,7 – 30,6)
LN	1,13 (0 – 3,22)	14,51 (3,3 – 38,4)
Υγιείς	1,12 (0 – 3,67)	19,26 (1,5 – 50,3)

Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IDC και DCIS

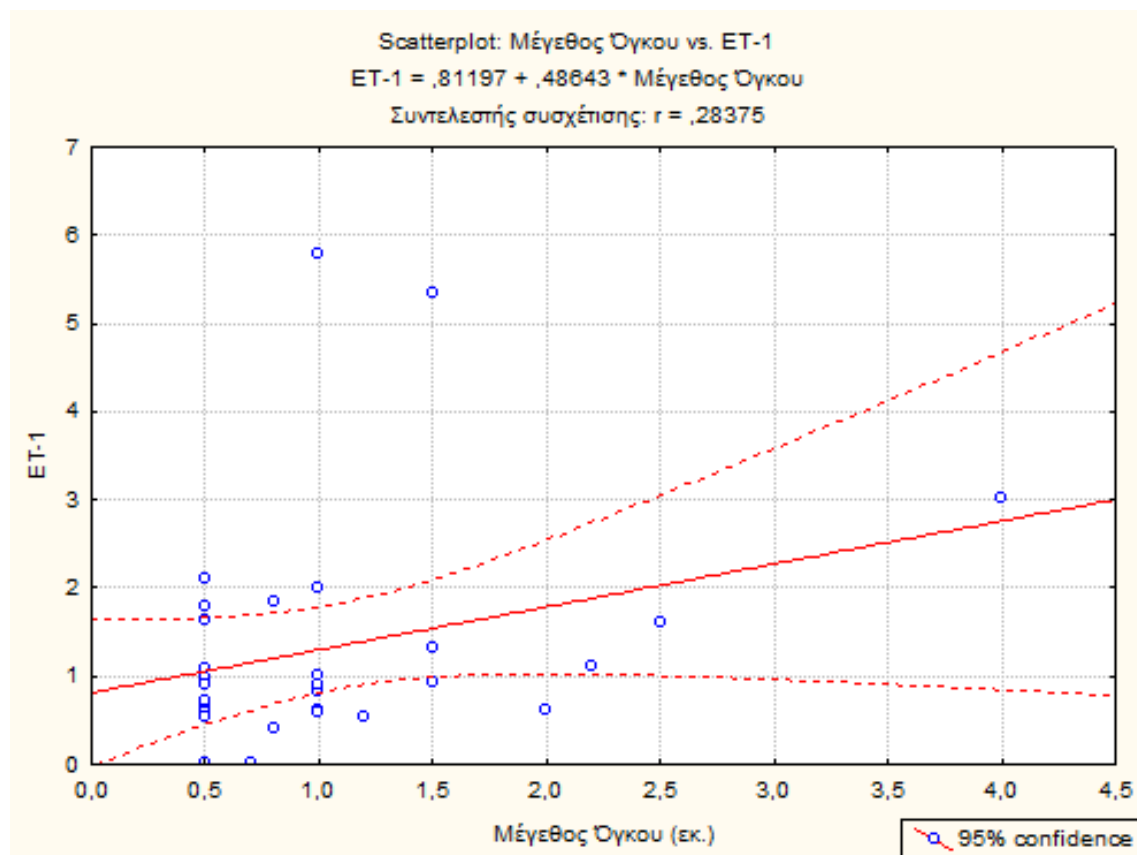
Η έκφραση της ET-1 και της Big ET-1 μελετήθηκε σε σχέση με την ιστολογική ταξινόμηση των IDC, την έκφραση των ER, PR και Her2, το μέγεθος του όγκου, το μέγεθος του όγκου (κατάταξη κατά TNM), την παρουσία λεμφαδενικής διήθησης, και το Στάδιο της νόσου κατά AJCC. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε κάποια σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της ET-1 και της Big ET-1 και τις μελετηθείσες παραμέτρους (Πίνακας 2.12), αλλά παρατηρήθηκε ασθενής συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα με το απόλυτο μέγεθος του όγκου (σε mm) (Pearson's r correlation coefficient, $r=0,28$, Σχήμα 2.6.). Αντίθετα, η έκφραση της Big ET-1 στο πλάσμα δεν παρατηρήθηκε να σχετίζεται με το απόλυτο μέγεθος του όγκου.

Πίνακας 2.12. Επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ασθενών με IDC σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Παράμετρος	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
Ιστολογικό Grade				
Grade I	0,62	NS ¹	0,925	NS ¹
Grade II	0,909		0,646	
Grade III	1,7135		0,682	
Οιστρογονικοί Υποδοχείς (ER)				
ER (+)	0,909	NS ²	0,676	NS ²
ER (-)	0,918		0,689	
Προγεστερονικοί Υποδοχείς (PR)				
PR (+)	0,906	NS ²	0,742	NS ²
PR (-)	0,9555		0,6425	
Υπερέκφραση Her2				
Her2 (+)	0,62	NS ²	0,609	NS ²
Her2 (-)	0,993		0,686	
Μέγεθος Όγκου (TNM)				
pT1	0,903	NS ²	0,689	NS ²
pT2	1,605		0,675	
Λεμφαδενική Διήθηση (TNM)				
N0	0,9555	NS ²	0,6955	NS ²
N1	0,7535		0,675	
Στάδιο Νόσου (AJCC)				
Στάδιο I	0,918	NS ²	0,689	NS ²
Στάδιο II	0,903		0,675	

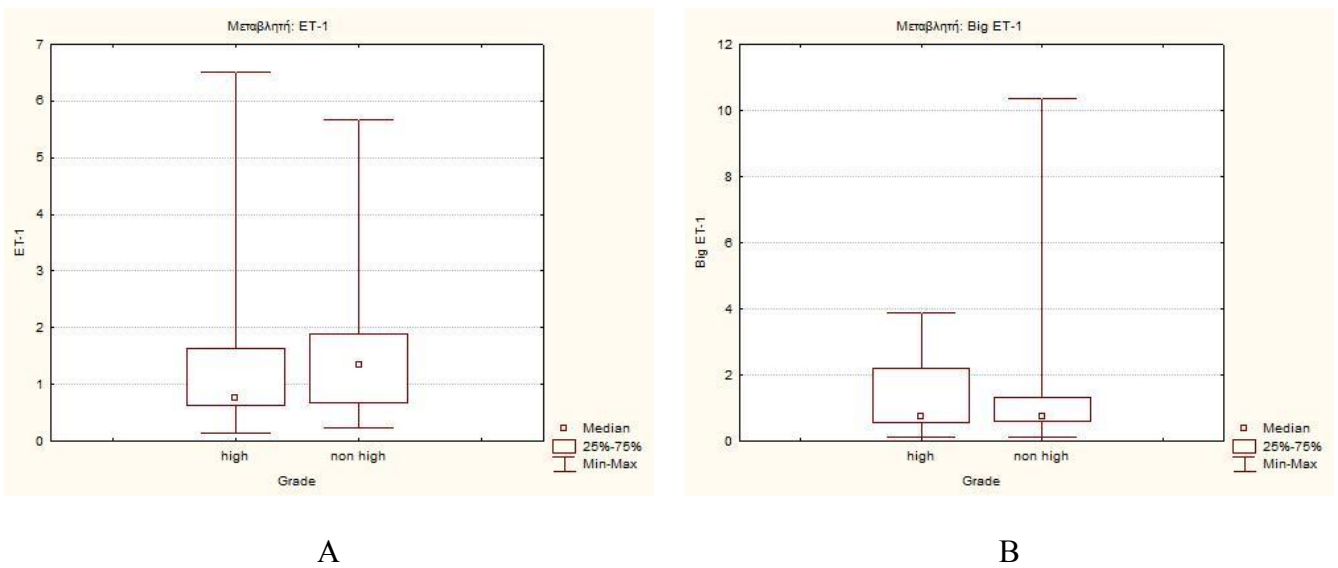
¹Kruskal-Wallis test, ²Mann-Whitney U test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Σχήμα 2.6. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της ET-1 στο πλάσμα ασθενών με IDC με το μέγεθος του όγκου σε εκατοστά.



Όσον αφορά τις ασθενείς με DCIS, η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με το πυρηνικό grade του όγκου (Σχήμα 2.7, Πίνακας 2.13, Mann – Whitney U test).

Σχήμα 2.7. Box & Whisker plots, επίπεδα έκφρασης της ET-1 (A) και Big ET-1 (B) στο πλάσμα σε σχέση με το πυρηνικό grade σε ασθενείς με DCIS.



Πίνακας 2.13. Επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ασθενών με DCIS σε σχέση με το πυρηνικό grade.

Παράμετρος	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
Πυρηνικό Grade				
High grade	0,757	NS ¹	0,729	NS ¹
Non-high grade	1,335		0,762	

¹Mann-Whitney U test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Συγκριτική μελέτη της έκφρασης της ET-1 στον ιστό σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IDC και DCIS.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης της ET-1 ολοκληρώθηκε σε 26/30 ασθενείς με IDC και 23/30 ασθενείς με DCIS. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της ET-1 (score 2 – 3) σε σχέση με το ιστολογικό grade των όγκων, την παρουσία θετικών οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών (PR) υποδοχέων, την υπερέκφραση του Her2, το μέγεθος του όγκου (κατάταξη κατά TNM), την παρουσία λεμφαδενικής διήθησης και το Στάδιο της Νόσου κατά AJCC (Πίνακας 2.14). Ακόμη, η έκφραση της ET-1 στο ιστικό δείγμα δεν βρέθηκε να συσχετίζεται με το απόλυτο μέγεθος του όγκου. Αντίστοιχα, όσον αφορά στα DCIS, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση της ET-1 στον ιστό σε σχέση με το πυρηνικό grade του όγκου (Πίνακας 2.15).

Πίνακας 2.14. Έκφραση της ET-1 στον ιστό σε σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IDC.

Παράμετρος	ET-1		p
	Θετικό	Αρνητικό	
Ιστολογικό Grade			
Grade I	1	7	NS ¹
Grade II	2	10	
Grade III	0	6	
Οιστρογονικοί Υποδοχείς (ER)			
ER (+)	3	19	NS ²
ER (-)	0	4	

Προγεστερονικοί Υποδοχείς (PR)			
PR (+)	2	20	NS ²
PR (-)	1	3	
Υπερέκφραση Her2			
Her2 (+)	0	1	NS ²
Her2 (-)	3	22	
Μέγεθος Όγκου (TNM)			
pT1	3	20	NS ²
pT2	0	3	
Λεμφαδενική Διήθηση (TNM)			
N0	2	16	NS ²
N1	1	7	
Στάδιο Νόσου (AJCC)			
Στάδιο I	2	15	NS ²
Στάδιο II	1	8	
Σύνολο	3	23	

¹Pearson's chi-square, ²Fisher's exact test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Πίνακας 2.15. Έκφραση της ET-1 στον ιστό σε σύγκριση με το πυρηνικό grade σε ασθενείς με DCIS.

Παράμετρος	ET-1		p
	Θετικό	Αρνητικό	
Πυρηνικό Grade			
High grade	5	10	NS ¹
Non – high grade	2	6	
Σύνολο	7	16	

¹Fisher's exact test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του VEGF σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IDC και DCIS.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του VEGF ολοκληρώθηκε σε 27/30 ασθενείς με IDC και 23/30 ασθενείς με DCIS. Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF σε σχέση με το ιστολογικό grade των όγκων, την παρουσία θετικών οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών (PR) υποδοχέων, την υπερέκφραση του Her2, το μέγεθος του όγκου (κατάταξη κατά TNM), την παρουσία λεμφαδενικής διήθησης, το Στάδιο της Νόσου κατά AJCC (Πίνακας 2.16), και το απόλυτο μέγεθος του όγκου. Αντίστοιχα, όσον αφορά τα DCIS, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του VEGF στον ιστό σε σχέση με το πυρηνικό grade του όγκου (Πίνακας 2.17).

Πίνακας 2.16. Έκφραση του VEGF στον ιστό σε σύγκριση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με IDC.

Παράμετρος	VEGF		p
	Θετικό	Αρνητικό	
Ιστολογικό Grade			
Grade I	4	4	NS ¹
Grade II	10	3	
Grade III	5	1	
Οιστρογονικοί Υποδοχείς (ER)			
ER (+)	15	8	NS ²
ER (-)	4	0	

Προγεστερονικοί Υποδοχείς (PR)			
PR (+)	15	7	NS ²
PR (-)	4	1	
Υπερέκφραση Her2			
Her2 (+)	1	0	NS ²
Her2 (-)	18	8	
Μέγεθος Όγκου (TNM)			
pT1	17	7	NS ²
pT2	2	1	
Λεμφαδενική Διήθηση (TNM)			
N0	14	5	NS ²
N1	5	3	
Στάδιο Νόσου (AJCC)			
Στάδιο I	13	5	NS ²
Στάδιο II	6	3	
Σύνολο	19	8	

¹Pearson's chi-square, ²Fisher's exact test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Πίνακας 2.17. Έκφραση του VEGF στον ιστό σε σύγκριση με το πυρηνικό grade σε ασθενείς με DCIS.

Παράμετρος	VEGF		p
	Θετικό	Αρνητικό	
Πυρηνικό Grade			
High grade	11	4	NS ¹
Non – high grade	4	4	
Σύνολο	15	8	

¹Fisher's exact test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Μελέτη της έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό σε ασθενείς με IDC και DCIS.

Στους Πίνακες 2.18 και 2.19 αναγράφονται οι διάμεσες τιμές της ET-1 και της Big ET-1 στις ασθενείς με IDC και DCIS ανάλογα με την έκφραση της ET-1 και του VEGF όπως μετρήθηκε στο ιστικό δείγμα, μαζί με τις αντίστοιχες τιμές του *p*. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν ανέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα των ασθενών τόσο με IDC όσο και με DCIS σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα.

Πίνακας 2.18. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό σε ασθενείς με IDC.

Παράμετρος	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
Έκφραση της ET-1				
Θετικό	0,993	NS ¹	0,446	NS ¹
Αρνητικό	0,995		0,689	
Έκφραση του VEGF				
Θετικό	0,995	NS ¹	0,689	NS ¹
Αρνητικό	0,628		0,681	

¹Mann-Whitney U test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Πίνακας 2.19. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό σε ασθενείς με DCIS.

Παράμετρος	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
Έκφραση της ET-1				
Θετικό	0,801	NS ¹	0,631	NS ¹
Αρνητικό	0,891		0,808	
Έκφραση του VEGF				
Θετικό	0,757	NS ¹	0,803	NS ¹
Αρνητικό	1,271		0,649	

¹Mann-Whitney U test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Μελέτη και συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα σε ασθενείς με IDC και DCIS.

3/29 δείγματα ασθενών με διηθητικό καρκίνωμα των πόρων (IDC) χαρακτηρίστηκαν ως θετικά για έκφραση της ET-1 και 19/27 ως θετικά για έκφραση του VEGF. Όλα (3/3, ποσοστό 100%) τα δείγματα που ήταν θετικά για έκφραση της ET-1 ήταν και θετικά για έκφραση του VEGF. Εντούτοις, δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στα δείγματα ασθενών με IDC (Πίνακας 2.20). Όσον αφορά στα *in situ* (DCIS), 7/23 χαρακτηρίστηκαν ως θετικά για έκφραση της ET-1 και 15/23 ως θετικά για έκφραση του VEGF. 4/7 (42,8%) από τα δείγματα ασθενών με DCIS που ήταν θετικά για

έκφραση της ET-1 ήταν ταυτόχρονα θετικά και για έκφραση του VEGF, ενώ κατά τη στατιστική ανάλυση δεν αναδείχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στα *in situ* καρκινώματα (Πίνακας 2.21).

Πίνακας 2.20. Συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 με την έκφραση του VEGF σε ασθενείς με IDC.

		VEGF		<i>p</i>
		θετικό	Αρνητικό	
ET-1	θετικό	3	0	NS ¹
	αρνητικό	16	7	

¹Chi-square test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Πίνακας 2.21. Συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 με την έκφραση του VEGF σε ασθενείς με DCIS.

		VEGF		<i>p</i>
		θετικό	Αρνητικό	
ET-1	θετικό	3	4	NS ¹
	αρνητικό	12	4	

¹Chi-square test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Μελέτη των επιπέδων έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό σε ασθενείς με Λοβιακή Νεοπλασία

Στον Πίνακα 2.22 αναγράφονται οι διάμεσες τιμές της ET-1 και της Big ET-1 στις ασθενείς με LN ανάλογα με την έκφραση της ET-1 και του VEGF όπως

μετρήθηκε στο ιστικό δείγμα, μαζί με τις αντίστοιχες τιμές του *p*. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δεν ανέδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα των ασθενών με LN σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα.

Πίνακας 2.22. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στον ιστό σε ασθενείς με LN.

Παράμετρος	ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>	Big ET-1 (διάμεση τιμή, fmol/mL)	<i>p</i>
Έκφραση της ET-1				
Θετικό	0,811	NS ¹	0,779	NS ¹
Αρνητικό	0,676		0,686	
Έκφραση του VEGF				
Θετικό	0,87	NS ¹	0,691	NS ¹
Αρνητικό	0,806		0,772	

¹Mann-Whitney U test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

Μελέτη και συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα σε ασθενείς με Λοβιακή Νεοπλασία

Από τα ιστικά δείγματα των ασθενών με Λοβιακή Νεοπλασία, 7/29 χαρακτηρίστηκαν ως θετικά για έκφραση της ET-1 και 20/29 ως θετικά για έκφραση του VEGF. 5/7 (ποσοστό 71,4%) από τα δείγματα που ήταν θετικά για έκφραση της

ET-1 ήταν θετικά και για έκφραση του VEGF. Εντούτοις, στη στατιστική ανάλυση δεν αναδείχθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ET-1 και του VEGF στη Λοβιακή Νεοπλασία (Πίνακας 2.23).

Πίνακας 2.20. Συσχέτιση της έκφρασης της ET-1 με την έκφραση του VEGF σε ασθενείς με LN στο ιστικό δείγμα.

		VEGF		<i>p</i>
		Θετικό	Αρνητικό	
ET-1	θετικό	5	2	NS ¹
	αρνητικό	15	7	

¹Chi-square test, NS: Στατιστικά μη σημαντικό

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σύγχρονη αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού προσανατολίζεται τόσο προς την πρόωμη διάγνωση όσο και προς την εξατομικευμένη θεραπεία, αξιοποιώντας τα τελευταία τεχνολογικά επιτεύγματα στην απεικόνιση των βλαβών του μαστού, και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Η ανακάλυψη βιοδεικτών με προβλεπτική, προγνωστική ή/και διαγνωστική αξία τις τελευταίες δεκαετίες έχει συνεισφέρει πολύ σημαντικά στον τομέα αυτό. Υπό το πρίσμα αυτό, η ET-1, το πρόδρομο μόριό της (Big ET-1) και οι υποδοχείς της μελετώνται διεξοδικά την τελευταία εικοσαετία σχετικά με το ρόλο τους στον καρκίνο του μαστού.

Συγχρόνως, πολλές προκλινικές μελέτες εστιάζουν στην πιθανή στόχευση του συστήματος των ενδοθηλινών στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ο εκλεκτικός ανταγωνισμός των ET_AR έχει βρεθεί να δρα ανασταλτικά στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, ενισχύοντας τη δράση των αναστολέων της αρωματάσης και της φουλβεστράντης και βελτιώνοντας την *in vivo* δραστικότητα της αναστροζόλης [431]. Σε κύτταρα καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο Her2, οι ανταγωνιστές των ET_AR αύξησαν την αντιπολλαπλασιαστική και αντιδιηθητική δράση της στοχευμένης θεραπείας με τραστουζουμάμπη [432]. Σε αντίθεση, τα αποτελέσματα από κλινικές μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα, καρκίνο του προστάτη ή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ήταν απογοητευτικά [433-435]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, φαίνεται πως εκτός από το σύστημα των ενδοθηλινών, υπάρχουν και άλλοι επιπλέον παράγοντες που δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί και επηρεάζουν το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού των υποδοχέων της ET-1 *in vivo* [436].

Τα επίπεδα της ET-1 έχουν μελετηθεί στον ορό ασθενών με νεοπλασίες, όπως των ωοθηκών, του προστάτη, του παχέος εντέρου και του μαστού [429, 437-439]. Σε μελέτες ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών ή του προστάτη, δεν αναδείχθηκε η προγνωστική αξία των επιπέδων έκφρασης της ET-1 στο περιφερικό αίμα [438, 439]. Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 βρέθηκαν να είναι αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου με ή χωρίς ηπατικές μεταστάσεις [437]. Σχετικά με τον καρκίνο του μαστού, υπάρχει μόνο μια μελέτη της οποίας τα αποτελέσματα αναφέρουν αυξημένα επίπεδα της ET-1 στον ορό ασθενών με καρκίνο μαστού και λεμφαδενικές μεταστάσεις σε σχέση με ασθενείς χωρίς μεταστάσεις. Όσον αφορά στην έκφραση της ET-1, η ανάλυσή μας δεν ανέδειξε κάποια διαφορά μεταξύ των επιπέδων της στο πλάσμα ασθενών με διηθητικό ή *in situ* καρκίνο του μαστού και ασθενών με υπερπλαστικές αλλοιώσεις του μαστού χωρίς ατυπία ή υγιείς. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα της ET-1 στο πλάσμα δεν βρέθηκαν να συσχετίζονται σημαντικά με καμία από τις υπό μελέτη κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των διηθητικών και *in situ* καρκίνων.

Το βιολογικά πρόδρομο μόριο της ET-1, η Big ET-1 έχει επίσης προταθεί σαν πιθανός βιολογικός δείκτης της εκκριτικής δραστηριότητας της ET-1 [440]. Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα του καρκίνου του μαστού εκφράζουν το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης (Endothelin Converting Enzyme, ECE), το οποίο μετατρέπει την Big ET-1 σε ET-1 [441]. Τα επίπεδα έκφρασης της Big ET-1 έχουν βρεθεί αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο [442, 443]. Η πρόσφατη μελέτη των Yildirim και συν. [430] αναφέρει ότι τα επίπεδα της Big ET-1 στον ορό ασθενών με καρκίνο του μαστού ήταν υψηλότερα σε σχέση με υγιή ομάδα ελέγχου, με ασθενείς με μεταστατική νόσο που έχει αντιμετωπισθεί με χειρουργική εξαίρεση και/ή χημειοθεραπεία, και με ασθενείς

που έχουν ολοκληρώσει θεραπευτικό σχήμα για αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού [430]. Στην παρούσα μελέτη, παρ' όλο που το δείγμα μας περιλαμβάνει ασθενείς με νόσο μικρότερου Σταδίου από την προαναφερθείσα μελέτη, και με μικρού μεγέθους πρωτοπαθείς όγκους, τα επίπεδα της Big ET-1 στο πλάσμα ήταν υψηλότερα στις ασθενείς με διηθητικό και *in situ* καρκίνωμα του μαστού σε σύγκριση με ασθενείς με υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία και την υγιή ομάδα ελέγχου, αναδεικνύοντας μια σαφή σχέση μεταξύ των επιπέδων της Big ET-1 στο περιφερικό αίμα με την παρουσία κακοήθειας, είτε πρόκειται για διηθητικό, είτε για *in situ* καρκίνωμα. Επιπρόσθετα, όπως και στη μελέτη των Yildirim και συν. [430], τα επίπεδα της Big ET-1 δεν βρέθηκαν να σχετίζονται με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους του όγκου όπως το Στάδιο της νόσου, την παρουσία διηθημένων λεμφαδένων, το μέγεθος και το βαθμό κακοήθειας του όγκου, την παρουσία ορμονικών υποδοχέων ή την υπερέκφραση του Her2.

Τα υπάρχοντα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η ιστική έκφραση της ET-1 αυξάνεται στον καρκίνο του μαστού, ανάλογα με την πρόοδο της νόσου [426]. Πράγματι, αυξημένη έκφραση της ET-1 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε εκχύλισμα ιστού καρκίνου του μαστού, σε σύγκριση με φυσιολογικό μαζικό ιστό και καλοήθεις αλλοιώσεις [427]. Αργότερα, οι Alanen και συν. περιέγραψαν αυξημένη ανοσοϊστοχημική έκφραση της ET-1 σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού και χαμηλή ή μέτρια ανοσοϊστοχημική έκφραση της ET-1 σε φυσιολογικό μαζικό ιστό και καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού [425]. Αυξημένη έκφραση της ET-1, του ET_AR και του ET_BR έχει επίσης αναφερθεί σε ανοσοϊστοχημική μελέτη διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, σε σύγκριση με *in situ* καρκινώματα και φυσιολογικό μαζικό ιστό [426]. Στη μελέτη αυτή, η έκφραση των υποδοχέων ET_AR και ET_BR βρέθηκε να αυξάνεται σταδιακά από το φυσιολογικό ιστό στον *in situ* καρκίνο και το

διηθητικό καρκίνο, υποδεικνύοντας μια πιθανή συσχέτιση της έκφρασης των υποδοχέων της ενδοθηλίνης με την απόκτηση δυσμενέστερων βιολογικών χαρακτηριστικών του όγκου [426]. Παράλληλα, και τα επίπεδα της έκφρασης ET-2 και ET-3, των ισομερών δηλαδή της ET-1, έχουν επίσης βρεθεί αυξημένα στον καρκίνο του μαστού [425, 444].

Η αυξημένη έκφραση της ET-1 και των υποδοχέων της σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού έχει επίσης αναφερθεί ότι συσχετίζεται με βασικές κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που χαρακτηρίζουν επιθετικούς όγκους και αποτελούν αρνητικούς προγνωστικούς παράγοντες, όπως το μεγαλύτερο μέγεθος, η λεμφαγγειακή διήθηση, οι απομακρυσμένες μεταστάσεις, ο υψηλότερος βαθμός κακοήθειας και η υπερέκφραση του Her2 [445]. Στην ίδια μελέτη, η έκφραση της ET-1 και των υποδοχέων της ήταν αυξημένη σε ασθενείς με μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση (Disease Free Survival, DFS) και συνολική επιβίωση (Overall Survival, OS), ενώ η αύξηση της έκφρασης του ET_AR βρέθηκε να συσχετίζεται σημαντικά με μείωση του DFS. Στην παρούσα μελέτη, αυξημένη έκφραση της ET-1 παρατηρήθηκε μόνο στο 11,5% και 30,4% των ασθενών με διηθητικό και *in situ* καρκίνο του μαστού, αντίστοιχα, και δεν υπήρξαν διαφορές στην ιστική έκφραση της ET-1 μεταξύ των ασθενών με διηθητικό καρκίνο, *in situ* καρκίνο και υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία. Επίσης, η έκφραση της ET-1 στον ιστό δεν βρέθηκε να σχετίζεται σημαντικά με τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ή με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που μελετήθηκαν, στις ασθενείς με διηθητικό και *in situ* καρκίνο του μαστού. Η διαφορά των ευρημάτων μας που αφορούν τη μελέτη της ιστικής έκφρασης της ET-1 με τα ήδη υπάρχοντα στη βιβλιογραφία πιθανώς να οφείλεται αφ' ενός στο μικρό μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας (10,7 mm έναντι 27,4 mm στη μελέτη των Wulfing

και συν. [445]) και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του δείγματός μας που αποτελείται κυρίως από ασθενείς με νόσο Σταδίου I (ποσοστό 70%), και αφ' ετέρου στο σχετικά μικρό αριθμό ιστικών δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Στη μελέτη μας, η αυξημένη έκφραση της Big ET-1 στο πλάσμα των ασθενών με διηθητικό και *in situ* καρκίνο του μαστού σε σχέση με ασθενείς με υπερπλαστικές αλλοιώσει και υγιή ομάδα ελέγχου, δεν παρατηρήθηκε να συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης ET-1, τόσο στο πλάσμα όσο και στο ιστικό δείγμα. Η «παράδοξη» αυτή παρατήρηση θα μπορούσε πιθανώς να οφείλεται σε διαταραχή της έκφρασης ή της δραστηριότητας του ECE, η οποία και επηρεάζει το ισοζύγιο μεταξύ του πρόδρομου μορίου, δηλαδή της Big ET-1, και της δραστηκής πρωτεΐνης ET-1. Η μοναδική αναφορά σχετικά με τη μεταβολή της έκφρασης των μορίων που συμμετέχουν στη σύνθεση και την αποδόμηση της ET-1 προέρχεται από τους Smollich και συν. [267], όπου παρατηρήθηκε μια μόλις υποσημαινόμενη μείωση στην έκφραση του ECE σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικό μαζικό ιστό, αλλά σημαντική μείωση στην έκφραση της νεπριλυσίνης (NEP), του μορίου που επάγει την αποδόμηση της ET-1.

Μια άλλη αιτία της παρατήρησης αυξημένης έκφρασης της Big ET-1, αλλά όχι της ET-1, που διαπιστώθηκε στο δείγμα μας, είναι πιθανό να εξηγείται λαμβάνοντας υπόψιν τις ιδιότητες των δυο πρωτεϊνών: η μεν ET-1 έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 90 δευτερόλεπτα ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής της προενδοθηλίνης (Big-ET-1) περίπου 20 λεπτά [440]. Έτσι, με δεδομένη την έκφραση του ECE στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού, έχει υποστηριχθεί ότι η μέτρηση της έκφρασης της Big ET-1 αποτελεί πιο αξιόπιστο δείκτη ενεργοποίησης του συστήματος των ενδοθηλινών απ' ότι η μέτρηση της έκφρασης της ET-1 [440].

Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρ' όλο που η απορρύθμιση του συστήματος των ενδοθηλινών είναι κοινό εύρημα μεταξύ των υφιστάμενων μελετών, και η υπερέκφραση της ET-1 σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού περιγράφεται σχεδόν ομοιόμορφα σε ποσοστά γύρω στο 40% των δειγμάτων στις μέχρι σήμερα μελέτες [420, 426, 428, 446], η ακριβής τάση υπερ- ή υποέκφρασης των ενδοθηλινών και των υποδοχέων τους παραμένει υπό συζήτηση [425]. Παράλληλα, οι απόψεις για την εντόπιση των υποδοχέων της ενδοθηλίνης στον μαζικό ιστό είναι εξίσου αντικρουόμενες. Τα ευρήματα σε καλλιέργειες επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων καρκίνου του μαστού υποδεικνύουν ότι η ET-1 που απελευθερώνεται από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού μπορεί να δρα με παρακρινή τρόπο στα γειτονικά κύτταρα του στρώματος [447]. Οι ινοβλάστες των στρωματικών κυττάρων είναι γνωστό ότι διαθέτουν υποδοχείς για την ET. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται απουσία υποδοχέων της ET στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, από την άλλη όμως νεότεροι ερευνητές περιγράφουν έκφραση ET_AR και ET_BR και σε επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του μαστού [426, 428].

Η αγγειογένεση είναι μια ζωτικής σημασίας διεργασία κατά την ανάπτυξη ενός όγκου. Για το λόγο αυτό, οι αντιαγγειογενετικές θεραπείες παρουσιάζουν πολύ έντονο ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Ο ρόλος της ET-1 και των υποδοχέων της στην αγγειογένεση έχει μελετηθεί σε σχέση με την έκφραση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), ο οποίος θεωρείται ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην αγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού [448, 449]. Αυξημένη έκφραση της ET-1, του ET_AR και του ET_BR έχει βρεθεί να σχετίζεται με αυξημένη έκφραση του VEGF και αυξημένη μικροαγγειακή πυκνότητα (microvessel density, MVD) σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού [397]. Στην παρούσα μελέτη, δεν αναδείχθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ

των επιπέδων της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ή της έκφρασης της ET-1 στον ιστό ασθενών με διηθητικό ή *in situ* καρκίνωμα του μαστού, με την έκφραση του VEGF. Επιπρόσθετα, η ανάλυσή μας δεν ανέδειξε κάποια συσχέτιση της έκφρασης του VEGF με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τόσο των διηθητικών όσο και των *in situ* καρκινικών όγκων του μαστού.

Όσον αφορά στην έκφραση της ET-1 στη λοβιακή νεοπλασία, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία που να εστιάζουν αποκλειστικά σε αυτή την κατηγορία νεοπλασιών του μαζικού αδένου. Οι μελέτες των Wulfing και συν. που αναφέρθηκαν παραπάνω και αναδεικνύουν αυξημένη έκφραση της ET-1 σε ασθενείς με διηθητικό ή *in situ* καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν, σε μικρά ποσοστά, δείγματα λοβιακού καρκίνου του μαστού, χωρίς όμως υπο-ανάλυση της κατηγορίας αυτής [428, 449-451]. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα της Big ET-1 ανευρίσκονται αυξημένα σε δείγμα ασθενών με όλο το φάσμα των αλλοιώσεων που περικλείονται στον όρο «Λοβιακή Νεοπλασία», σε σχέση με την υγιή ομάδα ελέγχου, ενώ η διαφορά αυτή δεν παρατηρείται για την ET-1. Έτσι, η Big ET-1 αναδεικνύεται ως πιθανός βιολογικός δείκτης και για την λοβιακή νεοπλασία, και παράλληλα διαφαίνεται η ανάγκη εμπειριστατωμένης μελέτης της έκφρασης των ενδοθηλινών και των υποδοχέων τους στις αλλοιώσεις του τύπου αυτού.

2.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε αφ' ενός στον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα, και αφ' ετέρου στην ιστική έκφραση της ET-1, σε ασθενείς με διηθητικό καρκίνο του μαστού, *in situ* καρκίνο του μαστού, υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία και λοβιακή νεοπλασία. Τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα και η ιστική έκφραση της ET-1 μελετήθηκαν τόσο στις διαφορετικές ομάδες ασθενών και όσο και στην ομάδα ελέγχου, αλλά και σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων και την ιστική έκφραση του VEGF. Τα συμπεράσματα της μελέτης μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

1. Τα επίπεδα της Big ET-1, αλλά όχι της ET-1, παρατηρούνται αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού και *in situ* πορογενές καρκίνωμα του μαστού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
2. Τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα των ασθενών με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού δεν συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά τόσο με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοήθειας, η έκφραση ορμονικών υποδοχέων, η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Her2, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, το μέγεθος του όγκου (κατάταξη κατά TNM) και το Στάδιο της νόσου κατά AJCC, όσο και με την έκφραση της ET-1 και του VEGF στο ιστικό δείγμα.
3. Τα επίπεδα της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα ασθενών με *in situ* πορογενές καρκίνωμα του μαστού δεν βρέθηκε να συσχετίζονται στατιστικώς σημαντικά με το πυρηνικό grade του όγκου.

4. Η έκφραση της ET-1 και του VEGF σε ιστικά δείγματα ασθενών με διηθητικό και *in situ* πορογενές καρκίνωμα του μαστού δεν διαπιστώθηκε να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την έκφραση της ET-1 σε ιστικά δείγματα ασθενών με υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία.

5. Η έκφραση της ET-1 σε ιστικά δείγματα ασθενών με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού δεν εμφανίζεται να συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά τόσο με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοήθειας, η έκφραση ορμονικών υποδοχέων, η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Her2, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, το μέγεθος του όγκου (κατάταξη κατά TNM) και το Στάδιο της νόσου κατά AJCC, όσο και με την ιστική έκφραση του VEGF.

6. Η έκφραση της ET-1 σε ιστικά δείγματα ασθενών με *in situ* πορογενές καρκίνωμα του μαστού δεν εντοπίζεται να συσχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με το πυρηνικό grade του όγκου.

7. Τα επίπεδα της έκφρασης της Big ET-1, αλλά όχι της ET-1, παρατηρούνται αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με λοβιακή νεοπλασία σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η έκφραση της ET-1 και του VEGF σε ιστικά δείγματα ασθενών με λοβιακή νεοπλασία δεν ελέγχεται να διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την έκφραση της ET-1 και του VEGF σε ιστικά δείγματα ασθενών με υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία. Στις ασθενείς με λοβιακή νεοπλασία, η έκφραση της ET-1 δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της ET-1 και της Big ET-1 στο πλάσμα και ιστική έκφραση του VEGF.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., and Ward, E., Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010. 60(5): p. 277-300.
2. Howlader, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Garshell, J., Neyman, N., Altekruse, S.F., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. 2012, Bethesda, MD: National Cancer Institute.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10
4. Bowcock, A.M., *Breast Cancer;Molecular genetics,Pathogenesis, and Therapeutics*. 1st ed. Contemporary Cancer Researche, ed. J.A. Nickoloff. Vol. 1. 1999, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 582.
5. Garfinkel, L., Boring, C.C., and Heath, C.W., Jr., Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer*, 1994. 74(1 Suppl): p. 222-7.
6. Guinee, V.F., *Epidemiology of breast cancer*, in *THE BREAST: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*, E.M.C.I. Kyrby I. Bland, Editor. 1999, W.B Saunders Company: Philadelphia. p. 339-3551.
7. Berry, D.A., Cronin, K.A., Plevritis, S.K., Fryback, D.G., Clarke, L., Zelen, M., et al., Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med*, 2005. 353(17): p. 1784-92.
8. SEER. *Cancer of the Breast - SEER Stat Fact Sheets*.
9. *American Cancer Society Breast Cancer Facts & Figures 2009 - 2010*, American Cancer Society, Inc.: Atlanta.
10. Hsieh, C.C., Trichopoulos, D., Katsouyanni, K., and Yuasa, S., Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*, 1990. 46(5): p. 796-800.
11. Colditz, G.A. and Rosner, B., Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 2000. 152(10): p. 950-64.
12. Hamilton, A.S. and Mack, T.M., Puberty and genetic susceptibility to breast cancer in a case-control study in twins. *N Engl J Med*, 2003. 348(23): p. 2313-22.
13. Kelsey, J.L., Gammon, M.D., and John, E.M., Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*, 1993. 15(1): p. 36-47.
14. Rosner, B., Colditz, G.A., and Willett, W.C., Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*, 1994. 139(8): p. 819-35.
15. Bruzzi, P., Negri, E., La Vecchia, C., Decarli, A., Palli, D., Parazzini, F., and Del Turco, M.R., Short term increase in risk of breast cancer after full term pregnancy. *BMJ*, 1988. 297(6656): p. 1096-8.
16. Martin, R.M., Middleton, N., Gunnell, D., Owen, C.G., and Smith, G.D., Breast-feeding and cancer: the Boyd Orr cohort and a systematic review with meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(19): p. 1446-57.
17. Stuebe, A.M., Willett, W.C., Xue, F., and Michels, K.B., Lactation and incidence of premenopausal breast cancer: a longitudinal study. *Arch Intern Med*, 2009. 169(15): p. 1364-71.

18. Zheng, T., Holford, T.R., Mayne, S.T., Owens, P.H., Zhang, Y., Zhang, B., Boyle, P., and Zahm, S.H., Lactation and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. *Br J Cancer*, 2001. 84(11): p. 1472-6.
19. Colditz, G.A., Willett, W.C., Hunter, D.J., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Hennekens, C.H., and Rosner, B.A., Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study. *Jama*, 1993. 270(3): p. 338-43.
20. Slattery, M.L. and Kerber, R.A., A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database. *Jama*, 1993. 270(13): p. 1563-8.
21. Dupont, W.D. and Page, D.L., Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*, 1985. 312(3): p. 146-51.
22. Dupont, W.D., Page, D.L., Parl, F.F., 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*, 1994. 331(1): p. 10-5.
23. Henderson, I.C., Risk factors for breast cancer development. *Cancer*, 1993. 71(6 Suppl): p. 2127-40.
24. Degnim, A.C., Visscher, D.W., Berman, H.K., Frost, M.H., Sellers, T.A., Vierkant, R.A., et al., Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study. *J Clin Oncol*, 2007. 25(19): p. 2671-7.
25. Fisher, B., Dignam, J., Wolmark, N., Wickerham, D.L., Fisher, E.R., Mamounas, E., et al., Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet*, 1999. 353(9169): p. 1993-2000.
26. Eliassen, A.H., Colditz, G.A., Rosner, B., Willett, W.C., and Hankinson, S.E., Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *Jama*, 2006. 296(2): p. 193-201.
27. Lahmann, P.H., Hoffmann, K., Allen, N., van Gils, C.H., Khaw, K.T., Tehard, B., et al., Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*, 2004. 111(5): p. 762-71.
28. Morimoto, L.M., White, E., Chen, Z., Chlebowski, R.T., Hays, J., Kuller, L., et al., Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control*, 2002. 13(8): p. 741-51.
29. Key, T.J., Appleby, P.N., Reeves, G.K., Roddam, A., Dorgan, J.F., Longcope, C., et al., Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, 2003. 95(16): p. 1218-26.
30. Maruti, S.S., Willett, W.C., Feskanich, D., Rosner, B., and Colditz, G.A., A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(10): p. 728-37.
31. Dallal, C.M., Sullivan-Halley, J., Ross, R.K., Wang, Y., Deapen, D., Horn-Ross, P.L., et al., Long-term recreational physical activity and risk of invasive and in situ breast cancer: the California teachers study. *Arch Intern Med*, 2007. 167(4): p. 408-15.
32. Bernstein, L., Patel, A.V., Ursin, G., Sullivan-Halley, J., Press, M.F., Deapen, D., et al., Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women. *J Natl Cancer Inst*, 2005. 97(22): p. 1671-9.

33. Mertens, A.J., Sweeney, C., Shahar, E., Rosamond, W.D., and Folsom, A.R., Physical activity and breast cancer incidence in middle-aged women: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 97(2): p. 209-14.
34. McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams-Campbell, L.L., Woods, N., and Ockene, J., Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Jama*, 2003. 290(10): p. 1331-6.
35. Friedenreich, C.M., Bryant, H.E., and Courneya, K.S., Case-control study of lifetime physical activity and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*, 2001. 154(4): p. 336-47.
36. Yang, D., Bernstein, L., and Wu, A.H., Physical activity and breast cancer risk among Asian-American women in Los Angeles: a case-control study. *Cancer*, 2003. 97(10): p. 2565-75.
37. Lee, I.M., Cook, N.R., Rexrode, K.M., and Buring, J.E., Lifetime physical activity and risk of breast cancer. *Br J Cancer*, 2001. 85(7): p. 962-5.
38. McTiernan, A., Tworoger, S.S., Rajan, K.B., Yasui, Y., Sorenson, B., Ulrich, C.M., et al., Effect of exercise on serum androgens in postmenopausal women: a 12-month randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. 13(7): p. 1099-105.
39. Chen, W.Y., Rosner, B., Hankinson, S.E., Colditz, G.A., and Willett, W.C., Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *Jama*, 2011. 306(17): p. 1884-90.
40. Bao, P.P., Shu, X.O., Gao, Y.T., Zheng, Y., Cai, H., Deming, S.L., et al., Association of hormone-related characteristics and breast cancer risk by estrogen receptor/progesterone receptor status in the shanghai breast cancer study. *Am J Epidemiol*, 2011. 174(6): p. 661-71.
41. Band, P.R., Le, N.D., Fang, R., and Deschamps, M., Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet*, 2002. 360(9339): p. 1044-9.
42. Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W., Jr., et al., Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*, 2002. 87(11): p. 1234-45.
43. Chaturvedi, P., Does smoking increase the risk of breast cancer? *Lancet Oncol*, 2003. 4(11): p. 657-8; discussion 8.
44. Cui, Y., Miller, A.B., and Rohan, T.E., Cigarette smoking and breast cancer risk: update of a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. 100(3): p. 293-9.
45. Reynolds, P., Hurley, S., Goldberg, D.E., Anton-Culver, H., Bernstein, L., Deapen, D., et al., Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. *J Natl Cancer Inst*, 2004. 96(1): p. 29-37.
46. Peck, D.R. and Lowman, R.M., Estrogen and the postmenopausal breast. Mammographic considerations. *Jama*, 1978. 240(16): p. 1733-5.
47. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 1997. 350(9084): p. 1047-59.

48. Van Leeuwen, F.E. and Rookus, M.A., Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet*, 2003. 362(9392): p. 1330; author reply -1.
49. Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., et al., Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 2002. 288(3): p. 321-33.
50. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet*, 1996. 347(9017): p. 1713-27.
51. Campbell, H.S., Fletcher, S.W., Pilgrim, C.A., Morgan, T.M., and Lin, S., Improving physicians' and nurses' clinical breast examination: a randomized controlled trial. *Am J Prev Med*, 1991. 7(1): p. 1-8.
52. Osteen, R.T., Cady, B., Chmiel, J.S., Clive, R.E., Doggett, R.L., Friedman, M.A., et al., 1991 national survey of carcinoma of the breast by the Commission on Cancer. *J Am Coll Surg*, 1994. 178(3): p. 213-9.
53. Pilgrim, C., Lannon, C., Harris, R.P., Cogburn, W., and Fletcher, S.W., Improving clinical breast examination training in a medical school: a randomized controlled trial. *J Gen Intern Med*, 1993. 8(12): p. 685-8.
54. Wiecha, J.M. and Gann, P., Provider confidence in breast examination. *Fam Pract Res J*, 1993. 13(1): p. 37-41.
55. Leitch, A.M., Dodd, G.D., Costanza, M., Linver, M., Pressman, P., McGinnis, L., and Smith, R.A., American Cancer Society guidelines for the early detection of breast cancer: update 1997. *CA Cancer J Clin*, 1997. 47(3): p. 150-3.
56. *ABC of Breast Diseases*. 4th ed, ed. J.M. Dixon. 2012, Malden, Mass.: BMJ Books.
57. *Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS) Atlas*. 5th ed. 2009, Reston, VA: American College of Radiology.
58. Weaver, D.L., Rosenberg, R.D., Barlow, W.E., Ichikawa, L., Carney, P.A., Kerlikowske, K., et al., Pathologic findings from the Breast Cancer Surveillance Consortium: population-based outcomes in women undergoing biopsy after screening mammography. *Cancer*, 2006. 106(4): p. 732-42.
59. Tabar, L., Vitak, B., Chen, H.H., Duffy, S.W., Yen, M.F., Chiang, C.F., Krusemo, U.B., Tot, T., and Smith, R.A., The Swedish Two-County Trial twenty years later. Updated mortality results and new insights from long-term follow-up. *Radiol Clin North Am*, 2000. 38(4): p. 625-51.
60. Tabar, L., Vitak, B., Chen, H.H., Yen, M.F., Duffy, S.W., and Smith, R.A., Beyond randomized controlled trials: organized mammographic screening substantially reduces breast carcinoma mortality. *Cancer*, 2001. 91(9): p. 1724-31.
61. Nelson, H.D., Tyne, K., Naik, A., Bougatsos, C., Chan, B.K., and Humphrey, L., Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 2009. 151(10): p. 727-37, W237-42.
62. Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., Forbes, J., Edwards, R., Ashley, S., and Boyle, P., Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*, 2003. 361(9354): p. 296-300.
63. Gotzsche, P.C. and Nielsen, M., Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(4): p. CD001877.

64. Freedman, D.A., Petitti, D.B., and Robins, J.M., On the efficacy of screening for breast cancer. *Int J Epidemiol*, 2004. 33(1): p. 43-55.
65. Pelikan, S. and Moskowitz, M., Effects of lead time, length bias, and false-negative assurance on screening for breast cancer. *Cancer*, 1993. 71(6): p. 1998-2005.
66. Tabar, L., Fagerberg, G., Duffy, S.W., Day, N.E., Gad, A., and Grontoft, O., Update of the Swedish two-county program of mammographic screening for breast cancer. *Radiol Clin North Am*, 1992. 30(1): p. 187-210.
67. Hofvind, S., Vacek, P.M., Skelly, J., Weaver, D.L., and Geller, B.M., Comparing screening mammography for early breast cancer detection in Vermont and Norway. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(15): p. 1082-91.
68. Dodd, G.D., Present status of thermography, ultrasound and mammography in breast cancer detection. *Cancer*, 1977. 39(6 Suppl): p. 2796-805.
69. Radiation, N.C.o., *Mammography-A User's Guide, NCRP Report No. 85: National Council on Radiation Protection and Measurements*. paperback ed. 1986, Bethesda: National Council on Radiation.
70. NHS Breast Screening Programme, *National survey of mammographic image quality and dose in the UK Breast Screening Programme*. 1998, NHSBSP; 37.
71. Stokell, P.J. and Robb, J.D., *SPIDER-1 Software for evaluating the detriment associated with radiation exposure*. 1994, Chilton: National Radiological Protection Board.
72. Law, J., Risk and benefit associated with radiation dose in breast screening programmes--an update. *Br J Radiol*, 1995. 68(812): p. 870-6.
73. Burch, A. and Goodman, D.A., A pilot survey of radiation doses received in the United Kingdom Breast Screening Programme. *Br J Radiol*, 1998. 71(845): p. 517-27.
74. Radiologists, R.C.o. *NHS Breast Screening Programme*. 1997.
75. NHS Breast Screening Programme. *Mammographic dose and image quality in the UK Breast Screening Programme*. 1995.
76. Feig, S.A. and Hendrick, R.E., Radiation risk from screening mammography of women aged 40-49 years. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1997. 22: p. 119-24.
77. Kopans, D.B., What is a useful adjunct to mammography? *Radiology*, 1986. 161(2): p. 560-1.
78. Seltzer, M.H., What is a useful adjunct to mammography? *Radiology*, 1987. 163(2): p. 584-5.
79. Jackson, V.P., The current role of ultrasonography in breast imaging. *Radiol Clin North Am*, 1995. 33(6): p. 1161-70.
80. Cole-Beuglet, C., Goldberg, B.B., Kurtz, A.B., Rubin, C.S., Patchefsky, A.S., and Shaber, G.S., Ultrasound mammography: a comparison with radiographic mammography. *Radiology*, 1981. 139(3): p. 693-8.
81. Piccoli, C.W., Current utilization and future techniques of breast ultrasound. *Curr Opin Radiol*, 1992. 4(5): p. 139-45.
82. Stelling, C.B., MR imaging of the breast for cancer evaluation. Current status and future directions. *Radiol Clin North Am*, 1995. 33(6): p. 1187-204.
83. Peters, N.H., Borel Rinkes, I.H., Zuithoff, N.P., Mali, W.P., Moons, K.G., and Peeters, P.H., Meta-analysis of MR imaging in the diagnosis of breast lesions. *Radiology*, 2008. 246(1): p. 116-24.
84. Sardanelli, F., Boetes, C., Borisch, B., Decker, T., Federico, M., Gilbert, F.J., et al., Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer*, 2010. 46(8): p. 1296-316.

85. Kalles, V., Zografos, G.C., Provatopoulou, X., Koulocheri, D., and Gounaris, A., The current status of positron emission mammography in breast cancer diagnosis. *Breast Cancer*, 2013. 20(2): p. 123-30.
86. Itoh, A., Ueno, E., Tohno, E., Kamma, H., Takahashi, H., Shiina, T., Yamakawa, M., and Matsumura, T., Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology*, 2006. 239(2): p. 341-50.
87. O'Connor, M., Rhodes, D., and Hruska, C., Molecular breast imaging. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009. 9(8): p. 1073-80.
88. Brandt, K.R., Craig, D.A., Hoskins, T.L., Henrichsen, T.L., Bendel, E.C., Brandt, S.R., and Mandrekar, J., Can digital breast tomosynthesis replace conventional diagnostic mammography views for screening recalls without calcifications? A comparison study in a simulated clinical setting. *AJR Am J Roentgenol*, 2013. 200(2): p. 291-8.
89. Bundred, N. and Dixon, M.J., *Carcinoma in situ*, in *ABC of Breast Diseases*, M.J. Dixon, Editor. 2012, BMJ Books.
90. Fisher, E.R., Sass, R., Fisher, B., Wickerham, L., and Paik, S.M., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol 6). I. Intraductal carcinoma (DCIS). *Cancer*, 1986. 57(2): p. 197-208.
91. Correa, C., McGale, P., Taylor, C., Wang, Y., Clarke, M., Davies, C., et al., Overview of the randomized trials of radiotherapy in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2010. 2010(41): p. 162-77.
92. Fisher, B., Costantino, J., Redmond, C., Fisher, E., Margolese, R., Dimitrov, N., et al., Lumpectomy compared with lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer. *N Engl J Med*, 1993. 328(22): p. 1581-6.
93. Julien, J.P., Bijker, N., Fentiman, I.S., Peterse, J.L., Delledonne, V., Rouanet, P., et al., Radiotherapy in breast-conserving treatment for ductal carcinoma in situ: first results of the EORTC randomised phase III trial 10853. EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *Lancet*, 2000. 355(9203): p. 528-33.
94. Emdin, S.O., Granstrand, B., Ringberg, A., Sandelin, K., Arnesson, L.G., Nordgren, H., et al., SweDCIS: Radiotherapy after sector resection for ductal carcinoma in situ of the breast. Results of a randomised trial in a population offered mammography screening. *Acta Oncol*, 2006. 45(5): p. 536-43.
95. Houghton, J., George, W.D., Cuzick, J., Duggan, C., Fentiman, I.S., and Spittle, M., 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*, 2003. 362(9378): p. 95-102.
96. Schnitt, S.J. and Guidi, A.J., *Pathology of invasive breast cancer*, in *Diseases of the Breast*, J.R. Harris, et al., Editors. 2004, Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia.
97. Abner, A.L., Connolly, J.L., Recht, A., Bornstein, B., Nixon, A., Hetelekidis, S., Silver, B., Harris, J.R., and Schnitt, S.J., The relation between the presence and extent of lobular carcinoma in situ and the risk of local recurrence for patients with infiltrating carcinoma of the breast treated with conservative surgery and radiation therapy. *Cancer*, 2000. 88(5): p. 1072-7.
98. Orvieto, E., Maiorano, E., Bottiglieri, L., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Galimberti, V., et al., Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*, 2008. 113(7): p. 1511-20.

99. Winchester, D.J., Chang, H.R., Graves, T.A., Menck, H.R., Bland, K.I., and Winchester, D.P., A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg*, 1998. 186(4): p. 416-22.
100. Li, C.I., Uribe, D.J., and Daling, J.R., Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*, 2005. 93(9): p. 1046-52.
101. Li, C.I., Moe, R.E., and Daling, J.R., Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Arch Intern Med*, 2003. 163(18): p. 2149-53.
102. Liu, G.F., Yang, Q., Haffty, B.G., and Moran, M.S., Clinical-pathologic features and long-term outcomes of tubular carcinoma of the breast compared with invasive ductal carcinoma treated with breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2009. 75(5): p. 1304-8.
103. Di Saverio, S., Gutierrez, J., and Avisar, E., A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. 111(3): p. 541-7.
104. Gaffey, M.J., Mills, S.E., Frierson, H.F., Jr., Zarbo, R.J., Boyd, J.C., Simpson, J.F., and Weiss, L.M., Medullary carcinoma of the breast: interobserver variability in histopathologic diagnosis. *Mod Pathol*, 1995. 8(1): p. 31-8.
105. Ridolfi, R.L., Rosen, P.P., Port, A., Kinne, D., and Mike, V., Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*, 1977. 40(4): p. 1365-85.
106. Armes, J.E. and Venter, D.J., The pathology of inherited breast cancer. *Pathology*, 2002. 34(4): p. 309-14.
107. Vu-Nishino, H., Tavassoli, F.A., Ahrens, W.A., and Haffty, B.G., Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breast-conserving therapy (BCT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005. 62(4): p. 1040-7.
108. Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., et al., Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*, 2006. 295(21): p. 2492-502.
109. Potemski, P., Kusinska, R., Watala, C., Pluciennik, E., Bednarek, A.K., and Kordek, R., Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*, 2005. 69(6): p. 478-85.
110. Fan, C., Oh, D.S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D.S., Nobel, A.B., van't Veer, L.J., and Perou, C.M., Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*, 2006. 355(6): p. 560-9.
111. Singletary, S.E., Allred, C., Ashley, P., Bassett, L.W., Berry, D., Bland, K.I., et al., Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002. 20(17): p. 3628-36.
112. *Stages of breast cancer*. [08/25/2013]; National Cancer Institute]. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/Patient/page2>.
113. Fisher, E.R., Costantino, J., Fisher, B., and Redmond, C., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol 4). Discriminants for 15-year survival. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. *Cancer*, 1993. 71(6 Suppl): p. 2141-50.
114. Fisher, E.R., Anderson, S., Redmond, C., and Fisher, B., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*, 1993. 71(8): p. 2507-14.

115. Fisher, E.R., Redmond, C., Fisher, B., and Bass, G., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer*, 1990. 65(9 Suppl): p. 2121-8.
116. Mansour, E.G., Ravdin, P.M., and Dressler, L., Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer*, 1994. 74(1 Suppl): p. 381-400.
117. Robbins, P., Pinder, S., de Klerk, N., Dawkins, H., Harvey, J., Sterrett, G., Ellis, I., and Elston, C., Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*, 1995. 26(8): p. 873-9.
118. Simpson, J.F. and Page, D.L., Prognostic value of histopathology in the breast. *Semin Oncol*, 1992. 19(3): p. 254-62.
119. Simpson, J.F. and Page, D.L., Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *Am J Clin Pathol*, 1994. 102(4 Suppl 1): p. S3-8.
120. Wold, L.E., Ingle, J.N., Pisansky, T.M., Johnson, R.E., and Donohue, J.H., Prognostic factors for patients with carcinoma of the breast. *Mayo Clin Proc*, 1995. 70(7): p. 678-9.
121. Carter, C.L., Allen, C., and Henson, D.E., Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*, 1989. 63(1): p. 181-7.
122. Russo, J., Frederick, J., Ownby, H.E., Fine, G., Hussain, M., Krickstein, H.I., Robbins, T.O., and Rosenberg, B., Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1987. 88(2): p. 123-31.
123. Quiet, C.A., Ferguson, D.J., Weichselbaum, R.R., and Hellman, S., Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1995. 13(5): p. 1144-51.
124. Seidman, J.D., Schnaper, L.A., and Aisner, S.C., Relationship of the size of the invasive component of the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer*, 1995. 75(1): p. 65-71.
125. Koscielny, S., Tubiana, M., Le, M.G., Valleron, A.J., Mouriesse, H., Contesso, G., and Sarrazin, D., Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer*, 1984. 49(6): p. 709-15.
126. Koscielny, S., Tubiana, M., and Valleron, A.J., A simulation model of the natural history of human breast cancer. *Br J Cancer*, 1985. 52(4): p. 515-24.
127. Rosen, P.P., Groshen, S., and Kinne, D.W., Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol*, 1991. 9(9): p. 1650-61.
128. Rosen, P.P., Groshen, S., Kinne, D.W., and Norton, L., Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol*, 1993. 11(11): p. 2090-100.
129. Rosen, P.P., Saigo, P.E., Braun, D.W., Jr., Weathers, E., and DePalo, A., Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg*, 1981. 193(1): p. 15-25.
130. Leitner, S.P., Swern, A.S., Weinberger, D., Duncan, L.J., and Hutter, R.V., Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M0). *Cancer*, 1995. 76(11): p. 2266-74.
131. Alderson, M.R., Hamlin, I., and Staunton, M.D., The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 1971. 25(4): p. 646-56.

132. Nemoto, T., Vana, J., Bedwani, R.N., Baker, H.W., McGregor, F.H., and Murphy, G.P., Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer*, 1980. 45(12): p. 2917-24.
133. Fisher, B., Bauer, M., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Fisher, E.R., Cruz, A.B., et al., Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*, 1983. 52(9): p. 1551-7.
134. Fisher, E.R., Redmond, C., and Fisher, B., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol no. 4). VI. Discriminants for five-year treatment failure. *Cancer*, 1980. 46(4 Suppl): p. 908-18.
135. Fisher, E.R., Anderson, S., Tan-Chiu, E., Fisher, B., Eaton, L., and Wolmark, N., Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer*, 2001. 91(8 Suppl): p. 1679-87.
136. Berg, J.W. and Robbins, G.F., Factors influencing short and long term survival of breast cancer patients. *Surg Gynecol Obstet*, 1966. 122(6): p. 1311-6.
137. Smith, J.A., 3rd, Gamez-Araujo, J.J., Gallager, H.S., White, E.C., and McBride, C.M., Carcinoma of the breast: analysis of total lymph node involvement versus level of metastasis. *Cancer*, 1977. 39(2): p. 527-32.
138. Huvos, A.G., Hutter, R.V., and Berg, J.W., Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg*, 1971. 173(1): p. 44-6.
139. Rosen, P.P., Axillary lymph node metastases in patients with occult noninvasive breast carcinoma. *Cancer*, 1980. 46(5): p. 1298-306.
140. Fisher, E.R., Gregorio, R.M., Redmond, C., Kim, W.S., and Fisher, B., Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast project. (Protocol no. 4). III. The significance of extranodal extension of axillary metastases. *Am J Clin Pathol*, 1976. 65(4): p. 439-44.
141. Donegan, W.L., Stine, S.B., and Samter, T.G., Implications of extracapsular nodal metastases for treatment and prognosis of breast cancer. *Cancer*, 1993. 72(3): p. 778-82.
142. Hetelekidis, S., Schnitt, S.J., Silver, B., Manola, J., Bornstein, B.A., Nixon, A.J., et al., The significance of extracapsular extension of axillary lymph node metastases in early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2000. 46(1): p. 31-4.
143. Leonard, C., Corkill, M., Tompkin, J., Zhen, B., Waitz, D., Norton, L., and Kinzie, J., Are axillary recurrence and overall survival affected by axillary extranodal tumor extension in breast cancer? Implications for radiation therapy. *J Clin Oncol*, 1995. 13(1): p. 47-53.
144. Mambo, N.C. and Gallager, H.S., Carcinoma of the breast: the prognostic significance of extranodal extension of axillary disease. *Cancer*, 1977. 39(5): p. 2280-5.
145. Hartveit, F., Skjaerven, R., and Maehle, B.O., Prognosis in breast cancer patients with tumour cells in the efferent vessels of their axillary nodes. *J Pathol*, 1983. 139(3): p. 379-82.
146. Clemente, C.G., Boracchi, P., Andreola, S., Del Vecchio, M., Veronesi, P., and Rilke, F.O., Peritumoral lymphatic invasion in patients with node-negative mammary duct carcinoma. *Cancer*, 1992. 69(6): p. 1396-403.

147. Fisher, E.R., Kotwal, N., Hermann, C., and Fisher, B., Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. Relationship to five-year, disease-free survival in patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 1983. 107(5): p. 222-7.
148. Ellis, G.K. and Gown, A.M., New applications of monoclonal antibodies to the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Pathol Annu*, 1990. 25(Pt 2): p. 193-235.
149. Thompson, A. and Pinder, S., *Prognostic Factors*, in *ABC of Breast Diseases*, M.J. Dixon, Editor. 2012, BMJ Books.
150. Adami, H.O., Malke, B., Holmberg, L., Persson, I., and Stone, B., The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med*, 1986. 315(9): p. 559-63.
151. de la Rochefordiere, A., Asselain, B., Campana, F., Scholl, S.M., Fenton, J., Vilcoq, J.R., et al., Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet*, 1993. 341(8852): p. 1039-43.
152. Nixon, A.J., Neuberger, D., Hayes, D.F., Gelman, R., Connolly, J.L., Schnitt, S., et al., Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*, 1994. 12(5): p. 888-94.
153. Barnavon, Y. and Wallack, M.K., Management of the pregnant patient with carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet*, 1990. 171(4): p. 347-52.
154. Petrek, J.A., Dukoff, R., and Rogatko, A., Prognosis of pregnancy-associated breast cancer. *Cancer*, 1991. 67(4): p. 869-72.
155. Gallenberg, M.M. and Loprinzi, C.L., Breast cancer and pregnancy. *Semin Oncol*, 1989. 16(5): p. 369-76.
156. Fisher, E.R., Sass, R., and Fisher, B., Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers (protocol no. 4). X. Discriminants for tenth year treatment failure. *Cancer*, 1984. 53(3 Suppl): p. 712-23.
157. Lagios, M.D., Westdahl, P.R., Margolin, F.R., and Rose, M.R., Duct carcinoma in situ. Relationship of extent of noninvasive disease to the frequency of occult invasion, multicentricity, lymph node metastases, and short-term treatment failures. *Cancer*, 1982. 50(7): p. 1309-14.
158. Lash, R.H., Bauer, T.W., Hermann, R.E., and Esselstyn, C.B., Partial mastectomy: pathologic findings and prognosis. *Hum Pathol*, 1986. 17(8): p. 813-22.
159. Dawson, P.J., Ferguson, D.J., and Karrison, T., The pathological findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer*, 1982. 50(10): p. 2131-8.
160. Kister, S.J., Sommers, S.C., Haagensen, C.D., and Cooley, E., Re-evaluation of blood-vessel invasion as a prognostic factor in carcinoma of the breast. *Cancer*, 1966. 19(9): p. 1213-6.
161. Upalakalin, J.N., Collins, L.C., Tawa, N., and Parangi, S., Carcinoid tumors in the breast. *Am J Surg*, 2006. 191(6): p. 799-805.
162. Bloom, H.J.G. and W.W., R., Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 159 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 1957. 11: p. 359-77.
163. Elston, C.W. and Ellis, I.O., Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991. 19(5): p. 403-10.

164. Frierson, H.F., Jr., Wolber, R.A., Berean, K.W., Franquemont, D.W., Gaffey, M.J., Boyd, J.C., and Wilbur, D.C., Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 1995. 103(2): p. 195-8.
165. Page, D.L., Ellis, I.O., and Elston, C.W., Histologic grading of breast cancer. Let's do it. *Am J Clin Pathol*, 1995. 103(2): p. 123-4.
166. Rosen, P.P., Groshen, S., Saigo, P.E., Kinne, D.W., and Hellman, S., Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol*, 1989. 7(9): p. 1239-51.
167. Rosen, P.R., Groshen, S., Saigo, P.E., Kinne, D.W., and Hellman, S., A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1989. 7(3): p. 355-66.
168. Elston, C.W. and Ellis, I.O., Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991. 19(5): p. 403-10.
169. Nime, F.A., Rosen, P.P., Thaler, H.T., Ashikari, R., and Urban, J.A., Prognostic significance of tumor emboli in intramammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1977. 1(1): p. 25-30.
170. Roses, D.F., Bell, D.A., Flotte, T.J., Taylor, R., Ratech, H., and Dubin, N., Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (T1N0M0) breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1982. 78(6): p. 817-20.
171. Davis, B.W., Gelber, R., Goldhirsch, A., Hartmann, W.H., Hollaway, L., Russell, I., and Rudenstam, C.M., Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol*, 1985. 16(12): p. 1212-8.
172. Bauer, T.W., O'Ceallaigh, D., Eggleston, J.C., Moore, G.W., and Baker, R.R., Prognostic factors in patients with stage I, estrogen receptor-negative carcinoma of the breast. A clinicopathologic study. *Cancer*, 1983. 52(8): p. 1423-31.
173. Carter, D., Pipkin, R.D., Shepard, R.H., Elkins, R.C., and Abbey, H., Relationship of necrosis and tumor border to lymph node metastases and 10-year survival in carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol*, 1978. 2(1): p. 39-46.
174. Gilchrist, K.W., Gray, R., Fowble, B., Tormey, D.C., and Taylor, S.G.t., Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer: a 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol*, 1993. 11(10): p. 1929-35.
175. Mate, T.P., Carter, D., Fischer, D.B., Hartman, P.V., McKhann, C., Merino, M., Prosnitz, L.R., and Weissberg, J.B., A clinical and histopathologic analysis of the results of conservation surgery and radiation therapy in stage I and II breast carcinoma. *Cancer*, 1986. 58(9): p. 1995-2002.
176. Identification of breast cancer patients with high risk of early recurrence after radical mastectomy. II. Clinical and pathological correlations. A report of the Primary Therapy of Breast Cancer Study Group. *Cancer*, 1978. 42(6): p. 2809-26.
177. Lee, A.K., DeLellis, R.A., Silverman, M.L., and Wolfe, H.J., Lymphatic and blood vessel invasion in breast carcinoma: a useful prognostic indicator? *Hum Pathol*, 1986. 17(10): p. 984-7.

178. Pinder, S.E., Ellis, I.O., Galea, M., O'Rourke, S., Blamey, R.W., and Elston, C.W., Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1994. 24(1): p. 41-7.
179. Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E.N., Moore, D.H., Meli, S., and Gasparini, G., Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(24): p. 1875-87.
180. Weidner, N., Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 1995. 147(1): p. 9-19.
181. Weidner, N., Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol*, 1993. 10(4): p. 302-13.
182. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., and Folkman, J., Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991. 324(1): p. 1-8.
183. Axelsson, K., Ljung, B.M., Moore, D.H., 2nd, Thor, A.D., Chew, K.L., Edgerton, S.M., Smith, H.S., and Mayall, B.H., Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(13): p. 997-1008.
184. Toi, M., Kondo, S., Suzuki, H., Yamamoto, Y., Inada, K., Imazawa, T., Taniguchi, T., and Tominaga, T., Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*, 1996. 77(6): p. 1101-6.
185. Vartanian, R.K. and Weidner, N., Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol*, 1994. 144(6): p. 1188-94.
186. Guidi, A.J., Fischer, L., Harris, J.R., and Schnitt, S.J., Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86(8): p. 614-9.
187. Dawkins, H.J., Robbins, P.D., Smith, K.L., Sarna, M., Harvey, J.M., Sterrett, G.F., and Papadimitriou, J.M., What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erbB-2 in prognosis and disease. *Pathol Res Pract*, 1993. 189(10): p. 1233-52.
188. De Potter, C.R. and Schelfhout, A.M., The neu-protein and breast cancer. *Virchows Arch*, 1995. 426(2): p. 107-15.
189. Smith, K.L., Robbins, P.D., Dawkins, H.J., Papadimitriou, J.M., Redmond, S.L., Carrello, S., Harvey, J.M., and Sterrett, G.F., c-erbB-2 amplification in breast cancer: detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by in situ hybridization. *Hum Pathol*, 1994. 25(4): p. 413-8.
190. Battifora, H., Gaffey, M., Esteban, J., Mehta, P., Bailey, A., Faucett, C., and Niland, J., Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogene product in paraffin- embedded tissues in early breast cancer: retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol*, 1991. 4(4): p. 466-74.
191. Heintz, N.H., Leslie, K.O., Rogers, L.A., and Howard, P.L., Amplification of the c-erb B-2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med*, 1990. 114(2): p. 160-3.
192. Muss, H.B., Thor, A.D., Berry, D.A., Kute, T., Liu, E.T., Koerner, F., et al., c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*, 1994. 330(18): p. 1260-6.
193. Baak, J.P., Chin, D., van Diest, P.J., Ortiz, R., Matze-Cok, P., and Bacus, S.S., Comparative long-term prognostic value of quantitative HER-2/neu protein

- expression, DNA ploidy, and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. *Lab Invest*, 1991. 64(2): p. 215-23.
194. Rosen, P.P., Lesser, M.L., Arroyo, C.D., Cranor, M., Borgen, P., and Norton, L., Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer*, 1995. 75(6): p. 1320-6.
 195. Tsuda, H., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Hirota, T., Tsugane, S., Watanabe, S., Terada, M., and Yamamoto, H., Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c- erbB-2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer*, 1990. 65(8): p. 1794-800.
 196. Paik, S., Kim, C., and Wolmark, N., HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med*, 2008. 358(13): p. 1409-11.
 197. Piccart-Gebhart, M.J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., et al., Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005. 353(16): p. 1659-72.
 198. Perez, E.A., Romond, E.H., Suman, V.J., Jeong, J.H., Davidson, N.E., Geyer, C.E., Jr., et al., Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol*, 2011. 29(25): p. 3366-73.
 199. Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Jr., Davidson, N.E., et al., Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2005. 353(16): p. 1673-84.
 200. Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., et al., Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2011. 365(14): p. 1273-83.
 201. Romond, E.H., Jeong, J.H., Rastogi, P., Swain, S.M., Geyer, C.E., Jr., Ewer, M.S., et al., Seven-year follow-up assessment of cardiac function in NSABP B-31, a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel (ACP) with ACP plus trastuzumab as adjuvant therapy for patients with node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, 2012. 30(31): p. 3792-9.
 202. Thor, A.D., Moore, D.H., II, Edgerton, S.M., Kawasaki, E.S., Reihnsaus, E., Lynch, H.T., et al., Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(11): p. 845-55.
 203. Allred, D.C., Clark, G.M., Elledge, R., Fuqua, S.A., Brown, R.W., Chamness, G.C., Osborne, C.K., and McGuire, W.L., Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(3): p. 200-6.
 204. Barnes, D.M., Dublin, E.A., Fisher, C.J., Levison, D.A., and Millis, R.R., Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol*, 1993. 24(5): p. 469-76.
 205. Thor, A.D., Berry, D.A., Budman, D.R., Muss, H.B., Kute, T., Henderson, I.C., et al., erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(18): p. 1346-60.
 206. Bosari, S. and Viale, G., The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Arch*, 1995. 427(3): p. 229-41.

207. Silvestrini, R., Benini, E., Daidone, M.G., Veneroni, S., Boracchi, P., Cappelletti, V., Di Fronzo, G., and Veronesi, U., p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(12): p. 965-70.
208. Gasparini, G., Weidner, N., Bevilacqua, P., Maluta, S., Dalla Palma, P., Caffo, O., et al., Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol*, 1994. 12(3): p. 454-66.
209. Isola, J., Visakorpi, T., Holli, K., and Kallioniemi, O.P., Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(14): p. 1109-14.
210. Pietilainen, T., Lipponen, P., Aaltomaa, S., Eskelinen, M., Kosma, V.M., and Syrjanen, K., Expression of p53 protein has no independent prognostic value in breast cancer. *J Pathol*, 1995. 177(3): p. 225-32.
211. Seshadri, R., Leong, A.S., McCaul, K., Fergaira, F.A., Setlur, V., and Horsfall, D.J., Relationship between p53 gene abnormalities and other tumour characteristics in breast-cancer prognosis. *Int J Cancer*, 1996. 69(2): p. 135-41.
212. Lipponen, P., Ji, H., Aaltomaa, S., Syrjanen, S., and Syrjanen, K., p53 protein expression in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Int J Cancer*, 1993. 55(1): p. 51-6.
213. Sjogren, S., Inganas, M., Norberg, T., Lindgren, A., Nordgren, H., Holmberg, L., and Bergh, J., The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(3-4): p. 173-82.
214. Marks, J.R., Humphrey, P.A., Wu, K., Berry, D., Bandarenko, N., Kerns, B.J., and Iglehart, J.D., Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg*, 1994. 219(4): p. 332-41.
215. Reed, W., Hannisdal, E., Boehler, P.J., Gundersen, S., Host, H., and Marthin, J., The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14- 30 years. *Cancer*, 2000. 88(4): p. 804-13.
216. Rosen, P.P., Lesser, M.L., Arroyo, C.D., Cranor, M., Borgen, P., and Norton, L., p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol*, 1995. 13(4): p. 821-30.
217. Hartmann, A., Blaszyk, H., Kovach, J.S., and Sommer, S.S., The molecular epidemiology of p53 gene mutations in human breast cancer. *Trends Genet*, 1997. 13(1): p. 27-33.
218. Dowell, S.P. and Hall, P.A., The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis: is there a relationship? *J Pathol*, 1995. 177(3): p. 221-4.
219. Andersen, T.I., Holm, R., Nesland, J.M., Heimdal, K.R., Ottestad, L., and Borresen, A.L., Prognostic significance of TP53 alterations in breast carcinoma. *Br J Cancer*, 1993. 68(3): p. 540-8.
220. Thorlacius, S., Borresen, A.L., and Eyfjord, J.E., Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. *Cancer Res*, 1993. 53(7): p. 1637-41.

221. Caleffi, M., Teague, M.W., Jensen, R.A., Vnencak-Jones, C.L., Dupont, W.D., and Parl, F.F., p53 gene mutations and steroid receptor status in breast cancer. Clinicopathologic correlations and prognostic assessment. *Cancer*, 1994. 73(8): p. 2147-56.
222. Gonzalez-Campora, R., Galera Ruiz, M.R., Vazquez Ramirez, F., Rios Martin, J.J., Fernandez Santos, J.M., Ramos Martos, M.M., and Gomez Pascual, A., Apoptosis in breast carcinoma. *Pathol Res Pract*, 2000. 196(3): p. 167-74.
223. de Jong, J.S., van Diest, P.J., and Baak, J.P., Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer*, 2000. 82(2): p. 368-73.
224. Berardo, M.D., Elledge, R.M., de Moor, C., Clark, G.M., Osborne, C.K., and Allred, D.C., bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer*, 1998. 82(7): p. 1296-302.
225. Binder, C., Marx, D., Overhoff, R., Binder, L., Schauer, A., and Hiddemann, W., Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathological variables. *Ann Oncol*, 1995. 6(10): p. 1005-10.
226. Reed, J.C., Bcl-2 family proteins: regulators of chemoresistance in cancer. *Toxicol Lett*, 1995. 82-83: p. 155-8.
227. Visscher, D.W., Sarkar, F., Tabaczka, P., and Crissman, J., Clinicopathologic analysis of bcl-2 immunostaining in breast carcinoma. *Mod Pathol*, 1996. 9(6): p. 642-6.
228. Elledge, R.M., Green, S., Howes, L., Clark, G.M., Berardo, M., Allred, D.C., et al., bcl-2, p53, and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 1997. 15(5): p. 1916-22.
229. Gee, J.M., Robertson, J.F., Ellis, I.O., Willsher, P., McClelland, R.A., Hoyle, H.B., et al., Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer*, 1994. 59(5): p. 619-28.
230. Hellems, P., van Dam, P.A., Weyler, J., van Oosterom, A.T., Buytaert, P., and Van Marck, E., Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *Br J Cancer*, 1995. 72(2): p. 354-60.
231. Biesterfeld, S., Noll, I., Noll, E., Wohltmann, D., and Bocking, A., Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. *Hum Pathol*, 1995. 26(1): p. 47-52.
232. Kujari, H.P., Collan, Y.U., and Atkin, N.B., Use of the mitotic counts for the prognosis and grading of breast cancer. Method evaluation study. *Pathol Res Pract*, 1994. 190(6): p. 593-9.
233. Laroye, G.J. and Minkin, S., The impact of mitotic index on predicting outcome in breast carcinoma: a comparison of different counting methods in patients with different lymph node status. *Mod Pathol*, 1991. 4(4): p. 456-60.
234. Barbareschi, M., Girlando, S., Mauri, F.M., Forti, S., Eccher, C., Mauri, F.A., Togni, R., Dalla Palma, P., and Doglioni, C., Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 1994. 102(2): p. 171-5.
235. Leonardi, E., Girlando, S., Serio, G., Mauri, F.A., Perrone, G., Scampini, S., Dalla Palma, P., and Barbareschi, M., PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol*, 1992. 45(5): p. 416-9.

236. Sahin, A.A., Ro, J., Ro, J.Y., Blick, M.B., el-Naggar, A.K., Ordonez, N.G., et al., Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer*, 1991. 68(3): p. 549-57.
237. Vielh, P., Chevillard, S., Mosseri, V., Donatini, B., and Magdelenat, H., Ki67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am J Clin Pathol*, 1990. 94(6): p. 681-6.
238. Weidner, N., Moore, D.H., 2nd, and Vartanian, R., Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody. *Hum Pathol*, 1994. 25(4): p. 337-42.
239. Wintzer, H.O., Zipfel, I., Schulte-Monting, J., Hellerich, U., and von Kleist, S., Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, 1991. 67(2): p. 421-8.
240. Witzig, T.E., Ingle, J.N., Cha, S.S., Schaid, D.J., Tabery, R.L., Wold, L.E., Grant, C., Gonchoroff, N.J., and Katzmann, J.A., DNA ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer*, 1994. 74(6): p. 1752-61.
241. Frierson, H.F., Jr., Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol*, 1991. 15(4): p. 358-67.
242. Page, D.L., Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol*, 1991. 15(4): p. 334-49.
243. Sigurdsson, H., Baldetorp, B., Borg, A., Dalberg, M., Ferno, M., Killander, D., and Olsson, H., Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 1990. 322(15): p. 1045-53.
244. Visscher, D.W., Zarbo, R.J., Greenawald, K.A., and Crissman, J.D., Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. *Pathol Annu*, 1990. 25 Pt 1: p. 171-210.
245. Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T., A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988. 332(6163): p. 411-5.
246. Benigni, A. and Remuzzi, G., Endothelin antagonists. *Lancet*, 1999. 353(9147): p. 133-8.
247. Lee, M.E., Bloch, K.D., Clifford, J.A., and Quertermous, T., Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *The Journal of biological chemistry*, 1990. 265(18): p. 10446-50.
248. Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., and Masaki, T., The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem*, 1989. 264(25): p. 14954-9.
249. Kedzierski, R.M. and Yanagisawa, M., Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. 41: p. 851-76.
250. Corder, R., Identity of endothelin - converting enzyme and other targets for the therapeutic regulation of endothelin biosynthesis. *Handbook Exper Pharmacol*, 2001: p. 35-67.

251. Yanagisawa, H., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Emoto, N., Williams, S.C., Takeda, S., Clouthier, D.E., and Yanagisawa, M., Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest*, 2000. 105(10): p. 1373-82.
252. Rubanyi, G.M. and Polokoff, M.A., Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 1994. 46(3): p. 325-415.
253. Barton, M. and Yanagisawa, M., Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008. 86(8): p. 485-98.
254. Wilson, D.B., Dorfman, D.M., and Orkin, S.H., A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(9): p. 4854-62.
255. de Nucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D., and Vane, J.R., Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(24): p. 9797-800.
256. Hoyer, D., Waeber, C., and Palacios, J.M., [125I]endothelin-1 binding sites: autoradiographic studies in the brain and periphery of various species including humans. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989. 13 Suppl 5: p. S162-5.
257. Masaki, T., Tissue specificity of the endothelin-induced responses. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991. 17 Suppl 7: p. S1-4.
258. Williams, D.L., Jr., Jones, K.L., Colton, C.D., and Nutt, R.F., Identification of high affinity endothelin-1 receptor subtypes in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 180(2): p. 475-80.
259. Levin, E.R., Endothelins. *The New England journal of medicine*, 1995. 333(6): p. 356-63.
260. Orry, A.J. and Wallace, B.A., Modeling and docking the endothelin G-protein-coupled receptor. *Biophysical journal*, 2000. 79(6): p. 3083-94.
261. Mobarec, J.C. and Filizola, M., Advances in the Development and Application of Computational Methodologies for Structural Modeling of G-Protein Coupled Receptors. *Expert opinion on drug discovery*, 2008. 3(3): p. 343-55.
262. Masaki, T., The endothelin family: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2000. 35(4 Suppl 2): p. S3-5.
263. Rozengurt, E., Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of cellular physiology*, 2007. 213(3): p. 589-602.
264. Moreland, S., McMullen, D.M., Delaney, C.L., Lee, V.G., and Hunt, J.T., Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. 184(1): p. 100-6.
265. Dupuis, J., Goresky, C.A., and Fournier, A., Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol*, 1996. 81(4): p. 1510-5.
266. Fukuroda, T., Fujikawa, T., Ozaki, S., Ishikawa, K., Yano, M., and Nishikibe, M., Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. 199(3): p. 1461-5.
267. Smollich, M., Gotte, M., Yip, G.W., Yong, E.S., Kersting, C., Fischgrabe, J., Radke, I., Kiesel, L., and Wulfig, P., On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. 106(3): p. 361-9.

268. Luscher, T.F. and Barton, M., Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, 2000. 102(19): p. 2434-40.
269. Barton, M., Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep*, 2000. 2(1): p. 84-91.
270. Schiffrin, E.L., State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*, 1999. 34(4 Pt 2): p. 876-81.
271. Maguire, J.J. and Davenport, A.P., Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol*, 2002. 137(5): p. 579-88.
272. Proven, A., Roderick, H.L., Conway, S.J., Berridge, M.J., Horton, J.K., Capper, S.J., and Bootman, M.D., Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 16): p. 3363-75.
273. Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., and Sugishita, Y., Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature*, 1996. 384(6607): p. 353-5.
274. Uchida, Y., Ninomiya, H., Saotome, M., Nomura, A., Ohtsuka, M., Yanagisawa, M., Goto, K., Masaki, T., and Hasegawa, S., Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol*, 1988. 154(2): p. 227-8.
275. Rubin, L.J., Hooper, M.M., Klepetko, W., Galie, N., Lang, I.M., and Simonneau, G., Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(7): p. 601-7.
276. Kohan, D.E., The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006. 15(1): p. 34-40.
277. Chatziantoniou, C. and Dussaule, J.C., Insights into the mechanisms of renal fibrosis: is it possible to achieve regression? *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. 289(2): p. F227-34.
278. Hoher, B., Thone-Reineke, C., Rohmeiss, P., Schmager, F., Slowinski, T., Burst, V., et al., Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest*, 1997. 99(6): p. 1380-9.
279. Remuzzi, G., Perico, N., and Benigni, A., New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(12): p. 986-1001.
280. Καλλές, Β., Παντελίδου, Β., Κυριακίδης, Ι., and Στυλιάδης, Ι., Ο ρόλος των ενδοθελινών στην αρτηριακή υπέρταση. *Αρτηριακή Υπέρταση*, 2008. 17(2-3): p. 109-16.
281. Yokokawa, K., Tahara, H., Kohno, M., Murakawa, K., Yasunari, K., Nakagawa, K., et al., Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Ann Intern Med*, 1991. 114(3): p. 213-5.
282. Schiffrin, E.L., Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens*, 2001. 14(6 Pt 2): p. 83S-9S.
283. Barton, M. and Kiowski, W., The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep*, 2001. 3(4): p. 322-30.
284. Barton, M. and Luscher, T.F., Endothelin antagonists for hypertension and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1999. 8(5): p. 549-56.

285. Schiffrin, E.L., Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol*, 2005. 43(1): p. 19-29.
286. Lerman, A., Edwards, B.S., Hallett, J.W., Heublein, D.M., Sandberg, S.M., and Burnett, J.C., Jr., Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*, 1991. 325(14): p. 997-1001.
287. Barton, M., Haudenschild, C.C., d'Uscio, L.V., Shaw, S., Munter, K., and Luscher, T.F., Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(24): p. 14367-72.
288. Schiffrin, E.L., Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens*, 2002. 15(10 Pt 2): p. 115S-22S.
289. Tepe, G., Brehme, U., Seeger, H., Raschack, M., Claussen, C.D., and Duda, S.H., Endothelin A receptor antagonist LU 135252 inhibits hypercholesterolemia-induced, but not deendothelialization-induced, atherosclerosis in rabbit arteries. *Invest Radiol*, 2002. 37(6): p. 349-55.
290. Caligiuri, G., Levy, B., Pernow, J., Thoren, P., and Hansson, G.K., Myocardial infarction mediated by endothelin receptor signaling in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(12): p. 6920-4.
291. Verhaar, M.C., Strachan, F.E., Newby, D.E., Cruden, N.L., Koomans, H.A., Rabelink, T.J., and Webb, D.J., Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation*, 1998. 97(8): p. 752-6.
292. Krum, H., Viskoper, R.J., Lacourciere, Y., Budde, M., and Charlon, V., The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med*, 1998. 338(12): p. 784-90.
293. Black, H.R., Bakris, G.L., Weber, M.A., Weiss, R., Shahawy, M.E., Marple, R., et al., Efficacy and safety of darusentan in patients with resistant hypertension: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2007. 9(10): p. 760-9.
294. Nakov, R., Pfarr, E., and Eberle, S., Darusentan: an effective endothelinA receptor antagonist for treatment of hypertension. *Am J Hypertens*, 2002. 15(7 Pt 1): p. 583-9.
295. Pollock, D.M. and Schneider, M.P., Clarifying endothelin type B receptor function. *Hypertension*, 2006. 48(2): p. 211-2.
296. Greene, S., Bunday, R., BNunley, K., Hartman, J., Melvin, L., and Gorczynski, R. *Determination of endothelin receptor antagonist affinities and selectivities in human cardiac membranes.* in *10th International Conference on Endothelin*. 2007. Bergamo, Italy.
297. Ergul, A., Hypertension in black patients: an emerging role of the endothelin system in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 2000. 36(1): p. 62-7.
298. Parrinello, G., Scaglione, R., Pinto, A., Corrao, S., Cecala, M., Di Silvestre, G., Amato, P., Licata, A., and Licata, G., Central obesity and hypertension: the role of plasma endothelin. *Am J Hypertens*, 1996. 9(12 Pt 1): p. 1186-91.
299. Duru, F., Barton, M., Luscher, T.F., and Candinas, R., Endothelin and cardiac arrhythmias: do endothelin antagonists have a therapeutic potential as antiarrhythmic drugs? *Cardiovasc Res*, 2001. 49(2): p. 272-80.
300. Lee, T.M., Chen, C.C., Lin, M.S., and Chang, N.C., Effect of endothelin receptor antagonists on ventricular susceptibility in postinfarcted rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(4): p. H1871-9.

301. Dupuis, J., Endothelin-receptor antagonists in pulmonary hypertension. *Lancet*, 2001. 358(9288): p. 1113-4.
302. Dupuis, J., Endothelin receptor antagonists and their developing role in cardiovascular therapeutics. *Can J Cardiol*, 2000. 16(7): p. 903-10.
303. Kirchengast, M. and Luz, M., Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005. 45(2): p. 182-91.
304. Channick, R.N., Simonneau, G., Sitbon, O., Robbins, I.M., Frost, A., Tapson, V.F., et al., Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet*, 2001. 358(9288): p. 1119-23.
305. Rubin, L.J., Badesch, D.B., Barst, R.J., Galie, N., Black, C.M., Keogh, A., et al., Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2002. 346(12): p. 896-903.
306. Battistini, B., Berthiaume, N., Kelland, N.F., Webb, D.J., and Kohan, D.E., Profile of past and current clinical trials involving endothelin receptor antagonists: the novel "-sentan" class of drug. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. 231(6): p. 653-95.
307. Hoeper, M.M., Seyfarth, H.J., Hoeffken, G., Wirtz, H., Spiekerkoetter, E., Pletz, M.W., Welte, T., and Halank, M., Experience with inhaled iloprost and bosentan in portopulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2007. 30(6): p. 1096-102.
308. Leuchte, H.H., Meis, T., El-Nounou, M., Michalek, J., and Behr, J., Inhalation of endothelin receptor blockers in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. 294(4): p. L772-7.
309. Rich, S. and McLaughlin, V.V., Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*, 2003. 108(18): p. 2184-90.
310. Omland, T., Lie, R.T., Aakvaag, A., Aarsland, T., and Dickstein, K., Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 1994. 89(4): p. 1573-9.
311. Pacher, R., Stanek, B., Hulsmann, M., Koller-Strametz, J., Berger, R., Schuller, M., et al., Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 1996. 27(3): p. 633-41.
312. Staniloae, C., Dupuis, J., White, M., Gosselin, G., Dyrda, I., Bois, M., et al., Reduced pulmonary clearance of endothelin in congestive heart failure: a marker of secondary pulmonary hypertension. *J Card Fail*, 2004. 10(5): p. 427-32.
313. Kaye, D.M. and Krum, H., Drug discovery for heart failure: a new era or the end of the pipeline? *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6(2): p. 127-39.
314. Kelland, N.F. and Webb, D.J., Clinical trials of endothelin antagonists in heart failure: a question of dose? *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. 231(6): p. 696-9.
315. Kiowski, W., Sutsch, G., Hunziker, P., Muller, P., Kim, J., Oechslin, E., Schmitt, R., Jones, R., and Bertel, O., Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*, 1995. 346(8977): p. 732-6.
316. Teerlink, J.R., Endothelins: pathophysiology and treatment implications in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep*, 2005. 2(4): p. 191-7.
317. Καλλές, Β., Παντελίδου, Β., and Στυλιάδης, Ι., Το σύστημα των ενδοθηλινών στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια. *Καρδιολογία*, 2007. 10(1): p. 7-12.

318. Kohan, D.E., Endothelins in the normal and diseased kidney. *Am J Kidney Dis*, 1997. 29(1): p. 2-26.
319. Katoh, T., Chang, H., Uchida, S., Okuda, T., and Kurokawa, K., Direct effects of endothelin in the rat kidney. *Am J Physiol*, 1990. 258(2 Pt 2): p. F397-402.
320. Barton, M., Luscher, T.F., and Rabelink, T.J., Salt wars. *Science*, 1998. 281(5385): p. 1962.
321. Garipey, C.E., Ohuchi, T., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M., Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest*, 2000. 105(7): p. 925-33.
322. Barton, M., Vos, I., Shaw, S., Boer, P., D'Uscio, L.V., Grone, H.J., et al., Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and Glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11(5): p. 835-45.
323. Goddard, J., Johnston, N.R., Hand, M.F., Cumming, A.D., Rabelink, T.J., Rankin, A.J., and Webb, D.J., Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation*, 2004. 109(9): p. 1186-93.
324. Schneider, M.P., Ge, Y., Pollock, D.M., Pollock, J.S., and Kohan, D.E., Collecting duct-derived endothelin regulates arterial pressure and Na excretion via nitric oxide. *Hypertension*, 2008. 51(6): p. 1605-10.
325. Ge, Y., Huang, Y., and Kohan, D.E., Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in collecting duct-derived endothelin-1 regulation of blood pressure. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008. 86(6): p. 329-36.
326. Ohuchi, T., Yanagisawa, M., and Garipey, C.E., Renal tubular effects of endothelin-B receptor signaling: its role in cardiovascular homeostasis and extracellular volume regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. 9(4): p. 435-9.
327. Barton, M., Reversal of proteinuric renal disease and the emerging role of endothelin. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2008. 4(9): p. 490-501.
328. Benigni, A., Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int*, 2000. 57(4): p. 1778-94.
329. Bruno, S., Cattaneo, D., Perico, N., and Remuzzi, G., Emerging drugs for diabetic nephropathy. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2005. 10(4): p. 747-71.
330. Benigni, A., Perico, N., and Remuzzi, G., Research on renal endothelin in proteinuric nephropathies dictates novel strategies to prevent progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001. 10(1): p. 1-6.
331. Opocensky, M., Kramer, H.J., Backer, A., Vernerova, Z., Eis, V., Cervenka, L., Certikova Chabova, V., Tesar, V., and Vaneckova, I., Late-onset endothelin-A receptor blockade reduces podocyte injury in homozygous Ren-2 rats despite severe hypertension. *Hypertension*, 2006. 48(5): p. 965-71.
332. Ortmann, J., Amann, K., Brandes, R.P., Kretzler, M., Munter, K., Parekh, N., et al., Role of podocytes for reversal of glomerulosclerosis and proteinuria in the aging kidney after endothelin inhibition. *Hypertension*, 2004. 44(6): p. 974-81.
333. Morigi, M., Buelli, S., Angioletti, S., Zanchi, C., Longaretti, L., Zoja, C., et al., In response to protein load podocytes reorganize cytoskeleton and modulate endothelin-1 gene: implication for permselective dysfunction of chronic nephropathies. *Am J Pathol*, 2005. 166(5): p. 1309-20.

334. Wesson, D.E., Regulation of kidney acid excretion by endothelins. *Kidney Int*, 2006. 70(12): p. 2066-73.
335. Collino, F., Bussolati, B., Gerbaudo, E., Marozio, L., Pelissetto, S., Benedetto, C., and Camussi, G., Preeclamptic sera induce nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 294(5): p. F1185-94.
336. Pisoni, R., Ruggenti, P., and Remuzzi, G., Renoprotective therapy in patients with nondiabetic nephropathies. *Drugs*, 2001. 61(6): p. 733-45.
337. Opocensky, M., Dvorak, P., Maly, J., Kramer, H.J., Backer, A., Kopkan, L., et al., Chronic endothelin receptor blockade reduces end-organ damage independently of blood pressure effects in salt-loaded heterozygous Ren-2 transgenic rats. *Physiol Res*, 2004. 53(6): p. 581-93.
338. Placier, S., Boffa, J.J., Dussaule, J.C., and Chatziantoniou, C., Reversal of renal lesions following interruption of nitric oxide synthesis inhibition in transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. 21(4): p. 881-8.
339. Boffa, J.J., Tharaux, P.L., Dussaule, J.C., and Chatziantoniou, C., Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension*, 2001. 37(2 Part 2): p. 490-6.
340. Honing, M.L., Bouter, P.K., Ballard, D.E., and Rabelink, T.J., *ABT-627, a selective ETA receptor antagonist, reduces proteinuria in patients with diabetes mellitus*. 2000, Utrecht. p. 89-102.
341. Wenzel, R.R., Mann, J.J., Jurgens, C., Yildirim, I., Bruck, H., Philipp, T., and Mitchell, A. *The ETA - selective antagonist SPP301 on top of standard treatment reduces urinary albumin excretion rate in patients with diabetic nephropathy*. in *ASN Renal Week*. 2005.
342. Zanatta, C.M., Gerchman, F., Burtet, L., Nabinger, G., Jacques-Silva, M.C., Canani, L.H., and Gross, J.L., Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. 80(2): p. 299-304.
343. Cardillo, C., Campia, U., Iantorno, M., and Panza, J.A., Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension*, 2004. 43(1): p. 36-40.
344. Lteif, A., Vaishnava, P., Baron, A.D., and Mather, K.J., Endothelin limits insulin action in obese/insulin-resistant humans. *Diabetes*, 2007. 56(3): p. 728-34.
345. Mundy, A.L., Haas, E., Bhattacharya, I., Widmer, C.C., Kretz, M., Hofmann-Lehmann, R., Minotti, R., and Barton, M., Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(2): p. 368-75.
346. van Harmelen, V., Eriksson, A., Astrom, G., Wahlen, K., Naslund, E., Karpe, F., et al., Vascular peptide endothelin-1 links fat accumulation with alterations of visceral adipocyte lipolysis. *Diabetes*, 2008. 57(2): p. 378-86.
347. Ortman, J., Nett, P.C., Celeiro, J., Traupe, T., Tornillo, L., Hofmann-Lehmann, R., et al., Endothelin inhibition delays onset of hyperglycemia and associated vascular injury in type I diabetes: evidence for endothelin release by pancreatic islet beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 334(2): p. 689-95.
348. Rachdaoui, N. and Nagy, L.E., Endothelin-1-stimulated glucose uptake is desensitized by tumor necrosis factor-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. 285(3): p. E545-51.

349. Said, S.A., Ammar el, S.M., and Suddek, G.M., Effect of bosentan (ETA/ETB receptor antagonist) on metabolic changes during stress and diabetes. *Pharmacol Res*, 2005. 51(2): p. 107-15.
350. Wu-Wong, J.R., Berg, C.E., Wang, J., Chiou, W.J., and Fissel, B., Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 1999. 274(12): p. 8103-10.
351. Agui, T., Xin, X., Cai, Y., Sakai, T., and Matsumoto, K., Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stromal cells. *Blood*, 1994. 84(8): p. 2531-8.
352. Ferreira, S.H., Romitelli, M., and de Nucci, G., Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989. 13 Suppl 5: p. S220-2.
353. Grant, K., Loizidou, M., and Taylor, I., Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*, 2003. 88(2): p. 163-6.
354. Luft, F.C., Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002. 11(1): p. 59-66.
355. Virdis, A. and Schiffrin, E.L., Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003. 12(2): p. 181-7.
356. Nett, P.C., Teixeira, M.M., Candinas, D., and Barton, M., Recent developments on endothelin antagonists as immunomodulatory drugs--from infection to transplantation medicine. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2006. 1(3): p. 265-76.
357. Denton, C.P., Therapeutic targets in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, 2007. 9 Suppl 2: p. S6.
358. Mayes, M.D., Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 2003. 48(5): p. 1190-9.
359. Denton, C.P. and Black, C.M., Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2003. 29(2): p. 335-49, vii.
360. Hennessy, S. and Wigley, F.M., Current drug therapy for scleroderma and secondary Raynaud's phenomenon: evidence-based review. *Curr Opin Rheumatol*, 2007. 19(6): p. 611-8.
361. Korn, J.H., Mayes, M., Matucci Cerinic, M., Rainisio, M., Pope, J., Hachulla, E., et al., Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(12): p. 3985-93.
362. Sfikakis, P.P., Papamichael, C., Stamatelopoulos, K.S., Tousoulis, D., Fragiadaki, K.G., Katsichti, P., Stefanadis, C., and Mavrikakis, M., Improvement of vascular endothelial function using the oral endothelin receptor antagonist bosentan in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 2007. 56(6): p. 1985-93.
363. Ebihara, I., Nakamura, T., Tomino, Y., and Koide, H., Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on murine lupus nephritis and IgA nephropathy. *Contrib Nephrol*, 1996. 118: p. 155-63.
364. Nakamura, T., Ebihara, I., Fukui, M., Tomino, Y., and Koide, H., Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes*, 1995. 44(8): p. 895-9.

365. Camargos, E.R., Rocha, L.L., Rachid, M.A., Almeida, A.P., Ferreira, A.J., Teixeira, A.L., Jr., et al., Protective role of ETA endothelin receptors during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect*, 2004. 6(7): p. 650-6.
366. Souza-Rodrigues, R.D., Costa, A.M., Lima, R.R., Dos Santos, C.D., Picanco-Diniz, C.W., and Gomes-Leal, W., Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. *Brain Res*, 2008. 1200: p. 78-88.
367. Lattmann, T., Hein, M., Horber, S., Ortmann, J., Teixeira, M.M., Souza, D.G., et al., Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling. *Am J Transplant*, 2005. 5(5): p. 1042-9.
368. Braun, C., Conzelmann, T., Vetter, S., Schaub, M., Back, W.E., Yard, B., et al., Prevention of chronic renal allograft rejection in rats with an oral endothelin A receptor antagonist. *Transplantation*, 1999. 68(6): p. 739-46.
369. Fukunaga, K., Takada, Y., Taniguchi, H., Mei, G., Seino, K.I., Yuzawa, K., et al., Endothelin antagonist treatment for successful liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation*, 1999. 67(2): p. 328-32.
370. Orth, S.R., Odoni, G., Amann, K., Strzelczyk, P., Raschack, M., and Ritz, E., The ET(A) receptor blocker LU 135252 prevents chronic transplant nephropathy in the "Fisher to Lewis" model. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(2): p. 387-91.
371. Shennib, H., Lee, A.G., Kuang, J.Q., Yanagisawa, M., Ohlstein, E.H., and Giaid, A., Efficacy of administering an endothelin-receptor antagonist (SB209670) in ameliorating ischemia-reperfusion injury in lung allografts. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(6 Pt 1): p. 1975-81.
372. Tang, J.L., Aitouche, A., Subbotin, V., Salam, A., Sun, H., Gandhi, C., et al., Endothelin-1 receptor blockade and its effect on chronic rejection. *Transplant Proc*, 1999. 31(1-2): p. 1249.
373. Ziv, I., Fleminger, G., Djaldetti, R., Achiron, A., Melamed, E., and Sokolovsky, M., Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke*, 1992. 23(7): p. 1014-6.
374. Macrae, I.M., Robinson, M.J., Graham, D.I., Reid, J.L., and McCulloch, J., Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1993. 13(2): p. 276-84.
375. Kessler, I.M., Pacheco, Y.G., Lozzi, S.P., de Araujo, A.S., Jr., Onishi, F.J., and de Mello, P.A., Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol*, 2005. 64 Suppl 1: p. S1:2-5; discussion S1:5.
376. Vatter, H., Zimmermann, M., Tesanovic, V., Raabe, A., Seifert, V., and Schilling, L., Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. *J Neurosurg*, 2005. 102(6): p. 1108-14.
377. Sanai, L., Haynes, W.G., MacKenzie, A., Grant, I.S., and Webb, D.J., Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*, 1996. 22(1): p. 52-6.
378. Tschakowsky, K., Sagner, S., Lehnert, N., Kaul, M., and Ritter, J., Endothelin in septic patients: effects on cardiovascular and renal function and its

- relationship to proinflammatory cytokines. *Crit Care Med*, 2000. 28(6): p. 1854-60.
379. Voerman, H.J., Stehouwer, C.D., van Kamp, G.J., Strack van Schijndel, R.J., Groeneveld, A.B., and Thijs, L.G., Plasma endothelin levels are increased during septic shock. *Crit Care Med*, 1992. 20(8): p. 1097-101.
 380. Chauhan, B.C., Endothelin and its potential role in glaucoma. *Can J Ophthalmol*, 2008. 43(3): p. 356-60.
 381. Angerio, A.D., Bufalino, D., Bresnick, M., Bell, C., and Brill, S., Inflammatory bowel disease and endothelin-1: a review. *Crit Care Nurs Q*, 2005. 28(2): p. 208-13.
 382. Antoniu, S.A., Targeting the endothelin pathway in the idiopathic pulmonary fibrosis: the role of bosentan. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. 12(9): p. 1077-84.
 383. Zietkowski, Z., Skiepkowski, R., Tomasiak, M.M., and Bodzenta-Lukaszyk, A., Endothelin-1 in exhaled breath condensate of allergic asthma patients with exercise-induced bronchoconstriction. *Respir Res*, 2007. 8: p. 76.
 384. Nurnberger, W., Plasma endothelin and the hepatorenal syndrome. *N Engl J Med*, 1993. 329(1): p. 63.
 385. Mangiafico, R.A., Malatino, L.S., Attina, T., Messina, R., and Fiore, C.E., Exaggerated endothelin release in response to acute mental stress in patients with intermittent claudication. *Angiology*, 2002. 53(4): p. 383-90.
 386. Inoue, K., Hirota, M., Kimura, Y., Kuwata, K., Ohmuraya, M., and Ogawa, M., Further evidence for endothelin as an important mediator of pancreatic and intestinal ischemia in severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 2003. 26(3): p. 218-23.
 387. Miyauchi, T., Tomobe, Y., Shiba, R., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., et al., Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus. Potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. *Circulation*, 1990. 81(6): p. 1874-80.
 388. Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P., The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(2): p. 110-6.
 389. Bagnato, A., Spinella, F., and Rosano, L., The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008. 86(8): p. 473-84.
 390. Bagnato, A., Spinella, F., and Rosano, L., The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 2008. 86(8): p. 473-84.
 391. Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P., The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2003. 3(2): p. 110-6.
 392. Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K.J., and Tecce, R., Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer research*, 2000. 60(18): p. 5310-7.
 393. Bagnato, A., Spinella, F., and Rosano, L., Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocrine-related cancer*, 2005. 12(4): p. 761-72.
 394. Rosano, L., Di Castro, V., Spinella, F., Tortora, G., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A., Combined targeting of endothelin A receptor and epidermal growth factor receptor in ovarian cancer shows enhanced antitumor activity. *Cancer research*, 2007. 67(13): p. 6351-9.

395. Bek, E.L. and McMillen, M.A., Endothelins are angiogenic. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2000. 36(5 Suppl 1): p. S135-9.
396. Salani, D., Di Castro, V., Nicotra, M.R., Rosano, L., Tecce, R., Venuti, A., Natali, P.G., and Bagnato, A., Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *The American journal of pathology*, 2000. 157(5): p. 1537-47.
397. Wulfing, P., Kersting, C., Tio, J., Fischer, R.J., Wulfing, C., Poremba, C., Diallo, R., Bocker, W., and Kiesel, L., Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2004. 10(7): p. 2393-400.
398. Wenger, R.H., Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *The Journal of experimental biology*, 2000. 203(Pt 8): p. 1253-63.
399. Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Natali, P.G., and Bagnato, A., Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *The Journal of biological chemistry*, 2002. 277(31): p. 27850-5.
400. Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A., Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 expression by targeting the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2004. 10(14): p. 4670-9.
401. Minchenko, A. and Caro, J., Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Molecular and cellular biochemistry*, 2000. 208(1-2): p. 53-62.
402. Grimshaw, M.J., Naylor, S., and Balkwill, F.R., Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Molecular cancer therapeutics*, 2002. 1(14): p. 1273-81.
403. Grimshaw, M.J., Hagemann, T., Ayhan, A., Gillett, C.E., Binder, C., and Balkwill, F.R., A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer research*, 2004. 64(7): p. 2461-8.
404. Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Decandia, S., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A., Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells. *Cancer research*, 2007. 67(4): p. 1725-34.
405. Λιάκου, Π., *Μέτρηση της Ενδοθηλίνης - 1 (ET-1) και Αγγειοδραστικού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGF) σε συνδυασμό με τη μέτρηση αιμάτωσης του ήπατος (DPI) στους ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου*. 2012, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα.
406. Sood, A.K., Fletcher, M.S., Coffin, J.E., Yang, M., Seftor, E.A., Gruman, L.M., Gershenson, D.M., and Hendrix, M.J., Functional role of matrix metalloproteinases in ovarian tumor cell plasticity. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2004. 190(4): p. 899-909.
407. Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Salani, D., Rosano, L., Spinella, F., and Bagnato, A., Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin Sci (Lond)*, 2002. 103 Suppl 48: p. 302S-5S.
408. Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Varmi, M., Salani, D., Rosano, L., Trisciuglio, D., Spinella, F., and Bagnato, A., Endothelin-1 protects ovarian

- carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol*, 2002. 61(3): p. 524-32.
409. Bagnato, A., Spinella, F., and Rosano, L., Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, 2005. 12(4): p. 761-72.
410. Grimshaw, M.J., Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2007. 14(2): p. 233-44.
411. Buckanovich, R.J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., et al., Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med*, 2008. 14(1): p. 28-36.
412. Corder, R., Douthwaite, J.A., Lees, D.M., Khan, N.Q., Viseu Dos Santos, A.C., Wood, E.G., and Carrier, M.J., Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, 2001. 414(6866): p. 863-4.
413. Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Decandia, S., Albini, A., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A., Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the endothelin axis and downstream signaling pathways in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(6): p. 1483-92.
414. Xu, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., and Yanagisawa, M., ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, 1994. 78(3): p. 473-85.
415. Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Morita, T., Ino, K., Mizutani, S., and Kikkawa, F., Neutral endopeptidase 24.11/CD10 suppresses progressive potential in ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(5): p. 1798-808.
416. Nelson, J.B., Chan-Tack, K., Hedican, S.P., Magnuson, S.R., Opgenorth, T.J., Bova, G.S., and Simons, J.W., Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 1996. 56(4): p. 663-8.
417. Bagnato, A., Salani, D., Di Castro, V., Wu-Wong, J.R., Tecce, R., Nicotra, M.R., Venuti, A., and Natali, P.G., Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*, 1999. 59(3): p. 720-7.
418. Salani, D., Taraboletti, G., Rosano, L., Di Castro, V., Borsotti, P., Giavazzi, R., and Bagnato, A., Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol*, 2000. 157(5): p. 1703-11.
419. Asham, E., Shankar, A., Loizidou, M., Fredericks, S., Miller, K., Boulos, P.B., Burnstock, G., and Taylor, I., Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer*, 2001. 85(11): p. 1759-63.
420. Bagnato, A. and Spinella, F., Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. 14(1): p. 44-50.
421. Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V., and Catt, K.J., Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 1997. 57(7): p. 1306-11.
422. Nelson, J.B., Opgenorth, T.J., Fleisher, L.A., and Frank, S.M., Perioperative plasma endothelin-1 and Big endothelin-1 concentrations in elderly patients undergoing major surgical procedures. *Anesth Analg*, 1999. 88(4): p. 898-903.

423. Pedram, A., Razandi, M., Hu, R.M., and Levin, E.R., Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*, 1997. 272(27): p. 17097-103.
424. Salani, D., Di Castro, V., Nicotra, M.R., Rosano, L., Tecce, R., Venuti, A., Natali, P.G., and Bagnato, A., Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*, 2000. 157(5): p. 1537-47.
425. Alanen, K., Deng, D.X., and Chakrabarti, S., Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology*, 2000. 36(2): p. 161-7.
426. Wulfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wulfing, C., Poremba, C., Greb, R.R., Bocker, W., and Kiesel, L., Endothelin-1, Endothelin-A- and Endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep*, 2004. 11(4): p. 791-6.
427. Yamashita, J., Ogawa, M., Inada, K., Yamashita, S., Matsuo, S., and Takano, S., A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1991. 74(3): p. 363-9.
428. Wulfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wulfing, C., Poremba, C., Rody, A., Greb, R.R., Bocker, W., and Kiesel, L., Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(11): p. 4125-31.
429. Hagemann, T., Binder, C., Binder, L., Pukrop, T., Trumper, L., and Grimshaw, M.J., Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. *DNA Cell Biol*, 2005. 24(11): p. 766-76.
430. Yildirim, Y., Gunel, N., Coskun, U., Sancak, B., Bukan, N., Aslan, S., and Cetin, A., Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer. *Int Immunopharmacol*, 2008. 8(8): p. 1119-23.
431. Smollich, M., Gotte, M., Fischgrabe, J., Macedo, L.F., Brodie, A., Chen, S., Radke, I., Kiesel, L., and Wulfing, P., ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast cancer research and treatment*, 2010. 123(2): p. 345-57.
432. Fischgrabe, J., Gotte, M., Michels, K., Kiesel, L., and Wulfing, P., Targeting endothelin A receptor enhances anti-proliferative and anti-invasive effects of the HER2 antibody trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int J Cancer*, 2010. 127(3): p. 696-706.
433. Kefford, R., Beith, J.M., Van Hazel, G.A., Millward, M., Trotter, J.M., Wyld, D.K., et al., A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs*, 2007. 25(3): p. 247-52.
434. Carducci, M.A., Saad, F., Abrahamsson, P.A., Dearnaley, D.P., Schulman, C.C., North, S.A., Sleep, D.J., Isaacson, J.D., and Nelson, J.B., A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*, 2007. 110(9): p. 1959-66.
435. Chiappori, A.A., Haura, E., Rodriguez, F.A., Boulware, D., Kapoor, R., Neuger, A.M., et al., Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official*

- journal of the American Association for Cancer Research*, 2008. 14(5): p. 1464-9.
436. Binder, C., Hagemann, T., Sperling, S., Schulz, M., Pukrop, T., Grimshaw, M.J., and Ehrenreich, H., Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Molecular cancer therapeutics*, 2009. 8(8): p. 2452-60.
 437. Abdel-Gawad, I.A., Hassanein, H.M., Bahgat, N.A., Abdel Sattar, M.A., El-Sissy, A.H., Altaweel, M.A., and Helal, A.M., Study of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with cancer colon. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2008. 20(3): p. 216-23.
 438. Moszynski, R., Szpurek, D., Michalak, S., Szubert, S., and Sajdak, S., The role of endothelin-1 and its correlation with CA125 levels, grayscale ultrasonography and doppler findings in differential diagnoses of ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2009. 30(5): p. 552-6.
 439. Strijbos, M.H., Gratama, J.W., Schmitz, P.I., Rao, C., Onstenk, W., Doyle, G.V., et al., Circulating endothelial cells, circulating tumour cells, tissue factor, endothelin-1 and overall survival in prostate cancer patients treated with docetaxel. *Eur J Cancer*, 2010. 46(11): p. 2027-35.
 440. Hensen, A., Ahlborg, G., Ottosson-Seeberger, A., and Lundberg, J.M., Metabolism of Big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin-1 (1-21). *Regul Pept*, 1995. 55(3): p. 287-97.
 441. Patel, K.V. and Schrey, M.P., Human breast cancer cells contain a phosphoramidon-sensitive metalloproteinase which can process exogenous big endothelin-1 to endothelin-1: a proposed mitogen for human breast fibroblasts. *Br J Cancer*, 1995. 71(3): p. 442-7.
 442. Ishibashi, M., Fujita, M., Nagai, K., Kako, M., Furue, H., Haku, E., Osamura, Y., and Yamaji, T., Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76(2): p. 378-83.
 443. Simpson, R.A., Dickinson, T., Porter, K.E., London, N.J., and Hemingway, D.M., Raised levels of plasma big endothelin 1 in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*, 2000. 87(10): p. 1409-13.
 444. Bhalla, A., Haque, S., Taylor, I., Winslet, M., and Loizidou, M., Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest*, 2009. 39 Suppl 2: p. 74-7.
 445. Wulfing, P., Diallo, R., Kersting, C., Wulfing, C., Poremba, C., Rody, A., Greb, R.R., Bocker, W., and Kiesel, L., Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2003. 9(11): p. 4125-31.
 446. Kojima, K. and Nihei, Z., Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer. *Surg Oncol*, 1995. 4(6): p. 309-15.
 447. Baley, P.A., Resink, T.J., Eppenberger, U., and Hahn, A.W., Endothelin messenger RNA and receptors are differentially expressed in cultured human breast epithelial and stromal cells. *J Clin Invest*, 1990. 85(4): p. 1320-3.
 448. Gasparini, G., Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001. 37(2): p. 97-114.

449. Wulfing, P., Kersting, C., Buerger, H., Mattsson, B., Mesters, R., Gustmann, C., et al., Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br J Cancer*, 2005. 92(9): p. 1720-8.
450. Wulfing, P., Kersting, C., Tio, J., Fischer, R.J., Wulfing, C., Poremba, C., Diallo, R., Bocker, W., and Kiesel, L., Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(7): p. 2393-400.
451. Wulfing, P., Tio, J., Kersting, C., Sonntag, B., Buerger, H., Wulfing, C., et al., Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 2004. 91(3): p. 434-40.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Circulating levels of endothelin-1 (ET-1) and its precursor (Big ET-1) in breast cancer early diagnosis

Vasileios Kalles · George C. Zografos ·
Xeni Provatopoulou · Eleni Kalogera ·
Paraskevi Liakou · Georgia Georgiou ·
Alexandros Sagkriotis · Aphroditis Nonni ·
Antonia Gounaris

Received: 24 November 2011 / Accepted: 23 February 2012
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2012

Abstract Deregulation of the endothelin system, comprised of endothelin-1 (ET-1), its isoforms (ET-2 and ET-3) and their receptors (ET_AR and ET_BR), is under investigation in various types of human cancer. ET-1 has been suggested to participate in breast cancer development and progression, while Big ET-1, its biological precursor, has also been found elevated in breast cancer patients. In the present study, we investigated plasma ET-1 and Big ET-1 levels in patients with suspicious mammographic lesions, in order to assess their potential application as diagnostic biomarkers in the early estimation of breast disease. The study consisted of 94 patients (Group A: to 30 patients with invasive ductal carcinoma; Group B: 30 with ductal carcinoma in situ; and Group C: 34 with papilloma or ductal hyperplasia), who underwent an image-guided vacuum-assisted breast biopsy, and 30 healthy controls (group D). ET-1 and Big ET-1 plasma levels were measured with enzyme-linked immunosorbent assay. ET-1 levels did not exhibit significant differences between patients and healthy controls (Group A: to 0.92 fmol/mL; Group B: 0.90 fmol/mL; Group C: 0.66 fmol/mL; and Group D: 0.86 fmol/mL). In contrast, Big ET-1 levels were significantly

higher in patients with invasive or in situ carcinoma compared to healthy controls (Group A: 0.69 fmol/mL; Group B: 0.62 fmol/mL; and Group D: 0.39 fmol/mL; $p < 0.001$ and $p < 0.01$). Plasma Big ET-1 may provide a useful tool for the early detection of invasive or noninvasive ductal breast cancer. The utilization of such a diagnostic tool would greatly assist in the modern management of breast cancer.

Keywords Endothelin-1 · Big endothelin-1 · Invasive ductal breast cancer · Ductal carcinoma in situ

Introduction

Endothelin-1 (ET-1) is a 21-amino acid peptide, identified by Yanagisawa et al. in 1988 as a vasoconstricting agent, produced by endothelial, vascular smooth muscle and epithelial cells [1, 2]. ET-1 and its isoforms ET-2 and ET-3 exert their effects through two types of G protein-coupled receptors, namely ET_AR and ET_BR [3–5]. The three peptide hormones (ET-1, ET-2, and ET-3), their G protein-coupled receptors, and the enzymes of endothelin biosynthesis (endothelin-converting enzyme, ECE) and degradation (nepriylsin) comprise the endothelin system. The biological precursor of ET-1 is Big ET-1 or proendothelin-1, a 38-amino acid peptide converted to ET-1 under the activity of the endothelin-converting enzyme [6].

Since its identification, an impressive amount of data has accumulated regarding the role of the endothelin system in a variety of physiological functions [7]. Apart from the role of ET-1 in the regulation of the vascular tone, being 100 times more potent vasoconstricting agent than noradrenaline [8], it is currently under the spotlight as a vital agent during

V. Kalles · G. C. Zografos · P. Liakou · G. Georgiou
Breast Unit, 1st Department of Propaedeutic Surgery,
Hippokratio Hospital, University of Athens,
Athens, Greece

X. Provatopoulou · E. Kalogera · A. Sagkriotis · A. Gounaris (✉)
Research Center, Hellenic Anticancer Institute,
11 Valtetsiou St.,
Athens 10680, Greece
e-mail: antgouna@otenet.gr

A. Nonni
Department of Pathology, University of Athens,
Athens, Greece

growth and progression of certain tumors, including colorectal, prostate, ovarian, and breast [9–12]. More specifically, preclinical and clinical studies suggest that ET-1 is involved in tumor cell proliferation, invasion, angiogenesis, and neovascularization in various tumor types [9, 13–18].

In breast cancer, expression of components of the endothelin system has been associated with the transition from normal tissue to progressively invasive lesions [19]. ET-1 expression has been evaluated applying several methods, such as RIA, immunohistochemistry (IHC), and RT-PCR [20–23]. ET-1 overexpression in cancerous breast tissue compared to normal tissue has been demonstrated since the past decade [22]. Increased tissue ET-1, ET_AR, and ET_BR expression has been shown to correlate with more aggressive types of breast carcinomas, poorer prognosis, and reduced overall survival [24].

Recently, circulating levels of ET-1 and Big ET-1 have been evaluated in breast cancer patients, but data are still scarce [25, 26]. ET-1 has been found increased in patients with lymph node-positive breast cancer [25]. Serum Big ET-1 levels, on the other hand, have been investigated in patients with invasive ductal carcinoma and have been found elevated in comparison to healthy controls or off-therapy patients [26]. In the present study, we investigated plasma ET-1 and Big ET-1 levels in patients with newly diagnosed non-palpable suspicious mammographic lesions, in order to assess their potential application as diagnostic biomarkers in the early detection of breast disease.

Materials and methods

Patient population

The study consisted of 94 female patients with a mean age of 53.55 ± 12.18 years, undergoing an image-guided vacuum-assisted breast biopsy and 30 healthy controls with a mean age of 55.07 ± 11.59 years. The study was approved by the hospital's ethics committee, and written consent was obtained from all the patients.

Inclusion criteria consisted of the presence of suspicious non-palpable mammographic breast lesions, such as microcalcifications, solid lesions, or asymmetric breast density, classified as BIRADS ≥ 4 . All biopsies were performed by the surgeon—radiologist team at the Breast Unit of Hippokratiko Hospital of Athens—under stereotactic mammographic guidance, on the Fischer's Mammotest™ stereotactic table (Fischer Imaging, Denver, CO, USA). Patients were excluded from the study, if they had body weight over 120 kg, severe osteoarthritis, severe chronic respiratory problems, or severe heart failure. Healthy controls were women who attended the Breast Unit for their annual mammography and clinical breast examination,

during which the presence of breast cancer or other suspicious findings was excluded.

Sample analysis

Peripheral venous blood samples were collected prior to the biopsy procedure in ethylenediaminetetraacetic acid-containing tubes and were processed according to standard protocols. The plasma supernatant was subsequently stored in aliquots at -80°C . Plasma levels of ET-1 and Big ET-1 were measured in duplicates with an enzyme-linked immunosorbent assay, according to manufacturer instructions (Biomedica Gruppe, Austria).

Statistical analysis

For the statistical analysis, the STATISTICA v.10 statistical package (StarSoft Inc., Tulsa, USA) was used. Differences in ET-1 and Big ET-1 plasma levels among patient groups were evaluated with the Kruskal–Wallis and multiple comparisons tests. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess the normality of distribution of each parameter. The presence of statistically significant correlations between ET-1 or Big ET-1 levels and age was determined using Pearson's correlation coefficient if parameters were normally distributed and Spearman's correlation coefficient if distribution was not normal. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Patients were divided into three independent groups according to the histopathological diagnosis of the breast lesion. Group A included 30 patients with invasive ductal carcinoma (IDC); group B, 30 patients with ductal carcinoma in situ (DCIS); and group C, 34 women with papilloma or ductal hyperplasia without atypia. Group D consisted of 30 healthy controls (Table 1).

ET-1 plasma expression was determined in 88/95 patients and 29/30 controls. Median ET-1 levels were 0.92 fmol/mL in group A (interquartile range=0.61–1.62 fmol/mL), 0.90 fmol/mL in group B (interquartile range=0.54–1.78 fmol/mL), 0.66 fmol/mL in group C (interquartile

Table 1 Age (mean \pm SD) of study participants within each patient group (group A: invasive ductal carcinoma, group B: ductal carcinoma in situ, group C: papilloma/hyperplasia, and group D: healthy controls)

	Group A	Group B	Group C	Group D
<i>N</i>	30	30	34	30
Age (years)	56.9 ± 13.0	53.9 ± 11.4	50.4 ± 11.7	55.1 ± 11.6

range=0.46–0.90 fmol/mL), and 0.86 fmol/mL in group D (interquartile range=0.63–1.22 fmol/mL) subjects. Statistical analysis showed no significant differences in ET-1 plasma levels between the four patient groups.

As far as Big ET-1 plasma expression is concerned, it was determined in 94/94 patients and 30/30 control samples. Median levels were 0.69 fmol/mL in group A (interquartile range=0.58–1.97 fmol/mL), 0.62 fmol/mL in group B (interquartile range=0.49–0.88 fmol/mL), 0.64 fmol/mL in group C (interquartile range=0.27–1.43 fmol/mL), and 0.39 fmol/mL in group D (interquartile range=0.15–0.55 fmol/mL) patients. Statistically significant differences in Big ET-1 plasma levels were observed between the four patient groups ($p=0.0005$). Multiple comparisons of mean ranks for all groups showed that Big ET-1 plasma levels were significantly higher in patients with invasive ductal carcinoma and ductal carcinoma in situ compared to healthy controls ($p<0.001$ and $p<0.01$, respectively) (Fig. 1).

A statistically significant correlation between Big ET-1 expression and age was observed but only for healthy controls (Pearson's $r=0.414$, $p<0.05$) (Fig. 2). On the contrary, ET-1 expression was not correlated to the age of the subjects.

Discussion

Current management of breast cancer is oriented toward earliest diagnosis and individualized care, mainly due to improvements in imaging methods, the discovery of novel biomarkers, and the development of tailored therapies. The discovery of new specific biomarkers of predictive, prognostic, and diagnostic value during the last decades has

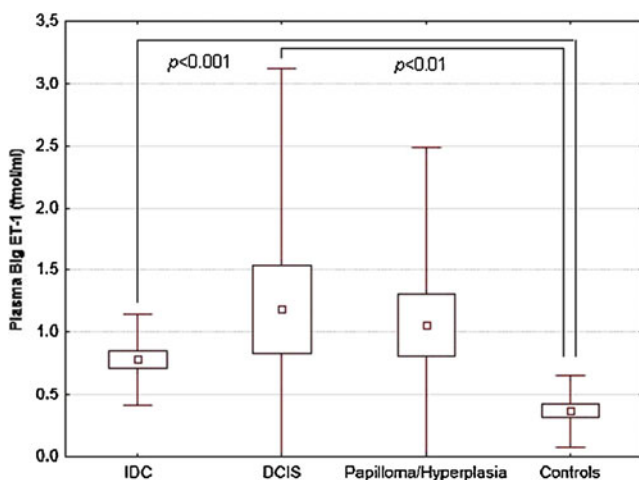


Fig. 1 Box and whisker plot of plasma Big ET-1 levels in patients with invasive ductal carcinoma (IDC), ductal carcinoma in situ (DCIS), and papilloma or hyperplasia and in healthy controls

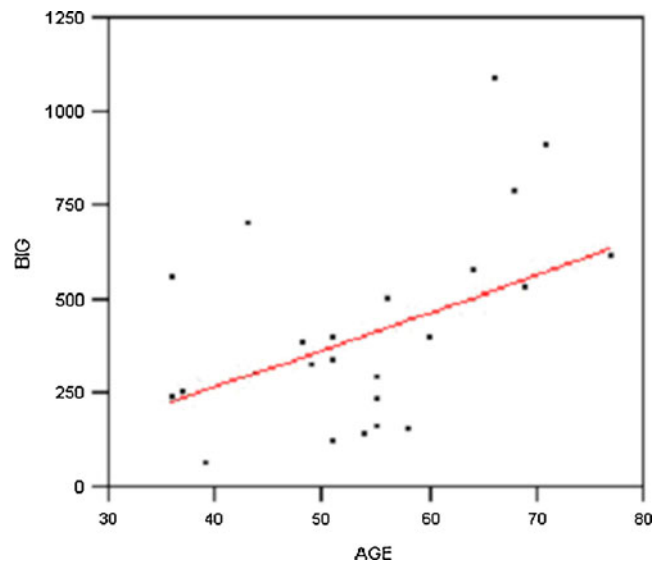


Fig. 2 Linear correlation between Big ET-1 plasma expression and age in healthy controls (Pearson's $r=0.414$, $p<0.05$)

significantly contributed to this task. With the objective of improving breast cancer control, ET-1, as well as its receptors (ET_{AR} and ET_{BR}) and its biological precursor (Big ET-1), has lately been under investigation.

Nowadays, various preclinical studies focus on the potential targeting of the ET system during treatment of breast cancer. Selective ET_{AR} antagonism has been shown to display antitumoral activity on breast cancer cells both in vitro and in vivo, exhibiting additive effects in combination with aromatase inhibitors and fulvestrant and improving the in vivo efficacy of anastrozole [27]. In Her2-overexpressing human breast cancer cells, ET_{AR} antagonism augmented the antiproliferative and anti-invasive effect of Her2-targeted therapy [28]. However, results from clinical studies in patients with advanced melanomas, prostate cancer, or non-small cell lung cancer were disappointing [29–31]. Apparently, apart from the ET system members, there are other determinants in the tumor cells, which remain yet undefined, that influence the in vivo outcome [32].

Existing data support the hypothesis that ET-1 expression increases in parallel with disease progression [33]. Indeed, higher ET-1 levels were originally observed in malignant breast tissue extracts in comparison to benign lesions or normal breast tissue [22]. Furthermore, Alanen et al. have described moderate to strong tissue expression of ET-1 in breast carcinomas but weak IHC staining in normal or fibroadenous tissues [20]. Increased expression of ET-1 and ET_{AR} has also been immunohistochemically observed in invasive breast cancer tissue compared to in situ or normal breast tissue [33]. A recent study identified a consistent and significantly higher expression of ET-1, ET_{AR} , and ET_{BR} in IDC and DCIS tissue specimens in comparison to normal breast tissue, suggesting that increased expression

of the ET axis might be associated with an increasing malignant potential [33].

Increased expression of ET-1 and its receptors in breast cancer tissue has also been found to correlate with essential clinicopathological parameters that characterize aggressive types of tumors and predict an unfavorable outcome, such as larger tumor size, lymphovascular invasion, distant metastasis, higher histological grade, and Her2-overexpression [24]. In the same study, the investigators demonstrated that expression of ET-1 and its receptors was increased in patients with lower disease-free survival (DFS) and overall survival, while ET_AR expression significantly correlated with decreased DFS. Increased expression of ET_AR has also been shown to be an independent predictive marker for unfavorable response in neoadjuvant chemotherapy [34].

Angiogenesis is a vital process during tumor growth and metastasis; thus, antiangiogenic strategies for the treatment of breast cancer are of major interest. The role of ET-1 and its receptors has been studied in correlation with the vascular endothelial growth factor (VEGF), which is considered as one of the most important factors implicated in angiogenesis in breast cancer [35, 36]. Increased ET-1, ET_AR, and ET_BR expression has been associated with increased VEGF expression and higher vascularity, as assessed by tumor microvessel density, in breast cancer tissue [37].

Serum levels of ET-1 have been evaluated in various human cancers, including ovarian, prostate, colon, and breast cancers [25, 38–40]. In ovarian cancer, circulating ET-1 levels failed to mark out as a potential biomarker for the prediction of the disease [39]. Similarly, in prostate cancer, serum concentrations of ET-1 were not prognostic for overall survival [40]. On the contrary, ET-1 levels were significantly elevated in colon cancer patients with or without liver metastasis as well as in patients with hepatocellular carcinoma [38, 41]. Regarding breast cancer, only one study has been available so far investigating ET-1 serum expression in correlation to lymph node involvement [25]. According to this, ET-1 is increased in the serum of breast cancer patients with lymph node metastasis compared to those with no lymph node involvement. Our study aimed to investigate the expression of ET-1 and its precursor Big ET-1 in early stages of breast disease, presented as small, mammographically detectable lesions. Regarding ET-1, the results demonstrate that there is no significant difference between patients with primary invasive or in situ ductal carcinoma compared to healthy controls.

The biological precursor Big ET-1 has a much longer half-life than ET-1 and is mainly cleared through kidney and liver [42, 43]. It has been demonstrated that human breast cancer cells express the ECE, which converts Big ET-1 to ET-1 [6]. Thus, Big ET-1 is also considered a candidate marker for the investigation of the ET-1 secretory activity [42]. Circulating Big ET-1 has been found elevated

in patients with hepatocellular cancer, while successful tumor embolization resulted in a decrease in the amount of Big ET-1 and a concomitant reduction in tumor size [41]. Elevated levels of Big ET-1 have also been demonstrated in the plasma of patients with colorectal cancer, while those with liver metastases had significantly higher levels than those with localized disease [44]. Similarly, a recent study reported significantly higher serum Big ET-1 levels in primary breast cancer patients compared to off-therapy patients, healthy controls, and patients with metastatic disease (who had undergone surgery and/or received chemotherapy) [26]. According to our results, Big ET-1 levels were significantly higher in patients with invasive or in situ ductal carcinoma, but not in those diagnosed with papilloma or ductal hyperplasia, compared to healthy controls, thus outlining an important potential correlation between circulating Big ET-1 levels and malignant characteristics. In healthy controls, Big ET-1 levels exhibited a statistically significant correlation with age. However, this relationship seems to become deranged in the presence of breast disease.

Our observation of elevated expression of plasma Big ET-1, not accompanied by a corresponding change in ET-1 levels, in breast carcinoma could potentially be attributed to the deregulation of ECE expression or activity, affecting the balance between the precursor molecule and its active form. The only currently available evidence come from Smollich et al., who reported that the transition from normal breast tissue to carcinoma is associated with an insignificant reduction in ECE expression but a significant decline in the expression of ET-1's degrading enzyme, neprilysin [45]. Taking into consideration that ECE activity in breast cancer has not yet been investigated, it seems reasonable that further studies addressing this issue could be initiated in order to elucidate potential changes in all components of the endothelin system during malignant transformation.

Significant correlations between increased ET-1 tissue expression and several clinicopathological parameters of aggressive breast carcinoma, including histological tumor grade, have been observed [24]. On the contrary, serum Big ET-1 levels are not correlated to tumor stage, hormone receptor status, or lymph node status in primary breast cancer [26]. The correlation between plasma ET-1 and Big ET-1 levels and disease grade remains to be further investigated.

In summary, our study investigates plasma ET-1 and Big ET-1 levels in patients with newly diagnosed, nonpalpable suspicious mammographic lesions, extending the spectrum of breast cancer patients in which ET-1 and Big ET-1 levels have been studied. Plasma ET-1 is unlikely to be regarded as a promising diagnostic or prognostic biomarker. Plasma Big ET-1, on the contrary, may provide a useful tool for the early detection of invasive or noninvasive ductal breast cancer. The utilization of such a diagnostic tool would greatly assist in the modern management of breast cancer.

Acknowledgments We would like to thank AN Kastania for her contribution to this work. The study was financially supported by the Hellenic Anticancer Institute.

Conflicts of interest None.

References

- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411–5.
- Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356–63.
- Williams Jr DL, Jones KL, Colton CD, Nutt RF. Identification of high affinity endothelin-1 receptor subtypes in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;180:475–80.
- Hoyer D, Waeber C, Palacios JM. [125I]endothelin-1 binding sites: autoradiographic studies in the brain and periphery of various species including humans. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;13 Suppl 5:S162–5.
- Masaki T. Tissue specificity of the endothelin-induced responses. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17 Suppl 7:S1–4.
- Patel KV, Schrey MP. Human breast cancer cells contain a phosphoramidon-sensitive metalloproteinase which can process exogenous big endothelin-1 to endothelin-1: a proposed mitogen for human breast fibroblasts. *Br J Cancer*. 1995;71:442–7.
- Grimshaw MJ. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocrin Relat Cancer*. 2007;14:233–44.
- Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86:485–98.
- Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, et al. Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res*. 1996;56:663–8.
- Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, et al. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*. 1999;59:720–7.
- Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosanò L, Tecce R, Venuti A, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol*. 2000;157:1537–47.
- Asham E, Shankar A, Loizidou M, Fredericks S, Miller K, Boulos PB, et al. Increased endothelin-1 in colorectal cancer and reduction of tumour growth by ET(A) receptor antagonism. *Br J Cancer*. 2001;85:1759–63.
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:110–6.
- Bagnato A, Spinella F. Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14:44–50.
- Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12:761–72.
- Bagnato A, Tecce R, Di Castro V, Catt KJ. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 1997;57:306–11.
- Pedram A, Razandi M, Hu RM, Levin ER. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem*. 1997;272:17097–103.
- Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157:1703–11.
- Bagnato A, Spinella F, Rosanò L. The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86:473–84.
- Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology*. 2000;36:161–7.
- Kojima K, Nihei Z. Expression of endothelin-1 immunoreactivity in breast cancer. *Surg Oncol*. 1995;4:309–15.
- Yamashita J, Ogawa M, Inada K, Yamashita S, Matsuo S, Takano S. A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1991;74:363–9.
- Yamashita J, Ogawa M, Sakai K. Prognostic significance of three novel biologic factors in a clinical trial of adjuvant therapy for node-negative breast cancer. *Surgery*. 1995;117:601–8.
- Wulfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Rody A, et al. Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4125–31.
- Hagemann T, Binder C, Binder L, Pukrop T, Trümper L, Grimshaw MJ. Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. *DNA Cell Biol*. 2005;24:766–76.
- Yildirim Y, Gunel N, Coskun U, Sancak B, Bukan N, Aslan S, et al. Serum big endothelin-1 levels in female patients with breast cancer. *Int Immunopharmacol*. 2008;8:1119–23.
- Smollich M, Götte M, Fischgräbe J, Macedo LF, Brodie A, Chen S, et al. ETAR antagonist ZD4054 exhibits additive effects with aromatase inhibitors and fulvestrant in breast cancer therapy, and improves in vivo efficacy of anastrozole. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;123:345–57.
- >Fischgräbe J, Götte M, Michels K, Kiesel L, Wulfing P. Targeting endothelin A receptor enhances anti-proliferative and anti-invasive effects of the HER2 antibody trastuzumab in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2010;127:696–706.
- Carducci MA, Saad F, Abrahamsson PA, Dearnaley DP, Schulman CC, North SA, et al. Atrasentan Phase III Study Group Institutions. A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*. 2007;110:1959–66.
- Chiappori AA, Haura E, Rodriguez FA, Boulware D, Kapoor R, Neuger AM, et al. Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1464–9.
- Kefford R, Beith JM, Van Hazel GA, Millward M, Trotter JM, Wyld DK, et al. A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs*. 2007;25:247–52.
- Binder C, Hagemann T, Sperling S, Schulz M, Pukrop T, Grimshaw MJ, et al. Stromal endothelin B receptor-deficiency inhibits breast cancer growth and metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:2452–60.
- Wulfing P, Diallo R, Kersting C, Wulfing C, Poremba C, Greb RR, et al. Endothelin-1, endothelin-A- and endothelin-B-receptor expression in preinvasive and invasive breast disease. *Oncol Rep*. 2004;11:791–6.
- Wulfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wulfing C, et al. Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:434–40.
- Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001;37:97–114.
- Wulfing P, Kersting C, Buerger H, Mattsson B, Mesters R, Gustmann C, et al. Expression patterns of angiogenic and lymphangiogenic

- factors in ductal breast carcinoma in situ. *Br J Cancer*. 2005;92:1720–8.
37. Wülfing P, Kersting C, Tio J, Fischer RJ, Wülfing C, Poremba C, et al. Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2393–400.
 38. Abdel-Gawad IA, Hassanein HM, Bahgat NA, Abdel Sattar MA, El-Sissy AH, Altaweel MA, et al. Study of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in patients with cancer colon. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2008;20:216–23.
 39. Moszynski R, Szpurek D, Michalak S, Szubert S, Sajdak S. The role of endothelin-1 and its correlation with CA125 levels, gray-scale ultrasonography and doppler findings in differential diagnoses of ovarian tumors. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30:552–6.
 40. Strijbos MH, Gratama JW, Schmitz PI, Rao C, Onstenk W, Doyle GV, et al. Circulating endothelial cells, circulating tumour cells, tissue factor, endothelin-1 and overall survival in prostate cancer patients treated with docetaxel. *Eur J Cancer*. 2010;46:2027–35.
 41. Ishibashi M, Fujita M, Nagai K, Kako M, Furue H, Haku E, et al. Production and secretion of endothelin by hepatocellular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76:378–83.
 42. Hemsén A, Ahlborg G, Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM. Metabolism of Big endothelin-1 (1-38) and (22-38) in the human circulation in relation to production of endothelin-1 (1-21). *Regul Pept*. 1995;55:287–97.
 43. Nelson JB, Opgenorth TJ, Fleisher LA, Frank SM. Perioperative plasma endothelin-1 and big endothelin-1 concentrations in elderly patients undergoing major surgical procedures. *Anesth Analg*. 1999;88:898–903.
 44. Simpson RA, Dickinson T, Porter KE, London NJ, Hemingway DM. Raised levels of plasma big endothelin 1 in patients with colorectal cancer. *Br J Surg*. 2000;87:1409–13.
 45. Smollich M, Götte M, Yip GW, Yong ES, Kersting C, Fischgräbe J, Radke I, Kiesel L, Wülfing P. On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;106:361–9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

hormone receptor status, lymphovascular invasion, her-2/neu status, p53 expression, histologic grade necrosis, and microcalcifications.

Results: 63 patients (47.4%) were found as solitary lesions. 30 patients (22.6%) were found at another suspicious lesions, NME were found at 40 patients (30.1%). NMEs have been found at younger patients (group 1: 53.7; group 2: 51.6; group 3: 46.1, $p=0.02$), tumor sizes and specimen's sizes were not different among three groups, existence of EIC, necrosis, calcification, lymph vascular invasion, hormone receptor status, histologic grade, her-2/neu status, lymph node status and p53 expressions were not correlated with NME. Histologic features, such as ductal carcinoma with cribriform type and lobular carcinoma were more found at NME than other groups ($p=0.012$) (Table 1). Group 2 were more taken mastectomy than other groups ($p=0.048$) (Table 1). In breast conserving operations, the sizes of specimen were not different among three groups, but re-excision rates in NME were higher than other groups (group 1: 1.8%, group 2: 9.5%, group: 20%).

Conclusions: NME has not been determined about an exact entity and the clinical significance. It was a small retrospective study, but it needs to get wider excision margins than non-NME contained breast cancers.

	Group 1	Group 2	Group 3	P-value
Age	53.6(±8.7)	51.6(±8.8)	46.1(±7.5)	<0.001
Tumor size	2.12(±1.3)	1.6(±1.1)	2.0(±2.0)	0.368
Specimen size	10.8(±3.4)	13.6(±4.8)	12.5(±5.6)	0.021
Specimen sized (BCS)	10.0(±2.2)	10.6(±1.7)	10.3(±3.4)	0.637
LN(-)	48	22	31	0.654
LN(+)	15	9	9	
ER(-)	29	12	19	0.806
ER(+)	34	18	21	
PR(-)	38	19	21	0.617
PR(+)	25	11	19	
Histology				0.012
DCIS/LCIS	5	4	13	
IDC	18	12	9	
ILC	0	1	0	
Others	3	0	0	
EIC(-)	53	22	28	0.21
EIC(+)	9	8	10	
LVI(-)	53	24	32	0.709
LVI(+)	9	6	8	
Necrosis(-)	35	21	24	0.458
Necrosis(+)	27	9	16	
Microcalcification(-)	40	24	17	0.752
Microcalcification(+)	22	16	13	
Operation				0.049
BCS	55	21	30	
MRM	8	9	10	
HG				0.499
low	24	13	12	
high	39	17	28	
p53(-)	42	24	25	0.272
p53(+)	21	6	15	
Her-2/neu(-)	49	22	25	0.244
Her-2/neu(+)	14	9	15	

84 Poster
Role of Big Endothelin-1 in the Early Diagnosis of Lobular Neoplasia of the Breast

A. Gounaris¹, V. Kalles², E. Kalogera¹, X. Provatopoulou¹, A. Kastania³, P. Liakou², A. Nonni², G.C. Zografos². ¹Hellenic Anticancer Institute, Research Center, Athens, Greece; ²Hippokratio Hospital University of Athens, 1st Department of Propaedeutic Surgery, Athens, Greece; ³Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Bioinformatics and Medical Bioinformatics, Athens, Greece

Background: The endothelins and their receptors, collectively known as the endothelin system, exert important vasoactive properties while they are involved in various cellular processes including tissue differentiation, development, cell proliferation and hormone production. This network is often deregulated in human malignancy, contributing to mitogenesis, angiogenesis, invasion and metastasis, antiapoptosis and immune modulation. The tissue expression of endothelin-1 (ET-1) has been shown to increase

during the progression of breast cancer, correlating with the acquisition of malignant potential. As far as its biological precursor Big ET-1 is concerned, clinical data suggest that it is a sensitive indicator of ET-1 activation. The aim of the present study is to investigate plasma ET-1 and Big ET-1 expression in patients with lobular neoplasia of the breast and their potential role in early diagnosis.

Materials and Methods: Peripheral blood samples were collected upon diagnostic biopsy of women with suspicious mammographic abnormalities BI-RADS ≥ 4 . Among them, 30 patients were diagnosed with lobular neoplasia (Mean age: 52.52±9.22 years) and 32 patients with benign breast lesions (Mean age: 55.68±11.32 years). Plasma ET-1 and Big ET-1 levels were quantitatively determined by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Significantly higher plasma Big ET-1 levels were observed in patients with lobular neoplasia, compared to those with benign disease (0.72 and 0.33 fmol/ml, respectively, $p<0.0001$). On the contrary, plasma ET-1 levels did not differ between the two patient groups (0.81 and 0.82 fmol/ml, respectively).

Table1: ET-1 and its biological precursor, Big ET-1, median plasma levels in patients with lobular neoplasia and benign lesions of the breast

	Lobular Neoplasia (N= 30)	Benign Disease (N= 32)	p-value
ET-1 (fmol/ml)	0.81	0.82	NS
Big ET-1 (fmol/ml)	0.72	0.33	<0.0001

Conclusions: Lobular neoplasia (LN) encompasses the entire spectrum of atypical epithelial proliferations in the terminal duct-lobular unit, including atypical lobular hyperplasia (ALH) and lobular carcinoma in situ (LCIS). LN is regarded as a risk factor for the subsequent development of invasive ductal or lobular carcinoma. To date, scarce data have been reported regarding circulating ET-1 and Big ET-1 levels in breast cancer while there are no studies specifically focusing on lobular neoplasia. This is an original observation of significantly higher plasma levels of Big ET-1 in patients with lobular neoplasia compared to benign breast disease, suggesting that Big ET-1 circulating expression may provide a promising biomarker for the early diagnosis of lobular neoplasia of the breast.

85 Poster
Sonographic Features of BI-RADS(TM)-US 4 Breast Masses in Luminal, HER2 Overexpression and Triple Negative Phenotypes

S. Derchain¹, R.M. Jales¹, L.O. Sarian¹, H.S.A. Camargo Jr.¹, C.F. Peralta¹, E.F. Marussi¹. ¹State University of Campinas Faculty of Medical Sciences, Obstetrics and Gynecology, Campinas SP, Brazil

Background: The molecular dissimilarities between breast cancer types often lead to different clinical presentations and maybe correlate with some ultra sonographic (US) features. The purpose of this study was to assess the sonographic characteristics of BI-RADS[®]-US 4 breast masses in the Luminal, HER2 overexpression and Triple Negative phenotypes.

Methods: We consecutively examined a series of 335 women diagnosed as presenting BI-RADS[®]-US 4 breast masses between March 2009 and December 2010. All masses were biopsied and histological results were classified as malignant (n=140, 42%) or benign (n=195, 58%). Estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Her2) expression were assessed, using immunohistochemistry (IHC). For 8 (6%) cases, only ER and PR were evaluated. Lesions with complete IHC assessment were grouped into three phenotypic subtypes: Luminal (89 cases), Her2 overexpression (27 cases) and Triple Negative (16 cases). We then compared the sonographic features of the malignant lesions according to the phenotypic status of the masses. All calculations were performed with SPSS version 15 (SPSS Inc., Chicago IL). This study was approved by our institutional review board and all participants signed an informed consent form.

Results: The positive predictive values (PPV) for subcategories 4a, 4b and 4c of the 335 BI-RADS[®]-US 4 masses were 16%, 43% and 85%, respectively. Mucinous carcinomas were significantly associated with BI-RADS[®]-US 4a and 4b categories ($p=0.01$). The Luminal phenotype was positively associated with the following sonographic features: spiculated margin (OR=6.4; 95% CI=1.8 to 23.6), indistinct margin (OR=17.2; 95% CI=1.8 to 23.6), echogenic halo (OR=3.8; 95% CI=1.05 to 13.6). The Luminal phenotype was negatively associated with enhancement (OR=0.3; 95% CI=0.15 to 0.76). Triple Negative phenotype was negatively associated with spiculated margin (OR=0.13; 95% CI=0.02 to 0.8) and shadowing (OR=0.02; 95% CI=0.01 to 0.47). The Her2 phenotype was not associated with any of the sonographic features.

Conclusion: Specific sonographic features may be positively related to the Luminal and Triple Negative phenotypes, but the BI-RADS[®]-US subcategories 4a, 4b and 4c were not associated with the molecular phenotypes of malignant breast masses.

a dual role, affecting tumor growth and angiogenesis. Moreover, it is activated in response to injury, thereby participating in tissue protection, regeneration and repair. The present study investigates serum HGF levels during surgical management of breast cancer patients.

Methods: Serum HGF expression was determined in 38 patients with invasive ductal breast cancer undergoing surgery. Blood samples were collected pre- and 24–72 hours postoperatively. HGF levels were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. The Wilcoxon/sign rank test was used to assess the significance of difference between pre- and postoperative HGF levels. Potential associations between preoperative HGF, demographic and clinicopathological factors were investigated by Kruskal–Wallis, Mann–Whitney and Spearman's correlation coefficient tests. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Data were analysed using STATA v11.0 software.

Results: The mean preoperative level of serum HGF in breast cancer patients was 1144.45 ± 479.70 pg/ml. HGF levels were significantly increased postoperatively, exhibiting a mean value of 1478.16 ± 745.18 pg/ml ($p < 0.005$). No significant associations were observed between preoperative HGF levels and demographic and clinicopathological variables, including age, height, weight, body mass index, waist circumference, waist to hip ratio, menopausal status, type of surgery, tumor size, nodal status, histological grade, estrogen receptor, progesterone receptor, Ki67 and p53 status.

Conclusion: Cancer treatment, including surgery, affects the tumor's microenvironment, which dynamically responds to tissue damage. Within the tumor microenvironment, a variety of cells and growth factors mediate tissue destruction and reorganization. Our findings of significantly increased HGF levels postoperatively could potentially be attributed to the proteolytic activation of HGF in response to tissue injury and suggest a role of this biomarker as a potent constituent of the tumor microenvironment.

Disclosure of Interest: No significant relationships.

P14

PLASMA EXPRESSION OF ENDOTHELIN IN PATIENTS WITH DUCTAL CARCINOMA OF THE BREAST

V. Kalles^{1*}, E. Kalogera², X. Provatopoulou², I.K. Papapanagiotou¹, G.P. Georgiou¹, A. Gounaris², G. Zografos¹. ¹Breast Unit, 1st Propaedeutic Surgical Clinic, Hippocratio General Hospital, Athens, Greece, ²Research Center, Hellenic Anticancer Institute, Athens, Greece

Goals: Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoactive peptide, along with its receptors, is involved in various physiological functions, such as tissue development, differentiation, cell proliferation and hormone production. Deregulation of the endothelin system has been suggested to contribute to tumor proliferation, neoangiogenesis, invasion and metastasis. ET-1 overexpression has been demonstrated in breast carcinoma tissue, while the circulating levels of Big Endothelin-1 (Big ET-1), ET-1's precursor, have been found elevated in breast cancer patients when compared to healthy controls. The present study sought to investigate the plasma levels of both ET-1 and Big ET-1 in patients with invasive and in situ ductal carcinoma of the breast.

Methods: Peripheral venous blood samples were collected prior to diagnostic biopsy of women with suspicious non-palpable mammographic lesions (BI-RADS ≥ 4). Plasma levels of ET-1 and Big ET-1, performing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), were determined in 30 patients diagnosed with Invasive Ductal Carcinoma (Group A), 30 patients with Ductal Carcinoma in situ (Group B) and 30 patients with benign breast lesions (Group C).

Results: No significant differences in plasma expression of ET-1 were observed among the study groups. In contrast, plasma expression of Big ET-1 was significantly elevated in Group A and Group B patients in comparison to Group C ($p < 0.01$). Within Group A patients, plasma expression of both ET-1 and Big ET-1 did not differ with regard to the

tumor histological grade. Furthermore, within Group B, no difference in plasma expression of ET-1 and Big ET-1 was observed among patients diagnosed with non-high grade and high grade DCIS tumors.

Conclusion: Augmented expression of ET-1, as well as its receptors (ETAR and ETBR), has already been demonstrated in breast carcinomas. Moreover, ETAR-positive tumors have been associated with clinicopathological markers for poor prognosis, such as high histological grade. As per our results, plasma levels of Big ET-1 were a more sensitive indicator of ET-1 activation than those of ET-1 itself, while, in our patient sample, there was no correlation between higher histological or nuclear grade and elevated ET-1 or Big ET-1 plasma levels.

Disclosure of Interest: No significant relationships.

P15

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF C/T ANTIGENS AND TOPO2A EXPRESSION IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CARCINOMAS

A. Juretic^{1*}, I. Mrklic², G.C. Spagnoli³, Z. Pogorelic⁴, S. Tomic². ¹Department of Oncology, Clinical Hospital Center "Zagreb", University of Zagreb, School of Medicine, Zagreb, Croatia, ²Department of Pathology, Forensic Medicine and Cytology, Split University Hospital Center, University of Split, School of Medicine, Split, Croatia, ³Department of Biomedicine, University of Basel, Institute of Surgical Research and Hospital Management (ICFS), Basel, Switzerland, ⁴Department of Pediatric Surgery, Split University Hospital Center, University of Split, School of Medicine, Split, Croatia

Goals: Cancer/testis (C/T) antigens are a subgroup of tumor-associated antigens expressed in normal testis germ line cells and trophoblast, and in various malignancies of different histological types. The best-studied C/T antigens are those of the MAGE-A family and the NY-ESO-1 antigen. The aim of this study is to assess the expression C/T antigens in the triple negative breast cancer (TNBC) group, expression of topoisomerase 2-alpha (TOPO2A), basal-like (BL) immunophenotype defined by basal markers (CK5/6, CK14, and EGFR), BL morphology and conventional clinicopathologic factors as well as to demonstrate their prognostic relevance with respect to this group of tumours.

Methods: The study includes 83 patients who underwent surgery between January 2003 and December 2009. These patients lack immunohistochemical (IHC) expression of ER, PR and HER 2. All histologic and IHC tumour slides were evaluated by two pathologists (S.T., I.M.) and graded by the guidelines proposed by Elston and Ellis. The histologic types were determined according to WHO. Tumour staging was based on TNM system. Breast tumor tissue samples were fixed immediately after surgery in 10% buffered formalin, and later embedded in paraffin for routine histologic examination. Tissue sections 4- μ m were cut from a paraffin block of each specimen and applied to slides for IHC. The slides were stained with haematoxylin and eosin with additional immunostains for ER, PR, HER 2, CK5/6, CK14, EGFR, Ki-67, TOPO2A, MAGE-A1, multi-MAGE-A, MAGE-A10 and NY-ESO-1 (Mrklic I et al. Acta Histochem. 2012; in press; Badovinac T et al. Med Oncol. 2012; 29: 1586–91). Obtained data were analyzed using Statistics for Windows Release 12.0 (Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA).

Results: Out of 83 TNBC, 60 (72.28%) were histologically identified as invasive ductal carcinomas NOS, 13 (15.66%) metaplastic carcinomas, 2 (2.4%) invasive lobular carcinomas, 3 (3.61%) invasive mixed carcinomas, 3 (3.61%) medullary carcinomas and 2 (2.4%) apocrine carcinomas. Fifty-five (66.3%) have BL immunophenotype and 40 (48.2%) BL morphology. C/T antigens were expressed at different frequencies in TNBC. MAGE-A1 showed most frequent expression (69.2%), followed by multi-MAGE (58%), NY-ESO (27.1%) and MAGE-A10 (16%). MAGE-A10 expression was significantly correlated with tumour size ($p = 0.026$). Expression of MAGE-A1, MAGE-A10 and multi-MAGE was significantly correlated with clinical stage ($p = 0.024$, $p = 0.041$, $p = 0.031$, respectively). Significant correlation



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Poster session 1: Oncology, renal physiology and disease, neurology, infectious diseases, new topics of endothelin biology

The role of endothelin-1 in the vascular pathobiology of cerebral malaria

Brandi D. Freeman, Minxian Dai, Mahalia S. Desruisseaux

Albert Einstein College of Medicine, USA

E-mail address: BRANDI.FREEMAN@PHD.EINSTEIN.YU.EDU

(B.D. Freeman)

Cerebral malaria (CM) is a serious complication of *Plasmodium falciparum* infection associated with cerebral vasculopathy, high mortality, and risk of neurological sequelae. In human CM, infected RBCs adhere to the brain endothelium and occlude the cerebral blood vessels causing cerebral vascular damage, impaired perfusion, vasospasms, vasoconstriction, and inflammation. Vasoactive factors, including endothelin (ET-1), have become increasingly important in the pathogenesis of CM. We previously demonstrated that antagonism of the ET-1 type A receptor (ETA) improved survival and attenuated brain hemorrhage in murine CM. In this study we tested the hypothesis that ET-1 contributes to CNS inflammation and BBB disruption in experimental CM (ECM) via its actions on ETA. To test this hypothesis we used our model of *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection of C57BL/6 mice. PbA-infection resulted in activation of monocytic CNS cells, microglia, which are important in inflammation. ECM was also associated with an increase in brain microvascular endothelial cell activation which is critical for leukocyte adhesion. Treatment of PbA-infected mice with ETA receptor antagonists attenuated the increase in microglial and endothelial cell activation, suggesting that ET-1 contributes to CNS inflammation during ECM. Furthermore, leakage of Evans blue bound-albumin into the brain was reduced in ECM mice receiving ETA receptor antagonism, providing further support that disruption of the BBB and inflammation during ECM result, in part, from increases in ET-1 and its actions on the ETA receptor. Together these findings illustrate a role for ET-1 in the immunopathology and vasculopathy associated with ECM, and highlight the peptide as a potential target for adjunctive therapy for the protection of neurological function in patients with CM.

doi: [10.1016/j.lfs.2013.12.045](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.045)

Dual endothelin blockade exacerbates upregulated VEGF angiogenic signaling in the heart of a lipopolysaccharide-induced endotoxemic rat model

Masami Oki^a, Subrina Jesmin^a, Nobutake Shimojo^a, Majedul Islam^a, Tanzila Khatun^a, Satoru Kawano^a, Takashi Miyauchi^b, Taro Mizutani^a^aDepartment of Emergency and Critical Care Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan^bDepartment of Cardiovascular Medicine, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan
E-mail address: s1321258@u.tsukuba.ac.jp (M. Oki)

Sepsis, a heterogeneous class of syndromes, is associated with the development of progressive damage in multiple organs. The pathogenesis of sepsis-induced myocardial dysfunction is still not fully understood. The present study examined the alteration of key angiogenic signaling pathway mediated by the vascular endothelial growth factor (VEGF) in sepsis heart and the effects of dual endothelin (ET) antagonism on it. Normal male Wistar rats at age 8 wks were administered with lipopolysaccharide (LPS: 15 mg/kg) and then sacrificed at different time points (1 h, 3 h, 6 h and 10 h). Some rats without LPS administration was considered as the control group. Some of the LPS-administered rats were treated with dual endothelin blocker (SB209670, 1 mg/kg body weight) for 6 h and then sacrificed. Administration of LPS resulted in increases in the serum levels of TNF-alpha (maximum at 1 h after LPS, 1200-fold compared to control rats), and ET-1 (maximum at 3 h after LPS, 25-fold compared to control rats). At 6 h after LPS administration, we found decreased percent of fractional shortening in the heart. The expression of VEGF, and its downstream angiogenic signaling molecules namely eNOS and NO, was significantly increased in heart tissues after LPS administration compared to the control group which was also accompanied by increased cardiac ET-1 level. Dual endothelin blockade for 6 h further upregulated the VEGF angiogenic signaling in endotoxemic heart.

doi: [10.1016/j.lfs.2013.12.046](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.12.046)

Endothelin plasma and tissue expression in ductal carcinoma of the breast: Correlation with clinicopathological characteristics and VEGF

Xeni Provatopoulou^a, Vasileios Kalles^b, Eleni Kalogera^a, Afrodite Nonni^c, Maria Matiatou^b, Ioannis Papapanagiotou^b, George C. Zografos^b, Antonia Gounaris^a^aResearch Center, Hellenic Anticancer Institute, Athens, Greece^bBreast Unit, 1st Department of Propaedeutic Surgery, Hippokratia Hospital, University of Athens, Athens, Greece^cDepartment of Pathology, University of Athens, Athens, GreeceE-mail address: xprovatopoulou@yahoo.gr (X. Provatopoulou)

Purpose: Endothelin-1 (ET-1) is overexpressed in breast carcinomas, while circulating levels of its precursor (Big ET-1) have also been found elevated. In the present study, we evaluated plasma ET-1

and Big ET-1 levels, and tissue expression of ET-1 in patients with ductal carcinoma of the breast. Methods: Peripheral venous blood samples were collected prior to diagnostic biopsy from women with suspicious non-palpable mammographic lesions. Plasma ET-1 and Big ET-1 levels were determined in 30 patients with IDC, 30 with DCIS and 30 with benign lesions (controls), by performing ELISA. ET-1 and VEGF tissue expression was immunohistochemically determined. Potential correlations with histological grade, hormone receptor status, Her2/neu amplification, tumor size, lymph node involvement and disease stage were investigated in IDC. Results: Big ET-1 plasma levels were significantly higher in IDC and DCIS patients compared to controls ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively). No significant differences in ET-1 levels were observed between the three groups. Moderate to strong IHC staining for ET-1 was observed in 3/29 and 7/23 IDC and DCIS patients, respectively. VEGF was significantly expressed in 8/27 and 8/23 IDC and DCIS patients, respectively. In IDC, plasma and tissue expression of ET-1 and plasma expression of Big ET-1 did not correlate with any of the analyzed clinicopathological characteristics or VEGF tissue expression. Conclusions: Plasma levels of Big ET-1 were a more sensitive indicator of ET-1 deregulation than those of ET-1 in our study. Our results support the potential clinical application of Big ET-1 as a breast cancer biomarker.

doi:10.1016/j.lfs.2013.12.047

The localisation and distribution of endothelin receptors in normal and cancer colon tissues: Confirmation by autoradiography, immunohistochemistry and quantum dot targeting

Samer-ul Haque^a, Bala Ramesh^a, Hazel Welch^a, David Abraham^c, Olagunju Ogubbiyi^a, Marilena Loizidou^a, Micheal Dashwood^b

^aDepartment of Surgery and Interventional Sciences, University College London, UK

^bDepartment of Clinical Biochemistry, University College London, UK

^cCentre for Rheumatology and Connective Tissue Disorders, University College London, UK

E-mail address: samer@doctors.org.uk (S. Haque)

Background: Endothelin-1 (ET-1) acts via two G-protein-coupled receptors, ETA and ETB. Overexpressed ET-1 and ETA in colorectal cancer (CRC) promote tumour growth and progression. Aim: To investigate (1) ETA and ETB distribution in normal and cancer tissues from patients with CRC and (2) determine ETA and ETB localisation to cell types and tissue structures. Methods: ETA and ETB distribution was determined using in vitro autoradiography with competitive inhibition, using receptor antagonists (BQ123, ZD4054, BQ788) on normal and cancer tissues resected from patients with CRC (N = 8). Immunohistochemistry (IHC) confirmed ETA and ETB expression and identified associated cells/structures. ETA distribution was also investigated by quantum dots (QDs) conjugated to BQ123 (ETA-antagonist). Results: In normal bowel epithelium, ETA was observed closer to the luminal surface and ETB towards the muscularis mucosa/lamina propria. There was greater ETA than ETB binding in CRC. Both cancer and normal tissues demonstrated strongest binding to stromal cells, particularly fibroblasts (IHC). QD-BQ123 demonstrated an ETA punctate pattern in stromal areas surrounding epithelial cells; and an ETA increase in CRC compared to normal. Conclusions: ET-1 binds strongly to CRC stromal structures, with ETA greater than ETB, and is consistent with ET-1 signalling contributing to tumourigenesis. Within normal tissue, differential ETA and ETB distribution (luminal versus muscularis mucosa/lamina propria) has not been reported previously. This may relate to trophic, growth arrest and differentiation signalling. This study demonstrates the effective, novel use of receptor-antagonist-conjugated QDs; reveals possible ET-1 roles in normal tissue; and provides further

evidence for the potential therapeutic use of ETA antagonists as CRC adjuvant treatment.

doi:10.1016/j.lfs.2013.12.048

Novel molecular pathways by which ETA receptor mediates tumourigenic signals in colorectal cancer: Support for ETA receptor antagonism as adjuvant treatment

Samer-ul Haque^a, Marilena Loizidou^a, Micheal Dashwood^b, Xu Shi-wen^c, David Abraham^c, Hazel Welch^a

^aDepartment of Surgery and Interventional Sciences, University College London, UK

^bDepartment of Clinical Biochemistry, University College London, UK

^cCentre for Rheumatology and Connective Tissue Disorders, University College London, UK

E-mail address: samer@doctors.org.uk (S. Haque)

Background: The endothelin A receptor (ETA) mediates tumourigenic signals in colorectal cancer (CRC). The ETA ligand, endothelin-1 (ET-1), stimulates not only cancer cells but also surrounding fibroblasts and may promote the creation of a supporting tumour stroma. Aim: To identify ET-1 regulated genes associated with oncogenic pathways in colonic fibroblasts. Methods: Micro-array analysis following 4 h ET-1 stimulation of colonic fibroblast strains (isolated from patients undergoing resection for CRC, n = 4) identified differentially expressed genes (n = 19) at significant levels. Three were investigated further: COLXI, AML-1, and EGFR (collagen type-XI; acute myeloid leukemia-1; epidermal growth-factor receptor). Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and immunoblotting evaluated AML-1 and COLX expression levels, following treatment with ET-1 and/or receptor antagonists (ETA: BQ123, ZD4054; ETB: BQ788). ETA and ETB regulation of EGFR was investigated by gene silencing (siRNA); these assays and ET-1 regulation of EGFR over 24 h were evaluated by qRT-PCR. Results: ET-1 stimulated expression of AML-1 and COLXI at both gene (>1.5-fold; $p < 0.01$) and protein ($p < 0.05$) levels; stimulation was inhibited by ETA, but not by ETB, antagonism (AML-1: 75.1–77.1% by BQ123, ZD4054; COLXI: 65.1% by ZD4054; $p < 0.05$). EGFR expression demonstrated a biphasic increase at 4 h and 24 h (3.8-fold; 4.5-fold). Silencing ETA, but not ETB, returned EGFR levels to control. Conclusions: ETA antagonism has potential for targeting oncogenic pathways: AML-1 is linked to c-Jun N-terminal kinase which inhibits apoptosis/promotes proliferation; and abnormal TGF- β (transforming growth-factor-beta) signalling. COLXI is linked to CRC tumourigenesis. The ET-1-stimulated biphasic EGFR response and ETA antagonism have not been reported before in CRC. These findings identify mechanisms by which ETA promotes tumourigenesis and support addition of ZD4054 to existing EGFR antagonism therapy.

doi:10.1016/j.lfs.2013.12.049

Serum big endothelin-1 as a clinical marker in canine pulmonary hypertension and tumors

Shinya Fukumoto^a, Kiwamu Hanazono^a, Taku Miyasho^d, Tsuyoshi Kadosawa^b, Hidetomo Iwano^c, Tsuyoshi Uchida^a

^aVeterinary Internal Medicine, Department of Small Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japan

^bVeterinary Oncology, Department of Small Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, Japan