



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ - ΑΝΑΤΟΜΕΙΟ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ

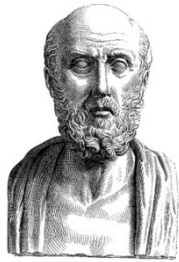
**ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΡΩΜΑΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ
ΣΑΚΧΑΡΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

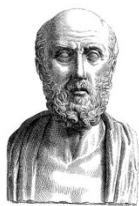
ΙΩΑΝΝΗΣ - ΑΝΑΡΓΥΡΟΣ ΒΛΑΧΟΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

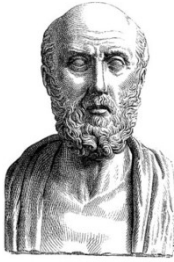


Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή της γνώμης του συγγραφέα (Ν.5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2.)



ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ

Ὅμνυμι Απόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισι τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρῆ ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγχεόντι, εἴη ἐπάύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.



ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Ορκίζομαι στον Απόλλωνα τον Ιατρό και στον Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και σ' όλους τους Θεούς και τις Θεές επικαλούμενος την μαρτυρία τους, να τηρήσω πιστά κατά τη δύναμη και την κρίση μου αυτό τον όρκο και το συμβόλαιό μου αυτό. Να θεωρώ αυτόν που μου δίδαξε αυτή την τέχνη ίσο με τους γονείς μου και να μοιραστώ μαζί του τα υπάρχοντά μου και τα χρήματά μου αν έχει ανάγκη φροντίδας. Να θεωρώ τους απογόνους του ίσους με τ' αδέρφια μου και να τους διδάξω την τέχνη αυτή αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς αμοιβή και συμβόλαιο και να μεταδώσω με παραγγελίες, οδηγίες και συμβουλές όλη την υπόλοιπη γνώση μου και στα παιδιά μου και στα παιδιά εκείνου με δίδαξε και στους άλλους μαθητές που έχουν κάνει γραπτή συμφωνία μαζί μου και σ' αυτούς που έχουν ορκισθεί στον ιατρικό νόμο και σε κανέναν άλλο και να θεραπεύω τους πάσχοντες κατά τη δύναμή μου και την κρίση μου χωρίς ποτέ, εκουσίως, να τους βλάψω ή να τους αδικήσω. Και να μη δώσω ποτέ σε κανένα, έστω κι αν μου το ζητήσει, θανατηφόρο φάρμακο, ούτε να δώσω ποτέ τέτοια συμβουλή. Ομοίως να μη δώσω ποτέ σε γυναίκα φάρμακο για ν' αποβάλει. Να διατηρήσω δε τη ζωή μου και την τέχνη μου καθαρή και αγνή. Και να μη χειρουργήσω πάσχοντες από λίθους αλλά ν' αφήσω την πράξη αυτή για τους ειδικούς. Και σ' όποια σπίτια κι αν μπω, να μπω για την ωφέλεια των πασχόντων αποφεύγοντας κάθε εκούσια αδικία και βλάβη και κάθε γενετήσια πράξη και με γυναίκες και με άνδρες, ελεύθερους και δούλους. Και ό,τι δω ή ακούσω κατά την άσκηση του επαγγέλματός μου, ή κι εκτός, για τη ζωή των ανθρώπων, που δεν πρέπει ποτέ να κοινοποιηθεί, να σιωπήσω και να το τηρήσω μυστικό. Αν τον όρκο μου αυτό τηρήσω πιστά και δεν τον αθετήσω, είτε ν' απολαύσω για πάντα την εκτίμηση όλων των ανθρώπων για τη ζωή μου και για την τέχνη μου, αν όμως παραβώ και αθετήσω τον όρκο μου να υποστώ τα αντίθετα από αυτά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ υποχρεωσή μου να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν στην εκπόνηση αυτής της Διδακτορικής Διατριβής.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέποντα της παρούσας Διατριβής Καθηγητή Χειρουργικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ κ. Μαρκόπουλο Χρήστο, για την υψηλοτάτου επιπέδου επιστημονική υποστήριξη για την εκπόνηση της Διατριβής, για την αρμονική συνεργασία αλλά και για την ειλικρινή ηθική υποστήριξη προς το πρόσωπό μου. Η εξαιρετική του ιατρική κατάρτιση, ο επαγγελματισμός του αλλά και ο μοναδικός του τρόπος να προσεγγίζει τους μαθητευόμενους τον καθιστούν για εμένα προσωπικά ως πρότυπο Ιατρού αλλά και Ανθρώπου.

Η συνεργασία μας αποτελεί για εμένα υπέρτατη τιμή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ.κ. Καθηγητές της τριμελούς Επιτροπής, την Καθηγήτρια Παθολογίας-Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών του ΕΚΠΑ κ. Γκόγκα Ελένη για την αμέριστη επιστημονική και ηθική συμπαράσταση, καθώς και τον Καθηγητή Πειραματικής Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής Αθηνών κ. Κουτσιλιέρη Μιχαήλ για την παραχώρηση του Εργαστηρίου του και για την επιστημονική του υποστήριξη για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διευθύντρια του Ενδοκρινολογικού Τμήματος Γ. Ν. Αθηνών «Κοργιαλένιο-Μπενάκειο» Ε. Ε. Σ. κ. Κώστογλου-Αθανασίου Ιφιγένεια για την επιστημονική υποστήριξη ιδιαίτερα στο κομμάτι της δημοσίευσης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υπεύθυνη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Παπαγεωργίου Ευσταθία για την άριστη επίβλεψη και την σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αφιερώνεται

Στη μνήμη της Αδερφής μου

ΛΙΝΑΣ

(φοιτήτρια Ιατρικής Αθηνών)

Και στους υπέροχους γονείς μου

Δημήτρη και Σταματίνα

που με στηρίζουν σε όλα μου τα βήματα

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**▪ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ**

1	Γενικά	9
2	Ατιολογία	9
3	Κληρονομικός Καρκίνος Μαστού	11
4	Παθολογοανατομική ταξινόμηση	13
5	Διαγνωστική προσπέλαση	17
6	Θεραπευτική αντιμετώπιση	23

▪ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

1	Σακχαρώδης Διαβήτης, μία παγκόσμια Ασθένεια	41
2	Ομοιοστατική γλυκόζη	42
3	Τύποι του Σακχαρώδη Διαβήτη	44
4	Πάγκρεας και έκκριση ινσουλίνης	46
5	Ρύθμιση της γλυκόζης	50
6	Δράση Οιστρογόνων - Συνέπειες στην ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα και Διαβήτης	53

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	68
2	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	69
2.1	Κυτταρικές καλλιέργειες και επίδραση με οιστραδιόλη	69
2.2	Απομόνωση του συνολικού RNA	76
2.3	Ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής αντίστροφης μεταγραφής πολυμεράσης με βάση τον πραγματικό χρόνο (qRT-PCR)	78
2.4	Απομόνωση της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης	85
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	95
3.1	Κυτταρικές καλλιέργειες	95
3.2	Απομόνωση συνολικού κυτταρικού RNA	97
3.3	qRT-PCR	98
3.4	Απομόνωση πρωτεΐνης	101
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	114
6	ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	115

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1. Γενικά

Ο καρκίνος του Μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος του γυναικείου πληθυσμού στις αναπτυγμένες χώρες του δυτικού κόσμου. Αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου των γυναικών από κακόηθες νεόπλασμα και τη πρώτη αιτία θανάτου στην ηλικία 40-49 ετών.

Καρκίνος του Μαστού μπορεί να εμφανισθεί πολύ σπάνια ακόμη και από τα τελευταία χρόνια της εφηβείας, κυρίως όμως μετά την ηλικία των 40 ετών και μετέπειτα η συχνότητα του αυξάνει αναλογικά με την ηλικία.

Στην Ελλάδα, η συχνότητα του έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια και αντιμετωπίζονται περί τις 6000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού κάθε χρόνο.

2. Αιτιολογία

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού παραμένει άγνωστη, αλλά έχουν εντοπισθεί αρκετοί προδιαθεσικοί παράγοντες της νόσου όπως η πρόωμη εμμηναρχή, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η ατεκνία, το θετικό οικογενειακό ιστορικό και όσον αφορά τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού, η εντόπιση γονιδιακών μεταλλάξεων BRCA 1 και BRCA 2.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να εμφανιστεί και στους άνδρες είναι όμως συχνότερος στις γυναίκες (♀:♂=100:1), όπου ο μαστός υφίσταται την επίδραση των ορμονών κατά την εφηβεία και κατά τη διάρκεια των ετών της εμμήνου ρύσεως.

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνει αναλογικά όσο μεγαλώνει η γυναίκα και εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες ηλικίας >50 ετών ενώ είναι σπάνιος σε ηλικίες <35 ετών με εξαίρεση τις γυναίκες που έχουν κληρονομική προδιαθεση.

Το θετικό οικογενειακό ιστορικό αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παραγοντα για την εμφάνιση καρκίνου μαστού. Όταν μια γυναίκα έχει μια συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο μαστού, σχεδόν διπλασιάζεται ο σχετικός κίνδυνος να αναπτύξει καρκίνο του μαστού και η ίδια. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το θετικό οικογενειακό ιστορικό είναι διαφορετικό από τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού που οφείλεται σε γενετική μετάλλαξη. Τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού τον υποπτευόμαστε όταν στο ιστορικό της γυναίκας υπάρχουν συγγενείς που εκδήλωσαν καρκίνο μαστού σε μικρή ηλικία, αμφοτερόπλευρα ή υπάρχει συγχρόνως και ιστορικό καρκίνου ωοθηκών.

Η πρόωμη εμμηναρχή, η πρόωμη εγκατάσταση κανονικής έμμηνου ρύσεως και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση βρέθηκε ότι αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ενώ η πρόωμη φυσιολογική ή χειρουργική εμμηνόπαυση ελαττώνουν τον κίνδυνο αυτό. Η πρώτη τελειόμηνη κύηση πριν απο την ηλικία των 20 ετών ελαττώνει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, ενώ η καθυστερημένη πρώτη τελειόμηνη κύηση και ιδιαίτερα μετά την ηλικία των 35 ετών τον αυξάνει. Οι μετέπειτα εγκυμοσύνες δεν επηρεάζουν τον κίνδυνο προσβολής απο τη νόσο. Σε μια μάλιστα μελέτη βρέθηκε προστατευτική επίδραση των πολλαπλών κυήσεων και ιδιαίτερα μετά την πέμπτη εγκυμοσύνη (Yuan et al 1988).

Όσον αφορά τα ορμονικά σκευάσματα, η χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών φαίνεται να αυξάνει ελαφρώς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες κατα το

χρόνο χρήσης τους ή λίγο μετά. Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης προσφέρει ανακούφιση απ τα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης έναντι της οστεοπόρωσης και αύξηση της προστατευτικής HDL χοληστερόλης έναντι της LDL. Ωστόσο, η μακροχρόνια χρήση της μετά την εμμηνόπαυση (>5 ετών) αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού. Ο αυξημένος αυτός κίνδυνος φαίνεται να εξαλείφεται δύο χρόνια μετά τη διακοπή της.

Τέλος, η παχυσαρκία, η κατανάλωση αλκοόλ καθώς και η καθιστική ζωή φαίνεται να λειτουργούν ως προδιαθεσικοί παράγοντες για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Αντίθετα, η τακτική, έντονη άσκηση κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρκίνου μαστού μίας γυναίκας, κυρίως διότι μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της έμμηνου ρύσεως, να επιμηκύνει το χρόνο μεταξύ των περιόδων ή να ελαττώσει τον αριθμό των εμμηνορρυσιακών κύκλων, μειώνοντας έτσι την έκθεση της γυναίκας στα οιστρογόνα.

3. Κληρονομικός Καρκίνος Μαστού

Μία σημαντική ανακάλυψη στην πρόοδο των ερευνών για τη γενετική βάση του καρκίνου του μαστού ήταν ο εντοπισμός το 1997 των ογκοκατασταλτικών γονιδίων BRCA 1 στο χρωμόσωμα 17 και BRCA 2 στο χρωμόσωμα 13, η μετάλλαξη στα οποία ενοχοποιείται για τον κληρονομικό καρκίνο του μαστού.

Στο 5% περίπου των γυναικών με καρκίνο του μαστού, ανευρίσκεται, μετά απο εξέταση γενετικού υλικού, μετάλλαξη στα γονίδια BRCA 1 ή 2, η οποία εκτός απο καρκίνο του μαστού, ενοχοποιείται και για την ανάπτυξη καρκίνου των ωοθηκών. Τέτοιες μεταλλάξεις ανευρίσκονται σε ποσοστό περίπου 10% των ασθενών

που αναπτύσσουν καρκίνο σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών και σε ακόμα μεγαλύτερο (30-40%) σε γυναίκες που έχουν συγχρόνως ιστορικό οικογενούς καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών.

Οι γυναίκες που πρέπει να υποβάλλονται σε γονιδιακή διερεύνηση για αυτές τις μεταλλάξεις, πρέπει να έχουν στο οικογενειακό ιστορικό τους τα κάτωθι κριτήρια:

- Τουλάχιστον 3 γυναίκες με καρκίνο μαστού, ανεξαρτήτου ηλικίας
- Τουλάχιστον 2 γυναίκες με καρκίνο μαστού, μία εκ των οποίων σε ηλικία <51 ετών
- Τουλάχιστον μια γυναίκα με καρκίνο μαστού και μία με καρκίνο ωοθηκών
- Τουλάχιστον μια γυναίκα με καρκίνο μαστού και καρκίνο ωοθηκών
- Τουλάχιστον 2 γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών
- Τουλάχιστον μία γυναίκα με αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού σε ηλικία <51 ετών
- Τουλάχιστον μία γυναίκα με καρκίνο μαστού σε ηλικία <36 ετών
- Τουλάχιστον έναν άνδρα με καρκίνο μαστού, καθώς και μία γυναίκα με καρκίνο μαστού ή ωοθηκών
- Καρκίνο μαστού στο ατομικό ιστορικό σε ηλικία <60ετών, ο οποίος triple negativ (μη ορμονοεξαρτώμενος και HER2-Receptor negativ) είναι
- Καρκίνος ωοθηκών στο ατομικό ιστορικό

Οι γυναίκες στις οποίες έχει ανιχθευθεί γονιδιακή μετάλλαξη των γονιδίων BRCA1 ή BRCA 2 εμφανίζουν κίνδυνο 60% να αναπτύξουν κατά τη διάρκεια της ζωής του καρκίνο μαστού. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου ωοθηκών για τις γυναίκες με

μετάλλαξη του γονιδίου BRCA 1 είναι περίπου 40-60% και για την μετάλλαξη του γονιδίου BRCA 2 είναι περίπου 20%.

Οι γυναίκες με μετάλλαξη αυτών των γονιδίων θεωρούνται πολύ υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου μαστού ή ωοθηκών και η τακτική αντιμετώπιση τους μπορεί να είναι: 1) αμφοτερόπλευρη προφυλακτική μαστεκτομή με σύγχρονη αποκατάσταση και ωοθηκεκτομή, 2) προφυλακτική χορήγηση αντι-οιστρογονικής αγωγής, ή 3) ένταξη σε πρόγραμμα εντατικού ελέγχου, ο οποίος περιλαμβάνει κλινική εξέταση και υπέρηχο μαστού και γυναικολογικό κάθε 6 μήνες από την ηλικία των 25 ετών, ετήσια μαγνητική μαστογραφία απ την ηλικία των 25 ετών, ετήσιος έλεγχος με ψηφιακή μαστογραφία απ την ηλικία των 40 ετών.

4. Παθολογοανατομική ταξινόμηση

Ιστολογικά διακρίνουμε τους ακόλουθους τύπους Καρκίνου:

A. Διηθητικά Καρκινώματα

1. Πορογενές διηθητικό καρκίνωμα

Αποτελεί την πιο συνηθισμένη (περίπου 85%) ιστολογική μορφή διηθητικού καρκίνου του μαστού και περιλαμβάνει μερικές σπάνιες διακριτές οντότητες, που αναγνωρίζονται ως ειδικοί τύποι (Μυελοειδές καρκίνωμα, θηλώδες καρκίνωμα, σωληνώδες, βλεννώδες ή κολλοειδές). Το σημαντικότερο όμως μέρος των περιπτώσεων του, χαρακτηρίζονται ως πορογενή διηθητικά καρκινώματα χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (NOS). Μακροσκοπικά

παρουσιάζουν συνήθως ασαφή όρια, αστεροειδή παρυφή, γκριζωπή χροιά και σκληρή σύσταση. Μπορεί να παρουσιάζουν θέσεις νέκρωσης, αιμορραγικής διήθησης ή κυστικής εκφύλισης και να διηθούν το υπερκείμενο δέρμα ή την υποκείμενη περιτονία και τους θωρακικούς μυς.

2. Λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα

Αποτελεί το 10-15% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Συχνά συνυπάρχει με πορογενές καρκίνωμα. Μπορεί να είναι πολυκεντρικό ενώ πολύ συχνά έχει σύγχρονη ή μετάχρονη αμφοτερόπλευρη εμφάνιση. Μικροσκοπικά τα κύτταρα είναι μικρά, με στρογγυλό πυρήνα και λίγες μιτώσεις και σχηματίζουν, στην κλασσική μορφή του διηθητικού λοβιακού καρκίνου, αλύσσους (Indian file pattern). Υπάρχουν και άλλες λιγότερο συχνές παραλλαγές, όπως αυτή στην οποία τα κύτταρα παίρνουν τη μορφή σφραγιστήρας δακτυλίου (Signet ring pattern).

3. Νόσος Paget

Η νόσος εκδηλώνεται ως εκζεματοειδής βλάβη, μετά συνοδού ορώδους εκκρίματος, και μπορεί να συνυπάρχει υποκείμενο διηθητικό καρκίνωμα αναγνωριζόμενο ως ψηλαφητή μάζα. Τα κύτταρα της νόσου Paget θεωρούνται κατα τη «μεταναστευτική θεωρία» κύτταρα αδενοκαρκινώματος του μαστού, τα οποία μεταναστεύουν εντός της επιδερμίδας της θηλής και της θηλαίας άνω από καρκίνωμα (διηθητικό ή μη διηθητικό) που προσβάλλει τους πόρους στο υποκείμενο μαζικό παρέγχυμα. Σε νεότερες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι σε μεγάλο ποσοστό (~50%) μπορεί να μην συνυπάρχει άλλο

καρκίνωμα σε κεντρική ή περιφερική θέση του μαστού και η νόσος Paget να εντοπίζεται μόνον στη θηλή.

4. Φλεγμονώδες Καρκίνωμα

Παρουσιάζεται κλινικά με τη μορφή οξείας φλεγμονής του μαστού, ανάλογη της οξείας μαστίτιδας. Η εικόνα αυτή δεν αποδίδεται σε φλεγμονή, αλλά σε διήθηση των λεμφαγγείων του δέρματος από καρκινικά κύτταρα. Το εκσεσημασμένο οίδημα καθιστά δυσχερή την ανεύρεση του υποκείμενου διηθητικού καρκίνου και η διάγνωση τίθεται ή δια βιοψίας δέρματος ή δια παρακεντήσεως/βιοψίας του όγκου, εφόσον είναι ψηλαφητός ή μαστογραφικά ελεγχόμενος. Αποτελεί το 1-2% περίπου των καρκίνων του μαστού. Ως αναγκαίο κριτήριο κλινικής διάγνωσης του θεωρείται η ερυθρότητα του δέρματος του μαστού τουλάχιστον στο ένα τρίτο αυτού. Πρόκειται για ιδιαίτερα κακοήθη κλινική μορφή, με κακή πρόγνωση, πολλή συχνή διήθηση επιχώριων λεμφαδένων και εμφάνιση γενικευμένης μεταστατικής νόσου σε πολλές περιπτώσεις.

B. Μη Διηθητικά (in situ) Καρκινώματα

Πρόκειται για νεοπλάσματα που προκύπτουν από πολλαπλασιασμό κακόηθων κυττάρων και αντικατάσταση από αυτά του φυσιολογικού επιθηλίου των πόρων ή των λοβιακών μονάδων, χωρίς να διηθείται η βασική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Προέρχονται από την τελική λοβιακή μονάδα του μαζικού ιστού.

Διακρίνονται σε πορογενή και λοβιακά με βάση τα χαρακτηριστικά των κακόηθων κυττάρων, την τοπογραφία τους και τις ιστολογικές δομές που σχηματίζουν.

1. Μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (DCIS-Ductal Carcinoma In Situ)

Αποτελεί την πιο συχνή μορφή μη διηθητικού καρκινώματος του μαστού και μπορεί να ανευρεθεί:

- ως μαστογραφικό εύρημα (συρρέουσες αποτιτανώσεις, σκίαση, αρχιτεκτονική διαταραχή του παρεγχύματος του μαζικού αδένου)
- ως τυχαίο ιστολογικό εύρημα σε τεμάχιο βιοψίας και σπανιότερα
- λόγω κλινικών ευρημάτων, όπως ψηλαφητή μάζα, έκκριση θηλής κ.α.

Το DCIS χαρακτηρίζεται από σημαντική πιθανότητα (>20%) τοπικής υποτροπής, συνήθως ως διηθητικό καρκίνωμα, που οφείλεται κυρίως σε υπολειμματικές μικροσκοπικές εστίες της νόσου στο τμήμα του μαστού που παραμένει μετά από συντηρητική επέμβαση ευρείας εκτομής και διατήρησης του μαστού, χωρίς την προσθήκη ακτινοβολίας. Η χρήση τοπικής ακτινοθεραπείας περιορίζει σημαντικά τον κίνδυνο της τοπικής υποτροπής (<6%).

2. Μη διηθητικό λοβιακό Καρκίνωμα (LCIS- Lobular Carcinoma In Situ)

Αποτελείται από ομοιόμορφα κακοήθη κύτταρα με βαθυχρωματικούς πυρήνες, χωρίς σημαντική ατυπία και μιτωτική δραστηριότητα, τα οποία πληρούν τον αυλό των λοβιακών μονάδων και μικρών λοβιακών πόρων.

Πρόκειται για πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου, λοβιακού ή πορογενούς (δεκαπλάσιος σχετικός κίνδυνος), που αφορά και στους δύο μαστούς. Η πρόγνωσή του δεν

εξαρτάται απο το μέγεθός του, ενώ μπορεί να είναι πολυκεντρικό ή και αμφοτερόπλευρο νεόπλασμα.

5. Διαγνωστική προσπέλαση

Η διαγνωστική διαδικασία ψηλαφητού όγκου του μαστού περιλαμβάνει το ιστορικό, την κλινική εξέταση, το υπερηχογράφημα, τη μαστογραφία, την κυτταρολογική εξέταση υλικού παρακέντησης με λεπτή βελόνη (FNA) ή/και την ιστολογική εξέταση υλικού βιοψίας με κόπτουσα βελόνη (Core biopsy).

1. Ιστορικό

Η ασθενής θα πρέπει να ερωτηθεί για κάθε σύμπτωμα που αναφέρεται στους μαστούς της και κυρίως για τυχόν σκληρίες, πόνο ή οίδημα πρίν απο την περίοδο, έκκριμα από τη θηλή ή αλλαγές που έχει παρατηρήσει όπως για παράδειγμα πρόσφατη εισολκή ή εξέλκωση της θηλής. Σημαντικά στοιχεία επίσης απο το ιστορικό αποτελούν η ηλικία έναρξης της έμμηνου ρύσεως, η ηλικία της πρώτης τελειόμηνου κήσεως, η λήψη αντισυλληπτικών ή άλλων ορμονικών σκευασμάτων, η ηλικία εμμηνόπαυσης καθώς και το οικογενειακό ιστορικό.

2. Επισκόπηση

Της κλινικής εξέτασης προηγείται η επισκόπηση των μαστών. Η ασθενής κάθεται απέναντι απ τον εξεταστή γυμνή από τη μέση και

πάνω, και παρατηρούμε τους μαστούς για ασυμμετρία, εμφανείς μάζες, οίδημα, ερυθρότητα, εισολκή ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή της θηλής. Στη συνέχεια, αφού τοποθετήσει η ασθενής τα χέρια της πρώτα επάνω και πίσω από το κεφάλι και κατόπιν, ζητώντας της να πιέσει με τα χέρια γύρω από τη μέση της, προκαλώντας σύσπαση των μυών, ελέγχουμε εάν υπάρχει καθήλωση του αδένου στο θωρακικό τοίχωμα.

3. Ψηλάφηση

Μετά την επισκόπηση ακολουθεί η ψηλάφηση του μαστού. Οι μαστοί εξετάζονται με την παλαμιαία επιφάνεια των δαχτύλων και των δύο χεριών, με ήπιες κινήσεις, εξασκώντας ελαφρά πίεση. Η ψηλάφηση γίνεται με κυκλικές κινήσεις που αρχίζουν από την περιφέρεια, κατευθύνονται προς το κέντρο, προσέχοντας να καλυφθεί όλος ο μαστός, από την ουρά μέχρι τη θηλή. Ιδιαίτερα ψηλαφάται η μασχάλη, ελέγχοντας για τυχόν παθολογικά διογκωμένους λεμφαδένες.

4. Υπερηχογραφικός έλεγχος

Χρησιμοποιείται κυρίως στις νεαρές γυναίκες για λόγους αποφυγής ακτινοβολίας, χαμηλής αξιοπιστίας της μαστογραφίας σε νεαρές ηλικίες που οφείλεται στη μεγάλη πυκνότητα του μαστού και μικρής πιθανότητας κακοήθειας. Παλαιότερα είχε κυρίως εφαρμογή στο διαχωρισμό συμπαγών από κυστικές διογκώσεις και την απεικόνιση του περιγράμματος των ογκόμορφων αλλοιώσεων, ενώ σήμερα, με τη βοήθεια της ελαστογραφίας - εκτίμηση σκληρότητας του όγκου - και της μελέτης αιμάτωσης των αλλοιώσεων, μπορεί να βοηθήσει

σημαντικά στην διάγνωση κακοήθειας. Επίσης ο υπέρηχος χρησιμεύει στην καθοδήγηση χειρισμών όπως η παρακέντηση κύστης ή η βιοψία όγκου, στην περίπτωση απεικόνισης ευρημάτων στη μαστογραφία που δεν εντοπίζονται κλινικά κατά την ψηλάφηση. Ο υπέρηχος πλεονεκτεί των άλλων απεικονιστικών μεθόδων στο γεγονός ότι δεν επιβαρύνει την ασθενή με ακτινοβολία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε νεαρές γυναίκες και σε εγκύους και έχει χαμηλό κόστος, αλλά δεν είναι σε καμία περίπτωση ακριβέστερη μέθοδος από την μαστογραφία και δεν μπορεί να την αντικαταστήσει.

5. Μαστογραφία

Πρόκειται για ειδική ακτινογραφία του μαστού. Σκοπός της μαστογραφίας είναι, εκτός από την ενίσχυση της κλινικής διαγνώσης όταν υπάρχει ψηλαφητό εύρημα, η ανάδειξη άλλων εστιών καρκίνου και μη ψηλαφητών όγκων με τη μορφή αποτιτανώσεων, αλλοίωσης της αρχιτεκτονικής του μαζικού αδένα ή σκιάσεων μικρού μεγέθους ή στο βάθος του μαστού.

Η μαστογραφία πρέπει να "διαβάζεται" πάντοτε συγκριτικά, τόσο σε σχέση με παλαιότερες προηγούμενων ετών, όσο και συγκρίνοντας τον έναν με τον άλλον μαστό, διότι οι μαστοί συνήθως παρουσιάζουν συμμετρική ανάπτυξη.

Το American College of Radiology (ACR) έχει θεσπίσει το σύστημα BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Database System) για να κωδικοποιήσει τη διαγνωστική του Καρκίνου του Μαστού από τους Ακτινοδιαγνώστες στην καθημερινή πράξη.

Κατάταξη κατά BI-RADS:

0	Ανεπαρκής απεικόνιση	<i>Απαραίτητη η επανάληψη της εξέτασης ή πρόσθετη απεικονιστική εκτίμηση.</i>
1	Αρνητική για κακοήθεια	<i>Επανάλεγχος στα πλαίσια του ελέγχου (screening).</i>
2	Καλοήθεια	<i>Μάζα σαφώς καλοήθης. Επανάλεγχος στα πλαίσια του ελέγχου (screening).</i>
3	Πιθανώς καλοήθεια	<i>Ευρήματα με πιθανότητα >98% για καλοήθεια. Επανάλεγχος σε 6 μήνες.</i>
4	Ύποπτη αλλοίωση	<i>Εύρημα με πιθανότητα κακοήθειας (3-94%). Πιθανή ανάγκη για βιοψία.</i>
5	Υψηλή υποψία κακοήθειας	<i>Αλλοίωση με >95% πιθανότητα για κακοήθεια.</i>
6	Αποδεδειγμένη από βιοψία κακοήθεια	<i>Έλεγχος στα πλαίσια της θεραπείας για αποδεδειγμένο από βιοψία καρκίνο του μαστού.</i>

Επιπλέον, το **Στάδιο 4** υπόκειται σε περαιτέρω διαχωρισμό σε 4A, 4B και 4C, με χαμηλή, μέτρια και υψηλή πιθανότητα για κακοήθεια αντίστοιχα.

- **στο στάδιο 4A** περιλαμβάνονται ψηλαφητές μάζες με υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά ινοαδενώματος, επιλεγμένες κύστεις ή ακόμα και αποστήματα και συστήνεται επανάλεγχος στους 6 μήνες.
- **στο στάδιο 4B** υπάρχει υποψία πως θα χρειαστεί και βιοψία ενώ

- **στο στάδιο 4C** περιλαμβάνονται εικόνες που κατά πάσα πιθανότητα θα μεταπέσουν σε BI-RADS 5.

6. Βιοψία Μαστού

Είναι η εξέταση στο μικροσκόπιο του ιστού ή του ογκιδίου που αφαιρείται από τον ιατρό. Υπάρχουν διάφοροι τύποι (μέθοδοι) βιοψιών μαστού. Τα αποτελέσματα της βιοψίας, είναι αυτά που θα καθορίσουν αν χρειάζεται περαιτέρω θεραπευτική αντιμετώπιση.

Οι τύποι βιοψιών, περιλαμβάνουν:

1. Βιοψία με λεπτή βελόνη / Fine-Needle Aspiration Cytology (FNAC): Είναι ο πιο απλός τύπος βιοψίας που χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει αλλοιώσεις που εντοπίστηκαν κατά τη εξέταση. Είναι ένας γρήγορος τρόπος για να ξεχωρίσει μια κύστη γεμάτη υγρό, από μια συμπαγή μάζα. Λαμβάνονται κύτταρα και όχι κομμάτι ιστού, μέσω μιας μικρής βελόνας (τύπου αιμοληψίας) και σύριγγας. Μπορεί επίσης να ληφθεί υλικό για να σταλεί για καλλιέργεια.

2. Βιοψία με κόπτουσα βελόνη/ Core needle biopsy: Αυτός είναι ο προτιμώμενος σήμερα τρόπος βιοψίας για να αξιολογηθεί μια μάζα μαστού που εντοπίστηκε στη μαστογραφία, στον υπέρηχο ή κατά τη ψηλάφηση. Η ιστολογική εξέταση υλικού είναι ακριβέστερη από τη κυτταρολογική της FNAC και μας δίνει επιπλέον την ευχέρεια περαιτέρω ανάλυσης (ER, PR, HER2) στη περίπτωση κακοήθειας, διευκολύνοντας τους θεραπευτικούς χειρισμούς. Ο χειρουργός ή ο ακτινολόγος, χρησιμοποιώντας μια κοίλη, κόπτουσα βελόνη, λαμβάνει κομμάτια ιστού (συνήθως 4-5 κύλινδροι ιστού), και το

αποστέλει για ιστολογική εξέταση. Στη περίπτωση «αψηλάφητης αλλοίωσης» η βιοψία αυτή μπορεί να γίνει με υπερηχογραφική καθοδήγηση (U/S guided Core biopsy).

3. Στερεοτακτική βιοψία: Αυτός ο τύπος βιοψίας, χρησιμοποιεί το μηχάνημα του μαστογράφου για να εντοπίσει ακριβώς την ύποπτη αλλοίωση, η οποία είναι ορατή μόνο στη μαστογραφία (π.χ. επασβεστώσεις) και όχι σε υπέρηχο ή στη ψηλάφηση. Για αυτή τη βιοψία, το στήθος με την ύποπτη αλλοίωση θα τοποθετηθεί στο μαστογράφο, μέχρι ο ακτινολόγος να εντοπίσει τις συντεταγμένες της βλάβης. Ακολουθεί τοπική αναισθησία και λήψη κομματιών ιστού με βελόνα και σύστημα κενού (vacuum probe).

4. Ανοικτή βιοψία: Σε ορισμένες περιπτώσεις έντονης κλινικής υποψίας, παρά τα «αρνητικά» αποτελέσματα των προηγούμενων μεθόδων, διενεργείται στο χειρουργείο, με τοπική ή γενική αναισθησία, εξαίρεση της ύποπτης περιοχής. Αν η μάζα δεν είναι ψηλαφητή, ο ακτινολόγος θα εντοπίσει την αλλοίωση (στον υπέρηχο ή το μαστογράφο) αμέσως πριν το χειρουργείο και θα τοποθετήσει ειδικό σύρμα – οδηγό εντός αυτής (hook wire), ώστε να καθοδηγήσει τον χειρουργό στην ανεύρεση και αφαίρεση του ευρήματος.

6. Θεραπευτική αντιμετώπιση του Καρκίνου του Μαστού

A. Χειρουργική αντιμετώπιση

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού τις περισσότερες φορές αρχίζει με τη χειρουργική αντιμετώπιση. Αυτή μπορεί να συνίσταται στην αφαίρεση ολόκληρου του μαστού (μαστεκτομή) ή στην εξαίρεση μόνο του προσβεβλημένου τμήματος του μαστού μαζί με ένα περιθώριο υγιούς ιστού που περιβάλλει τον όγκο (ογκεκτομή / ευρεία εκτομή / επέμβαση διατήρησης μαστού). Στη περίπτωση διηθητικού καρκίνου, συνήθως στον ίδιο χρόνο με την εγχείρηση επί του μαστού πραγματοποιείται και επέμβαση διερεύνησης στους λεμφαδένες της σύστοιχης μασχάλης. Αυτή μπορεί να είναι είτε βιοψία του φρουρού λεμφαδένα (SLNB – Sentinel Lymph Node Biopsy) σε ασθενείς με «αρνητική» κλινικά μαχάλη, είτε πλήρης λεμφαδενικός καθαρισμός στη περίπτωση κλινικά διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων.

Η διατήρηση του μαστού και η αποφυγή της μαστεκτομής είναι πάντα προτιμητέα εφόσον τουτο είναι ογκολογικά ασφαλές. Βασικοί παράγοντες που θα καθορίσουν την απόφαση προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση είναι:

1. **Το μέγεθος του όγκου.** Τα κλασικά συγγράμματα αναφέρουν ότι όγκοι με μέγιστη διάμετρο 4 εκατοστά ή μεγαλύτερη θα πρέπει να αφαιρούνται με μαστεκτομή. Στην πραγματικότητα όμως σημασία έχει το σχετικό μέγεθος του όγκου σε σχέση με το μέγεθος του μαστού, η ακριβή θέση του όγκου εντός του αδένα κλπ. Σήμερα με τις προηγμένες ογκοπλαστικές τεχνικές, είναι δυνατή η ασφαλής εξαίρεση μεγαλύτερων όγκων με ταυτόχρονη διατήρηση του μαστού και καλό αισθητικό αποτέλεσμα.

2. *Πολλαπλές εστίες* καρκίνου στον ίδιο μαστό (πολυεστιακός ή πολυκεντρικός καρκίνος μαστού).

3. *Γυναίκες με πολύ αυξημένο κίνδυνο* να αναπτύξουν και δεύτερο καρκίνο στον υπόλοιπο αδένα, συνήθως λόγω βεβαρυμένου οικογενειακού ιστορικού ή φορείς μεταλλαγμένων γονιδίων BRCA.

3. *Επιθυμία της ασθενούς.*

4. *Αδυναμία μετεγχειρητικής ακτινοβολήσης* του μαστού για κοινωνικούς ή ιατρικούς λόγους (πχ προηγηθείσα ακτινοβολία για νόσο Hodgkin)

Υπάρχουν πολλές σημαντικές ιατρικές μελέτες που επιβεβαιώνουν την ογκολογική ισοδυναμία των δύο μεθόδων: η μακροχρόνια (10ετής) επιβίωση ασθενών που υποβλήθηκαν είτε σε συντηρητική εκτομή είτε σε μαστεκτομή είναι η ίδια. Ακόμα, υπάρχουν μελέτες που επιβεβαιώνουν ότι η πιθανότητα τοπικής υποτροπής είναι επίσης περίπου η ίδια. Να σημειωθεί ωστόσο ότι με ελάχιστες εξαιρέσεις, η συντηρητική εκτομή ακολουθείται από ακτινοβολήση του εναπομείναντος μαστού μετεγχειρητικά.

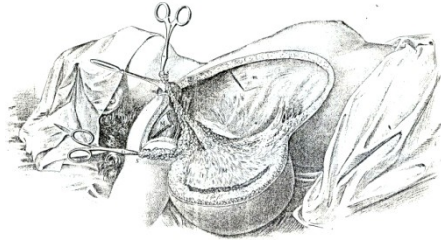
Αναλυτικότερα διακρίνονται οι παρακάτω χειρουργικές επεμβάσεις:

Βιοψία (Excisional Biopsy) και Ευρεία τοπική εκτομή (Wide Local Excision): Αφαιρείται μόνο ο μακροσκοπικός όγκος εξ' ολοκλήρου και επι υγιών ορίων. Η τεχνική αυτή είναι ισοδύναμη της ογκεκτομής και τα τελευταία χρόνια έχει αντικατασταθεί από την "ευρεία τοπική εκτομή". Στην ευρεία εκτομή αφαιρείται ο όγκος με ένα υγιές τμήμα μαστού τουλάχιστον 2εκ γύρω απ' αυτόν.

Μερική μαστεκτομή: Σε αυτή τη μέθοδο αφαιρείται ένα μεγαλύτερο μέρος του στήθους σε σχέση με τον ογκεκτομή, ίσως

ολόκληρο τμήμα ή τεταρτημόριο του μαστού, ώστε να περιοριστεί ο καρκίνος.

Ολική μαστεκτομή (ή απλή): Με τη μέθοδο αυτή αφαιρούνται ο μαστός, το υπερκείμενο δέρμα και το σύμπλεγμα θηλής – άλω



Κλασσική Ριζική Μαστεκτομή:

Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Halsted το 1894 και περιλαμβάνει την εκτομή όλου του

μαζικού αδένου, του περιεχόμενου της μασχάλης και του μείζονος και ελάσσονος θωρακικού (Halsted WS, 1894,1898). Σήμερα εφαρμόζεται σπάνια και μόνο σε όγκους του οπισθίου τμήματος του μαστού, με εκτεταμένη διήθηση του μείζονος ή/και ελάσσονος θωρακικού μυός.

Τροποποιημένη Ριζική Μαστεκτομή: Αυτή η εγχείρηση περιγράφηκε από τον Patey το 1950 και είναι όμοια της κλασσικής ριζικής μαστεκτομής του Halsted, αλλά με διατήρηση του μείζονος θωρακικού μυός. Η προσπέλαση της κορυφής της μασχάλης επιτυγχάνεται με τη διατομή του ελάσσονος θωρακικού μυός, κοντά στην πρόσφυσή του στην κορακοειδή απόφυση. Τροποποίηση της επέμβασης αποτελεί η αφαίρεση του ελάσσονος θωρακικού μυός, με σκοπό τον καλύτερο καθαρισμό των λεμφαδένων της μασχάλης, περιλαμβανομένων και αυτών που βρίσκονται μεταξύ των θωρακικών μυών (λεμφαδένες του Rotter) (Patey DH, Dyson WH, 1948).

Μαστεκτομή με διατήρηση δέρματος (Skin-Sparing Mastectomy): Σε αυτή την εγχείρηση αφαιρείται το σύμπλεγμα θηλής-άλω, όλος ο μαζικός αδένας μαζί με το περιεχόμενο της μασχάλης, διατηρείται όμως μεγάλο τμήμα του υπερκείμενου δέρματος του στήθους και απαιτείται μόνον ένα μικρό μόσχευμα για

να καλυφθεί το έλλειμμα της περιοχής θηλής-άλω. Η αποκατάσταση γίνεται με μυοδερματικό κρημνό (LD ή TRAM) ή πρόθεση σιλικόνης και το αισθητικό αποτέλεσμα μπορεί να είναι πολύ καλό, λόγω διατήρησης του φυσιολογικού σχήματος του μαστού και ιδιαίτερα της υπομαστική πτυχής- αναδίπλωσης στη βάση του στήθους (Cady B et al 1993, Cady B. 1998).

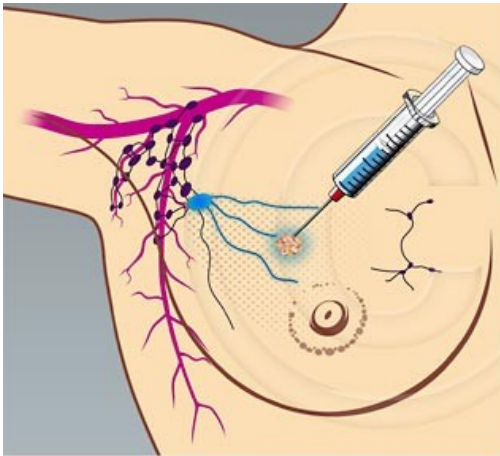
Υποδόριος Μαστεκτομή (Subcutaneous Mastectomy): Κατά την υποδόριο μαστεκτομή το υπερκείμενο δέρμα αποχωρίζεται από το μαστό και αφαιρείται όσο το δυνατόν περισσότερος μαζικός αδένας έως και την "ουρά" του μαστού (ουρά του Spence). Παραμένει ένα μικρό τμήμα αδενικού ιστού κάτω από το σύμπλεγμα θηλής-άλω, με σκοπό να διαφυλαχθεί η αιμάτωση της θηλής και να αποφευχθεί τυχόν νέκρωση.

Η σύγχρονη αποκατάσταση από την οποία συνοδεύεται, γίνεται συνήθως με την τοποθέτηση μίας μόνιμης πρόθεσης σιλικόνης μέσα στο χώρο που δημιουργείται κάτω από το μείζονα θωρακικό μύ, ο οποίος παρασκευάζεται και κινητοποιείται κατάλληλα Όσον αφορά τις ενδείξεις της υποδόριας μαστεκτομής εξακολουθεί να υπάρχει σχετική διαφωνία στο χώρο της ογκολογίας. Αρκετοί υποστηρίζουν ότι δεν έχει θέση στην θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένου και του DCIS. Μεγαλύτερη συμφωνία υπάρχει στην ένδειξη της ως "προφυλακτικής" επέμβασης σε γυναίκες πολύ υψηλού κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου μαστού (λοβιακό *in situ* νεόπλασμα, ατυπία και ισχυρό οικογενειακό καρκίνου, ιστορικό λοβιακού καρκίνου μαστού στον άλλο μαστό, ύπαρξη μεταλλάξεων BRCA 1, 2, ή συνδυασμός των ανωτέρω). Ακόμη όμως και στην τελευταία περίπτωση αρκετοί αντιπροτείνουν την απλή μαστεκτομή με σύγχρονη αποκατάσταση για πληρέστερο προφυλακτικό αποτέλεσμα.

Βιοψία λεμφαδένα φρουρού

Πρόκειται για την αφαίρεση ενός ή πολύ λίγων λεμφαδένων από τη μασχάλη (συνήθως λιγότερων από 4). Η εγχείρηση αυτή πραγματοποιείται όταν δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι λεμφαδένες έχουν επηρεαστεί. Όταν το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης επιβεβαιώσει ότι οι λεμφαδένες είναι καθαροί, δε χρειάζεται πλήρης καθαρισμός, ο οποίος ως γνωστόν μπορεί να συνδέεται με επιπλοκές (κυρίως λεμφοίδημα).

Η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα είναι μια μοντέρνα επέμβαση με ελάχιστες επιπλοκές για την ασθενή. Το βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες επιπλοκές σε γυναίκες που μπορούν να αποφύγουν τον πλήρη λεμφαδενικό καθαρισμό.



Για την πραγματοποίηση της βιοψίας του φρουρού λεμφαδένα είναι απαραίτητη η αναγνώρισή του. Ο χειρουργός θα πρέπει να αναγνωρίσει ποιόν από τους 15-40 λεμφαδένες της μασχάλης είναι αυτός που πρέπει να αφαιρεθεί. Αυτό

διεθνώς πραγματοποιείται είτε με την ένεση ραδιενεργού ισοτόπου (Tc^{99m} - ραδιενεργό τεχνήτιο) είτε μπλέ χρωστικής κάτω από το δέρμα του μαστού άμεσα προεγχειρητικά ή ακόμη το συνδυασμό των δύο (με τη λεγόμενη διπλή τεχνική) (Beechey-Newman, 1998). Στη συνέχεια, διεγχειρητικά ανευρίσκεται ο σωστός λεμφαδένας καθώς είναι αυτός που θα έχει προσλάβει το ραδιενεργό υλικό (και θα

ανιχνεύεται με τη χρήση κατάλληλου οργάνου) ή/και την χρωστική (που θα τον χρωματίσει μπλε).

Εγχειρήσεις αποκατάστασης μετά απο Ματεκτομή

Η αποκατάσταση του μαστού μετά απο ολική αφαίρεση του γίνεται κυρίως με δύο τρόπους: είτε με τη χρήση διατατήρα ιστών (tissue expander) (Argenta LC, 1984) είτε με τη χρησιμοποίηση μυοδερματικών κρημνών (Schefflan M., Dinner M. 1983, Rainsbury R. M., 2002).

Στην πρώτη περίπτωση, διατείνεται το δέρμα της περιοχής απο ένα "μπαλόνη"(διατατή πρόθεση) που τοποθετείται κάτω απο το μείζονα θωρακικό μύ. Η διάταση έως το επιθυμητό αλλά και εφικτό μέγεθος, επιτυγχάνεται με τη σταδιακή ένεση ορού μέσα στη διατατή πρόθεση μέσω μιας βαλβίδας που τοποθετείται υποδορίως. Σε δεύτερο χρόνο γίνεται αφαίρεση του διατατήρα με τη βαλβίδα του και η τοποθέτηση αντίστοιχου μεγέθους προθέματος σιλικόνης. Μπορεί όμως να τοποθετηθεί και ειδική πρόθεση (διατατή πρόθεση Becker) που αποτελείται από ένα σταθερού μεγέθους τμήμα με σιλικόνη και ένα διατεινόμενο που πληρούται με ορό, από την οποία, όταν φτάσει το επιθυμητό μέγεθος, αφαιρείται μόνο η βαλβίδα και δεν χρειάζεται δεύτερη εγχείρηση για να αποκατασταθεί. Επιπρόσθετα, συνήθως χρειάζεται και αισθητική επέμβαση στον άλλο μαστό (σμίκρυνση, ανόρθωση) για την επίτευξη συμμετρίας ως προς το μέγεθος. Σημαντικότερη επιπλοκή της μεθόδου είναι η ανάπτυξη ρικνωτικής κάψας με αποτέλεσμα ασυμμετρία, πόνο ή και απόρριψη της πρόθεσης.

Στη δεύτερη περίπτωση, το έλλειμμα της μαστεκτομής αποκαθίσταται με τη μεταφορά κρημνού δέρματος - υποδορίου

λίπους - μύς με την αγγείωσή του και συνήθως χρησιμοποιείται ο πλατύς ραχιαίος ή ο ορθός κοιλιακός μυς. Αρκετές φορές, όταν χρησιμοποιείται ο πλατύς ραχιαίος μύς, θα χρειαστεί επίσης η τοποθέτηση μικρού προθέματος σιλικόνης για την επίτευξη του επιθυμητού μεγέθους και συνήθως η αισθητική επέμβαση σμίκρυνσης και ανόρθωσης του άλλου μαστού για την επίτευξη συμμετρίας.

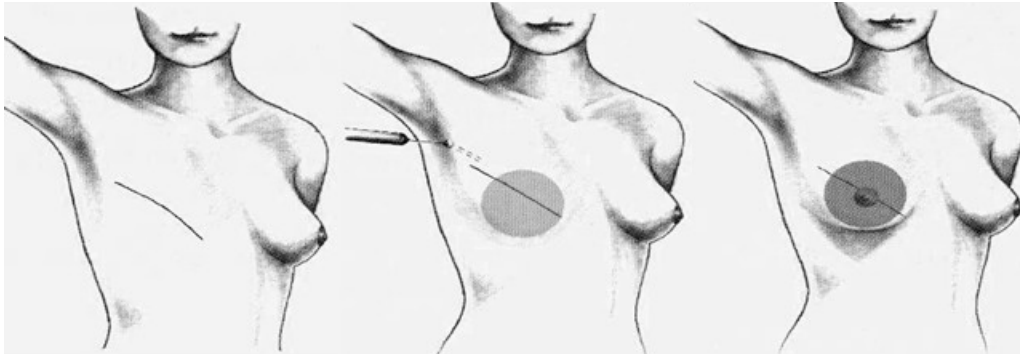
Τελευταία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί μια παραλλαγή της τεχνικής αποκατάστασης με τον πλατύ ραχιαίο μύ (μικρο-κρημνός, Latissimus dorsi mini-flap), κατά την οποία, στον ίδιο χρόνο με την αντιμετώπιση του όγκου λαμβάνεται τμήμα από το πλατύ ραχιαίο μυ μαζί με το υποδόριο λίπος αλλά χωρίς το υπερκείμενο δέρμα και η οποία χρησιμοποιείται για την πλήρωση του ελλείμματος που δημιουργείται κατά την εκτέλεση της μερικής μαστεκτομής.

Η αποκατάσταση του συμπλέγματος θηλής-άλω και στις δύο παραπάνω μεθόδους, μπορεί να γίνει με πολλές τεχνικές, στον ίδιο χειρουργικό χρόνο ή και αργότερα.

Η επιλογή της μίας από τις δύο μεθόδους αποκατάστασης του μαστού, εξαρτάται από σωματομετρικούς παράγοντες της κάθε ασθενούς και θα πρέπει να γίνεται γνωστό στην ασθενή ότι αρκετές φορές θα χρειασθεί να υποβληθεί σε μικρές συμπληρωματικές διορθωτικές επεμβάσεις για διόρθωση και βελτίωση του αποτελέσματος.

Ατενδείξεις για την αποκατάσταση με μυοδερματικούς κρημνούς αποτελεί η μεγάλη ηλικία της ασθενούς με τυχόν προβλήματα στη μικροκυκλοφορία, η διαβητική αγγειοπάθεια και το κάπνισμα που έχουν σχέση με την καλή αιμάτωση και βιωσιμότητα του κρημνού.

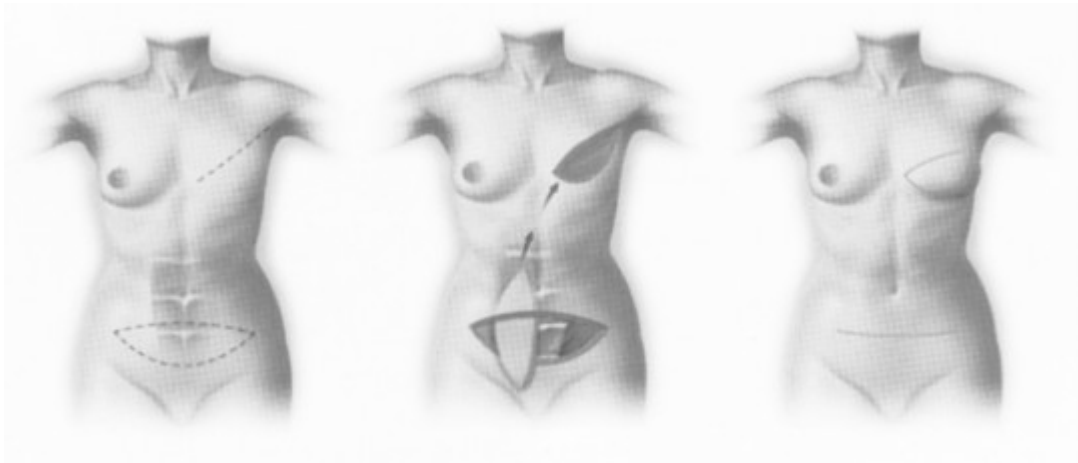
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΜΑΣΤΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΑΣΤΕΚΤΟΜΗ



Αποκατάσταση μαστού με τοποθέτηση διατατήρα ιστών
και προθέματος σιλικόνης



Αποκατάσταση μαστού με μυοδερματικό κρημνό – πλατύς ραχιαίος
(LD flap)



Αποκατάσταση μαστού με μυοδερματικό κρημνό – ορθός κοιλιακός
(TRAM flap)

B. Χημειοθεραπεία

Έχει αποδειχθεί ότι, εκτός από τη χειρουργική αντιμετώπιση, η συστηματική χορήγηση συνδυασμού - σχήματος φαρμάκων ελαττώνει την πιθανότητα υποτροπής της νόσου κατά την πρώτη δεκαετία και αυξάνει τη συνολική επιβίωση.

Η Χημειοθεραπεία χορηγείται μετά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου (επικουρική χημειοθεραπεία) ή πριν από την διεξαγωγή του χειρουργείου (νεοεπικουρική χημειοθεραπεία) σε ειδικές περιπτώσεις (τοπικά προχωρημένη νόσος, φλεγμονώδης καρκίνος, τριπλά αρνητικοί όγκοι, HER2 θετικοί όγκοι).

Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σχημα είναι 4xEC (Epirubicin-Cyclofosamid ανα τρεις βδομαδες) και 12xPaclitaxel (εβδομαδιαία χορήγηση).

Σε περιπτώσεις που ο όγκος είναι θετικός στην έκφραση του HER2 τότε απαιτείται συνδυασμός χημειοθεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα (Trastuzumab, Perjeta).

Γ. Ακτινοθεραπεία

Η Ακτινοθεραπεία είναι ένα σπουδαίο μέσον αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού. Οι συντηρητικές χειρουργικές επεμβάσεις με διατήρηση του μαστού δεν θα είχαν καθιερωθεί χωρίς τη βοήθεια της ακτινοθεραπείας για τον έλεγχο της τοπικής υποτροπής (Veronesi et al 1981, Fisher et al 1995). Η συνεχής τεχνολογική εξέλιξη οδήγησε στη σημαντική ελάττωση των παρενεργειών της ακτινοβολίας και τη βελτίωση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Η θεραπεία γίνεται τμηματικά για 6 εβδομάδες, κάθε μέρα, 5 φορές την εβδομάδα. Η ακτινοβολία γίνεται με ηλεκτρόνια, μονάδα Κοβαλτίου ή με γραμμικό επιταχυντή σε δόση 4600-5000 cGy συνολικά και 1000cGy ζπιπλέον (boost) στη θέση του όγκου (tumor bed) στην περίπτωση ευρείας ογκεκτομής και διατήρησης του μαστού (Lichter et al, 1992).

Γενικά, οι ασθενείς που αντιμετωπίζονται με ευρεία τοπική εκτομή ή τεταρτεκτομή, λαμβάνουν μετεγχειρητικά ακτινοβολία στο μαστό και όταν συνοδεύονται από διηθημένους λεμφαδένες και κυρίως με διήθηση σε περισσότερους των 3 λεμφαδένων ή εξωκαψική διήθηση και του μασχαλιαίου λίπους, τότε ακτινοβολείται και η μασχάλη, η υπερκλείδιος περιοχή και μερικές φορές, ανάλογα με τη θέση του όγκου, η ομόπλευρος παραστερνική περιοχή (Ragaz et al 1997).

Πρέπει να τονισθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία ελαττώνει τις τοπικές υποτροπές, αλλά είναι αμφίβολο εάν αυξάνει και την επιβίωση.

Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται επίσης στις περιπτώσεις τοπικής υποτροπής στο θωρακικό τοίχωμα ή στους λεμφαδένες στη μασχαλιαία κοιλότητα, αλλά και επί εγκεφαλικών και οστικών μεταστάσεων, δευτεροπαθών εντοπίσεων στο νωτιαίο μυελό, το μεσοθωράκιο και αλλού.

Συνοπτικά οι ενδείξεις ακτινοθεραπείας είναι:

- ογκεκτομή ή τεταρτεκτομή και διατήρηση του μαστού
- τοπικά προχωρημένος όγκος (T3 και T4)
- υπολειμματική νόσος στην\ περιοχή του θωρακικού τοιχώματος μετά από μαστεκτομή και όταν δεν υπάρχει δυνατότητα πλήρους χειρουργικής αφαίρεσης

- διηθημένοι περιοχικοί λεμφαδένες
- υπολειμματική νόσος στην μασχαλιαία χώρα μετά από λεμφαδενικό καθαρισμό
- εγκεφαλικές μεταστάσεις
- οστικές μεταστάσεις όταν υπάρχουν έντονα συμπτώματα ή κίνδυνος κατάγματος λόγω μεταστάσεων
- ορισμένες περιπτώσεις μετά από μαστεκτομή ειδικά σε μεγάλους όγκους με συνυπάρχοντες παράγοντες κινδύνου (G3, L1)

Παρά την σημαντική βελτίωση των μέσων και των τεχνικών, η Ακτινοθεραπεία εξακολουθεί να έχει παρενέργειες (γενική αδυναμία, κούραση κατά τη διάρκεια της θεραπείας) και επιπλοκές που διακρίνονται σε οξείες-άμεσες και απότερες. Στις οξείες περιλαμβάνονται η φλεγμονή, η υπέρχρωση, το έγκαυμα του δέρματος και το ήπιο άλγος στο μαστό. Οι απότερες επιπλοκές έχουν να κάνουν με ευαισθησία, σκληρία και οίδημα στο μαστό, κάταγμα των πλευρών, περικαρδίτιδα, πνευμονίτιδα, οίδημα άνω άκρου και παράλυση βραχιονίου πλέγματος.

Δ. Ορμονοθεραπεία

Η ανακάλυψη των ορμονικών υποδοχέων σε κύτταρα καρκίνου του μαστού έδωσε νέα ώθηση για πιο συστηματική προσέγγιση αυτής της μορφής θεραπείας της νόσου (Μαρκόπουλος 1993).

Ο οιστρογονικός υποδοχέας (estrogen receptor - ER) είναι μια πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους που ενώ αρχικά εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα, νεώτερες ενδείξεις τον τοποθετούν πλέον σταθερά συνδεδεμένο στον κυτταρικό πυρήνα.

Ένα πιθανό μοντέλο δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων σε κυτταρικό επίπεδο, περιλαμβάνει αρχικά την μέσω διαπίδυσης είσοδό τους από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως την ένωσή τους με ελεύθερο ER. Στη συνέχεια, ο υποδοχέας διέρχεται μια διαδικασία ενεργοποίησης που οδηγεί σε ένα μετασχηματισμό σταθεροποίησης του συμπλέγματος οιστρογόνου-υποδοχέα. Η επίδραση του ενεργοποιημένου αυτού συμπλέγματος στο γονίδιο διεγείρει την διαδικασία μεταγραφής, μετάφρασης και τελικά αναδιπλασιασμού, που έχει σαν αποτέλεσμα τη διαίρεση του κυττάρου και τον πολλαπλασιασμό του. Σύμφωνα με μερικές ενδείξεις, το οιστρογονικό αυτό αποτέλεσμα δεν επιτυγχάνεται άμεσα αλλά έμμεσα, με την αναπαραγωγή των ER και ενός παράγοντα ανάπτυξης (Growth Factor-GF) που δίνει το τελικό ερέθισμα του πολλαπλασιασμού. Μέσω αυτού του μηχανισμού, τα οιστρογόνα οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των ER-θετικών καρκινικών κυττάρων, ενώ τα ER-αρνητικά κύτταρα αναπτύσσονται αυτόνομα, δια συνεχούς παραγωγή παραγόντων ανάπτυξης, ανεξάρτητα από ορμονικά ερεθίσματα.

Όσον αφορά τον προγεστερονικό υποδοχέα (Progesterone Receptor-PgR) έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση του ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και μάλλον η παρουσία του στον καρκίνο του μαστού υποδηλώνει κυρίως μια ισχυρή οιστρογονική επίδραση και έναν ενεργό ER.

Στα ορμονοευαίσθητα κύτταρα, τόσο τα οιστρογόνα όσο και η προγεστερόνη προκαλούν την παραγωγή των παραγόντων ανάπτυξης TGF α και EGF που ερεθίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ περιορίζουν την παραγωγή του ανασταλτικού για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων TGF β . Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ενός κοινού υποδοχέα για τους TGF α και EGF, τον EGFR

(Epidermal Growth Factor Receptor). Ίσως έτσι εξηγείται το γεγονός ότι η αυτόνομη παραγωγή του EGFR χαρακτηρίζει τα μη ορμονοευαίσθητα κύτταρα και οι καρκίνοι που έχουν υψηλή έκφραση αυτού του υποδοχέα είναι χειρότερης πρόγνωσης.

Σήμερα έχουμε στη διάθεσή μας αρκετές μεθόδους ανίχνευσης και μέτρησης των ορμονικών υποδοχέων σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα ή τμήματα του όγκου από καρκίνο μαστού (Markopoulos et al 1988). Οι δύο πλέον χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η βιοχημική-DCC και η ανοσο-κυτταρολογική – ICA.

Παρά τον εντοπισμό και άλλων υποδοχέων στα κύτταρα του μαστού (υποδοχείς ινσουλίνης, παραγόντων ανάπτυξης κ.α.) οι δύο πλέον χρησιμοποιούμενοι υποδοχείς στην κλινική πράξη είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων ER και ο υποδοχέας προγεστερόνης PgR.

Η κατάσταση των οιστρογονικών υποδοχέων του όγκου σχετίζεται με την ηλικία και την εμμηνορρυσιακή κατάσταση της ασθενούς. Οι ER θετικοί όγκοι είναι πιο συχνόι στις μετεμμηνοπαυσιακές από ότι στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ άνω του 80% των όγκων σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 75 ετών είναι θετικοί στους υποδοχείς οιστρογόνων.

Όσον αφορά τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου, η παρουσία θετικών τιμών του ER συνδέεται με λιγότερο ‘επιθετικούς’ όγκους, υπό την έννοια της υψηλής διαφοροποίησης των κυττάρων και των χαμηλών δεικτών πολλαπλασιασμού.

Περίπου 50% των ασθενών με καρκίνο του μαστού που οι όγκοι τους εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς, θα ανταποκριθούν σε ορμονικούς χειρισμούς, σε αντίθεση με τις ασθενείς με όγκους αρνητικούς σε οιστρογονικούς υποδοχείς που η πιθανότητα ανταπόκρισης σε ορμονικούς χειρισμούς είναι μικρότερη του 10%. Οι ασθενείς με θετικούς και τους δύο υποδοχείς έχουν την

υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης σε ορμονικούς χειρισμούς (75%), ενώ σε όγκους αρνητικούς και για τους δύο υποδοχείς αυτή η πιθανότητα είναι ελάχιστη. Επιπρόσθετα, η πιθανότητα ανταπόκρισης αυξάνει αναλογικά και με την αύξηση της ποσοτικής ή της ποιοτικής έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων του όγκου. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι, οι μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού σε υψηλό ποσοστό (έως και 80%) όσον αφορά τους οιστρογονικούς υποδοχείς και σε μικρότερο τους προγεστερονικούς, παρουσιάζουν την ίδια κατάσταση υποδοχέων με τον πρωτοπαθή όγκο και ότι οι ER θετικοί όγκοι προσβάλλουν συχνότερα τα οστά, σε αντίθεση με τους ER αρνητικούς που οι μεταστάσεις τους εντοπίζονται συχνότερα στο ήπαρ. Οι παρατηρήσεις αυτές εξηγούν και την υψηλή πιθανότητα ανταπόκρισης σε περαιτέρω ορμονικούς χειρισμούς των μεταστάσεων που αναπτύσσονται σε ασθενείς που είχαν ER θετικό πρωτοπαθή όγκο.

1. Ορμονοθεραπεία με Ταμοξιφένη

Μια από τις σπουδαιότερες προόδους στην ορμονική θεραπεία ήταν η παρασκευή μη στεροειδών ουσιών, που ανταγωνίζονται τη δράση των οιστρογόνων. Η πλέον συχνά χρησιμοποιούμενη τέτοια ουσία είναι η Ταμοξιφένη, που ανταγωνίζεται την οιστραδιόλη στη δέσμευση με τον οιστρογονικό υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων, ενώ συγχρόνως, σε κυτταρικό επίπεδο, προάγει την παραγωγή του ανασταλτικού για τον πολλαπλασιασμό παράγοντα ανάπτυξης TGFβ. Αποτέλεσμα είναι η επιβράδυνση της κυτταρικής διαίρεσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου.

Οι παρενέργειες της Ταμοξιφένης είναι συνήθως ήπιες (Jackson et al, 1987). Σε μικρό ποσοστό παρατηρούνται εξάψεις, αιμορραγία απο τον κόλπο ή αμηνόρροια και δεν επιφέρει καταστολή του μυελού των οστών. Η μακροχρόνια χορήγηση ταμοξιφένης επίσης ελαττώνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου στον άλλο μαστό, προστατεύει από καρδιαγγειακά επεισόδια (αλλάζοντας ευνοικά το λιπιδαιμικό προφίλ των ασθενών) και προλαμβάνει την οστεοπόρωση, έχει όμως παρατηρηθεί ελαφρά αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου σε ασθενείς που λαμβάνουν ταμοξιφένη.

Η Ταμοξιφένη μπορεί να χορηγηθεί σε όλες τις γυναίκες με ER θετικούς όγκους (προ- και μετεμμηνοπαυσιακές) με ημερήσια δόση 20mg για 5-10 χρόνια. Η χορήγηση ταμοξιφένης ελαττώνει κατά 30% τον αριθμό των υποτροπών και θανάτων από τη νόσο στην πρώτη 5ετία, που αντιστοιχεί με ελάττωση της ολικής θνησιμότητας κατά 8-10% (The ATAC Trialist Group).

2. Ορμονοθεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης

Η αρωματάση είναι ένα ένζυμο που ανιχνεύεται στην περιφέρεια (ήπαρ, μυϊκός και κυρίως λιπώδης ιστός) και είναι απαραίτητη για την μετατροπή των πρόδρομων επινεφριδιακών ουσιών (DHEA, DHEA-S και 4-dione) σε οιστρογόνα. Έχει όμως επίσης ανιχνευθεί στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού και υπολογίζεται ότι ανω του 70% των καρκίνων του μαστού έχουν τη δυνατότητα αρωματοποίησης.

Στοχεύοντας στην αναστολή αυτού του τρόπου παραγωγής οιστρογόνων και επομένως στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των οιστρογόνο-εξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων, η ανάπτυξη αναστολέων της αρωματάσης γνώρισε ταχεία πρόοδο και σήμερα

βρισκόμαστε στην τρίτη γενιά στεροειδών (exemestane) και μη στεροειδών αναστολέων αρωματάσης (anastrozole, letrozole).

Οι αναστολείς της αρωματάσης αναστέλλουν την περιφερειακή παραγωγή οιστρογόνων αποκλείοντας την εξωτερική τροφοδότηση των καρκινικών κυττάρων και επίσης αναστέλλουν την ενδοκυττάρια παραγωγή οιστρογόνων, εμποδίζοντας το καρκινικό κύτταρο να παράγει τα δικά του, ενδοκυττάρια οιστρογόνα.

Η εφαρμογή των αναστολέων του ενζύμου επικεντρώνεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στις οποίες η βασική παραγωγή οιστρογόνων προέρχεται από την εκτός ωοθηκών μετατροπή της επινεφριδιακής ανδροστενδίωνης σε οιστρόνη.

Οι μη στεροειδείς αναστολείς της αρωματάσης (αναστραζόλη και λετροζόλη) όπως και οι νεότεροι στεροειδείς αναστολείς (φορμεστάνη και εξεμαστάνη) πλεονεκτούν σε σύγκριση με τον παλαιότερο αναστολέα αμινογλουτεθιμίδη, διότι διατηρούν την ανασταλτική δράση στην αρωματάση χωρίς να αναστέλλουν την επινεφριδιακή σύνθεση στεροειδών (κάτι που έκανε η αμινογλουτεθιμίδη και απαιτούσε τη σύγχρονη χορήγηση κορτιζόνης) και έτσι έχουν λιγότερες παρενέργειες.

Οι αναστολείς της αρωματάσης έχουν αποδειχθεί ότι υπερτερούν έναντι της Ταμοξιφένης στην αντιμετώπιση του ορμονοευαίσθητου, τοπικά προχωρημένου καρκίνου του μαστού και της μεταστατικής νόσου σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς και αποτελούν σήμερα την θεραπεία εκλογής πρώτης γραμμής. Ακόμη, φαίνεται ότι επίσης υπερτερούν και ως συμπληρωματική θεραπεία στις μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με ορμονοευαίσθητο, πρώιμο καρκίνο του μαστού (The ATAC Trialist Group).

Επιπλέον στη χορήγηση των αναστολέων της αρωματάσης ως επικουρικής θεραπείας, υπάρχουν σήμερα δεδομένα που πείθουν ότι

μετά απο 5 χρόνια χορήγησης Ταμοξιφένης, η χορήγηση Λετροζόλης παρατείνει το ελεύθερο νόσου χρονικό διάστημα και ειδικά σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες και τη συνολική επιβίωση. Αντίστοιχα, καλά αποτελέσματα φαίνεται να προκύπτουν όταν η Ταμοξιφένη αντικαθίσταται μετά από χορήγηση 2-3 ετών από την Εξεμεστάνη ή την Αναστραζόλη (Coombes RC et al, 2004).

Τέλος, η χορήγηση αναστολέων αρωματάσης, όταν γίνεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ορμονοευαίσθητο καρκίνο μαστού, ελαττώνει την επίπτωση εμφάνισης διηθητικού και μη διηθητικού καρκίνου στον ετερόπλευρο μαστό σε μαγαλύτερο βαθμό απ' ότι η Ταμοξιφένη, ενώ δεν αυξάνει την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του ενδομητρίου όπως η τελευταία.

Ο τρόπος δράσης των αναστολέων αρωματάσης - παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων - έχει οδηγήσει σε προβληματισμό σε σχέση με τις μακροχρόνιες επιπτώσεις στον οργανισμό των ασθενών της αποστέρησης των οιστρογόνων και κυρίως αναφορικά με τη καρδιαγγειακή νόσο, την αλλαγή του λιπιδαιμικού προφίλ και της ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη, οστεοπόρωσης και οστικών καταγμάτων.

3. Ορμονοθεραπεία με Ανάλογα του υποθαλαμικού εκλυτικού παράγοντα των γοναδοτροπινών

Συνδέονται με τον αντίστοιχο υποδοχέα στην υπόφυση και προκαλούν αρχικώς αύξηση και στη συνέχεια μείωση των γοναδοτροπινών με αποτέλεσμα τη διακοπή της σύνθεσης οιστρογόνων από τις ωοθήκες.

Έχουν αντικαταστήσει την χειρουργική ωοθηκεκτομή στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και τα πλέον χρησιμοποιούμενα ανάλογα LHRH είναι: buserelin, leuprolide και Goserelin.

Χορηγούνται στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στην ορμονική θεραπεία, σε συνδυασμό με Ταμοξιφένη ή Αναστολείς Αρωματάσης. Επίσης θεωρείται ότι έχουν προστατευτική δράση στην ωοθηκική λειτουργία όταν χορηγούνται παράλληλα με την χημειοθεραπευτική αγωγή και εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της χορήγησης χημειοθεραπείας σε προ-εμμηνοπαυσιακές ασθενείς με σκοπό τη διατήρηση της γονιμότητας.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες των ουσιών αυτών είναι παρόμοιες με τα συμπτώματα της κλιμακτηρίου, καθώς στην ουσία η χορήγησή τους οδηγεί σε τεχνητή εμμηνόπαυση. Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι: εξάψεις, εφιδρώσεις, ξηρότητα στο επιθήλιο του κόλπου, πονοκέφαλοι, κατάθλιψη. Η μακρά θεραπεία μπορεί να προκαλέσει και οστεοπόρωση, για αυτό και απαιτείται συχνή παρακολούθηση της οστικής πυκνότητας.

B. Εισαγωγή στο Σακχαρώδη Διαβήτη

1. Σακχαρώδης Διαβήτης, μία παγκόσμια ασθένεια.

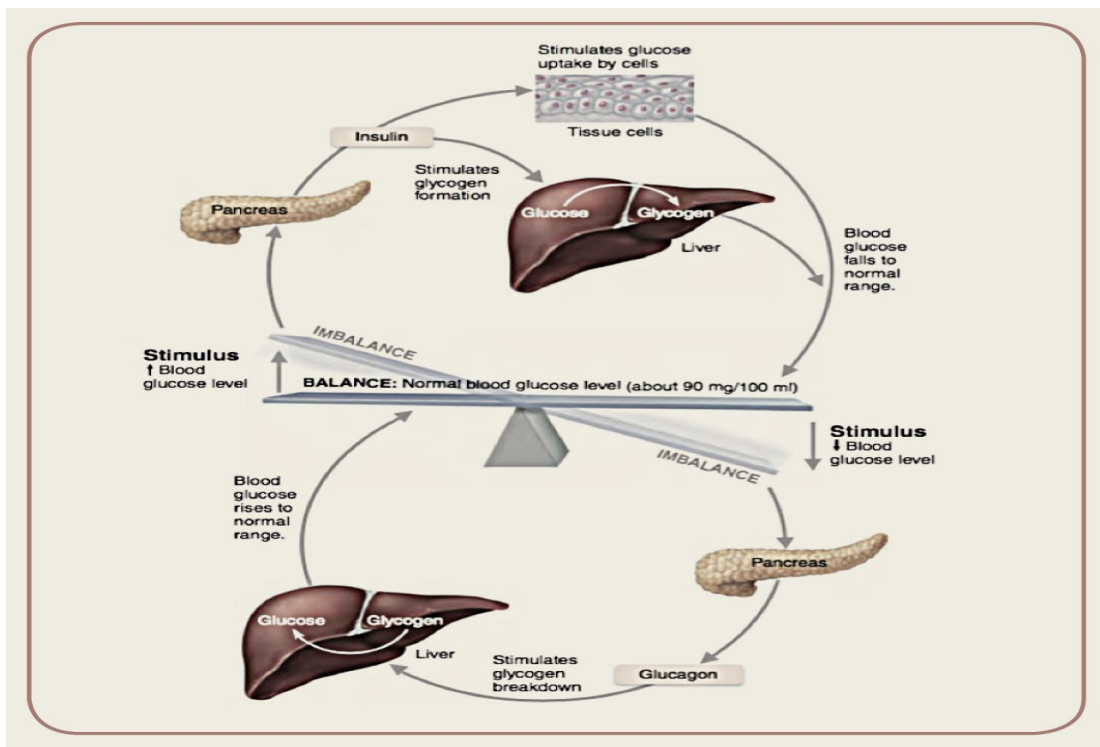
Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (DM) τείνει σίγουρα να γίνει μία από τις μεγαλύτερες και πιο προκλητικές ασθένειες παγκοσμίως, με τον αριθμό των προσβεβλημένων ανθρώπων να υπολογίζεται περίπου στα 415 εκατομμύρια (Kapur, Schmidt and Barcel, 2015). Θεωρείται σαν μία ομάδα από μεταβολικές διαταραχές, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο (Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010). Τα ανώμαλα επίπεδα γλυκόζης προκύπτουν από τις διαταραχές στην ομοίωση της γλυκόζης. Μία ομοιοστατική διαδικασία που στοχεύει στο να συντηρούνται τα επίπεδα γλυκόζης σε φυσιολογικό εύρος (Szablewski, 2011). Τα πρώιμα συμπτώματα της ασθένειας περιλαμβάνουν την πολυφαγία, πολυουρία, πολυδιψία, τα οποία είναι ενδείξεις αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Kang et al., 2014). Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μία μεταβολική ασθένεια, που σχετίζεται με αυξημένη θνησιμότητα, εξαιτίας των επιζήμιων επιπτώσεων σε διάφορα όργανα και ιστούς συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του νευρικού συστήματος, των ματιών, της καρδιάς, του εγκεφάλου (Barrow, Machando and Gustafsson, 2006). Αυτά τα συμπτώματα προκύπτουν από τη δυσανεξία στη γλυκόζη και τις καταστροφικές επιπτώσεις που έχει η υψηλή γλυκόζη στο αίμα και στα αγγεία του σώματος και τα κύτταρα γενικότερα (Szablewski, 2011).

2. Ομοιοστατική γλυκόζη

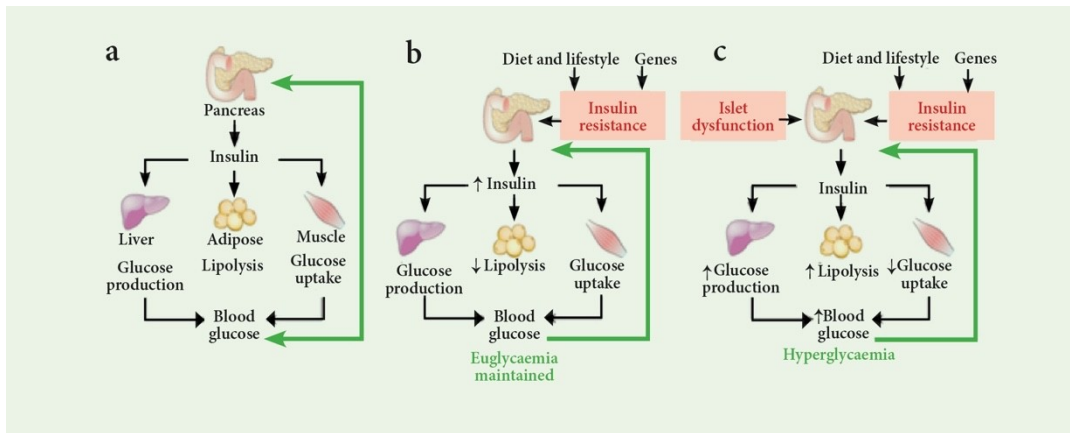
Όπως σε κάθε ομοιοστατικό μηχανισμό, του οποίου ο ρόλος είναι να διατηρήσει ένα σταθερό εσωτερικό περιβάλλον ανεξάρτητα από τις εξωτερικές συνθήκες, ο σκοπός του ομοιοστατικού μηχανισμού της γλυκόζης είναι η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα μέσα σ' ένα ακριβές εύρος και η συνεχής παροχή των κυττάρων με ενέργεια, ανεξάρτητα από την κατανάλωση τροφής (Szablewski, 2011). Η ομοιόσταση της γλυκόζης είναι ένας περίπλοκος μηχανισμός, ο οποίος συμπεριλαμβάνει την έντονη επικοινωνία πολλών διαφορετικών περιφερειακών οργάνων (ήπαρ, μυες, εγκέφαλος και άλλα) με το πάγκρεας και την εμπλοκή πολλών ρυθμιστικών μορίων όπως η ινσουλίνη, το γλυκογόνο και άλλες ορμόνες (Nadal et al., 2009) (Szablewski, 2011) (Rosen and Spiegelman, 2006). Μετά το γεύμα, υπάρχει μία αύξηση στα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών, ανάμεσα στα οποία η γλυκόζη είναι το πιο σημαντικό. Το αυξημένο επίπεδο γλυκόζης είναι ο κύριος παράγοντας που διεγείρει τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος να εκκρίνουν ινσουλίνη, τη μόνη ορμόνη του σώματος με την ικανότητα να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα με το να μεταφέρει γλυκόζη στα κύτταρα για εφοδιασμό ενέργειας (Nadal et al., 2009) (Aronoff et al., 2004). Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης ξεκινούν να πέφτουν, επειδή περισσότερη γλυκόζη καταναλώνεται, η παραγωγή ινσουλίνης καταστέλλεται. Σ' αυτή τη περίπτωση και όταν δεν υπάρχει επιπλέον κατανάλωση τροφής (κατάστατη νηστείας), οι ορμόνες της υπεργλυκαιμίας, όπως η επινεφρίνη, τα κορτικοστεροειδή, η αυξητική ορμόνη, η θυροξίνη διεγείρονται και ενεργούν ως αντιροπιστικός μηχανισμός (Nadal et al., 2009) (Marieb and Hoehn, 2013). Η διέγερση αυτών των αντιροπιστικών ορμονών, διεγείρει την έκκριση γλυκαγόνου (από το πάγκρεας) του οποίου η δράση προκαλεί την παραγωγή ηπατικής γλυκόζης, η οποία

συντελεί στην έμμεση έκκριση ινσουλίνης και συνεπώς προωθεί την είσοδο γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος και την περαιτέρω μεταφορά της στα κύτταρα. Η έκκριση ινσουλίνης, στην κυκλοφορία του αίματος σταματά την παραγωγή γλυκόζης με την καταστολή της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Με αυτό τον τρόπο διατηρείται η ισορροπία της γλυκόζης (Nadal et al., 2009; Marieb and Hoehn, 2013; Aronoff et al., 2004).

Γράφημα 1.1 (Marieb and Hoehn, 2013): Σχηματική απεικόνιση των δράσεων της ινσουλίνης και του γλυκαγόνου στην ομοίωση της γλυκόζης.



Γράφημα 1.2 (Schwartz et al., 2013): Μοντέλο ομαλής και μη ομοίωσης γλυκόζης στο πάγκρεας



3. Τύποι του Σακχαρώδη Διαβήτη

Μιας και η ινσουλίνη διαδραματίζει τον κύριο ρόλο στον έλεγχο της γλυκόζης στο αίμα, μία διαταραχή στη δράση της, όπως η ανικανότητα των κυττάρων να ανταποκριθούν στην δράση της ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη) ή μία διαταραχή στη βιοσύνθεση της μπορεί να οδηγήσει στην εκδήλωση μίας ομάδας μεταβολικών διαταραχών, τον Σακχαρώδη Διαβήτη (Dean and McEntyre, 2004).

Η πλειψηφία των διαβητικών περιπτώσεων εμπίπτουν σε δύο κύριες κατηγορίες; Ο τύπου 1 διαβήτη (T1D) και ο τύπου 2 διαβήτη (T2D). Ο Διαβήτης τύπου 1 αντιστοιχεί μόνο στο 5-10% των ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη και είναι αποτέλεσμα αυτοάνοσης καταστροφής των παγκρεατικών βήτα κυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος επιτίθεται στο πάγκρεας. Καθώς ο αριθμός των λειτουργικών βήτα κυττάρων μειώνεται, ο ρυθμός της παραγωγής και έκκρισης ινσουλίνης μειώνεται επίσης, μέχρι που να υπάρχει λίγη ή καθόλου έκκριση ινσουλίνης (Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010) (Marieb and Hoehn,

2013). Από την άλλη πλευρά, στην περίπτωση T2D, που είναι ο επικρατέστερος τύπος και αντιστοιχεί σε 90-95% των περιπτώσεων DM, η ινσουλίνη είναι παρούσα, αλλά η δράση της είναι ανεπαρκής, είτε επειδή τα επίπεδα της είναι χαμηλά είτε εξαιτίας της αντίστασης στην ινσουλίνη (αποτυχία των κυττάρων να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη). Σε πολλές περιπτώσεις οι ασθενείς με T2D παρουσιάζουν διαταραχή και στη έκκριση ινσουλίνης αλλά και στην δράση της (Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010) (Dean and McEntyre, 2004) (Marieb and Hoehn, 2013).

Η αιτιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη (τύπου 1 και 2) αποτελείται από μία αλληλεπίδραση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο T1 τύπος έχει ισχυρή γενετική βάση, και ένας αριθμός από κληρονομικά γονίδια που σχετίζονται με την ασθένεια έχουν εντοπισθεί, τα πιο σημαντικά από τα οποία περιλαμβάνουν το γονίδιο της ινσουλίνης, όπως επίσης τα HLA, PTPN22, IL2RA, CTLA-4 γονίδια. Παρ'όλα αυτά, η κλινική εκδήλωση της ασθένειας υποκινείται από άλλους παράγοντες, οι οποίοι δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητοί. Περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις ή τα συστατικά του φαγητού, πιστεύεται ότι εκλύουν αυτοανοσία (Van Belle, Coppieters and Von Herrath, 2011; Daneman, 2006).

Η αιτιολογία του T2 διαβήτη είναι πιο περίπλοκη, επειδή περισσότεροι παράγοντες από τον αριθμό των βήτα κυττάρων μπορεί να συμβάλλουν στην εμφάνισή του. Παρ'όλα αυτά, υπάρχουν ισχυρά γενετικά και περιβαλλοντικά στοιχεία που οδηγούν στην εμφάνιση της ασθένειας (Olakoba, Obateru and Olakoba, 2012). Για παράδειγμα, ο T2 διαβήτης έχει συσχετισθεί με την παχυσαρκία, που συνδέεται και με τις διατροφικές συνήθειες και με τη γενετική. Η αυξημένη όρεξη, η υπερφαγία και η συσσώρευση λίπους προκαλούν

αντίσταση στην ινσουλίνη σε κάποιο βαθμό, ακόμα κι αν κάποιες φορές στην αρχή της ασθένειας υπάρχει υπερέκκριση ινσουλίνης. Επιπλέον, υπάρχουν γονίδια που επειδή ελέγχουν την όρεξη, την ενεργειακή δαπάνη και την κατανομή λίπους έχουν συσχετισθεί με το διαβήτη (Szoke and Gerich, 2005; Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010). Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν, συμπεριλαμβάνουν καταστάσεις συνδεδεμένες με την βιοσύνθεση και έκκριση ινσουλίνης όπως ενδοκρινοπάθειες, ενδοκρινικές ανισορροπίες ή μεταλλάξεις στα γονίδια των ομοιοστατικών παραγόντων γλυκόζης Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010 Obateru and Olakoba, 2012). Επίσης, υπάρχουν και άλλοι τύποι διαβήτη, αλλά είναι σπάνιοι. Παραδείγματα περιλαμβάνουν διαβήτη κύησης, διαβήτη που προκαλείται από φάρμακα ή χημικά (που θεωρείται υπότυπος του τύπου 2), ιδιοπαθής διαβήτης (που θεωρείται υπότυπος του τύπου 1) και κάποιοι άλλοι συσχετισμένοι με μετάλλαξη (Αμερικανική Ένωση Διαβητολόγων, 2010) (Olakoba, Obateru and Olakoba,2012).

4. Πάγκρεας και έκκριση ινσουλίνης

1. Η λειτουργία του παγκρέατος

Η ενδοκρινής λειτουργία του παγκρέατος στην ομοίωση της γλυκόζης είναι κεντρικής σημασίας. Γύρω στο 1-2% της μάζας του παγκρέατος αποτελείται από νησίδες του Langerhans, οι οποίες είναι ομάδες εξωκρινών κυττάρων, διασκορπισμένα μέσα στο όργανο. Υπάρχουν περίπου 1.000.000 νησίδες ανά πάγκρεας, και κάθε μία περιέχει από 1.000 μέχρι 3.000 κύτταρα (Marieb and Hoehn, 2013)

(Nadal et al., 2009). Αυτά τα κύτταρα είναι από τέσσερις βασικούς τύπους, άλφα (α-κύτταρα), βήτα (β-κύτταρα), δέλτα (δ-κύτταρα) και PP κύτταρα. Τα περισσότερα είναι τα β-κύτταρα και τα α-κύτταρα, που παράγουν και εκκρίνουν τις ορμόνες ινσουλίνης και γλυκαγόνου αντίστοιχα, οι οποίες είναι κύριοι παράγοντες στο να διατηρούν τα επίπεδα γλυκόζης σε ισορροπία. Τα δέλτα κύτταρα παράγουν την ορμόνη σωματοστατίνη, της οποίας ο ρόλος είναι να αναστείλλει την παραγωγή και ελευθέρωση του γλυκαγόνου και της ινσουλίνης, και τα PP κύτταρα, τα οποία παράγουν την ορμόνη του παγκρεατικού πολυπεπτιδίου (Marieb and Hoehn, 2013). Εκτός από αυτούς τους κύριους τύπους κυττάρων, υπάρχουν και τα κύτταρα έψιλον (ε-κύτταρα) τα οποία παράγουν γρελίνη και τα οποία εντοπίστηκαν πρόσφατα (Nadal, et al., 2009 Marieb and Hoehn, 2013).

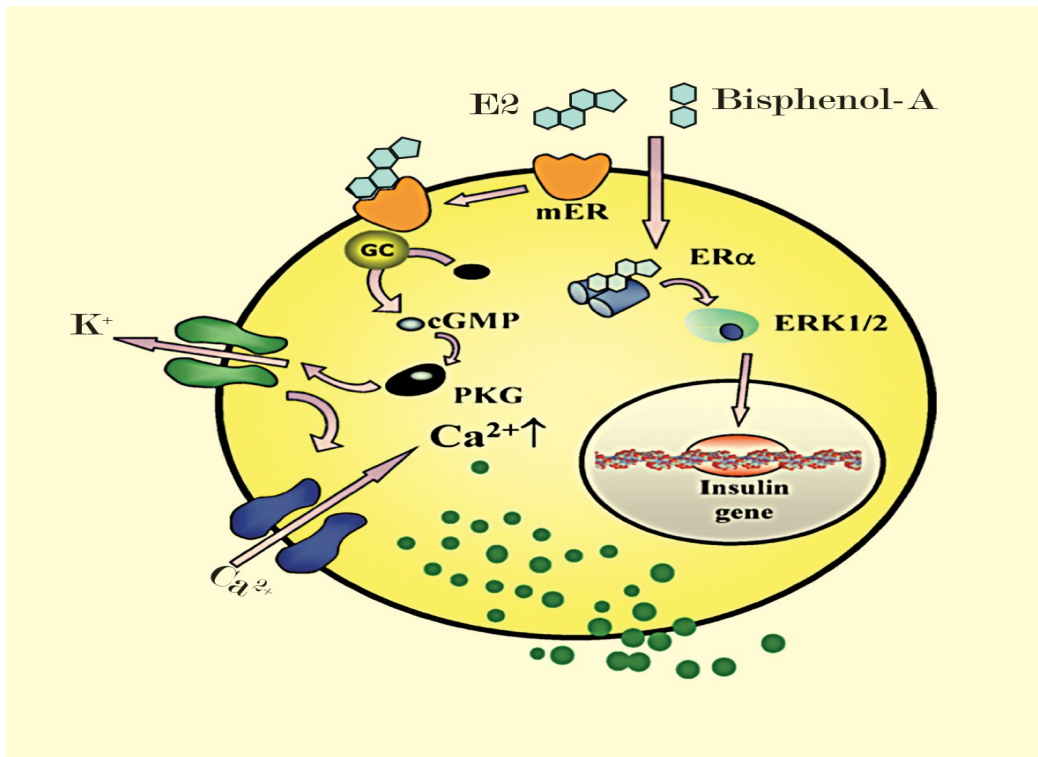
Όπως προαναφέρθηκε η κύρια λειτουργία των β-κυττάρων είναι η σύνθεση και η έκκριση ινσουλίνης, η οποία συνδέεται με το μεταβολισμό της γλυκόζης και την ανάπτυξη Σακχαρώδη Διαβήτη. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης ελέγχεται από την μετάφραση του αντιγράφου της προ-ινσουλίνης σε απάντηση της γρήγορης έκθεσης στην γλυκόζη ή από την μεταγραφή του γονιδίου της ινσουλίνης μετά από εκτεταμένη έκθεση γλυκόζης. Ο ρυθμός της βιοσύνθεσης της ινσουλίνης επηρεάζεται σημαντικά από τα θρεπτικά συστατικά, τους νευροδιαβιβαστές και άλλες ορμόνες (Nadal et al., 2009) (Szablewski, 2011).

2. Ηλεκτρική δραστηριότητα και εκκριτική απόκριση των β-κυττάρων

Τα παγκρεατικά β-κύτταρα παράγουν ηλεκτρικά ερεθίσματα ως απάντηση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης. Η ηλεκτρική δραστηριότητα αυτών των ηλεκτρικά ευερέθιστων κυττάρων, καθορίζει την εκκριτική τους απόκριση (Nadal et al., 2009). Το μοτίβο της ηλεκτρικής δραστηριότητας των β-κυττάρων αποτελείται από περιόδους ερεθισμάτων που υποκινούν την ηλεκτρική δραστηριότητα, η οποία ακολουθείται από ηλεκτρικά ήρεμες περιόδους. Αυτό το μοτίβο συντελεί σε διακυμάνσεις στη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ca^{++}), η οποία με τη σειρά της επιφέρει διακυμάνσεις στην έκκριση ινσουλίνης (Bertam, Sherman and Satin, 2010).

Πιο λεπτομερώς, ο αυξημένος ενδοκυτταρικός λόγος ATP/ADP και η αυξημένη συγκέντρωση πολυφωσφορικής διαδενοσίνης, που προκύπτουν από το μεταβολισμό της γλυκόζης, υποκινούν τη διαδικασία για το ερεθισμό της απόκρισης ινσουλίνης, με το να προκαλούν το κλείσιμο καναλιών τύπου K_{ATP} . Το κλείσιμο των K_{ATP} υποκινεί εκπόλωση της μεμβράνης, η οποία ενεργοποιεί τα κανάλια Ca^{++} και επιτρέπει την εισροή των Ca^{++} . Σαν αποτέλεσμα, επιτυγχάνεται η παλμική έκκριση ινσουλίνης (Nadal et al., 2009) (Tarasov, Dusonchet and Ashcroft, 2004).

Figure 1.3 (Nadal et al, 2009): Μοντέλο για την δράση της E2 και BPA (σε περιβάλλον με οιστρογόνα) στα παγκρεατικά β-κύτταρα. Η E2 συνδέεται με τον υποδοχέα mER και ενεργοποιεί την G, και ακολούθως μια πρωτεϊνική κινάση G (PKG), η οποία προκαλεί το κλείσιμο των διαύλων K_{ATP} . Ο τύπος L των διαύλων ασβεστίου ανοίγει ακολούθως σαν αποτέλεσμα αποπόλωσης, με επακόλουθο την εισροή Ca^{2+} και την ενεργοποίηση της ινσουλίνης. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων ERα και ενεργοποιεί την ERK1/2, η οποία ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων ινσουλίνης με μηχανισμό μέχρι στιγμής άγνωστο (Nadal et al., 2009). Η Bisphenol-A είναι ένα φυσικό οιστρογόνο το οποίο δείχνει να έχει παρόμοια δράση με την οιστραδιόλη (Nadal et al., 2009).



5. Ρύθμιση της γλυκόζης

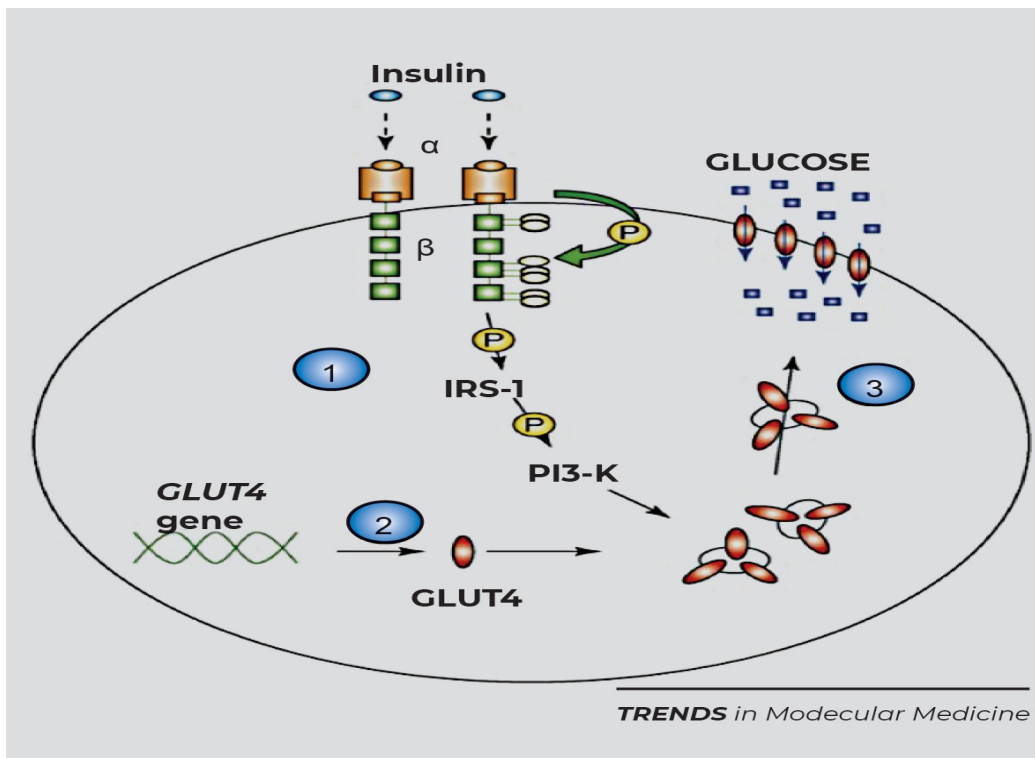
1. Η πρόσληψη γλυκόζης από διαφορετικούς ιστούς

Από τη στιγμή που η ινσουλίνη έχει παραχθεί ξεκινά να μεσολαβεί για τη διαδικασία πρόσληψης γλυκόζης από διαφορετικούς ιστούς. Κατά τη διάρκεια της περιόδου μετά το γεύμα, η γλυκαιμία ελέγχεται μέσω της απελευθέρωσης της ινσουλίνης, η οποία αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης. Το αρχικό βήμα για την αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα είναι η προσκόλληση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της ινσουλίνης στην επιφάνεια του κυττάρου (Barros, Machano and Gustafsson, 2006).

Οι υποδοχείς ινσουλίνης αποτελούνται από δύο εξωκυτταρικές υπομονάδες, τις α υπομονάδες, όπου η ινσουλίνη δεσμεύεται και δύο διαμεμβρανικές υπομονάδες, που ονομάζονται β υπομονάδες, που έχουν δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και ρυθμίζουν τη μεταγωγή σήματος. Η δέσμευση της ινσουλίνης στην α υπομονάδα προκαλεί μία δομική αλλαγή, η οποία συντελεί στην αυτοφωσφορυλίωση της υπομονάδας β σε πολλά υπολείματα τυροσίνης, τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης (Barros, Machano and Gustafsson, 2006) (Chang, Chiang and Saltiel, 2004). Ο καταρράκτης φωσφορυλίωσης οδηγεί στην μετατόπιση των κυστιδίων που περιέχουν GLUT4 από την ενδοκυτταρική περιοχή στην μεμβράνη πλάσματος του κυττάρου, όπου η GLUT4 σχηματίζει μία τρισδιάστατη δομή, που επιτρέπει την διάχυση γλυκόζης μέσα στο κύτταρο (Barros, Machano and Gustafsson, 2006) (Huang and Czech, 2007). Η GLUT4 κυρίως εκφράζεται στους σκελετικούς μυς (SM) και στο λευκό λιπώδη ιστό (WAT). Σε αυτούς τους ιστούς η πρόσληψη γλυκόζης κυρίως

επιτυγχάνεται μέσω της διέγερσης της GLUT4 από την ινσουλίνη (Barros, Machano and Gustafsson, 2006) (Huang and Czech, 2007) (Nadal et al., 2009).

Γράφημα 1.4 (Barros, Machado and Gustafsson, 2006): Μια σχηματική παρουσίαση της ινσουλίνης και της πρόσληψης γλυκόζης σε ινσουλινοευαίσθητους ιστούς. Καθώς οι υποδοχείς ινσουλίνης είναι ενεργοποιημένοι στις κυτταρικές μεμβράνες από την ινσουλίνη, λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση των υπομονάδων β. Ακολούθως, μερικές πρωτεΐνες από το κυτταρόπλασμα όπως η IRS-1 και PI3-K (απαιτούνται για την ενεργοποίηση της ινσουλίνης) είναι φωσφορυλιωμένες. Η αλληλουχία φωσφορυλίωσης έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή των κυστιδίων που περιέχουν GLUT4 σε κυτταρικές μεμβράνες, που περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που ενισχύουν την είσοδο γλυκόζης με διευκολυνόμενη διάχυση. Τυχόν αλλαγές σ αυτή την αλληλουχία γεγονότων οδηγεί σε αντίσταση στην ινσουλίνη.



Στο ήπαρ, η ινσουλίνη δρα άμεσα με το να επηρεάζει τις ενζυματικές δραστηριότητες και δεν εξαρτάται από την GLUT4. Η ενεργοποίηση της σύνθεσης του γλυκογόνου και της φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου συντελούν στην αποθήκευση γλυκόζης σαν γλυκογόνο, η οποία είναι ο κύριος τρόπος πρόσληψης γλυκόζης σε αυτό το όργανο. Ένας άλλος τρόπος, με τον οποίο η ινσουλίνη αυξάνει την

πρόσληψη γλυκόζης (μειώνει την παραγωγή της) συμπεριλαμβάνει τη διέγερση άλλων ενζύμων στο ήπαρ (π.χ. γλυκοκινάση, φωσφοφρουκτοκινάση και άλλα), τα οποία συμμετέχουν στη γλυκόλυση (Barrow, Machano and Gustafsson, 2006).

2. Άλλες ορμόνες στη ρύθμιση της γλυκόζης

Για περισσότερα από 80 χρόνια, η ρύθμιση της ινσουλίνης ήταν η μόνη διαθέσιμη θεραπεία, αλλά αυτή αντικαθιστά μόνο μία από τις ορμόνες που απαιτείται για την ομοίωση της γλυκόζης και αφορά μόνο τις απαιτήσεις για τη θεραπεία του T1D, όπου δεν υπάρχει αρκετή ή καθόλου παραγωγή ινσουλίνης. Στη θεραπεία του T2D έχουμε πολλές επιλογές για να επιτύχουμε το καλύτερο αποτέλεσμα (Aronoff et al., 2004). Όπως ήδη προαναφέρθηκε, ο διαβήτης δεν είναι μία ορμονική ασθένεια και η διατήρηση άριστων επιπέδων γλυκόζης είναι μία αντανάκλαση της ισορροπίας χυμικών, νευρικών και ορμονικών επιρροών (Aronoff et al., 2004) (Szablesk, 2011).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε για τους σκοπούς της τρέχουσας εργασίας ότι ο μηχανισμός της ομοίωσης της γλυκόζης, που περιγράφηκε νωρίτερα, είναι μόνο ενδεικτικός της πραγματικής διαδικασίας που συμβαίνει στο σώμα μας. Στην πραγματικότητα, έρευνες έχουν δείξει την παρουσία πολλών περισσοτέρων παραγόντων, ειδικά ορμονών που επηρεάζουν την ισορροπία της γλυκόζης. Για παράδειγμα, εκτός από την ινσουλίνη και το γλυκαγόνο, τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως γλυκορυθμιστικές ορμόνες το 1920 και το 1950 αντίστοιχα, η αμυλίνη και άλλες ορμόνες (όμοιο με γλυκαγόνη πολυπεπίδιο-1, ικρετίνη, γκρελίνη, ινσουλινοτροπικό πολυπεπίδιο βασισμένο στη γλυκόζη και άλλα) αναγνωρίστηκαν αργότερα ότι παίζουν ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης,

προτείνοντας ότι ο διαβήτης (τύπου 2) είναι μία πολύ-ορμονική ασθένεια (Aronoff et al., 2004) (Szablewski, 2011). Άλλες ορμόνες που έχουν βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στην ισορροπία της γλυκόζης περιλαμβάνουν: σωματοστατίνη (ορμόνη ανάπτυξης), παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PPY), αδρεναλίνη, γλυκοκορτικοειδή, ορμόνη του θυροειδή, οιστρογόνα, ανδρογόνα και άλλα (Szablewski, 2011).

Αυτή η εργασία εστιάζεται στην επίδραση των αυξημένων οιστρογόνων στο μεταβολισμό και τη ρύθμιση της γλυκόζης. Αυτό είναι κυρίως σημαντικό για γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, ή σε γυναίκες με αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων, που βιώνουν πολλές μεταβολικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων του T2D και άλλων (Mauvais-Jarvis, Clegg and Havener, 2012).

6. Ενέργειες των οιστρογόνων : Συνέπειες για την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα και Διαβήτης

6.1. Συνεισφορά των οιστρογόνων στο Σακχαρώδη Διαβήτη

Για πολλά χρόνια, θεωρούσαμε ότι η λειτουργία των οιστρογόνων περιορίζεται μόνον στο να έχουν ένα κύριο ρόλο στην αναπαραγωγή και ένα συμβάλλοντα ρόλο στη φυσιολογία της γυναίκας. Παρ'όλα αυτά, αυτή η γνώμη έχει αλλάξει επειδή πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι οι δράσεις των οιστρογόνων συνεισφέρουν στη ρύθμιση μιας ευρύτερης σειράς από λειτουργίες απ'ότι εθεωρείτο μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένης της ενεργειακής δαπάνης και της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα (Barros, Machado and Gustafsson, 2006) (Kang et al., 2014).

Στοιχεία από το ρόλο των οιστρογόνων στην ομοιόσταση της γλυκόζης και την κατανάλωση ενέργειας, παρατηρήθηκε αρχικά από

τα αποτελέσματα των αυξημένων επιπέδων οιστρογόνων στην ισορροπία της γλυκόζης στις γυναίκες, εξαιτίας της πρόσληψης αντισυλληπτικών από το στόμα, της θεραπείας αντικατάστασης των οιστρογόνων, την ωοθηκεκτομή, την εμμηνόπαυση, την εγκυμοσύνη (Nadal et al., 2009). Οι γυναίκες με ανώμαλα επίπεδα οιστρογόνων παρουσιάζουν αύξηση της κεντρικής παχυσαρκίας, αντίσταση στην ινσουλίνη και άλλες ανωμαλίες που σχετίζονται με την ομοιόσταση γλυκόζης και οι οποίες σχετίζονται με την εξέλιξη του T2D (Mauvais-Jarvis, Clegg and Havener, 2013).

Μελέτες έχουν γίνει για να πιστοποιήσουμε τη θεωρία ότι οι ανωμαλίες στα επίπεδα και στη λειτουργία των οιστρογόνων έχουν διαβητογενετική επιρροή, με την επίδειξη της σχέσης μεταξύ των οιστρογόνων και της ομοιόστασης γλυκόζης κάτω από φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές περιπτώσεις, όπως ο εμμηνορρυσιακός κύκλος (Solomon, 2001), ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης (Kaaja, 2005) και το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Cobin, 2005).

Πρόσφατα, τα οιστρογόνα και οι μεταβολίτες τους, η οιστραδιόλη, η οιστριόλη και η οισρόνη (Heldring et al., 2007), θεωρούνται ως σημαντικά μέλη των ρυθμιστικών μεταβολικών μηχανισμών. Ειδικά η οιστραδιόλη (17β-E2 ή E2), η οποία είναι η πιο ισχυρή και άφθονη, έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει ρόλο σε πολλές διαδικασίες, με το να ελέγχει τη γονιδιακή ρύθμιση όχι μόνο των γυναικών αλλά και των ανδρών (Barros, Machado and Gustafsson, 2006) (Ropero et al., 2008). Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον ρόλο της στην εξέλιξη του T2D, τα οιστρογόνα θεωρούνται ότι επηρεάζουν και την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την έκκριση ινσουλίνης. Τα ανώμαλα επίπεδα οιστρογόνων (υψηλότερα ή χαμηλότερα από το κανονικό εύρος) ίσως καταστείλουν την έκκριση ινσουλίνης ή μπορεί να προάγουν την αντίσταση στην ινσουλίνη (Ding et al., 2007) (Godsland, 2005)

(Nadal et al., 2009). Παρ'όλα αυτά, ο μηχανισμός με τον οποίο τα οιστρογόνα ρυθμίζουν την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα είναι ακόμη αδιευκρίνιστος, και απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να κατανοήσουμε το ρόλο της παραγωγής και ευαισθησίας της ινσουλίνης (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015).

6.2. Οι μηχανισμοί της οιστραδιόλης και η σηματοδότηση των δεκτών των οιστρογόνων

Οι βιολογικές επιπτώσεις της E2 εκδηλώνονται μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων (ER). Οι ERs είναι υποδοχείς οι οποίοι δρουν ως παράγοντες μεταγραφής υποκινούμενοι από το διεγέρτη. Οι ERα και ERβ είναι οι δύο κύριοι ERs, και οι δύο υπάρχουν σε αρκετές ισομορφίες και επιδεικνύουν διαφορετικά σχέδια και λειτουργίες έκφρασης (Mauvais-Jarvis, Clegg and Hevener, 2013). Παρ'όλα αυτά, αυτοί οι υποδοχείς μοιράζονται δομικές ομοιότητες με τα μέλη από τον πυρήνα των υποδοχέων όπως οι περιοχές A/B, C,D και E/F, οι οποίες εμπλέκονται στον σχηματισμό λειτουργικών περιοχών (Marino, Galluso and Ascenzi, 2006) (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015). Πιο λεπτομερώς, η περιοχή N-τερματικό (A/B περιοχή) περιέχει την ενεργοποίηση της λειτουργίας ανεξάρτητου συνδέτη-1 (AF1). Η DNA-συνδετική περιοχή (C περιοχή) συμπεριλαμβάνεται στον ER διμερισμό και στην αναγνώριση και σύνδεση του στοιχείου απόκρισης οιστρογόνου (ERE). Στην περιοχή D υπάρχει το σήμα του πυρηνικού εντοπισμού, ενώ στην περιοχή E ή στην τερματική περιοχή COOH δέσμευσης του συνδέτη υπάρχει η λειτουργία ενεργοποίησης-2 (AF2), η οποία εξαρτάται από το συνδέτη και συνεργάζεται με την τερματική για τη ρύθμιση της

γονιδιακής μεταγραφής. Τέλος, η περιοχή F δεν έχει ακόμη οριστεί ολοκληρωτικά (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015) (Heldring et al., 2007).

Γράφημα 1.5 (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015): Κύριες Δομές των υποδοχέων ERα και ERβ. Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στο γράφημα είναι οι ακόλουθες: NTD: N-terminal domain, DBD: DNA-binding domain, LBD: ligand binding domain.



Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν πολλές διαδικασίες με διάχυση των κυττάρων-στόχων μέσω της μεμβράνης πλάσματος και σηματοδότηση μέσω των υποδοχέων των ενδοκυτταρικών οιστρογόνων (ERs). Η τυπική διαδικασία σηματοδότησης των ER εξαρτάται από το διεγέρτη και διεγείρεται από τη δέσμευση της E2 στους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς του κυτταροπλάσματος. Μόλις συνδεθούν, οι υποδοχείς διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου δεσμεύονται στην περιοχή του διεγέρτη των κυττάρων-στόχων και προκαλούν μεταγραφική απόκριση. Παρ'όλα αυτά, υπάρχει αλληλεπίδραση για σηματοδοτούμενους διόδους που

αποκλίνουν από την κλασική διαδικασία (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015).

Για παράδειγμα, πολλά γονίδια που δεν περιέχουν αλληλουχίες ERE ρυθμίζονται από τον ERs (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Η ρύθμιση αυτών των γονιδίων προκύπτει μέσα από μία ανεξάρτητη αλλά συνδεδετικά εξαρτώμενη διαδρομή του ERE, με τη διαμόρφωση άλλων μεταγραφικών παραγόντων μέσω της πρωτεΐνης σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση του ERs με την πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1 (AP-1) και την πρωτεΐνη ειδικότητας 1 (SP-1) είναι παραδείγματα από την ανεξάρτητη διαδρομή του ERE (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015) (Marino, Galluzo and Ascenzi, 2006).

Οι δύο διαδρομές που περιγράφηκαν προηγουμένως εξυπηρετούν τη γενωμική δράση του οιστρογόνου. Παρ'όλα αυτά, υπάρχει διαδρομή, όπου τα οιστρογόνα δεν ρυθμίζουν άμεσα τη μεταγραφή. Αυτή είναι η μη γενωμική διαδρομή, που εξαρτάται από διεγέρτες, στην οποία οι λειτουργίες των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται από αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους μεμβρανικούς ERs και στις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση, όπως η τυροσίνη, η κινάση c-Src, οι υποδοχείς αυξητικού παράγοντα και άλλες. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις στη συνέχεια προκαλούν μία ραγδαία αρνητική σηματοδότηση μέσω MAPK, των G-πρωτεϊνών, την πρωτεΐνη κινάση B και C. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει τη ρύθμιση μεγαλύτερου εύρους γονιδίων από τον κλασικό τρόπο (Bjornstrom and Sjobern, 2005) (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015) (Marino, Galluzo and Ascenzi, 2006).

Εκτός από τον κλασικό ERs, υπάρχει η πρόσφατα αναγνωρισμένη πρωτεΐνη συζευγμένου υποδοχέα οιστρογόνου (GPER), μέσω της οποίας η μη-γονιδιακή σηματοδότηση μπορεί να προκύψει. Σ' αυτή

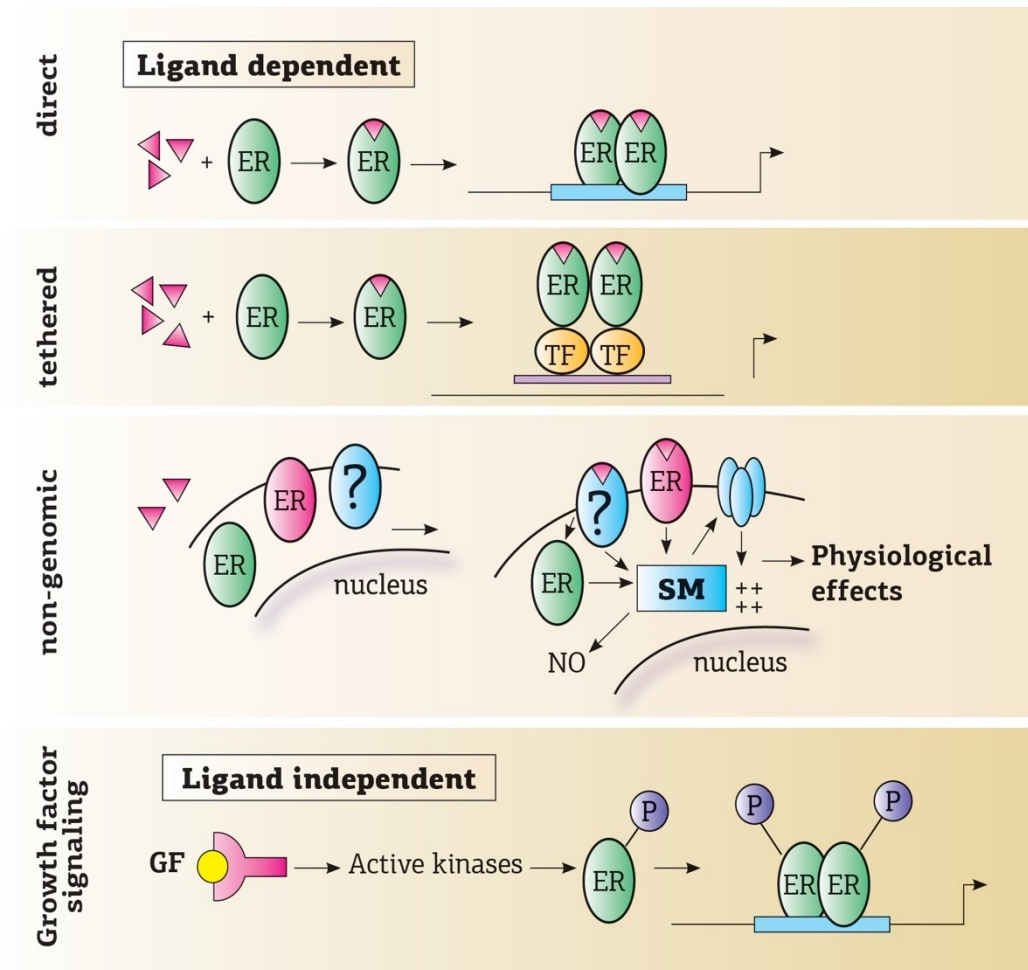
τη διαδικασία σηματοδότησης, η ενδοκυτταρική απελευθέρωση του Ca^{2+} , η παραγωγή Camp και η ενεργοποίηση του MAPK ή οι κινήσεις ασβεστίου και καλμοδουλίνης μπορεί να διεγερθούν (Marino, Galluzzo and Ascenzi, 2006) (Gupte, Pownall and Hmilton, 2015).

Και η γονιδιακή και η μη-γονιδιακή σηματοδότηση του οιστρογόνου μπορεί να επιτευχθεί με την τοποθέτηση του ERs στα μιτοχόνδρια, μέσω ενός μηχανισμού σηματοδότησης, που δεν έχει ακόμη κατανοηθεί. Αυτή η διαδρομή της δράσης της E2 μπορεί επίσης να συμπεριληφθεί στον μεταβολισμό (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015) (Ropero et al., 2008).

6.3. Ανεξάρτητος σηματοδοτικός μηχανισμός διεγέρτη

Ο ERs μπορεί να διεγείρει μεταγραφικές αποκρίσεις, χωρίς να ενεργοποιηθεί από τα οιστρογόνα. Αυτή είναι η εξαρτώμενη από τον διεγέρτη (γενωμική) διαδρομή, στην οποία οι ERs ενεργοποιούνται από φωσφορυλίωση που προκαλείται από αυξητικούς παράγοντες ή από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη και δεσμεύεται στους EREs (Hall, Couse and Korack, 2001).

οιστρογονικών υποδοχέων ERs. TF: Transcription factor, SM: Second messenger, GF: Growth factor



6.4. Ο ρόλος της E2 και του ERs στην ομοιόσταση της γλυκόζης

Μετά την εμμηνόπαυση ή την ωθηκεκτομή, οι γυναίκες παρουσιάζουν αύξηση της όρεξης τους και της κεντρικής παχυσαρκίας, τα οποία είναι συμπτώματα που σχετίζονται με την εμφάνιση του T2D και άλλων σχετικών μεταβολικών διαταραχών (π.χ. μεταβολικό σύνδρομο) (Gupte, Pownall and Hamilton, 2015). Τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνου, σε τέτοιες περιπτώσεις, συνδέονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την εξασθετισμένη ανοχή

γλυκόζης. Παρ'όλα αυτά, τα οιστρογόνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση της γλυκόζης όχι μόνο των γυναικών αλλά και των ανδρών. Μία περίπτωση εγγενούς έλλειψης οιστρογόνων εξαιτίας της μετάλλαξης, η οποία απενεργοποιεί το γονίδιο ERα, έχει αναφερθεί. Οι άνδρες έχουν αφύσικα υψηλά επίπεδα E2, μεταξύ άλλων ενδοκρινών βλαβών, οι οποίες σχετίζονται με υπερινσουλιαιμία και προβλήματα στην ανοχή γλυκόζης (Smith et al., 1995) (Zirilli et al., 2008).

Έχει αναφερθεί ότι ασθενείς με μετάλλαξη στο γονίδιο αρωματάσης, οι οποίοι ως εκ τούτου είναι ανεπαρκείς στην αρωμάση έχουν εξασθενημένη ανοχή γλυκόζης (Zirilli et al., 2008). Παρομοίως, ποντίκια ανεπαρκή στην αρωμάση (ArKO) έχουν ανοχή στη γλυκόζη και προβλήματα με την παραγωγή και δράση της ινσουλίνης (Nadal et al., 2009).

Περαιτέρω έρευνες έχουν διεκπεραιωθεί με στόχο να εξετάσουν τον αντίκτυπο της E2. Αυτές έχουν αναφέρει ότι η E2 ρυθμίζει άμεσα τη δράση της ινσουλίνης μέσω επιδράσεων στους ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς ή έμμεσα με το να ρυθμίζει παράγοντα που συνεισφέρουν στην αντίσταση στην ινσουλίνη.

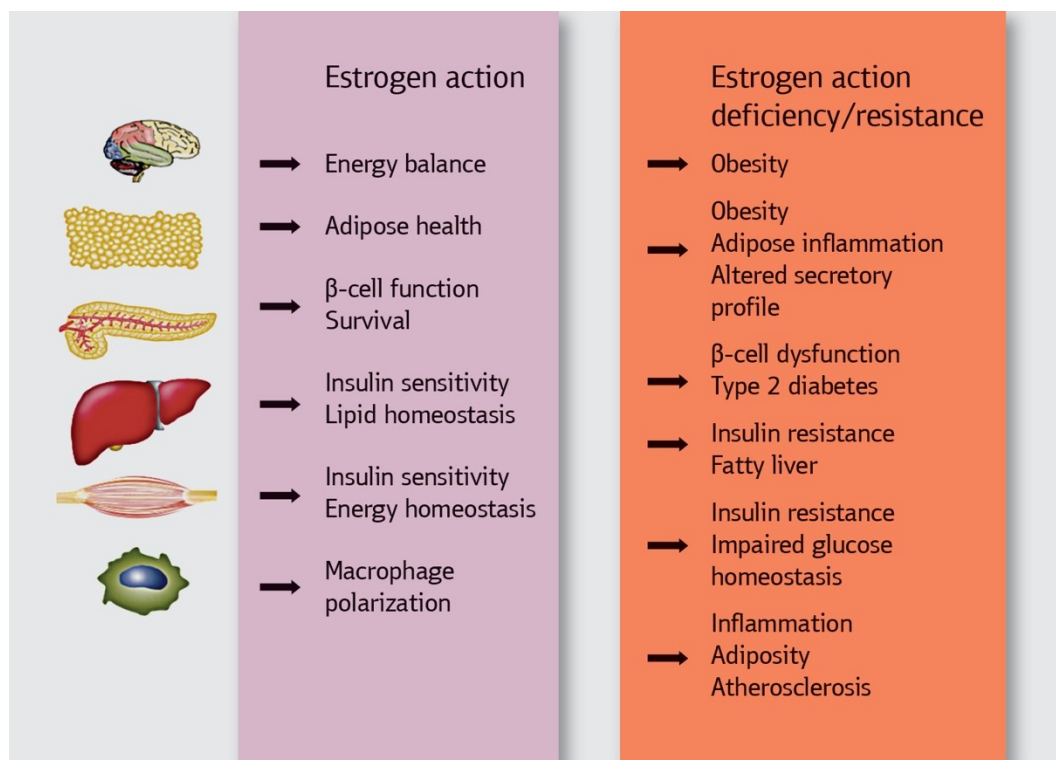
Πιο ειδικά η E2:

- Επηρεάζει το μηχανισμό πρόσληψης της γλυκόζης από τους ιστούς. Για παράδειγμα, διαμεσολαβεί στη λειτουργία του GLUT4 στους σκελετικούς μυς (Nadal et al., 2009).
- Επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή, που είναι μία προστατευτική λειτουργία για την φυσιολογική δράση της ινσουλίνης (Mauvais-Jarvis, Clegg and Havener, 2013).
- Ελέγχει το μεταβολισμό με το να συνεισφέρει σε μερικές λειτουργίες που ρυθμίζουν την όρεξη στον εγκέφαλο και στον

υποθαλάμο. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα, τα οποία έχουν δείξει ότι η ανεπάρκεια της E2 οδηγεί σε αυξημένη όρεξη, και ως εκ τούτου στην παχυσαρκία, η οποία αυξάνει την πιθανότητα της ευαισθησίας στην ινσουλίνη και του T2D (Mauvais-Jarvis, Clegg and Havener, 2013).

Πρόσφατες έρευνες έχουν εστιαστεί στην επίπτωση που η E2 έχει στη βιοσύνθεση και στην έκκριση ινσουλίνης, όπως επίσης και στον προστατευτικό ρόλο της β-κυτταρικής μάζας (Nadal et al., 2009).

Γράφημα 1.7: Σύνοψη της δράσης των οιστρογόνων στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στον ενεργειακό μεταβολισμό πριν και μετά την εμμηνόπαυση.



Οι υποδοχείς οιστρογόνου ERα και ERβ έχουν αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα, και στην ενεργειακή ισορροπία και δαπάνη (Nadal et al., 2009) (Ropero et al., 2008).

Παρ'όλα αυτά, το ERα ξεχωρίζει εξαιτίας των ποικίλων του δράσεων, ενώ το ERβ φαίνεται ότι έχει λιγότερες μεταγραφικές δράσεις από το ERα (Yi et al., 2002) (Nadal et al., 2009). Τα ERα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (ERαKO) έχουν μειώσει τις ενεργειακές δαπάνες, την ανώμαλη ομοιοστατική γλυκόζη, είναι παχύσαρκα και έχουν αντίσταση στην ινσουλίνη (Bryzgalova et al., 2006) (Heine et al., 2000) (Ogawa et al., 2003). Η ενεργοποίηση του ERα με τη δράση συγκεκριμένων αγωνιστών αντιστρέφει την αντίσταση στην ινσουλίνη, που προέρχεται από την υψηλή σε λιπαρά διατροφή (HFD), και μόνο βελτιώνει την ανοχή στη γλυκόζη στα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ERβ (ERβKO), προτείνοντας τον κυρίαρχο ρόλο του ERα συγκρίνοντας το με το ERβ στην ισορροπία γλυκόζης (Ludholm et al., 2008) (Foryst-Ludwig et al., 2008). Επιπλέον, το ERα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης σε πολλούς ιστούς, όπως στους σκελετικούς μυς, στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό, στον εγκέφαλο και στο πάγκρεας (Barros et al., 2006) (Ropero et al., 2008).

Στο SM, το ERα θεωρείται ότι ευνοεί την έκφραση ινσουλίνης και GLUT4. Η έκφραση GLUT4 μειώνεται στα ποντίκια ERαKO, τα οποία παρουσιάζουν αλλαγμένη πρόσληψη, η οποία αυξάνεται στα ποντίκια ArKO, ενώ δεν επηρεάζει τα ποντίκια ERβKO (Barros et al., 2006) (Nadal et al., 2009). Το ERβ θεωρείται ότι έχει διαβητογόνο επιρροή και κατασταλτικό ρόλο στην έκφραση GLUT4, επειδή έχει αποδειχθεί στα ποντίκια ArKO ότι η θεραπεία με αγωνιστή ERβ μειώνει την έκφραση GLUT4 (Bryzgalova et al., 2006) (Barros et al., 2009) (Barros et al., 2006) (Nadal et al., 2009).

Στο ήπαρ, το ERα θεωρείται ότι συνεισφέρει στη διαμόρφωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, επειδή τα ποντίκια ERαKO έχουν

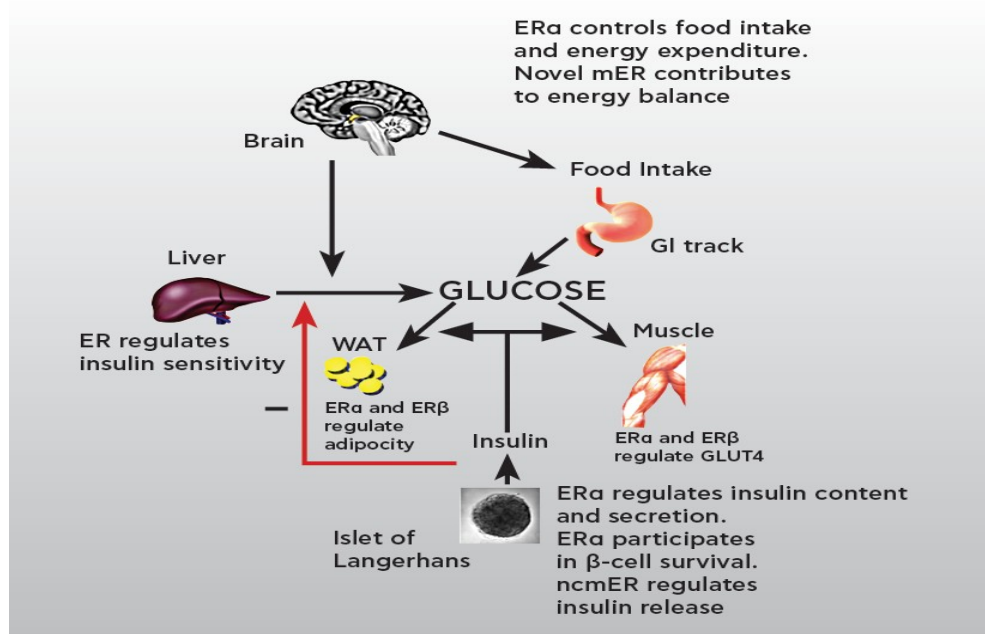
αναφερθεί ότι έχουν ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη (Bryzgalova et al., 2006).

Στον λιπώδη ιστό, το ERα έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχει στην διανομή του πάχους, στο μεταβολισμό του πάχους και στην παχυσαρκία. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη από ERα συμβάλλει στην υπερπλασία των λιποκυττάρων και παράγει υπερτροφία στον WAT, αλλά όχι στον καφέ λιπώδη ιστό (BAT) , ο οποίος σχετίζεται με διαταραγμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και δυσανεξία στη γλυκόζη (Cooke et al., 2001) (Heine et al., 2000). Στη διανομή του πάχους στο σώμα, το ERβ επίσης συμμετέχει, επηρεάζοντας το ποσό των WAT και στους άντρες και στις γυναίκες (Cooke et al., 2001) (Naaz et al., 2002) (Penza et al.,2006). Η αναλογία ERα/ERβ συνδέεται με την παχυσαρκία και την παραγωγή και έκκριση λεπτίνης στον επίπλου λιπώδη ιστό στη γυναίκα (Shin et al., 2007) (Nadal et al., 2009).

Στον εγκέφαλο, τα ποντίκια με ERα γονιδιακή παύση ή τα διαγονιδιακά ποντίκια, στα οποία το ERα έχει επιλεκτικά διαγραφεί ανακτούν βάρος, αυξάνουν σπλαχνική παχυσαρκία, μειώνουν τις ενεργειακές δαπάνες, αυξάνουν την όρεξη τους και την υπερινσουλιναιμία (Musatov et al., 2007). Η αύξηση της όρεξης κυρίως εξηγείται από τις επιπτώσεις της E2 στη θέση του υποθαλάμου, υπεύθυνου για τη ρύθμιση της όρεξης και των ενεργειακών δαπανών(Clegg et al., 2006). Επιπλέον, το ERβ βρέθηκε ότι έχει ρόλο στη ρύθμιση της όρεξης μέσω της ενεργοποίησης των ανορεκτικών μηχανισμών επιδρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Liang et al.,2002). Όλες αυτές οι επιπτώσεις της E2 στον μεταβολισμό, που μεσολάβησαν από το ERs σχετίζονται με την ανάπτυξη της παχυσαρκίας και μπορεί να συμβάλλουν στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Επιπλέον, η E2 έχει προστατευτικό ρόλο

για τη δράση της ινσουλίνης, ο οποίος προκαλείται μέσω της μείωσης των φλεγμονών. Αιμοποιητικά ή μυελογενή έχουν συγκεκριμένα οι ERα αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικές επιπτώσεις στη δράση της ινσουλίνης (Ribas et al., 2011) (Ribas et al., 2009).

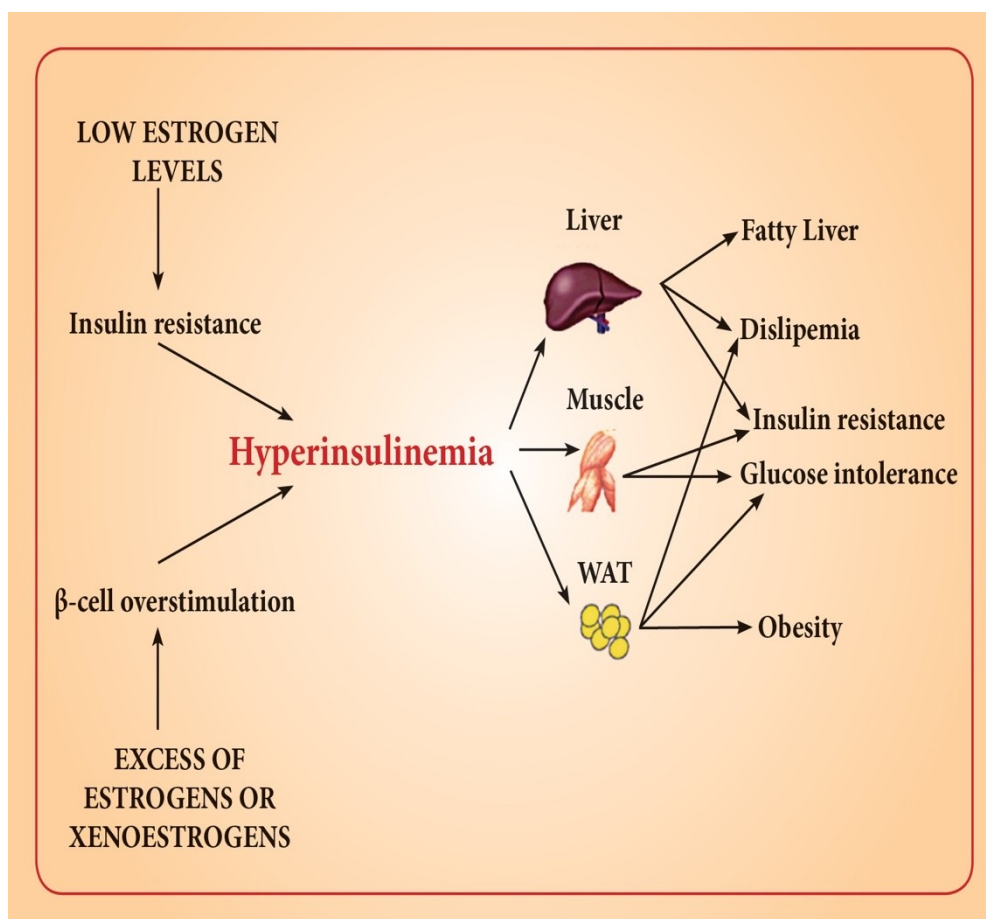
Γράφημα 1.8: Όργανα που εμπλέκονται στην ομοίωση της γλυκόζης και ο ρόλος των οιστρογονικών υποδοχέων σε αυτά. Μετά την πρόσληψη τροφής ή μετά την γλυκογονόλυση ή γλυκονεογένεση αυξάνονται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Αυτή η διαδικασία ελέγχεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα ΚΝΣ. Αντίθετα, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μειώνονται όταν η γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα. Για αυτή τη διαδικασία απαιτείται ινσουλίνη. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ERs παρουσιάζονται αν επηρεάζουν το ενεργειακό ισοζύγιο καθώς και το μεταβολισμό του λίπους και της γλυκόζης στον εγκέφαλο (υποθάλαμος), στο ήπαρ στο λιπώδη ιστό, τους σκελετικούς μύες και το πάγκρεας (Mauvais-Jarvis, Clegg and Hevener, 2012).



Η επίπτωση της E2 και του ERs έχει κυρίως ερευνηθεί σε ιστούς εκτός από την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Ως εκ τούτου μέχρι και τώρα, οι έρευνες για την άμεση επίπτωση της E2 στο πάγκρεας είναι

περιορισμένες, μερικές από τις οποίες θα συζητηθούν παρακάτω. Αρσενικά ποντίκια, που τους χορηγείται E2 100μg/kg ανά μέρα για 4 μέρες έδειξαν αλλαγμένη ανοχή στη γλυκόζη και ανέπτυξαν την αντίσταση στη γλυκόζη. Οι νησίδες από τους ποντικούς που υπέστησαν αγωγή, έχουν υψηλή περιεκτικότητα ινσουλίνης και αύξησαν την έκκριση ινσουλίνης σε απόκριση της διέγερσης ινσουλίνης, οι οποίες ίσως προκύπτουν από την επίπτωση της E2 στα β-κύτταρα ή την προσαρμογή της νησίδας στην αυξημένη αντίσταση της ινσουλίνης ή και τα δύο (Alonso-Magdalena et al., 2005) (Nadal et al., 2009). Σε άλλο πείραμα, η άμεση επίπτωση της E2 ερευνήθηκε σε απομονωμένες νησίδες από αρσενικά ποντίκια που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με 100Pm-10nmE2. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη έκφραση γονιδιακής ινσουλίνης και βιοσύνθεσης της ινσουλίνης. Η δράση της E2 βρέθηκε να διεγείρεται μέσω του υποδοχέα ERα, αφού τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νησίδες από ERαKO και ERβKO ποντίκια, και τη χρήση των ERα και των υποδοχέων τους (Adachi et al., 2005) (Alonso-Mgdalena et al., 2008) (Nadal et al., 2009). Παρ'όλα αυτά, σε μία πιο πρόσφατη έρευνα, η οποία εξέτασε τους ERα και τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια ERβ, αποδείχθηκε ότι και οι ERα και οι ERβ, συμμετείχαν στην ινσουλινοτροπική επίδραση της E2 στα κανάλια K_{ATP} των παγκρεατικών β-κυττάρων (Soriano et al., 2009).

Γράφημα 1.9 (Nadal et al., 2009): Υπερβολική έκκριση ινσουλίνης προκαλείται από μη φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων και από την επίδραση αυτών στους διάφορους ιστούς. Στο γράφημα φαίνεται ότι τα χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων οδηγούν σε αντίσταση στην ινσουλίνη, ενώ πολύ υψηλά επίπεδα οιστρογόνων προκαλούν υπερδιέγερση των β κυττάρων. Αυτό με τη σειρά του, προκαλεί υπερινσουλιναιμία, η οποία προκαλεί επιπλοκές στο ισιζύγιο γλυκόζης και στον μεταβολισμό της.



Στο πάγκρεας, ο ERα, εκτός από το ρόλο του για τη ρύθμιση της περιεκτικότητας της ινσουλίνης στο πάγκρεας, βρέθηκε ότι διαδραματίζει ρόλο στην επιβίωση των παγκρεατικών β-κυττάρων μετά από οξειδωτικό στρες. Αυτά τα στοιχεία προκύπτουν από την αυξημένη ευαισθησία των ποντικών ERαKO, στο οξειδωτικό στρες, η οποία προκαλεί την απόπτωση των β-κυττάρων και του διαβήτη

ανεπαρκούς ινσουλίνης (Gupte,Pownall and Hamilton, 2015) (Le May et al., 2006) (Nadal et al., 2009).

Έτσι, φαίνεται ότι η E2 ασκεί μία ανοδική ρυθμιστική δράση στα β-κύτταρα, και αναβαθμίζει τη βιοσύνθεση ινσουλίνης, παρ'όλα αυτά όμως η σχέση μεταξύ των άμεσων επιπτώσεων της E2 στα β-κύτταρα δεν έχει γεφυρωθεί. Τα πειράματα που εκτελέστηκαν σ' αυτό το σημείο στοχεύουν να βρουν την επίπτωση της E2 στη INS-1 κυτταρική σειρά, τα οποία είναι β-κύτταρα ινσουλινώματα αρουραίων, αλλά δεν έχουν ακόμη ερευνηθεί σε βάθος.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι γυναίκες με ορμονοεξαρτώμενο Καρκίνο του Μαστού υποβάλλονται σε αντιορμονική θεραπεία με σκοπό να μειωθούν τα επίπεδα οιστρογόνων στο αίμα τους και κατ'επέκταση ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων. Στις μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες με ορμονο-εξαρτώμενο Καρκίνο Μαστού χρησιμοποιείται κυρίως η αντιορμονική θεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης, της οποίας ο μηχανισμός δράσης αναλύθηκε παραπάνω. Τα επίπεδα οιστρογόνων σε αυτές τις γυναίκες μειώνονται εντυπωσιακά και μάλιστα σε ακόμα χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αντιορμονικές θεραπείες.

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι να μελετήσει σε κυτταρικό επίπεδο, ποιά αλληλεπίδραση υπάρχει ανάμεσα στα επίπεδα οιστρογόνων και στην έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β κύτταρα και κατ'επέκταση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.

Τα αποτελέσματα ενδέχεται να φανούν χρήσιμα για μελλοντικές έρευνες, στη διευρέυση του κινδύνου ανάπτυξης Διαβήτη Τύπου 2 σε γυναίκες με καρκίνο Μαστού που υποβάλλονται σε αντιορμονική θεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες και επίδραση με Οιστραδιολη.

2.1.1. Κυτταρική καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά INS-1 (AddexBio, USA), μια σειρά παγκρεατικών βήτα κυττάρων αρουραίων. Η κυτταρική σειρά INS-1 προέρχεται από ινσουλινώμα αρουραίου το οποίο εισήχθη εκθέτοντας τα τροκτικά σε ακτινοβολία ακτινών X, και εμφανίζει πολλά και σημαντικά λειτουργικά χαρακτηριστικά των παγκρεατικών β-κυττάρων όπως υψηλή περιεκτικότητα ινσουλίνης, παραγωγή τόσο προϊνσουλίνης I και II όσο και απόκριση σε γλυκόζη και ορμόνες. Τα χαρακτηριστικά αυτά, μαζί με το γεγονός ότι τα κύτταρα INS-1 διατηρούν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης τα καθιστά κατάλληλα για τη μελέτη διαφόρων πτυχών της λειτουργίας β-κυττάρων, όπως η έκφραση ινσουλίνης (Skelin, Rupnik και Cencic, 2010) και επίσης τα καθιστά κατάλληλα για τον σκοπό της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, υπό ελεγχόμενες συνθήκες 5% (v/v), CO₂ στους 37 ° C και ελέγχονταν κάθε δύο με τρεις ημέρες για τυχόν μόλυνση, πριν από κάθε επέμβαση, αλλαγή του μεταβολισμένου θρεπτικού μέσου με φρέσκο ή την ανακαλλιέργεια τους. Ως θρεπτικό μέσο συνιστάται και χρησιμοποιήθηκε RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% (o/o) FBS, 10mM HEPES, 2mM L-γλουταμίνη, 1x πυροσταφυλικό νάτριο, 0,05mM 2-μερκαπτοαιθανόλη διάλυμα αντιβιοτικών 100 U / ml πενικιλίνης / 0,1g στρεπτομυκίνης (Gibco, USA). Τα κύτταρα INS-

1 τοποθετήθηκαν σε φλάσκες με επιφάνεια 75cm^2 (T75) στις οποίες προστέθηκαν 10 ml από το προαναφερθέν θρεπτικό μέσο.

Η ανακαλλιέργεια ή *διαίρεση των κυττάρων* είναι μια διαδικασία η οποία υφίσταται, για κάθε κυτταρική καλλιέργεια η οποία διεξάγεται στο εργαστήριο μέσω της οποίας ανά τακτά χρονικά διαστήματα παρέχονται φρέσκα θρεπτικά συστατικά και χώρος για την ανάπτυξη των εφαπτομένων καλλιεργείων . Όταν τα κύτταρα μιας εφαπτομένης καλλιέργειας φτάσουν σε στάδιο πληρότητας (κάλυψης της επιφάνειας στην οποία μεγαλώνουν), βρίσκονται δηλαδή σε εκθετική λογαριθμική φάση ανάπτυξης, τότε πρέπει να διαιρεθούν. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι αυτή η διαίρεση ουδεμιά σχέση έχει με την κυτταρική διαίρεση. Η κυτταρική διαίρεση, μίτωση, είναι μια αυτοματοποιημένη διαδικασία ελεγχόμενη από τα κύτταρα. Η ανακαλλιέργεια είναι μια διαδικασία υποπολλαπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού ώστε να διατηρηθεί σωστά η κυτταρική καλλιέργεια και η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Κάτω από την απαγωγό νοηματικής ροής, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από την φλάσκα , με την χρήση ενός άσηπτου σιφωνίου και τα κύτταρα πλύθηκαν προσεκτικά με 5mL PBS το οποίο δεν περιείχε ασβέστιο και μαγνήσιο, έτσι ώστε να απομακρυνθούν ο βόειος εμβρυικός ορός και οι αναστολείς της θρυψίνης/EDTA (Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη και η διαδικασία ονομάζεται θρυψινοποίηση). Κατόπιν της απομάκρυνσης και του PBS στη φλάσκα προστέθηκε μια ποσότητα θρυψίνης 0.05%/ EDTA (2ml), ικανή να σπάσει τους δεσμούς που έχουν δημιουργηθεί μεταξύ των κυττάρων και του πλαστικού πυθμένα της φλάσκας αλλά και μεταξύ των ίδιων των κυττάρων. Για να αυξηθεί η δράση της θρυψίνης η φλάσκα

ανακινήθηκε με απαλές οφιοειδής κινήσεις , έτσι ώστε το ενζυμικό διάλυμα να διανεμηθεί σε όλη την επιφάνεια των κυττάρων. Η φλάσκα μεταφέρθηκε στον επωαστικό θάλαμο 37°C, 5% CO₂, μέχρι να ολοκληρωθεί η αποκόλληση των κυττάρων (~5min).

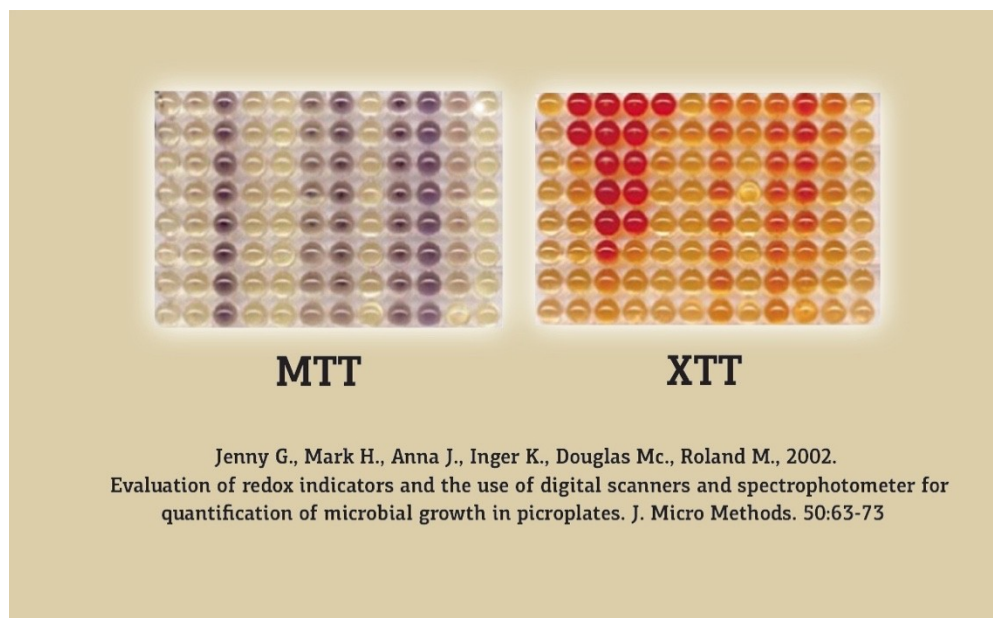
Μετά την επώαση, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε αναστροφο μικροσκόπιο, για να εξακριβωθεί εάν αποσυνδέθηκαν και αν φαίνονταν αρκετά στρογγυλά. Η πλήρης απόσπαση των κυττάρων επιτεύχθηκε με έντονη ανάμιξη του διαλύματος. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 8 ml μέσου καλλιέργειας και αναμίχθηκε καλά για να σταματήσει η ενυδατική πέψη από την θρυψίνη.

Στη συνέχεια, 8 ml φρέσκου μέσου προστέθηκαν σε τέσσερις νέες φιάλες (παράγοντας διαίρεσης 1: 4). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2 ml κυτταρικού αιωρήματος, το οποίο περιέχει τα αποκολλημένα κύτταρα, σε κάθε μία από τις τέσσερις νέες φιάλες. Κάθε φιάλη, πριν την τοποθέτηση της στον επωαστικό κλίβανο για την ανάπτυξη της κυτταρικής καλλιέργειας, παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί ο αριθμός και η μορφολογία των κυττάρων.

2.1.2 Μέθοδος XTT

Μέσο αυτής της μεθόδου μετρήθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού / μεταβολισμού των κυττάρων με χρήση του άλατος 2,3-δις- (2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ) -2H- τετραζολίου- 5-καρβοξανιλιδίου (XTT) . Μόνο στα ζώντα κύτταρα τα μιτοχόνδρια είναι ικανά να ανάγουν το XTT για να σχηματίσουν μια πορτοκαλί χρωστική υδατοδιαλυτή ουσία. Συνεπώς, η συγκέντρωση της χρωστικής ουσίας είναι ανάλογη με τον αριθμό των μεταβολικά δραστικών κυττάρων. Η χρήση των αλάτων του τετραζολίου, όπως η MTT, ξεκίνησε τη δεκαετία του 1950 και βασίζεται στο γεγονός ότι

τα ζωντανά κύτταρα μέσω της αφυδραγονάσης του κύκλου του Krebs, ανάγουν τα άλατα του τετραζολίου σε χρωματιστές ενώσεις φορμαζάνης (όπως στην παρακάτω εικόνα).

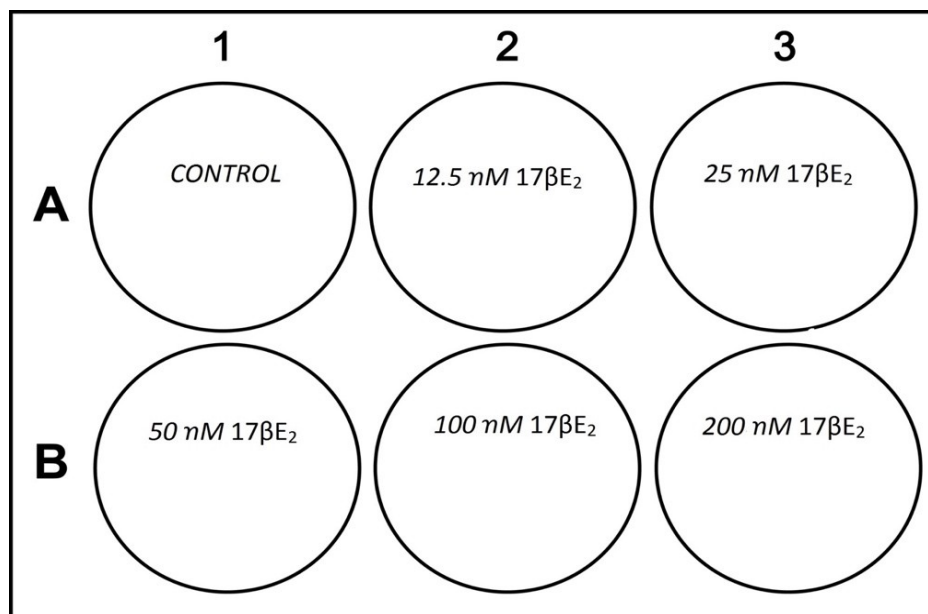


Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πολυτριβλία 96 πηγαδιών σε πυκνότητα κυττάρων 10^3 κύτταρα / πηγάδι και αναπτύχθηκαν σε RPMI (150 μ l / φρεάτιο) συμπληρωμένο είτε με 10% είτε με 0,5% FBS, ανάλογα με το πείραμα. Μετά από κατεργασία με οιστραδιόλη, προστέθηκαν 15 μ l XTT σε κάθε πηγάδι και επώαστηκαν στον κλίβανο (37 ° C, 5% CO₂) για έως 4 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το XTT και προστέθηκαν 150 μ l DMSO σε κάθε πηγάδι του πολυτριβλίου 96 θέσεων . Η οπτική πυκνότητα (OD) μετρήθηκε στα 450nm με τη χρήση μίας συσκευής ανάγνωσης πολυτριβλίων 96 θέσεων (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως .

2.1.3 Επίδραση στα κύτταρα διαλύματος οιστραδιόλης

Χρησιμοποιήθηκε 17β-οιστραδιόλη ή 17β-E2 > 98% (μοριακό βάρος MW = 272,38kg / mol) από την Sigma Aldrich (USA) για την παρασκευή διαλύματος 7,4μM 17β-E2 το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας επίδρασης στον κυτταρικό πληθυσμό INS-1. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πολυτριβλία 6 πηγαδιών και διεξήχθει το πείραμα με χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων 17β-E2 (όπως φαίνεται στο σχήμα 3.1). Λεπτομερέστερα, στο πρώτο πηγάδι, που ήταν ο μάρτυρας/control, προστέθηκαν 2 ml μέσου καλλιέργειας, ενώ στα επόμενα πέντε φρεάτια προστέθηκαν 2 ml μέσου καλλιέργειας συμπληρωμένου με διαφορετικές συγκεντρώσεις οιστραδιόλης, 12,5nM ,25 nM ,50 nM ,10 nM και 200 nM .

Σχήμα 3.1: Συγκέντρωση οιστραδιόλης σε κάθε πηγάδι του πολυτριβλίου 6 πηγαδιών

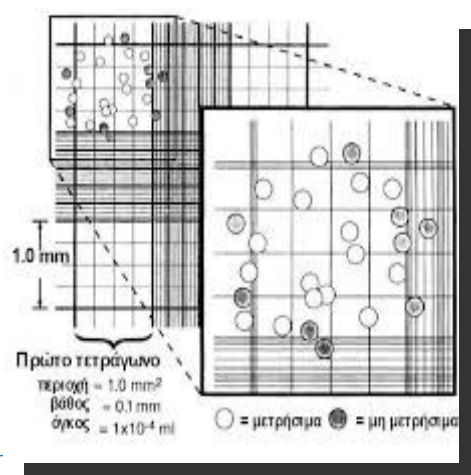
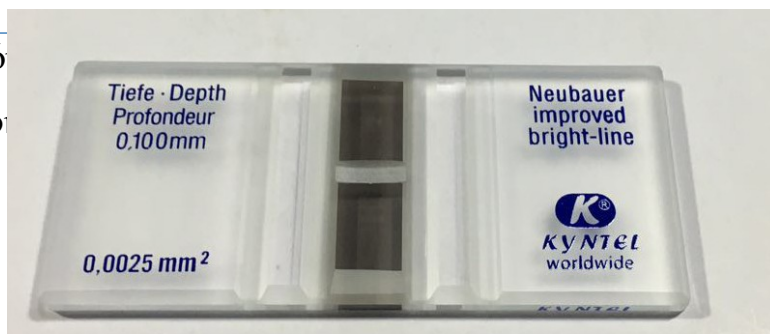


2.1.4 Μέτρηση κυτταρικού πληθυσμού με την χρήση αιματοκυτταρόμετρου

Τα κύτταρα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε για να εξασφαλιστεί ότι, κατά την πειραματική μελέτη, ο αριθμός κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε κάθε πηγάδι του πολυτριβλιού 6 θέσεων είναι ο ίδιος (περίπου 500.000 κύτταρα ανά φρεάτιο). Η μετρηση του κυτταρικού πληθυσμού γίνεται ως εξής:

Μέσω ενζυματικής πέψης, αποκολλώνται τα κύτταρα που είναι να μετρηθούν και 10 μl του διαλύματος με το εναιώρημα κυττάρων μεταφέρονται με χρήση μικρο-πιπέτας στην ειδική περιοχή του αιματοκυτταρόμετρου (εικόνα 3.2), χωρίς να γίνει υπερπλήρωση. Ακολούθως, το αιματοκυτταρόμετρο μεταφέρεται στο οπτικό μικροσκόπιο, όπου και μετριοούνται τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των πλαισίων του κάθε τεταρτημορίου.

Εικό
αιμο



Πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των κυττάρων που μετρήθηκαν επί 1000, λαμβάνεται ο αριθμός των κυττάρων ανά ml εναιωρήματος. Πολλαπλασιάζοντας έπειτα επί τα ml του εναιωρήματος υπολογίζεται εν τέλει, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων που εμπεριέχονται στο εναιώρημα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα όγκου (κύτταρα / ml) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

Αριθμός κυττάρων / ml = μέσος αριθμός κυττάρων 10^4 παράγοντας αραίωσης

Η απαιτούμενη ποσότητα κυττάρων στη συνέχεια επαναιωρήθηκε σε 2 ml μέσου κυτταρικής καλλιέργειας και σε σπόρους σε κάθε φρεάτιο των πλακών των 6 φρεατίων. Ο τελικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο ήταν περίπου 500.000.

2.2 Απομόνωση του συνολικού RNA.

2.2.1 Απομονωση του συνολικού RNA.

Η απομόνωση του συνολικού RNA επιτεύχθηκε με τη χρήση του NucleoZOL, ακολουθώντας τις οδηγίες που έδωσε ο κατασκευαστής (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Με αυτό το αντιδραστήριο αποφεύγεται ο παραδοσιακός διαχωρισμός φάσεων, είναι μια διαδικασία μιας φάσης, η οποία ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης ή μεταφοράς DNA και πρωτεϊνών καθώς και απώλεια δειγμάτων.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: ξέπλυμα των κυτταρικών καλλιεργειών με PBS, εν συνεχεία η λύση των κυττάρων έγινε με 1ml NucleoZOL για κάθε πηγαδάκι του πολυτριβλιού 6 θέσεων, που περιείχε την καλλιέργεια. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού ανακινήθηκε με πιπέτα και μεταφέρθηκε σε ένα falcon 2ml όπου προστέθηκαν 400ul RNAase free water για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και του DNA και άλλων συστατικών του δείγματος. Το κάθε σωληνάριο που περιείχε ανακινήθηκε έντονα για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Όλα τα σωληνάρια τα οποία περιείχαν τα δείγματα και τους μάρτυρες, φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα $12.000 \times g$. Σε αυτή τη φάση, για να παρθεί μόνο το RNA, το υπερκείμενο, μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο όπου προστέθηκαν για κάθε δείγμα 1ml καθαρής ισοπροπανόλης. Τα σωληνάρια επώαστηκαν σε

θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 12.000 x g. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρωση, αφαιρέθηκε και το ίζημα ξεπλύθηκε εις διπλούν με 500 μ l 75% αιθανόλη και φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 7.000x g. Εν τέλει, η ανασύσταση του RNA, πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 μ l RNAase free water. Για την πλήρη διάσπαση του ιζήματος του RNA κάθε σωληνάριο μπήκε στο vortex για 3 λεπτα.

2.2.2 Εκτίμηση της συγκέντρωσης του εξαχθέντος από τα κύτταρα RNA με φασματοφωτομετρική ανάλυση

Για να προσδιοριστεί η μέση συγκέντρωση του RNA που υπάρχει σε ένα μίγμα, καθώς και της καθαρότητας του τελικού προϊόντος, πραγματοποιείται φασματοφωτομετρική ανάλυση. Η φασματοφωτομετρική μέτρηση χρησιμοποιεί την αρχή ότι τα νουκλεϊκά οξέα, συμπεριλαμβανομένου του RNA, απορροφούν το υπεριώδες φως με καθορισμένο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, το RNA απορροφά το φως στα 260 nm και ως αποτέλεσμα λιγότερο φως χτυπά τον ανιχνευτή φωτός, και ως εκ τούτου οδηγεί σε παραγωγή μιας υψηλότερης οπτικής πυκνότητας (OD). Ο διαλύτης του RNA πρέπει να είναι νερό, έτσι ώστε να μην επηρεάζει τις ενδείξεις απορρόφησης. Η ανάγνωση της απορρόφησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του RNA χρησιμοποιώντας τον νόμο Beer-Lambert , ο οποίος αντιπροσωπεύει τη γραμμική αλλαγή της απορρόφησης έναντι της συγκέντρωσης. Για δείγματα RNA, είναι γνωστό ότι στα 260 nm μια ανάγνωση απορρόφησης 1 αντιστοιχεί στο διάλυμα RNA 40 μ g/ml. Ως εκ τούτου, η συγκέντρωση RNA μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση της ακόλουθης εξίσωσης (Liu, 2009):

Συγκέντρωση RNA = 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ x OD260 x παράγοντα αραίωσης

Ωστόσο, σε αυτό το πείραμα, χρησιμοποιήθηκε το Biospec-nano για την βασική έρευνα (προκαθορισμένο στα 260 nm) και το σχετικό λογισμικό πρόγραμμα του υπολογιστή, το οποίο παρείχε άμεσα τη συγκέντρωση των δειγμάτων RNA. Το nano drop Biospec-nano δίνει πληροφορίες όσον αφορά την αναλογία της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm και 280 nm, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της καθαρότητας του απομονωμένου ολικού κυτταρικού RNA.

2.3 Ποσοτική αντίδραση αλυσιδωτής αντίστροφης μεταγραφής πολυμεράσης με βάση τον πραγματικό χρόνο (qRT-PCR)

2.3.1 Αρχή της qRT-PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκώνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της

θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και το στάδιο επιμήκυνσης/σύνθεσης της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Με την Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification curve), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή Ct (cycle threshold). Πρόκειται για τον αριθμό των

κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης οι οποίοι απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται ως η έναρξη της εκθετικής φάσης της ενίσχυσης του υποστρώματος. Η τιμή Ct είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή Ct τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

2.3.2. Μέτρηση της ποιότητας και της ποσότητας του RNA.

Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε προσδιορίστηκε με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε υπεριώδη ακτινοβολία (U.V.) μήκους κύματος 260 nm (Biospec-nano. Shimadzu Biotech, Japan).

Η οπτική απορρόφηση του RNA στα 260nm μας επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA στο διάλυμα, δεδομένου ότι μία μονάδα οπτικής απορρόφησης 1 OD αντιστοιχεί σε 40 µg/ml μονόκλωνου RNA.

Η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα να ελεγχθεί η καθαρότητα του RNA που απομονώθηκε, δηλαδή εάν υπάρχει πρόσμιξη με DNA ή με πρωτεΐνες ή άλλες ουσίες. Αυτό προσδιορίζεται εάν μετρηθεί το ίδιο διάλυμα στα 280nm και μετά προσδιορισθεί ο λόγος OD260/OD280.

Αν ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος από 1,8 τότε το RNA που απομονώθηκε είναι καθαρό. Αν ο λόγος είναι μικρότερος (δηλαδή ο παρονομαστής είναι πολύ μεγαλύτερος), τότε το RNA έχει πρόσμιξη με DNA.

Σε καθαρά διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, η A260 είναι περίπου διπλάσια της A280.

Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί επιλεκτικά μόνο ο επιθυμητός στόχος DNA, οι εκκινητές πρέπει να έχουν υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα, συνεπώς ο επιτυχής σχεδιασμός τους είναι πολύ σημαντικός.

Για την κατασκευή και καλύτερη επιλογή εκκινητών υπάρχουν ειδικά προγράμματα τα οποία είναι διαθέσιμα από το διαδίκτυο (π.χ. Primer Blast).

2.3.3 Πρωτόκολλο αντίστροφης μεταγραφάσης

Η μετατροπή του RNA σε πρότυπο cDNA είναι ένα σημαντικό πρώτο βήμα για την ανίχνευση του RNA χαμηλής αφθονίας σε ένα δείγμα. Επειδή υπάρχει αναπόφευκτη διακύμανση σε RNA στα βιολογικά δείγματα, και επειδή το καθαρό RNA είναι ασταθές όταν εξάγεται, είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί ένα συμπληρωματικό DNA του mRNA που μας ενδιαφέρει (Bustin , 2004). Στη παρούσα μελέτη, η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο PrimeScript™ RT reagent (Perfect Real Time, TaKaRa Dalian Biotechnology Co., Ltd. Dalian, China). Το κιτ αποτελείται από ένα μίγμα του Oligo (dT) που ανάγονται σε μια πολυ (A) ουρά mRNA και τυχαίους εκκινητές οι οποίοι δεσμεύονται σε πολλαπλά σημεία κατά μήκος της μεταγραφής RNA. Χρησιμοποιούνται επιπλέον, τα ένζυμα αντίστροφης μεταγραφάσης, ρυθμιστικό διάλυμα και νερό ελεύθερο από RNAase, τα οποία αναμειγνύονται με το συνολικό DNA. Τα αντιδραστήρια που εμφανίζονται στον πίνακα 2.1 ανήκουν στο προαναφερθέν κιτ , και μαζί με το ολικό εξαγόμενο RNA προστέθηκαν σε μικρούς σωλήνες Eppendorf. Επειδή υπήρχαν 6 δείγματα RNA που εξήχθησαν, έγιναν

7 μείγματα των ακόλουθων αντιδραστηρίων, 6 με τα δείγματα RNA και 1 δείγμα ελέγχου (χωρίς RNA). Κατά την προετοιμασία του μείγματος όλα τα αντιδραστήρια τοποθετήθηκαν σε πάγο. Η συνολική ποσότητα του μείγματος σε κάθε μικρο-σωλήνα έφθασε σε όγκο 10 μl. Στις περιπτώσεις που χρειάστηκε για να επιτευχθεί ο τελικός όγκος των 10 μl, για κάθε σωληνίσκο, προστέθηκε H₂O απαλλαγμένο από RNAase. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή BioSystems Veriti™ για τη δημιουργία του cDNA.

Table 2.1: Mixture of Reagents used for the creation of cDNA (TakaraBio)

Reagent	Amount
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μl
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μl
Oligo dT Primer (50 μM)	0.5 μl
Random 6 mers (100 μM)	<u>0.5 μl</u>
total RNA	
RNase Free dH ₂ O	
Total	10 μl

2.3.4 Πρωτόκολλο της real time PCR.

Μόλις παραχθεί το cDNA, μπορούν τα δείγματα να προετοιμαστούν για το επόμενο στάδιο το οποίο είναι η qPCR. Η ποσοτική RT-PCR είναι μια μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του RNA. Η qPCR απαιτεί τη χρήση του cDNA αντίστοιχο του κάθε δειγματος, των PRIP, των δεοξυριβονουκλείδων, του DNA πολυμεράσης, ενός ρυθμιστικού διαλύματος και ενός κατάλληλου φθορίζοντος μορίου που συνδέεται με το DNA για να αναφέρεται η παρουσία προϊόντων PCR σε πραγματικό χρόνο. Είναι επίσης υποχρεωτικό ένας θερμοκυκλοποιητής που παρέχει όλες τις απαιτούμενες θερμοκρασίες για PCR. Ο θερμοκυκλοποιητής περιέχει αισθητήρες, προσαρμοσμένους στο απαιτούμενο μήκος κύματος, για να ανιχνεύσει το σήμα φθορισμού που παράγεται από το μόριο φθορισμού. Αυτή η μέθοδος καθιστά δυνατή τη μέτρηση του ρυθμού παραγωγής του ενισχυμένου προϊόντος σε κάθε κύκλο της PCR, ως εκ τούτου καλείται σε πραγματικό χρόνο (Boustin, 2005) (Πίνακας 2.2 και 2.3).

Σε αυτό το πείραμα, η ποσοτική RT-PCR διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας ως φθορίζον μόριο το SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time, TaKaRa Dalian Biotechnology Co., Ltd. Dalian, China) on a BIO-RAD iQ™5 170-9780 Multicolor Real-Time PCR Detection System (170-9780, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). Μόλις δεσμευτεί για το DNA SYBR παρουσιάζει υψηλό βαθμό φθορισμού, ο οποίος αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι σύνδεση SYBR-DNA.

Πίνακας 2.2: αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε

πραγματικό χρόνο qRT-PCR. Αυτά τα αντιδραστήρια προετοιμάστηκε για 6 δείγματα διαλύματος cDNA. Επίσης προετοιμάστηκε ένα κενό δείγμα με 9,2 μl H₂O και καμία λύση cDNA.

<Per reaction>

Reagent	Amount
SYBR® <i>Premix Ex Taq</i> II (2X)	10 μl
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl
RT reaction solution (cDNA solution)	1 μl
dH ₂ O (sterile distilled water)	8.2 μl
total	20 μl

Πίνακας 2.3: τα Πρίμερς που χρησιμοποιούνται για την αντίστροφη μεταγραφή (Τσόι ET Αλ., 2005)

Primer name (rat)	Primers
Insulin 1 (232bp)	Forward: 5'-TCGTCCTCTGGGAGCCCAAG-3' Reverse: 5'-TGCCCGGCAGAAGCGTGGCATT-3'
Insulin 2 (289bp)	Forward: 5'-TCATCCTCTGGGAGCCCCGC-3' Reverse: 5'-AGTTGCAGTAGTTCTCCAGT-3'
β -Actin (535bp)	Forward: 5'-ACCTGACAGACTACCTCATG-3' Reverse: 5'-ATCGTACTCCTGCTTGCTGA-3'

Τα δείγματα όπου στη συνέχεια τοποθετούνται στο BIO-RAD iQTM5 170-9780 το οποίο παρουσιάζει μια ανάλυση της καμπύλης τήξης των ενισχυμένων θραυσμάτων DNA σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Ένα λογισμικό υπολογιστή (Bio Rad iQ™ 5 οπτικό σύστημα λογισμικού, έκδοση 2,1) που χρησιμοποιείται για την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (το επίπεδο έκφρασης της ινσουλίνης κανονικοποιήθηκε σε β -Actin), επέτρεψε τη σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου με την παροχή δεδομένων για τη δημιουργία του γραμμογραφήματος (Γράφημα 3.1). Για να διερευνηθεί εάν η διαφορική έκφραση της ινσουλίνης είναι στατιστικώς σημαντική έγινε student t-test και το λογισμικό SPSS (ANTIBA, SPSS v. 20, SPSS Inc. Head τρίμηνα, Σικάγο, ΗΠΑ) χρησιμοποιήθηκε για στατιστική ανάλυση. Η σημασία ορίστηκε σε $P < 0.05$.

2.4 Απομόνωση της ολικής κυτταρικής πρωτεΐνης

2.4.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Για να επιτευχθεί η απομόνωση των πρωτεϊνών, το πολυτριβλίο των θέσεων που φέρει τα δείγματα μεταφέρθηκε σε χημική απαγωγό. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα πλύθηκαν με παγωμένο αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (περίπου 1 ml σε κάθε πηγάδι ήταν αρκετό για να καλύψουν τα κύτταρα). Μετά την τελευταία πλύση, πραγματοποιείται επαναιώρηση των κύτταρων σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει 0,1 – 0,3% Triton X-100.3. Ανάδευση του εναιωρήματος των κυττάρων αρκετές φορές. Στη συνέχεια, το εναιώρημα από κάθε πηγάδι αναρροφήθηκε με μια πιπέτα, μεταφέρθηκε σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα, και φυγοκεντρήθηκε στους 4°C για 20 λεπτά στο 14000g Τέλος, μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε ένα φρέσκο σωλήνα (τοποθετήθηκε σε πάγο).

2.4.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA assay

Η δοκιμασία Bradford αποτελεί φασματοσκοπική αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Βασίζεται στην μετατόπιση της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία σε όξινες συνθήκες μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλέ καθώς δεσμεύεται στις προς προσδιορισμό πρωτεΐνες. Η απορρόφηση μετράται στα 595nm. Έτσι, σε πλάκα μικροτιτλοποίησης αρχικά προστέθηκε ποσότητα ορού βόειας αλβουμίνης, BSA (Bovine Serum Albumin) σε αρχική συγκέντρωση 1mg/mL σταδιακά αραιωμένη με απιονισμένο νερό έως συγκέντρωση 0,03125 mg/mL για την κατασκευή της καμπύλης

αναφοράς. Τα δείγματα αραιώθηκαν με dH₂O σε αναλογία 1:5 (2 μl δείγματος και 8 μl νερού) και τέλος προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι ποσότητα Dye Reagent. Ένα πηγαδάκι χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό. Η χρωστική Dye Reagent που περιέχεται στο αντιδραστήριο Bradford δημιουργεί σύμπλοκα με τα βασικά και αρωματικά αμινοξέα που εμπεριέχονται στις πρωτεΐνες. Έτσι μετατοπίζεται το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της ακτινοβολίας από τα 465nm στα 595nm. Τελικά μετρήθηκε η απορρόφηση των συμπλόκων στα 595nm. Από την καμπύλη αναφοράς και μέσω της μετρούμενης απορρόφησης, υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

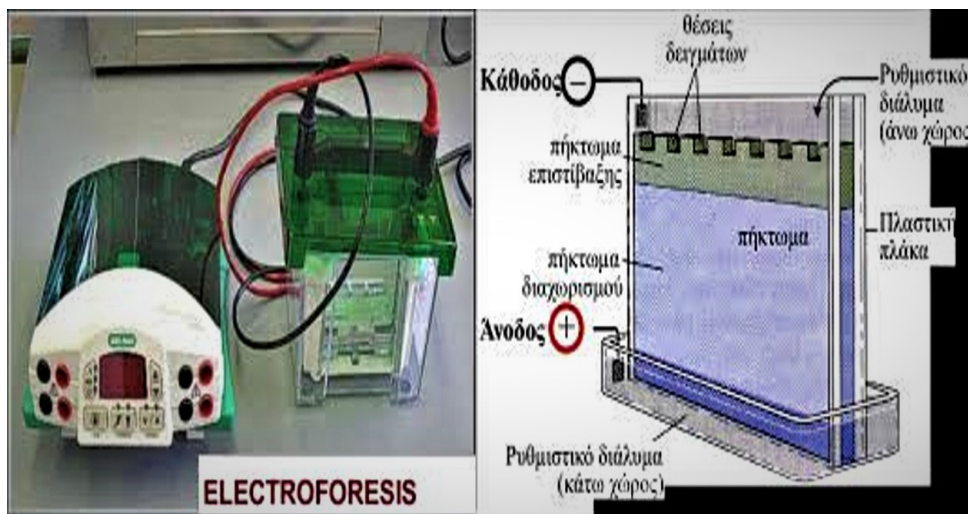
Η μικρό-πλακα 96 θέσεων που έφερε, την πρότυπη καμπύλη και τα δείγματα μετρήθηκαν με έναν αναγνώστη μικρο-πλάκας ELISA (VersaMax, μοριακές συσκευές, Sanivail, CA, USA) στα 562nm .

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών επιτρέπει την εκτέλεση ίσης ποσότητας πρωτεΐνης σε κάθε πηγάδι της SDS-PAGE, η οποία είναι σημαντική για να είναι σε θέση να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες και να μετρήσει την έκφραση των στοχευόμενων πρωτεϊνών.

2.4.3 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS – PAGE)

Ο όρος ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στο φαινόμενο μετανάστευσης ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων ιόντων ή άλλων σωματιδίων της ύλης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Σημαντικά βιολογικά μόρια, όπως τα αμινοξέα, τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, μπορούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο να μετακινηθούν είτε προς την άνοδο (-) είτε προς την κάθοδο (+) αναλόγως της φύσης του ηλεκτρικού τους φορτίου. Με αυτό τον τρόπο, εκμεταλλευόμενοι τα διαφορετικά φορτία και μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που υφίστανται την ηλεκτροφόρηση, επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους.



Στο συγκεκριμένο αυτό είδος ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) (βλ. παραπάνω εικόνα) χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού το ακρυλαμίδιο το οποίο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα. Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στη δημιουργία αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Στις αλυσίδες αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN-μεθυλεν-bis-ακρυλαμιδίου (bis), τα οποία λόγω της δομής τους μπορούν να ενσωματωθούν σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι να δημιουργηθεί πλέγμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου είναι ένα παράδειγμα καταλυτικής δράσης των ελευθέρων ριζών. Η κατάλυση γίνεται μέσω μίας βάσης, της NN-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης (TEMED), αλλά μόνο με τη

βοήθεια ελεύθερων ριζών που δημιουργούνται χημικά με υπερθειικά ιόντα (S_2O^{32-}), χάρη στην παρουσία ενός δευτέρου καταλύτη του Ammonium Persulphate (APS). Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων (SDS, DTT). Το SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες. Η επιπλέον χρήση αναγωγικών παραγόντων όπως είναι το DTT (DiThioThreitol), έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται πλήρως με τη θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 5min στους $100^{\circ}C$, παρουσία όλων των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων. Τελικά στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση αναλύονται πολυπεπίδια τα οποία έχουν αποκτήσει καθαρό αρνητικό φορτίο λόγω του SDS και επομένως η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Σε όλα τα πειράματα που περιγράφονται χρησιμοποιήθηκε ασυνεχές σύστημα ρυθμιστικών διαλυμάτων (discontinuous PAGE), σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970).

Στη παρούσα μελέτη ίσοι όγκοι πρωτεΐνης (20 μ g) και ρυθμιστικού διαλύματος "φορτώθηκαν" στα πηγαδάκια του πηκτώματος SDS-PAGE gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gel (BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). Παράλληλα φορτώθηκαν δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards #1610377 by BioRad Laboratories, Hercules, California, USA). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 50V για 5 λεπτά και ύστερα στα 130V για 1 ώρα (by BioRad Laboratories, Hercules, California, USA).

2.4.4. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Η αρχή της τεχνικής του Western blotting, στηρίζεται στην ιδέα ότι συγκεκριμένα αντισώματα αναγνωρίζουν πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν διαχωριστεί βάσει του μεγέθους τους, μέσω της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης (gel electrophoresis). Η μέθοδος αυτή, βασίζεται στο σχηματισμό και την ανίχνευση ενός σύμπλοκου αντιγόνου- αντισώματος, ανάμεσα σε ένα αντίσωμα και ένα πολυπεπτίδιο που έχει ακινητοποιηθεί σε μεμβράνη (Gershoni and Palade, 1983; Stott, 1989). Εφαρμόζεται για την ανίχνευση και την ποσοτική μέτρηση αντιγόνων ενός μίγματος πρωτεϊνών, για τη σύγκριση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών και για τη μελέτη των τροποποιήσεων τους κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους. Περιλαμβάνει την ηλεκτροφορητική ανάλυση του αντιγονικού διαλύματος με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (η οποία αναλύθηκε παραπάνω), τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες και τέλος τη δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων στο αντιγόνο (Towbin et al., 1979).

Η ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση κατά Western επιτρέπει την ανίχνευση μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης μέσα από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί η μεταφορά τους (με αποτύπωση, κυρίως ανοσοαποτύπωση) σε μια επιφάνεια, συνήθως μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene Fluoride membrane, Millipore, USA), που τις κάνει να αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν.

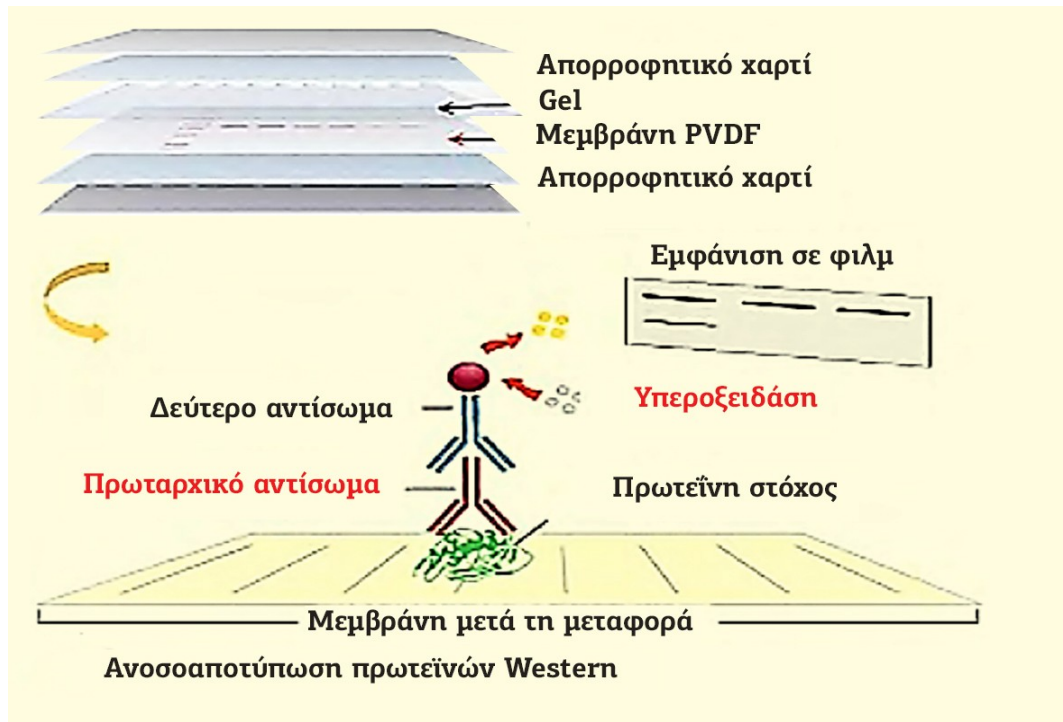
Το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Σήμανση του δεύτερου αντισώματος με ραδιενέργεια ή με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (Horseradish Peroxidase, HRP) δημιουργεί μια σκοτεινή γραμμή σε φίλμ ακτινών X (αυτοραδιογραφία), που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της υπό μελέτης πρωτεΐνης.

2.4.5. Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών από την πήκτη πολυακρυλαμιδίου στην μεμβράνη PVDF με ηλεκτροαποτύπωση ακολουθούνται τα κάτωθι στάδια: Η μεμβράνη PVDF επωάζεται για 2min σε μεθανόλη με σκοπό να ενεργοποιηθεί. Τα χαρτιά Whitman, η μεμβράνη και το gel επωάζονται σε Transfer Buffer για 10min.

Κατασκευάζεται το sandwich ως εξής:

- 2 χαρτάκια Whitman
- 1 μεμβράνη PVDF
- Gel
- 2 χαρτάκια Whitman



Εικόνα 5: Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών Western

Ακολούθως το sandwich μεταφέρεται στην ειδική συσκευή για Semi-dry Transfer. Η ηλεκτροαποτύπωση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με ηλεκτροφορεση 18 ωρών (overnight) σε ένα ψυχρό δωμάτιο σε συνεχές ρεύμα 10 mA (Εικόνα 5).

2.4.6. Επώαση αντισωμάτων

Μετά το πέρας της μεταφοράς ακολουθεί βάνισμο της μεμβράνης με Ponceau μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Ακολουθούν διαδοχικά ξεπλύματα της μεμβράνης με TBS-T (1 φορά x15min και 3 φορές x 5min). Η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα μπλοκαρίσματος 5% (γάλα σε σκόνη διαλυμένο σε TBS-T) ολονύκτια για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκλυση 3 φορές με TBS-T για 10min. Έπειτα η

μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε πρωταρχικό αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Απομάκρυνση του πρωταρχικού αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min. Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Σε αυτή τη μελέτη, προστέθηκε το πρωτογενές διάλυμα αντισωμάτων ινσουλίνης (L6B10) (mAb #8138 Cell Signaling, ΗΠΑ), το οποίο επώαστηκε ολονύκτια στους 4°C. Απομάκρυνση του πρωταρχικού αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος. Επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα(#7076 at 1:2000), συζευγμένο με υπεροξειδάση sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (#7075 at 1:2000), που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραιώση με TBS-T/0.01% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS-T για 10min.

Χρησιμοποιήθηκε αφυδρογονάση 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH) ως έλεγχος φόρτωσης για την ομαλοποίηση των επιπέδων πρωτεΐνης που ανιχνεύθηκε και για να επιβεβαιωθεί ότι το φορτίο πρωτεΐνης είναι το ίδιο σε όλο το πήκτωμα. Ένα μονοκλωνικό

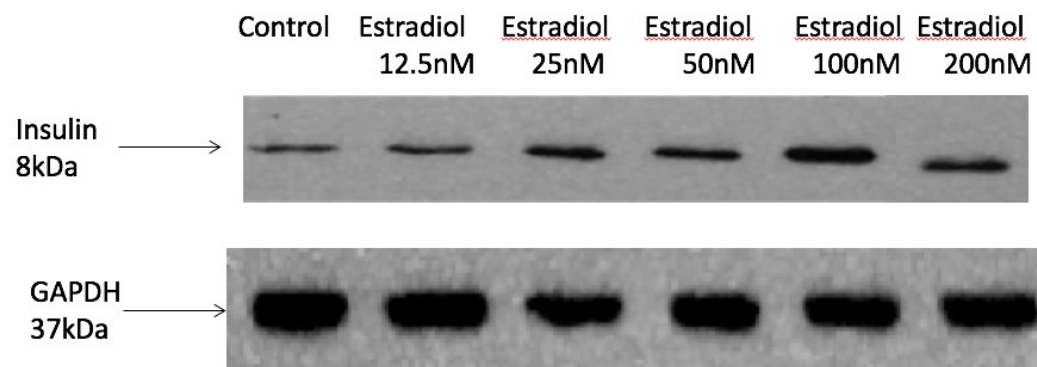
αντίσωμα IgG1 ποντικού (6C5: sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ΗΠΑ), που συνιστάται για την ανίχνευση της GAPDH που προέρχεται από αρουραίο, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πρωτεΐνης GAPDH. Τα δευτερεύοντα αντισώματα ήταν συζευγμένα με υπεροξειδάση αγριοραπανίδας (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

2.4.7. Ανάλυση απεικόνισης και δεδομένων

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 1min σε 10ml διαλύματος λουμινόλης (1.25mM σε 0.1M Tris-Cl pH=8.5), στο οποίο προστέθηκαν 10μl 3% H₂O₂ και 100μl κουμαρικού οξέος. Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν τη λουμινόλη σε 3-άμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Ο πλαστικός προστάτης τοποθετήθηκε σε μια κασέτα μεμβράνης με την πλευρά της πρωτεΐνης στραμμένη προς τα πάνω. Η απεικόνιση των αναμενόμενων ζωνών επιτεύχθηκε με τη χρήση ταινιών ακτίνων X (ταινία CL-XPosure™, Θερμοεπιστημονική, ΗΠΑ) και έκθεση ακτίνων X της μεμβράνης σε σκοτεινό δωμάτιο. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διάφανη μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ. Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης. Συγκεκριμένα, 3min επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης-Kodak και 3min στο διάλυμα σταθεροποίησης-Kodak και 3min στο νερό.

Με λογισμικό ανάλυσης εικόνας (Image Lab version 4.1 by Bio Rad), μετρήθηκε η ένταση του συγκροτήματος των πρωτεϊνών-στόχου. Το ένζυμο GAPDH χρησιμοποιήθηκε για την ομαλοποίηση των επιπέδων των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS ((ANOVA, SPSS v.20 statistical package)) σχεδιάστηκε ένα γράφημα γραμμής έκφρασης πρωτεΐνης.

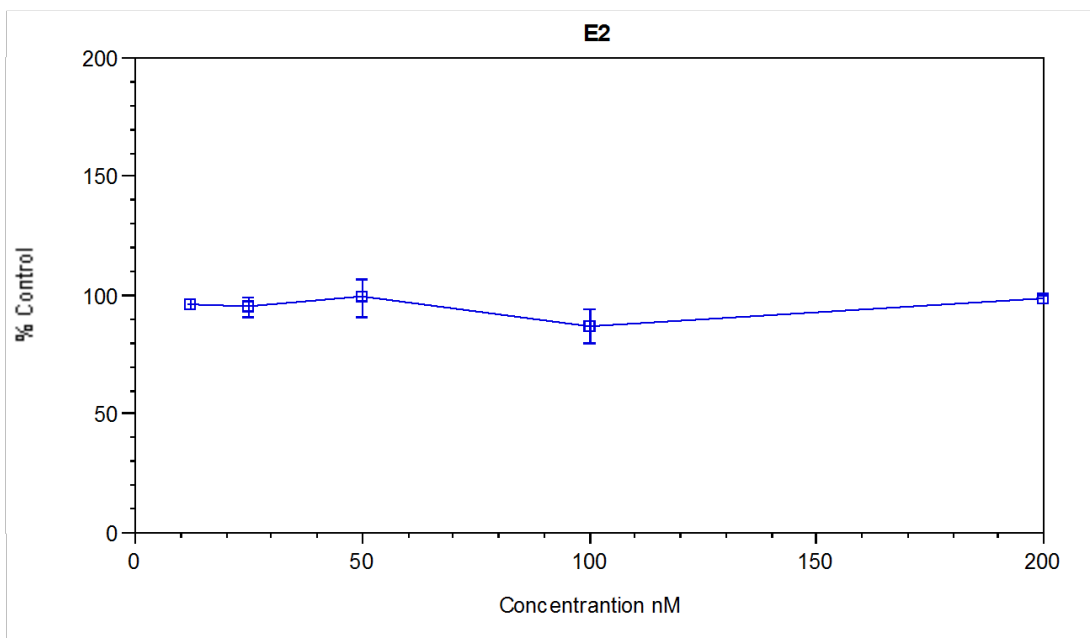
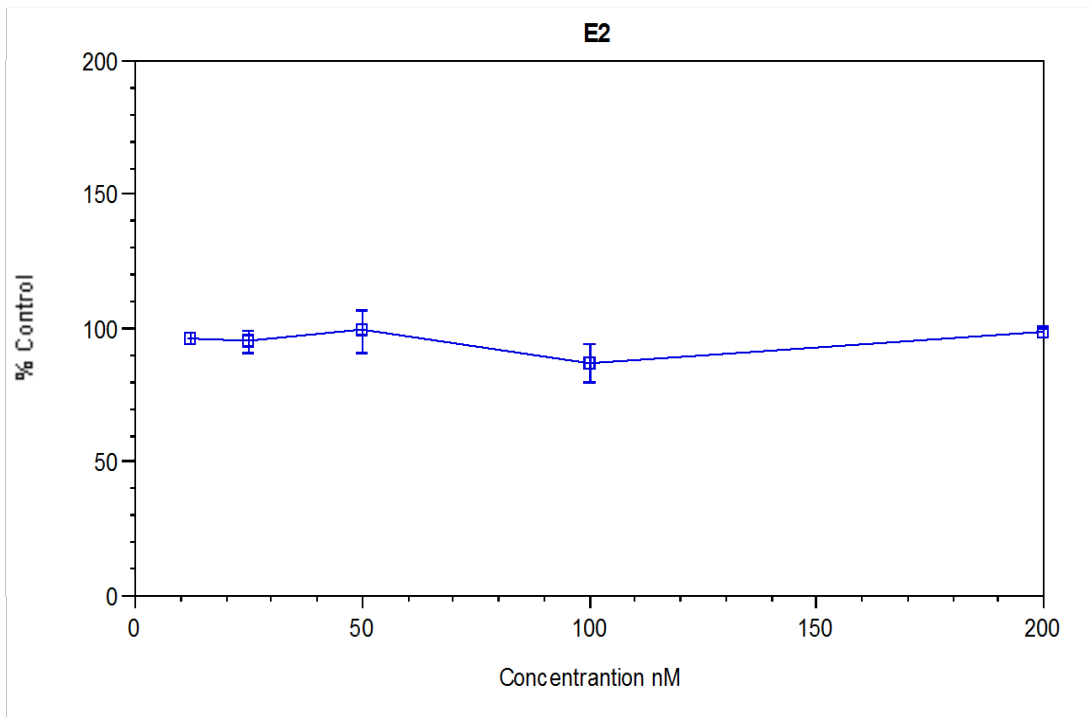
Σχημα 3.1: Αποτελέσματα Western Blot

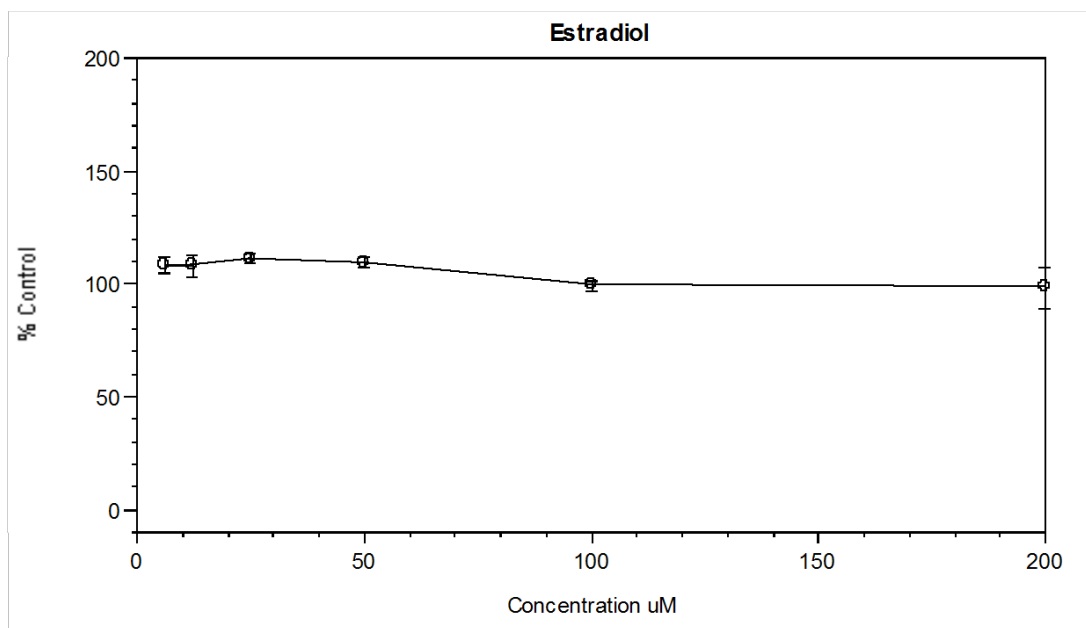


3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κυτταρική καλλιέργεια

Τα κύτταρα INS 1 (AddexBio, USA) θεωρήθηκαν ως ιδανικό μοντέλο για την έκβαση των πειραμάτων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.1. Όταν τα κύτταρα έφτασαν περίπου 80% πληρότητας, καλλιεργήθηκαν σε πολυτριβλία 6 θέσεων όπου τους χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις E2. Στα δείγματα καθώς και στους μάρτυρες μελετήθηκε η αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού μέσω XTT τεστ (όπως φαίνονται στα παρακάτω τρία διαγράμματα) καθώς και η έκφραση ινσουλίνης έπειτα από την χορήγηση E2 σε γονιδιακό επίπεδο και σε επίπεδο πρωτεϊνών.





3.2 Απομόνωση συνολικού κυτταρικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα κύτταρα ήταν απαραίτητη για την εκτέλεση της PCR πραγματικού χρόνου και την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης της ινσουλίνης (mRNA) των κυττάρων INS-1, μετά τη χορήγηση διαφορετικών συγκεντρώσεων E2. Η εκχύλιση του ολικού κυτταρικού RNA εκτελέστηκε με τη χρήση Nucleozol. Η συγκέντρωση των δειγμάτων RNA που εξήχθησαν μετρήθηκε στη συνέχεια με τη χρήση του BioSpec. Εκτός αυτού, η καθαρότητα και η ακεραιότητα του συνολικού απομονωμένου RNA αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό του λόγου της οπτικής πυκνότητας

στα 260 nm και 280 Nm. Μια αναλογία κοντά στο 2,0 δείχνει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του RNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1. Οι τιμές της αναλογίας της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm καθώς και στα 280 nm κυμαίνονταν από 1,99 έως 2,01, που πολύ κοντά στο 2, πράγμα που σημαίνει ότι το απομονωμένο RNA ήταν καθαρό και κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί για qRT-PCR.

Treatment	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Ratio A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentration of total RNA (ng/μl)
Control	177.25	88.2	2.01	709
12.5nM	205	102.5	2.00	820
25nM	197.6	98.8	2.00	790.45
50nM	215.5	107.2	2.01	862
100nM	173.25	87.1	1.99	693
200nM	186.25	93.1	2.00	745

Πίνακας 3.1: Συγκέντρωση και λόγος A₂₆₀ / A₂₈₀ ολικού RNA από κύτταρα INS-1 που έχουν υποστεί επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις E2

3.3 (qRT-PCR)

Η σχετική γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε σε β-ακτίνη η οποία χρησίμευσε ως γονίδιο καθαρότητας και ενήργησε ως αναφορά-εσωτερικός έλεγχος.

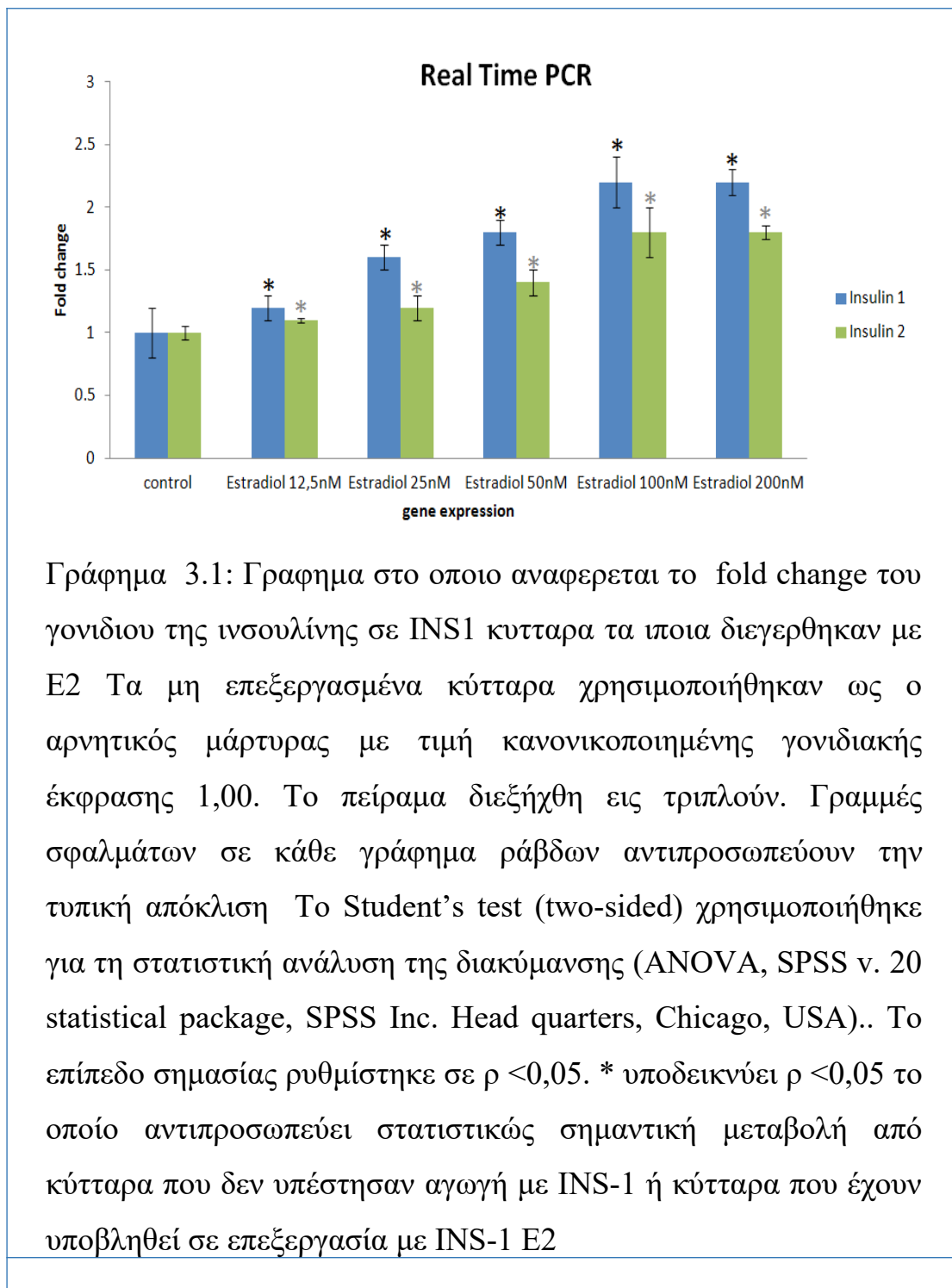
Τα αποτελέσματα RT-PCR έδειξαν ότι υπάρχει θετική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση της ινσουλίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφραση ινσουλίνης είναι θετικά ελεγχόμενη (up regulated) από το

την E2. Η σχετική γονιδιακή έκφραση κανονικοποιήθηκε σε β-ακτίνη η οποία χρησίμευσε ως γονίδιο καθαριότητας και ενήργησε ως αναφορά-εσωτερικός έλεγχος. Υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης των γονιδίων ως προς το γονίδιο ελέγχου και τα αποτελέσματα παρατίθενται στο γράφημα 3.1 και στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης

	Fold change	
	Insulin 1	Insulin 2
Estradiol 12,5nM	1.2	1.1
Estradiol 25nM	1.6	1.2
Estradiol 50nM	1.8	1.4
Estradiol 100nM	2.2	1.8
Estradiol 200nM	2.2	1.8

ινσουλίνης-πρωτεΐνης σε INS-1 μετά από θεραπεία με διαφορετικές συγκεντρώσεις E2, σε σύγκριση με κύτταρα που δεν υποβλήθηκαν σε αγωγή με INS-1



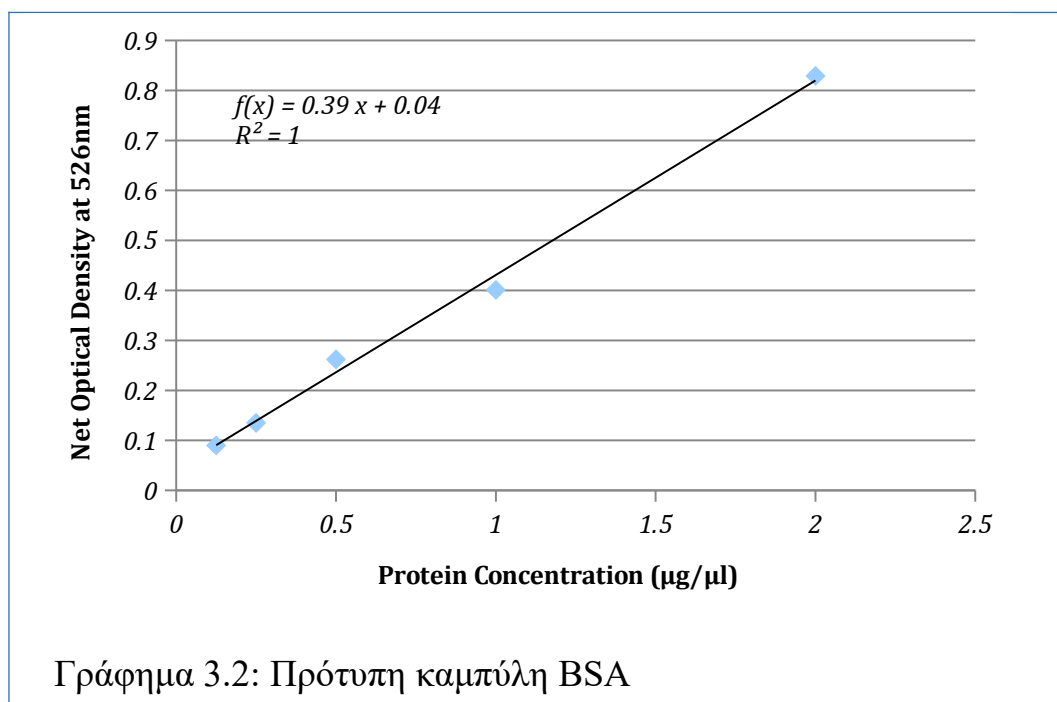
Η έκφραση των γονιδίων INS-1 και INS-2 έδειξε να αυξάνεται όσο αυξάνεται η χορήγηση της οιστραδιόλης. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι στη συγκέντρωση της οιστραδιόλης 100nM και πάνω, φαίνεται να μην εκφράζονται περαιτέρω αυτά τα γονίδια

γεγονός που μπορεί να αναχθεί στον κορεσμό των υποδοχέων των οιστρογόνων.

3.4 Απομόνωση πρωτεΐνης

Η έκφραση της ινσουλίνης αξιολογήθηκε επίσης σε επίπεδο πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη που εξάγεται από τα κύτταρα INS-1, μετρήθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών κατά Western (Western Blot)

Η παρουσία και ποσότητα των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με μια δοκιμασία BCA ((Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit, USA)). Η αλβουμίνη του βόειου ορού χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο. Οι τιμές οπτικής πυκνότητας των 5 διαφορετικών συγκεντρώσεων δειγμάτων BSA μετρήθηκαν με συσκευή ανάγνωσης πλακών (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.4.2. Η πρότυπη καμπύλη που προκύπτει εμφανίζεται στο γράφημα 3.2:

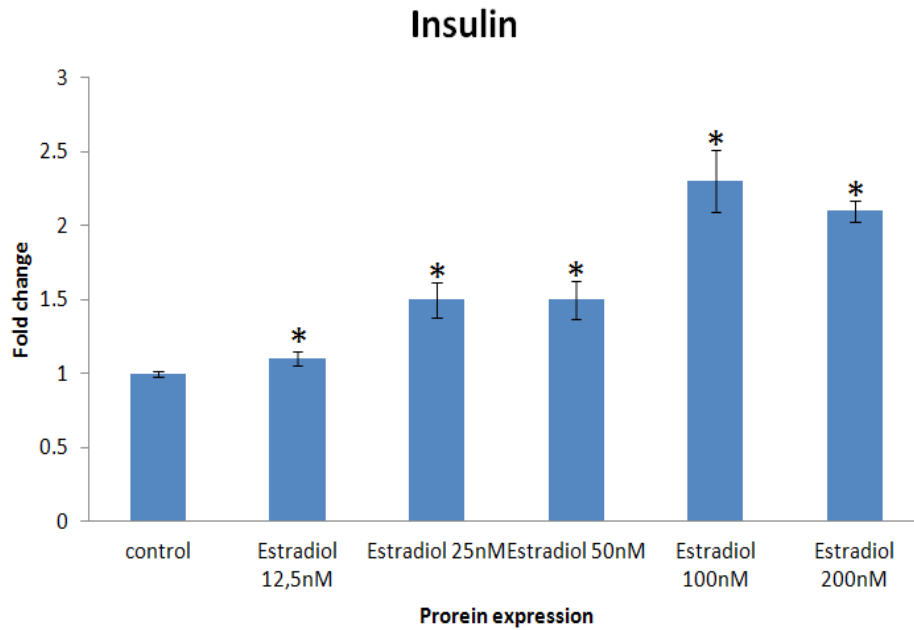


Η πρότυπη καμπύλη σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας Excel, Microsoft Office 2016. Σύμφωνα με αυτή την καμπύλη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των δειγμάτων βρέθηκε να είναι όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.3 και στο Γράφημα 3.3:

Sample	Unknown Protein Concentration (μg/μl)
Control	1.23
Estradiol 12.5nM	0.97
Estradiol 25nM	1.33

Γράφημα 3.3: Παράγεται γράφημα το οποίο φαίνεται η κανονικοποίηση (fold change) της έκφρασης της ινσουλίνης σε κύτταρα INS-1 υπό την επίρεια E2. Τα μη επεξεργασμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός έλεγχος με μια κανονικοποιημένη τιμή έκφρασης του γονιδίου του 1,00. Όλα τα πειράματα έγιναν εις τριπλούν .

Οι γραμμές σφάλματος σε κάθε γράφημα ράβδων αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση. Το Student's test (two-sided) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA, SPSS v. 20 statistical package, SPSS Inc. Head quarters, Chicago, USA Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0.05$. * υποδεικνύει $p < 0.05$, η οποία αντιπροσωπεύει στατιστικά σημαντική αλλαγή από μη επεξεργασμένα κύτταρα INS-1 ή κύτταρα E2 που έχουν υποστεί επεξεργασία



Όπως στην ινσουλίνη, δείχνει να υπάρχει αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης η οποία όμως, εν αντίθεση με την προηγούμενη, δεν εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης. Τα δειγμάτα που έλαβαν θεραπεία με 25nM και 50nM οιστραδιόλη παρουσιάζουν ίδια επίπεδα έκφρασης, ενώ στο δείγμα στο οποίο χορηγήθηκε οιστραδιόλη 200nM η έκφραση γονιδίων μειώνεται, συγκριτικά με την 100nM.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επισκόπηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης, εκτός από την κατανόηση των πολλαπλών επιδράσεων της E2 έως στον μεταβολισμό και της συνεισφοράς της στην ανάπτυξη του T2D, ήταν να διερευνήσει την άμεση επίδραση της ορμόνης σε β-κύτταρα και την περιεκτικότητα σε ινσουλίνη, η οποία δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως σε έρευνες. Πιο συγκεκριμένα, ο στόχος της πειραματικής εργασίας που παρουσιάστηκε, ήταν να προσδιορίσει τις επιπτώσεις των διαφόρων

συγκεντρώσεων οιστραδιόλης στην έκφραση της ινσουλίνης σε κύτταρα INS-1, τα οποία είναι παγκρεατικά βήτα κύτταρα ποντικού. Αυτό έγινε με τη μέτρηση της έκφρασης της ινσουλίνης σε πρωτεϊνικό και γονιδιακό επίπεδο μετά τη θεραπεία των κυττάρων με διαφορετικές δόσεις οιστραδιόλης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο δείχνουν ότι η μηδενική υπόθεση επετεύχθη. Τόσο η ποσότητα της ινσουλίνης όσο και η γονιδιακή της έκφραση αυξήθηκε με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο μέχρι την συγκέντρωση E2 των 100Nm. Πέραν αυτής της συγκέντρωσης η παραγωγή πρωτεΐνης φτάνει σε ένα plateau.

4.2 Έκφραση γονιδίων ινσουλίνης-επίπεδο mRNA

Η αλλοίωση του επιπέδου έκφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης υπό τα ερεθίσματα της οιστραδιόλης μελετήθηκε με qRT-PCR σε πραγματικό χρόνο, επειδή αποδίδει γρήγορα και ακριβή δεδομένα με μικρή μόνο ποσότητα RNA. Η γονιδιακή έκφραση μετά τη θεραπεία με E2 όλων των δειγμάτων που έχουν υποστεί κατεργασία οιστραδιόλης με το (μη επεξεργασμένο) δείγμα έγινε σε συνάρτηση με έναν εσωτερικό μαρτυρά και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς αυτόν. Αναλυτικότερα, η κανονικοποίηση (fold change) που εμφανίζεται στο γράφημα 3.1 αντιπροσωπεύει την αναλογία της

έκφρασης του γονιδίου της ινσουλίνης για κάθε δείγμα που του χορηγήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα οιστραδιόλης προς την αναλογία της γονιδιακής έκφρασης του δείγματος ελέγχου (χωρίς θεραπεία με οιστραδιόλη). Οι εκκινητές της αντίδρασης ήταν η ινσουλίνη 1 και 2 επομένως υπάρχουν δύο ράβδοι για κάθε δείγμα. Η γονιδιακή έκφραση αυξήθηκε αναλογικά με την αυξημένη συγκέντρωση της οιστραδιόλης. Η αυξημένη ινσουλίνη υποδεικνύει τον ρυθμιστικό ρόλο της οιστραδιόλης στην έκφραση της ινσουλίνης. Ωστόσο, η γονιδιακή έκφραση έφτασε σε ένα plateau, πιθανώς λόγω του κορεσμού των υποδοχέων οιστρογόνων. Πιο συγκεκριμένα, η γονιδιακή έκφραση σε 100nM οιστραδιόλη και 200nM είναι ίση (2,2 φορές αύξηση σε σύγκριση με τον έλεγχο), πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει ένα όριο στις δράσεις της E2, και ως εκ τούτου στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης (πιθανώς λόγω κορεσμού των ERs). Για να εξασφαλιστεί ότι η οιστραδιόλη επηρεάζει την έκφραση γονιδιακής ινσουλίνης και όχι τον κυτταρικό πληθυσμό των β-κυττάρων, το πείραμα που διεξάγεται θα μπορούσε να περιλαμβάνει μια δοκιμασία που θα μετρά το ποσοστό διάδοσης με και χωρίς θεραπεία E2.

4.3 Έκφραση γονιδίων ινσουλίνης-επίπεδο πρωτεΐνης

Τα αποτελέσματα της WB εμφανίζονται στην εικόνα 3.1, όπου κάθε μπάντα αντιστοιχεί στις στοχευμένες πρωτεΐνες. Η πρώτη γραμμή των συγκροτημάτων αντιστοιχεί στην ινσουλίνη, ενώ η δεύτερη στο GAPDH. Το γεγονός ότι οι μπαντες του GAPDH είναι σχεδόν ίδια σε μέγεθος και στην ίδια γραμμή, υποδεικνύουν ότι η φόρτωση των δειγμάτων έγινε σωστά και ότι το πείραμα εκτελέστηκε επιτυχώς. Από την εικόνα, φαίνεται ότι η έκφραση της ινσουλίνης αυξάνεται με

τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση οιστραδιόλης. Ωστόσο, γενικά, τα αποτελέσματα της Western Blot είναι ημιποσοτικά και παρέχουν μόνο μια σχετική σύγκριση του επιπέδου των πρωτεϊνών. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο εκτελέστηκε η ανάλυση της μπάντας, να επιτρέπει τη σύγκριση της γονιδιακής έκφρασης. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν αυξημένη γονιδιακή έκφραση συγκρινόμενη με το μη επεξεργασμένο δείγμα, αλλά η αύξηση δεν ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της E2. Ωστόσο, οι διαφορές στη γονιδιακή έκφραση αυτών των δύο δειγμάτων από την αναμενόμενη δοσοεξαρτώμενη αύξηση είναι ασήμαντες και μπορεί να οφείλονται σε ανακρίβειες κατά τη φόρτωση των δειγμάτων.

4.4 Συσχέτιση με παρόμοιες μελέτες

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν δείχνουν ότι η έκφραση ινσουλίνης σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο αυξάνεται με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, μετά από θεραπεία β/κυττάρων που παράγουν ινσουλίνη από οιστραδιόλη. Η γονιδιακή έκφραση ινσουλίνης αυξήθηκε αναλογικά της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης. Η γονιδιακή έκφραση έφτασε σε ένα πλατώ, πιθανότατα ως αποτέλεσμα του κορεσμού των οιστρογονικών υποδοχέων.

Σε έρευνα που διεξήχθη σε θηλυκά ποντίκια, έδειξε ότι η ωθηκεκτομή μειώνει την έκκριση της ινσουλίνης όπως καθορίστηκε τόσο από την stain intensity σε β-κύτταρα όσο και στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφάση. Στα ίδια πειράματα, η οιστραδιόλη έδειξε να αντισταθμίζει τις δυσμενείς επιδράσεις που προκαλούνται απ τις γλυκοζαμίνες στα β-κύτταρα,

συμπεριλαμβανομένης και της εξασθενημένης λόγω γλυκοζαμίνης έκκριση ινσουλίνης.

Άλλη έρευνα (Soriano), έδειξε ότι η 17-β-οιστραδιόλη, σε φυσιολογικά επίπεδα, εμπλέκεται στη φυσιολογική λειτουργία των β-κυττάρων. Επιπλέον έδειξε ότι η μακρά έκθεση σε οιστραδιόλη αυξάνει την περιεκτικότητα, την γονιδιακή έκφραση και την απελευθέρωση της ινσουλίνης μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων α , καθώς γρήγορες απαντήσεις σε 17-β-β-οιστραδιόλη ρυθμίζουν τις αντλίες K (ATP) αυξάνοντας την απελευθέρωση ινσουλίνης απ τα β-κύτταρα.

Σε άλλη έρευνα (Nadal, 2009, The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes) έδειξαν ότι οιστρογονικοί υποδοχείς α και β υπάρχουν στα β-κύτταρα. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς α φάνηκε να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης ινσουλίνης, στην έκκρισή της και στην επιβίωση των β-κυττάρων. Αποδείχθηκε ότι η ενεργοποίηση των α οιστρογονικών υποδοχέων απ' την 17-β-οιστραδιόλη συμβάλλει στην αύξηση της βιοσύνθεσης της ινσουλίνης. Επιπλέον, έδειξε ότι η προκαλούμενη απ τη γλυκόζη έκκριση ινσουλίνης ενισχύθηκε από την οιστραδιόλη σε απομονωμένα β-κύτταρα. Οι β οιστρογονικοί υποδοχείς εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης στα β-κύτταρα. Σύμφωνα με αυτό, ένας αγωνιστής οιστρογονικού υποδοχέα β φάνηκε να είναι ινσουλινοτρόπο μέσο, ενισχύοντας την έκκριση ινσουλίνης από έκθεση σε γλυκόζη τόσο στα ποντίκια όσο και στους ανθρώπους.

Ο ανταγωνιστής οιστρογονικού υποδοχέα α (Ταμοξιφένη) έδειξε να προκαλεί Διαβήτη *in vitro* και *in vivo*. Έτσι η Ταμοξιφένη μπορεί να προκαλεί Διαβήτη. Οι Αναστολείς Αρωματάσης μειώνουν σαφώς τις συγκεντρώσεις οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες,

απενεργοποιώντας το ένζυμο αρωματάση, που είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση οιστρογόνων από ανδρογονικά υποστρώματα. Οι Αναστολείς Αρωματάσης δείχθηκε ότι προκαλούν μειωμένο μεταβολισμό της γλυκόζης ή ακόμα και αρχόμενο Διαβήτη σε γυναίκες με καρκίνο του Μαστού, αν και οι αναφορές είναι αμφιλεγόμενες. Παρ'όλ'αυτά, η σχέση μεταξύ θεραπείας με Αναστολείς Αρωματάσης και Διαβήτη συσχετίζεται με το θεμελιώδη ρόλο των οιστρογόνων και έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο και στον έλεγχο του ενεργειακού μεταβολισμού.

4.5 Κλινική σημασία

Τα ρυθμιστικά αποτελέσματα της E2 ως προς την ευαισθησία και την αντοχή στην ινσουλίνη, τη λειτουργία β-κυττάρων, την πρόσληψη γλυκόζης, τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής, τη διανομή λίπους και άλλων μεταβολικών διεργασιών, όπως υποδηλώνουν οι περισσότερες διαθέσιμες μελέτες, είναι αδιάψευστα. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η E2 και οι υποδοχείς της θεωρούνται φαρμακολογικοί στόχοι με δυνατότητα καταπολέμησης του διαβήτη και σχετικών μεταβολικών διαταραχών. Ωστόσο, οι συνθήκες υπό τις οποίες η E2 έχει ευεργετική ή επιβλαβή δράση εξακολουθούν να είναι αμφιλεγόμενες (Nadal et al 2009,) (Ropero et al., 2008). Πιστεύεται ότι το αποτέλεσμα της δράσης της E2 εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της, το φύλο και τον ιστό, και δεδομένου ότι τα οιστρογόνα έχουν ένα σχετικά στενό θεραπευτικό δείκτη, η πρόκληση με μακροχρόνια φαρμακευτική αγωγή είναι να αποφευχθούν οι παρενέργειες. Για παράδειγμα, υπερβολική E2 μπορεί να είναι τόσο επιβλαβής όσο και η ανεπάρκεια της και να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη, ή μπορεί να οδηγήσει στην εξέλιξη των επιθετικών καρκίνων (Mauvais-Jarvos, Clegg και Hevener, 2013)

Η εξεύρεση των κατάλληλων συνθηκών, στις οποίες η E2 ασκεί μόνο τα ευεργετικά αποτελέσματά της, είναι πολύ σημαντικό για την αντιμετώπιση των μεταβολικών διαταραχών και του T2D, ειδικά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Θα ήταν χρήσιμο στο μέλλον, να παρακολουθηθούν κλινικά ασθενείς με καρκίνο Μαστού, στις οποίες χορηγείται αντιορμονική θεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης, και να ελεγχθεί αν πράγματι υπάρχει τάση να αυξάνεται η γλυκόζη του ορού του αίματος ή ακόμα και η εκδήλωση T2D στην πορεία της θεραπείας.

4.6 Χορήγηση οιστρογόνων και μεταβολισμός

Οι πρόσφατες διαθέσιμες θεραπείες υποκατάστασης οιστρογόνων έχουν μερικές ευεργετικές επιδράσεις στην πρόληψη ασθενειών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Παρολαυτά παρουσιάζουν εν μέρει κάποιες παρενέργειες ιδιαίτερα αν η δόση δεν είναι η κατάλληλη. Ο οιστρογονικός τύπος και ο τρόπος χορήγησης είναι παράγοντες που επηρεάζουν το κλινικό αποτέλεσμα. Το φυσικό οιστρογόνο είναι η E2 και είναι διαθέσιμο σε διάφορες μορφές όπως από το στόματος, κρέμες και γέλη. Σε αντίθεση με τα κλασικά απ' του στόματος χορηγούμενα οιστρογόνα, τα διαδερμικώς χορηγούμενα παρακάμπτουν τον μεταβολισμό στο ήπαρ με αποτέλεσμα να διατηρούν σταθερά επίπεδα στον ορό του αίματος. Επιπλέον, η ενδοδερμική χορήγηση E2 σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι ασφαλής και αποτελεσματική, επειδή μιμείται τη φυσιολογική κατάσταση, κατά την οποία τα οιστρογόνα διαχέονται στην συστηματική κυκλοφορία. Επιπρόσθετα, τα από του στόματος οιστρογόνα (E2), όπως το συζευγμένο αλογοειδές οιστρογόνο (CCG), το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε ελεγχόμενες με

placebo δοκιμές, έχει υψηλότερη ευεργετική μεταβολική επίδραση, με καλύτερη καταστολή της ηπατικής αντίστασης στην ινσουλίνη στα ποντίκια.

Παρ' ολ' αυτά, η CCG αναφέρεται ότι συσχετίζεται με την αύξηση των τριγλυκεριδίων και των προφλεγμονώδων δεικτών, επιδράσεις τις οποίες η διαδερμική E2 δεν εμφανίζει. Άλλα απ' του στόματος χορηγούμενα οιστρογόνα αναφέρεται ότι επιδεινώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σε μια έρευνα η οποία ανέλυσε την επίδραση της θεραπείας υποκατάστασης οιστρογόνων σε 100 δοκιμές σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, κατέληξαν ότι τόσο τα από του στόματος χορηγούμενα οιστρογόνα όσο και τα διαδερμικώς χορηγούμενα αυξάνουν το LBM, μειώνουν το κοιλιακό λίπος, βελτιώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, μειώνουν την αρτηριακή πίεση, το λόγο LDL/HDL και τον χοληστερολαιμικό δείκτη σε μη διαβητικές γυναίκες.

Στις διαβητικές γυναίκες, τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια, με επιπρόσθετη επίδραση στην μείωση των επιπέδων γλυκόζης αίματος.

4.7 Θεραπευτικές προοπτικές

Μία πολλα υποσχόμενη προσέγγιση για την θεραπεία την έλλειψης E2 είναι στοχευμένη θεραπευτική στρατηγική. Αυτό απαιτεί την εις βάθος γνώση του μηχανισμού δράσης της E2 και των επιδράσεων της στους ιστούς. Η διευκρίνιση όλων των άγνωστων πτυχών της δράσης της E2 θα βοηθήσει στην ανάπτυξη οιστρογονικών ή ομοίων των οιστρογόνων φαρμάκων που θα επηρεάζουν αποκλειστικά ιστούς που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης και θα παρέχουν τις επιθυμητές δράσεις χωρίς παρενέργειες.

Πρόσφατα, υπάρχουν δύο στοχευμένες θεραπείες με E2 που είναι ακόμα σε κλινικό στάδιο. Υπάρχουν επιλεκτικά ιστο-οιστρογονικά συμπλέγματα (TSECs) (Komm, 2008) (Kharode et al., 2008) και συζευγμένα οιστρογόνα με glucagon-like peptide-1 (GLP-1), που έδειξαν να έχουν θετικές επιδράσεις για να ασχοληθεί με τον διαβήτη και τη συννοσηρότητα σε ποντίκια.

Ειδικά, GPL-1 συζευγμένη E2 έδειξε να έχει αντίστροφη επίδραση στην παχυσαρκία, στην υπεργλυκαιμία και στην δυσλιπιδαιμία στα ποντίκια. (Finan et al., 2012) (Tiano et al., 2015). Παρ'όλ'αυτά, αυτές οι θεραπείες δεν έχουν ακόμα διερευνηθεί στους ανθρώπους για το αν χρειάζονται περαιτέρω βελτίωση. (Mauvais-Jarvis, Clegg and Hevener, 2013).

Η βελτίωση των στοχευμένων θεραπειών απαιτεί την διερεύνηση όλων των λειτουργιών της E2 καθώς και τις ιδιαιτερότητες των ιστών και των ειδικών λειτουργιών που ενεργοποιούν σε κάθε ιστό. Έμφαση πρέπει να δοθεί στις ειδικές επιδράσεις της E2 στους ιστούς. Ειδικά, ο τρόπος με τον οποίο η E2 ρυθμίζει το ενεργειακό ισοζύγιο μέσω της δράσης της σε διάφορα κύτταρα και όργανα, όπως τα παγκρεατικά νησίδια και τα β-κύτταρα, οι σκελετικοί μύες, το ήπαρ χρήζουν περαιτέρω έρευνας. Ο λειτουργικός ρόλος της E2 και ο μηχανισμός δράσης της ιδιαίτερα στα β-κύτταρα και στους σκελετικούς μύες είναι πολύ σημαντικός στη διερεύνηση των ανωμαλιών ινσουλίνης και απαιτεί επιπλέον έρευνα. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της περιοχής του εγκεφάλου όπου τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους ρυθμίζουν το αίσθημα της όρεξης και το σωματικό βάρος θα ήταν πολύ χρήσιμο για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα οιστρογόνα και ERs έχουν συνδεθεί με διάφορες πτυχές του μεταβολισμού. Σε αυτή την πειραματική μελέτη αποδείχθηκε ότι η έκφραση γονιδιακής ινσουλίνης ενισχύεται από τη δράση της E2 στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Εκτός από τα β-κύτταρα, η E2 έχει επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζει πολλούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ομοιόσταση και το μεταβολισμό της γλυκόζης. Ωστόσο, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η E2

επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση είναι ακόμα ασαφείς. Ποικίλες διαταραχές που σχετίζονται με την αντοχή στην ινσουλίνη είναι συνήθως καλά θεραπεύσιμες με την υποκατάσταση οιστραδιόλης, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί αρνητικές επιδράσεις των οιστρογόνων. Λαμβανομένων υπόψη των ευεργετικών αποτελεσμάτων της θεραπείας αντικατάστασης οιστραδιόλης σε διάφορες ασθένειες, θα πρέπει να κατανοήσουμε το δίκτυο των οδών μεταγωγής σημάτων ER και να αναπτύξουμε νέες ενώσεις που στοχεύουν στην σηματοδότηση των οιστρογόνων σε εκλεκτικούς μεταβολικούς ιστούς, χωρίς αρνητικά αποτελέσματα σε άλλους ιστούς. Παρόλο που η υποκατάσταση οιστρογόνου μπορεί να είναι ευεργετική για ασθενείς με T2D και υπεραμφικαμψίες, ενίσχυση της έκφρασης της ινσουλίνης και υπερβολική διέγερση β-κυττάρων για παρατεταμένη περίοδο, με υπερβολική οιστραδιόλη παράγει στρες ενδοπλασματικό και οδηγεί το β-κύτταρο σε απόπτωση και ως εκ τούτου, διαβήτη. Τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα μιμούνται τις επιδράσεις των οιστρογόνων και είναι πιθανοί υποψήφιοι για να επιδεινώσουν και να επιταχύνουν την ανάπτυξη του T2D, και έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος και αντοχή στην ινσουλίνη, και θα πρέπει να αποφεύγονται (Nadal et al., 2009). Είναι πολύ πιθανό ότι τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα μιμούνται τις επιδράσεις της οιστραδιόλης σε όλους τους ιστούς, και θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για να διερευνηθεί η επίδρασή τους.

Τέλος, η θεραπεία του T2D, η οποία είναι μια πολυορμονική νόσος, απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Η ταυτοποίηση των μοριακών στόχων απαιτείται για τον περιορισμό της ανάπτυξης μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου. Η

οιστραδιόλη, η οποία πρόσφατα προέκυψε ως σημαντικός ρυθμιστής της ομοιοστάσης της γλυκόζης πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω.

6. ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η διεκπεραίωση της παρούσας Διατριβής συνέβαλε στην κατανόηση σε κυτταρικό επίπεδο των αλλαγών που συμβαίνουν στα β παγκρεατικά κύτταρα και κατ'επέκταση στην έκκριση ινσουλίνης ανάλογα με τα επίπεδα των οιστρογόνων στο αίμα.

Τα αποτελέσματα της Διατριβής μπορούν να φανούν χρήσιμα στη διερεύνηση της ανάπτυξης Διαβήτη Τύπου 2 σε γυναίκες με Καρκίνο Μαστού, οι οποίες υπόκεινται σε αντιορμονική θεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης, υπό την οποία τα επίπεδα οιστρογόνων στο αίμα μειώνονται εντυπωσιακά.

Θα ήταν επομένως σκόπιμο μελλοντικά, να ερευνηθεί, σε κλινικό πλέον επίπεδο, η μεταβολή των επιπέδων σακχάρου του αίματος καθώς και ο κίνδυνος ανάπτυξης Διαβήτη Τύπου 2, σε γυναίκες με Καρκίνο Μαστού που υπόκεινται σε αντιορμονική θεραπεία με Αναστολείς Αρωματάσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adachi, T., Yasuda, K., Mori, C., Yoshinaga, M., Aoki, N., Tsujimoto, G. and Tsuda, K. (2005). Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 43(5), pp.713-719.
2. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A., Carrera, M., Cederroth, C., Baquié M., Gauthier, B., Nef, S., Stefani, E. and Nadal, A. (2008). Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ERα

PLoS ONE, 3(4), p.e2069.

3. Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. and Nadal, A. (2005). The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic β -Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environ Health Perspect*, 114(1), pp.106-112.

4. American Diabetes Association, (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 34(Supplement_1), pp.S62-S69.

5. Aronoff, S., Berkowitz, K., Shreiner, B. and Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), pp.183-190.

6. Anderson, G., Chlebowski, R., Aragaki, A., Kuller, L., Manson, J., Gass, M., Bluhm, E., Connelly, S., Hubbell, F., Lane, D., Martin, L., Ockene, J., Rohan, T., Schenken, R. and Wactawski-Wende, J. (2012). Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, 13(5), pp.476-486.

8. Andersson, B., Johannsson, G., Holm, G., Bengtsson, B., Sashegyi, A., Pavo, I., Mason, T. and Anderson, P. (2002). Raloxifene Does Not Affect Insulin Sensitivity or Glycemic Control in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Clinical Trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), pp.122-128.

9. Barrett-Connor, E., Ensrud, K., Harper, K., Mason, T., Sashegyi, A., Krueger, K. and Anderson, P. (2003). Post hoc analysis of data from the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) trial on the effects of three years of raloxifene treatment on glycemic control and cardiovascular disease risk factors in women with and

- without type 2 diabetes. *Clinical Therapeutics*, 25(3), pp.919-930.
10. Barros, R., Machado, U. and Gustafsson, J. (2006). Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), pp.425-431.
11. Barros, R., Gabbi, C., Morani, A., Warner, M. and Gustafsson, J. (2009). Participation of ER and ER in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 297(1), pp.E124-E133.
12. Bertram, R., Sherman, A. and Satin, L. (2010). Electrical Bursting, Calcium Oscillations, and Synchronization of Pancreatic Islets. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, [online] 654, pp.261-279. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3120131/> [Accessed 15 Feb. 2016].
13. Björnström, L. and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), p.833842.
- Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J., Galuska, D., Steiler, T., Dahlman-Wright, K., Nilsson, S., Gustafsson, J., Efendic, S. and Khan, A. (2006). Evidence that oestrogen receptor alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia*, 49(3), pp.588-597.
14. Bustin S. (ed) (2004) A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California.
15. Bustin, S. (2005). Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), pp.597-601.
16. Chang, L., Chiang, S. and Saltiel, A. (2004). Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Molecular Medicine*, [online] 10(7-12), pp.65-71. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1431367/> [Accessed 10 Feb. 2016].

17. Choi, K., Shin, J., Lee, J., Kim, Y., Kim, S. and Kim, C. (2005). In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(4), pp.1299-1305.

18. Chu, M., Cosper, P., Nakhuda, G. and Lobo, R. (2006). A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertility and Sterility*, 86(6), pp.1669-1675.

19. Chu, M., Cushman, M., Solomon, R. and Lobo, R. (2008). Metabolic syndrome in postmenopausal women: the influence of oral or transdermal estradiol on inflammation and coagulation markers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5), pp.526.e1-526.e7.

20. Clegg, D., Brown, L., Woods, S. and Benoit, S. (2006). Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin. *Diabetes*, 55(4), pp.978-987.

21. Cobin, R. (2005). Polycystic Ovarian Syndrome and Insulin Resistance: Implications for Estrogen Use in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 3(3), pp.259-269.

22. Cooke, P., Heine, P., Taylor, J. and Lubahn, D. (2001). The role of estrogen and estrogen receptor alpha in male adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1-2), pp.147-154.

23. Coskun, U., Toruner, F. and Gunel, N. (2002). Tamoxifen therapy and hepatic steatosis. *Neoplasma*, 1(49), pp.61-62.

24. Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 367(9513), pp.847-858.

25. Dean, L. and McEntyre, J. (2004). *The genetic landscape of diabetes*. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information [online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1667/> [Accessed 15.Feb 2016]
26. Ding, E., Song, Y., Manson, J., Rifai, N., Buring, J. and Liu, S. (2007). Plasma sex steroid hormones and risk of developing type 2 diabetes in women: a prospective study. *Diabetologia*, 50(10), pp.2076-2084.
27. Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Hohmann, S., Hartge, M., Sprang, C., Frost, N., Krikov, M., Bhanot, S., Barros, R., Morani, A., Gustafsson, J., Unger, T. and Kintscher, U. (2008). Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ER β) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPAR γ . *PLoS Genetics*, 4(6), p.e1000108.
- Francucci, C., Pantaleo, D., Iori, N., Camilletti, A., Massi, F. and Boscaro, M. (2005). Effects of raloxifene on body fat distribution and lipid profile in healthy post-menopausal women. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28(9), pp.623-631.
28. Gallagher, C., Langefeld, C., Gordon, C., Campbell, J., Mychalecky, J., Bryer-Ash, M., Rich, S., Bowden, D. and Sale, M. (2007). Association of the Estrogen Receptor Alpha Gene With the Metabolic Syndrome and Its Component Traits in African-American Families: The Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Diabetes*, 56(8), pp.2135-2141.
29. Godsland, I. (2005). Oestrogens and insulin secretion. *Diabetologia*, 48(11), pp.2213-2220.
30. Gupte, A., Pownall, H. and Hamilton, D. (2015). Estrogen: An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function. *Journal of Diabetes Research*, 2015, pp.1-9.

31. Hall, J., Couse, J. and Korach, K. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), pp.36869-36872.
32. Heine, P., Taylor, J., Iwamoto, G., Lubahn, D. and Cooke, P. (2000). Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), pp.12729-12734.
33. Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M. and Gustafsson, J. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), pp.905-931.
- Huang, S. and Czech, M. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), pp.237-252.
34. Kaaja, R. (2005). Manifestations of Chronic Disease During Pregnancy. *JAMA*, 294(21), p.2751.
35. Kang, H., Yang, H., Kang, H., Hong, E. and JEUNG, e. (2014). Effects of xenoestrogens on streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(2), pp.273-282.
36. Kapur, A., Schmidt, M. and Barcelo, A. (2015). Diabetes in Socioeconomically Vulnerable Populations. *International Journal of Endocrinology*, 2015, pp.1-2.
37. Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C., Simpson, E., Korach, K., Tsai, M. and Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), pp.9232-9237.
38. Lipscombe, L., Fischer, H., Yun, L., Gruneir, A., Austin, P., Paszat, L., Anderson, G. and Rochon, P. (2012). Association between tamoxifen treatment and diabetes: a population based study. *Cancer*,

118(10), pp.2615-2622.

39. Lopez, M., Lelliott, C., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., Blount, M., Vazquez, M., Finer, N., Powles, T., O'Rahilly, S., Saha, A., Dieguez, C. and Vidal-Puig, A. (2006). Tamoxifen-Induced Anorexia Is Associated With Fatty Acid Synthase Inhibition in the Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus and Accumulation of Malonyl-CoA. *Diabetes*, 55(5), pp.1327-1336.

40. Liu, D. (2009). *Handbook of nucleic acid purification*. Boca Raton: CRC Press. p111-112.

41. Lundholm, L., Bryzgalova, G., Gao, H., Portwood, N., Falt, S., Berndt, K., Dicker, A., Galuska, D., Zierath, J., Gustafsson, J., Efendic, S., Dahlman-Wright, K. and Khan, A. (2008). The estrogen receptor α -selective agonist propyl pyrazole triol improves glucose tolerance in ob/ob mice; potential molecular mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 199(2), pp.275-286.

42. Marieb, E. and Hoehn, K. (2013). *Human Anatomy and Physiology*. 9th ed. Boston: Pearson Education Inc., pp.618-620.

Marino, M., Galluzzo, P. and Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *CG*, 7(8), pp.497-508.

43. Martensson, U., Salehi, S., Windahl, S., Gomez, M., Swärd, K., Daszkiewicz-Nilsson, J., Wendt, A., Andersson, N., Hellstrand, P., Grande, P., Owman, C., Rosen, C., Adamo, M., Lundquist, I., Rorsman, P., Nilsson, B., Ohlsson, C., Olde, B. and Leeb-Lundberg, L. (2009). Deletion of the G Protein-Coupled Receptor 30 Impairs Glucose Tolerance, Reduces Bone Growth, Increases Blood Pressure, and Eliminates Estradiol-Stimulated Insulin Release in Female Mice. *Endocrinology*, 150(2), pp.687-698.

44. Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D. and Hevener, A. (2013). The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. *Endocrine Reviews*, 34(3), pp.309-338.
45. Meli, R., Pacilio, M., Raso, G., Esposito, E., Coppola, A., Nasti, A., Di Carlo, C., Nappi, C. and Di Carlo, R. (2004). Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats. *Endocrinology*, 145(7), pp.3115-3121.
46. Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D., Mobbs, C., Yang, X., Clegg, D., Kaplitt, M. and Ogawa, S. (2007). Silencing of estrogen receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), pp.2501-2506.
47. Naaz, A., Zakroczymski, M., Heine, P., Taylor, J., Saunders, P., Lubahn, D. and Cooke, P. (2002). Effect of Ovariectomy on Adipose Tissue of Mice in the Absence of Estrogen Receptor Alpha (ER α): a Potential Role for Estrogen Receptor Beta (ER β). *Hormone and Metabolic Research*, 34(11/12), pp.758-763.
48. Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I. and Ropero, A. (2009). The pancreatic β -cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1-2), pp.63-68.
- Nagamani, M., Szymajda, A., Sepilian, V., Urban, R. and Gilkison, C. (2008). Effects of raloxifene on insulin sensitivity, β -cell function, and hepatic insulin extraction in normal postmenopausal women. *Fertility and Sterility*, 89(3), pp.614-619.
49. Nishino, M., Hayakawa, K., Nakamura, Y., Morimoto, T. and Mukaihara, S. (2003). Effects of Tamoxifen on Hepatic Fat Content and the Development of Hepatic Steatosis in Patients with Breast

Cancer: High Frequency of Involvement and Rapid Reversal After Completion of Tamoxifen Therapy. *American Journal of Roentgenology*, 180(1), pp.129-134.

50. Ogawa, S., Chan, J., Gustafsson, J., Korach, K. and Pfaff, D. (2003). Estrogen Increases Locomotor Activity in Mice through Estrogen Receptor α : Specificity for the Type of Activity. *Endocrinology*, 144(1), pp.230-239.

51. Olokoba, A., Obateru, O. and Olokoba, L. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Medical Journal*, 27(4), pp.269-273.

52. Penza, M., Montani, C., Romani, A., Vignolini, P., Pampaloni, B., Tanini, A., Brandi, M., Alonso-Magdalena, P., Nadal, A., Ottobrini, L., Parolini, O., Bignotti, E., Calza, S., Maggi, A., Grigolato, P. and Di Lorenzo, D. (2006). Genistein Affects Adipose Tissue Deposition in a Dose-Dependent and Gender-Specific Manner. *Endocrinology*, 147(12), pp.5740-5751.

53. Ribas, V., Drew, B., Le, J., Soleymani, T., Daraei, P., Sitz, D., Mohammad, L., Henstridge, D., Febbraio, M., Hewitt, S., Korach, K., Bensinger, S. and Hevener, A. (2011). Myeloid-specific estrogen receptor deficiency impairs metabolic homeostasis and accelerates atherosclerotic lesion development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), pp.16457-16462.

54. Ribas, V., Nguyen, M., Henstridge, D., Nguyen, A., Beaven, S., Watt, M. and Hevener, A. (2009). Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ER -deficient mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 298(2), pp.E304-E319.

55. Ropero, A., Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., and Nadal, A. (2008). The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids*, 73(9-10), pp.874-879.

56. Rosen, E. and Spiegelman, B. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), pp.847-853.
57. Salpeter, S., Walsh, J., Ormiston, T., Greyber, E., Buckley, N. and Salpeter, E. (2006). Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab*, 8(5), pp.538-554.
58. Shin, J., Hur, J., Seo, H., Jeong, Y., Lee, J., Oh, M., Kim, T., Saw, H. and Kim, S. (2007). The ratio of estrogen receptor α to estrogen receptor β in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 72(6-7), pp.592-599.
59. Skelin, M., Rupnik, M. and Cencic, A. (2010). Pancreatic Beta Cell Lines and their Applications in Diabetes Mellitus Research. *ALTEX*, 27(2), pp.105-113.
60. Smith, E., Boyd, J., Frank, G., Takahashi, H., Cohen, R., Specker, B., Williams, T., Lubahn, D. and Korach, K. (1995). Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 50(3), pp.201-204.
- Smith, I. and Dowsett, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*, 348(25), pp.2431-2442.
61. Solomon, C. (2001). Long or Highly Irregular Menstrual Cycles as a Marker for Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA*, 286(19), p.2421.
62. Soriano, S., Roperio, A., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Quesada, I., Gassner, B., Kuhn, M., Gustafsson, J. and Nadal, A. (2009). Rapid Regulation of K ATP Channel Activity by 17 β -Estradiol in Pancreatic β -Cells Involves the Estrogen Receptor β and the Atrial Natriuretic Peptide Receptor. *Molecular Endocrinology*, 23(12), pp.1973-1982.

63. Szablewski, L. (2011). *Glucose homeostasis and insulin resistance*. [Saif Zone, Sharjah, United Arab Emirates]: Bentham Science Publishers. p22- 174
64. Szoke, E. and Gerich, J. (2005). Role of impaired insulin secretion and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Compr Ther*, 31(2), pp.106-112.
65. Tarasov, A., Dusonchet, J. and Ashcroft, F. (2004). Metabolic Regulation of the Pancreatic Beta-Cell ATP-Sensitive K⁺ Channel: A Pas de Deux. *Diabetes*, 53(Supplement 3), pp.S113-S122.
66. Tiano, J. and Mauvais-Jarvis, F. (2012). Selective estrogen receptor modulation in pancreatic β -cells and the prevention of type 2 diabetes. *Islets*, 4(2), pp.173-176.
67. Tommaselli, G., Di Carlo, C., Di Spiezio Sardo, A., Bifulco, G., Cirillo, D., Guida, M., Capasso, R. and Nappi, C. (2006). Serum leptin levels and body composition in postmenopausal women treated with tibolone and raloxifene. *Menopause*, 13(4), pp.660-668.
68. Van Belle, T., Coppieters, K. and Von Herrath, M. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiological Reviews*, 91(1), pp.79-118.
69. Walker, J. (2009). *The protein protocols. Ed. 3rd. London: Springer. P11-15*
70. Yi, P., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R. and Muyan, M. (2002). Differences in the Abilities of Estrogen Receptors to Integrate Activation Functions Are Critical for Subtype-Specific Transcriptional Responses. *Molecular Endocrinology*, 16(8), pp.1810-1827.
71. Zirilli, L., Rochira, V., Diazzi, C., Caffagni, G. and Carani, C. (2008). Human models of aromatase deficiency. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3-5), pp.212-218.

Fechner R. Mills S. Breast Pathology, Benign Proliferation, Atypias and in situ carcinomas. ASCP Press Chicago 1990

72. Patchefsky AS, Schwartz GF, Finkelstein SD. Heterogeneity of intraductal carcinoma of the breast disease. *Cancer* 63: 731-741, 1989

Warner NE. Lobular carcinoma of the breast. *Cancer* 23: 840, 1985

Powell DE, Stelling CB. The diagnosis and detection of breast disease. Masby- Year Book, Inc St. Louis 1994

Page DL, Dixon JM, Anderson TJ. Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 7: 525, 1983

73. Lagios MS, Rose MR, Margoln F. Tubular carcinoma of the breast. Association with multicentricity, bilaterality and family history of mammary carcinoma. *Am J Clin Pathol* 73: 25-30, 1980

Lucas FV, Perez Mesa C. Inflammatory carcinoma breast. *Cancer* 41: 1595, 1978

74. Markopoulos C, Gogas H, Livaditou A, Floros D. Mucoepidermoid carcinoma breast. *European Journal of Gynecological Oncology* 18: 495-6, 1997

75. Halsted WS. I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg.* 1907 Jul;46(1):1-19. doi: 10.1097/00000658-190707000-00001. PMID: 17861990; PMCID: PMC1414357.

76. Halsted WS. I. A Clinical and Histological Study of certain Adenocarcinomata of the Breast: and a Brief Consideration of the Supraclavicular Operation and of the Results of Operations for Cancer of the Breast from 1889 to 1898 at the Johns Hopkins Hospital. *Ann Surg.* 1898 Nov;28(5):557-76. PMID: 17860646; PMCID: PMC1427166.

77. PATEY DH, DYSON WH. The prognosis of carcinoma of the breast in relation to the type of operation performed. *Br J Cancer.* 1948

Mar;2(1):7-13. doi: 10.1038/bjc.1948.2. PMID: 18863724; PMCID: PMC2007539.

78. Cady B, Stone MD, Wayne J. New therapeutic possibilities in primary invasive breast cancer. *Ann Surg.* 1993 Sep;218(3):338-47; discussion 347-9. doi: 10.1097/00000658-199309000-00013. PMID: 8373276; PMCID: PMC1242976.

79. Cady B. Risk of recurrence after treatment of early breast cancer with skin-sparing mastectomy: another editorial perspective. *Ann Surg Oncol.* 1998 Mar;5(2):103-4. doi: 10.1007/BF02303840. PMID: 9625607.

80. Beechey-Newman N. Sentinel node biopsy: a revolution in the surgical management of breast cancer? *Cancer Treat Rev.* 1998 Jun;24(3):185-203. doi: 10.1016/s0305-7372(98)90049-4. PMID: 9767734.

81. Argenta LC. Reconstruction of the breast by tissue expansion. *Clin Plast Surg.* 1984 Apr;11(2):257-64. PMID: 6723196.

82. Schefflan M, Dinner MI. The transverse abdominal island flap: Part II. Surgical technique. *Ann Plast Surg.* 1983 Feb;10(2):120-9. doi: 10.1097/00000637-198302000-00007. PMID: 6838117.

83. Rainsbury RM. Breast-sparing reconstruction with latissimus dorsi miniflaps. *Eur J Surg Oncol.* 2002 Dec;28(8):891-5. doi: 10.1053/ejso.2002.1350. PMID: 12477482.

84. Fisher B, Anderson S, Redmond CK, Wolmark N, Wickerham DL, Cronin WM. Reanalysis and results after 12 years of follow-up in a randomized clinical trial comparing total mastectomy with lumpectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1995 Nov 30;333(22):1456-61. doi: 10.1056/NEJM199511303332203. PMID: 7477145.

85. Veronesi U, Luini A, Galimberti V, Zurrada S. Conservation approaches for the management of stage I/II carcinoma of the breast: Milan Cancer Institute trials. *World J Surg.* 1994 Jan-Feb;18(1):70-5. doi: 10.1007/BF00348194. PMID: 8197779.
86. Lichter AS, Fraass BA, Yanke B. Treatment Techniques in the Conservative Management of Breast Cancer. *Semin Radiat Oncol.* 1992 Apr;2(2):94-106. doi: 10.1053/SRAO00200094. PMID: 10717023.
87. Ragaz J, Jackson SM, Le N, Plenderleith IH, Spinelli JJ, Basco VE, Wilson KS, Knowling MA, Coppin CM, Paradis M, Coldman AJ, Olivotto IA. Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in node-positive premenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med.* 1997 Oct 2;337(14):956-62. doi: 10.1056/NEJM199710023371402. PMID: 9309100.
88. Μαρκόπουλος Χ: Ορμονικοί Υποδοχείς στο Καρκίνο του Μαστού. *Ιατρική*, 64(1):1-7,1993
89. Markopoulos C, Berger U, Wilson P, Gazet JC, Coombes RC. Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988 May 14;296(6633):1349-51. doi: 10.1136/bmj.296.6633.1349. PMID: 3134982; PMCID: PMC2545825.
90. Jackson IM, Lowery C. Clinical rise of anti-oestrogens. In Furr BJA, Wakeling AE (eds). *Pharmacology and clinical uses of inhibitors of Hormone secretion and Action.* Builiere, Tindall and Cox, London, pp87-105, 1987.
91. The ATAC Trialist Group-Anastrazol alone or in combination with Tamoxifen versus Tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early cancer:first results of the ATAC randomized trial. *Lancet* 359: 2131-2139, 2002

92. Coombes RC et al; Intergroup Exemestane Study. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):1081-92. doi: 10.1056/NEJMoa040331. Erratum in: *N Engl J Med.* 2004 Dec 2;351(23):2461. Erratum in: *N Engl J Med.* 2006 Oct 19;355(16):1746. van de Velde, Cornelius [added]. PMID: 15014181.
93. Veronesi U, Sacrosi R, Del Vecchio M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med* 305:6-11, 1981
94. Recht A and Houlihan MJ: Axillary lymph nodes and breast Cancer *Cancer* 75:1491-1512, 1995
95. Giuliano AE, Sentinel lymphadenectomy in primary breast carcinoma: an alternative to routine axillary dissection. *J Surg Oncol* 62:75-77, 1996
96. Kunovac Kallak T, Baumgart J, Stavreus Evers A, Sundström Poromaa I, Moby L, Kask K, Norjavaara E, Kushnir MM, Bergquist J, Nilsson K. Higher than expected estradiol levels in aromatase inhibitor-treated, postmenopausal breast cancer patients. *Climacteric.* 2012 Oct;15(5):473-80. doi: 10.3109/13697137.2011.642427. Epub 2012 Feb 11. PMID: 22324859.

