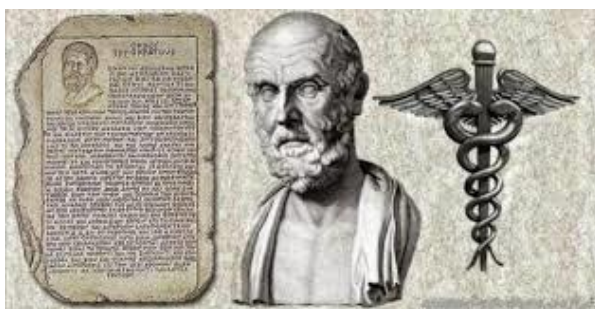




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη του γH2AX σε ασθενείς με βλάβες
του μαστού. Συσχέτιση
με κλασικούς προγνωστικούς δείκτες»**

ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ ΔΙΔΑΚΤΩΡ:

Ιατρός: Βικτωρία – Βαρβάρα Πάλλα

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη του γH2AX σε ασθενείς με βλάβες
του μαστού. Συσχέτιση
με κλασικούς προγνωστικούς δείκτες»**

ΥΠΟΨΗΦΙΟΣ ΔΙΔΑΚΤΩΡ:

Ιατρός: Βικτωρία – Βαρβάρα Πάλλα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Παύλος Πατάπης (επιβλέπων)

Καθηγήτρια κ. Δέσποινα Περρέα

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Δημήτριος Δημητρούλης

ΑΘΗΝΑ 2019

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ημερομηνία υποβολής αιτήσεως: 26-06-2015

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 16-07-2015

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. **Παύλος Πατάπης:** Αναπληρωτής καθηγητής
2. **Δέσποινα Περρέα:** Καθηγήτρια
3. **Δημήτριος Δημητρούλης:** Αναπληρωτής καθηγητής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-10-2015

Ημερομηνία κατάθεσης Α΄ έκθεσης προόδου: 21-09-2016

Ημερομηνία κατάθεσης Β΄ έκθεσης προόδου: 15-05-2017

Ημερομηνία κατάθεσης Γ΄ έκθεσης προόδου: 06-05-2019

Ημερομηνία κατάθεσης διδακτορικής διατριβής: 28-09-2019

Ημερομηνία πρότασης Συμβουλευτικής επιτροπής: 27-08-2019

Δημόσια παρουσίαση σε 7/μελή επιτροπή: 11-09-2019

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. **Παύλος Πατάπης (επιβλέπων):** Αναπληρωτής Καθηγητής
2. **Δέσποινα Περρέα:** Καθηγήτρια
3. **Δημήτριος Δημητρούλης:** Αναπληρωτής Καθηγητής
4. **Κωνσταντίνος Κόντζογλου,** Καθηγητής
5. **Ιωάννης Παπανικολάου:** Αναπληρωτής Καθηγητής
6. **Στυλιανός Κύκαλος:** Επίκουρος Καθηγητής
7. **Αλέξανδρος Παπαλάμπρος:** Επίκουρος Καθηγητής

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΑΡΙΣΤΑ

ΟΡΚΟΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ
ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ
ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ
ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ
ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗ;
ΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ
ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΩΥΤΟΥ ΑΔΕΛ-
ΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΣΚΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ
ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΗΣΑΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΣΥΓ-
ΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ
ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣ
ΚΑΙ ΤΟΙΣ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΗΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜ-
ΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ.
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ
ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΕΣΙΝ.
ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙ-
ΜΟΝ ΟΥΔΕ ΥΠΗΓΗΣΟΜΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ
ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ, ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΞΙΩΣ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ, ΟΥ ΤΕΜΕΣ
ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ
ΠΡΗΒΙΟΣ ΤΗΣΔΕ, ΕΞ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΞΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ
ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙ-
ΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ
ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ
ΔΟΥΛΩΝ. Α ΔΕ ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΪΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ
ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑ-
ΛΕΙΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙ-
ΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ
ΜΗ ΣΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑ-
ΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΙΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ'
ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΩΝ.

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. Επαγγελματική Εμπειρία

- 19/10/2018- παρόν: ειδική Μαιευτήρας Γυναικολόγος στο Diakonie Klinikum Schwäbisch Hall. Απόκτηση τίτλου ειδικότητας μαιευτικής γυναικολογίας από τον αρμόδιο φορέα του κρατιδίου Βάδης Βυρρεμβέργης της Γερμανίας
- 12/2014- 19/10/2018: ειδικευόμενη ιατρός μαιευτικής γυναικολογίας Diakonie Klinikum Schwäbisch Hall.
- 10/2013 – 10/2014: ειδικευόμενη ιατρός μαιευτικής γυναικολογίας, Νοσοκομείο Γεννηματάς Αθηνών.
- 08/2012 – 10/2014: Ιατρός στην ομάδα του Καθηγητή μαιευτικής γυναικολογίας Δ. Χασιάκου
- 05/2012 - 08/2012: Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο Κ.Υ Μακρακώμης, Περιφερειακό ιατρείο Υπάτης.
- 03/2012 – 05/2012: Εκπαίδευση στην ουρογυναικολογία- Ουρογυναικολογικό εξωτερικό ιατρείο, Β' Μαιευτική και Γυναικολογική πανεπιστημιακή κλινική, Αρεταίειο Νοσοκομείο Αθηνών
- 03/2011 – 03/2012: ειδικευόμενη ιατρός γενικής χειρουργικής, Περιφερειακό Νοσοκομείο Πύργου
- 06/2010 – 05/2011: Ιατρός υπηρεσίας υπαίθρου στο Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας και στο Κ.Υ Αταλάντης.
- 08/2009- 06/2010: Εκπαίδευση στη γενική χειρουργική. Α' πανεπιστημιακή χειρουργική κλινική, Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών.

2. Εκπαίδευση - Σεμινάρια

- 2003-2009: Ιατρική Σχολή Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο. Βαθμός 08.38
- 2008-2010: Ιατρική Ορολογία στα Αγγλικά, Διδασκαλείο ξένων γλωσσών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο
- 2010: Σεμινάριο ALS. Εξειδικευμένη Υποστήριξη της Ζωής - Advanced Life Support (ALS) από την Ελληνική Εταιρεία Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης.

- 2010: Σεμινάριο ATLS – Advanced Trauma Life Support από Κέντρο εκπαίδευσης ATLS του Πανεπιστημίου Αθηνών
- 2016-2018: Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Έρευνα στη Γυναικεία Αναπαραγωγή». Βαθμός 08.48
- 2019: Πιστοποίηση στην ελάχιστη επεμβατική χειρουργική (MIC) από τη γερμανική εταιρία γυναικολογικής ενδοσκόπησης.

3. Παρουσιάσεις σε Συνέδρια

- 2014: **14th Panhellenic Congress of Pathological Anatomy**
Uterine smooth muscle tumors of uncertain malignant potential (STUMP) and gastric leiomyosarcoma: A case report
- 2012: **1st national congress organized by “ Unita e valore della chirurgia italiana.**
Women under 35 years old and breast cancer: Is it a different pathological entity?
Pelvic ring injury and associated abdominal trauma: our experience in a rural hospital
- 2011: **113th National Congress of Italian surgery society**
 - Coexistence of a ruptured haemorrhagic corpus luteum and ruptured spleen after sexual intercourse. A case report.
 - Colon cancer: our 10th year of experience in a Greek rural region
 - Minor umbilical hernias: alternative techniques with the use of prosthetic materials
 - Road traffic trauma patient and injuries of intra-abdominal solid organs: our experience.
- 2009: **17th Postgraduate Congress of clinical oncology (Creta)**
 - Paraneoplastic humoral hypocalcaemia caused by the parathormone related peptide gynaecological malignancies. A systematic review
 - Combination of paclitaxel, topotecan and carboplatin in metastatic breast
 - COX-2 expression in invasive breast cancer: correlation with prognostic factors.

4. Δημοσιεύσεις

- 2018: **International Journal of Angiology.**
Fascia Suture Technique and Suture-mediated Closure Devices: Systematic Review.
- 2017: **SAGE Open Med Case Rep.** Endometrioid adenocarcinoma arising from colon endometriosis.
In Vivo. Pulmonary Embolism in a Young Immunocompetent Adult Infected with Cytomegalovirus. Are Novel Oral Anticoagulants an Efficient Alternative?
Indian J Urol. Ureteral endometriosis: A systematic literature review.
Ann Transl Med. A critical reappraisal of the treatment modalities of normal appearing thoracic aorta mural thrombi.
Arch Ital Urol Androl. Influence of HIV virus in the hospital stay and the occurrence of postoperative complications classified according to the Clavien-Dindo classification and in comparison with the Charlson Comorbidity Index in patients subjected to urologic and general surgery operations. Our preliminary results.
Vasc Specialist Int. Endovascular Management of Atherosclerotic Renal Artery Stenosis: Post-Cardiovascular Outcomes in Renal Atherosclerotic Lesions Era Winner or False Alarm?
Tumour Biol. gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor?
- 2015: **Indian J Surg Indian.** Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker. Does It Apply in Abdominal Aortic Aneurysms? A Review of Literature.
Arab J Gastroenterol. Intestinal adaptation in short bowel syndrome: A case report.
Case Rep Vasc Med. Absence of Clinical and Hemodynamic Consequences due to Posterior Tibial Artery Congenital Aplasia.
Case Rep Urol. Synchronous Bilateral Testicular Tumors with Different Histopathology.

Hellenic J Cardiol. Urine NGAL as a biomarker of kidney damage after on- and off-pump coronary artery bypass graft surgery: a prospective pilot study.

Int Angiol. Homocysteine as a risk factor of restenosis after carotid endarterectomy.

- 2014: **British Journal of Medicine & Medical Research.** GnRH Agonists: Are they Ready for Clinical Use as an Anti-adhesive Agent? A Review of the Literature

Journal of Gynecologic Surgery. Cesarean Myomectomy: Pros and Cons. A retrospective study.

Arab journal of gastroenterology. Intestinal adaptation: self-treatment against short bowel syndrome - A case report.

Transplantation Reviews .Secondary Hyperoxaluria as a risk factor for kidney stone formation and renal failure in native kidneys and renal grafts.

Indian J Surg. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) as a Biomarker: Does it apply in abdominal aortic aneurysms? A review of the literature

Case Reports in Vascular Medicine (doi:10.1155/2014/780561.) Giant popliteal artery aneurysm: Case report and review of the literature.

ISRN Surgery . Sentinel Lymph Node Biopsy in Uterine Cervical Cancer Patients: Ready for Clinical Use? A Review of the Literature

- 2013: **Oncology.** Correlation between Ki67 and breast prognosis.
- 2010: **World J Surg Oncol.** Cell cyclins: Triggering elements of cancer or not?

5. Ξένες Γλώσσες

ΓΕΡΜΑΝΙΚΑ: Επίπεδο C1, Goethe Institut

ΑΓΓΛΙΚΑ: Επίπεδο C2, Cambridge και Michigan

ΓΑΛΛΙΚΑ: Επίπεδο B2, Γαλλικό Ινστιτούτο Ελλάδος IFG

Αφιερώσεις

Στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Ισιδώρα

*Στους δασκάλους μου και κυρίως στον αείμνηστο
Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας
κύριο Δημήτριο Χασιάκο*

Στο Γιώργο Καραολάνη

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής δε θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοδήγηση και το ενδιαφέρον της Καθηγήτριας κ. Δέσποινας Περρέα. Την ευχαριστώ εκ βάθρων για τη συνεχή κατεύθυνση των βημάτων μου και την αμέριστη προσφορά της στην προσπάθειά μου αυτή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Παύλο Πατάπη και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Δημητρούλη για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη.

Θα ήθελα επιπρόσθετα να ευχαριστήσω τη συνάδελφο και συντοπίτισσα κυρία Δήμητρα Καραγιάννη για την πολύτιμη συμβολή της στην εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Η αφιέρωση της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής στην οικογένεια μου είναι το ελάχιστο ευχαριστώ απέναντι στην ανιδιοτελή τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και των επαγγελματικών μου βημάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|-----------------------------------------|----|
| Περίληψη | 11 |
| Abstract | 12 |
| Γενικό Μέρος | 13 |
| 1. Καρκίνος του μαστού | 14 |
| 1.1. Επιδημιολογία..... | 14 |
| 1.2. Παράγοντες κινδύνου | 15 |
| 1.3. Συμπτωματολογία..... | 18 |
| 1.4. Διάγνωση | 18 |
| 1.5. Σταδιοποίηση..... | 19 |
| 1.6. Ιστολογία | 27 |
| 1.7. Θεραπεία καρκίνου του μαστού | 32 |
| 2. Βιοδείκτες | 33 |
| 2.1 Ορισμός..... | 33 |
| 2.2 gH2AX στον κυτταρικό κύκλο | 33 |
| 2.3 Μέθοδοι ανίχνευσης της gH2AX | 38 |
| 2.4 Μελέτες gH2AX: δειγματοληψία | 39 |
| Ειδικό Μέρος | 42 |
| 1. Εισαγωγή | 43 |
| 2. Μεθοδολογία | 45 |
| 2.1. Πληθυσμός μελέτης | 45 |
| 2.2. Ανοσοϊστοχημεία | 45 |
| 3. Στατιστική ανάλυση | 48 |
| 4. Αποτελέσματα | 49 |
| 5. Συζήτηση-Συμπεράσματα | 54 |
| Βιβλιογραφικές Αναφορές | 56 |
| Κατάλογος Πινάκων | 65 |
| Κατάλογος Εικόνων | 66 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η ιστόνη H2AX υποβάλλεται σε φωσφορυλίωση ως απάντηση στις βλάβες της διπλής έλικας του DNA, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούν μέρος της ογκογενετικής διαδικασίας. Η ανίχνευση της gH2AX μπορεί δυνητικά να λειτουργήσει ως βιοδείκτης για τη μετατροπή του φυσιολογικού ιστού σε προκακοήθη και στη συνέχεια σε κακοήθη ιστό. Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση της κλινικής σημασίας της έκφρασης της gH2AX στον καρκίνο του μαστού.

Μέθοδος: Έγινε ανάλυση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ιστόνης gH2AX σε ιστούς προερχόμενους από εκατόν δέκα (110) ασθενείς πάσχοντες από καρκίνο του μαστού και η έκφραση αυτή συσχετίστηκε με κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες.

Αποτελέσματα: Μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου, υψηλότερος βαθμός διαφοροποίησης και μεγαλύτερος αριθμός παθολογικών λεμφαδένων σχετίζονται σημαντικά με υψηλότερες τιμές έκφρασης gH2AX. Επιπλέον, η έκφραση της gH2AX διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε ασθενείς με διαφορετικό FIGO στάδιο. Υψηλότερη έκφραση οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων σχετίζεται σημαντικά με χαμηλότερες τιμές έκφρασης της gH2AX.

Συμπεράσματα: Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της gH2AX και δυσμενών παθολογοανατομικών παραμέτρων.

Λέξεις κλειδιά: H2AX, καρκίνος μαστού, ιστολογία, βιοδείκτης, πρόγνωση

ABSTRACT

Objectives: Histone H2AX undergoes phosphorylation as an answer to DNA double-strand breaks, which in turn are part of the oncogenic procedure. The detection of gH2AX can potentially serve as a biomarker for transformation of normal tissue to premalignant and consequently to malignant tissue. The aim of this study was to evaluate the clinical significance of gH2AX expression in breast cancer.

Method: gH2AX expression in tissues from 110 breast cancer patients was analyzed by immunohistochemistry and correlated with clinicopathological variables.

Results: Greater tumor size, higher grade and number of affected lymph nodes are significantly associated with greater values of gH2AX (Table 3). In addition, gH2AX differs significantly among patients' FIGO stage. Higher values of ER and PgR are significantly associated with lower gH2AX values

Conclusions: A positive association between gH2AX expression and infaust histopathological parameters was observed.

Key words: H2AX, breast cancer, histology, biomarker, prognosis

Γενικό

Μέρος

1. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αναφέρεται σε καρκίνο που αναπτύσσεται στους γαλακτοπαραγωγούς αδένες ή αλλιώς λοβούς του μαστού ή στους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα.

1.1 Επιδημιολογία

Βάσει στατιστικών στοιχείων πρόκειται για τον πιο συχνό τύπο καρκίνου στις γυναίκες, επηρεάζοντας 2,1 εκατομμύρια γυναίκες ετησίως. Ευθύνεται για το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο στις γυναίκες. Ο Διεθνής Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 627.000 γυναίκες πέθαναν λόγω καρκίνου του μαστού το 2018, αριθμός που αποτελεί το 15% των αιτιών θανάτου στις γυναίκες. (1). Η ίδια πηγή πληροφορεί πως τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στον ελληνικό πληθυσμό είναι τα κατωτέρω:

- 7.734 νέες περιπτώσεις καρκίνου μαστού για το 2018, ο οποίος στο γενικό πληθυσμό είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος μετά τον καρκίνο του πνεύμονα.
- Στον υποπληθυσμό των γυναικών ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερα εντοπισμένος καρκίνος.
- Ο καρκίνος του μαστού είναι η 3η αιτία θανάτου από καρκίνο στο σύνολο του πληθυσμού.
- Η πιθανότητα νόσησης από καρκίνο του μαστού καθόλη τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου υπολογίζεται σε 1:8 (12%) στο γυναικείο και 1 : 883 στον ανδρικό πληθυσμό αντίστοιχα.

Από τα ανωτέρω φαίνεται ότι οι γυναίκες πλήττονται κυρίως από κακοήγη νόσο του μαστού, ενώ στους άνδρες η νόσος αποτελεί σπανιότητα.

Όσον αφορά στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού στο πέρασμα του χρόνου, υπήρξε ραγδαία αύξηση αυτής κατά τις δεκαετίες του 1980 και του 1990, και γι' αυτό ευθύνεται σε μεγάλο ποσοστό το screening μαστογραφίας. Με τα προγράμματα screening οι κακοήθειες διαγιγνώσκονταν 1 έως 3 χρόνια νωρίτερα και ίσως εντοπίζονταν αργά αναπτυσσόμενοι καρκίνοι. Η αύξηση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού αντανακλά επίσης τις αλλαγές στον τρόπο ζωής όπως η γέννηση λιγότερων παιδιών καθώς και η μεγαλύτερη ηλικία κατά την γέννηση του πρώτου παιδιού. Η αύξηση της επίπτωσης ήταν μεγαλύτερη σε γυναίκες άνω των 50 ετών από ό,τι σε νεότερες γυναίκες. Ανάμεσα στα έτη 1987 και 1994, η συχνότητα κακοηθειών του μαστού σταθεροποιήθηκε και αυξήθηκε πάλι μετά τα μέσα της δεκαετίας του 1990, γεγονός που αντανακλά τα αυξημένα επίπεδα παχυσαρκίας και την αυξημένη συχνότητα χρήσης ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης στην εμμηνόπαυση, παράγοντες αναγνωρισμένοι ως αιτίες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Μεταξύ 2002 και 2003, λόγω της ανάδειξης συσχέτισης χρήσης ορμονικής υποκατάστασης μετεμμηνόπαυσιακά με κακοήθεις όγκους του μαστού και καρδιαγγειακές παθήσεις, και κατά συνέπεια απόσυρσης των γυναικών από την θεραπεία, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού κυρίως σε γυναίκες της λευκής φυλής, μεγαλύτερες των 50 ετών και ορμονοευαίσθητων περιπτώσεων. Από το 2005 έως σήμερα, η συνολική επίπτωση καρκίνου του μαστού παραμένει σταθερή με τα ποσοστά να διαφοροποιούνται μεταξύ των φυλών και των ηλικιακών ομάδων (2).

1.2 Παράγοντες κινδύνου

Ποικίλοι παράγοντες έχουν αναγνωρισθεί ως παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ωστόσο για την πλειονότητα των γυναικών που

εμφανίζουν κακοήγη νόσο του μαστού είναι αδύνατο να εντοπιστούν συγκεκριμένοι παράγοντες κινδύνου (3,4) (πίνακας 1).

Η ηλικία αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου, με την πιθανότητα ανάπτυξης κακοήθειας του μαστού με αυξανόμενη την ηλικία και κυρίως σε ηλικίες >50 ετών.

Το ατομικό ιστορικό έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία σε νεαρή ηλικία, άτυπης υπερπλασίας του μαστού, καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών αυξάνει επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στον ίδιο ή στον ετερόπλευρο μαστό.

Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης του κατά δύο έως τρεις φορές. Ορισμένες μεταλλάξεις, όπως εντοπίζονται στα γονίδια BRCA1, BRCA2 και p53 καταλήγουν σε πολύ υψηλό κίνδυνο για τις γυναίκες που τις φέρουν. Μεταλλάξεις γονιδίων οδηγούν σε σύνδρομα, μέρος των οποίων αποτελεί ο καρκίνος του μαστού. Τα πιο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα αποτελούν το σύνδρομο Lynch (γονίδια MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2), το σύνδρομο Cowden (PTEN γονίδιο), το σύνδρομο Li-Fraumeni (γονίδιο TP53) και το σύνδρομο αταξίας τηλαγγειεκτασίας (γονίδιο ATM). Ωστόσο, αυτές οι μεταλλάξεις είναι σπάνιες και ευθύνονται για μικρό ποσοστό (5-10%) επί του συνολικού αριθμού περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

Παράγοντες που σχετίζονται με την αναπαραγωγική συμπεριφορά, όπως η παρατεταμένη έκθεση σε ενδογενή οιστρογόνα (μικρή ηλικία κατά την εμμηναρχή, μεγάλη ηλικία κατά την εμμηνόπαυση, μεγάλη ηλικία κατά την απόκτηση του πρώτου παιδιού) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου. Οι ορμονικές μορφές αντισύλληψης και η ορμονική υποκατάσταση κατά την εμμηνόπαυση θέτουν τις χρήστριες σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις μη χρήστριες, καθώς αποτελούν πηγές εξωγενών οιστρογόνων.

Ο θηλασμός αποτελεί προστατευτικό παράγοντα.

Οι Danaei et al το 2005 (5) υπολόγισαν τη συνεισφορά των τροποποιήσιμων παραγόντων κινδύνου (αποκλείοντας τους αναπαραγωγικούς), και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το 21% όλων των περιπτώσεων κακοηθειών του μαστού παγκοσμίως οφείλονται στην κατάχρηση αλκοόλ, στην παχυσαρκία και στην έλλειψη φυσικής δραστηριότητας. Το ανωτέρω ποσοστό ήταν υψηλότερο στις χώρες με υψηλό μέσο εισόδημα, με τον πιο σημαντικό παράγοντα κινδύνου την παχυσαρκία. Η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου στις αναπτυγμένες χώρες μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στις διαιτητικές συνήθειες, στη μεγαλύτερη ηλικία πρώτου τοκετού, στο μικρότερο αριθμό τέκνων και στο συντομότερο διάστημα θηλασμού (6). Επίσης η υιοθέτηση του δυτικού τρόπου ζωής στις αναπτυσσόμενες χώρες ευθύνεται για την αύξηση της επίπτωσης της νόσου στις χώρες αυτές.

| Παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού |
|-------------------------------------------------------------|
| Ηλικία |
| Παχυσαρκία |
| Κατάχρηση αλκοόλ |
| Έλλειψη φυσικής δραστηριότητας |
| Ατομικό ιστορικό άτυπης υπερπλασίας του μαστού |
| Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού |
| Ατομικό ιστορικό καρκίνου των ωθηκών |
| Ατομικό ιστορικό ακτινοβόλησης του θώρακα |
| Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού |
| Ποικίλα γενετικά σύνδρομα |
| Πρώιμη εμμηναρχή |
| Τεκνοποίηση σε ηλικία >35 ετών |
| Εμμηνόπαυση σε μεγάλη ηλικία |
| Χρήση αντισυλληπτικών |
| Χρήση θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης |

Πίνακας 1. Παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού

1.3 Συμπτωματολογία

Η πλειοψηφία των γυναικών με καρκίνο του μαστού δεν επιδεικνύουν σημεία ή συμπτώματα κατά τη διάγνωση.

Ωστόσο η παρουσία ενός όγκου, η αλλαγή του μεγέθους ή του σχήματος του μαστού, αλλαγές του δέρματος του μαστού όπως ερυθρότητα, πάχυνση (peau d'orange), έκκριση από τη θηλή, εισολκή της θηλής αλλά και σπανιότερα επιμένων πόνος στο μαστό, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό αποτελούν πιθανές εκδηλώσεις του καρκίνου του μαστού (7).

Επίσης, ανάλογα με το στάδιο, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να εμφανιστεί ως μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια επί μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Άλλος εντοπισμένο ή γενικευμένο ή παθολογικά κατάγματα είναι εκδηλώσεις οστικών μεταστάσεων. Μεταστάσεις στο ήπαρ ή στον εγκέφαλο μπορούν να εμφανιστούν με νευρολογικά συμπτώματα, ασκίτη, ανεπάρκεια ήπατος κλπ (8).

1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού βασίζεται στις εξής τρεις εξετάσεις (9):

1. Κλινική εξέταση. Η φυσική εξέταση των μαστών και των γειτονικών λεμφαδένων περιλαμβάνει επισκόπηση και ψηλάφηση.

2. Απεικονιστικές εξετάσεις. Αυτή περιλαμβάνει τη διεξαγωγή μαστογραφίας στα πλαίσια πρωτογενούς ή δευτερογενούς πρόληψης, και έναν υπερηχογραφικό έλεγχο των μαστών και των γειτονικών λεμφαδένων. Ο υπερηχογραφικός έλεγχος ενδείκνυται κυρίως σε γυναίκες νεαρότερης ηλικίας ή σε πυκνούς μαστούς. Σε ορισμένους ασθενείς μπορεί να χρειαστεί μαγνητική τομογραφία των μαστών, ειδικά σε νεαρές γυναίκες με πυκνό μαστικό ιστό, γυναίκες με μεταλλάξεις του γονιδίου BRCA, και γυναίκες με εμφυτεύματα σιλικόνης. Η μαγνητική τομογραφία συνιστάται επίσης επί λοβιακού

καρκίνου του μαστού και σε υποψία πολυκεντρικού καρκίνου του μαστού. Στα πλαίσια της σταδιοποίησης, επιπρόσθετη διερεύνηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί με ακτινογραφία θώρακος, υπερηχογράφημα κοιλίας ή αξονική τομογραφία θώρακος και κοιλίας καθώς και με σπινθηρογράφημα οστών.

3. Αιματολογικές εξετάσεις: Η χρήση καρκινικών δεικτών και συγκεκριμένα των Ca15-3 και Ca 72-9 είναι χρήσιμοι για το follow up της νόσου και όχι για τη διάγνωσή της.

4. Ιστολογική εξέταση. Πριν οποιαδήποτε θεραπευτική παρέμβαση είναι απαραίτητη η ιστολογική επιβεβαίωση. Η βιοψία πραγματοποιείται συχνά με την υπερηχογραφική καθοδήγηση. Υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι βιοψίας (10):

- Βιοψία με λεπτή βελόνη/ Fine- Needle Aspiration biopsy (FNA):
- Βιοψία με κόπτουσα βελόνη/ Core needle biopsy
- Στερεοτακτική βιοψία με τη βοήθεια μαστογράφου
- Ανοιχτή βιοψία όταν δε συμβαδίζουν τα κλινικά, απεικονιστικά και ιστολογικά ευρήματα.

1.5 Σταδιοποίηση

Η αμερικανική επιτροπή καρκίνου (American Joint Committee on Cancer -AJCC) από το 1959 έχει δημοσιεύσει επτά εκδόσεις του συστήματος TNM για τη σταδιοποίηση του καρκίνου. Τα αρχικά TNM αντιστοιχούν στα παρακάτω : T = tumor (όγκος), N= node (λεμφαδένες) και M=metastasis (μετάσταση). Το 2017 δημοσιεύθηκε η όγδοη έκδοση, στην οποία οι αλλαγές βασίστηκαν σε αποδείξεις από τα πιο πρόσφατα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα (11). Μια βασική διαφορά στο νέο σύστημα σταδιοποίησης είναι ότι ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μία ομάδα νόσων με διαφορετικά μοριακά χαρακτηριστικά, τα οποία οδηγούν σε διαφορετική

πρόγνωση, πρότυπα διασποράς και υποτροπής της νόσου, καθώς και σε διαφορετική ανταπόκριση στις υπάρχουσες θεραπείες (12). Για αυτόν το λόγο η επιτροπή AJCC ενσωμάτωσε στο κλασικό σύστημα TNM, βιοδείκτες όπως η ιστολογική διαφοροποίηση ή grading, οι ορμονικοί υποδοχείς, η έκφραση HER2, και οι δοκιμασίες πολυγονιδιακής ανάλυσης ή πολυγονιδιακά panels.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα επιμέρους στοιχεία του συστήματος σταδιοποίησης AJCC (13).

| Κατηγορία T | Περιγραφή |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TX | Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εντοπιστεί |
| T0 | Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου |
| Tis (DCIS) | Μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού |
| Tis (Paget disease) | Νόσος Paget της θηλής που δε σχετίζεται με διηθητικό ή μη καρκίνωμα στο υποκείμενο παρέγχυμα του μαστού |
| T1 | Όγκος <20 mm στη μέγιστη διάμετρό του |
| T1a | Όγκος με μέγιστη διάμετρο >1mm και < ή = 5mm |
| T1b | Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 5 mm και < 10mm |
| T1c | Όγκος με μέγιστη διάμετρο >10 mm και < ή =20 mm |
| T2 | Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 20 mm και < ή =50mm |
| T3 | Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 50 mm |
| T4 | Όγκος οποιασδήποτε διαμέτρου με άμεση επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή και στο δέρμα (εξέλκωση ή μακροσκοπικά οζίδια) |
| T4a | Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα |
| T4b | Εξέλκωση ή και ομόπλευρα μακροσκοπικά οζίδια ή και οίδημα (peau d'orange), που δεν πληρούν τα κριτήρια για φλεγμονώδες καρκίνωμα |
| T4c | Τα χαρακτηριστικά των σταδίων T4a και T4b συνυπάρχουν |
| T4d | Φλεγμονώδες καρκίνωμα |

Πίνακας 2. Περιγραφή των σταδίων T του καρκίνου του μαστού

| Κατηγορία N | Περιγραφή |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pNX | Οι τοπικοί λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν (π.χ. δεν έχουν αφαιρεθεί για ιστολογική εξέταση) |
| pN0 | Δεν ανευρίσκονται λεμφαδενικές μεταστάσεις ή μόνο μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα |
| pN1 | Μικρομεταστάσεις ή μεταστάσεις σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή/και κλινικά αρνητικοί έσω μαστικοί λεμφαδένες με μικρομεταστάσεις ή μακρομεταστάσεις στο φρουρό λεμφαδένα |
| pN1mi | Μικρομεταστάσεις (περίπου 200 κύτταρα, μεγαλύτερα των 0,2 mm αλλά όχι μεγαλύτερα των 2,0 mm) |
| pN1a | Μεταστάσεις σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες |
| pN1b | Μεταστάσεις στον ομόπλευρο έσω μαστικό φρουρό λεμφαδένα |
| pN1c | Συνδυασμός pN1a και pN1b |
| pN2 | Μεταστάσεις σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες ή θετικοί ομόπλευροι έσω μαστικοί λεμφαδένες με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες |
| pN2a | Μεταστάσεις σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες |
| | |
| pN2b | Μεταστάσεις σε κλινικά θετικούς έσω μαστικούς λεμφαδένες με ή χωρίς μικροσκοπική επιβεβαίωση και παθολογοανατομικά αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. |
| pN3 | Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες Ή στους υποκλείδιους (επίπεδο III) λεμφαδένες Ή στους ομόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες με την παρουσία ενός ή περισσότερων θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων (επίπεδα I και II) Ή σε έναν ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες και μικρο- ή μακρο-μεταστάσεις στο φρουρό λεμφαδένα σε κλινικά αρνητικούς ομόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες. Ή στους ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες |
| pN3a | Μεταστάσεις σε 10 ή περισσότερους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή στους υποκλείδιους (επίπεδο III) λεμφαδένες |
| pN3b | pN1a ή pN2a στην παρουσία κλινικά θετικών έσω μαστικών λεμφαδένων με απεικονιστικές εξετάσεις ή pN2a στην παρουσία pN1b |
| pN3c | Μεταστάσεις στους ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες |

Πίνακας 3. Σταδιοποίηση περιοχικών λεμφαδένων

| | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| M0 | Καμία κλινική ή απεικονιστική ένδειξη απομακρυσμένης μετάστασης |
| cM0(i+) | Καμία κλινική ή απεικονιστική ένδειξη απομακρυσμένης μετάστασης στην παρουσία καρκινικών κυττάρων που εντοπίζονται μικροσκοπικά ή με μοριακές τεχνικές στην κυκλοφορία του αίματος, στο μυελό των οστών ή σε μη περιοχικούς λεμφαδένες σε ασυμπτωματικό ασθενή |
| cM1 | Απομακρυσμένη μετάσταση διαγνωσμένη κλινικά ή απεικονιστικά |
| pM1 | Οποιαδήποτε ιστολογικά αποδεδειγμένη μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα ή όταν πρόκειται για μη περιοχικούς λεμφαδένες, μεγαλύτερη από 0,2 mm |

Πίνακας 4. Περιγραφή σταδίων M

| Όταν το T είναι | Και το N είναι | Και το M είναι | Τότε, το Ανατομικό στάδιο είναι |
|-----------------|----------------|----------------|---------------------------------|
| Tis | N0 | M0 | 0 |
| T1 | N0 | M0 | IA |
| T0 | N1mi | M0 | IB |
| T1 | N1mi | M0 | IB |
| T0 | N1 | M0 | IIA |
| T1 | N1 | M0 | IIA |
| T2 | N0 | M0 | IIA |
| T2 | N1 | M0 | IIB |
| T3 | N0 | M0 | IIB |
| T0 | N2 | M0 | IIIA |
| T1 | N2 | M0 | IIIA |
| T2 | N2 | M0 | IIIA |
| T3 | N1 | M0 | IIIA |
| T3 | N2 | M0 | IIIA |
| T4 | N0 | M0 | IIIB |
| T4 | N1 | M0 | IIIB |
| T4 | N2 | M0 | IIIB |
| Οποιοδήποτε T | N3 | M0 | IIIC |
| Οποιοδήποτε T | Οποιοδήποτε N | M1 | IV |

Πίνακας 5. Ανατομικά στάδια

| TNM | Grading | HER2neu | Οιστρογονικοί Υποδοχείς | Προγεστερονικοί Υποδοχείς | Παθολογο-ανατομικό προγνωστικό στάδιο |
|--------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------|
| TisN0M0 | Οποιοδήποτε | Οποιοδήποτε | Οποιοδήποτε | Οποιοδήποτε | 0 |
| T1N0M0 T0N1miM0 T1N1miM0 | G1 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | G2 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IA |
| Αρνητικοί | | | Θετικοί | IA | |
| | | | Αρνητικοί | IB | |
| G3 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA | |
| | | | Αρνητικοί | IA | |
| | | Αρνητικοί | Θετικοί | IA | |
| | | | Αρνητικοί | IA | |
| | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IA | |
| | | | Αρνητικοί | IA | |
| | | Αρνητικοί | Θετικοί | IA | |
| | | | Αρνητικοί | IB | |
| T0N1M0 T1N1M0 T2N0M0 | G1 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IB |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IB |

| | | | | | |
|------------------|----|-----------|-----------|-----------|-----|
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Αρνητικοί | IIA |
| | | | | Θετικοί | IA |
| | | | Αρνητικοί | IB | |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | G2 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IB |
| | | | Αρνητικοί | IB | |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IIA |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | G3 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IIA |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| Αρνητικό | | Θετικοί | Θετικοί | IB | |
| | | | Αρνητικοί | IIA | |
| | | Αρνητικοί | IIA | | |
| | | Αρνητικοί | IIA | | |
| T2N1M0 T3N0M0 | G1 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IIB |
| | | | Αρνητικοί | IIB | |
| | | | Αρνητικοί | IIB | |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IA |
| | | | | Αρνητικοί | IIB |
| | | | Αρνητικοί | IIB | |
| | | | Αρνητικοί | IIB | |
| | G2 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IB |
| | | | | Αρνητικοί | IIB |
| Αρνητικοί | | | IIB | | |

| | | | | | |
|------------------------------------------------|----|-----------|-----------|-----------|-----|
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΒ |
| | G3 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| T0N2MO T1N2MO T2N2MO T3N1MO T3N2MO | G1 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | G2 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΒ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| Αρνητικό | | Θετικοί | Θετικοί | ΙΒ | |
| | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ | |
| | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΑ | |
| | | | Αρνητικοί | ΙΙΒ | |
| | G3 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |
| | | | | Αρνητικοί | ΙΙΑ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | ΙΙΑ |

| | | | | | |
|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | | | | Αρνητικοί | IIIΑ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΒ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΑ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΑ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΓ |
| T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0 TanyN3M0 | G1 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΑ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΒ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΑ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΒ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | G2 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΑ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΒ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| | | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΑ |
| | | | | Αρνητικοί | IIIΒ |
| Αρνητικοί | | | Θετικοί | IIIΒ | |
| | | | Αρνητικοί | IIIΓ | |
| G3 | Θετικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΒ | |
| | | | Αρνητικοί | IIIΒ | |
| | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΒ | |
| | | | Αρνητικοί | IIIΒ | |
| | Αρνητικό | Θετικοί | Θετικοί | IIIΒ | |
| | | | Αρνητικοί | IIIΓ | |
| | | Αρνητικοί | Θετικοί | IIIΓ | |
| | | | Αρνητικοί | IIIΓ | |
| Οποιοδήποτε T και N και M1 | οποιοδήποτε | οποιοδήποτε | οποιοδήποτε | οποιοδήποτε | IV |

Πίνακας 6. Παθολογοανατομικό προγνωστικό στάδιο

1.6 Ιστολογία

Η παθολογοανατομική εξέταση καθορίζει τα κατωτέρω στοιχεία, τα οποία αποτελούν και προγνωστικούς παράγοντες για τον καρκίνο του μαστού:

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

Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας ανακοίνωσε το 2012 την ισχύουσα ταξινόμηση του διηθητικού καρκίνου του μαστού βάσει ιστολογικών χαρακτηριστικών. Οι κατηγορίες αναγράφονται στον Πίνακα 6 (14). Το 75% καταλαμβάνουν τα μη ειδικού τύπου καρκινώματα, τα οποία διαγιγνώσκονται εξ αποκλεισμού καθώς δεν πληρούν τα κριτήρια διάγνωσης των ειδικών τύπων καρκίνου του μαστού (15). Το υπόλοιπο 25% καταλαμβάνουν τα ειδικού τύπου καρκινώματα του μαστού με το λοβιακό να είναι το συχνότερο μεταξύ αυτών.

- Διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου
 - Πλειόμορφο καρκίνωμα
 - Καρκίνωμα με οστεοκλαστικού τύπου γιγαντοκύτταρα
 - Με στοιχεία χοριοκαρκινώματος
 - Με στοιχεία μελανώματος

- Διθηθικό λοβιακό καρκίνωμα
 - κλασικό λοβιακό καρκίνωμα
 - συμπαγής τύπος
 - πολύμορφο
 - σωληνολοβιακό
 - μεικτό

- Σωληνώδες

- Ηθμοειδές

- Βλεννώδες

- Με μυελώδη χαρακτηριστικά
 - μυελώδες
 - άτυπο μυελώδες
 - διθηθικό μη ειδικού τύπου με μυελώδη χαρακτηριστικά

- Με αποκρινή χαρακτηριστικά

- Καρκίνωμα με κύτταρα σφραγιστήρος δακτυλίου

- Μικροθηλώδες

- Μεταπλαστικό μη ειδικού τύπου
 - Ακανθοκυτταρικό (εκ πλακωδών κυττάρων) καρκίνωμα
 - Κερατινοποιούμενο από μεγάλα κύτταρα
 - Ατρακτόμορφο
 - Ακανθολυτικού τύπου
 - Αδενοκαρκίνωμα με ατρακτοκυτταρική διαφοροποίηση
 - Αδενοπλακώδες καρκίνωμα
 - Αδενοπλακώδες καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας
 - Μικτά επιθηλιακά/μεσεγχυματικά μεταπλαστικά καρκινώματα

- Καρκίνωμα με οστική μετάπλαση
- Καρκίνωμα με χονδρική μετάπλαση
- Σπάνιοι τύποι
 - με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά
 - εκκριτικό
 - θηλώδες
 - βλενοεπιδερμοειδές
 - πολύμορφο
 - λιποεκκριτικό
 - γλυκογονοεκκριτικό
 - ογκοκυτταρικό
 - κυψελιδικό

Πίνακας 7. Ιστολογικοί τύποι καρκίνου του μαστού

Ο προσδιορισμός του βαθμού διαφοροποίησης είναι σημαντικό στοιχείο προγνώσεως (16, 17). Ο τρόπος προσδιορισμού πρέπει να είναι αναπαραγώγιμος, και να ελαττώνει όσο γίνεται περισσότερο τον υποκειμενικό παράγοντα, με δεσμεύσεις και συμμόρφωση σε σαφές πρωτόκολλο. Το ευρέως κοινά αποδεκτό σύστημα αξιολόγησης του καρκίνου του μαστού είναι η τροποποιημένη κατά Elston και Ellis μέθοδος Nottingham του αρχικού κατά Bloom και Richardson συστήματος. Η μέθοδος περιλαμβάνει την εκτίμηση τριών στοιχείων της μορφολογίας του όγκου: το σχηματισμό σωληναρίων, τη μορφολογία των πυρήνων και τον αριθμό των μιτώσεων. Κάθε στοιχείο βαθμολογείται από 1 έως 3. Η άθροιση των βαθμών παρέχει το συνολικό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Ο βαθμός κακοήθειας προκύπτει από την άθροιση των αριθμών για τους σωληνώδεις βλάστες, την πολυμορφία των πυρήνων και τον αριθμό των πυρηνοκινήσιων. Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας δεν πρέπει να περιορίζεται στο διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου, αλλά να πραγματοποιείται

για όλους τους ιστολογικούς υπότυπους, με εξαίρεση το σωληνώδες και το μυελοειδές καρκίνωμα, όπου ο βαθμός κακοήθειας είναι προφανής. Ο βαθμός κακοήθειας είναι σημαντικός δείκτης επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο μαστού. Ασθενείς με βαθμό κακοήθειας 1 έχουν 85% πιθανότητα δεκαετούς επιβίωσης σε αντίθεση με τις ασθενείς με βαθμό κακοήθειας 3, όπου το ποσοστό είναι μικρότερο του 45%.

Η έκφραση των ορμονικών υποδοχέων μελετάται με την ανοσοϊστοχημεία και προσδιορίζεται με διαφορετικές μεθόδους, όπως το εκατοστιαίο ποσοστό των θετικών πυρήνων και τα συστήματα διαβάθμισης Allred και H score, που βασίζονται στην ένταση και την έκταση της πυρηνικής χρώσης.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού του Her2 είναι η ανοσοϊστοχημεία και ο *in situ* υβριδισμός (18,19). Ένα καρκίνωμα ορίζεται ως θετικό, δηλαδή υπερεκφράζει την πρωτεΐνη Her2 ανοσοϊστοχημικώς, όταν ποσοστό >30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με παχύ δακτύλιο και σημειώνεται ως 3+. Ορίζεται επίσης θετικό (με γονιδιακή επαύξηση) όταν τα γονιδιακά αντίγραφα είναι >6 ή ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 είναι >2,2. Ορίζεται ως αμφίσημο/απροσδιόριστο ανοσοϊστοχημικώς όταν ποσοστό >30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με παχύ δακτύλιο ή ποσοστό >30% των κυττάρων παρουσιάζει πλήρη μεμβρανική χρώση με λεπτό δακτύλιο και σημειώνεται 2+. Ορίζεται ως αμφίσημο/απροσδιόριστο με τη μέθοδο FISH ή CISH όταν τα γονιδιακά αντίγραφα είναι 4-6 ή ο λόγος σημάτων HER2/CEP17 ισούται με 1,8-2,2. Αφορά περίπου στο 2%-3% των περιπτώσεων και, όταν συμβαίνει, πρέπει να αξιολογηθούν άλλα 20 κύτταρα από τον ίδιο παθολογοανατόμο, άλλα 40 κύτταρα από δεύτερο παθολογοανατόμο και, σε ασυμφωνία του λόγου Her2/CEP17, επανάληψη του test. Ορίζεται ως αρνητικό ανοσοϊστοχημικώς όταν ποσοστό >10% των κυττάρων παρουσιάζει ατελή μεμβρανική χρώση με λεπτό δακτύλιο ή κύτταρα με μεμβρανική

χρώση και σημειώνεται 1+ ή όταν δεν παρατηρείται καθόλου μεμβρανική χρώση και σημειώνεται 0. Οι υπότυποι που έχουν χαμηλή έκφραση των Claudins αφορούν στο 5-10% καρκίνων μαστού, είναι κακής πρόγνωσης και χαρακτηρίζονται από χαμηλό βαθμό έκφρασης Her2 clusters, των γονιδίων πολλαπλασιασμού και των σχετιζόμενων με τους υποδοχείς οιστρογόνων γονιδίων.

Το ενδιαφέρον για το Ki67 έχει αυξηθεί καθώς αποτελεί έναν πιθανό δείκτη πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (20,21). Συγκρινόμενη με τους άλλους δείκτες, η ανοσοϊστοχημεία του Ki67 αποτελεί μια γρήγορη και σχετικά οικονομική τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα παθολογοανατομικά εργαστήρια. Η τεχνική απαιτεί μόνο ένα μικρό δείγμα ιστού και μπορεί να εκτελεστεί ακόμη και σε δείγματα αναρρόφησης με λεπτή βελόνη.

Ασθενείς με ίδια κλινικά και κλασικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά έχουν διαφορετική πορεία και κατάληξη, όπως διαφορετική πορεία έχουν και ασθενείς με ίδια ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά (22). Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού σε μοριακούς υπότυπους, ώστε η θεραπευτική αντιμετώπιση να είναι στοχευμένη και αποτελεσματική. Στον πίνακα 8 περιγράφονται οι μοριακοί υπότυποι.

| Μοριακός υπότυπος | Υποομάδα | Χαρακτηριστικά |
|--------------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|
| Luminal A | | ER+, PR+, HER2 -, Ki67 χαμηλό |
| Luminal B | HER2 - | ER+ και ένα από τα κατωτέρω κριτήρια : PR- ή Ki67 υψηλό |
| | HER2+ | ER+, Ki67 υψηλό ή χαμηλό |
| Πλούσιος σε HER2 | | ER-, PR-, HER2 + |
| Basal like | | ER-, PR-, HER2 - |

Πίνακας 8. Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού

1.7 Θεραπεία καρκίνου του μαστού

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού πρέπει να βασίζεται στις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες και να είναι εξατομικευμένη μετά από παραπομπή στο ογκολογικό συμβούλιο. Οι ισχύουσες οδηγίες συστήνουν θεραπεία βάσει σταδίου και μοριακού υπότυπου.

Η χειρουργική αντιμετώπιση περιλαμβάνει την ογκεκτομή ή τη μαστεκτομή. Η επιλογή της χειρουργικής προσέγγισης εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου (T), το αν είναι πολυεστιακός ή πολυκεντρικός, από το αν είναι φλεγμονώδης και από τη σχέση μεγέθους όγκου και μεγέθους του μαστού. Όσον αφορά στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, η τεχνική του φρουρού λεμφαδένα οδήγησε σε μείωση της νοσηρότητας που συνδυάζεται με το λεμφαδενικό καθαρισμό της μασχάλης. Η χειρουργική αφαίρεση του φρουρού λεμφαδένα ενδείκνυται σε κλινικά, υπερηχογραφικά ή ιστολογικά προεγχειρητικά μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Στις συμπληρωματικές θεραπείες περιλαμβάνονται η ακτινοθεραπεία του μαστού ή και της μασχάλης, η χημειοθεραπεία, η ενδοκρινική θεραπεία επί θετικών ορμονικών υποδοχέων και η θεραπεία με αντισώματα επί έκφρασης HER2.

2. Βιοδείκτες

2.1 Ορισμός

Ως βιοδείκτης ορίζεται από το εθνικό ινστιτούτο καρκίνου (National Cancer Institute) το βιολογικό μόριο που βρίσκεται στο αίμα ή σε άλλα βιολογικά υγρά ή ιστούς, το οποίο αποτελεί σημείο μιας φυσιολογικής ή μη διαδικασίας ή κατάστασης ή νόσου. Ένας βιοδείκτης μπορεί να μετρηθεί αντικειμενικά και να εκτιμηθεί ως ένδειξη μιας φυσιολογικής βιολογικής διαδικασίας, μιας παθολογικής διαδικασίας ή μιας φαρμακολογικής απάντησης σε μια συγκεκριμένη θεραπεία ή κατάσταση. Οι βιοδείκτες χρησιμοποιούνται εκτενώς ως αναλυτικά εργαλεία για την εκτίμηση βιολογικών παραμέτρων δίνοντας τη δυνατότητα μιας γρήγορης και περιεκτικής θεραπευτικής ανάλυσης. Επιπρόσθετα, η μέτρηση των βιοδεικτών μπορεί να προάγει την ανάπτυξη και εκτίμηση νέων θεραπειών (23).

2.2 gH2AX στον κυτταρικό κύκλο

Η H2AX είναι μια ποικιλία της ιστόνης H2A. Η ιστόνη H2A σε συνδυασμό με τις ιστόνες H2B, H3 και H4 δημιουργούν έναν οκταμερή πυρήνα ιστονών πρωτεϊνών, γύρω από τον οποίο περιτυλίγονται 145-147 ζεύγη βάσεων DNA. Αυτή η μονάδα ονομάζεται νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελεί τη μικρότερη υπομονάδα γενωμικού DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα (24) .

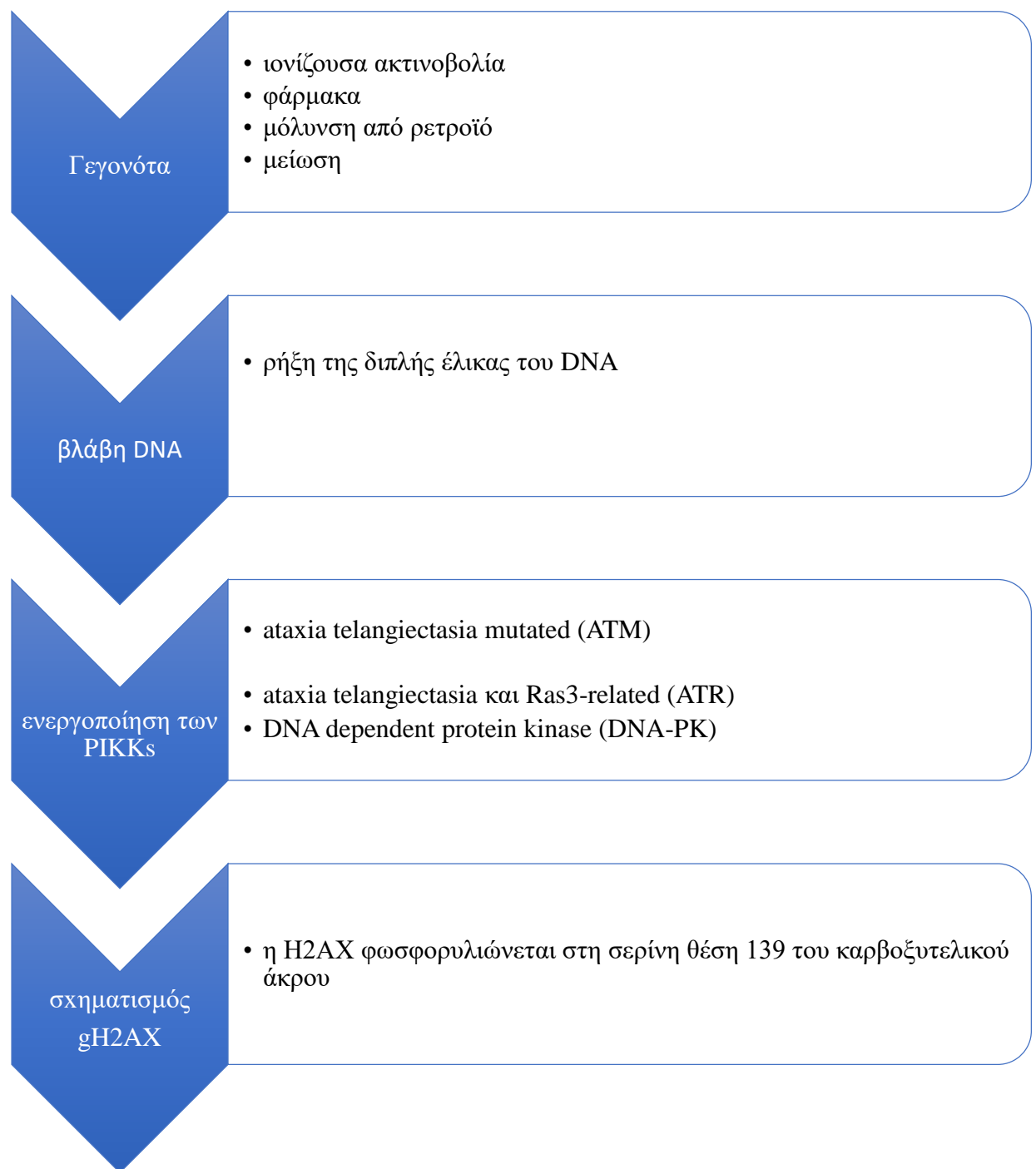
Η H2AX αποτελεί το 2-25% της συνολικής H2A, και τα επίπεδά της εξαρτώνται από το είδος της κυτταρικής σειράς και του ιστού (25). Το γεγονός ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την H2AX περιλαμβάνει εξαρτώμενους και ανεξάρτητους της αντιγραφής τόπους των ιστονών, καθιστά αυτό το γονίδιο μοναδικό ανάμεσα στα υπόλοιπα γονίδια των ιστονών. Μέσω αυτού του μηχανισμού ρύθμισης της μετάφρασης, εξασφαλίζεται

η παρουσία επαρκών μορίων H2AX στις φάσεις G0 και G1 του κυτταρικού κύκλου (26). Η βλάβη του DNA επέρχεται ως αποτέλεσμα πλήθους γεγονότων (27), όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, η θεραπεία με ραδιομιμητικούς παράγοντες, φάρμακα ή ακόμη και ως αποτέλεσμα φυσιολογικών διαδικασιών, μεταξύ των οποίων είναι και η μείωση. Η μόλυνση με ρετροϊούς με επακόλουθη ενσωμάτωση του ιού στο γένωμα και βράχυνση των τελομερών επίσης προκαλεί βλάβη του DNA. Οι βλάβες της διπλής έλικας του DNA δυνατόν να επισυμβούν σε όλες τις ανωτέρω αναφερθείσες περιπτώσεις και να προκαλέσουν το πιο θανατηφόρο τύπο βλάβης του DNA (1-2,28).

Οι βλάβες της διπλής έλικας του DNA με τη σειρά τους ευθύνονται για την ενεργοποίηση των τριών 3-κινασών της φωσφατιδυλινωσιτόλης (PIKKSs): ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia και Rad3-related (ATR), και DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), οι οποίες καταλύουν τη φωσφορυλίωση της H2AX (29-30). Η ATM και οι DNA-PKs επιδεικνύουν λειτουργικό πλεόνασμα όσον αφορά τη φωσφορυλίωση της H2AX που είναι αποτέλεσμα ιονίζουσας ακτινοβολίας, ενώ η ATR είναι σημαντικότερη για τη φωσφορυλίωση της H2AX μετά από βλάβη του DNA η οποία θα επιβράδυνε ή θα διέκοπτε τη διχάλα της αντιγραφής (26). Η H2AX φωσφορυλιώνεται στη σερίνη στη θέση 139 του καρβοξυτελικού άκρου (Εικόνα 1). Η H2AX η πρωτεΐνη Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin/NBS1) και η πρωτεΐνη mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1) δημιουργούν μια αγκύλη πολλαπλασιασμού η οποία οδηγεί και πάλι στη φωσφορυλίωση της H2AX σε περιοχές γειτονικές βλαβών της διπλής έλικας του DNA (31). Η NSBI και η MDC1 συνδέονται απευθείας με τη gH2AX μέσω της περιοχής MDC1 BRCT και αυτός ο μεγάλου εύρους εντοπισμός του συμπλέγματος gH2AX/BRCT εγγύς βλαβών της διπλής έλικας του DNA εξυπηρετεί ως σημείο έλξης για τη συσσώρευση άλλων πρωτεϊνών (DDR – discoidin domain receptor), συμπεριλαμβανομένου και του συμπλέγματος MRN

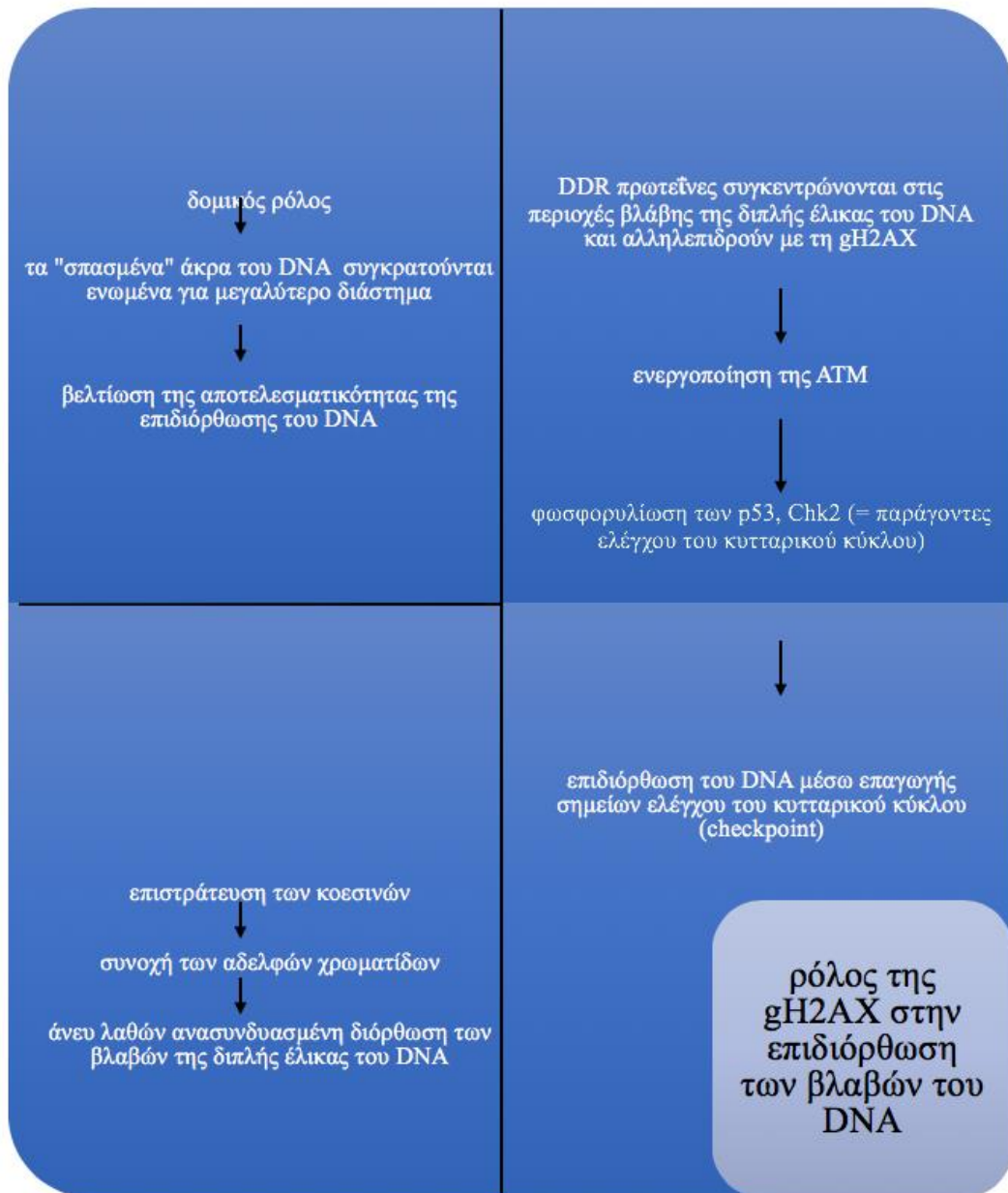
(MRE11-RAD50-NBS1) και των πρωτεϊνών *ring finger protein 8*, E3 ubiquitin protein ligase (RNF8), breast cancer 1 (BRCA1), early onset (BRCA1), and p53-binding protein 1 (53BP1) (32-36). Έχει επίσης προταθεί ότι επιπρόσθετα στο λειτουργικό ρόλο της γH2AX ως απόκριση στη βλάβη του DNA, η γH2AX παίζει επίσης ένα καίριο δομικό ρόλο. Ειδικότερα, η γH2AX συνεισφέρει στη χρονικά αποδοτική παραμονή των παραγόντων επιδιόρθωσης στις θέσεις της βλάβης (37-38). Είναι επίσης πιθανόν ότι η γH2AX και οι συσχετιζόμενες πρωτεΐνες συμβάλλουν στη συγκράτηση των σπασμένων άκρων και έτσι παρέχεται ο απαραίτητος χρόνος για τη διόρθωση του γενετικού υλικού και μειώνεται η πιθανότητα λανθασμένης διόρθωσης (39-40). Ένα άλλο σημαντικό μονοπάτι διόρθωσης του DNA περιλαμβάνει τη στρατολόγηση των κοεσινών (cohesins) –σύμπλοκο πρωτεϊνών που ρυθμίζει το διαχωρισμό των αδελφών χρωματιδών κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, είτε μείωσης είτε μίτωσης- στο σημείο της βλάβης του DNA με σκοπό να προωθήσουν τη διόρθωση της βλάβης. Η διατήρηση του ανωτέρω μηχανισμού θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία άνευ βλάβης αδελφή χρωματίδη η οποία θα μεσολαβεί για μία αλάνθαστη διόρθωση των βλαβών του DNA και για την πρόληψη αδρών χρωμοσωμικών αλλαγών όπως αυτών που παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 2) (41-42).

Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω αναφερόμενες λειτουργίες της H2AX στη διόρθωση του DNA και στη διατήρηση της σταθερότητας του DNA, προτείνεται η χρήση του γH2AX ως βιοδείκτη για την έγκαιρη διάγνωση και για την πρόγνωση του καρκίνου.



Εικόνα 1. Η ακολουθία των γεγονότων που εμπλέκονται στο σχηματισμό της gH2AX

PIKKs: phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases



Εικόνα 2. Ρόλος της gH2AX στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA ATM: ataxia telangiectasia mutated.

2.3 Μέθοδοι ανίχνευσης της gH2AX

Οι κύριες τεχνικές μέτρησης των επιπέδων και της κινητικής της gH2AX είναι: 1) η ανοσοϊστοχημεία, 2) η κυτταρομετρία ροής 3) το Western blot και 4) η ELISA, με τις δύο πρώτες μεθόδους να χρησιμοποιούνται συχνότερα παρά το γεγονός ότι οι δύο τελευταίες παρέχουν μια αντικειμενική ποσοτικοποίηση των επιπέδων της gH2AX (43-46). Έχουν αναπτυχθεί αντισώματα εναντίον της φωσφορυλιωμένης σερίνης στη θέση 139, τα οποία μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα για την ανίχνευση των θέσεων της gH2AX μέσω ανοσοϊστοχημείας. Επιπρόσθετα, αυτή η μέθοδος μπορεί να ταυτοποιήσει την κινητική της επιδιόρθωσης για μια περίοδο 24 ωρών μέσω της ανάδειξης των κυτταρικών διαφορών στη διόρθωση των βλαβών της διπλής έλικας του DNA (47-48). Αυτή η τεχνική είναι ευαίσθητη και ειδική. Η κυτταρομετρία ροής είναι μια καινοτόμος τεχνική που επιτρέπει την απόκτηση των κυτταρικών εικόνων σε πολλαπλά κανάλια ταυτόχρονα, παρέχοντας το πλεονέκτημα της ταχείας ανίχνευσης του σήματος του DNA σε κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου και δίνοντας πληροφορίες ταυτόχρονα για τον αριθμό αλλά και για το μέγεθος των τόπων της gH2AX στον πυρήνα (49-51). Με αυτήν την τεχνική είναι εφικτή μια εξελιγμένη στατιστική ανάλυση μέσω της ποσοτικοποίησης σε μεγάλους αριθμούς κυττάρων. Ο κυριότερος περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι η χαμηλή ανάλυση και κατά συνέπεια η χαμηλή ακρίβεια. Η χρήση υποστηρικτικών εφαρμογών όπως το πολυπαραγοντικό scanning και η λειτουργία του εκτεταμένου βάθους πεδίου (extended depth of field -EDF) συνεισφέρουν στην επίτευξη σχετικά υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας στον καθορισμό της φωσφορυλίωσης της H2AX σε μεμονωμένα κύτταρα ενώ ταυτόχρονα γίνεται συσχετισμός της έκφρασης της gH2AX στους κυτταρικούς πληθυσμούς με το περιεχόμενο του DNA ή την επαγωγή της απόπτωσης. Ο συνδυασμός της κυτταρομετρίας ροής με μεγέθυνση x60 και η

λειτουργία του εκτεταμένου βάθους πεδίου παρέχουν τα ίδια επίπεδα ανάλυσης των γενετικών τόπων συγκρινόμενα με την *in situ* ποσοτικοποίηση των γενετικών τόπων. Η σύγκριση της κυτταρομετρίας ροής με τις μεθόδους *in situ* μικροσκοπίας έδειξε μία 25-30% αύξηση στην ανάλυση των γενετικών τόπων (52-54) . Η μέτρηση της ανοσοχρώσης της gH2AX με τη χρήση της υψηλού περιεχομένου απεικονιστικής πλατφόρμας στην κυτταρική σειρά B λεμφοκυττάρων κοτόπουλου DT40 περιγράφηκε και από τους Nishihara et al (55). Η Western blot έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των γενετικών τόπων της gH2AX, κυρίως στη βασική έρευνα. Είναι λιγότερο πρακτική για τις κλινικές μελέτες, καθώς απαιτείται μεγάλος αριθμός κυττάρων ώστε να αποκτηθεί ικανός αριθμός πυρηνικών πρωτεϊνών. Η ELISA είναι μία τεχνική που παρέχει μια αντικειμενική ποσοτικοποίηση της gH2AX βασισμένη στην ηλεκτροχημειοφωταύγεια (56). Οι ανωτέρω μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την *in vitro* ανίχνευση της gH2AX. Οι Cornelissen et al (57) επινοήσαν μια μέθοδο για την *in vivo* ανίχνευση. Πιο συγκεκριμένα, παρήγαγαν τα φθοροφόρα και με ραδιοϊσότοπα ανοσολογικά προϊόντα συζεύξεως που στοχεύουν την gH2AX. Σε ακτινοβολημένα φέροντα όγκους ποντίκια ή σε ποντίκια υπό χημειοθεραπεία χορηγήθηκαν είτε diethylenetriaminopentaacetic οξύ (DTPA) (για τιτλοφόρηση με In ¹¹¹) είτε φθοροφόρο Cy3 με το κυτταροδιεισδυτικό πεπτιδίο Tat, το οποίο δημιουργήσε το ειδικό για τη gH2AX προϊόν σύζευξης. Στη συνέχεια διενεργήθηκε αξονική τομογραφία εκπομπής απλού φωτονίου (SPECT) και μετρήθηκε η ραδιενέργεια, και κατά αυτόν τον τρόπο μετρήθηκε επίσης *in vivo* η συγκέντρωση της gH2AX (57).

2.4 Μελέτες gH2AX: δειγματοληψία

Οι περισσότεροι κυτταρικοί και ιστικοί τύποι είναι κατάλληλοι για ανίχνευση της gH2AX. Ποικίλα βασικά επίπεδα της gH2AX ανευρίσκονται σε διάφορους

κυτταρικούς και ιστικούς τύπους, ώστε είναι σημαντική η προσεκτική επιλογή του δείγματος.

Οι μελέτες που περιλαμβάνουν ογκολογικούς ιστούς αποκτούν δείγματα μέσω χειρουργικών επεμβάσεων ή βιοψίας. Η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να είναι εύκολη όταν ο όγκος είναι εύκολα προσβάσιμος όπως στην περίπτωση βιοψίας ή όταν ο όγκος αφαιρείται στα πλαίσια θεραπευτικής επέμβασης. Αντιθέτως, όγκοι με εν τω βάθει εντόπιση ή μη χειρουργήσιμοι όγκοι κάνουν τη συλλογή των δειγμάτων πιο περίπλοκη. Επιπλέον, η ετερογένεια των όγκων, διαφορές στην αγγείωση των όγκων και η νέκρωση μπορούν να οδηγήσουν σε bias στις μελέτες. Οι ανωτέρω παράγοντες επηρεάζουν το μεταβολικό status και τη διαφοροποίηση των κυττάρων που αποκτώνται (58). Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC) είναι μια εναλλακτική των καρκινικών ιστών, που προσφέρουν μια επιλογή για την εκτίμηση των ογκολογικών θεραπειών, καθώς μια αύξηση στους γενετικούς τόπους της gH2AX στα CTCs παρατηρείται μετά τη θεραπεία. Ωστόσο, είναι τεχνικά απαιτητικό, καθώς ο αριθμός των απομονούμενων από την αιματική ροή κυττάρων είναι συνήθως χαμηλός ή ακόμη και μη ανιχνεύσιμος (59-60).

Όταν εξετάζεται η κινητική της gH2AX, φυσιολογικά κύτταρα όπως τα λεμφοκύτταρα, κύτταρα του δέρματος και στοματικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Επίσης είναι εύκολη η δειγματοληψία λεμφοκυττάρων. Ωστόσο η ποικιλότητα αυτού του κυτταρικού πληθυσμού κάνει προβληματική την αξιολόγηση της gH2AX σε μη συγχρονισμένους κυτταρικούς πληθυσμούς (61,62). Επίσης κύτταρα του δέρματος και κύτταρα αποφολίδωσης είναι εύκολα συλλέξιμα (63). Κύτταρα των ούλων επίσης συλλέγονται εύκολα και μπορεί να προσφέρουν έναν ευαίσθητο δείκτη για την έκθεση στην ακτινοβολία χαμηλής δόσης. Ωστόσο, το υψηλό στάδιο τελικής

διαφοροποίησης και τα πολύ υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA στο υπόβαθρο καθιστούν τη μελέτη των στοματικών κυττάρων μειονεκτική (64,65).

Ειδικό

Μέρος

1. Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι η πρωταρχική αιτία θανάτου παγκοσμίως, με τον καρκίνο του μαστού να αποτελεί το δεύτερο συχνότερο τύπο καρκίνου και την πέμπτη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο. Μεταξύ των γυναικών, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη πιο συχνή κακοήθεια, η οποία είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο αριθμό θανάτων από καρκίνο. Βάσει στοιχείων του παγκόσμιου οργανισμού υγείας, 2.1 εκατομμύρια γυναίκες διαγιγνώσκονται ετησίως με καρκίνο του μαστού, ενώ 627.000 γυναίκες πέθαναν από καρκίνο του μαστού το 2018. Τα ανωτέρω στοιχεία αναδεικνύουν το κρίσιμο ρόλο της πρώιμης διάγνωσης, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ανακάλυψης καινούριων βιοδεικτών και καινούριων εργαλείων εκτίμησης κινδύνου ασθένειας. Όσον αφορά στον καρκίνο του μαστού, βιοδείκτες ειδικοί για τη συγκεκριμένη ασθενή και τον καρκινικό τύπο αποτελούν ακρογωνιαίους λίθους για το σχεδιασμό εξατομικευμένης θεραπείας, συνεισφέροντας στην πρώιμη διάγνωση και στην καλύτερη πρόγνωση.

Οι κλασικοί προγνωστικοί παράγοντες του καρκίνου του μαστού είναι το μέγεθος του όγκου (T), το status των λεμφαδένων (N), η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M), η λεμφαγγειακή διήθηση (L,V), δείκτες πολλαπλασιασμού (όπως το Ki67), η κατάσταση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων (ER,PR), το status HER2/neu, ο ιστολογικός τύπος, η ηλικία της ασθενούς και η εθνικότητα (66).

Τα προηγούμενα χρόνια, μοριακά tests, τα οποία εξετάζουν μια σειρά σχετικών γονιδίων σε δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) υπήρξαν διαθέσιμα στο εμπόριο, αλλά ενδεικνύονταν σε υποομάδες ασθενών μόνο και είχαν υψηλό κόστος (67,68).

Η H2AX είναι μια ποικιλία της ιστόνης H2A, με τα επίπεδά της να κυμαίνονται μεταξύ 2-25 % της συνολικής H2A και να εξαρτώνται από την κυτταρική γραμμή και

τον ιστό (25). Ποικίλα γεγονότα (27), όπως το ογκογενετικό stress, η ιονίζουσα ακτινοβολία, η θεραπεία με ραδιομμητικούς παράγοντες, τα φάρμακα ή ακόμη και φυσιολογικές διαδικασίες (μεταξύ αυτών η μείωση) ευθύνονται για βλάβες του DNA (69). Οι βλάβες της διπλής έλικας του DNA (DSBs) με τη σειρά τους ευθύνονται για την ενεργοποίηση τριών κινασών (PIKKs, phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases): ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR), and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), οι οποίες καταλύουν τη φωσφορυλίωση της H2AX στη σερίνη της θέσης 139 του καρβοξυτελικού άκρου (29,30). Η φωσφορυλιωμένη H2AX παίζει ένα λειτουργικό και δομικό ρόλο στην επιδιόρθωση των βλαβών του DNA.

Από τα ανωτέρω μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η gH2AX θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένας ευαίσθητος δείκτης για βλάβες της διπλής έλικας του DNA, οι οποίες σημαίνουν γενωμική αστάθεια, και μπορεί δυνητικά να συμβάλει στην καρκινογένεση και την πρόοδο του καρκίνου. Ως αποτέλεσμα, η παρακολούθηση του σχηματισμού της gH2AX θα μπορούσε δυνητικά να λειτουργήσει ως ένα ευαίσθητο μέσο πρώιμης ανίχνευσης του καρκίνου του μαστού.

Η παρούσα μελέτη στοχεύει στην ανάδειξη του ρόλου της gH2AX ως πιθανού προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνο του μαστού, όπως και στη συσχέτιση με τους κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες. Μελετήθηκε η έκφραση της gH2AX σε δείγματα καρκίνου του μαστού καθώς και η συσχέτισή της με κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες ασθενών με τη συγκεκριμένη κακοήθεια. Από όσο είναι γνωστό στους ερευνητές, αυτή είναι από τις ελάχιστες προοπτικές μελέτες που ερευνούν την ανίχνευση της gH2AX σε block παραφίνης με ιστούς από ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

2. Μεθοδολογία

2.1 Πληθυσμός μελέτης

Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία σε πανεπιστημιακή χειρουργική κλινική από τον Ιανουάριο του 2016 έως το Σεπτέμβριο του 2018 αποτελούν το δείγμα του πληθυσμού μελέτης. Εκατόν δέκα διαδοχικοί ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντα καρκίνο του μαστού πήραν μέρος στη μελέτη.

Τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη ήταν: νεοδιαγνωσθέντας καρκίνος του μαστού και ένδειξη για χειρουργική θεραπεία βάσει κατευθυντήριων οδηγιών και μετά από παραπομπή του ασθενούς στο ογκολογικό συμβούλιο του νοσοκομείου. Ιστορικό κακοήθειας σε οποιοδήποτε μέρος του σώματος και προηγούμενη αντινεοπλασματική θεραπεία αποτελούσαν τα κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών από τη μελέτη.

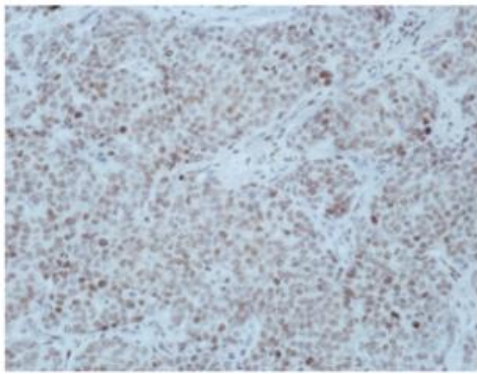
Η πρώτη επαφή με τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε στο εξωτερικό ιατρείο μαστού. Οι ασθενείς συμπλήρωσαν ένα ερωτηματολόγιο που αποσκοπούσε στην απόκτηση ενός πιο λεπτομερούς ιατρικού ιστορικού. Ακολούθησε αναλυτική ενημέρωση πάνω στη διεξαγωγή της έρευνας και υπέγραψαν την αντίστοιχη συγκατάθεση. Μετά από έγκριση από το επιστημονικό συμβούλιο και βάσει της εθνικής νομοθεσίας, χρησιμοποιήθηκαν κωδικοποιημένα καρκινικά δείγματα.

2.2 Ανοσοϊστοχημεία

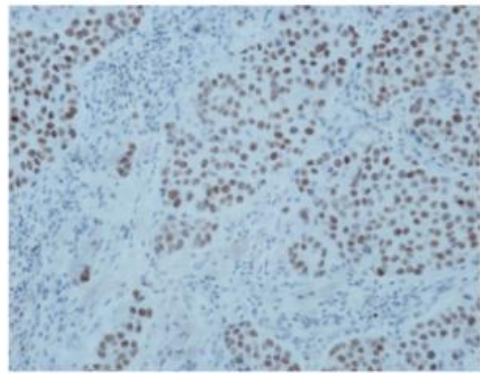
Τα δείγματα των ιστών μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Τα επόμενα βήματα επεξεργασίας του ιστού διενεργήθηκαν όπως περιγράφεται κατωτέρω: αποπαραφινοποίηση του ιστού σε τομές- unmasking του αντιγόνου (δηλαδή ανάκτηση του επίτοπου μέσω θερμότητας) με διάλυμα κιτρικού (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH 6, PTLINK) για δέκα λεπτά σε

θερμοκρασία 96°C - blocking των ιστών με διάλυμα FLEX hyperoxidase blocking solution για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου – επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού ειδικό για τη gH2AX (clone 20E3 CELL SIGNALING) σε αραιώση 1:300 για ένα βράδυ (σε σκοτεινές συνθήκες) σε θερμοκρασία 4°C. Το EnVision™ FLEX/HRP χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο αντίχρωσης των συμπλεγμάτων αντιγόνου – αντισώματος. Αντίχρωση με αιματοξυλίνη για πέντε λεπτά ακολουθούμενη από στερέωση των τομών και εξέταση υπό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου αποτελούσαν τα τελικά στάδια επεξεργασίας του ιστού για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης της gH2AX σε δείγματα καρκίνου του μαστού. Επιπλέον αντισώματα κατά των αντιστοιχών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν από τους παρακάτω κατασκευαστές : μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού κατά των οιστρογονικών υποδοχέων α (estrogen receptor α (ERα) rabbit monoclonal) - κλώνος EP1 (DAKO) σε αραιώση 1:50, μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του προγεστερονικού υποδοχέα – κλώνος PGR636 (DAKO) σε αραιώση 1:200, και μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά του c -erb-B2/HER2/neu – κλώνος CB11 (CELL MARQUE) σε αραιώση 1:200.

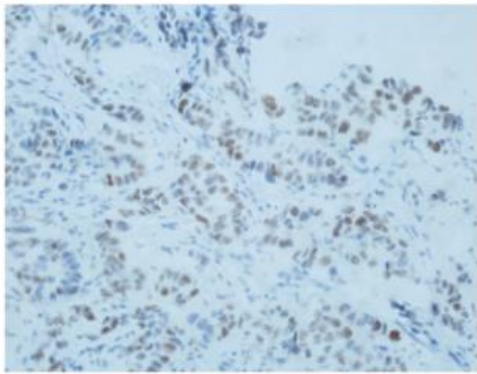
Οι χρωματισμένες τομές εξετάστηκαν υπό το μικροσκόπιο σε μεγεθύνσεις έως x400 και δόθηκαν ημιποσοτικές τιμές από τουλάχιστον δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους (εικόνα 3). Αναφορικά με την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, εκτιμήθηκε το ποσοστό των θετικά χρωσμένων πυρήνων για οιστρογονικούς, προγεστερονικούς υποδοχείς και για το gH2AX. Αξιολογήθηκε η χρώση της κυτταρικής μεμβράνης για το HER2/neu (χρησιμοποιήθηκαν τιμές 0, 1+, 2+, 3+) και σε περίπτωση τιμής HER2/neu 2+, διενεργήθηκε χρωμογονική υβριδοποίηση (chromogenic in situ hybridization (CISH)) και αξιολογήθηκε βάσει των κατευθυντήριων οδηγιών του αμερικανικού κολλεγίου παθολογοανατόμων και της αμερικανικής εταιρείας κλινικής ογκολογίας (70).



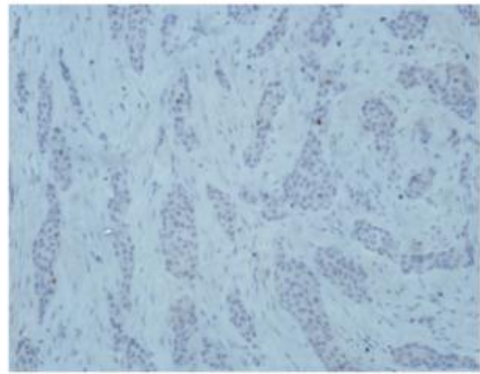
a.



b.



c.



d.

Εικόνα 3. ανοσοϊστοχημικές εικόνες έκφρασης του gH2AX

a. υψηλή έκφραση του gH2AX με ετερογενή ένταση (μεγέθυνση x200)

b. υψηλή έκφραση του gH2AX (μεγέθυνση x200)

c. χαμηλή έκφραση του gH2AX (μεγέθυνση x200)

d. πολύ χαμηλή έκφραση του gH2AX (μεγέθυνση x200)

3. Στατιστική ανάλυση

Μεταβλητές με κανονική κατανομή εκφράστηκαν με τη μέση τιμή τους και την τυπική απόκλιση, ενώ μεταβλητές με μη κανονική κατανομή εκφράστηκαν μέσω της διάμεσης τιμής και του ενδοτεταρτημοριακού εύρους (interquartile range). Οι ποιοτικές μεταβλητές εκφράστηκαν με την απόλυτη και σχετική συχνότητα. Το Mann-Whitney test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση της έκφρασης του gH2AX μεταξύ δύο ομάδων και το Kruskal-Wallis για τη σύγκριση των μέσων τιμών σε περισσότερες από δύο υποομάδες. Η διόρθωση Bonferroni χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση πολλαπλών συγκρίσεων με σκοπό τον έλεγχο για λάθη τύπου I. Ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η συσχέτιση μεταξύ δύο συνεχόμενων μεταβλητών. Συντελεστής συσχέτισης μεταξύ 0.1 και 0.3 αξιολογήθηκε ως χαμηλός, μεταξύ 0.31 και 0.5 μέτριος και πάνω από 0.5 υψηλός. Η ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε με ανεξάρτητες μεταβλητές τις τιμές του gH2AX χρησιμοποιώντας την εισαγωγή και εξαγωγή με βήματα (τιμή p για εισαγωγή 0.05, για εξαγωγή 0.10) και λογαριθμικές μετατροπές λόγω μη κανονικής κατανομής της ανεξάρτητης μεταβλητής. Προσαρμοσμένοι συντελεστές παλινδρόμησης (β) και τυπικά λάθη (standard errors, SE) υπολογίστηκαν από τις αναλύσεις πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης. Όλες οι αναφερόμενες τιμές p είναι δίπλευρης σημαντικότητας. Στατιστική σημαντικότητα θεωρήθηκε όταν $p < 0.05$. Οι αναλύσεις διεξήχθησαν με το στατιστικό λογισμικό SPSS (version 22.0).

4. Αποτελέσματα

Η μελέτη συμπεριέλαβε κακοήθεις όγκους από 110 ασθενείς (άνδρες/γυναίκες= 1/109) με μέση ηλικία 61.4 έτη (σταθερή απόκλιση (SD=13.9 years). 57.3 % των ασθενών εμφάνισαν καρκίνο στο δεξιό και 41.8% στον αριστερό μαστό. Η πλειοψηφία των ασθενών βρισκόνταν σε στάδια T1 ή T2 (47.3% και 45.5% αντίστοιχα) με μέση διάμετρο του όγκου 2.5 εκατοστά (SD 1.7 εκατοστά), ενώ 40.9 % είχαν όγκο με βαθμό διαφοροποίησης 3 (G3). Ο διάμεσος αριθμός εξετασθέντων λεμφαδένων ήταν 8.5 (IQR: 3-15) και παθολογικών λεμφαδένων 1 (IQR: 0-4). Ιστολογικό στάδιο II (43.6%) και προγνωστικό στάδιο I (68.2%) βρέθηκε στην πλειοψηφία των ασθενών. Οι περισσότεροι ασθενείς (70.9%) υπεβλήθησαν σε μαστεκτομή είτε λόγω ογκολογικής ένδειξης ή λόγω επιθυμίας του ασθενούς.

Πληροφορίες αναφορικά με τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, το HER2/neu, το Ki67 και την έκφραση του gH2AX παρουσιάζονται στον πίνακα 9. 48.2% των ασθενών ήταν HERneu 2+ και 24.5% ήταν CISH θετικοί. Η διάμεση τιμή του gH2AX ήταν 45 (IQR:20-70).

| | N (%) |
|-------------------------|-------------|
| Ηλικία, μέσος όρος (SD) | 61.4 (13.9) |
| Γένος | |
| Γυναίκες | 109 (99.1) |
| Άνδρες | 1 (0.9) |
| Μαστός | |
| Αριστερός | 46 (41.8) |
| Δεξιός | 63 (57.3) |

| | |
|------------------------------------------|--------------|
| Άμφω | 1 (0.9) |
| Στάδιο T | |
| I | 52 (47.3) |
| II | 50 (45.5) |
| III | 7 (6.4) |
| IV | 1 (0.9) |
| Μέγεθος όγκου, μέσος όρος (SD) | 2.5 cm (1.7) |
| Grade | |
| 1 | 24 (21.8) |
| 2 | 41 (37.3) |
| 3 | 45 (40.9) |
| Παθολογικοί λεμφαδένες, median (IQR) | 1 (0 - 4) |
| Εξετασθέντες λεμφαδένες, median (IQR) | 8.5 (3 - 15) |
| Ιστολογικό στάδιο | |
| I | 40 (36.4) |
| II | 48 (43.6) |
| III | 22 (20.0) |
| Προγνωστικό στάδιο | |
| I | 75 (68.2) |
| II | 16 (14.5) |
| III | 19 (17.3) |
| Χειρουργική επέμβαση | |
| Μαστεκτομή | 78 (70.9) |
| Ουκτεκτομή | 14 (12.7) |
| Τεταρτεκτομή | 18 (16.4) |
| ER %, mean (SD) | 71.9 (38.5) |
| PgR %, mean (SD) | 40.8 (37.9) |

Πίνακας 9.

| | |
|--------------------------|--------------|
| HER2 | |
| 0 | 30 (27.3) |
| 1 | 11 (10.0) |
| 2 | 53 (48.2) |
| 3 | 16 (14.5) |
| CISH θετικό ¹ | 13 (24.5) |
| Ki-67 %, median (IQR) | 35 (30 - 60) |

Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, HER2/neu, Ki67 και έκφραση του gH2AX

¹ αναφέρεται σε ασθενείς με HER2 = 2

Υψηλότερα T και βαθμός διαφοροποίησης σχετίζονται σημαντικά με υψηλότερες τιμές gH2AX (πίνακας 10). Επίσης, μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου και υψηλότερος αριθμός παθολογικών λεμφαδένων σχετίζονται σημαντικά θετικά με την έκφραση gH2AX. Επιπλέον, το gH2AX διαφέρει σημαντικά ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Μετά από διόρθωση κατά Bonferroni, βρέθηκε ότι ασθενείς σταδίου I είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με αυτούς σταδίου II και III ($p=0.001$ και $p=0.003$ αντίστοιχα). Παρομοίως, ασθενείς με προγνωστικό στάδιο I είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές έκφρασης σε σχέση με ασθενείς με προγνωστικά στάδια II και III ($p<0.001$ και $p=0.001$ αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές έκφρασης του gH2AX συγκρινόμενοι με ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ογκεκτομή ($p=0.014$).

Όταν διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ έκφρασης gH2AX και του status των ορμονικών υποδοχέων, βρέθηκε ότι υψηλότερες τιμές ER και PR σχετίζονται σημαντικά με χαμηλότερες τιμές gH2AX (πίνακας 11). Αντίθετα, τα HER2 και Ki67 σχετίζονται θετικά με το gH2AX. Ασθενείς με HER2 +2 που είχαν θετικό CISH, είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές gH2AX συγκρινόμενοι με ασθενείς με HER2 +2 και αρνητικό CISH.

Με τη χρήση πολλαπλής γραμμικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης, το status των προγεστερονικών υποδοχέων, το HER2 και ο βαθμός διαφοροποίησης σχετίζονται σημαντικά με το gH2AX (πίνακας 12)

| | gH2AX Ser139 % | P ⁺⁺ |
|-----------------------------------------|----------------|-----------------|
| | Median (IQR) | |
| Ηλικία, r ⁺ | -0.02 | 0.852 |
| Μαστός | | |
| Αριστερός | 60 (30 – 70) | 0.077 |
| Δεξιός | 40 (15 – 70) | |
| T, r ⁺ | 0.36 | <0.001 |
| Grade, r ⁺ | 0.76 | <0.001 |
| Μέγεθος όγκου, r ⁺ | 0.48 | <0.001 |
| Παθολογικοί λεμφαδένες, r ⁺ | 0.23 | 0.026 |
| Εξετασθέντες λεμφαδένες, r ⁺ | 0.14 | 0.189 |
| Στάδιο | | |
| I | 20 (15 – 50) | 0.001 |
| II | 60 (35 – 75) | |
| III | 55 (30 – 70) | |
| Προγνωστικό στάδιο | | |
| I | 30 (15 – 60) | <0.001 |
| II | 70 (70 – 80) | |
| III | 60 (40 – 80) | |
| Επέμβαση | | |

| | | |
|--------------|----------------|-------|
| Μαστεκτομή | 50 (25 – 70) | |
| Ογκεκτομή | 17.5 (10 – 40) | 0.032 |
| Τεταρτεκτομή | 70 (20 – 70) | |

Πίνακας 10. Συσχέτιση της έκφρασης του gH2AX Ser139 % με τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

| | gH2AX Ser139 % | P ⁺⁺ |
|------------------------|----------------|-----------------|
| | Median (IQR) | |
| ER %, r ⁺ | -0.55 | <0.001 |
| PgR %, r ⁺ | -0.59 | <0.001 |
| HER2, r ⁺ | 0.46 | <0.001 |
| CISH ¹ | | |
| Αρνητικό | 40 (20 – 60) | 0.006 |
| Θετικό | 70 (60 – 70) | |
| Ki67 %, r ⁺ | 0.87 | 0.050 |

Πίνακας 11. συσχέτιση του gH2AX με την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, το HER2 και το Ki67

¹αναφέρεται σε ασθενείς με HER2 2+ ⁺Spearman's correlation coefficient ⁺⁺Mann-Whitney test

| | β ⁺ | SE ⁺⁺ | P |
|--------------|----------------|------------------|--------|
| Χειρουργείο | | | |
| Μαστεκτομή | | | |
| Ογκεκτομή | -0.16 | 0.06 | 0.012 |
| Τεταρτεκτομή | -0.04 | 0.05 | 0.444 |
| PgR % | -0.003 | 0.001 | <0.001 |
| HER2 | 0.05 | 0.02 | 0.012 |
| Grade | 0.22 | 0.03 | <0.001 |

Πίνακας 12. Πολλαπλή γραμμική ανάλυση με το gH2AX ως εξαρτημένη μεταβλητή και τα χαρακτηριστικά των ασθενών ως ανεξάρτητες μεταβλητές.

⁺regression coefficient ⁺⁺Standard Error

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα του gH2AX πιθανώς να αντανακλούν την ενδογενή γενετική αστάθεια στους καρκινικούς μαστικούς ιστούς. Η αυξανόμενη χρώση του gH2AX συσχετίστηκε με μη ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες όπως είναι το στάδιο του καρκίνου, ο βαθμός διαφοροποίησης, η απουσία έκφρασης ορμονικών υποδοχέων και το Ki67. Υψηλότερες τιμές gH2AX μπορεί να υποδεικνύουν έναν πιο επιθετικό καρκινικό φαινότυπο, ως αποτέλεσμα βλαβών της διπλής έλικας του DNA.

Παρόμοια αποτελέσματα ανέδειξαν και οι Yang et al. (71), οι οποίοι συμπέραναν ότι η έκφραση του gH2AX σχετίζεται σημαντικά με φτωχά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά. Οι Nagelkerke et al. (72) έδειξαν μέσω μιας πολυπαραγοντικής ανάλυσης με το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης και την τριπλή αρνητικότητα των όγκων, μόνο η συσχέτιση μεταξύ τριπλής αρνητικότητας και gH2AX έμεινε σημαντική. Οι Sedelnikova et al.(73) πρότειναν ότι η ανίχνευση του gH2AX θα μπορούσε να ευνοήσει την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Καθώς η ανίχνευση του gH2AX αποτελεί ένα σημαντικά πιο ευαίσθητο, αποτελεσματικό και αναπαραγώγιμο τρόπο αξιολόγησης του βαθμού βλάβης του DNA, συγκριτικά με άλλες τεχνικές όπως η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου, προτείνεται ότι το gH2AX θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο πρώιμης διάγνωσης του καρκίνου (74).

Συμπερασματικά, μέσω της προοπτικής κοόρτης των 110 ασθενών με καρκίνο του μαστού, παρατηρήσαμε μια θετική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης του gH2AX και μη ευνοϊκών παθολογοανατομικών παραγόντων. Προτείνουμε περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών με τους οποίους το gH2AX εμπλέκεται στην ογκογένεση του καρκίνου

του μαστού και διαγνωστικών και θεραπευτικών στρατηγικών χρησιμοποιώντας το gH2AX ως στόχο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
2. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>
3. IARC (2008). World cancer report 2008. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
4. Lacey JV Jr. et al. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*, 9, 84.
5. Danaei G et al. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366, 1784–93.
6. Peto J. (2001). Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 411, 390–5.
7. Koo MM, von Wagner C, Abel GA, McPhail S, Rubin GP, Lyratzopoulos G. Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2017;48:140–146. doi:10.1016/j.canep.2017.04.010
8. *Radiol Technol.* 2017 May;88(5):519M-539M. Metastatic Breast Cancer. Peart O.
9. Wöckel A, Albert US, Janni W, Scharl A, Kreienberg R, Stüber T. The Screening, Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Breast Cancer. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(18):316–323. doi:10.3238/arztebl.2018.0316
10. John M. Eisenberg Center for Clinical Decisions and Communications Science. Having a Breast Biopsy: A Review of the Research for Women and Their Families.

- 2016 May 26. In: Comparative Effectiveness Review Summary Guides for Consumers [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2005-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368364>
11. Gabriel NH, James LC, Carl JD, Stephen BE, Elizabeth AM, Hope SR, et al. Breast. In: Mahul BA, editor. American Joint Committee on Cancer (AJCC). AJCC cancer staging manual. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017. pp. 589–628
 12. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015;24(Suppl 2):S26–S35.
 13. Gabriel N. Hortobagyi, Stephen B. Edge, and Armando Giuliano. New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book 2018* :38, 457-467
 14. World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. 2003. ISBN 978-92-832-2412-9.
 15. Ellis P., Schnitt S.J., Sastre-Garau X., Bussolati G., Tavassoli F.A., Eusebi V., Peterse J.L., Mukai K., Tabar L., Jacquemier J., Cornelisse C.J., Sasco A.J., Kaaks R., Pisani P., Goldgar D.E., Devilee P., Cleton-Jansen M.J., Borresen-Dale A.L., van't Veer L., Sapino A., 2003. Invasive breast carcinoma. In Tavassoli F.A., editor; , Devilee P., editor. (Eds.), WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon Press; Lyon
 16. Emad A Rakha, Jorge S Reis-Filho, Frederick Baehner, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade *Breast Cancer Research* 2010 12:207

17. Rakha EA, Aleskandarani M, Toss MS, et al. Breast cancer histologic grading using digital microscopy: concordance and outcome association. *Journal of Clinical Pathology* 2018;**71**:680-686.
18. Podoll M. HER2 (c-erbB2) breast. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsbreasther2.html>. Accessed July 11th, 2019.
19. Kunitomo K, Inoue S, Ichihara F, Kono K, Fujii H, Matsumoto Y, Ooi A. A case of metastatic breast cancer with outgrowth of HER2-negative cells after eradication of HER2-positive cells by humanized anti-HER2 monoclonal antibody (trastuzumab) combined with docetaxel. *Hum Pathol.* 2004 Mar;**35**(3):379-81.
20. cSahin S., Gönül İ. Işık, Çakir A., Seçkin S., Uluoğlu Ö.. Clinicopathological Significance of the Proliferation Markers Ki67, RacGAP1, and Topoisomerase 2 Alpha in Breast Cancer. *Int J Surg Pathol.* 2016; 24 (7) : 607-13 .
21. Kontzoglou K, Palla V, Karaolanis G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology.* 2013;**84**(4):219-25. doi: 10.1159/000346475. Epub 2013 Jan 24.
22. Kondov B, Milenkovic Z, Kondov G, et al. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;**6**(6):961–967. Published 2018 Jun 6. doi:10.3889/oamjms.2018.231
23. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;**69**(3):89-95.

24. Ausio J. Histone variants—the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006
25. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273(10): 5858–5868.
26. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 957–967.
27. Sharma A, Singh K and Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* 2012; 920: 613–626.
28. Marti TM, Hefner E, Feeney L, et al. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 9891–9896.
29. Hanasoge S and Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis* 2007; 28
30. Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, et al. ATR dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J* 2006; 25(24): 5775–5782.
31. Stucki M and Jackson SP. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair* 2006; 5(5): 534–543.
32. Wood JL, Singh N, Mer G, et al. MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2007; 282: 35416–35423.
33. Lou Z, Minter-Dykhous K, Franco S, et al. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification $\left[\frac{1}{\text{SER}} \right]$ of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 2006; 21(2): 187–200.

34. Kobayashi J. Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double strand breaks: nBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT. *J Radiat Res* 2004; 45(4): 473–478.
35. Solier S and Pommier Y. The nuclear γ -H2AX apoptotic ring: implications for cancers and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(12): 2289–2297.
36. Montero JA, Sanchez-Fernandez C, Lorda-Diez CI, et al. DNA damage precedes apoptosis during the regression of the interdigital tissue in vertebrate embryos. *Sci Rep* 2016; 6: 35478.
37. Fink M, Imholz D and Thoma F. Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3589–3600.
38. Pinto DM and Flaus A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem* 2010; 50: 55–78.
39. Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, et al. H2AX Haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* 2003; 114(3): 371–383.
40. Bassing CH and Alt FW. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 2004; 3: 149–153.
41. Xie A, Puget N, Shim I, et al. Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol Cell* 2004; 16(6): 1017–1025.
42. Lowndes NF and Toh GW-L. DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* 2005; 15(3): R99–R102.
43. Pouliliou S and Koukourakis M. Gamma histone 2AX (γ -H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. *Biomarkers* 2014; 19(3): 167–180.
44. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, et al. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* 2013; 753(1): 24–40.

45. Nagelkerke A and Span PN. Staining against phospho- H2AX (γ -H2AX) as a marker for DNA damage and genomic instability in cancer tissues and cells. *Adv Exp Med Biol* 2016; 899: 1–10.
46. Tang MM, Mah LJ, Vasireddy RS, et al. Quantitation of gammaH2AX foci in tissue samples. *J Vis Exp* 2010; 40: 2063.
47. Sedelnikova OA, Pilch DR, Redon C, et al. Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 233–235.
48. Bourton EC, Plowman PN, Adam Zahir S, et al. Multispectral imaging flow cytometry reveals distinct frequencies of gH2AX foci induction in double strand break repair defective human cell Lines. *Cytom* 2012; 81A: 130–137.
49. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2012; 88(5): 405–413.
50. Tanaka T, Huang X, Halicka HD, et al. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* 2007; 71(9): 648–661.
51. Johansson P, Fasth A, Ek T, et al. Validation of a flow cytometry-based detection of γ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. *Cytometry B Clin Cytom*. Epub ahead of print 6 April 2016. DOI: 10.1002/cyto.b.21374.
52. Huang X, Halicka HD, Traganos F, et al. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38(4): 223–243.
53. Darzynkiewicz Z, Huang X and Okafuji M. Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods Mol Biol* 2006; 314: 81–93.

54. Parris CN, Adam Zahir S, Al-Ali H, et al. Enhanced γ -H2AX DNA damage foci detection using multimagnification and extended depth of field in imaging flow cytometry. *Cytometry* 2015; 87: 717–723.
55. Nishihara K, Shahane SA and Xia M. Determination of histone H2AX phosphorylation in DT40 cells. In: Zhu H and Xia M (eds) *High-throughput screening assays in toxicology* (vol. 1473 of the series *Methods in Molecular Biology*). New York: Humana Press, 2016, pp. 71–76.
56. Avondoglio D, Scott T, Kil WJ, et al. High throughput evaluation of gamma-H2AX. *Radiat Oncol* 2009; 4: 31.
57. Cornelissen B, Kersemans V, Darbar S, et al. Imaging DNA damage in vivo using γ H2AX-targeted immunoconjugates. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4539–4549.
58. Chan N and Bristow RG. “Contextual” synthetic lethality and/or loss of heterozygosity: tumor hypoxia and modification of DNA repair. *Clin Cancer Res* 2010; 16(18): 4553–4560.
59. Catts VS, Catts SV, Jablensky A, et al. Evidence of aberrant DNA damage response signalling but normal rates of DNA repair in dividing lymphoblasts from patients with schizophrenia. *World J Biol Psychiatry* 2012; 13(2): 114–125.
60. Maheswaran S and Haber DA. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(1): 96–99.
61. Asakawa H, Koizumi H, Koike A, et al. Prediction of breast cancer sensitivity to neoadjuvant chemotherapy based on status of DNA damage repair proteins. *Breast Cancer Res* 2010; 12(2): R17.
62. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010; 9(4): 662–669.

63. Rube CE, Fricke A, Wendorf J, et al. Accumulation of DNA double-strand breaks in normal tissues after fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76(4): 1206–1213.
64. Colin C, Devic C, Noël A, et al. DNA double-strand breaks induced by mammographic screening procedures in human mammary epithelial cells. *Int J Radiat Biol* 2011; 87(11): 1103–1112.
65. Yoon AJ, Shen J, Wu HC, et al. Expression of activated checkpoint kinase 2 and histone 2AX in exfoliative oral cells after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 2009; 171(6): 771–775.
66. Stankov A., Bargallo-Rocha J.E., Namendys-Silva Silvio A. et al. Prognostic Factors and Recurrence in Breast Cancer: Experience at the National Cancer Institute of Mexico. *ISRN Oncol.* 2012; 2012: 825258. doi: 10.5402/2012/825258
67. Eichler C, Fromme J, Thangarajah F et al. Gene-expression Profiling - A Decision Impact Analysis: Decision Dependency on Oncotype DX® as a Function of Oncological Work Experience in 117 Cases. *Anticancer Res.* 2019 Jan;39(1):297-303. doi: 10.21873/anticanres.13111.
68. Thangarajah F, Eichler C, Fromme J et al. The impact of EndoPredict® on decision making with increasing oncological work experience: can overtreatment be avoided? *Arch Gynecol Obstet.* 2019 Feb 19. doi: 10.1007/s00404-019-05097-w. [Epub ahead of print]
69. Jeggo, PA, Lobrich, M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007; 26: 7717–7719.
70. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline

update. Arch Pathol Lab Med. 2014;138:241–256; . doi: 10.5858/arpa.2013-0953-SA. Epub 2013 Oct 7.

71. Yang S., Polley E., Nguyen D. Association of gamma-H2AX expression with clinopathologic characteristics and clinical outcomes in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2016 34:15_suppl, 11577-11577
72. Nagelkerke A, van Kuijk SJ, Sweep FC, et al. Constitutive expression of gamma-H2AX has prognostic relevance in triple negative breast cancer. *Radiother Oncol* 2011; 101(1): 39–45
73. Sedelnikova OA and Bonner WM. GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle* 2006; 5: 2909–2913
74. Palla, V.-V., Karaolani, G., Katafigiotis, I. et al. gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumour Biol.* 2017 Mar;39(3):1010428317695931. doi: 10.1177/1010428317695931

Κατάλογος Πινάκων

| Πίνακας | Περιγραφή | Σελίδα |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 | Παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού | 17 |
| 2 | Περιγραφή των σταδίων T του καρκίνου του μαστού | 20 |
| 3 | Σταδιοποίηση περιοχικών λεμφαδένων | 21 |
| 4 | Περιγραφή σταδίων M | 22 |
| 5 | Ανατομικά στάδια | 22 |
| 6 | Παθολογοανατομικό προγνωστικό στάδιο | 23 |
| 7 | Ιστολογικοί τύποι καρκίνου του μαστού | 27 |
| 8 | Μοριακοί υπότυποι καρκίνου του μαστού | 31 |
| 9 | Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, HER2/neu, Ki67 και έκφραση του gH2AX | 49 |
| 10 | Συσχέτιση της έκφρασης του gH2AX Ser139 % με τα χαρακτηριστικά των ασθενών. | 52 |
| 11 | Συσχέτιση του gH2AX με την έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, το HER2 και το Ki67. | 53 |
| 12 | Πολλαπλή γραμμική ανάλυση με το gH2AX ως εξαρτημένη μεταβλητή και τα χαρακτηριστικά των ασθενών ως ανεξάρτητες μεταβλητές. | 53 |

Κατάλογος εικόνων

| Εικόνα | Περιγραφή | Σελίδα |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1 | Η ακολουθία των γεγονότων που εμπλέκονται στο σχηματισμό της gH2AX. PIKKs: phosphatidylinositol-3-kinase-like kinases | 36 |
| 2 | Ρόλος της gH2AX στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA ATM: ataxia telangiectasia mutated | 37 |
| 3 | Ανοσοϊστοχημικές εικόνες έκφρασης του gH2AX | 47 |