

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ



**ΘΕΜΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΟΣ  
ΜΑΚΡΟΥ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ RNA (LNCrNA) ΩΣ  
ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**Ιωάννης Ψαθάς**

Ιατρός - Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2024

**ΘΕΜΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΟΣ  
ΜΑΚΡΟΥ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ RNA (LNCRNA) ΗΟΤΤΙΡ ΩΣ  
ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ



**ΘΕΜΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΟΣ  
ΜΑΚΡΟΥ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ RNA (LNCRNA) ΗΟΤΤΙΡ ΩΣ  
ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

**Ιωάννης Ψαθάς**

Ιατρός - Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ, 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Καθηγητής Χειρουργικής, Κακλαμάνος Ιωάννης (Επιβλέπων)
2. Καθηγητής Χειρουργικής, Μπονάτσος Γεράσιμος
3. Καθηγητής Χειρουργικής, Μπίρμπας Κωνσταντίνος

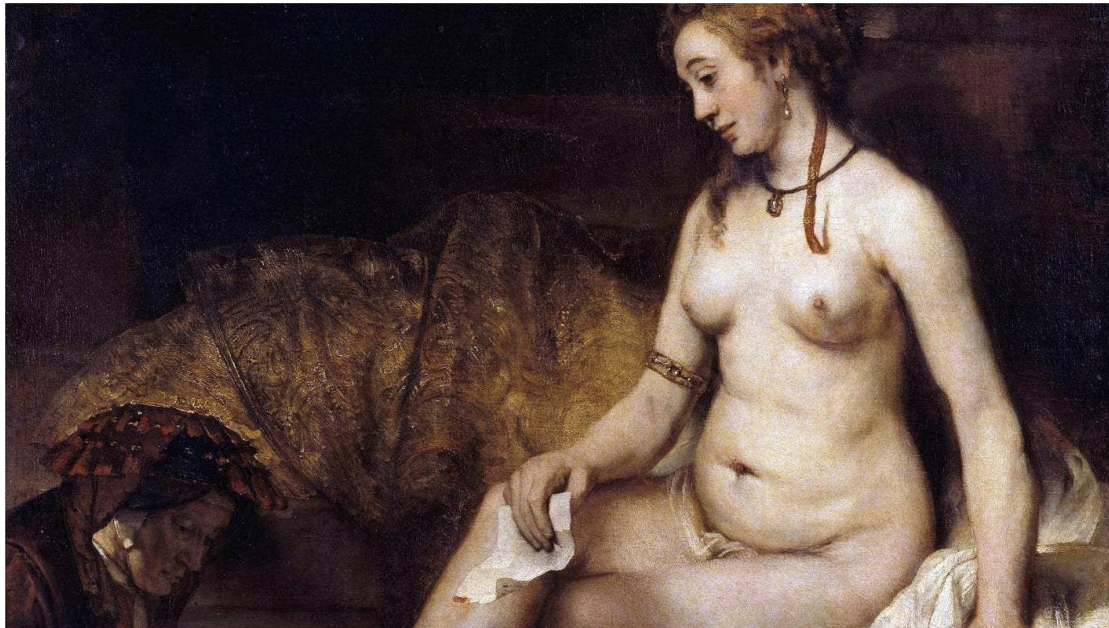
Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Καθηγητής Χειρουργικής, Κακλαμάνος Ιωάννης (Επιβλέπων)
2. Καθηγητής Χειρουργικής, Μπονάτσος Γεράσιμος
3. Καθηγητής Χειρουργικής, Μπίρμπας Κωνσταντίνος
4. Καθηγητής Χειρουργικής, Τούτουζας Κωνσταντίνος
5. Καθηγητής Βιολογίας – Βιολογίας συμπεριφοράς, Σταματάκης Αντώνιος
6. Αναπληρωτής Καθηγητής Ανατομίας, Μαριόλης – Σαψάκος Θεόδωρος
7. Επίκουρος Καθηγητής Ερευνητικής Μεθοδολογίας και Νοσηλευτικής βάσει Τεκμηρίων, κ. Γαλάνης Πέτρος

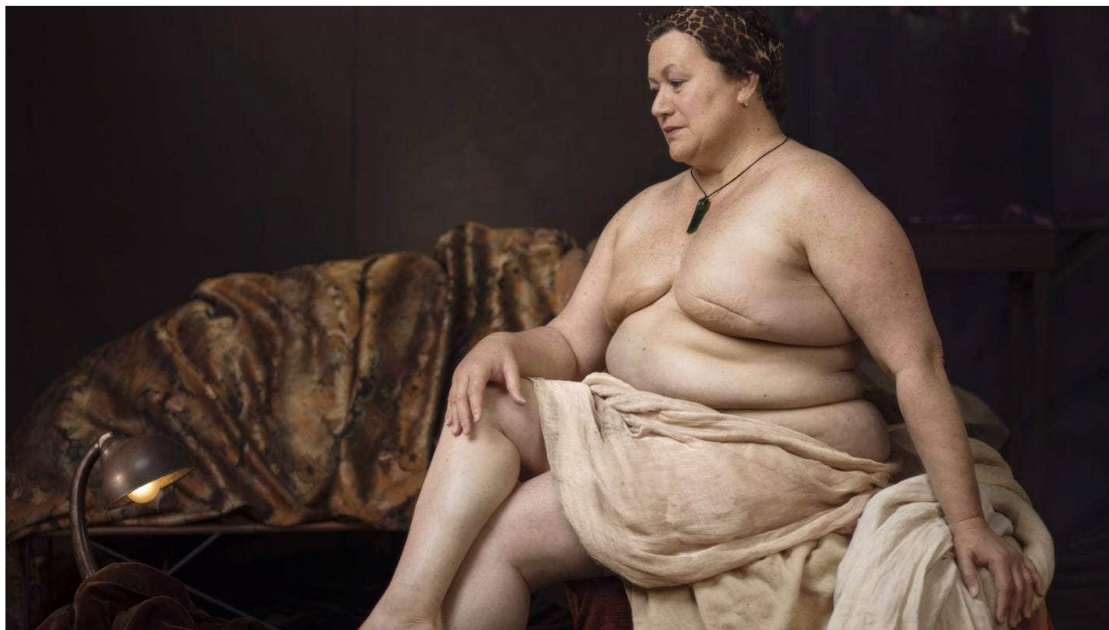
Copyright 2024 ΙΩΑΝΝΗΣ ΨΑΘΑΣ για την Ελληνική γλώσσα σε όλο τον κόσμο. Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγορευτικής των προσβολών της. Επισημαίνεται πάντως ότι κατά ο Ν. 2387/20 (όπως έχει τροποποιηθεί από το Ν 100/1975 και ισχύει σήμερα) και κατά τη Διεθνή Σύμβαση της Βέρνης (όπως έχει κυρωθεί με το Ν. 100/1975) απαγορεύεται η αναδημοσίευση, η αποθήκευση σε οποιοδήποτε σύστημα διάσωσης και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιοδήποτε τρόπο ή μορφή τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια του συγγραφέα.

«Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Νοσηλευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών δεν σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα»

(Σχετικές διατάξεις του άρθρου 50 του Νόμου 1268/82, σε συνδυασμό με τις διατάξεις του Πανεπιστημίου Αθηνών, Άρθρο 202 παρ. 2 του Νόμου 5343/32).



Η Βηρσαβεέ με το γράμμα του Δαβίδ (Bathsheba at Her Bath or Bathsheba with King David's Letter) – Ρέμπραντ, 1654



Η Shona Kelway, 54, από το Pukekohe, αναπαριστά τον πίνακα «Η Βηρσαβεέ με το γράμμα του Δαβίδ» του Ρέμπραντ, με σκοπό να αυξήσει την ευαισθητοποίηση του κόσμου σχετικά με τον καρκίνο του μαστού.

Πηγή: BREAST CANCER FOUNDATION NZ  
(<https://www.breastcancerfoundation.org.nz/the-survivors-collection>)

Στην Χριστίνα μου

Στην Πηγή, στον Ρωμανό, στην Ρόζα & στον Βίνι.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Χειρουργικής της Νοσηλευτικής Σχολής ΕΚΠΑ, Διευθυντή της Πανεπιστημιακής Χειρουργικής Κλινικής και Διευθυντή Ιατρικής Υπηρεσίας του Γ.Ο.Ν.Κ «Άγιοι Ανάργυροι» κ. Ιωάννη Κακλαμάνο για την έμπνευση που μου μετέδωσε, τις πολύτιμες συμβουλές του και τη διάθεσή του να μου μεταλαμπαδεύει τη γνώση. Οι αμέτρητες ώρες που συνεργαστήκαμε στις χειρουργικές αίθουσες, η αγωνίες που μοιραστήκαμε δίπλα στους αρρώστους και οι δημιουργικές διαφωνίες μας θα με συνοδεύουν.

Ήταν ιδιαίτερη τιμή για εμένα να γνωρίσω προσωπικά και να χειρουργήσω δίπλα στον Ομότιμο Καθηγητή Χειρουργικής κ. Γεράσιμο Μπονάτσο ως διευθυντή της Πανεπιστημιακής Χειρουργικής κλινικής του Γ.Ο.Ν.Κ «Άγιοι Ανάργυροι» και ακόμη μεγαλύτερη η ευγνωμοσύνη μου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε -και ακόμη μου δείχνει- και για την εμπύχωση του να αναζητώ διαρκώς νέες γνώσεις και δεξιότητες . Η διατριβή αυτή δεν θα είχε ξεκινήσει χωρίς την προτροπή του. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στον Καθηγητή Χειρουργικής της Νοσηλευτικής Σχολής ΕΚΠΑ κ. Κωνσταντίνο Μπίρμπα για την καθοδήγησή του στην εκπόνηση αυτής της διατριβής αλλά κυρίως για την επικοινωνιακή συνεργασία και επικοινωνία μας εντός και εκτός χειρουργικής αίθουσας όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θεόδωρο Μαριόλη – Σαψάκο για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσε, την δημιουργική συνεργασία μεταξύ μας, τη φιλία και τη συμπόρευση. Θέλω επίσης να αναφερθώ στα μέλη της νοσηλευτικής ομάδας της Πανεπιστημιακής Χειρουργικής Κλινικής για τους κοινούς κόπους που καταβάλλαμε στην υπηρεσία των ασθενών μας και να τους ευχαριστήσω θερμά για τη συνεργασία.

Καμία από τις σελίδες αυτές δεν θα είχε γραφτεί χωρίς την προσωπική εργασία, τις συμβουλές και την καθοδήγηση της κ. Λουίζας Μαχαίρα, Βιολόγου του τμήματος Γενετικής του Γενικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Άγιος Σάββας». Είναι εκείνη που με ώθησε να δω τον καρκίνο του μαστού από άλλη οπτική γωνία και εκείνη που προσωπικά έφερε εις πέρας τη φύλαξη, την επεξεργασία και τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων. Θα της τρέφω πάντα απεριόριστη ευγνωμοσύνη για την υπομονή και την ηγασία της θέληση να μου λύνει κάθε απορία μέχρι τέλους.



Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε από τον Επίκουρο καθηγητή του τμήματος Νοσηλευτικής κ. Πέτρο Γαλάνη και τον ευχαριστώ για αυτό.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του τμήματος Νοσηλευτικής του ΕΚΠΑ καθώς και το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γενικού Ογκολογικού Νοσοκομείου Κηφισιάς «Άγιοι Ανάργυροι» για τη συγκατάθεση τους στην εκπόνηση του πειραματικού αυτού πρωτοκόλλου σε ασθενείς που χειρουργήθηκαν για καρκίνο του μαστού στο νοσηλευτικό ίδρυμα .

Το μεγαλύτερο βέβαια «ευχαριστώ» το οφείλω σε καθεμία από τις γυναίκες που συμμετείχαν σε αυτή την έρευνα. Αψηφώντας τον φόβο και την αγωνία για τη νόσο αλλά και τη ζωή τους άκουσαν προσεκτικά και υπέγραψαν αποφασιστικά τη συγκατάθεσή τους, μεταδίδοντάς μου την ελπίδα και τη δύναμή τους.

Για την ολοκλήρωση της έρευνας, της βιβλιογραφικής ενημέρωσης, της μελέτης για την κατανόηση του μοριακού μικρόκοσμου του καρκίνου του μαστού καθώς και της συγγραφής της χρειάστηκε επιμονή και αφοσίωση. Κάποιες δυσκολίες έμοιασαν ανυπέρβλητες. Στη διαδρομή αυτή είχα πάντα δίπλα μου την οικογένειά μου, τη Χριστίνα, την Πηγή, τον Ρωμανό, την Ρόζα, τον Βίνι, τη μαμά Ευφροσύνη. Είναι πάντα εδώ για να μου θυμίζουν με κάθε τρόπο την αξία της υπομονής, του ήθους και της προσήλωσης στο στόχο μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Ευχαριστίες</b> .....	8
<b>Εισαγωγή</b> .....	12
<b>Γενικό μέρος</b> .....	14
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στον Καρκίνο του Μαστού</b> .....	15
1.1 Ορισμός – Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο παγκοσμίως.....	15
1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού.....	16
1.3 Στοιχεία ανατομίας και ανάπτυξης του μαστού .....	19
1.4 Ιστολογικές μορφές του καρκίνου του μαστού.....	23
1.5 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού.....	25
1.6 Ο ρόλος των γονιδίων στην κλινική πράξη.....	27
1.7 Παράγοντες κινδύνου του καρκίνου του μαστού.....	28
1.7.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	28
1.7.2 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου.....	33
1.7.3 Παράγοντες με ασαφή επίδραση.....	35
1.8 Πρόληψη του καρκίνου του μαστού.....	36
<b>Κεφάλαιο 2: Πρόγνωση και μοριακά μονοπάτια του καρκίνου του μαστού</b> ...39	
2.1 Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού.....	39
2.2 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού.....	46
2.3 Μηχανισμοί καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού.....	50
<b>Κεφάλαιο 3: Μη κωδικά μόρια RNA και καρκίνος του μαστού</b> .....	55
3.1 Ορισμός και ταξινόμηση των μη κωδικών μορίων RNA.....	55
3.2 Συμμετοχή των μη κωδικών μορίων RNA στην ανάπτυξη του μαζικού αδένα.....	59
3.3 Ο ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην καρκινογένεση του μαστού.....	61
3.4 Οι βιοδείκτες και η χρησιμότητά τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου.....	62
3.5 Τα μη κωδικά μόρια RNA ως βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού.....	64
<b>Ειδικό μέρος</b> .....	67
<b>Κεφάλαιο 4: Τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA (lncRNA's) και ο ρόλος τους στον καρκίνο</b> .....	68
4.1 Τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA (lncRNA's) στην παθογένεια και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού.....	68
4.2 Το HOTTIP στον καρκίνο του μαστού.....	71

<b>4.3 Υλικά και Μεθοδολογία.....</b>	<b>75</b>
4.3.1 Επιλογή δειγμάτων.....	75
4.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από τον ορό περιφερικού αίματος.....	75
4.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων.....	76
4.3.4 Κατασκευή cDNA (Συμπληρωματικό – Complementary DNA).....	76
4.3.5 qRT-PCR (Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.....	77
<b>4.4 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....</b>	<b>84</b>
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>89</b>
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>92</b>
<b>Περίληψη.....</b>	<b>93</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>94</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>95</b>
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>118</b>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού δεν βρίσκεται τυχαία στην κορυφή της επιστημονικής έρευνας, όχι μόνο λόγω της πρώτης θέσης που σταθερά κατέχει ως αιτία θανάτου στις γυναίκες παγκοσμίως αλλά και ως μια νόσος με αντίκτυπο ατομικό, κοινωνικό, οικονομικό και πολιτειακό. Η επιστημονική γνώση καλπάζει και η ανάγκη για έγκαιρη πρόληψη, έγκυρη διάγνωση και αποτελεσματική θεραπεία αποτελούν πυξίδα αυτού του αγώνα. Η διεθνής βιβλιογραφία εμπλουτίζεται καθημερινά με νέα δεδομένα και μια «επάρατη» νόσος που μέχρι πριν λίγες δεκαετίες αντιμετωπιζόταν με ακρωτηριαστικές επεμβάσεις και δια βίου αναπηρίες, προσεγγίζεται πλέον από άλλη οπτική γωνία. Ο κόσμος του κυττάρου αποκαλύπτεται με πρωτοφανείς λεπτομέρειες και η έρευνα για τον καρκίνο του μαστού διεισδύει βαθύτερα, στον κόσμο του DNA, με απώτερο σκοπό εκεί να αναζητηθούν και οι μελλοντικές θεραπείες του.

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιλέχθηκε με γνώμονα αυτή ακριβώς τη σκέψη: να μελετήσουμε τον καρκίνο του μαστού έξω από τη χειρουργική αίθουσα και η κλινική πρακτική σε ένα μεγάλο ογκολογικό νοσοκομείο να συνδυαστεί με μια πειραματική μελέτη σε ένα αντικείμενο συχνό αλλά με πρωταρχική σημασία για τους ασθενείς και βέβαια τον ιατρό. Ανατρέξαμε στην τρέχουσα βιβλιογραφία και επιλέξαμε να μελετήσουμε ένα μόριο RNA που φερόταν να συμμετέχει ενεργά στην εκδήλωση αρκετών τύπων καρκίνου αλλά με πολύ περιορισμένη ακόμη αναφορά στον καρκίνο του μαστού.

Το HOTTIP είναι ένα μακρύ-μη-κωδικοποιητικό (ή μη-κωδικό) μόριο RNA δηλαδή ένα μόριο RNA που δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη αλλά συμμετέχει σε πολλές και σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, ρυθμίζοντας ή ελέγχοντας πολλές φορές τη γονιδιακή έκφραση. Έχουν ανακαλυφθεί αρκετές χιλιάδες μη κωδικών μορίων RNA τα οποία καταγράφονται σε βάση δεδομένων και μελετώνται συστηματικά για ποικίλες νόσους και καταστάσεις. Η δυσκολία του εγχειρήματος ήταν ότι επιλέξαμε να μετρήσουμε ποσοτικά τη συγκέντρωση του HOTTIP στον ορό περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο μαστού και όχι σε ιστούς, πειραματόζωα ή σειρές καρκινικών κυττάρων, κάτι που στη διεθνή βιβλιογραφία ήταν ανύπαρκτο κατά τον σχεδιασμό της έρευνας. Επιπλέον, η ποσοτική μελέτη ενός μορίου για το οποίο δεν υπάρχουν τιμές αναφοράς ή συγκεκριμένο εύρος τιμών, απαιτεί ειδική μοριακή ανάλυση ενώ και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έπρεπε να πραγματοποιηθεί μόνο σε συσχέτιση με ήδη γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες του καρκίνου του μαστού.

Στις δυσκολίες αυτές ήρθε να προστεθεί και η πρωτόγνωρη για όλους πανδημία από την COVID-19 η οποία προκάλεσε αντικειμενικές καθυστερήσεις στην εκπόνηση αυτής της εργασίας, κυρίως όμως απαίτησε να αφοσιωθούμε με όλες μας τις δυνάμεις στον παγκόσμιο αυτό ιατρικό αγώνα.

Για την έρευνά μας επιλέχθηκαν 46 γυναίκες με διεγνωσμένο καρκίνο μαστού, μεταξύ των οποίων και εκείνες που είχαν υποβληθεί σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Η λήψη περιφερικού αίματος γινόταν την ημέρα πριν το χειρουργείο και το δείγμα μεταφερόταν αυθημερόν και φυλασσόταν σε κατάλληλες συνθήκες συντήρησης στους  $-80^{\circ}\text{C}$  στο εργαστήριο Γενετικής του Γενικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Αθηνών «Άγιος Σάββας». Οι ασθενείς ενημερώνονταν λεπτομερώς για τη διαδικασία και την έρευνα στην οποία συμμετείχαν και δήλωναν ενυπόγραφα τη συγκατάθεσή τους. Πριν την έναρξη της διαδικασίας των αιμοληψιών είχε δοθεί έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Επιστημονικού Συμβουλίου του Γ.Ο.Ν.Κ. «Οι Άγιοι Ανάργυροι».

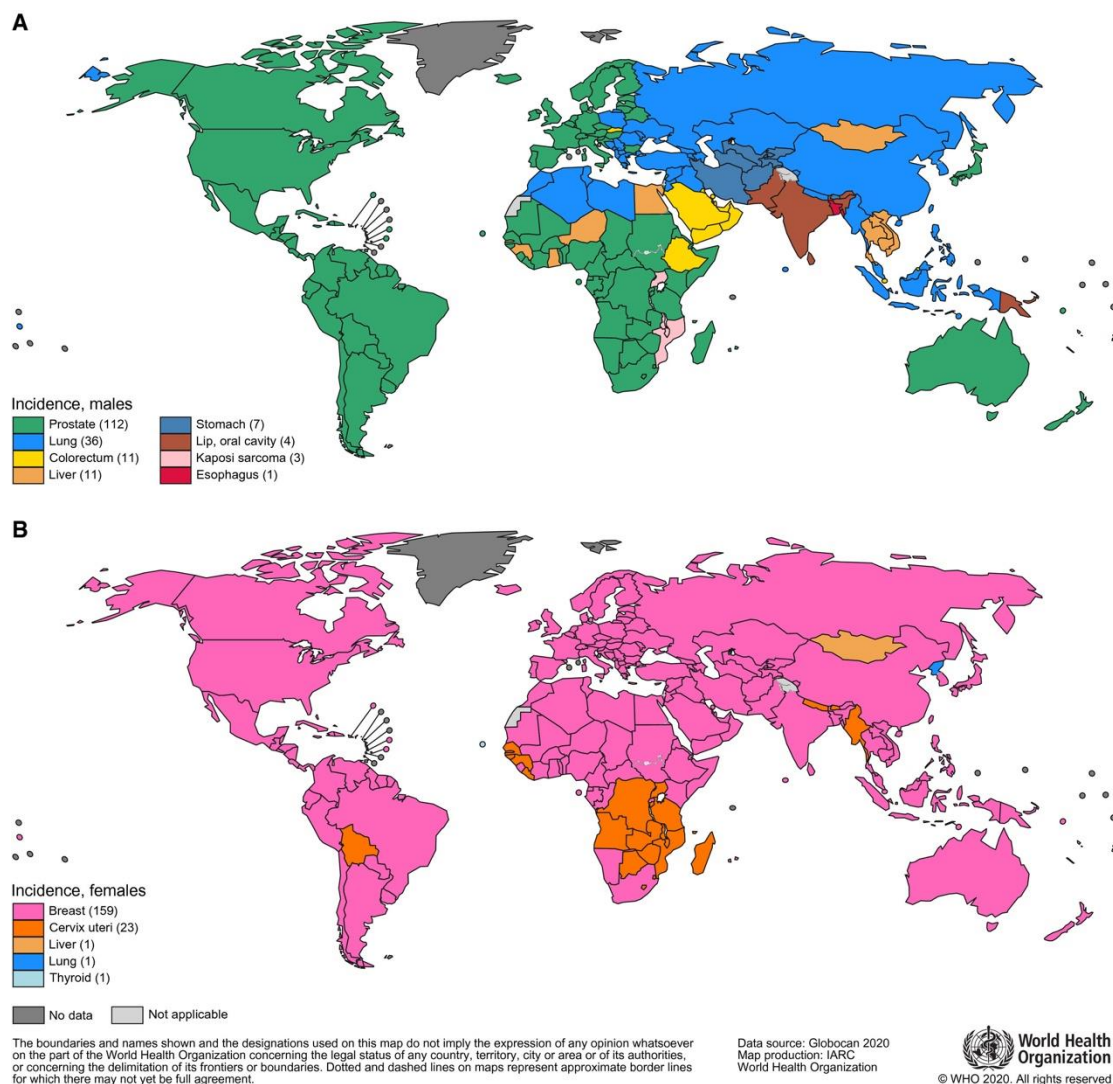
Η διατριβή αποτελείται από ένα γενικό μέρος στο οποίο περιγράφονται τα τελευταία επιστημονικά δεδομένα σχετικά με την επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού και τις παραμέτρους που τον χαρακτηρίζουν και ένα ειδικό μέρος στο οποίο προσεγγίζεται η μοριακή βάση της νόσου και αναλύεται το υπό μελέτη μόριο. Επίσης περιγράφονται λεπτομερώς η μέθοδος που ακολουθήθηκε και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την μοριακή ανάλυση των δειγμάτων. Τέλος αναλύονται τα αποτελέσματα της μελέτης και η κλινική τους σημασία.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή στον Καρκίνο του Μαστού

## 1.1 Ορισμός – Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο παγκοσμίως

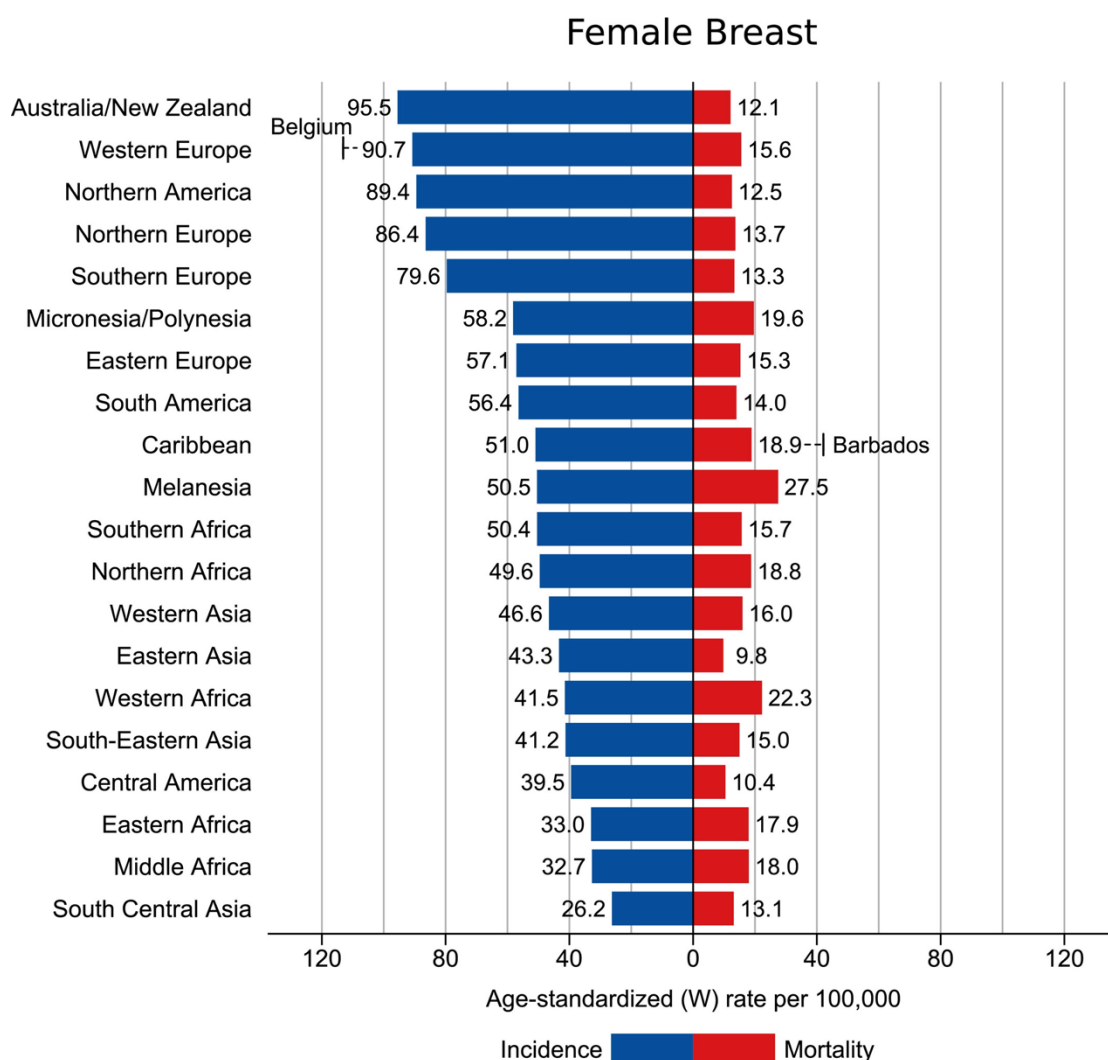
Ο καρκίνος αποτελεί την πρώτη σε συχνότητα αιτία θανάτου αλλά και σημαντική τροχοπέδη στην αύξηση του προσδόκιμου και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής παγκοσμίως. (Sung et al., 2021). Εκτιμάται ότι πάνω από 19,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου εμφανίζονται ετησίως σε όλο τον κόσμο (πλην του μελανώματος) ενώ το 2020 καταγράφηκαν επισήμως σχεδόν 20 εκατομμύρια θάνατοι από όλες τις μορφές καρκίνου (πλην του μελανώματος) (Sung et al., 2021, Kashyap et al., 2022), (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Οι πιο συνηθισμένες αιτίες καρκίνου ανά χώρα το 2020 για άνδρες (A) και γυναίκες (B). Από τον χάρτη εξαιρείται ο μη μελανοκυτταρικός καρκίνος του δέρματος που αποτελεί τον καρκίνο με τη μεγαλύτερη επίπτωση στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία σε αμφότερα τα φύλα, όπως και στους άνδρες στις ΗΠΑ. (Πηγή: Kashyap et al., 2022)

## 1.2 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού συνιστά ένα σοβαρό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας, καθώς αποτελεί την συχνότερη μορφή κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό. Σε συχνότητα εμφάνισης ο γυναικείος καρκίνος του μαστού έχει ξεπεράσει τον καρκίνο του πνεύμονα, με 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ανά έτος παγκοσμίως (11,7%) αλλά βρίσκεται πέμπτος στις αιτίες θανάτου με ποσοστό 6,9% και κάτω από αυτόν του πνεύμονα (18%), του παχέος εντέρου (9,4%), του ήπατος (8,3%) και του στομάχου (7,7%) (Sung et al., 2021, Kashyap et al., 2022), (Εικόνα 2).



*Εικόνα 2:* Δείκτες επίπτωσης και θνησιμότητας του γυναικείου καρκίνου του μαστού ανά γεωγραφική περιοχή του κόσμου, με τυποποιημένη ηλικία το 2020 (Πηγή: GLOBOCAN 2020)



Στις ανεπτυγμένες χώρες η συνολική πενταετής επιβίωση είναι πάνω από 80% ενώ την ίδια ώρα στην Ινδία είναι λιγότερο από 70% και στη Νότια Αφρική κάτω από 50%. Είναι δηλαδή σαφές ότι κοινωνικο-οικονομικοί παράγοντες, το επίπεδο μόρφωσης και διαβίωσης και η πρόσβαση σε περίθαλψη είναι παράγοντες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την εξέλιξη της νόσου (Wilkinson and Gathani, 2021). Επιπλέον παρά την αλματώδη εξέλιξη στις στοχευμένες θεραπείες, η πενταετής επιβίωση στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού με επικουρική χημειοθεραπεία παραμένει κάτω από 30% (Kashyap et al., 2022) .

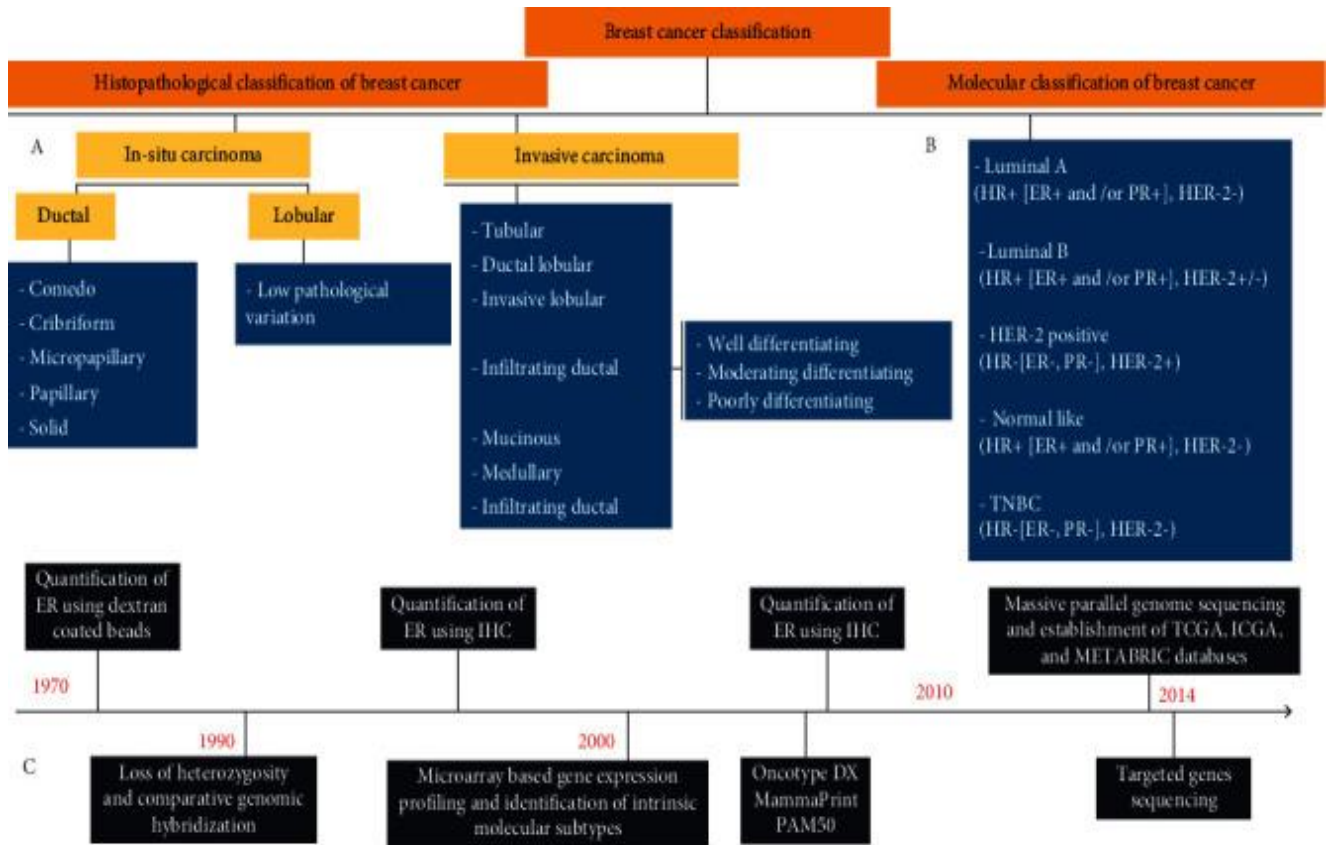
Στα τέλη του 2022 καταγράφονταν 7.8 εκατομμύρια γυναίκες εν ζωή παγκοσμίως που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο μαστού την τελευταία πενταετία με συνέπεια να καθίσταται ως επικρατών τύπος καρκίνου παγκοσμίως. Ο καρκίνος του μαστού απαντάται σε κάθε χώρα του πλανήτη, σε γυναίκες κάθε ηλικίας μετά την εφηβεία και με αυξημένη επίπτωση με την πρόοδο της ηλικίας.

Η καταγραφή των επιδημιολογικών δεδομένων του καρκίνου του μαστού επικεντρώνεται στον γυναικείο πληθυσμό, καθώς η νόσος είναι 100 φορές συχνότερη στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άνδρες. Οι επιδημιολογικές μελέτες εστιάζουν στις δυτικές κοινωνίες, καθώς η νόσος έχει υψηλή επίπτωση στις πολυάσχολες, υψηλής κυρίως κοινωνικοοικονομικής τάξεως γυναίκες της Ευρώπης, της Ασίας και των ΗΠΑ (World Health Organization: WHO, 2021).

Τα ποσοστά αυτά αφορούν σε συλλογή στοιχείων προηγούμενων ετών, πριν από την πανδημία που προκλήθηκε λόγω της COVID-19. Η έκταση των συνεπειών της COVID-19 σε πολλά μέρη του κόσμου είναι ακόμη άγνωστη και μη προβλέψιμη γιατί η ανησυχία και η ανασφάλεια που προκλήθηκε κατά την πανδημία, οι καθυστερήσεις στη διάγνωση και θεραπεία, η αναστολή των τακτικών προγραμμάτων screening στο γενικό πληθυσμό και το κλείσιμο των συστημάτων υγείας που είχε ως επακόλουθο τη μειωμένη πρόσβαση στην περίθαλψη, πιθανότατα θα οδηγήσει σε αρκετές περιπτώσεις σε μια βραχυπρόθεσμη, μη πραγματική μείωση της συχνότητας του καρκίνου, κάτι που πρέπει να συνυπολογιστεί στις προσεχείς μελέτες (Sung et al., 2021).

Η πλειονότητα των καρκίνων του μαστού που προσβάλλουν τις γυναίκες ανήκει στα αδενοκαρκινώματα του μαστού, τα οποία αφορούν σε καρκίνο είτε των αδενικών γαλακτοπαραγωγών λοβίων είτε των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού (Weigelt et al., 2010) . Η ποικιλομορφία όμως σε ιστολογικούς υποτύπους, στη μοριακή έκφραση και

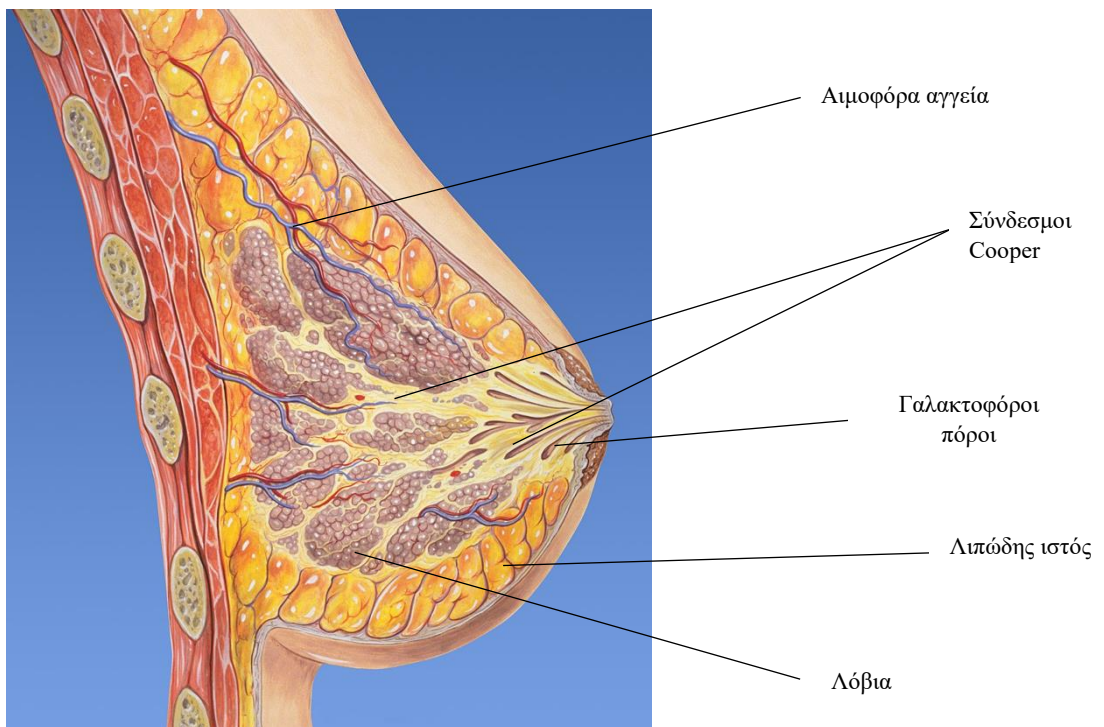
στα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά μπορούν να χαρακτηρίσουν αυτό τον καρκίνο ως μια «ομάδα ασθενειών» (Kashyap et al., 2022) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Σχηματική καταγραφή της ποικιλομορφίας του καρκίνου του μαστού με βάση τα ιστολογικά, κλινικά και μοριακά του χαρακτηριστικά (Πηγή: Kashyap et al., 2022)

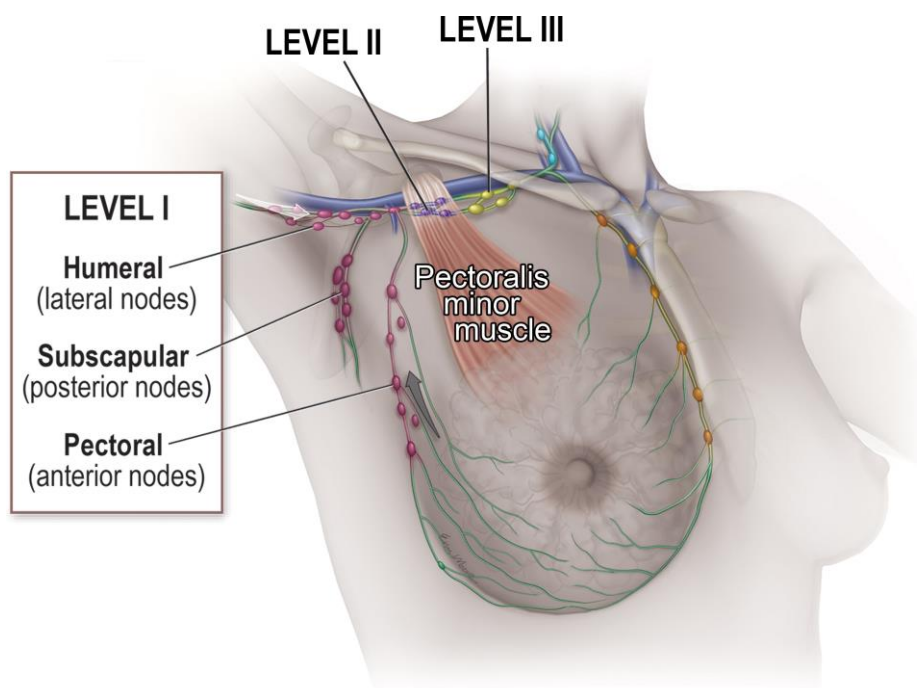
### 1.3 Στοιχεία Ανατομίας και Ανάπτυξης του μαστού

Ο μαστός, κυρίως ο γυναικείος και σε μικρότερο βαθμό ανδρικός, καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πρόσθιου θωρακικού τοιχώματος. Αποτελείται από αδενικό ιστό, που επιτελεί και την κύρια λειτουργία της γαλακτοφορίας και του θηλασμού και από ερειστικό ιστό, απαραίτητο για τη στήριξη του, μαζί με τον λιπώδη ιστό, τα αιμοφόρα αγγεία, τα λεμφαγγεία και τα αντίστοιχα νεύρα. Το μέγεθος του ανθρώπινου μαστού ποικίλει και εξαρτάται από παράγοντες φύλου, ηλικίας, γονιδιακού προφίλ, ορμονικού υποβάθρου, σωματοτύπου κλπ. (Skandalakis, 2008; Pandya et al., 2011). Οι σύνδεσμοι του Cooper εκτείνονται από το υποδόριο του δέρματος προς το μαζικό αδέν, τον οποίο και διαιρούν σε 15-20 λοβούς (Geddes, 2007). Στη θηλή καταλήγουν οι γαλακτοφόροι πόροι, οι οποίοι ξεκινούν από την βασική λειτουργική μονάδα του αδέν (TDLU : Terminal Ductal Lobular Unit). Οπισθίως ανάμεσα στον μαζικό αδέν και την περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός παρεμβάλλεται λίγος λιπώδης συνδετικός ιστός (Rehnke et al., 2018). Η αιμάτωση των μαστών προέρχεται από κλάδους της έσω μαστικής αρτηρίας, την πλάγια και την άνω θωρακική, τον θωρακικό κλάδο της ακρωμοθωρακικής, τους διατιτραίνοντες κλάδους των μεσοπλεύριων αρτηριών και από κλάδο της υποπλάτιας αρτηρίας. Αντίστοιχα οι φλέβες που αποχετεύουν τον μαστό εκβάλλουν στην έσω μαστική, τη μασχαλιαία και τις μεσοπλεύριες φλέβες (Moore et al., 2013), (Εικόνα 3).



*Εικόνα 3:* Ανατομία του μαζικού αδέν και οι βασικές λειτουργικές δομές του (Πηγή: Τροποποίηση από: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast\\_anatomy\\_normal.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_anatomy_normal.jpg))

Ο μαστός διαθέτει ένα πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο με ιδιαίτερη κλινική σημασία για την αντιμετώπιση του καρκίνου του οργάνου (Εικόνα 4). Η λέμφος από τον μαστό αποχετεύεται προς τους λεμφαδένες της σύστοιχης μασχάλης και προς αυτούς της έσω μαστικής αρτηρίας. Οι λεμφαδένες της μασχάλης με τη σειρά τους διαιρούνται σε τρία επίπεδα, η κλινική σημασία των οποίων αφορά στη διαδικασία του λεμφαδενικού καθαρισμού (Moore et al., 2013). Τέλος ο μαστός νευρώνεται από τα 4<sup>ο</sup>- 6<sup>ο</sup> μεσοπλεύρια νεύρα, το μεσοπλευροβραχιόνιο, το θωρακοραχιαίο, το μακρύ θωρακικό νεύρο του Bell καθώς και από κλάδους του αυτόνομου νευρικού συστήματος (Moore et al., 2013).

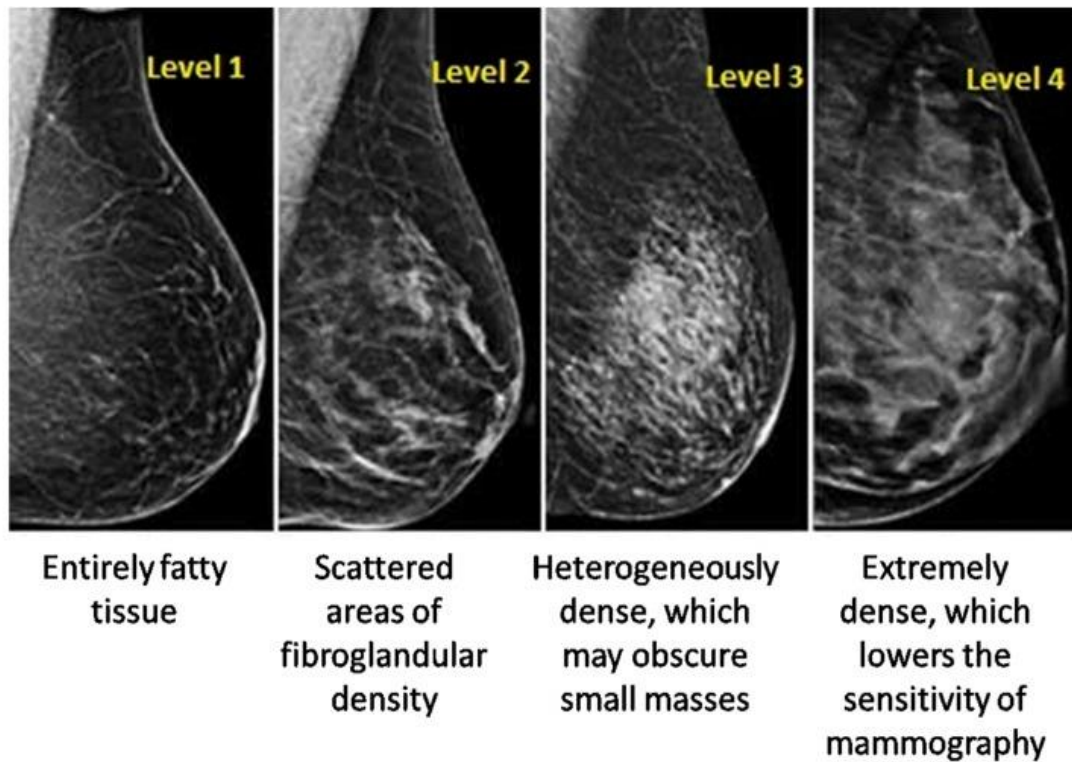


*Εικόνα 4:* Ανατομική ταξινόμηση μασχαλιαίων λεμφαδένων. (Πηγή: Zhang et al., 2022)

Η κύρια ανάπτυξη του μαζικού αδένου λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της εφηβείας, οπότε στους μεν άνδρες η αύξηση της τεστοστερόνης λειτουργεί ανασταλτικά στην περαιτέρω ανάπτυξη, στις δε γυναίκες όμως τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων ευνοούν την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων (Vorherr, 1974). Τόσο τα οιστρογόνα όσο και η προγεστερόνη λειτουργούν μέσω της σύνδεσής τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς (ER και PR) των κυττάρων του επιθηλιακού ιστού του υπό ανάπτυξη μαστού (Hennighausen et al., 1997).

Ο μαζικός αδένας περιβάλλεται από ένα στρώμα λιπώδους ιστού, διαφορετικής ποσότητας και σύστασης ανά γυναίκα, φυλή, ηλικία και φάση ωρίμανσης. Αν και η άποψη που επικρατούσε μέχρι πρόσφατα ήταν ότι το περιμαστικό λίπος αποτελεί τμήμα του σωματικού λίπους με περιορισμένες ιδιότητες, οι σύγχρονες λεπτομερείς μελέτες περιγράφουν το λίπος του μαστού ως ένα ξεχωριστό όργανο με σαφείς λειτουργίες. Οι λειτουργίες του, πέρα από στηρικτικές για το μαστό εν γένει, αφορούν επίσης ενδοκρινικές, μεταβολικές και αναπτυξιακές (Kothari et al., 2020). Ήδη από το 2010 οι Landskroner – Eier et al. παρουσίασαν τον κρίσιμο ρόλο του λιπώδους ιστού στην ανάπτυξη του μαζικού αδένος κατά τη διάρκεια της προεφηβείας, της εφηβείας και της ενηλικίωσης αλλά και στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του. Επιπλέον αναδείχθηκε η σημασία του περιμαστικού λιπώδους ιστού κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, του θηλασμού αλλά και της εμμηνόπαυσης. Συγκεκριμένα έχει καταδειχθεί η σημασία της ενδοκρινικής λειτουργίας των λιποκυττάρων μέσω έκκρισης λιποκινών όπως η λεπτίνη, η λιπονεκτίνη, το κολλαγόνο VI και ο TNFα στη φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένος καθώς και ο ρόλος τους στη λειτουργική διαφοροποίηση των κυττάρων του μαστού συμπεριλαμβανομένων και των επιθηλιακών κυττάρων (Granneman et al., 2005).

Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι η σύσταση του μαστού δημιουργεί διαφορετικές εικόνες στη μαστογραφία, ορίζοντας έτσι τη μαστογραφική πυκνότητα (mammographic Density, MD) ως ένα ακτινολογικό χαρακτηριστικό που σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου μαστού (Εικόνα 5). Συγκεκριμένα, η πυκνότητα του μαστού καθορίζεται από την αναλογία σε στρωματικά, επιθηλιακά και λιπώδη κύτταρα και η αναλογία αυτή δημιουργεί διαφορετική εικόνα στη μαστογραφία, κατατάσσοντας τις εξεταζόμενες γυναίκες σε τέσσερις κατηγορίες, ανάλογα με τη μαστογραφική πυκνότητα. Αυτό που έχει ενδιαφέρον είναι ότι οι γυναίκες με αυξημένη πυκνότητα μαστών φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και αυτό οφείλεται είτε στη δυσκολία έγκαιρης διάγνωσης μιας εμφανιζόμενης βλάβης είτε σε ορμονικούς – ενδοκρινικούς μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με τη νόσο για αυτό και απαιτείται αυξημένο επίπεδο προσοχής και πρόληψης (Nazari and Mukherjee, 2018).



*Εικόνα 5:* Επίπεδα πυκνότητας του μαστού στην ψηφιακή μαστογραφία (Πηγή: Nazari, S. S., & Mukherjee, P., 2018)

Αν και το μέγεθος του μαστού ποικίλει ανά γυναίκα, σχετίζεται με κληρονομικούς και γονιδιακούς παράγοντες και παρουσιάζει φυλετικές διαφορές, υπάρχουν ενδείξεις ότι γυναίκες με μεγαλύτερο μέγεθος μαστών έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου. Η υπόθεση αυτή ξεκίνησε από την παρατήρηση ότι γυναίκες που υπεβλήθησαν σε μειωτική επέμβαση μαστών παρουσίασαν μικρότερα ποσοστά ανάπτυξης καρκίνου, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με έκκριση ενδοκρινικών παραγόντων από τον αδένα και το περιμαστικό λίπος και σίγουρα χρειάζεται να μελετηθεί περαιτέρω για να βγουν πιο σαφή αποτελέσματα (Jansen et al., 2014).

#### 1.4 Ιστολογικές μορφές του καρκίνου μαστού

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να εμφανισθεί με πολλές διαφορετικές ιστολογικές μορφές, οι οποίες επηρεάζουν την πρόγνωση της νόσου και τον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής (Kashyap et al., 2022). Στην παθολογοανατομική εξέταση δείγματος του κακοήθους νεοπλασματος θα πρέπει να διερευνηθούν τα παρακάτω προκειμένου να πραγματοποιηθεί έγκυρα η ιστολογική ταξινόμηση του όγκου:

A) αν ο υπό μελέτη όγκος έχει διηθήσει την βασική μεμβράνη του επιθηλίου του μαστού κι έχει εισβάλλει στις παρακείμενες ανατομικές δομές (διηθητικός καρκίνος) ή δεν διηθεί την βασική μεμβράνη (καρκίνωμα *in situ*) (Akram et al., 2017).

B) αν τα καρκινικά κύτταρα εξορμούνται από το επιθήλιο των γαλακτοφόρων πόρων (πορογενής καρκίνος) ή από το γαλακτοπαραγωγό λόβιο (λοβιακός καρκίνος) (Berg et al., 2019; Mouabbi et al., 2022).

Δεδομένων των παθολογοανατομικών ευρημάτων, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί στις εξής ιστολογικές μορφές: α) νόσος Paget της θηλής, β) πορογενής καρκίνος (διηθητικός και *in situ*), γ) λοβιακός καρκίνος (διηθητικός και *in situ*), δ) σπάνιοι πρωτοπαθείς όγκοι (σαρκώματα, λεμφώματα, μελάνωμα) και ε) σπάνιες ιστολογικές μορφές (φλεγμονώδης καρκίνος, αδενοκυστικός, βλεννώδης, μυελοειδής, μεταπλαστικός) (Akram et al., 2017; Watkins, 2019). Ανάλογα με το σημείο εξόρμησης των καρκινικών κυττάρων και τις ιδιότητες τους (Roulot et al., 2016; Byler et al., 2014), η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού είναι η εξής:

A) Το *in situ* πορογενές καρκίνωμα (DCIS): αποτελεί τον συχνότερο μη διηθητικό τύπο καρκίνου του μαστού, 15-20% του συνόλου, αν και σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία έχει δυνητικά διηθητική συμπεριφορά και χαρακτηρίζεται και από πιθανότητα υποτροπής (Narod et al., 2022). Η συχνότητά του διαρκώς αυξάνεται λόγω του αυξανόμενου τακτικού μαστογραφικού ελέγχου (screening) (Badve & Gokmen-Polar, 2019). Αν και η νόσος θεωρείται Stage 0, η πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου μαστού, διηθητικού ή *in situ* ομόπλευρα ή ετερόπλευρα, είναι αυξημένη. Η συνολική θνητότητα από καρκίνο μαστού σε γυναίκες που είχαν DCIS την τελευταία 20ετία είναι 3.3%, με μεγαλύτερη επίπτωση σε εκείνες που η διάγνωση είχε γίνει πριν την ηλικία των 35 ετών και σε γυναίκες της μαύρης φυλής (Narod et al., 2015). Ως ιδιαίτερος τύπος έχει περιγραφεί ο Comedo-DCIS που αποτελεί μια προ-διηθητική νεοπλασία του μαστού, χαρακτηρίζεται από απόπτωση και κυτταρικό θάνατο και έχει

δυναμικά μεγαλύτερη δυναμική κακοήθειας σε σχέση με τους υπόλοιπους υποτύπους (Shekhar et al., 2008).

B) Το in situ λοβιακό καρκίνωμα (LCIS): θεωρείται μια «προκαρκινική» αλλοίωση, η ύπαρξη της οποίας συνδυάζεται με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στο μέλλον (Reed et al., 2021). Η πιθανότητα αυτή είναι 9-10 φορές μεγαλύτερη από το γενικό πληθυσμό και ανευρίσκεται σε ποσοστό 0,5-1% σε βιοψίες καλοηθών βλαβών του μαστού και στο 1.8-2.5% των συνολικών βιοψιών. Το συναντάμε συχνότερα σε προ-εμμηνόπαυσιακές γυναίκες (μέση ηλικία διάγνωσης τα 49-50 έτη), είναι πολυκεντρικό σε ποσοστό 60-80% και αμφοτερόπλευρο κατά 20-60% (Wen and Brogi, 2018; Sokolova & Lakhani, 2021).

Γ) Το πορογενές διηθητικό αδενοκαρκίνωμα (IDC): αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου του μαστού, με ποσοστό 80% επί του συνόλου. Συναντάται συχνότερα σε γυναίκες ηλικίας μεγαλύτερης των 55 ετών αλλά και σε άνδρες. Τύποι του πορογενούς διηθητικού καρκινώματος είναι το σωληνώδες, το μυελοειδές, το βλενώδες, το θηλώδες, το ηθμοειδές και το μεταπλαστικό καθένα από τα οποία έχει διαφορετική συμπεριφορά και πρόγνωση ([www.breastcancer.org/Invasive Ductal Carcinoma \(IDC\): Grade, Symptoms & Diagnosis](http://www.breastcancer.org/Invasive%20Ductal%20Carcinoma%20(IDC):%20Grade,%20Symptoms%20&%20Diagnosis), no date).

Δ) Το λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα (ILC): είναι ο δεύτερος σε συχνότητα διηθητικός καρκίνος μαστού (10-15%) που αφορά κυρίως σε γυναίκες μέσης ηλικίας (περίπου 52 ετών). Ως επί το πλείστον, είναι πολυεστιακός ( στο 50-55% των περιπτώσεων) και σε ποσοστό 20% των περιπτώσεων και αμφοτερόπλευρος (Reed et al., 2021). Σε σχέση με το IDC παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό απομακρυσμένης εντόπισης ή μετάστασης μετά από 10 χρόνια (Mouabbi et al., 2022).

E) Σπανιότεροι τύποι καρκίνου του μαστού: είναι ο φλεγμονώδης που εμφανίζει ιδιαίτερα επιθετική συμπεριφορά, ο ανδρικός καρκίνος του μαστού, η νόσος Paget, ο φυλλοειδής όγκος, μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα όπως το σάρκωμα, ο ινοεπιθηλιακός όγκος κ.α. (Jenkins et al., 2021). Ιδιαίτερο σπάνιο τύπο αποτελεί επίσης το νευροενδοκρινές καρκίνωμα του μαστού (NECB). Συχνά είναι δύσκολη η διάγνωσή του, καθώς προσομοιάζει με άλλους τύπους, αλλά με τη χρήση ειδικών δεικτών ανοσοϊστοχημείας η διάγνωση μπορεί να επιβεβαιωθεί και να καθοριστεί και η αντίστοιχη θεραπεία (Inno et al., 2015). Τέλος, στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί νεοπλάσματα όπως: αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα, καρκίνωμα από οξεόφιλα κύτταρα, κακόηθες ογκοκύτωμα, πλειομορφικός τύπος λοβιακού καρκίνου,



λέμφωμα μαστού, εκκριτικός καρκίνος μαστού και το αποκρινές καρκίνωμα (Acevedo et al., 2014).

Εκτός βεβαίως από την ιστολογική ταξινόμηση που αποτελεί το πρωταρχικό προγνωστικό εργαλείο για την μετέπειτα θεραπευτική προσέγγιση μιας ασθενούς, ένα σημαντικό κομμάτι της νόσου το οποίο αξιολογείται σε κλινικό και ερευνητικό επίπεδο είναι τα ενδοκρινικά χαρακτηριστικά του καρκίνου του μαστού, όπως η κατάσταση των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης ή των υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, τα οποία και καθορίζουν ένα σημαντικό κομμάτι της θεραπείας ιδιαίτερα μετά από το χειρουργείο (Li et al., 2022). Μέσα από την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών του όγκου, καθίσταται εφικτή η επιλογή της βέλτιστης δυνατής θεραπευτικής προσέγγισης αλλά και η εκτίμηση της πρόγνωσης (Nagini, 2017).

### 1.5 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Στις μέρες μας λοιπόν, η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού που πραγματοποιείται με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA (DNA micro-arrays) περιλαμβάνει την παρουσία ή όχι υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), καθώς και των υποδοχέων του Ανθρώπινου Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα 2 (HER2) (Yip and Rhodes, 2014; Waks and Winer, 2019). Ήδη από το 2011, οπότε διεξήχθη το St. Gallen International Expert Consensus, έχει διατυπωθεί η αναγκαιότητα της διερεύνησης σε κάθε ασθενή με καρκίνο του μαστού της μοριακής του βάσης, δηλαδή της ενεργούς έκφρασης ή όχι των προαναφερθέντων ορμονικών υποδοχέων αλλά και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού του όγκου, Ki-67 (Goldhirsch et al., 2011). Έκτοτε, έχουν ορισθεί οι τέσσερις βασικές μορφές καρκίνου του μαστού βάσει της μοριακής έκφρασης των παραπάνω δεικτών, οι οποίες είναι (Howlander et al., 2018):

α) Ο τύπος **Luminal A** : συναντάται σε ποσοστό 60-70% των ασθενών με καρκίνο μαστού και έχει πολύ καλή πρόγνωση. Παρουσιάζει αυξημένη έκφραση υποδοχέων οιστρογόνων (ER+) ή/και προγεστερόνης (PR±), μικρή ή καθόλου έκφραση HER2 (HER2-) και χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 <20% (Pellegrino et al., 2021).

β) ο τύπος **Luminal B**: αντιστοιχεί στο 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και η πρόγνωση του είναι πιο δυσμενής από τον Luminal A. Εκφράζει μοριακούς υποδοχείς ER+ ή/και PR±, υψηλή ή χαμηλή τιμή HER2± και υψηλή τιμή Ki-67 >20% (Pellegrino et al., 2021).

γ) ο τύπος που είναι **πλούσιος σε HER 2 (HER 2 enriched)**: αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό 10-15% των ασθενών και παρουσιάζει υψηλή έκφραση HER2+, ER-, PR- και χαμηλό Ki-67 <20%.

δ) ο **τριπλά αρνητικός (triple negative - TNBC)** καρκίνος του μαστού ή *Basal-like*: Σε ποσοστό 10-20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού απαντάται ο συγκεκριμένος τύπος, ο οποίος παρουσιάζει κακή πρόγνωση και δεν εκφράζει ορμονικούς υποδοχείς (ER-, PR-, HER2-). Η έκφραση πρωτεϊνών κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 είναι υψηλή όπως και αυτή των EGFR, CK5, CK14, CK17. (Perou et al., 2000). Συνδυάζεται με αυξημένη πιθανότητα εγκεφαλικών και σπλαγχνικών μεταστάσεων αλλά και τοπικής υποτροπής ενώ αποτελεί και το 80% των καρκίνων μαστού που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου BRCA1 (Luck et al., 2008).

Τα τελευταία χρόνια περιγράφεται από κάποιους ο **Normal-like** υποτύπος, με μοριακά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του Luminal A, ο οποίος όμως παρουσιάζει χειρότερη πρόγνωση (Feng et al., 2018). Τέλος χρησιμοποιώντας λεπτομερείς ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, αναγνωρίζονται αταξινόμητοι υποτύποι που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή στην επιλογή της θεραπείας (Kumar et al., 2015).

Όπως φαίνεται και στην *Εικόνα 6*, η μοριακή κατηγοριοποίηση έχει σκοπό τον καθορισμό της πρόγνωσης και της μελλοντικής θεραπείας. Η αρχική τιμή του Ki67 είχε οριστεί ως χαμηλή όταν ήταν <14% αλλά με την αναθεώρηση που έγινε στο St. Gallen International Expert Consensus το 2013, ως Low Ki-67 ορίστηκε το <20% (Zhang, 2022).

Subtypes	Molecular Signatures	Characteristics	Treatment options <sup>a</sup>
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, Low Ki67	~ 70%, Most common Best prognosis	Hormonal Therapy Targeted Therapy
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, High Ki67	10%–20% Lower survival than Luminal A	Hormonal Therapy Targeted Therapy
HER2	ER-, PR-, HER2+	5%–15%	Targeted Therapy
Triple Negative	ER-, PR-, HER2-	15%–20% More common in black women Diagnosed at younger age Worst prognosis	Limited Targeted Therapy
Normal-like	ER+, PR±, HER2-, Low Ki67	Rare Low proliferation gene cluster expression	Hormonal Therapy Targeted Therapy

<sup>a</sup> Besides conventional surgical and non-surgical treatment.

Εικόνα 6: Μοριακοί υποτύποι καρκίνου του μαστού. (Πηγή: Feng et al., 2018)

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία και τα κλινικά πρωτόκολλα, ανάλογα με τον υποτύπο καρκίνου του μαστού που παρουσιάζει μια ασθενής, διαμορφώνεται και η κατάλληλη θεραπεία. Οι εν λόγω θεραπείες σχεδιάζονται έτσι ώστε να ανταποκρίνονται στο μοριακό προφίλ του όγκου (ανοσοϊστοχημικοί δείκτες: ER, PR, HER2, Ki-67), το γονιδιακό υπόστρωμα (BRCA1, BRCA2, PIK3CA) και διάφορους ανοσολογικούς δείκτες (Tumor Infiltrating Lymphocytes, PD-L1). Τα ανωτέρω καθώς και η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών αποτελούν τη βάση για νέους διαγνωστικούς και θεραπευτικούς αλγορίθμους. Ειδικά στον HER2+ enriched και στον TNBC οι στοχευμένες θεραπείες (ανοσοθεραπεία, μονοκλωνικά αντισώματα, κλπ.) είναι σημαντικό κομμάτι τόσο της προεγχειρητικής θεραπευτικής προσέγγισης (neoadjuvant) όσο και στην επιλογή της χειρουργικής επέμβασης στον ίδιο τον μαστό και στους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες (Loibl et al., 2021).

## 1.6 Ο ρόλος των γονιδίων στην κλινική πράξη

Εκτός από την ανωτέρω ταξινόμηση, ο μοριακός έλεγχος για τον καρκίνο του μαστού εξελίσσεται διαρκώς και ο γονιδιακός έλεγχος περνά στην κλινική πράξη. Παρακάτω αναφέρονται κάποιες μοριακές δοκιμασίες (assays) που είναι εγκεκριμένες από το FDA (USA Food and Drug Administration):

- i. Score υποτροπής 21 γονιδίων (Oncotype DX). Χρησιμοποιείται για να διερευνηθεί η πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου σε επιλεγμένους ασθενείς καθώς και το όφελος πιθανής χημειοθεραπείας (Dowsett et al., 2010)
- ii. Prosigna Gene Signature. Αφορά μια ανάλυση 50 γονιδίων, γνωστή και ως (PAM50) που σχεδιάστηκε για να βοηθήσει στην πρόγνωση κινδύνου απομακρυσμένων μεταστάσεων 5 χρόνια μετά από σταθερή ορμονική θεραπεία σε ασθενείς με ER+ πρώιμο καρκίνο με λιγότερους από τρεις θετικούς λεμφαδένες, κατατάσσοντας τους σε ομάδες χαμηλού, μέσου και υψηλού κινδύνου (Wallden et al., 2015).
- iii. Mamaprint. Είναι μια προγνωστική δοκιμασία που αναλύει τη δραστηριότητα 70 γονιδίων σε πρώιμο καρκίνο μαστού και την πιθανότητα υποτροπής ή μετάστασης σε επιλεγμένους ασθενείς ( Straver et al., 2009).
- iv. EndoPredict. Η ανάλυση αφορά σε 12 γονίδια καρκινικών κυττάρων ασθενών με πρώιμο καρκίνο ER+, HER2+ και μέχρι τρεις θετικούς λεμφαδένες και σχεδιάστηκε για να προβλέψει το ρίσκο απομακρυσμένων μεταστάσεων 10 χρόνια μετά την αρχική διάγνωση (Almstedt et al., 2020).

## 1.7 Παράγοντες κινδύνου καρκίνου του μαστού

Η παθογένεση του καρκίνου του μαστού δεν είναι γνωστή παρόλο που πολλοί και διαφορετικοί παράγοντες ενοχοποιούνται για την αύξηση της επίπτωσής του και για την κοινωνικο-οικονομική ποικιλότητα που παρουσιάζει σε παγκόσμιο επίπεδο (World Health Organization: WHO, 2021). Οι παράγοντες κινδύνου που έχουν καταγραφεί και εν πολλοίς συνεχίζουν να μελετώνται είναι αρκετοί και σχετίζονται τόσο με ενδογενή χαρακτηριστικά και βιολογικές εκφράσεις όσο και με εξωγενείς επιρροές.

### 1.7.1 Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

1) Φύλο: Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο καρκίνος του μαστού είναι 100 φορές συχνότερος στις γυναίκες από ότι στους άνδρες. Το γεγονός φαίνεται να οφείλεται στις ορμονικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων και στις συγκεντρώσεις οιστρογόνων και προγεστερόνης στα θήλεα άτομα που τελικά προωθούν την εκδήλωση του καρκίνου του μαστού. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση της εμφάνισης καρκίνου

μαστού στους άνδρες παγκοσμίως και παράγοντες που επηρεάζουν αυτή την αύξηση φαίνεται να είναι το μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής, η παχυσαρκία, νόσοι και όγκοι των όρχεων και μεταλλάξεις του BRCA2 γονιδίου (Fox et al., 2021).

2) Ηλικία: Με την πάροδο της ηλικίας αυξάνεται και ο κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου του μαστού και οι γυναίκες ηλικίας 55-69 ετών είναι εκείνες με το μεγαλύτερο κίνδυνο ενώ μόνο το 2-7% όλων των περιπτώσεων απαντάται σε ηλικίες κάτω των 40 ετών. Παρόλα αυτά στις γυναίκες κάτω των 35 ετών ο καρκίνος του μαστού παραμένει η πιο συχνή κακοήθεια. Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι ενώ στις ηλικίες >45 ετών η νόσος είναι πιο συχνή σε γυναίκες της Καυκάσιας φυλής, σε ηλικίες <35 ετών η θνησιμότητα και η νοσηρότητα είναι μεγαλύτερες στις Αφρο-αμερικανίδες (Radecka and Litwiniuk, 2016). Τέλος οι γυναίκες <40 ετών συνήθως διαγιγνώσκονται σε πιο προχωρημένο στάδιο της νόσου, με πιο επιθετικούς και μεγάλους όγκους και για αυτό έχουν χειρότερη πρόγνωση και μεγαλύτερη θνησιμότητα (Shoemaker et al., 2018).

3) Γενετική προδιάθεση: Περίπου το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού θεωρούνται κληρονομικές, αν και μόλις στο 30% αυτών αναγνωρίζεται συγκεκριμένη μετάλλαξη. Υπολογίζεται ότι σε ένα ποσοστό 5-10% η νόσος σχετίζεται με ένα ισχυρά «διεισδυτικό» γονιδιακό υπόστρωμα, όπως αυτό των BRCA1 και BRCA2 (Samadder et al., 2019). Επίσης οι γυναίκες Ashkenazi έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικά μεγαλύτερη παρουσία μεταλλάξεων στα BRCA1 και BRCA2 γονίδια (Houghton and Hankinson, 2021). Είναι σημαντικό, γυναίκες που έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, αμφοτερόπλευρα ή εμφάνιση του καρκίνου σε πρώιμη ηλικία να υπόκεινται σε γονιδιακό έλεγχο προκειμένου να αναγνωρισθεί τυχόν κληρονομικό καρκινικό σύνδρομο.

Παρακάτω αναφέρονται οι συχνότερες και πλέον μελετημένες αλληλουχίες που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού:

- BRCA1 and BRCA2: πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA1 και 2 αποτελούν το κύριο αίτιο εμφάνισης κληρονομικού καρκίνου του μαστού. Στις ασθενείς που έχουν κληρονομήσει ένα αλληλόμορφο μεταλλαγμένου γονιδίου ελλοχεύει υψηλός κίνδυνος εκδήλωσης της νόσου. Τα εν λόγω γονίδια συμμετέχουν στη διαδικασία επιδιόρθωσης της αλυσίδας του DNA και επομένως τυχόν μεταλλάξεις τους σχετίζονται άμεσα με ανάπτυξη καρκίνου μαστού – ωθηκών (κυρίως το BRCA1). Οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού >60% όσων τις φέρουν ενώ αντίστοιχα καρκίνου των

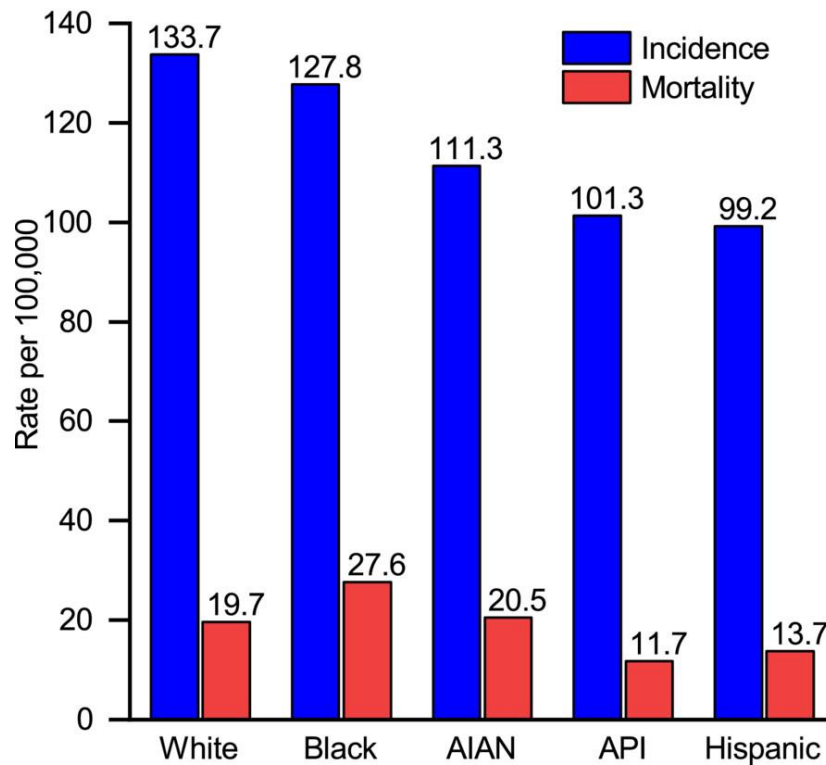
ωοθηκών κατά 40-60% για το BRCA1 και κατά 15-30% για το BRCA2 (Sessa et al., 2023).

- ATM: υπό φυσιολογικές συνθήκες, το προϊόν του γονιδίου ATM συμμετέχει στην επιδιόρθωση διαφόρων βλαβών του DNA. Η κληρονόμηση του ενός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου συσχετίζεται με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και μαζί με το CHEK2 αποτελούν τα δύο γονίδια με την πιο ισχυρή συσχέτιση με τον ER+ καρκίνο του μαστού (Dorling et al., 2021).
- TP53: το TP53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, υπεύθυνο υπό φυσιολογικές συνθήκες να παράγει την πρωτεΐνη p53, η οποία με την σειρά της σηματοδοτεί την διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης μη φυσιολογικών κυττάρων. Αποτελεί την πιο συχνή γονιδιακή μετάλλαξη σε όλους τους τύπους καρκίνου, στο 30% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού και συναντάται ιδιαίτερα συχνά σε ασθενείς με triple negative καρκίνο μαστού (Shahbandi et al., 2020). Οι μεταλλάξεις αυτές είναι επίσης υπεύθυνες για το σύνδρομο πολλαπλών κακοηθειών Li-Fraumeni στα πλαίσια του οποίου ελλοχεύει ισχυρός κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου του μαστού σε νεαρές ηλικίες <30 ετών (Li-Fraumeni Syndrome, 2022).
- CHEK2: μελέτες έχουν δείξει ότι κληρονομούμενες μεταλλάξεις και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου CHEK2 οδηγούν επίσης σε Σύνδρομο Li-Fraumeni. Επιπλέον, έχει φανεί ότι οι ετεροζυγώτες μεταλλαγμένου γονιδίου, έχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (Dorling et al., 2021).
- PTEN: υπό φυσιολογικές συνθήκες, το γονίδιο PTEN διαμεσολαβεί στην ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης. Κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου PTEN οδηγούν στο Σύνδρομο Cowden, με συνέπεια αυξημένη επίπτωση τόσο καλοηθών όγκων (κυρίως αμαρτωμάτων) σε διάφορα σημεία του σώματος όσο και κακοηθών ογκιδίων στον μαστό (Huber-Keener, 2022).
- CDH1: μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου οδηγούν στην εμφάνιση μιας σπάνιας μορφής καρκίνου του στομάχου αλλά και ενός λοβιακού διηθητικού ER+ καρκινώματος στο μαστό (Hu et al., 2021).
- PALB2, BARD1, RAD51C, RAD51D: Πρόσφατες πολυκεντρικές μελέτες που διενεργήθηκαν σε δείγμα 64.000 γυναικών ανέδειξαν σημαντική συσχέτιση των μεταλλάξεων αυτών των γονιδίων με ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Narod, 2021).

4) Οικογενειακό ιστορικό: Η εκδήλωση καρκίνου του μαστού σε συγγενείς πρώτου βαθμού αλλά και δευτέρου βαθμού αποτελεί ισχυρή ένδειξη υψηλού κινδύνου για καρκίνο του μαστού με κληρονομικό ή οικογενές πρότυπο. Συνολικά, το 5-10% των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού έχουν συγγενείς με την ίδια νόσο ή με καρκίνο ωοθηκών ενώ οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις σχετίζονται με ανάπτυξη και άλλων τύπων καρκίνου όπως αυτοί των σαλπίνγων, του παγκρέατος ή της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (Liu et al., 2021).

5) Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού: μια γυναίκα με ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού έχει αυξημένο κίνδυνο να παρουσιάσει καρκίνο στον αντίπλευρο μαστό με ένα ετήσιο ποσοστό 0,4% που παραμένει το ίδιο για τα επόμενα 25 χρόνια παρακολούθησης (Giannakeas et al., 2021).

6) Φυλή: βάσει επιδημιολογικών ερευνών που δημοσιεύονται στην βιβλιογραφία, οι γυναίκες της λευκής φυλής παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στο μαστό, ακολουθούμενες από τις Αφρο-αμερικανίδες και με το μικρότερο κίνδυνο να εμφανίζεται στην Ισπανική φυλή. Ωστόσο, αν οι γυναίκες τις μαύρης φυλής διαγνωστούν με καρκίνο του μαστού, παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας, 40% υψηλότερα από τις λευκές και πάνω από 50% υψηλότερα από εκείνες της Ασίας/Ειρηνικού. Επιπλέον στις γυναίκες της μαύρης φυλής διαπιστώνεται η υψηλότερη επίπτωση της νόσου στις ηλικίες <49 ετών ενώ στις ηλικίες 70-75 ετών υπερτερούν οι Αμερικανίδες Ινδιάνες / Ιθαγενείς της Αλάσκας (Giaquinto et al., 2022). Τέλος, στις Εβραίες Ασκενάζι έχει παρατηρηθεί υψηλότερη συχνότητα ύπαρξης μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA1, με συνέπεια υψηλότερα ποσοστά καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Hamada et al., 2019). Στην *Εικόνα 7* παρουσιάζεται το διάγραμμα νοσηρότητας και θνητότητας για τον καρκίνο του μαστού ανάλογα με τη φυλή και την εθνικότητα.



*Εικόνα 7:* Διάγραμμα νοσηρότητας (2015-2019) και θνητότητας (2016-2020) σε γυναίκες διαφορετικών φυλών / εθνικότητας στις ΗΠΑ. (Πηγή: Giaquinto *et al.*, 2022)

7) Πυκνότητα αδενικού ιστού – Άλλες αναπτυσσόμενες βλάβες : σύμφωνα με μελέτες, όσο περισσότερο πυκνός είναι ο αδενικός ιστός τόσο μεγαλύτερος και ο κίνδυνος εκδήλωσης καρκίνου του μαστού ανάμεσα σε γυναίκες ίδιας ηλικίας. Η αξιολόγηση της πυκνότητας μέσω του συστήματος βαθμολόγησης BIRADS αποτελεί αξιόπιστο δείκτη έγκαιρης διάγνωσης και ένδειξη για τυχόν περαιτέρω έλεγχο ή αντιμετώπιση (Bodewes *et al.*, 2022). Παράλληλα έχει διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένες καλοήθειες αδενικές βλάβες όπως η υπερπλασία των πόρων, το ινοαδένωμα, η σκληρυντική αδένωση και η θηλωμάτωση αυξάνουν λίγο τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού ενώ η άτυπη υπερπλασία των πόρων ή των λοβίων μπορεί να αυξήσει αυτό τον κίνδυνο έως και 5 φορές περισσότερο (Feng *et al.*, 2018).

8) Εμμηναρχή και εμμηνόπαυση: μελέτες έχουν δείξει ότι γυναίκες με πρόωμη εμμηναρχή (ηλικία μικρότερη των 12 ετών) και όψιμη εμμηνόπαυση, λόγω αυξημένης ορμονικής έκθεσης παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (Kashyap *et al.*, 2022). Βάσει μελετών έχει αποδειχθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της τεστοστερόνης, της βιοδιαθέσιμης τεστοστερόνης, της οιστραδιόλης και της διϋδροξυεπιανδροστερόνης (DHEAS) προκαλούν αύξηση του κινδύνου καρκίνου



μαστού συνολικά και του ER+ καρκίνου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Nounu et al., 2022).

9) Ακτινοβολία: γυναίκες που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολίες ή σε ακτινοθεραπεία έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για καρκίνο του μαστού, ο δε κίνδυνος αυτός φαίνεται να σχετίζεται με τη δόση της ακτινοβολίας που είχε δοθεί. Σε ανάλυση ασθενών με Hodgkin λέμφωμα που έχουν θεραπευτεί με ακτινοβολίες έχει παρατηρηθεί γραμμική συσχέτιση με την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και του πνεύμονα (McKeown et al., 2015).

### 1.7.2 Τροποποιήσιμοι παράγοντες κινδύνου

1) Κατανάλωση αλκοόλ: εδώ και αρκετές δεκαετίες η κατανάλωση αλκοόλ έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Ήδη το 1987 το επιστημονικό περιοδικό New England Journal of Medicine δημοσίευσε δύο έρευνες σύμφωνα με τις οποίες, ακόμη και η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ σχετιζόταν με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (Willet et al., 1987; Schatzkin et al., 1987). Το 2018 η αναθεώρηση που δημοσιεύτηκε από το Παγκόσμιο Ίδρυμα Μελέτης του Καρκίνου (WCRF) και του Αμερικάνικου Ιδρύματος Μελέτης του Καρκίνου (AICR) κατέληξε ότι η κατανάλωση αλκοόλ είναι μια «πιθανή αιτία» (probable cause) για την προεμμηνοπαυσιακή και μια «πειστική αιτία» (convincing cause) για την μετεμμηνοπαυσιακή ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Freudenheim, 2020).

2) Παχυσαρκία: βάσει επιδημιολογικών ερευνών, η παχυσαρκία μετά την εμμηνόπαυση αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του μαστού. Φαίνεται ότι η αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων από τον υπερβάλλοντα λιπώδη ιστό δρα επιβαρυντικά στην πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν έναν επιπλέον παράγοντα κινδύνου, τόσο λόγω αύξησης του λιπώδους ιστού όσο και λόγω εξωγενούς λήψης οιστρογόνων για πρόληψη της οστεοπόρωσης και ο κίνδυνος αυτός δείχνει να είναι δόσοεξαρτώμενος (Liu et al., 2022). Το 1976 έγινε η πρώτη αναφορά της παχυσαρκίας ως επιβαρυντικού παράγοντα στη διάγνωση και επιβίωση ασθενών με καρκίνο μαστού οπότε παρατηρήθηκε ότι οι παχύσαρκες γυναίκες είχαν μεγαλύτερους σε μέγεθος όγκους, υψηλότερα ποσοστά λεμφαδενικής διασποράς και χαμηλότερη συνολική επιβίωση (Abe et al., 1976). Σήμερα γνωρίζουμε ότι η παχυσαρκία σχετίζεται τόσο με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού όσο και περισσότερες επιπλοκές από το

χειρουργείο και τις ακτινοθεραπείες, αυξημένο ποσοστό υποτροπών σε σχέση με τις νορμοβαρείς ασθενείς και μικρότερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την ενδοκρινική θεραπεία (Lee et al., 2019).

3) Σωματική άσκηση: σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, η τακτική, ήπια σωματική δραστηριότητα μειώνει σε σημαντικό βαθμό τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ενώ η καθιστική ζωή αποτελεί παράγοντα αυξημένου κινδύνου για μη ορμονοεξαρτώμενους τύπους της νόσου (Dixon-Suen et al., 2022).

4) Απόκτηση παιδιών: βάσει επιδημιολογικών ερευνών γυναίκες που είχαν τελειόμηνο τοκετό σε μικρή ηλικία είχαν πολύ χαμηλότερο κίνδυνο εκδήλωσης καρκίνου του μαστού. Αν αυτό γίνει πριν την ηλικία των 20 ετών ο κίνδυνος μειώνεται κατά 50%. Αντιθέτως, γυναίκες που γεννούν σε ηλικία μεγαλύτερη των 35 ετών έχουν 22% μεγαλύτερο κίνδυνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο κίνδυνος αυτός είναι μειωμένος στις ασθενείς με ορμονο-ευαίσθητους όγκους, όπως επίσης και στα λοβιακά καρκινώματα (Kobayashi et al., 2012).

5) Θηλασμός: η μακρά διάρκεια του θηλασμού όπως και ο αριθμός των κηρήσεων φαίνεται να λειτουργούν προστατευτικά στην εκδήλωση καρκίνου του μαστού, κάτι που έχει μελετηθεί τόσο σε προεμμηνοπαυσιακές όσο και σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς (Ursin et al., 2005).

6) Ορμονοθεραπεία μετά την εμμηνόπαυση: η χορήγηση ορμονοθεραπείας που εφαρμόζεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την πρόληψη της οστεοπόρωσης και του καρδιαγγειακού κινδύνου, φαίνεται να συνιστά έναν σχετικό παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του μαστού. Στις περισσότερες γυναίκες ο 5ετής κίνδυνος είναι χαμηλός (<3%) αλλά σε γυναίκες με προδιαθεσικούς παράγοντες (ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό, φορείς μεταλλάξεων BRCA 1 ή 2, κλπ.) το ποσοστό αυτό ξεπερνά το 6% και η θεραπεία πρέπει να προσαρμόζεται ανάλογα (Rozenberg et al., 2021). Επιπλέον, οι γυναίκες που λαμβάνουν ορμονική θεραπεία υποκατάστασης στερούνται της ευεργετικής δράσης και της μείωσης του κινδύνου εκδήλωσης καρκίνου του μαστού που προσφέρει τυχόν σωματική τους άσκηση (Pizot et al., 2016).

7) Σακχαρώδης διαβήτης: ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί πλέον αποδεδειγμένο παράγοντα κινδύνου για διάφορες μορφές καρκίνου μεταξύ των οποίων και εκείνον του μαστού. Τόσο ο ΣΔ1 όσο και ο ΣΔ2 έχουν μόνιμη θετική συσχέτιση με νοσηρότητα αλλά και με θνητότητα από καρκίνο, γεγονός που καταδεικνύει την επίδραση της υπεργλυκαιμίας και κατ' επέκταση της ινσουλίνης στην παθογένεια της νόσου. Επίσης ο ΣΔ πολύ συχνά συνυπάρχει με την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο και αυτό

εξηγεί εν πολλοίς τους κοινούς μηχανισμούς που συνδέουν αυτές τις νόσους με την καρκινογένεση. Στον μηχανισμό αυτό συμμετέχουν η υπερινσουλιναίμια, οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες IGF's, η υπεργλυκαιμία, η δυσλιπιδαιμία, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες και το εντερικό μικροβίωμα (Kang & LeRoith, 2018). Σε πολλές μελέτες επίσης έχει φανεί η θετική συσχέτιση της μετοφορμίνης με μείωση της νοσηρότητας από διάφορες μορφές καρκίνου, μεταξύ των οποίων και εκείνου του μαστού (Wojciechowska et al., 2016). Σε μοριακό επίπεδο η έρευνα έχει στραφεί στο μεταβολισμό των ίδιων των λιποκυττάρων και στη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών και άλλων μορίων που εκκρίνονται και που ίσως να σχετίζονται με το μηχανισμό της καρκινογένεσης.

### 1.7.3. Παράγοντες με ασαφή επίδραση

1) Χημικοί παράγοντες από το περιβάλλον: στην βιβλιογραφία διατυπώνεται ότι ορισμένες χημικές ουσίες που υπάρχουν σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης παρουσιάζουν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των οιστρογόνων και δυνητικά θα μπορούσαν να είναι αιτία αύξησης του κινδύνου για εκδήλωση καρκίνου μαστού. Ουσίες που έχουν μελετηθεί είναι οι πολυβρωμιωμένοι διφαινυλ-αιθέρες (PBDE) που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη βιομηχανία ηλεκτρονικών συσκευών, καλωδίων, επίπλων, στρωμάτων, υφασμάτων κλπ. και, σύμφωνα με έρευνες, σχετίζονται με αυξημένη πιθανότητα για καρκίνο μαστού (P et al., 2022). Στο περιβάλλον οι δυνητικά επικίνδυνες ουσίες που μελετώνται είναι πολλές και προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Τέτοιες είναι οι Επίμονοι Οργανικοί Ρύποι (POP), διάφορα φυτοφάρμακα (DDT/DDE), βιομηχανικά πλαστικά προϊόντα, προϊόντα επεξεργασίας τροφίμων, τοξικά μέταλλα κ.α. που φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο καρκινογένεσης στο μαστό, την επιθετικότητα και τη μεταστατική συμπεριφορά του όγκου καθώς και την αντίσταση στις χημειοθεραπείες (Koual et al., 2020).

2) Κάπνισμα: Σε μεγάλες έρευνες των τελευταίων δεκαετιών έχει μελετηθεί η επίδραση του καπνίσματος στον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και έχει διαπιστωθεί μια μέτρια αλλά σημαντική αύξηση αυτού του κινδύνου, ειδικά στις γυναίκες που η ηλικία έναρξης του καπνίσματος είναι πρόωμη και σε εκείνες που έχουν βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό (Jones et al., 2017). Σημαντική επίσης ήταν η διαπίστωση μεγάλης Ευρωπαϊκής μελέτης (Mendelian randomization) που έδειξε πιθανή αιτιολογική συσχέτιση του καπνίσματος με τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού για το εφ' όρου ζωής κάπνισμα αλλά όχι για τον αριθμό των ημερήσιων τσιγάρων (Park et al., 2021). Η ακριβής αιτιοπαθογένεια δεν είναι γνωστή.

3) Νυχτερινή εργασία: πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με την επίδραση της νυχτερινής εργασίας σε διάφορες νόσους και στον κίνδυνο καρκινογένεσης. Μια μετα-ανάλυση του 2021 που περιλάμβανε 9,3 εκατομμύρια συμμετέχουσες ανέδειξε θετική συσχέτιση της νυχτερινής εργασίας με την αύξηση της νοσηρότητας από καρκίνο του μαστού και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο θανάτου από τη νόσο: 2.9% συνολικά, 5.3% για τις εργαζόμενες σε εναλλασσόμενες νυχτερινές βάρδιες και 8.6% για όσες γυναίκες εργάζονταν έτσι για τουλάχιστον 10 χρόνια (Wei et al., 2021). Πιθανολογείται η επίδραση της νυχτερινής εργασίας στη διαταραχή του κερκαδιανού ρυθμού και στις διακυμάνσεις της μελατονίνης και για αυτό το λόγο ερευνάται η συσχέτιση με τους ορμονο-εξαρτώμενους υποτύπους της νόσου (Hansen, 2017).

### **1.8 Πρόληψη του καρκίνου του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια εξαιρετικά συχνή για τον γυναικείο πληθυσμό νόσο, η οποία δύναται να προληφθεί σε δευτερογενές επίπεδο, μέσω του screening του γενικού πληθυσμού, ώστε να διαγνωσθεί και να αντιμετωπισθεί έγκαιρα και έγκυρα. Οι σύγχρονοι τρόποι πρόληψης που περιλαμβάνουν τακτική λεπτομερή απεικόνιση (screening), εξατομικευμένη προσέγγιση ανάλογα με τους παράγοντες κινδύνου της εξεταζόμενης και εξειδικευμένο μοριακό - γονιδιακό έλεγχο έχουν οδηγήσει σε σημαντική μείωση των θανάτων από τη νόσο. Παρόλα αυτά ο καρκίνος του μαστού παραμένει η πρωταρχική αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες ηλικίας 20-59 ετών και το γεγονός αυτό καθιστά τον τακτικό και προσεκτικό προληπτικό έλεγχο αναγκαία συνθήκη (Sun et al., 2017).

Πρωταρχικός στόχος του προσυμπτωματικού ελέγχου για τον καρκίνο του μαστού είναι η μείωση της νοσηρότητας στα πλαίσια της έγκαιρης ανίχνευσης της νόσου σε αρχικά στάδια, οπότε η πλήρης ίαση είναι εφικτή και η πιθανότητα περιοχικών ή απομακρυσμένων μεταστάσεων είναι μικρότερη. Η πρόληψη και η μείωση της νοσηρότητας σε γυναίκες αναπαραγωγικής και παραγωγικής ηλικίας έχει προφανώς πολλαπλά οφέλη για την ατομική, οικογενειακή, κοινωνική, εργασιακή ισορροπία και ανάπτυξη. Στην διεθνή βιβλιογραφία, πολλαπλές τυφλές τυχαιοποιημένες μελέτες επιβεβαιώνουν την αναγκαιότητα και την χρηστικότητα της μαστογραφίας ως μεθόδου διαλογής και έγκαιρης διάγνωσης καρκίνου του μαστού (Duffy et al., 2020).

Η ψηφιακή μαστογραφία συνιστά μια εύκολη ακτινολογική εξέταση, με μικρό κόστος και δόση ακτινοβολίας. Η ηλικία έναρξης του screening βρίσκεται υπό συνεχή

επιστημονική παρακολούθηση και οι οδηγίες (Guidelines) αναπροσαρμόζονται τακτικά. Σύμφωνα με τις Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ογκολογίας (ESMO) ασυμπτωματικές γυναίκες μετρίου κινδύνου πρέπει να κάνουν μαστογραφία κάθε 1-2 χρόνια στις ηλικίες 50-69 ετών. Σε γυναίκες μετρίου κινδύνου ηλικίας 40-49 και 70-74 ετών το screening συστήνεται ανά έτος αν και το όφελος από αυτή την πρακτική είναι υπό συζήτηση (ESMO Interactive Guidelines, 2022). Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι σε μεγάλη μελέτη που αφορούσε σε πάνω από 160.000 γυναίκες στο Ηνωμένο Βασίλειο και δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Lancet το 2020, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της τάξης του 25% στη θνητότητα από καρκίνο του μαστού μετά από ετήσιο προληπτικό έλεγχο με μαστογραφία σε γυναίκες 40 -49 ετών (Duffy et al., 2020). Τέλος το NCCN (National Comprehensive Cancer Network) σε γυναίκες μετρίου κινδύνου συστήνει ετήσιο προληπτικό έλεγχο από την ηλικία των 40 ετών ([www.nccn.org/Breast Cancer Screening and Diagnosis Version 1.2023](http://www.nccn.org/Breast Cancer Screening and Diagnosis Version 1.2023)).

Η ψηφιακή, πλέον, μαστογραφία αποτελεί την κύρια εξέταση για έγκαιρη διάγνωση ύποπτων βλαβών του μαστού αλλά η αποτελεσματικότητά της περιορίζεται σε γυναίκες με πυκνό μαστό γιατί συχνά μια ύποπτη βλάβη «καλύπτεται» από τον ίδιο τον μαζικό αδένα. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ψηφιακής μαστογραφίας είναι περίπου 90% ενώ η προγνωστική της αξία είναι μόλις 15%. Για το λόγο αυτό ο απεικονιστικός προληπτικός έλεγχος συνήθως συμπληρώνεται με υπερηχογράφημα μαστών και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται επιπλέον αναγνώριση των καλοηθών βλαβών του μαστού κατά 50%. Η μαγνητική τομογραφία μαστών (MRI) συμπληρώνει τη διαγνωστική προσπέλαση μιας και μπορεί να διακρίνει τις καλοήθειες από τις κακοήθειες βλάβες σε ποσοστό 72% (Conti et al., 2021).

Μέσα από την εξέλιξη της ψηφιακής τεχνολογίας και της πολυετούς εμπειρίας που προστίθενται στις γνώσεις για τον καρκίνο του μαστού, η ψηφιακή μαστογραφία μπορεί σε σημαντικό βαθμό πλέον να διακρίνει μια βλάβη και να την κατατάξει στον αντίστοιχο μοριακό τύπο. Για παράδειγμα, μια καλά περιγεγραμμένη βλάβη, με οπίσθια ενίσχυση και με μεγάλο μέγεθος συσχετίζεται με TNBC, ενώ υψηλής υποψίας μικροασβεστώσεις με μικροοζώδη όρια είναι ενδεικτικά του HER2 enriched υποτύπου. Αντίστοιχα χαρακτηριστικά μπορούν να συσχετισθούν με τον Luminal A μοριακό υποτύπο και να συνδυαστούν με υπερηχογραφικά ευρήματα, έτσι ώστε να προστεθούν στην κλινική εκτίμηση και να αποτελέσουν σημαντικό προγνωστικό στοιχείο που θα βοηθήσει στις πιθανές θεραπευτικές επιλογές (Ian et al., 2021).

Στη διαγνωστική φαρέτρα της πρόληψης και έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου του μαστού παραμένει η τομοσύνθεση μαστού, η εξέλιξη της οποίας οδηγεί σε ακριβέστερη διάγνωση σε ασθενείς με ύποπτη ή γνωστή βλάβη στο μαστό και σε συνδυασμό με καθοδηγούμενη βιοψία βοηθάει ιδιαίτερα στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση με μειωμένη δόση ακτινοβολίας (Garcia & Fernandez, 2019).

Παράλληλα ο υπερηχογραφικός έλεγχος παραμένει σημαντικό εργαλείο διάγνωσης, μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τη μορφολογία, την οριοθέτηση, την εσωτερική δομή και τα όρια μιας βλάβης, με μεγάλη ακρίβεια ακόμη και σε μαστούς με μεγάλη πυκνότητα και μπορεί να ταξινομήσει μια καλοήγη βλάβη με διαγνωστική ακρίβεια 99.5% (Guo et al., 2018).

Η μαγνητική τομογραφία (MRI) μαστών είναι μια λεπτομερής απεικονιστική μέθοδος που δεν μπορεί να υποκαταστήσει την ψηφιακή μαστογραφία ως μέσο screening του πληθυσμού αλλά έχει πολλά πλεονεκτήματα σε γυναίκες υψηλού κινδύνου, σε εκείνες που έχουν ισχυρό οικογενειακό ιστορικό ή θετικό γονιδιακό έλεγχο για BRCA, σε γυναίκες με ενθέματα σιλικόνης και στις περιπτώσεις εκείνες που μια βλάβη στο μαστό δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ή να περιγραφεί με ακρίβεια. Με τον τρόπο αυτό έχει μειωθεί ο αριθμός των βιοψιών μαστού που διενεργούνται και σε αρκετές περιπτώσεις υπήρξε έγκαιρη αντιμετώπιση νέων γυναικών με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού λόγω γονιδιακού προφίλ. Τέλος η MRI, η οποία εξελίσσεται με νέες τεχνικές όπως η υβριδική PET-MRI, η ultra-high field MRI κ.α., αποτελεί βασικό εργαλείο για τον καθορισμό της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας. Παρόλα αυτά είναι μια εξέταση με υψηλό κόστος, με αυξημένο ποσοστό ψευδώς θετικών ευρημάτων και που απαιτεί εξειδικευμένη γνώση εξοπλισμού και διάγνωσης (Bougias & Stogiannos, 2022).

Τελειώνοντας, μια ειδική κατηγορία ασθενών είναι τα διεμφυλικά άτομα (transgender) για τα οποία η διεθνής βιβλιογραφία δεν έχει συλλέξει επαρκή στοιχεία και οι ιατρικές οδηγίες (Guidelines) δεν είναι ακόμη καθορισμένες. Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού στα άτομα αυτά είναι άγνωστη λόγω ανεπαρκών επιδημιολογικών δεδομένων και έλλειψης μελετών. Στην παρούσα φάση η διαχείριση και ο προληπτικός έλεγχος γίνεται με κλινικά κριτήρια και με αναφορές περιστατικών (case reports) (Brown et al., 2021). Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί ότι στα διεμφυλικά άτομα η ηλικία διάγνωσης του καρκίνου του μαστού είναι μικρότερη (Stone et al., 2018).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Πρόγνωση και μοριακά μονοπάτια του Καρκίνου του Μαστού**

### **2.1 Σταδιοποίηση του καρκίνου μαστού**

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού διενεργείται με βάση το διεθνές, τροποποιημένο σύστημα ταξινόμησης TNM (Tumor-Nodes-Metastasis), όπως έχει διατυπωθεί από την Αμερικανική Επιτροπή Σταδιοποίησης του Καρκίνου (AJCC). Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού, όπως και άλλων μορφών καρκίνου, με βάση το διεθνές σύστημα ταξινόμησης TNM, αποτελεί βασικό βήμα στην θεραπευτική προσέγγιση αλλά και στον καθορισμό της πρόγνωσης της νόσου. Το παρόν σύστημα υπολογίζει αρχικά το μέγεθος του όγκου (T), την παρουσία ή όχι διηθημένων λεμφαδένων (N) και τέλος την παρουσία ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων (M) και στην συνέχεια ομαδοποιεί τα δεδομένα για τον προσδιορισμό του σταδίου της νόσου, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (Giuliano et al., 2018).

Ωστόσο, στις μέρες μας η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού δεν επαφίεται αποκλειστικά στο πρότυπο TNM, αλλά εξαρτάται και από ορισμένους βιοδείκτες, όπως είναι η έκφραση ή όχι ορισμένων υποδοχέων αλλά και άλλων μοριακών δεικτών που σχετίζονται με τον κακοήγη όγκο (Hortobagyi et al., 2018).

Πιο αναλυτικά, η 8<sup>η</sup> και τελευταία επικαιροποίηση της AJCC για τον καρκίνο του μαστού, που έγινε το 2017, έλαβε υπόψη της, όχι μόνο τα παθολογικά κριτήρια, αλλά και άλλους βιολογικούς παράγοντες, όπως ο βαθμός κακοήθειας, ο ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η παρουσία μικρομεταστάσεων στον όγκο και στους λεμφαδένες, η έκφραση ορμονικών υποδοχέων, η έκφραση του HER2 και κάποια γονιδιακά δεδομένα που αποδεδειγμένα πλέον επηρεάζουν την έκταση, την πρόγνωση αλλά και την επιβίωση της νόσου (Giuliano et al., 2018).

Αυτοί οι εργαστηριακοί προσδιορισμοί επηρεάζουν άμεσα το θεραπευτικό πλάνο και την πρόγνωση της νόσου (Provenzano, 2021). Κρίνεται δόκιμο λοιπόν το γεγονός ότι το σύστημα TNM έχει τροποποιηθεί και στην σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού

εμπεριέχει και τους κρίσιμους για την κλινική πρακτική μοριακούς δείκτες, ER/ PR/ HER2/ Ki67 (Moo et al., 2018).

Αναφορικά με το μέγεθος του όγκου, η ταξινόμηση με βάση κλινικά και παθολογοανατομικά κριτήρια φαίνεται στον *Πίνακα 1* που ακολουθεί.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του όγκου (T) με κλινικά (cT) και παθολογοανατομικά κριτήρια (pT), σύμφωνα με το AJCC.

<b>Κατηγορία όγκου T</b>	<b>Κριτήρια T</b>
<b>Tx</b>	Δεν προσδιορίζεται ο πρωτοπαθής όγκος
<b>T0</b>	Χωρίς ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
<b>Tis (DCIS)*</b>	Πορογενές καρκίνωμα in situ
<b>Tis (Paget)</b>	Νόσος Paget της θηλής, μη σχετιζόμενο με διηθητικό καρκίνο μαστού
<b>T1</b>	Μέγιστη διάμετρος $\leq 20$ mm
<b>T1mi</b>	Μικροδιήθηση - μέγιστη διάμετρος $\leq 1$ mm
<b>T1a</b>	Μέγιστη διάμετρος $> 1$ mm και $\leq 5$ mm
<b>T1b</b>	Μέγιστη διάμετρος $> 5$ mm και $\leq 10$ mm
<b>T1c</b>	Μέγιστη διάμετρος $> 10$ mm και $\leq 20$ mm
<b>T2</b>	Μέγιστη διάμετρος $> 20$ mm και $\leq 50$ mm



<b>T3</b>	Μέγιστη διάμετρος >50 mm
<b>T4</b>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους, με διήθηση του θωρακικού τοιχώματος ή του δέρματος
<b>T4a</b>	Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα
<b>T4b</b>	Εξέλκωση ή/και μακροσκοπικά δορυφόρα οζίδια ή/και οίδημα (όχι φλεγμονώδες καρκίνωμα)
<b>T4c</b>	Ταυτόχρονη παρουσία T4a και T4b
<b>T4d</b>	Φλεγμονώδης καρκίνος μαστού

\*Το in situ λοβιακό καρκίνωμα θεωρείται καλοήθης νόσος του μαστού

*Πηγή: Giuliano et al., 2018*

Σχετικά με την αξιολόγηση των περιοχικών λεμφαδένων, η ταξινόμηση δεν άλλαξε από την τελευταία της μορφή και απεικονίζεται στον Πίνακα 2, με βάση τα παθολογοανατομικά κριτήρια του όγκου.

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των λεμφαδένων (N) με παθολογοανατομικά κριτήρια (pN), σύμφωνα με το AJCC.

<b>Κατηγορία (N)</b>	<b>Κριτήρια</b>
<b>pNx</b>	Δεν προσδιορίζονται επιχώριοι λεμφαδένες
<b>pN0</b>	Δεν ανευρίσκεται μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες
<b>pN0(i+)</b>	Μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα (ITC) στους επιχώριους λεμφαδένες
<b>pN0(mol+)</b>	Μοριακά ευρήματα με μέθοδο RT-PCR
<b>pN1</b>	Μικρομεταστάσεις ή μεταστάσεις σε 1-3 επιχώριους λεμφαδένες
<b>pN1mi</b>	Μικρομεταστάσεις (περίπου 200 κύτταρα >0,2 mm και ≤2 mm
<b>pN1a</b>	Μετάσταση σε 1-3 λεμφαδένες, η μία >2 mm
<b>pN1b</b>	Μετάσταση σε λεμφαδένες φρουρούς της σύστοιχης μασχάλης
<b>pN1c</b>	Συνδυασμός pN1a και pN1b

**pN2**

Μετάσταση σε 4-9 επιχώριους  
λεμφαδένες ή απεικονιστικά  
θετικοί μασχαλιαίοι  
λεμφαδένες

**pN3**

Μετάσταση σε  $\geq 10$   
μασχαλιαίους λεμφαδένες  
ή σε υποκλείδιους λεμφαδένες  
(επίπεδο III)  
ή απεικονιστικά θετικοί  
μασχαλιαίοι λεμφαδένες σε  
παρουσία ενός ή περισσότερων  
LN επιπέδου I και II  
ή σε τουλάχιστον 3 LN με  
παρουσία μικρομεταστάσεων  
ή σε σύστοιχους υπερκλείδιους  
λεμφαδένες

---

Πηγή: Giuliano *et al.*, 2018

Τέλος, η ταξινόμηση με κριτήριο την ύπαρξη μεταστάσεων φαίνεται στον *Πίνακα 3*:

Πίνακας 3: Ταξινόμηση μεταστάσεων (M) με παθολογοανατομικά κριτήρια (pN), σύμφωνα με το AJCC.

<b>Κατηγορία (M)</b>	<b>Κριτήρια</b>
<b>Mx</b>	Η παρουσία μετάστασης δεν μπορεί να αξιολογηθεί
<b>M0</b>	Απουσία κλινικής ή απεικονιστικής ένδειξης μετάστασης
<b>cM0(I+)</b>	Ανεύρεση μικροεναποθέσεων καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία ή τον μυελό των οστών ή σε περιοχικούς λεμφαδένες <2mm
<b>M1</b>	Ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης

Πηγή: Giuliano *et al.*, 2018

Συνοπτικά, λαμβάνοντας υπόψη την αναθεώρηση του TNM 2017, η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού είναι αυτή που φαίνεται στον *Πίνακα 4*, ο οποίος με αυτή την απλοποιημένη μορφή μπορεί να εφαρμοστεί σε παγκόσμιο επίπεδο, ανεξάρτητα από την δυνατότητα χρήσης των υπολοίπων προγνωστικών βιοδεικτών.

Πίνακας 4: Ανατομική σταδιοποίηση Καρκίνου Μαστού κατά TNM, σύμφωνα με την AJCC (αναθεωρημένη έκδοση 2017).

Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	IA
T0	N1mi	M0	IB
T1	N1mi	M0	IB
T0	N1	M0	IIA
T1	N1	M0	IIA
T2	N0	M0	IIA
T2	N1	M0	IIB
T3	N0	M0	IIB
T1	N2	M0	IIIA
T2	N2	M0	IIIA
T3	N1	M0	IIIA
T3	N2	M0	IIIA
T4	N0	M0	IIIB
T4	N1	M0	IIIB
T4	N2	M0	IIIB
Any T	N3	M0	IIIC
Any T	Any N	M1	IV

- Tis = Πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS).

\*Το LCIS έχει αφαιρεθεί από την σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού, θεωρείται καλοήθης πάθηση με δυνητικά διηθητική συμπεριφορά

- T0 = Χωρίς σαφή εντόπιση του όγκου
- T1 = Μέγεθος όγκου μέγιστης διαμέτρου  $\leq 20\text{mm}$ . Περιλαμβάνει και τον όγκο T1mi
- T2 = Μέγεθος όγκου μέγιστης διαμέτρου  $> 20\text{mm}$  και  $\leq 50\text{mm}$
- T3 = Μέγεθος όγκου μέγιστης διαμέτρου  $> 50\text{mm}$
- T4 = Οποιοδήποτε μέγεθος όγκου με απευθείας διήθηση του δέρματος ή/και του θωρακικού τοιχώματος και το φλεγμονώδες καρκίνωμα του μαστού (T4d)
- N0 = Απουσία μεταστάσεων στους περιοχικούς λεμφαδένες
- N1 = Μετάσταση ή μικρομετάσταση σε 1-3 περιοχικούς λεμφαδένες
- N2 = Μετάσταση σε 4-9 περιοχικούς λεμφαδένες
- N3 = Μετάσταση σε  $> 10$  περιοχικούς λεμφαδένες
- M0 = Χωρίς παρουσία κλινικών ή απεικονιστικών απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M1 = Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

## 2.2 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού

Η πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού είναι εξαιρετικής σημασίας για πολλούς λόγους. Πρώτα από όλα δίνει πληροφορίες για την μελλοντική πορεία της νόσου, σε όλα τα επίπεδα. Δεύτερον, η πρόγνωση αποτελεί βασικό στοιχείο για την στοχευμένη θεραπεία: όσο πιο ακριβές είναι το προγνωστικό αποτέλεσμα τόσο καλύτερα οδηγούνται οι ασθενείς προς τη σωστή θεραπεία. Για παράδειγμα, ασθενείς με πτωχή πρόγνωση μπορεί να επιλεγούν για μια πιο επιθετική θεραπεία ενώ εκείνοι με την καλύτερη πρόγνωση να αποφύγουν μια δυσανάλογη υπερ-θεραπεία (overtreatment) και επομένως τα μη αναγκαία κόστη και τις δυσάρεστες παρενέργειες. Τρίτον, η πρόγνωση μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή ασθενών για ένταξη σε πειραματικά πρωτόκολλα. Τέλος, δείκτες όπως η νοσηρότητα και η θνητότητα χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή στρατηγικών πολιτικής της υγείας (Phung et al., 2019).

Η έννοια της πρόγνωσης λοιπόν αφορά τον καθορισμό της πιθανής θεραπείας λαμβάνοντας υπόψη το κόστος αυτής αλλά και τη συλλογή στοιχείων και αποτελεσμάτων για τους ασθενείς του μέλλοντος. Βασικές παράμετροι της προγνωστικής διαδικασίας είναι η θνητότητα, η νοσηρότητα, η μεταστατική διάθεση και η πιθανότητα υποτροπής της νόσου. Προγνωστικοί παράγοντες έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί πολλοί εδώ και δεκαετίες και, παρόλο που μελετώνται και εξετάζονται διαρκώς νέοι, κάποιοι από αυτούς παραμένουν ακόμη στην πρώτη γραμμή. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η σταδιοποίηση με το σύστημα TNM αποτελεί έναν από τους πρωταρχικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν αφού το στάδιο της νόσου μιας ασθενούς καθορίζει την θεραπεία που θα ακολουθηθεί (Nicolini et al., 2018).

Από τους πλέον συχνούς προγνωστικούς δείκτες, ο οποίος χρησιμοποιείται εδώ και πολλά έτη, είναι η κατάσταση των περιοχικών λεμφαδένων. Πολυάριθμες μελέτες υποδεικνύουν την παρουσία ισχυρής αιτιολογικής συσχέτισης μεταξύ του αριθμού των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων και της επιβίωσης στον καρκίνο του μαστού (Wang et al., 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων και η σημασία τους ως προγνωστικός δείκτης ξεκινά ήδη από την ακτινολογική εικόνα η οποία συνεισφέρει σημαντικά στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας πριν τη χειρουργική παρέμβαση. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η αξιολόγηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υπερηχογράφημα μασχάλης, η μαγνητική τομογραφία αλλά και η υπερηχογραφικά κατευθυνόμενη βιοψία λεμφαδένα, ενώ σημαντικές πληροφορίες μπορούν να δοθούν στην επανασταδιοποίηση της νόσου μετά από προεγχειρητική (neoadjuvant) χημειοθεραπεία (Chang et al., 2020).

Άλλος ένας προγνωστικός παράγοντας που, μέσα από πολλαπλές μελέτες, έχει αποδειχθεί η χρησιμότητά του είναι η ηλικία της ασθενούς. Γενικά οι πολύ νέες και οι ηλικιωμένες ασθενείς έχουν χειρότερη πρόγνωση. Γυναίκες <35 ετών συνήθως παρουσιάζονται με καρκίνο σε προχωρημένο στάδιο, με όγκους ER- και πιο επιθετικούς, κάτι που μεταφράζεται σε πρωιμότερη υποτροπή, μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μικρότερη επιβίωση ενώ γυναίκες ηλικίας 45-49 ετών έχουν την καλύτερη πρόγνωση. Παράλληλα, νεότερες γυναίκες με ER+ όγκους φαίνεται να έχουν μικρότερη επιβίωση χωρίς νόσο από εκείνες με όγκο ER- , την ίδια στιγμή που στις γηραιότερες ασθενείς ο τύπος των υποδοχέων δεν επηρεάζει καθόλου την πρόγνωση (Tirada et al., 2018).

Στις μέρες μας οι κλασικοί προαναφερόμενοι παράγοντες εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ιατρική πρακτική αλλά εμπλουτίζονται καθημερινά από νέες και πιο σύγχρονες τεχνικές και μεθόδους. Βασικό στοιχείο αυτής της προσέγγισης είναι οι μοριακοί τύποι του καρκίνου όπως αυτοί αναλύονται παραπάνω. Για παράδειγμα, μελέτες έχουν δείξει ότι νέες γυναίκες <40 ετών, με ER- και HER2+ νόσο σχετίζονται συχνότερα με εκδήλωση εγκεφαλικών μεταστάσεων και επομένως με σαφώς χειρότερη επιβίωση. Σε κάποιες μελέτες δε, έχει φανεί ότι ο TNBC σχετίζεται με εγκεφαλικές μεταστάσεις νωρίτερα στην πορεία της νόσου (Lopes et al., 2022).

Για να μπορεί να πραγματοποιηθεί με εγκυρότητα ο καθορισμός της πρόγνωσης ανά περίπτωση θα πρέπει συνυπολογίζονται όσο το δυνατόν περισσότεροι προγνωστικοί παράγοντες και για το λόγο αυτό έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στο παρελθόν δημιουργίας οργανωμένων και εφαρμόσιμων διαγνωστικών μοντέλων. Ένα από τα πρώτα αυτά μοντέλα ήταν ο προγνωστικός δείκτης Nottingham, ο οποίος λάμβανε υπόψη του τρεις βασικές παραμέτρους για την πρόγνωση της θνητότητας από καρκίνο του μαστού (Galea et al., 1992).

Πιο αναλυτικά, πρόκειται για ένα δείκτη που λαμβάνει υπόψιν του ως παραμέτρους για τον καθορισμό της πρόγνωσης του καρκίνου του μαστού, α) το μέγεθος του όγκου, β) το βαθμό κακοήθειας του όγκου, γ) τις μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Σχηματικά, ο δείκτης του Nottingham (NPI) ορίζεται ως:

$$(NPI) = [0.2 \times S] + N + G$$

όπου: 1) S = η διάμετρος του όγκου σε εκατοστά, 2) N = αντιπροσωπεύει την κατάσταση των λεμφαδένων (Στάδιο A: απουσία λεμφαδένων, Στάδιο B: παρουσία

λεμφαδένων μασχάλης α΄ επιπέδου, Στάδιο C: παρουσία λεμφαδένων μασχάλης β΄ επιπέδου, 3) G=βαθμός κακοήθειας του όγκου (Grade I = 1, Grade II =2, Grade III = 3). Ανάλογα με το τελικό score που βγαίνει από την συμπλήρωση των στοιχείων, προκύπτει και το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης για την συγκεκριμένη περίπτωση (G. et al., 2001) όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5:

Πίνακας 5 : Η σχέση του NPI score και της πενταετούς επιβίωσης

NPI Score	Κατάσταση πρόγνωσης	Ποσοστό 5ετούς επιβίωσης
2,0-2,4	άριστη	93%
2,4-3,4	καλή	85%
3,4-5,4	ενδιάμεση	70%
>5,4	κακή	50%

Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν, προγνωστικοί παράγοντες για τον καρκίνο του μαστού αποτελούν: α) επιδημιολογικά χαρακτηριστικά όπως η φυλή, το φύλο, η ηλικία, β) τα χαρακτηριστικά του όγκου που αφορούν στο μέγεθος, την λεμφαδενική διασπορά, τις απομακρυσμένες μεταστάσεις, την έκφραση ορμονικών υποδοχέων και γ) η γονιδιακή έκφραση των καρκινικών κυττάρων. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η σύγχρονη προσέγγιση αλλά και οι τρέχουσες συνθήκες στον τομέα της έρευνας είναι στραμμένες στο μοριακό επίπεδο, τόσο για την κατανόηση της συμπεριφοράς του καρκίνου όσο και για τη διάγνωση και θεραπεία.

Όπως αναφέρθηκε πρωτίτερα, η ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού σε μοριακούς υποτύπους αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί προγνωστικό μονοπάτι που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιλογή της θεραπείας και την έκβαση της νόσου. Σύμφωνα με έρευνες, η θνητότητα από τον καρκίνο του μαστού διαφοροποιείται ανάλογα με τον μοριακό τύπο του όγκου: η 4ετής επιβίωση για τον Luminal A υποτύπο είναι 92,5%, για τον Luminal B 90,3%, για τον HER+ enriched είναι 82,7%, ενώ τη χειρότερη πρόγνωση έχει ο τριπλά αρνητικός με ποσοστό 77% (Howlander et al., 2018).

Όπως είναι γνωστό, ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού αποτελεί έναν υποτύπο με μεγάλη ετερογένεια και πτωχή πρόγνωση και για αυτό η έρευνα έχει εστιάσει ιδιαίτερα πάνω του. Οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη γονιδιακή έκφραση μέσω των εξεφρασμένων πρωτεϊνών όπως οι EGFR, VEGF, FGFR, HER2 και ο Υποδοχέας Ανδρογόνων αλλά και στο επίπεδο της έκφρασης του RNA. Βασίζόμενοι στους ανοσολογικούς δείκτες, όπως οι PD-L1 (πρωτεΐνη αδρανοποίησης των T λεμφοκυττάρων), TMB (φορτίο μεταλλάξεων του όγκου), MSI (μικροδορυφορική



αστάθεια), μεγάλο κομμάτι της έρευνας είναι επικεντρωμένο στις δυνατότητες της ανοσοθεραπείας ενώ η ανίχνευση μεταλλάξεων στις αλύσους του DNA των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων ευελπιστεί να οδηγήσει σε στοχευμένες θεραπευτικές επιλογές στο μέλλον (Sukumat et al., 2021).

Σημαντικό ρόλο στην ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και επομένως στην βελτίωση της πρόγνωσης παίζουν τα διηθητικά λεμφοκύτταρα του όγκου (Tumor infiltrating lymphocytes – TIL). Έχει φανεί και συνεχίζει να βρίσκεται υπό έρευνα η θετική προγνωστική αξία των TIL's σε όγκους που παρουσιάζουν ευαισθησία στην επίδραση των λεμφοκυττάρων (lymphocyte predominant breast cancer – LPBC) και κατά συνέπεια η επιλογή στοχευμένης ανοσοθεραπείας για την αντιμετώπισή τους (Stanton and Disis, 2016). Σε ασθενείς με καρκίνο μαστού με σημαντική διήθηση των κυττάρων του όγκου από CD8+ T λεμφοκύτταρα διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της επιβίωσης ανεξάρτητα από άλλους κλασικούς προγνωστικούς παράγοντες όπως το μέγεθος του όγκου, η λεμφαδενική συμμετοχή, ο βαθμός κακοήθειας και οι ορμονικοί υποδοχείς, γεγονός που στέλνει αισιόδοξα μηνύματα για τις μελλοντικές θεραπείες, όπως ήδη συμβαίνει στον καρκίνο του παχέος εντέρου ή στο μελάνωμα (Mahmoud et al. 2011).

Παρόλο που από τις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα η έρευνα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της καρκινογένεσης εξελίσσονται ραγδαία, η σημασία των κλασικών δεικτών παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της πρόγνωσης και της πρόβλεψης του θεραπευτικού αποτελέσματος. Ήδη από το 1991 το Nottingham Grading System (NGS) ανέδειξε την ισχυρή συσχέτιση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας (grade) με την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού, παρουσιάζοντας υψηλό βαθμό επαναληψιμότητας και ακρίβειας των αποτελεσμάτων (Elston and Elis, 1991). Έκτοτε η εξέλιξη στον τομέα της μοριακής βιολογίας είναι ραγδαία αλλά σε πρακτικό επίπεδο μόνο η χρήση των BRCA έχει βρει κλινική εφαρμογή ενώ οι ακολουθίες DNA όπως τα Oncotype, PAM 50, Mamaprint κλπ. χρησιμοποιούνται σε μεμονωμένες περιπτώσεις. Εντατικά μελετώνται επίσης οι μεταλλάξεις του DNA των καρκινικών κυττάρων, η ανίχνευση τους στο περιφερικό αίμα, τα λειτουργικά μόρια RNA και πλήθος άλλων μορίων που πιθανόν να σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού (Rakha et al., 2021).

### 2.3 Μηχανισμοί καρκινογένεσης στον καρκίνου του μαστού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πολλών ερευνών η ετερογένεια που εμφανίζει ο καρκίνος είναι η απάντηση στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης, των μεταστάσεων, της υποτροπής και της αντίστασης στη θεραπεία. Για να εξηγηθεί αυτή η ετερογένεια έχουν προταθεί και είναι ευρέως αποδεκτά δύο υποθετικά μοντέλα: α) του καρκινικού βλαστοκυττάρου (cancer stem cell – CSC), σύμφωνα με το οποίο μέσα στον καρκίνο υπάρχει σε μικρή αναλογία μία ποσότητα CSC τα οποία έχουν τη δυνατότητα να ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε ποικίλες καρκινικές σειρές, οδηγώντας έτσι σε ανομοιογένεια των καρκινικών κυττάρων και β) της εξέλιξης του κλώνου, όπου ο καρκίνος μπορεί να ξεκινήσει από οποιοδήποτε κύτταρο, το κύτταρο αυτό ενεργοποιεί μεταλλάξεις, οι οποίες με τη σειρά τους παράγουν κλώνους καρκινικών κυττάρων και οδηγούν στην ετερογένεια του όγκου (Zhang, Tu and Liu, 2022). Στην έρευνα για τον καρκίνο του μαστού, είναι πλέον γνωστή η ύπαρξη των «βλαστοκυττάρων του καρκίνου του μαστού» (breast cancer stem cells – BCSCs) και οι προσπάθειες είναι στραμμένες στην αναγνώριση των μοριακών μηχανισμών τους προκειμένου να βρεθούν νέες αποτελεσματικές θεραπείες ( Al-Hajj et al., 2003).

Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζεται με πολλές και διαφορετικές μορφές και υποτύπους, έχει αρκετούς και σύνθετους ιστολογικούς τύπους και με την πάροδο του χρόνου φαίνεται ότι χαρακτηρίζεται και από ποικίλες γενετικές υπογραφές. Επομένως πρόκειται για έναν καρκίνο με μεγάλη ετερογένεια η οποία ξεκινά από την *in situ* επανενεργοποίηση των βλαστοκυττάρων του μαστικού αδένου κατά την καρκινογένεση. Φαίνεται δηλαδή ότι υπάρχει μια συσχέτιση ανάμεσα σε γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις και σε συγκεκριμένα αρχέγονα κύτταρα του μαστικού αδένου, ανάλογα με τον καρκινικό υποτύπο. Αυτές οι μεταλλάξεις αφορούν σε ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και παράγοντες των βλαστοκυττάρων που μπορούν να προκαλέσουν κυτταρικό επαναπρογραμματισμό (αποδιαφοροποίηση) ανάμεσα σε αρχέγονα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου και συγκεκριμένα είτε στη σειρά των basal κυττάρων είτε σε αυτή των luminal. Με τον τρόπο αυτό ξεκινά η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός μιας ή περισσότερων σειρών καρκινικών κυττάρων τα οποία εκφράζουν αντίστοιχους μοριακούς δείκτες βάσει των οποίων μπορεί να σχεδιαστεί η κατάλληλη θεραπεία. Για παράδειγμα οι GATA4, FOXA2, HNF-4A, SOX17 και α-FP εκφράζονται από τα κύτταρα στο ενδόδερμα, ενώ οι NES, SOX1, MAP2, GFAP στο εξώδερμα και οι TBXT, KDR, VIM(Vimentin) και FN1 (Fibronectin) στο μεσόδερμα. Πολλοί από αυτούς τους γονιδιακούς δείκτες κωδικοποιούν παράγοντες μεταγραφής (transcription factors – TF) η λειτουργία των οποίων είναι σημαντική για την

εξειδίκευση της λειτουργίας των κυττάρων αλλά και για τον προγραμματισμό του κυτταρικού θανάτου. Ακολουθώντας λοιπόν την έκφραση αυτών των βιοδεικτών μπορούμε να προσεγγίσουμε την «καταγωγή» της μετάλλαξης και να οδηγηθούμε σε ακριβέστερη διάγνωση και πιο στοχευμένη θεραπεία (Chu et al., 2019).

Αντίστοιχα, ο βιοδείκτης για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Programmed cell death, PD-1) που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια B7-CD28, είναι ένας υποδοχέας της μεμβράνης των T, B και NK κυττάρων που ρυθμίζει την ενεργοποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Το σημείο σύνδεσής του (PD-L1) που ανιχνεύεται σε κάποια καρκινικά κύτταρα ενεργοποιείται από B και T λεμφοκύτταρα, δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα και ινοβλάστες και η σύνδεση αυτή οδηγεί σε απόπτωση των T κυττάρων. Η αναστολή λοιπόν αυτής της σύνδεσης μέσω μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι μια θεραπευτική προσέγγιση που βρίσκεται υπό εξέταση σε πολλά είδη καρκίνου. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες αλλά και μετα-αναλύσεις, φαίνεται ότι ο PD-L1 μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βιοδείκτη σχετιζόμενο με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Zhang et al., 2017).

Αναφορικά με τον ρόλο των γονιδίων στην καρκινογένεση του καρκίνου του μαστού, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια BRCA1 και BRCA2 φαίνεται να ευθύνονται για το 80-90% των γενετικά προσδιορισμένων όγκων, ασθενών με κληρονομικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών και σχετίζονται με ανωμαλίες στην επιδιόρθωση βλαβών του γονιδιώματος. Έχουν καταγραφεί εκατοντάδες μεταλλάξεις των συγκεκριμένων γονιδίων. Το BRCA1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21, έχει 24 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1863 αμινοξέα. Αντίστοιχα το BRCA2 βρίσκεται στο 13q12 χρωμόσωμα, αποτελείται από 27 εξόνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 3418 αμινοξέων. Μεταλλάξεις στο εξόνιο 13 του BRCA1 και στο εξόνιο 11 του BRCA2 γονιδίου έχουν συσχετισθεί με καρκίνο των ωοθηκών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα εν λόγω γονίδια συμμετέχουν στις λειτουργίες επιδιόρθωσης του DNA μέσω ειδικών πρωτεϊνών και με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζουν την ομαλή διαδικασία της μεταγραφής του DNA και την επιδιόρθωση βλαβών στο μόριο της διπλής αλύσου του. Τυχόν μεταλλάξεις των αντίστοιχων γονιδίων ενεργοποιούν τη διάσπαση του DNA μέσω έκφρασης του p53 με συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο ή την απόπτωση (Varol et al., 2018).

Επιπλέον, καίριο ρόλο στον καρκίνο του μαστού παίζει και το γονίδιο που παράγει την πρωτεΐνη TP53. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας της μεταγραφής με δυνατότητα σύνδεσης με εκατοντάδες

διαφορετικά στοιχεία του γονιδιώματος, ρυθμίζοντας έτσι τη λειτουργία πολλών γονιδίων. Ο ουσιαστικός της ρόλος σχετικά με τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη σταθερότητα του γονιδιώματος του κυττάρου είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες και η ογκοκατασταλτική της δράση έχει επιβεβαιωθεί σε πολλαπλά πειράματα. Για την ακρίβεια, όταν ανιχνεύονται βλάβες στο μόριο του DNA, η πρωτεΐνη αλλάζει στερεοδιάταξη και μετατρέπεται σε ενεργή, δίνοντας σήμα για την έναρξη προ-αποπτωτικών διαδικασιών. Συνεπώς, η μετάλλαξη και η αδρανοποίηση της συνεπάγεται την συσσώρευση σφαλμάτων στο γενετικό υλικό που τελικά οδηγούν σε καρκίνο του μαστού (Pandit et al., 2016).

Πέρα όμως από τα παραπάνω γονίδια, συμμετοχή στα μονοπάτια καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού έχουν και οι στεροειδείς ορμόνες που σχετίζονται με το γυναικείο φύλο. Είναι γνωστή η σημασία της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER), προγεστερόνης (PR) αλλά και ανδρογόνων (AR) στους καρκινικούς ιστούς ενώ γνωστό είναι και ότι ο μηχανισμός αυτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Σε πολλές μελέτες έχει φανεί ότι τα καρκινικά κύτταρα πραγματοποιούν και τοπική σύνθεση στεροειδών ορμονών. Βιολογικά ενεργοποιημένα οιστρογόνα συντίθενται από ειδικά ένζυμα όπως η αρωμάτιση, τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπουν τις ορμόνες της κυκλοφορίας σε οιστραδιόλη και ανδρογόνα. Η τοπική αυτή έκφραση των στεροειδών αυτών ορμονών με τους μεταβολίτες που παράγουν προδιαθέτουν σε κακοήγη εξαλλαγή των αδενικών κυττάρων του μαστού (Valko-Rokytonska' et al., 2021). Στο ανθρώπινο κύτταρο υπάρχουν δύο είδη οιστρογονικών (ER) υποδοχέων, οι ERα που κωδικοποιούνται από το γονίδιο ESR1/ERα και οι ERβ που αντιστοιχούν στο γονίδιο ESR2/ERβ. Ήδη από τη δεκαετία του 1950, οπότε ο ERα ανακαλύφθηκε και άρχισε να υποβάλλεται σε ενδεδειγμένες έρευνες, καθιερώθηκε ως ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για την ανταπόκριση των ασθενών με καρκίνο μαστού στη θεραπεία, σε αντίθεση με τον ERβ που ήρθε στο φως πολύ αργότερα το 1996. Αμφότεροι οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν μέλη των υποδοχέων του πυρήνα, της ευρύτερης υπερ-οικογένειας των «παραγόντων μεταγραφής» και παρουσιάζουν αρκετές δομικές ομοιότητες όπως και ταύτιση κατά 96% στις περιοχές σύνδεσης με το DNA (DNA-binding-regions). Παρόλα αυτά παρουσιάζουν αρκετές διαφορές στην έκφραση και στους ενδοκυττάριους μηχανισμούς δράσης τους και για αυτό έχει διαπιστωθεί ότι η αξιολόγηση του ERα συνδέεται με την ορμονική θεραπεία ορμονο-ευαίσθητων όγκων (ER+) ενώ αντίθετα οι μελέτες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη σημασία του ERβ στους ER- όγκους καθώς και στον TNBC (Choi, 2022).

Εξαιτίας λοιπόν των αντίστοιχων υποδοχέων στα κύτταρα του μαστού, τα οιστρογόνα μπορούν να δράσουν τόσο μέσω της κλασσικής (γενωμικής) όσο και μέσω της μη κλασσικής (μη γενωμικής) οδού (Khan et al., 2022). Βάσει της κλασσικής οδού, τα οιστρογόνα εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου και έπειτα συνδέονται με τον υποδοχέα τους, ο οποίος εδράζεται στον πυρήνα, προς τον σχηματισμό του συμπλόκου οιστρογόνου-υποδοχέα. Το σύμπλοκο αυτό με την σειρά του, αλληλοεπιδρά με ειδικές αλληλουχίες του DNA (estrogen response elements - ERE) είτε άμεσα είτε έμμεσα, με αποτέλεσμα την επιστράτευση μεταγραφικών παραγόντων, ώστε να επιτευχθεί αναστολή της έκφρασης των γονιδίων που αφορούν στην απόπτωση (Chang, 2011).

Κατά παρόμοιο τρόπο στην μη γενωμική οδό δράσης των οιστρογόνων, τα τελευταία προσδένονται σε υποδοχείς πάνω ή κοντά στην κυτταρική μεμβράνη με συνέπεια την ενεργοποίηση ενός μοριακού μονοπατιού κινασών, ώστε τελικά να πυροδοτηθεί μια σειρά ενδοκυτταρικών καταρρακτών μεταγωγής σήματος, όπως είναι αυτά της MAPK κινάσης, της PI3K, αλλά και της πρωτεϊνικής κινάσης A και C. Τελικός σκοπός της ενεργοποίησης αυτών των μονοπατιών είναι η φωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση τόσο των οιστρογονικών υποδοχέων, όσο και μορίων που μετέχουν στον μεταγραφικό μηχανισμό. Τα παραπάνω βήματα, μεταλλάσσοντας την λειτουργικότητα των οιστρογονικών υποδοχέων δύνανται να οδηγήσουν σε καρκίνο του μαστού (Clusan et al., 2023).

Ένας άλλος παράγοντας που συμμετέχει στην καρκινογένεση είναι η υποξία του όγκου, δηλαδή η χαμηλή πρόσληψη οξυγόνου από τα καρκινικά κύτταρα. Στον μηχανισμό αυτό βασικό ρόλο παίζει ο παράγοντας υποξίας HIF (Hypoxia-inducible Factor) ο οποίος με τη σειρά του συμμετέχει σε έναν μεγάλο αριθμό ενδοκυττάρων μεταβολικών οδών καθώς και στη διαδικασία της αγγειογένεσης που αποτελεί κομμάτι του μηχανισμού της καρκινογένεσης (Hussen et al., 2022).

Εκτός των οιστρογόνων και η στερεοειδική ορμόνη προγεστερόνη συμμετέχει στα μονοπάτια καρκινογένεσης του καρκίνου του μαστού με τρόπο αντίστοιχο με εκείνο των πρώτων. Συγκεκριμένα, μέσω του ειδικού υποδοχέα του πυρήνα ή του κυτταροπλάσματος (Ligand-occupied PR) η προγεστερόνη συνδέεται με το DNA και συμμετέχει στη διαδικασία της μεταγραφής γονιδίων μεταξύ των οποίων αυτά των υποδοχέων οιστρογόνων, των υποδοχέων ινσουλίνης, του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) και του TGF-alpha. Με τον τρόπο αυτό η προγεστερόνη ρυθμίζει τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων και ρυθμίζει τη διαδικασία της μεταγραφής

γονιδίων και για το λόγο αυτό τυχόν μεταλλάξεις στα γονίδια αυξάνουν την πιθανότητα εκδήλωση καρκίνου του μαστού (Trabert et al., 2019).

Τέλος, σε μοριακό πλέον επίπεδο, γίνεται ολοένα και ευρύτερη η χρήση βιοδεικτών που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού και με την πρόγνωση της νόσου. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι είναι οι CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup> και ALDH<sup>+</sup>. Οι δύο πρώτες είναι γλυκοπρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και οι λειτουργίες τους αφορούν στην αλληλεπίδραση και στην μετάδοση σημάτων μεταξύ των κυττάρων, ανευρίσκονται σε ποσοστό από 0% έως 97% των καρκίνων του μαστού, ενώ έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με αυξημένη επιθετική συμπεριφορά του όγκου (Sheridan et al., 2006).

Αντίστοιχα η αλδεϊκή δεϋδρογενάση (ALDH) παρουσιάζεται με 19 ισομορφές της στο ανθρώπινο γονιδίωμα αλλά η ισομορφή ALDH1 καθορίζει αν ένα κύτταρο ονομαστεί ALDH<sup>+</sup>. Η δραστηριότητά της είναι βασική για την κυτταρική λειτουργία, ανιχνεύεται τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα και σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση (Ginestier et al., 2007). Σε πειράματα φάνηκε ότι καρκινικά κύτταρα που εξέφραζαν το συνδυασμό των τριών αυτών μορίων CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>+</sup>, ALDH<sup>+</sup> παρουσίαζαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και ογκογόνου δράσης, παρόλο που ο εν λόγω συνδυασμός είναι σπάνιος (Liu et al., 2018).

Ως απάντηση στα μοριακά ερεθίσματα, τα BCSCs ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια (pathway signals) για να εκφράσουν την ετερογένεια τους αλλά και τη δυνατότητά τους να ανανεώνονται, να μεθίστανται και να αντιστέκονται στις θεραπείες. Τυχόν μεταλλάξεις ή δυσλειτουργίες σε αυτά τα μονοπάτια, όπως τα Hippo και Hedgehog ή σε γονίδια όπως τα SNAIL, COX-2, Twist και SLUG φαίνεται ότι ευθύνονται για την μετατροπή των κυττάρων σε μεσεγχυματογενούς τύπου κύτταρα που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και έχουν δυνητικά μεταστατική συμπεριφορά ή ισχυρή αντίσταση στις θεραπείες (Zhang, Tu and Liu, 2022). Επιπλέον, σε μια μεγάλη μετα-ανάλυση που πραγματοποίησαν οι Zhang et al. (2022) φάνηκε ότι η έκφραση της SLUG πρωτεΐνης (μεταγραφικός παράγοντας που μεσολαβεί στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και η λειτουργία του αφορά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα BCSCs) σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση της νόσου (αύξηση της θνησιμότητας) και με αυξημένη παρουσία λεμφαδενικής διήθησης (Zhang et al., 2022).

Κλείνοντας, εκτός από τα μοριακά μονοπάτια (signaling pathways), τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης και τους παράγοντες μεταγραφής (Transcription Factors – TF), η έρευνα συνεχίζεται συστηματικά για την κατανόηση των μοριακών και βιολογικών

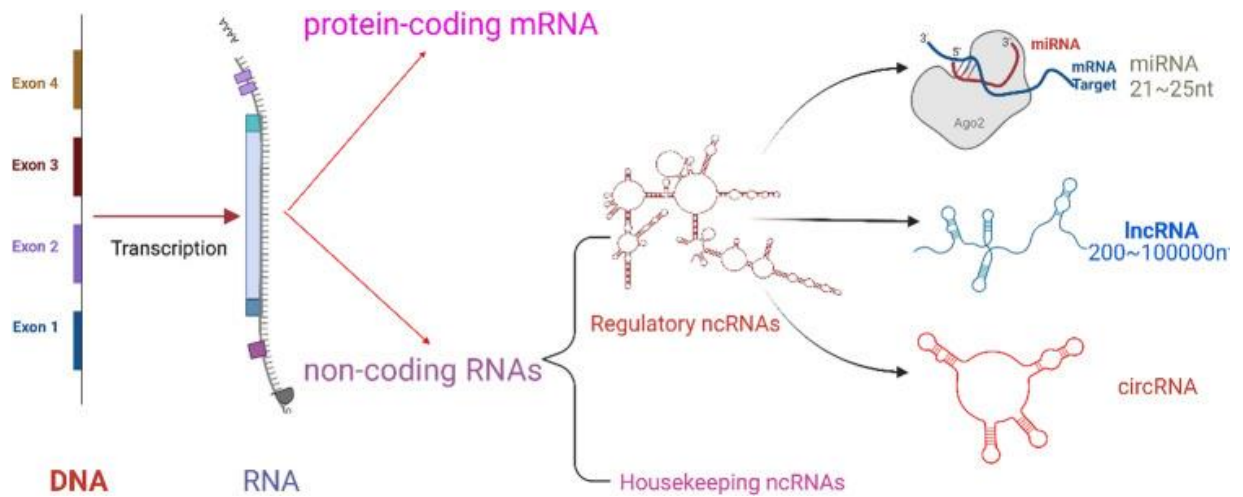
λειτουργιών των μη-κωδικών μορίων RNA (nc-RNAs). Παρόλο που ο τρόπος δράσης τους δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός, τόσο τα nc-RNAs όσο και τα mRNAs αποτελούν βασικό κομμάτι της τοπικής και συστηματικής επικοινωνίας μεταξύ των BCSCs ( Patel et al., 2016 – Prabhu et al., 2020).

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μη κωδικά μόρια RNA και Καρκίνος του μαστού**

---

#### **3.1 Ορισμός και ταξινόμηση των μη κωδικών μορίων RNA**

Σύμφωνα με τα δεδομένα που συλλέγονται από τις μελέτες προσδιορισμού της αλληλουχίας του γονιδιώματος του ανθρώπου, ποσοστό μεγαλύτερο από το 80% είναι μεταγραφικά ενεργό, δηλαδή δομείται από γονίδια. Εντούτοις, από αυτό το μεταγραφικά ενεργό μέρος του ανθρώπινου DNA, μόλις το 2% κωδικοποιεί γονίδια που είναι υπεύθυνα να παράγουν πρωτεΐνες (Saw et al., 2020). Τα υπόλοιπα γονίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μορίων RNA, τα οποία όμως δεν υφίστανται μετάφραση στα ριβοσώματα και άρα χαρακτηρίζονται ως μη-κωδικά μόρια RNA (Panni et al., 2020).



*Εικόνα 8:* Δημιουργία και ταξινόμηση των μη-κωδικών RNA. (Πηγή: Liang *et al.*, 2023)

Αμέσως μετά από την ανακάλυψη του μεταφορικού (tRNA) και του ριβοσωμικού RNA (rRNA) το 1950, πολλά άλλα μη κωδικά μόρια RNA, με βιολογική λειτουργία ανασύρθηκαν στην επιφάνεια. Στις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος αποκάλυψε ότι το 98% του “junk” DNA, εκείνου δηλαδή που δεν αφορούσε σε γονίδια, είχε τη δυνατότητα μεταγραφής. Το 2005 οπότε και δημοσιεύτηκε η ολοκλήρωση της ανάγνωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project – HGP) έγινε και ευρύτερα γνωστή η ύπαρξη των μη-κωδικών RNA (ncRNAs) (Samuel *et al.*, 2005). Έκτοτε, σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν ανακαλυφθεί αρκετές χιλιάδες από μοναδικά τέτοια μόρια, οι λειτουργίες και ο ρόλος των οποίων παραμένουν ακόμα υπό διερεύνηση (Saw *et al.*, 2020).

Το πρώτο miRNA *lin-4* απομονώθηκε το 1993 κατά την μελέτη του γονιδιώματος του πρότυπου οργανισμού *C. Elegans* (Lee *et al.*, 1993). Οι ερευνητές απομόνωσαν την αλληλουχία RNA και έδειξαν ότι το *lin-4* απενεργοποιεί την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου, του *lin-14*, του οποίου το πρωτεϊνικό προϊόν είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του σκώληκα. Στην συνέχεια, το δεύτερο miRNA, *let-7*, εντοπίστηκε το 2000, επίσης σε μελέτη του γονιδιώματος του σκώληκα *C.elegans* αλλά αποτελεί το πρώτο γνωστό εργαστηριακά απομονωμένο ανθρώπινο miRNA. Δυσλειτουργία του *let-7* οδηγεί σε μια αποδιαφοροποίηση του κυττάρου, κάτι που αποτελεί τη βάση νόσων κυτταρικής προέλευσης, όπως ο καρκίνος (Roush *et al.*, 2008).



Γενικά, τα μη-κωδικά RNA φαίνεται ότι συμμετέχουν σε πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες, ρυθμίζουν φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες ή ακόμα παίζουν ρόλο και στην εκδήλωση νόσων. Έχουν αναγνωριστεί επίσης ως ογκοκατασταλτικοί και ογκογενετικοί παράγοντες σε διάφορες μορφές καρκίνου (Pavet et al., 2010).

Τα μη-κωδικά μόρια RNA ταξινομούνται σε: 1) housekeeping ncRNAs και 2) ρυθμιστικά ncRNAs. Στα housekeeping ncRNAs συγκαταλέγονται: α) τα μεταφορικά RNA (tRNAs), β) τα ριβοσωμικά (rRNAs), γ) τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs), δ) τα μικρά πυρηνισκικά RNAs (snoRNAs), ε) τα RNA τελομεράσης (TERC), στ) τα tRNA-Derived Fragments (tRF) και ζ) τα μισά-tRNA (tiRNA). Από την άλλη, τα ρυθμιστικά ncRNA ταξινομούνται περαιτέρω βάσει μεγέθους στα: α) microRNAs (miRNA), β) small interfering RNA (siRNA), γ) piwi-interacting RNA (piRNA), δ) enhancer RNA (eRNA), στ) long non-coding RNA (lncRNA), ζ) circular RNA (circRNA) και η) Y RNA (Zhang et al., 2019).

Στον Πίνακα 6 φαίνεται αναλυτικά η ταξινόμηση των μη-κωδικών RNAs ανάλογα με το μέγεθος το μέγεθός τους (αριθμός νουκλεοτιδίων).

Πίνακας 6: Κατηγορίες των μη κωδικών RNA με βάση το μέγεθός τους.

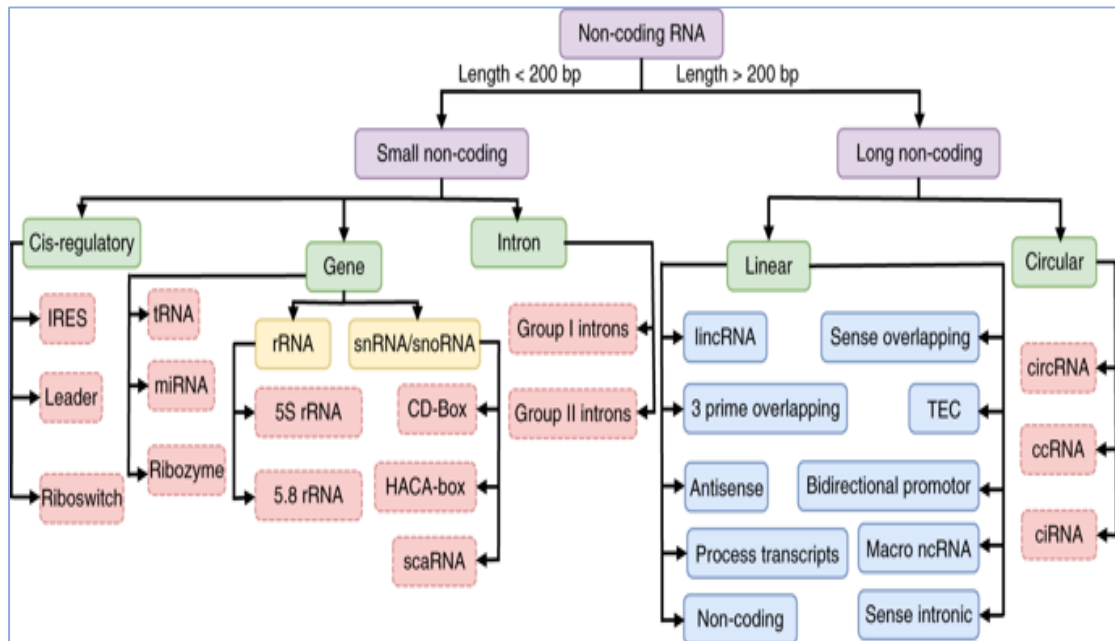
Type	Abbreviation	Full name	Size
Housekeeping ncRNAs	rRNA	ribosomal RNA	120–4,500 nt
	tRNA	tansfer RNA	76–90 nt
	snRNA	small nuclear RNA	100–300 nt
	snoRNA	small nucleolar RNA	60–400
	TERC	telomerase RNA	/
	tRF	tRNA-Derived Fragments	16–28 nt
	tiRNA	tRNA halves	29–50 nt
Regulatory ncRNAs	miRNA	microRNA	21–23 nt
	siRNA	small interfering RNA	20–25 nt
	piRNA	piwi-interacting RNA	26–32 nt
	eRNA	enhancer RNA	50–2,000 nt
	lncRNA	long non-coding RNAs	>200 nt
	circRNA	circular RNA	100–10,000 nt
	Y RNA	Y RNA	/

Πηγή: Zhang, P. et al., 2019

Τα housekeeping-nc RNAs είναι συνήθως μικρά σε μέγεθος μόρια, από 50 ως 500 νουκλεοτίδια (nt), εκφράζονται σε όλα ανεξαιρέτως τα κύτταρα και αποτελούν βασικό συστατικό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Τα πλέον γνωστά rRNA και tRNA συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, τα snRNAs στη διχοτόμηση του RNA και τα snoRNA στη διαφοροποίηση των μορίων RNA αλλά φαίνεται ότι κάποια από τα μόρια αυτά διαθέτουν και ρυθμιστικό ρόλο. Ολοένα και περισσότερο βέβαια ανακαλύπτονται λειτουργίες και δυνατότητες των εν λόγω μορίων σε διάφορα στάδια της μεταγραφής και μετάφρασης. Αντιστοίχως, τα ρυθμιστικά nc-RNAs ταξινομούνται, με βάση το μέγεθός τους, σε μικρά (small non-coding RNAs – sncRNAs) με λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια και σε μακρά (long non-coding RNAs – lncRNAs) με μέγεθος πάνω από 200 nt. Από αυτά τα μόρια τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Τα lncRNAs χαρακτηρίζονται ως προϊόντα μεταγραφής τα οποία όμως δεν έχουν ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Ο ρόλος τους είναι σύνθετος και εντοπίζεται στη ρύθμιση κοντινών και απομακρυσμένων γονιδίων από την εντόπισή τους αλλά και έμμεσα στη διαδικασία της μετάφρασης και μεταμεταφραστικής ρύθμισης των πρωτεϊνών, χωρίς ωστόσο να συμμετέχουν στη μεταφραστική διαδικασία (Zhang et al., 2019). Μερικά από τα lncRNAs επίσης, αλληλοεπιδρούν με το DNA, το RNA και τα προϊόντα της μετάφρασης και κάποια άλλα ανταποκρίνονται σε απομακρυσμένα ερεθίσματα και παίζουν το ρόλο του μοριακού σήματος – διαμεσολαβητή (Wang et al., 2011).

Σύμφωνα με τα υπάρχοντα ερευνητικά δεδομένα, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που μελετάται, παρατηρείται και διαφορετική αναλογία των μη κωδικών μορίων RNA. Το ριβοσωμικό RNA συνιστά το μεγαλύτερο ποσοστό στα ευκαρυωτικά κύτταρα περίπου 80-90%, το tRNA 10-15% και τα ncRNAs με μέγεθος μικρότερο των 200 βάσεων σε ποσοστό μόλις 0,002 – 0,2% (Dhana et al., 2018).

Σε κάθε περίπτωση, ανεξάρτητα από την ταξινόμηση που ακολουθείται (Εικόνα 9), τα μη-κωδικά RNA αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους με αναρίθμητους τρόπους, όπως και με άλλα μόρια του κυττάρου, με τμήματα του DNA και RNA και δημιουργούν ένα δίκτυο (Network) αντιδράσεων με καθοριστικό ρόλο στη ζωή του κυττάρου. Έτσι, οποιαδήποτε μετάλλαξη ή δυσλειτουργία κάποιου / κάποιων μορίων ή του ίδιου του δικτύου τους, δύναται να οδηγήσει σε νόσους και καρκίνο (Anastasiadou et al., 2017).



*Εικόνα 9:* Ταξινόμηση των μη κωδικών μορίων RNA. (Πηγή: Amin et al., 2019)

Τέλος, η παρουσία των μη κωδικών μορίων RNA σχετίζεται και με άλλες κρίσιμες λειτουργίες όπως είναι αυτή με την οποία αλληλουχίες lincRNA's, συμπεριλαμβανομένων των HOTTIP, XIST, FIRRE, κλπ., συμμετέχουν στη μεθυλίωση της ιστόνης και επομένως στην ενεργοποίηση του υπό μεταγραφή γονιδίου και της τρισδιάστατης δομής του πυρήνα (Dempset et al., 2017).

### 3.2 Συμμετοχή των μη κωδικών μορίων RNA στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου

Η μορφοποίηση των μαστικών αδένων αρχίζει από την εμβρυογένεση και συνεχίζει στην εφηβεία, παρουσιάζοντας ωστόσο μεταβολές κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, της γαλουχίας αλλά και της εμμηνόπαυσης. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των σταδίων, ο μαστικός αδένος της γυναίκας υφίσταται βαθιές μορφολογικές και λειτουργικές αλλαγές, οι οποίες περιλαμβάνουν τον πολλαπλασιασμό των αδενικών κυττάρων, την διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων του μαστού, σε συνδυασμό πάντα με εκτεταμένες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση (Maccias et al., 2012).

Η μορφογένεση του μαστού έχει μελετηθεί εκτενώς σε επίπεδο ανατομίας και φυσιολογίας και τα τελευταία χρόνια διερευνάται και σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Ειδικά την τελευταία δεκαετία δίνεται ιδιαίτερη έμφαση από τους ερευνητές στα ncRNA's, και ιδίως τα miRNAs και στον τρόπο με τον οποίο τα τελευταία συμμετέχουν στην ανάπτυξη του μαστού.

Η έρευνα του Avril-Sassen et al. (2009) σε πειραματόζωα κατέληξε στο πρώτο ολοκληρωμένο προφίλ miRNA που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου κατά την ήβη, την εγκυμοσύνη, την γαλουχία αλλά και την εμμηνόπαυση. Η παρούσα μελέτη ανέδειξε την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων του μαστού και άρα την ρύθμιση της μορφογένεσης του μαστού, από ομάδες miRNAs (Avril-Sassen et al., 2009).

Επιπλέον σε μελέτη των Ibarra et al (2007) φάνηκε ότι η οικογένεια των miRNA's let-7, δεν δρούσε κατά την εμβρυογένεση, αλλά παρουσίαζε κορύφωση κατά την εφηβεία και στην φάση της σεξουαλικά ώριμης, νεαρής γυναίκας, επηρεάζοντας την ανάπτυξη του μαστικού αδένου σε αυτές τις ηλικίες (Ibarra et al., 2007).

Ακόμη, οι αλληλουχίες miR-101a παρατηρήθηκαν σε αυξημένο ποσοστό σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του μαστικού αδένου. Η έρευνα των Tanaka et al., (2009), ανέδειξε την ικανότητα του miR-101a να ρυθμίζει άμεσα την παραγωγή της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), η οποία κατέχει κεντρικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού (Tanaka et al., 2009).

Πέρα από τα παραπάνω τα miRNAs φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο και στην διαμόρφωση της έκφρασης των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Πιο αναλυτικά, το μη κωδικό μόριο miR-126-3p έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει άμεσα τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα προγεστερόνης (PR), οδηγώντας σε μείωση τόσο του πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων των μαστών όσο και της έκφρασης της β-καζεΐνης (Cui et al., 2011).

Ομοίως, άλλες αλληλουχίες miRNA 's μπορούν να καταστέλλουν τη βιωσιμότητα και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων των μαστών, πιθανώς μέσω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν προς τα κάτω τον υποδοχέα προλακτίνης (PRL-R) και τον υποδοχέα αυξητικής ορμόνης (Rijnkels et al., 2010).

Επιπρόσθετα, μη κωδικά μόρια RNA των οποίων η έκφραση περιορίζεται στο στρώμα του μαστικού αδένου μπορεί να αποτελούν και αυτά κρίσιμους ρυθμιστές της ανάπτυξης

του μαστού μέσω επιθηλιο-στρωματικής αλληλεπίδρασης (epithelial-to-mesenchymal transition , EMT). Η λειτουργία αυτή έχει αποδειχθεί για τις αλληλουχίες miR-212 και miR-132 οι οποίες επεμβαίνουν στην ανάπτυξη του μαζικού αδένου κατά την εφηβεία μέσω της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Damavandi et al., 2016).

Τέλος εκτεταμένη έρευνα με σημαντικά αποτελέσματα έχει γίνει για την οικογένεια των miR-200 και τη σημασία τους στην φυσιολογική ανάπτυξη του μαζικού αδένου, και ως εκ τούτου έμμεσα και στην καρκινογένεση, μέσω της επιθηλιο-στρωματικής αλληλεπίδρασης (EMT) στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού από την εμβρυϊκή ζωή έως την εφηβεία (Roth et al., 2021).

Γίνεται εύκολα κατανοητό ότι οι αναρίθμητες λειτουργίες και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που συμμετέχουν τα μη-κωδικά μόρια RNA, αρχής γενομένης από την εμβρυϊκή κιάλας ζωή, καταδεικνύουν και τη σημασία τους στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης, της διεισδυτικότητας και της απάντησης στη θεραπεία.

### **3.3 Ο ρόλος των μη κωδικών μορίων RNA στην καρκινογένεση του μαστού**

Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, η απορρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ των ογκογόνων και των ογκοκατασταλτικών οδών, προάγει τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό και τελικά την ογκογένεση. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι δύο αυτές οδοί ελέγχονται τόσο από μικρά, όσο και από μεγάλα μη κωδικά μόρια RNAs (ncRNAs) σε μεταγραφικό, μετα-μεταγραφικό και επιγενετικό επίπεδο (Mishra et al., 2016).

Επιπλέον αυτού, οι Iorio et al. σε ανάλυση των μικροσυστοιχιών miRNA σε υγιείς γυναίκες και σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού, διαπίστωσαν ότι 29 miRNA 's εκφράστηκαν διαφορετικά στους ανθρώπινους όγκους σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς του μαστού, καθώς και ότι τα miR-10b, miR-125b, miR145, miR-21 και miR-155 ήταν τα πιο σταθερά απορυθμισμένα miRNA 's, η έκφραση των οποίων μπορεί να είναι είτε κατασταλτική είτε ογκογενετική (Iorio et al., 2005).

Σε συνέχεια των παραπάνω, έχει εξακριβωθεί ότι τα miR-21 και miR-155, τα οποία έχουν καταγραφεί ως ογκογόνα μόρια, παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές στον ορό ασθενών με καρκίνο μαστού συγκριτικά με την υγιή ομάδα ελέγχου ενώ οι τιμές αυτές μειώνονται μετά την χειρουργική εκτομή (Han et al., 2017).

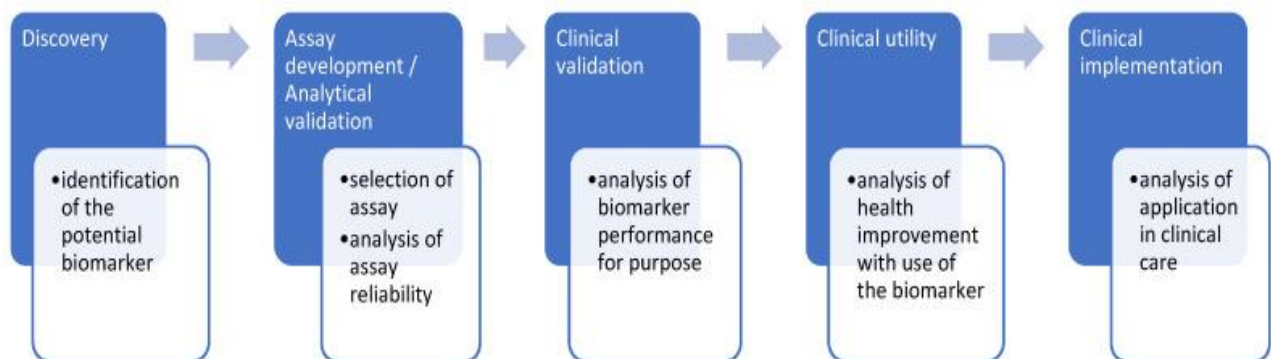
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και αυτό γίνεται μέσω της πρόσδεσής τους στο 3' UTR σημείο του mRNA που συμμετέχει στη μεταγραφή και η σύνδεση αυτή μπορεί να αναστείλει την ίδια τη διαδικασία της μεταγραφής. Έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση του miRNA απορυθμίζεται στους περισσότερους καρκίνους, μεταξύ των οποίων και του καρκίνου του μαστού. Ως εκ τούτου τα miRNAs θεωρούνται ως απόλυτοι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, λειτουργώντας άλλοτε ογκοκατασταλτικά και άλλοτε ογκογενετικά. Αντίστοιχα τα lncRNA εκφράζονται σαφώς σε όλους τους τύπους καρκίνου και συμμετέχουν στην εκδήλωση, εξέλιξη, υποτροπή και αντίσταση στη θεραπεία μέσω άμεσων και έμμεσων αλληλεπιδράσεων και αυτό τα καθιστά εξαιρετικά σημαντικά μόρια για τις μελλοντικές θεραπείες (Peinado et al., 2018). Η συμμετοχή τους στη γονιδιακή έκφραση γίνεται με πολλούς τρόπους, όπως η τροποποίηση της χρωματίνης, η διάσπαση/ωρίμανση του mRNA και η μεταφορά του mRNA επηρεάζοντας έτσι εν γένει τη σταθερότητά του (Khorikova et al., 2015). Τα lncRNA εμπλέκονται ενεργά τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστικού αδένου όσο και στην εκδήλωση του καρκίνου του μαστού και λειτουργικά κατατάσσονται επίσης ως ογκοκατασταλτικά ή ογκογενετικά. Το ενδιαφέρον όμως είναι ότι όλες οι παραπάνω λειτουργίες δεν είναι ανεξάρτητες αλλά η έκφραση ενός γονιδίου ρυθμίζεται μέσω της αμοιβαίας αλληλεπίδρασης του άξονα lncRNA-miRNA-mRNA. Το δίκτυο αυτό συμμετέχει σε ποικίλα μοριακά μονοπάτια και έχει βρεθεί τόσο στη φυσιολογική κυτταρική εξέλιξη όσο και στην ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος (Venkatesh et al., 2021).

#### **3.4. Οι βιοδείκτες και η χρησιμότητά τους στην αντιμετώπιση του καρκίνου**

Η χρήση βιοδεικτών στη βασική κλινική έρευνα αλλά και στην κλινική πράξη έχει γίνει αυτονόητη και η ανάγκη διερεύνησής τους στις κλινικές μελέτες είναι πλέον αναγκαία. Ο όρος «βιοδείκτης» αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία ιατρικών σημείων τα οποία αποτελούν αντικειμενικά ευρήματα από την εξωγενή παρατήρηση του ασθενή και μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Σύμφωνα δε με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως βιοδείκτης ορίζεται «οποιαδήποτε ουσία, δομή ή διαδικασία που μπορεί να μετρηθεί στο σώμα ή τα προϊόντα του και να επηρεάσει ή να προβλέψει την επίπτωση του αποτελέσματος ή της νόσου» (<https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>). Οι βιοδείκτες λοιπόν είναι

εξ ορισμού αντικειμενικές, υπολογίσιμες μεταβλητές στη μελέτη βιολογικών διεργασιών και δεν σχετίζονται με το σύμπτωμα ή το υποκειμενικό αίσθημα του ασθενή (Strimbu et al., 2010).

Αναφορικά με τον καρκίνο, ως βιοδείκτες περιγράφεται οποιοσδήποτε βιολογικός δείκτης που σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης κακοήθειας, την ανάπτυξη της νόσου και την έκβαση για τον ασθενή. Σε αυτούς συγκαταλέγονται γονιδιακές και σωματικές μεταβλητές, επιγενετικές υπογραφές και μεταβολές της μεταγραφικής διαδικασίας και μπορεί να αφορούν σε νουκλεϊκά οξέα ή πρωτεΐνες που ανιχνεύονται σε δείγμα από βιολογικά υγρά ή βιοψία του όγκου. Οι κλινικές εφαρμογές των βιοδεικτών είναι πολλές και ο τελικός σκοπός είναι να επιτευχθεί η ακριβής θεραπεία, να βελτιστοποιηθεί η πρόληψη, ο τακτικός προληπτικός έλεγχος (screening) και οι στρατηγικές θεραπείας της νόσου (Εικόνα 10). Επομένως η επιστημονική πρόκληση είναι : η έγκαιρη ανίχνευση, η ακριβής διάγνωση, ο καθορισμός της πρόγνωσης για τον ασθενή, η πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία, η παρακολούθηση της εξέλιξης του καρκίνου και αυτή της επιλεγμένης θεραπείας (Sarhadi et al., 2022).



*Εικόνα 10:* Σχηματική αναπαράσταση της διερεύνησης νέων βιοδεικτών. (Πηγή: Sarhadi V. & Armengol G. 2022)

Ένας προγνωστικός βιοδείκτης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της πιθανότητας ενός κλινικού συμβάντος, της υποτροπής της νόσου ή της εξέλιξης μιας νόσου που βρίσκεται υπό μελέτη. Σε αντίθεση με τους βιοδείκτες εκείνους που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές ομάδες ατόμων, κάνοντας διάκριση υγιών-ασθενών, οι προγνωστικοί

βιοδείκτες αφορούν σε άτομα στα οποία μελετάται συγκεκριμένη παθολογική οντότητα, η έκφραση ή/και τα χαρακτηριστικά της. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να βρεθεί μια ταχεία, προσβάσιμη, αξιόπιστη και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού του τελικού αποτελέσματος μιας ιατρικής πράξης (ερευνητικής, θεραπευτικής, κλπ.) και η εφαρμογή της σε κλινικό επίπεδο με γνώμονα το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι υψηλές τιμές του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA), που χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στη θεραπευτική προσέγγιση του ορθοκολικού καρκίνου, είναι ενδεικτικές των πιο επιθετικών τύπων καρκίνου, κάτι που λαμβάνεται υπόψη στην απόφαση για προεγχειρητική ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο ορθού σταδίου II και III (Weissenberger et al., 2005).

Σχετικά με τον καρκίνο του μαστού έγινε εκτενής αναφορά για τη χρήση των ορμονικών υποδοχέων (ER, PR, AR), του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2), του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67, της γονιδιακής έκφρασης (Oncotype, Mamaprint , κ.ά.) και άλλων παραμέτρων ως προγνωστικούς βιοδείκτες, δηλαδή ως βιολογικές μεταβλητές που καθοδηγούν ή και καθορίζουν την επιλογή της θεραπείας, την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και την βελτίωση των ποσοστών νοσηρότητας και θνητότητας. Οι προγνωστικοί βιοδείκτες πρέπει να χρησιμοποιούνται με μεθοδολογία και προγραμματισμό και καθένας από αυτούς να ερευνάται σε συγκεκριμένο τύπο ή υποτύπο καρκίνου, να έχουν δηλαδή εξειδίκευση στην αναζήτηση του αποτελέσματος (Hou et al., 2022). Η έρευνα για την ανεύρεση νέων και αξιόπιστων βιοδεικτών βρίσκεται σε διαρκή εξέλιξη και το επιστημονικό ενδιαφέρον είναι στραμμένο στο μοριακό επίπεδο και στα μη κωδικά RNA.

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στην προγνωστική αξία ενός μακρού μη κωδικού μορίου RNA, του HOTTIP στον καρκίνο του μαστού.

### **3.5 Τα μη κωδικά μόρια RNA ως βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού**

Η πρόοδος της επιστήμης της γενετικής, μας δίνει την δυνατότητα να αξιοποιήσουμε τα μη κωδικά μόρια RNA και ως βιοδείκτες σε διάφορες μορφές κακοήθειας, περιλαμβανομένης και εκείνης του μαστού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί πολλά μόρια miRNA παρουσιάζουν υψηλή έκφραση σε καρκινικά κύτταρα ή ακόμη και προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου ενώ άλλα ρυθμίζουν την εξέλιξη πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου (Yan et al., 2021). Είναι γνωστό ότι το miR-126 εκφράζεται έντονα στον καρκίνο του μαστού (Li, 2019) και στον ορθοκολικό καρκίνο (Ebrahimi et al., 2015).



Το miR-155 έχει αναγνωριστεί ως υπεύθυνο ογκογονίδιο σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του ήπατος και ταυτόχρονα βρίσκεται υπό μελέτη η χρήση του ως στοχευμένη θεραπεία αυτών (Luan et al., 2017).

Κάποια άλλα miRNA's όπως το miR-105 εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα με σκοπό τη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και ανιχνεύονται σε υψηλούς τίτλους στα μεταστατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Σε μελέτες μάλιστα φάνηκε ότι η μέτρηση του κυκλοφορούντος στο αίμα miR-105 μπορεί να αποτελέσει κλινικό δείκτη μεταστατικής νόσου του μαστού (Zhou et al., 2014).

Κάποια miRNA's έχουν ογκογόνο δράση στον καρκίνο του μαστού, όπως το let-7, το miR-141 και το mi-766 (Choi et al., 2016, X. Li et al., 2019) ενώ κάποια άλλα ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, όπως τα miR-30, miR-140 και miR-143 (Ouzounova et al., 2013, Yu et al., 2019, Xia et al., 2018).

Το lncRNA - EPIC1 έχει αναγνωριστεί ως το πρώτο ογκογόνο μόριο στον Luminal B υποτύπο του καρκίνου του μαστού (Wang et al., 2018) ενώ το πυρηνικό lncRNA - MALAT1 έχει ογκοκατασταλτική δράση στον καρκίνο του μαστού και αυτό αποδείχθηκε σε έρευνα κατά την οποία, η αναστολή του MALAT1 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της μεταστατικής διάθεσης του όγκου (Kim et al., 2018).

Αντίστοιχα με τα miRNA's τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA (lncRNA's) μπορεί να έχουν ογκογονική και ογκοκατασταλτική δράση. Στον καρκίνο του μαστού συγκεκριμένα, στην πρώτη κατηγορία ανήκουν: το 00617 που προάγει τη μετάσταση του όγκου (Z. Li et al., 2017), το XIST που προάγει τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική απόπτωση (Zong et al., 2020), το POR το οποίο προκαλεί αύξηση της αντίστασης στη φαρμακευτική θεραπεία (Q. Zhou et al., 2020), το HOTAIR που αυξάνει την καρκινική ανάπτυξη και τη μεταστατική διάθεση (Y. Wang et al., 2020), το TROJAN που εντείνει την διηθητική ανάπτυξη του όγκου (Jin et al., 2019) και διάφορα άλλα μόρια με αντίστοιχες ιδιότητες. Αντιθέτως, τα lncRNA's με κατασταλτική στον όγκο δράση είναι κυρίως το SCRIPT που αναστέλλει τον προγραμματισμό της μεταγραφικής λειτουργίας καρκινικών κυττάρων (Zagorac et al., 2021) και το PVT1 που σταματά την κυτταρική ανάπτυξη του όγκου (Cho et al., 2018).

Τα μη κωδικά RNA έχουν ποικίλες ιδιότητες και συμμετέχουν τόσο στην ανάπτυξη όσο και στη ρύθμιση της εξέλιξης διαφόρων τύπων καρκίνου. Κάποια από αυτά είναι ανιχνεύσιμα στο περιφερικό αίμα ή τα ούρα ασθενών με καρκίνο και μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία αλλά και ως προγνωστικοί δείκτες της

νόσου. Η έρευνα γύρω από τα εν λόγω μόρια στρέφεται παράλληλα και στη θεραπευτική τους χρήση μέσω της κατανόησης των μηχανισμών τους και των σύνθετων λειτουργιών τους (Yan et al., 2021). Ο καρκίνος του μαστού, λόγω της επίπτωσής του και των διαρκώς αυξανόμενων απαιτήσεων έγκαιρης διάγνωσης του, κατέχει μια κύρια θέση στην προσπάθεια αυτή, χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες, νέες προσεγγίσεις και πρωτοπόρες μοριακές μεθόδους.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Τα μακρά μη κωδικά μόρια RNA (lncRNA's) και ο ρόλος τους στον καρκίνο**

---

### **4.1 Τα lncRNA's στην παθογένεια και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού**

Σύμφωνα με την τρέχουσα βιβλιογραφία υπάρχει μεγάλος αριθμός lncRNA's που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού. Πολλαπλές δημοσιευμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του lncRNA, HOTAIR, μπορεί να είναι ένας πιθανός βιοδείκτης για τον καρκίνο του μαστού καθώς και ότι το επίπεδο του HOTAIR στο πλάσμα ασθενών σχετίζεται θετικά με τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων σε παρακείμενους λεμφαδένες (Shi et al., 2020).

Στην μελέτη του Hassanzarei και των συνεργατών του (2017), διερευνήθηκε η συμμετοχή των lncRNA's στον καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο πολυμορφισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας κάποιων υποτύπων του HOTAIR σχετιζόταν με μηχανισμούς της καρκινογένεσης και με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες περιοχής του Ιράν (Hassanzarei et al., 2017).

Ανάλογα ήταν και τα ευρήματα της έρευνας του Lin και των συνεργατών του που δημοσιεύθηκε την ίδια περίοδο. Οι ερευνητές κατέλεξαν στο συμπέρασμα ότι συγκεκριμένοι λειτουργικοί πολυμορφισμοί του HOTAIR σχετίζονταν με εκδήλωση καρκίνου του μαστού ενώ παράλληλα τέθηκε το ερώτημα της δυνατότητας ανίχνευσης του HOTAIR στο περιφερικό αίμα των ασθενών, με σκοπό τη χρήση του ως προγνωστικός βιοδείκτης (Lin et al., 2017).

Λίγο αργότερα (2019), ο Tang και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν έρευνα στην οποία πραγματοποιούνταν μέτρηση των επιπέδων των εξωσωμάτων (που αποτελούν μικροσκοπικά ναοκυστίδια της κυτταρικής μεμβράνης που εσωκλείουν και μεταφέρουν μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια ή RNA του κυττάρου) μεταφοράς του HOTAIR στον ορό, για να προσδιοριστεί η αξία του ως διαγνωστικού και προγνωστικού βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού. Η μελέτη έδειξε ότι τα επίπεδα HOTAIR στον ορό είναι υψηλότερα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού από ό,τι σε υγιή άτομα και ακόμη ότι μετά από 3 μήνες από το χειρουργείο μαστεκτομής, τα επίπεδα της εξωσωμικού HOTAIR στον ορό ελαττώνονταν. Τέλος, σε ασθενείς με

σταθερά υψηλά επίπεδα HOTAIR παρατηρήθηκε πτωχή επιβίωση και μειωμένη απάντηση στη χημειοθεραπεία (Tang et al., 2019).

Καθώς ο ρόλος και οι λειτουργίες των lncRNA's γίνονται πιο γνωστές, ολοένα και περισσότερες μελέτες έρχονται να φωτίσουν τις εν δυνάμει δυνατότητες χρήσης τους στη διάγνωση και θεραπεία της νόσου. Πρόσφατη έρευνα που περιλάμβανε περισσότερα από 1000 δείγματα ασθενών με καρκίνο μαστού ανέδειξε τη σημασία μιας γενετικής υπογραφής 11 μορίων lncRNA ως προγνωστικό δείκτη, ανεξάρτητο από άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Η γενετική αυτή υπογραφή σχετιζόταν με διήθηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός σημαντικό για τη συνέχεια των μελλοντικών ερευνών (Shen et al., 2020).

Σημαντικά είναι και τα ευρήματα σχετικά με την ανίχνευση μορίων lncRNA's στα βλαστοκύτταρα των καρκινικών κυττάρων (Cancer Stem Cells – CSS's). Ένα νέο μόριο με την ονομασία lncPORM φάνηκε ότι εκφράζεται σε υψηλούς τίτλους στα CSS's ασθενών με καρκίνο μαστού και να έχει θετική συσχέτιση με το βαθμό κακοήθειας, το στάδιο της νόσου καθώς και την πτωχή επιβίωση των ασθενών. Έτσι λοιπόν βρίσκεται υπό διερεύνηση η πιθανή χρήση του ως μελλοντικός βιοδείκτης αλλά και ως θεραπευτικό στρατηγικό όπλο (Liu et al., 2021).

Ο ρόλος των lncRNA's τόσο στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου όσο και στην εκδήλωση, εξέλιξη και ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι αναμφισβήτητος, ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης τους δεν είναι γνωστοί. Είναι όμως γνωστό ότι ο πολυμορφισμός των lncRNA's αυξάνει την ευαισθησία του κυττάρου στην εκδήλωση καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου μπορεί να επηρεάσει το επίπεδο έκφρασης, τη δομή και τη λειτουργία των lncRNA's, αυξάνοντας τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Για το λόγο αυτό η κλινική ανίχνευση αυτών των πολυμορφισμών μπορεί να αποβεί εξαιρετικά χρήσιμη ως δείκτης έγκαιρης διάγνωσης και προγνωστικής σημασίας (Abdi et al., 2022).

Οι έρευνες που βρίσκονται σε συνεχή εξέλιξη αποκαλύπτουν καθημερινά νέες πολύτιμες πληροφορίες για τους παθογενετικούς μηχανισμούς των lncRNA's στον καρκίνο του μαστού. Για παράδειγμα, σε μελέτη μέτρησης της έκφρασης του lncRNA SPINT1-AS1 στον ορό ασθενών με καρκίνο μαστού, το μελετώμενο μόριο βρέθηκε αυξημένο ενώ η αναστολή του προκάλεσε σημαντική μείωση της ανάπτυξης και της μεταστατικής συμπεριφοράς του καρκίνου (T. Zhou et al., 2021).

Επίσης συστηματική έρευνα πραγματοποιείται για τη χρησιμότητα lncRNA's στην κλινική πράξη. Πιο αναλυτικά, έχει διαπιστωθεί η σχέση τους με την ανάπτυξη αντίστασης στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και επομένως είναι πιθανή η χρησιμότητά τους στην αναστολή της χημειοαντίστασης και στην ανάπτυξη νέων αποτελεσματικών θεραπειών (Singh et al., 2022). Ήδη από τη μελέτη των Ji et al. (2019) διαπιστώθηκε ότι το lncRNA H19, μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών αυτοφαγίας των κυττάρων, αυξάνει την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στην ταμοξιφένη (Ji et al., 2019).

Αντίστοιχα μια λεπτομερής έρευνα για το lncRNA GAS5 έδειξε ότι το εν λόγω μόριο, που λειτουργεί ογκοκατασταλτικά στον καρκίνο του μαστού μέσω αλληλεπίδρασης με μια σειρά miRNA's, ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση με πολλαπλούς τρόπους και ως εκ τούτου μπορεί μέσω επιγενετικών μηχανισμών να αυξήσει την ευαισθησία στην χημειοθεραπεία και να βελτιώσει την πρόγνωση ασθενών με καρκίνο μαστού (Filippova et al., 2021). Επιπλέον, πέρα από την αντίσταση στην trastuzumab, το GAS5 μέσω αναστολής της επιδιόρθωσης του DNA και της καταστολής του miR-21, βρέθηκε ότι ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα στην ιονίζουσα ακτινοβολία, γεγονός που ανοίγει νέους δρόμους στις θεραπευτικές μας επιλογές (Ma et al., 2022).

Σε πρόσφατη έρευνα διαπιστώθηκε ότι ένα νέο μη-κωδικό-RNA που ανακαλύφθηκε τελευταία, το lncRNA-45, παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην μεταστατική διάθεση των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω της διαδικασίας της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μεταφοράς τους ( Qiu et al., 2023).

Τέλος, αξίζει να τονιστεί και πάλι η αλματώδης εξέλιξη στην έρευνα γύρω από τα lncRNA's αναφέροντας χαρακτηριστικά ευρήματα των τελευταίων μηνών. Έτσι, βρέθηκε ότι το lncRNA BC069792 έχει χαμηλή έκφραση στους καρκινικούς ιστούς του μαστού και σημαντικά μειωμένη έκφραση στους όγκους με υψηλό βαθμό κακοήθειας, υψηλό ki-67 και λεμφαδενική διασπορά. Επίσης το BC069792 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη διηθητική συμπεριφορά του όγκου και λειτουργεί σαν «μοριακό σφουγγάρι» απορροφώντας μόρια που ευνοούν την αύξηση των καρκινικών κυττάρων (Zhang et al., 2023). Επίσης, το PCAT19 είναι ένα lncRNA που διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται σε υψηλούς τίτλους σε ασθενείς με καρκίνο μαστού χαμηλότερου σταδίου νόσου και με λιγότερη λεμφαδενική εντόπιση, επισημαίνοντας την κατασταλτική του δράση στον καρκίνο του μαστού (Feng et al., 2023). Κλείνοντας, ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας επικεντρώνεται στο ρόλο του μεταβολισμού της γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι κάποια

μόρια lncRNA's παρουσιάζουν στενή συσχέτιση με τα επίπεδα γλυκολυτικών ενζύμων στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, ενεργοποιώντας μεταβολικές οδούς που αυξάνουν τον ρυθμό αύξησης του όγκου. Παρόλο που η έρευνα γύρω από το συγκεκριμένο αντικείμενο βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, υπάρχει η ελπίδα ότι η γνώση αυτή μπορεί να αποτελέσει ακρογωνιαίο λίθο μελλοντικών θεραπευτικών επιλογών (Liang et al., 2023).

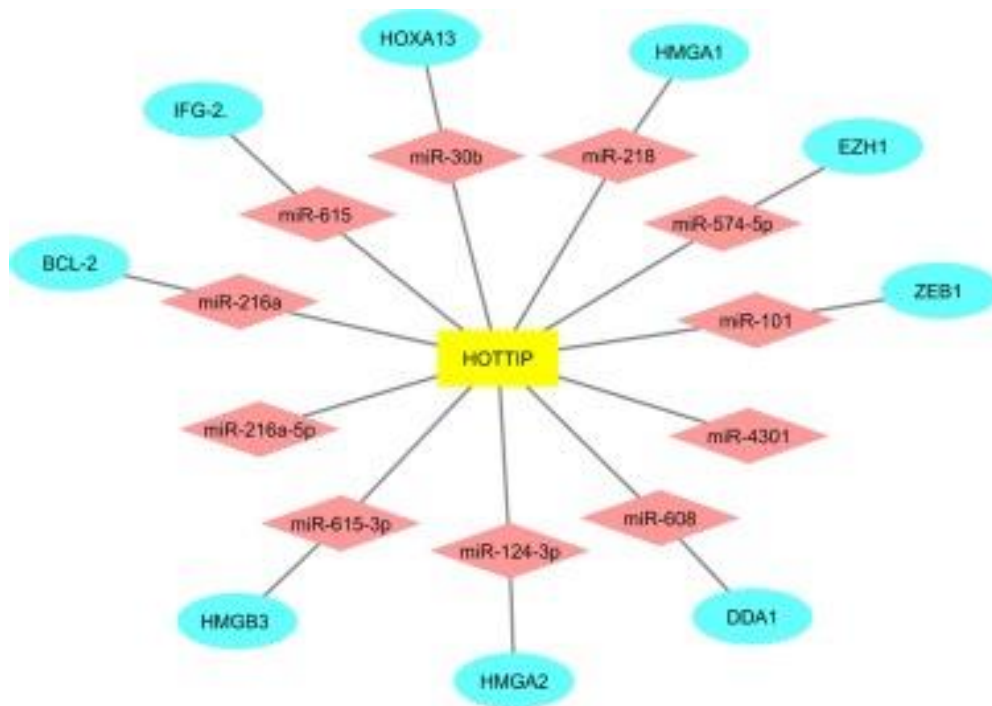
#### 4.2 Το HOTTIP στον καρκίνο του μαστού

Το HOTTIP (HOXA Transcript at the distal Tip) είναι ένα lncRNA αποτελούμενο από 3764 νουκλεοτίδια που κωδικοποιείται στο 5' άκρο της περιοχής HOXA. Η κωδικοποίησή του πραγματοποιείται στο χρωμόσωμα 7q36.1 και η λειτουργία του σχετίζεται τόσο με τη γονιδιακή έκφραση όσο και με επιγενετικές μετατροπές (Ghafouri – Fard *et al.*, 2021). Τα HOXA είναι μια ομάδα γονιδιακών συμπλόκων που βρίσκονται σε κοντινά μεταξύ τους χρωμοσώματα και επιτελούν σημαντικές λειτουργίες της ανάπτυξης από την εμβρυϊκή κιάλας ηλικία. Το HOTTIP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μεταφορά σημάτων χρωμοσωμικής διαμόρφωσης (chromosomal configuration), δηλαδή γενετικών πληροφοριών για το σχηματισμό της χρωματίνης. Μέσω της άμεσης σύνδεσής του με την πρωτεΐνη WDR5 και τη στρατολόγηση του συμπλέγματος WDR5/MLL (μεθυλοτρανσφεράση της ιστόνης) το HOTTIP κινείται επί της HOXA περιοχής και μέσω της μεθυλίωσης του H3K4 ενεργοποιεί την μεταγραφή των HOXA γονιδίων (K. C. Wang et al., 2011). Η συμμετοχή του στην ανωτέρω διαδικασία το καθιστά όχι μόνο απαραίτητο για την κυτταρική ανάπτυξη αλλά και ως ένα lncRNA που σχετίζεται με την καρκινογένεση. Πειράματα για το πλακώδες καρκίνωμα οισοφάγου, τον γαστρικό καρκίνο και τον καρκίνο του παγκρέατος έδειξαν ότι η λειτουργική συσχέτιση του HOTTIP με το σύμπλεγμα WDR5/MLL έπαιξε βασικό ρόλο στην εκδήλωση αυτών των τύπων καρκίνου (Chen et al., 2017; S. S. Wang et al., 2016; Fu et al., 2017), σύντομα όμως οι έρευνες αποκάλυψαν τη συμμετοχή του HOTTIP και σε άλλες μορφές καρκίνου όπως ο νεφροκυτταρικός καρκίνος (Peng et al., 2018), το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Quagliata et al., 2014), ο καρκίνος του προστάτη (S. Zhang et al., 2016) κ.ά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το HOTTIP εκτός από το να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση, διαφοροποιεί και τις αντικαρκινικές επιδράσεις των ανοσολογικών κυττάρων και επομένως ευνοεί τη διήθησή τους από καρκινικά κύτταρα, όπως έχει διαπιστωθεί στον καρκίνο των ωοθηκών όπου το HOTTIP ενεργοποιεί την IL-6 και οδηγεί σε ανοσοκαταστολή και ανάπτυξη του καρκίνου (Shang et al., 2019). Παρόλο που η συμμετοχή του στην καρκινογένεση είναι γνωστή, οι συσχετίσεις του HOTTIP με τους διάφορους τύπους καρκίνου δεν είναι πάντοτε σταθερές και για αυτό η έρευνα γύρω από τη λειτουργία του βρίσκεται σε συνεχή εξέλιξη. Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του μαστού πάντως, έχει διαπιστωθεί πως ασθενείς με υψηλότερη έκφραση του HOTTIP είχαν χειρότερη πρόγνωση και χαμηλότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα που αφορούσε σε μελέτη που έγινε παράλληλα σε κυτταρικές σειρές, ζώα και ανθρώπους, το HOTTIP φάνηκε να έχει ογκογονικές ιδιότητες παρόμοιες και στις τρεις αυτές μελέτες. Συγκεκριμένα, η «σίγαση» (silencing) του HOTTIP α) μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την μεταστατική συμπεριφορά, β) επέτεινε την απόπτωση των κυττάρων και τη χημειοευαισθησία των κυτταρικών σειρών και γ) προκάλεσε μείωση του ρυθμού αύξησης του όγκου σε πειραματόζωα που μεταμοσχεύτηκαν με τα ευαισθητοποιημένα κύτταρα, ενώ στην ανθρώπινη μελέτη η αυξημένη έκφρασή του συνδυάστηκε με μείωση της επιβίωσης των ασθενών (Ghafour-Fard et al., 2020).

Το HOTTIP ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση τόσο στο επίπεδο της μεταγραφής όσο και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Κατά τη διαδικασία της μεταγραφής το HOTTIP, μέσω της αλληλοεπίδρασης με το σύμπλεγμα WDR5/MLL, οδηγεί στη ρύθμιση της έκφρασης των HOXA γονιδίων και στην απορρόφηση κάποιων μορίων miRNA's τα οποία εμπλέκονται στην καρκινογένεση ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο τη διηθητική και μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 11).





Εικόνα 11: Αλληλοεπιδράσεις του HOTTIP με μόρια miRNA's που οδηγούν στην ενεργοποίηση ογκογονιδίων. (Πηγή: Ghafouri-Fard *et al.*, 2020)

Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι το HOTTIP σε κάποιες περιπτώσεις παρεμβαίνει στην ανοσολογική απάντηση των ιστών στον καρκίνο τόσο στο επίπεδο του καρκινικού κυττάρου όσο και στο καρκινικό μικροπεριβάλλον και η ιδιότητα αυτή το καθιστά δυνητικό θεραπευτικό μέσο (Ghafouri-Fard *et al.*, 2020).

Σε πειραματικό επίπεδο, ο Sun και οι συνεργάτες του (2018) πραγματοποίησαν έρευνα σε θηλυκά ποντίκια για να διερευνήσουν την επίδραση του HOTTIP στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού *in vitro* και την αξία του ως προγνωστικού δείκτη. Η παρούσα μελέτη παρείχε την πρώτη εικόνα για την επίδραση του HOTTIP στη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Τα αποτελέσματά της έδειξαν καθοριστικό ρόλο του HOTTIP στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού εφαρμόζοντας πειράματα *in vitro* και *in vivo*. Πρώτον, ανιχνεύοντας την έκφραση των γονιδίων HOXA, τόσο στην κυτταρική σειρά MCF-7 καρκίνου του μαστού όσο και στην κανονική κυτταρική σειρά MCF-10A επιθηλιακών αδενικών κυττάρων, βρέθηκε ότι τόσο τα HOTTIP όσο και τα HOXA11 ήταν αυξημένα τουλάχιστον πέντε φορές περισσότερο στα κύτταρα MCF-7 σε σύγκριση με τα MCF-10A. Δεύτερον,

προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του HOTTIP στη βιολογία του καρκίνου του μαστού μέσω *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων, διαπιστώθηκε ότι η αναστολή της λειτουργίας του οδήγησε σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα οι ερευνητές συμπέραναν ότι το HOTTIP μπορεί να διαδραματίσει πρωταρχικό ρόλο στη έκφραση πολλαπλών ογκογονικών ιδιοτήτων και στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως προγνωστικής αξίας βιοδείκτης στον καρκίνο του μαστού (Sun et al., 2018).

Όλες οι πλέον πρόσφατες δημοσιευμένες μελέτες συμπεραίνουν ότι το HOTTIP συμμετέχει σαφώς και με πολλαπλούς τρόπους στη διαδικασία της καρκινογένεσης του μαστού. Σχεδόν σε όλες διαπιστώνεται ότι η αυξημένη έκφρασή του οδηγεί σε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διηθητικότητας και της επιθήλιο - μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Han et al., 2019). Έχει επίσης αναγνωριστεί η σημασία του HOTTIP στην διατήρηση της αυτοανανέωσης των κυττάρων (stemness). Πράγματι έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωσή του στα stem cells των καρκινικών κυττάρων είναι αυξημένη, μέσω άγνωστων μέχρι στιγμής μηχανισμών, και η υπερέκφραση αυτή σχετίζεται με επιθετική συμπεριφορά του καρκίνου του μαστού. Το ανωτέρω εύρημα επιβεβαιώνεται με την μετρήσιμη αύξηση των τιμών των βιοδεικτών OCT4 και SOX2 των stem cells και αντίστοιχη μείωση των CK14 και CK18 δεικτών διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων και ως εκ τούτου συμπεραίνεται ότι το HOTTIP ρυθμίζει ενεργά τις λειτουργίες των καρκινικών βλαστοκυττάρων (cancer stem cells), αποτελώντας έτσι δυνητικά ένα μελλοντικό θεραπευτικό όπλο (Liang et al., 2020).

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι για τη μέτρηση της έκφρασης του HOTTIP στον ορό περιφερικού αίματος ασθενών, τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Στην πλέον πρόσφατη μελέτη (2021) έγινε προσπάθεια ανεύρεσης ενός μη επεμβατικού βιοδείκτη για τον καρκίνο του μαστού, με δεδομένους τους ποικίλους πολυμορφισμούς του HOTTIP και την εμπλοκή του στην καρκινογένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του HOTTIP σε περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο μαστού συγκριτικά με υγιή άτομα ήταν σημαντικά αυξημένα και ως εκ τούτου θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης της νόσου αλλά και ως στόχος εξειδικευμένων θεραπειών (Abdelaleem et al., 2021).

### **4.3 Υλικά και Μεθοδολογία**

#### 4.3.1 Επιλογή δειγμάτων

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο μαστού μία μέρα πριν τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου Γενικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Κηφισιάς «Άγιοι Ανάργυροι», μέσα στο χρονικό διάστημα από τον Ιούνιο του 2017 μέχρι τον Ιούλιο του 2018. Ολικός ορός απομονώθηκε από τα δείγματα με κατάλληλη φυγοκέντρηση και αποθηκεύτηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μέχρι την ανάλυση του. Περιφερικό αίμα επίσης λήφθηκε από υγιείς δότες. Ποσότητες του απομονωμένου ορού αυτών των ατόμων φυλάχθηκαν στις ίδιες συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν σαν ομάδα αρνητικών μαρτύρων (Control Group).

Επιλέχθηκαν 46 ασθενείς με διεγνωσμένο καρκίνο μαστού είτε από βιοψία με λεπτή βελόνα ή βιοψία πυρήνα (core biopsy) είτε που είχαν ήδη υποβληθεί σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία (neoadjuvant). Τα κριτήρια επιλογής ήταν το γυναικείο φύλο και η διάγνωση της νόσου πριν την αιμοληψία. Τα ιστολογικά αποτελέσματα και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των δειγμάτων κατά τη μελέτη του HOTTIP. Επίσης λήψη περιφερικού αίματος έγινε από 8 υγιείς γυναίκες με αρνητικό ιστορικό οποιασδήποτε κακοήθειας και τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως control group.

#### 4.3.2 Απομόνωση ολικού RNA από τον ορό περιφερικού αίματος

Ολικό RNA απομονώθηκε από τους ορούς χρησιμοποιώντας το Qiagen miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου. Πολύ σύντομα, 400  $\mu\text{L}$  από τον ορό αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα του kit και το μείγμα φιλτράρεται σε στήλη με τη βοήθεια σύντομης φυγοκέντρησης. Λόγω των ιδιοτήτων του φίλτρου και της αλατότητας του μείγματος, τα νουκλεϊνικά οξέα προσδένονται στη μεμβράνη του φίλτρου. Ακολουθεί ξέπλυμα του φίλτρου με αλκοολούχο διάλυμα και έκλουση του RNA με προσθήκη του κατάλληλου διαλύματος στο φίλτρο και φυγοκέντρηση.

#### 4.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης του ολικού RNA που απομονώνεται γίνεται με τις Qubit 3.0 φλουορόμετρο (Invitrogen, Thermo Fisher). Συνοπτικά, συγκεκριμένη ποσότητα του απομονωμένου RNA αναμιγνύεται με 200 Μl από το Qubit RNA High Sensitivity Reagent, επώάζεται για 2 λεπτά και φωτομετρείται και στη οθόνη του φλουορόμετρου εμφανίζεται η υπολογιζόμενη συγκέντρωση του δείγματος (σε ng/μL).

#### 4.3.4 Κατασκευή cDNA (Συμπληρωματικό – Complementary DNA)

Ποσότητα ολικού RNA ίση με 200 ng χρησιμοποιείται σε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής σύμφωνα με τις οδηγίες του τυποποιημένου συστήματος SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια για τη κατασκευή cDNA.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
5x Buffer	4 μl
DTT	2 μL
Nucleics Mix 10mM	1 μl
Random primers	300 ng
miScript Reverse Transcriptase	1 μl
Template RNA	200ng
dH2O ελεύθερο από RNase	Τελικός όγκος 20μl

Ακολουθεί επώαση του μείγματος σε θερμικό κυκλοποιητή (MiniAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems™) στις εξής συνθήκες (Πίνακας 8):

Πίνακας 8: Θερμικό πρωτόκολλο για τη κατασκευή cDNA.

Θερμοκρασία	Λεπτά
65°C	5'
4°C	5'
42°C	50'
70°C	15'
95°C	5'

Το cDNA που προκύπτει από τα παραπάνω στάδια αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την ανάλυσή του.

#### 4.3.5 qRT-PCR (Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (ή PCR – polymerase chain reaction) είναι μία βασική τεχνική της μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και την ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA.

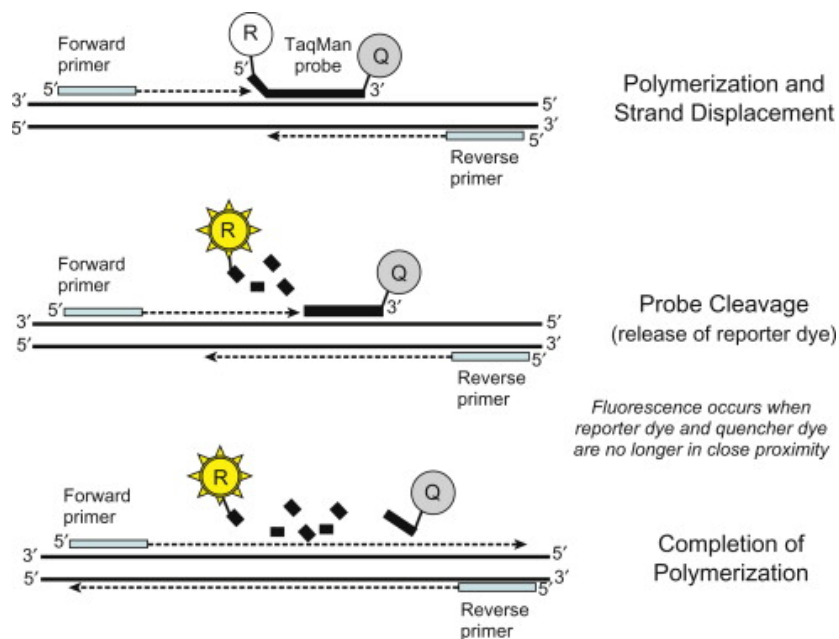
Για τη πραγματοποίησή της, είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (primers), καθένα από τα οποία είναι συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA-στόχου. Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (στους 95°C, denaturation )
- Προσαρμογή των εκκινητών στη DNA μήτρα (ποικίλλει μεταξύ 50 – 60°C, annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (72°C, extension)

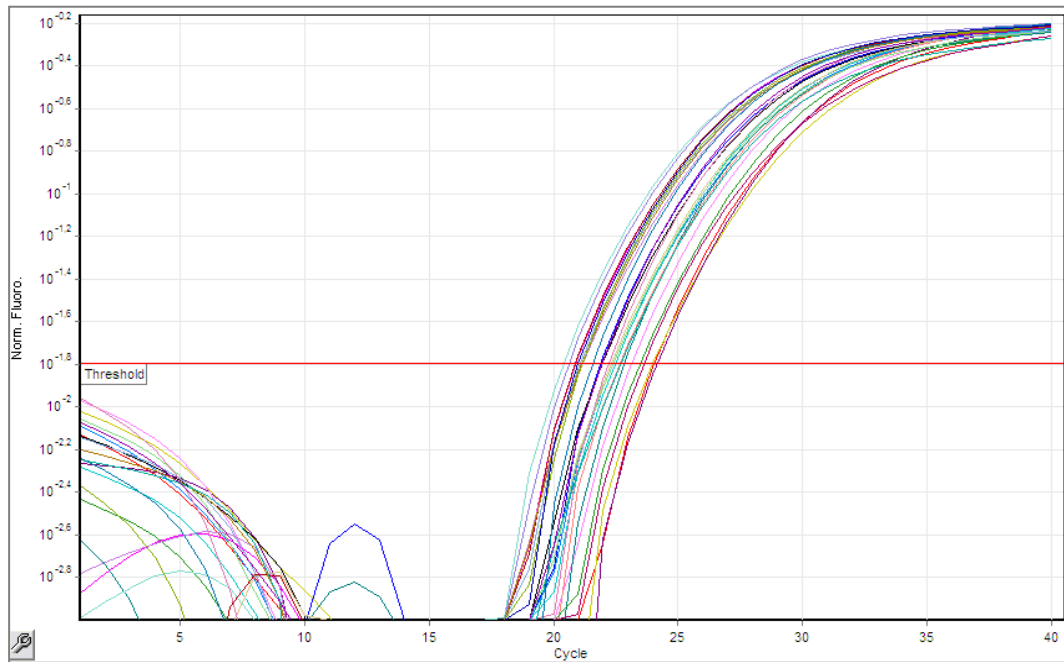
και γίνεται αυτόματα από ειδικά μηχανήματα: τους θερμικούς κυκλοποιητές (thermal cyclers). Θεωρητικά, σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η Real Time PCR δηλαδή η PCR πραγματικού χρόνου (ή qPCR, ποσοτική PCR). Η βασική διαφορά της μεθόδου αφορά την ποσοτικοποίηση του προϊόντος στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης. Αυτό επιτυγχάνεται ανιχνεύοντας ειδικό φθορισμό που εκλύεται από το συντιθέμενο προϊόν. Ο φθορισμός αυτός έχει ένταση ανάλογα με την ποσότητα του προϊόντος που έχει συντεθεί. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η ποσότητα του προϊόντος είναι ανάλογη του ποσού της μήτρας που αρχικά υπήρχε στο κάθε δείγμα, προσδιορίζεται το επίπεδο του συγκεκριμένου μορίου-στόχου μέσα στο δείγμα. Με αυτή τη λογική για κάθε δείγμα υπάρχει μια μοναδική τιμή Ct για την καμπύλη φθορισμού που φτιάχνεται.

Σήμερα υπάρχουν αρκετές διαφορετικές χημείες φθορισμού για την ανίχνευση του συντιθέμενου προϊόντος στο qPCR. Η πιο απλή, εύχρηστη και ταυτόχρονα με χαμηλό κόστος και υψηλή ακρίβεια είναι η χρήση εκκινητών και σημασμένου ιχνηθέτη, γνωστή ως Primers-TaqMan probes system. Η αρχή λειτουργίας της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στην ύπαρξη ενός μοναδικού μορίου ιχνηθέτη με αλληλουχία συμπληρωματική ως προς το μόριο-στόχος και στο ένα άκρο του φέρει φθοριόχρωμα. Καθώς γίνεται ο πολυμερισμός της αλυσίδας του DNA και υβριδίζεται εκεί ο ιχνηθέτης, απελευθερώνει και το φθορισμό (Εικόνα 12), (ScienceDirect.com).



Εικόνα 12: Πολυμερισμός της DNA αλυσίδας, υβριδισμός και φθορισμός (Πηγή: ScienceDirect.com)



*Εικόνα 13:* Γραφική παράσταση καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από τα επίπεδα του μη ειδικού φθορισμού (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή Ct. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο Ct από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Η qPCR πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα ABI 7500 PCR machine (Applied Biosystems™) χρησιμοποιώντας το Invitrogen™ Platinum™ Quantitative PCR SuperMix-UDG w/ROX. (Εικόνα 13). Για την ανίχνευση του μορίου HOTTIP χρησιμοποιήσαμε ένα έτοιμο, προσχεδιασμένο σύστημα εκκινήτων και ιχνηθέτη (Hs00955374\_s1, Thermo Fisher Scientific). Με αντίστοιχο σύστημα (Hs03929097\_g1, Thermo Fisher Scientific) μετρήσαμε τα επίπεδα του RNA του γονιδίου Gapdh σε κάθε δείγμα και το χρησιμοποιήσαμε σαν γονίδιο αναφοράς (housekeeping gene) για την ανάλυσή μας. Η μέθοδος  $\Delta\Delta Ct$  χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Στοιχειομετρία αντίδρασης.

Δείγμα cDNA.....	5μl
SuperMix-UDG w/ROX .....	10μl
TaqMan mix .....	2μl
ddH <sub>2</sub> O.....	< 20 μL

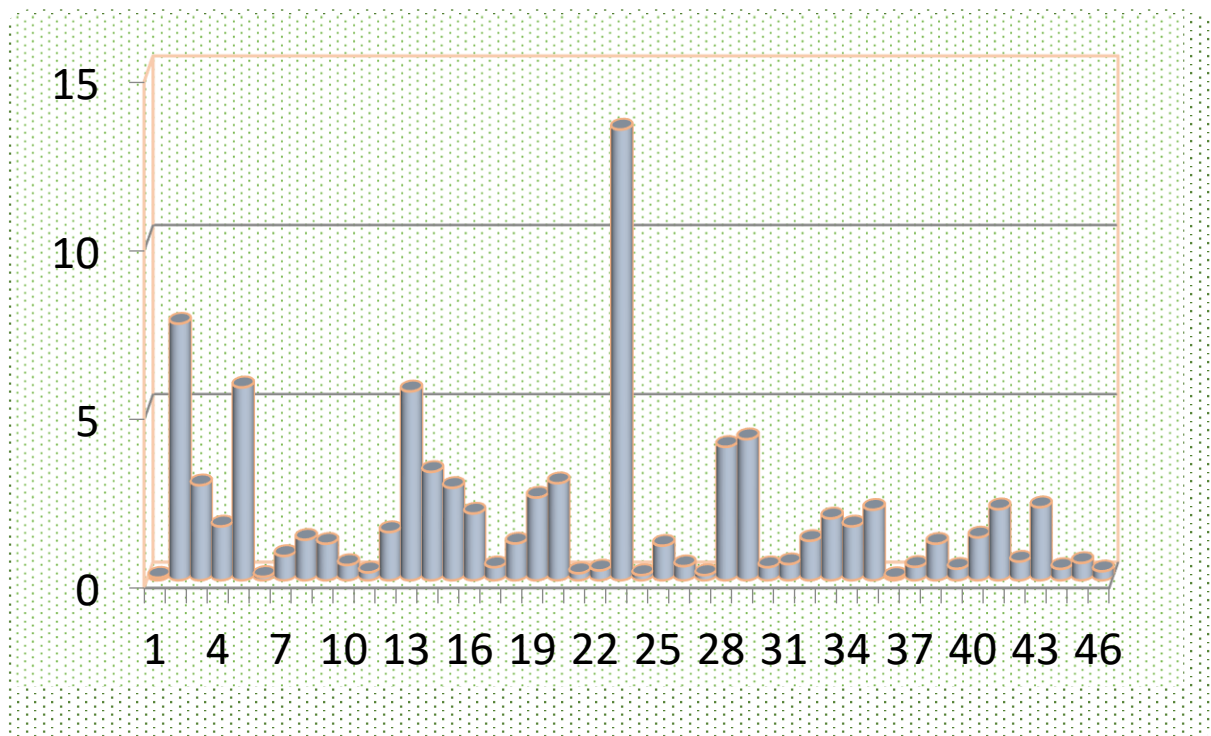
Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που έγιναν με την ως άνω περιγραφόμενη μέθοδο αναγράφονται στον *Πίνακα 10* και η σχηματική αναπαράσταση στην *Εικόνα 14*

Πίνακας 10: Τιμές του HOTTIP όπως μετρήθηκαν και αναλύθηκαν (Arbitrary units)

SAMPLES	HOTTIP	GAPDH	ΔCT	ΔΔCT	2 <sup>^</sup> (-ΔΔCT)
<b>1</b>	39,99	31,58	8,41	3,72	0,0758872
<b>2</b>	35,46	33,7	1,76	-2,93	7,621104
<b>3</b>	35,52	32,33	3,19	-1,5	2,8284271
<b>4</b>	36,01	32	4,01	-0,68	1,6021398
<b>5</b>	33,88	31,71	2,17	-2,52	5,735821
<b>6</b>	39,99	31,98	8,01	3,32	0,1001337
<b>7</b>	38,46	33,3	5,16	0,47	0,7219646
<b>8</b>	38,33	33,91	4,42	-0,27	1,2058078
<b>9</b>	37,28	32,71	4,57	-0,12	1,0867349
<b>10</b>	38,52	32,69	5,83	1,14	0,4537596
<b>11</b>	39,01	32,21	6,8	2,11	0,231647
<b>12</b>	37,88	33,71	4,17	-0,52	1,4339552
<b>13</b>	33,2	31	2,2	-2,49	5,6177795
<b>14</b>	35,62	32,62	3	-1,69	3,226567
<b>15</b>	36,93	33,7	3,23	-1,46	2,7510836
<b>16</b>	35,3	31,6	3,7	-0,99	1,986185



<b>17</b>	38,75	32,69	6,06	1,37	0,3868912
<b>18</b>	36,86	32,3	4,56	-0,13	1,0942937
<b>19</b>	34,88	31,49	3,39	-1,3	2,4622888
<b>20</b>	33,72	30,56	3,16	-1,53	2,8878584
<b>21</b>	38,34	31,38	6,96	2,27	0,2073299
<b>22</b>	38,94	32,47	6,47	1,78	0,2911834
<b>23</b>	34,36	33,41	0,95	-3,74	13,361407
<b>24</b>	39,31	31,9	7,41	2,72	0,1517744
<b>25</b>	37	32,35	4,65	-0,04	1,0281138
<b>26</b>	38,38	32,43	5,95	1,26	0,417544
<b>27</b>	39,56	32,16	7,4	2,71	0,15283
<b>28</b>	34,3	31,6	2,7	-1,99	3,97237
<b>29</b>	34,28	31,66	2,62	-2,07	4,1988667
<b>30</b>	38,75	32,69	6,06	1,37	0,3868912
<b>31</b>	38,28	32,53	5,75	1,06	0,4796321
<b>32</b>	36,05	31,59	4,46	-0,23	1,1728349
<b>33</b>	37,8	33,99	3,81	-0,88	1,8403753
<b>34</b>	35,17	31,16	4,01	-0,68	1,6021398
<b>35</b>	33,71	30,09	3,62	-1,07	2,0994334
<b>36</b>	39,74	31,11	8,63	3,94	0,0651541
<b>37</b>	38,58	32,56	6,02	1,33	0,3977682
<b>38</b>	37,05	32,48	4,57	-0,12	1,0867349
<b>39</b>	38,74	32,5	6,24	1,55	0,3415101
<b>40</b>	37,96	33,62	4,34	-0,35	1,2745606
<b>41</b>	34,4	30,79	3,61	-1,08	2,1140361
<b>42</b>	37,76	32,22	5,54	0,85	0,5547847
<b>43</b>	33,74	30,17	3,57	-1,12	2,1734697
<b>44</b>	38,65	32,39	6,26	1,57	0,3368084
<b>45</b>	38,18	32,53	5,65	0,96	0,5140569
<b>46</b>	39,26	32,66	6,6	1,91	0,2660925



*Εικόνα 14:* Γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων μέτρησης του HOTTIP. Οριζόντιος άξονας: αύξων αριθμός δείγματος. Κατακόρυφος άξονας: τιμές μέτρησης του HOTTIP [2<sup>(-ΔΔCT)</sup>].

Οι χειρουργικές επεμβάσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν κατά περίπτωση: ογκεκτομή, τεταρτεκτομή, μαστεκτομή, εκτομή λεμφαδένα φρουρού και λεμφαδενικός καθαρισμός σύστοιχης μασχάλης. Τα παρασκευάσματα παραλαμβάνονταν από το παθολογοανατομικό εργαστήριο του Γ.Ο.Ν.Κ «Άγιοι Ανάργυροι» όπου υποβάλλονταν σε ιστολογική εξέταση και ανοσοϊστοχημεία όπου χρησιμοποιήθηκε η ανοσοϊστοχημική μέθοδος της στρεπταβιδίνης – βιοτίνης. Το μέγεθος του όγκου και ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων καθορίστηκαν με βάση το σύστημα TNM της αμερικάνικης εταιρείας για τον καρκίνο (AJCC). Η έκφραση των οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών υποδοχέων (PR) από τα παρασκευάσματα εκτιμήθηκε από το ποσοστό των θετικών πυρήνων και την ένταση της χρωστικής αντίδρασης. Για τη μέτρηση των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα 6F11 σε τίτλο 1/50 ενώ η μέτρηση των προγεστερονικών υποδοχέων (PR) έγινε με τη χρήση του 16 αντισώματος σε τίτλο 1/10 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Το HercepTest (0, 1+, 2+, 3+) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ανοσοαντίδρασης HER2 λαμβάνοντας ως θετικό τον όγκο με 3+ βαθμό χρωστικής. Για το δείκτη

κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αξιολόγησης MIB-1 labelling index, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και μετρήθηκε το ποσοστό των θετικών κυττάρων στο σύνολο των μικροϊστοτεμαχίων που μελετήθηκαν σε 200x κλίμακα μεγέθυνσης.

#### **4.4 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων**

Για να παρουσιάσουμε τις ποσοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, η διάμεσος, η ελάχιστη τιμή και η μέγιστη τιμή. Για να παρουσιάσουμε τις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι απόλυτες και οι σχετικές συχνότητες. Ο έλεγχος των Kolmogorov-Smirnov χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της κανονικής κατανομής των ποσοτικών μεταβλητών.

Εξαιτίας της περιορισμένης μεταβλητότητας σε αρκετές κατηγορίες, οι εξής μεταβλητές δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις συσχετίσεις: ιστολογικός τύπος, τύπος πολυεστιακότητας, *cerb2* ή *Her2* και προεγχειρητική χημειοθεραπεία.

Για τη διερεύνηση της ύπαρξης σχέσης μεταξύ μιας ποσοτικής μεταβλητής που δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή και μιας διχοτόμου μεταβλητής χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann-Whitney. Για τη διερεύνηση της ύπαρξης σχέσης μεταξύ μιας ποσοτικής μεταβλητής που δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή και μιας κατηγορικής μεταβλητής χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Kruskal-Wallis. Για τη διερεύνηση της ύπαρξης σχέσης μεταξύ δυο ποσοτικών μεταβλητών που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman.

Το αμφίπλευρο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ίσο με 0,05. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το IBM SPSS 21.0 (Statistical Package for Social Sciences).

## Αποτελέσματα

Ο μελετώμενος πληθυσμός περιλάμβανε 46 γυναίκες με καρκίνο του μαστού και μέσης ηλικίας τα 63,8 έτη (τυπική απόκλιση=13,3). Η διάμεση ηλικία ήταν 61 έτη, ενώ η ελάχιστη και η μέγιστη ηλικία ήταν 37 και 91 έτη αντιστοίχως.

Τα περιγραφικά αποτελέσματα για τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται στον *Πίνακα 11*.

*Πίνακας 11.* Περιγραφικά αποτελέσματα για τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε κατηγορικές μεταβλητές.

Χαρακτηριστικά	N	%
Ιστολογικός τύπος		
Διηθητικό πορογενές	13	28,3
Διηθητικό πορογενές & DCIS	15	32,6
Διηθητικό λοβιακό & LCIS	6	13,0
Νόσος Paget της θηλής του μαστού	1	2,2
In situ πορογενές καρκίνωμα - DCIS	2	4,3
Μη συγκεκριμένος τύπος - NST	9	19,6
Σύνολο	46	100
Πολυεστιακότητα του όγκου		
Όχι	22	47,8
Ναι	24	52,2
Τύπος πολυεστιακότητας		
In situ λοβιακό καρκίνωμα - LCIS	5	20,8
Comedo	4	16,7
In situ πορογενές καρκίνωμα - DCIS	15	62,5
Σύνολο	24	100
Βαθμός διαφοροποίησης		
I	8	17,5
II	26	56,4

III	12	26,1
Σύνολο	46	100
Cerb2 ή HER 2		
Θετικό	1	2,2
Αρνητικό	45	97,8
Σύνολο	46	100
Σταδιοποίηση *		
T1N0	12	33,3
T1N1	5	13,9
T2N0	5	13,9
T2N1	5	13,9
T2N2	1	2,8
T2N3	2	5,6
T3N1	2	5,6
T4N0	1	2,8
T4N1	1	2,8
T4N2	1	2,8
Σύνολο	35*	100
Αφαίρεση λεμφαδένα φρουρού - SLND		
Όχι	23	50
Ναι	23	50
Σύνολο	46	100
Θετικός Λεμφαδένας φρουρός	6/23	26,1%
Λεμφαδενικός καθαρισμός μασχάλης		
Όχι	30	65,2
Ναι	16	34,8
Σύνολο	46	100
Θετικοί λεμφαδένες μασχάλης	9/16	56,2%
Συνολικά θετικοί λεμφαδένες	15/39	38,5%
Προεγχειρητική χημειοθεραπεία		

Όχι	43	93,5
Ναι	3	6,5

\* Στη σταδιοποίηση με το σύστημα TNM δεν συμπεριλαμβάνονται δείγματα που αφορούν σε τμήμα όγκου ή λεμφαδένων από βιοψία (core biopsy), η νόσος Paget, η συμπληρωματική εκτομή όγκου και όταν έχει προηγηθεί προεγχειρητική χημειοθεραπεία (neoadjuvant). Όλες οι ασθενείς ήταν ελεύθερες απομακρυσμένων μεταστάσεων (M0).

Τα περιγραφικά αποτελέσματα για τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Περιγραφικά αποτελέσματα για τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποσοτικές μεταβλητές.

Χαρακτηριστικά	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Διάμεσος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Μέγιστη διάμετρος του όγκου	2,39	1,42	2	0,50	7
ER (%)	61,25	37,61	80	0	100
PR (%)	35,41	36,74	12,5	0	100
Ki67 (%)	19,18	17,85	12	2	95
HOTTIP	2,0567	2,6520	1,1893	0,0651	13,3614

Οι σχέσεις ανάμεσα στο HOTTIP και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις. Ωστόσο, σημειώνονται οι παρακάτω διαφορές:

- Η διάμεση τιμή HOTTIP ήταν μεγαλύτερη στις ασθενείς με πολυεστιακότητα του όγκου.
- Η διάμεση τιμή HOTTIP ήταν μεγαλύτερη στις ασθενείς με καρκίνο σταδίου III.
- Η διάμεση τιμή HOTTIP ήταν μεγαλύτερη στις ασθενείς με καρκίνο μεγέθους T3/T4.
- Η διάμεση τιμή HOTTIP ήταν μεγαλύτερη στις ασθενείς που δεν έγινε αφαίρεση του λεμφαδένα φρουρού.
- Η διάμεση τιμή HOTTIP ήταν μεγαλύτερη στις ασθενείς που έγινε αφαίρεση λεμφαδένων.

*Πίνακας 13.* Σχέσεις ανάμεσα στο HOTTIP και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποιοτικές μεταβλητές.

Χαρακτηριστικά	Διάμεση τιμή HOTTIP	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	Τιμή p
Πολυεστιακότητα του όγκου			0,82 <sup>α</sup>
Όχι	1,1463	2,1881	
Ναι	2,3281	2,4323	
Βαθμός διαφοροποίησης			0,24 <sup>β</sup>
I	1,2745	1,9067	
II	1,0867	2,1589	
III	2,0798	3,0182	
Σταδιοποίηση			0,62 <sup>β</sup>
T1	1,0867	2,5413	
T2	1,1173	4,9157	
T3/T4	1,8037	2,4906	
Αφαίρεση λεμφαδένα φρουρού			0,36 <sup>α</sup>
Όχι	1,3543	2,3016	
Ναι	0,7914	1,9737	
Αφαίρεση λεμφαδένων			0,07 <sup>α</sup>
Όχι	1,0867	1,8083	
Ναι	2,1734	2,7744	

<sup>α</sup> έλεγχος Mann-Whitney

<sup>β</sup> έλεγχος Kruskal-Wallis

Οι σχέσεις ανάμεσα στο HOTTIP και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται στον Πίνακα 14. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις. Ωστόσο, σημειώνονται οι παρακάτω συσχετίσεις:

- Η αύξηση του ποσοστού PR σχετιζόταν με μείωση του HOTTIP.
- Η αύξηση του ποσοστού θετικότητας των λεμφαδένων σχετιζόταν με αύξηση του HOTTIP.

*Πίνακας 14.* Σχέσεις ανάμεσα στο HOTTIP και τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που αφορούν σε ποσοτικές μεταβλητές.

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης Spearman	Τιμή p
Μέγιστη διάμετρος του όγκου	0,02	0,88
ER (%)	-0,08	0,61
PR (%)	-0,13	0,40
Ki67 (%)	0,07	0,67
Ποσοστό θετικότητας του φρουρού λεμφαδένα (%)	-0,10	0,74
Ποσοστό θετικότητας των λεμφαδένων (%)	0,13	0,65

<sup>a</sup> συντελεστής συσχέτισης Spearman



## Συζήτηση

Το 1953 οι Francis Harry Compton Crick και James Watson πρώτοι παρουσίασαν τη δομή της διπλής έλικας του DNA, ανοίγοντας το δρόμο για την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας. Το 1958 ο Crick , προκειμένου να περιγράψει τη ροή της γενετικής πληροφορίας, πρότεινε το «Κεντρικό Δόγμα της Βιολογίας» βάσει του οποίου: η διπλή έλικα DNA αντιγράφεται, η γενετική πληροφορία μεταφέρεται σε μορφή mRNA μέσω της διαδικασίας μεταγραφής και τέλος μεταφράζεται σε πρωτεΐνη με βάση το συγκεκριμένο γενετικό κώδικα. Μερικά χρόνια αργότερα διαπιστώθηκε ότι η ροή της πληροφορίας μπορεί να έχει και αντίστροφη πορεία μέσω του ενζύμου «αντίστροφη μεταγραφάση» που κάποιοι ιοί χρησιμοποιούν για να συνθέσουν DNA από το δικό τους RNA γενετικό υλικό, ενώ λίγες δεκαετίες αργότερα η ανακάλυψη των μη κωδικών μορίων RNA άνοιξε το δρόμο για την βαθύτερη κατανόηση του κυτταρικού μικροκόσμου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή θέλησε να μελετήσει την πιθανή χρήση ενός μη κωδικού μορίου RNA, του HOTTIP, ως βιοδείκτη σε ασθενείς με καρκίνο μαστού. Ήδη από τη δεκαετία του '90 οι έρευνες για τα μη κωδικά μόρια RNA, αρχής γενομένης από τα miRNA's, είχαν αρχίσει να πολλαπλασιάζονται αφού η λειτουργική τους ποικιλομορφία είχε διακριθεί από νωρίς. Σύντομα η επιστημονική κοινότητα ανακάλυψε και κατέταξε χιλιάδες τέτοια μόρια και στις αρχές του 21<sup>ου</sup> αιώνα τα lncRNA's μπήκαν στο μικροσκόπιο των ερευνών. Η επιλογή του θέματος της παρούσας διατριβής έγινε με κριτήριο τα περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη σχέση του HOTTIP με τον καρκίνο του μαστού. Πρόθεσή μας ήταν να αναζητήσουμε την έκφραση του μορίου αυτού σε έναν τομέα της χειρουργικής ογκολογίας που οι πληροφορίες ήταν ελλιπείς.

Για να διερευνηθεί η σημασία του HOTTIP στην καρκινογένεση, έπρεπε να αναζητηθούν οι λειτουργίες των ncRNA's στα φυσιολογικά κύτταρα και η σημασία των μη κωδικών RNA στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου. Ήδη από το 2009 οι Avril-Sassen et al. κατέληξαν σε ένα ολοκληρωμένο γενετικό προφίλ miRNA's που συμμετέχουν στη συνολική ανατομική και λειτουργική ανάπτυξη των μαστών σε πειράματα σε επίμυες (Avril-Sassen et al., 2009). Στη συνέχεια βρέθηκε η συσχέτιση των ncRNA's και με τους υποδοχείς προγεστερόνης των κυττάρων του μαστικού αδένου (Cui et al., 2011) ενώ κάποιες αλληλουχίες miRNAs βρέθηκαν να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών μαστικών κυττάρων μέσω των υποδοχέων

προλακτίνης και αυξητικής ορμόνης (Rijnkels et al., 2010). Στο μηχανισμό της καρκινογένεσης διαπιστώθηκε ότι η επιθηλιο-στρωματική αλληλεπίδραση (epithelial-to-mesenchymal transition , EMT) είναι μια μοριακή διαδικασία στην οποία τα ncRNA's παίζουν σημαντικό ρόλο ενώ σταδιακά ολοένα και περισσότερες μελέτες έφεραν στο φως τη συμμετοχή των ncRNA's στην ογκογένεση, τόσο με ογκογονική όσο και με ογκοκατασταλτική δράση.

Πιο πρόσφατες μελέτες σχετικά με τον καρκίνο του μαστού έδειξαν ότι το lncRNA00617 προάγει τη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων (Z. Li et al., 2017), το lncRNA POR προκαλεί αύξηση της αντίστασης στη φαρμακευτική θεραπεία (Q. Zhou et al., 2020), το HOTAIR αυξάνει την καρκινική ανάπτυξη και τη μεταστατική διάθεση (Y. Wang et al., 2020) και το TROJAN εντείνει την διηθητική ανάπτυξη του όγκου (Jin et al., 2019).

Το 2017 οι Lin et al. δημοσίευσαν έρευνα στην οποία διαπιστώθηκε ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί στις αλληλουχίες της ομάδας γονιδίων HOTAIR σχετίζονταν με αυξημένη εκδήλωση καρκίνου του μαστού ενώ τέθηκε και το ερώτημα της πιθανής ανίχνευσης του HOTAIR σε ορό περιφερικού αίματος ασθενών ώστε να μελετηθεί ως πιθανός προγνωστικός βιοδείκτης (Lin et al., 2017). Παράλληλα καταδείχθηκε ότι αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού σε γυναίκες σχετιζόταν σαφώς με ανίχνευση πολυμορφισμού των νουκλεοτιδικών αλύσεων κάποιων γονιδιακών υποτύπων του HOTAIR (Hassanzarei et al., 2017). Η έρευνα συνεχίστηκε με τη μέτρηση των εξωσωμάτων (μικροσκοπικά νανοκυστίδια της κυτταρικής μεμβράνης με λειτουργικό ρόλο στη μεταφορά ενδοκυττάρων μορίων) σε ασθενείς με καρκίνο μαστού σε σύγκριση με υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα επίπεδα μέτρησης των εξωσωμάτων ήταν πολύ υψηλότερα στο περιφερικό αίμα των ασθενών ενώ μετά από χειρουργείο μαστεκτομής τα επίπεδα αυτά μειώνονταν. Επίσης τα υψηλά επίπεδα του εξωσωμικού HOTAIR συνδυάζονταν με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης και αυξημένη χημειοαντίσταση (Tang et al., 2019).

Το 2021 δημοσιεύτηκε άλλη μια σημαντική έρευνα βάσει της οποίας το lncRNA με την ονομασία lncPORM ανιχνεύτηκε σε υψηλούς τίτλους στα βλαστοκύτταρα των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Cancer Stem Cells – CSS's) και συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό κακοήθειας και πτώχη πρόγνωση (Liu et al., 2021). Οι πλέον πρόσφατες μελέτες του 2023 επιβεβαιώνουν τη σχέση των μη κωδικών μορίων RNA με την έκφραση του καρκίνου του μαστού. Οι Zhang et al.(2023) έδειξαν ότι το lncRNA BC069792 έχει ογκοκατασταλτική δράση λειτουργώντας ως μοριακό σφουγγάρι

μορίων που προάγουν την διηθητική και μεταστατική συμπεριφορά του όγκου ενώ και οι Feng et al. (2023) παρουσίασαν μελέτη σχετικά με το PCAT19 ως ογκοκαταστατικό ncRNA.

Αναφορικά με το υπό μελέτη μόριο, στις έρευνες που έχουν δημοσιευτεί την τελευταία δεκαετία, φαίνεται μια σταθερή σχέση του HOTTIP με τον αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου, το προχωρημένο στάδιο της νόσου, τη μεταστατική διάθεση του όγκου και τη λεμφαδενική διασπορά. Τα πρώτα αποτελέσματα σε πειράματα έδειξαν τη συμμετοχή του HOTTIP στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου (Chen et al., 2017), το γαστρικό καρκίνο (S. S. Wang et al., 2016) και εκείνον του παγκρέατος (Fu et al., 2017), η περαιτέρω λεπτομερής έρευνα όμως έδειξε ότι υψηλές τιμές του μορίου ανευρίσκονται και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Quagliata et al., 2014), τον καρκίνο του προστάτη (S. Zhang et al., 2016) και το νεφροκυτταρικό καρκίνο (Peng et al., 2018). Διαπιστώθηκε επίσης ότι ένας άλλος μηχανισμός δράσης του HOTTIP είναι μέσω της τροποποίησης των λεμφοκυττάρων, τα οποία καθιστά ευάλωτα στην καρκινική διήθηση (Shang et al., 2019). Αναφορικά με τον καρκίνο του μαστού σε μεγάλη μελέτη του 2020, όπου μελετήθηκε η έκφραση του HOTTIP παράλληλα σε κυτταρικές σειρές, πειραματόζωα και ανθρώπους, διαπιστώθηκε ότι συμπεριφερόταν ογκογονικά και στις τρεις περιπτώσεις επιδεινώνοντας την πρόγνωση αλλά και τα ποσοστά επιβίωσης (Ghafouri-Fard et al., 2020). Η ογκογονική του δράση φάνηκε και στην έρευνα των Sun et al. (2018) όπου η πειραματική «σίγαση» (silencing) του HOTTIP προκάλεσε σημαντική μείωση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού και τη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Sun et al., 2018). Τέλος, το 2021 δημοσιεύτηκε μια έρευνα στην οποία μετρήθηκε η συγκέντρωση του HOTTIP σε ορό περιφερικού αίματος ασθενών με καρκίνο μαστού σε σύγκριση με υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν για άλλη μια φορά τη σημαντικά αυξημένη έκφραση του HOTTIP στους ασθενείς σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός σημαντικό για την πιθανή μελλοντική του χρήση ως λειτουργικός προγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο του μαστού (Abdelaleem et al., 2021).

Οι μελέτες που πραγματοποιούνται και δημοσιεύονται τα τελευταία χρόνια έχουν στρέψει το ερευνητικό τους ενδιαφέρον στην πιθανή χρήση των μη κωδικών RNA ως βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού. Κάτι τέτοιο παραμένει ακόμη αρκετά δύσκολο στην εφαρμογή του και μέχρι σήμερα οι παραδοσιακές προγνωστικές παράμετροι παραμένουν αναντικατάστατες, ωστόσο η προσπάθεια ανεύρεσης νέων διαγνωστικών και προγνωστικών τεχνικών συνεχίζεται με θετικό πρόσημο.

## Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας αναφορικά με τον τρόπο και τους μηχανισμούς που το HOTTIP δρα και επηρεάζει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Μέχρι την έναρξη της έρευνας αυτής, τα περισσότερα δεδομένα αφορούσαν σε μελέτη έκφρασης του HOTTIP σε κυτταρικές σειρές, καρκινικούς ιστούς ή πειραματόζωα και όλα τα αποτελέσματα έδειχναν μια σημαντική συσχέτισή του με την εκδήλωση νόσου υψηλής κακοήθειας, επιθετικής συμπεριφοράς και λεμφαδενικής μεταστατικής συμπεριφοράς. Για τον λόγο λοιπόν αυτό και με δεδομένη την παρουσία μας σε ένα μεγάλο ογκολογικό νοσοκομείο, επιλέχθηκε μια πρωτότυπη μελέτη, αυτή της μέτρησης του HOTTIP στον ορό περιφερικού αίματος ασθενών με διεγνωσμένο καρκίνο μαστού και η διερεύνηση της πιθανής μελλοντικής του χρήσης ως προγνωστικός βιοδείκτης. Το πρωτότυπο του εγχειρήματος και η απουσία προηγούμενης αντίστοιχης έρευνας είναι και ο λόγος που τα δείγματα είναι σχετικά περιορισμένα, με την ελπίδα να αποτελέσουν την πρώτη ύλη για μεγαλύτερες και περισσότερες μελέτες.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μια υψηλή έκφραση του HOTTIP σε ασθενείς με μεγαλύτερο σε μέγεθος όγκο, με πιο προχωρημένο στάδιο νόσου και με περισσότερους διηθημένους λεμφαδένες, κάτι που επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση. Σημαντική επίσης διαπίστωση είναι ότι η διάμεση τιμή του HOTTIP ήταν μεγαλύτερη σε πολυεστιακούς όγκους, γεγονός με ιδιαίτερη κλινική σημασία για γυναίκες που ανευρίσκεται δυνητικά πολυεστιακός τύπος καρκίνου ή σε περιπτώσεις με αμφίβολη διάγνωση. Αξίζει μια πιο λεπτομερή ανάλυση προς αναζήτηση της προγνωστικής του αξίας. Πρότασή μας είναι μια επόμενη εργασία να αφορά σε πολυκεντρική μελέτη, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων και έχοντας συγκριτικά αποτελέσματα με έναν υγιή πληθυσμό αναφοράς.

Αναφορικά με την πιθανή χρήση του HOTTIP ως προγνωστικό βιοδείκτη για τον καρκίνο του μαστού, τα αποτελέσματα μας επιτρέπουν να αντιμετωπίζουμε αυτή την πιθανότητα με αισιοδοξία. Απαιτούνται αρκετές επιπλέον μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση για την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων. Η αντιμετώπιση του καρκίνου έχει διαρκώς ανάγκη από νέα και αποτελεσματικά όπλα για τη διάγνωση, την πρόληψη και την εξατομικευμένη θεραπεία και είναι υποχρέωση της επιστημονικής κοινότητας η εξυπηρέτηση αυτού του σκοπού με κάθε μέσο.



## **Περίληψη**

**Εισαγωγή:** Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη μορφή κακοήθειας στις γυναίκες όλων των ηλικιών και την πέμπτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το μεγάλο επιστημονικό στοίχημα εξακολουθεί να είναι η έγκαιρη πρόληψή του αλλά και η εξειδικευμένη θεραπεία του μέσω προγνωστικών δεικτών ακριβείας. Στην εποχή μας, πέρα από τις κλασικές κλινικοπαθολογικές και μοριακές παραμέτρους ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού, η έρευνα έχει στραφεί στο ρόλο των μη κωδικών RNA στον μηχανισμό της καρκινογένεσης και ως εκ τούτου στην αναζήτηση νέων εξατομικευμένων θεραπειών.

**Στόχος:** Στη διεθνή βιβλιογραφία το μη-κωδικό μόριο RNA HOTTIP έχει βρεθεί να εκφράζεται σε διάφορες μορφές καρκίνου όπως εκείνος του οισοφάγου, του στομάχου, του νεφρού, του παγκρέατος κ.α. λειτουργώντας συνήθως ως ογκογόνος παράγοντας. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μέτρηση του HOTTIP στον ορό περιφερικού αίματος ασθενών με διεγνωσμένο καρκίνο μαστού και η διερεύνηση της χρήσης του ως μελλοντικός προγνωστικός βιοδείκτης.

**Μεθοδολογία:** Για την εκπόνηση της έρευνας έγινε λήψη περιφερικού αίματος 46 ασθενών προεγχειρητικά, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση και διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Έγινε ανάλυση των δειγμάτων με real-time PCR και ανίχνευση του lncRNA HOTTIP σε σύγκριση με τα επίπεδα του Gapdh και εξαγωγή των αποτελεσμάτων με μέθοδο DDCT.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που έδειξε ότι το HOTTIP σχετιζόταν με την εκδήλωση καρκίνου υψηλότερης κακοήθειας, μεγαλύτερου μεγέθους και αυξημένης λεμφαδενικής διασποράς.

**Αποτελέσματα:** Τα αποτελέσματα της έρευνας επιβεβαιώνουν ότι το HOTTIP είναι ένα μόριο RNA που σχετίζεται με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου και δυνητικά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός βιοδείκτης. Περισσότερες μελέτες απαιτούνται για την εξαγωγή πιο ασφαλών συμπερασμάτων.

## **Abstract**

Being the most prevalent cancer in women globally, breast cancer poses a serious threat to global health. For a successful course of therapy and better patient outcomes, early identification of breast cancer is essential. Despite improvements in screening and diagnostic methods for early breast cancer detection, more accurate and trustworthy biomarkers are still required for the diagnosis, prognosis, and follow-up of this illness.

Non-coding RNAs (ncRNAs) have attracted a great deal of interest in recent years because of their function in cancer biology. In several malignancies, including breast cancer, long non-coding RNAs (lncRNAs), a subclass of ncRNAs, have become potential biomarkers and therapeutic targets. HOTTIP (HOXA transcript at the distal tip), one of the many lncRNAs investigated, has demonstrated potential as a possible biomarker for breast cancer.

The HOXA locus is the source of the well-studied lncRNA HOTTIP, which has been linked to several cellular functions such as cell division, migration, and proliferation. Additionally, a growing body of research indicates that dysregulated HOTTIP expression is linked to the onset and progression of disease, particularly breast cancer. This makes HOTTIP an attractive molecule to research for its possible application in the detection and treatment of breast cancer.

The purpose of this study is to conduct a thorough examination of the usage of circulating HOTTIP as a breast cancer biomarker. We will talk about the dysregulation of HOTTIP in breast cancer, the current knowledge of its molecular roles, and its potential as a non-invasive diagnostic and prognostic tool. We will also go through the difficulties and possibilities of using circulating lncRNAs as biomarkers in clinical practice, including concerns like sensitivity, specificity, and standardization of detection techniques.

Through this research, we want to add to the expanding body of information about non-coding RNAs in breast cancer and maybe progress the creation of new and improved methods for the early identification and treatment of this common and deadly condition.

## **Βιβλιογραφία**

Abdelaleem, O. O., Shaker, O. G., AbdelHafez, M. N., Abdelghaffar, N. K., Eid, H. M., Zaidan, M., Khalefa, A. A., Ahmed, N. A., Hemeda, N. F., Zaki, O. M., Awaji, A. A., & Mohammed, S. R. (2021). The Influence of rs1859168 Polymorphism on Serum Expression of HOTTIP and Its Target miR-615-3p in Egyptian Patients with Breast Cancer. *Biomolecules*, *11*(5), 733. <https://doi.org/10.3390/biom11050733>

Abdi, E., Latifi-Navid, S., & Latifi-Navid, H. (2022). LncRNA polymorphisms and breast cancer risk. *Pathology Research and Practice*, *229*, 153729. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153729>

Abe, R. *et al.* (1976) “Biological Characteristics of Breast Cancer in Obesity,” *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, *120*(4), pp. 351–359. Available at: <https://doi.org/10.1620/tjem.120.351>.

Acevedo, C.G., Amaya, C.S. and Guerra, J.L.L. (2014) “Rare breast tumors: Review of the literature,” *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, ELSEVIER*, *19*(4), pp. 267–274. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2013.08.006>.

Akram, M. *et al.* (2017) “Awareness and current knowledge of breast cancer,” *Biological Research*, *50*(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>.

Al-Hajj, M. *et al.* (2003) “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), pp. 3983–3988. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.

Almstedt, K. *et al.* (2020) “EndoPredict® in early hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, *182*(1), pp. 137–146. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05688-1>.

Anastasiadou, E., Jacob, L.S. and Slack, F.J. (2017) “Non-coding RNA networks in cancer,” *Nature Reviews Cancer*, *18*(1), pp. 5–18. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>.

Avril-Sassen, S., Goldstein, L. D., Stingl, J., Blenkiron, C., Quesne, J. L., Spiteri, I., Karagavriilidou, K., Watson, C. J., Tavaré, S., Miska, E. A., & Caldas, C. (2009). Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-548>

Badve, S. and Gökmen-Polar, Y. (2019) “Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019,” *Pathology*, 51(6), pp. 563–569. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.07.005>.

Berg, R.A. *et al.* (2019) “Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early-stage disease,” *Seminars in Oncology*, 46(2), pp. 121–132. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2019.03.002>.

Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. (2001). *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>

Bodewes, F.T.H. *et al.* (2022) “Mammographic breast density and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis,” *The Breast*, 66, pp. 62–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.09.007>.

Bougias, H. and Stogiannos, N. (2022) “Breast MRI: Where are we currently standing?,” *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences*, 53(2), pp. 203–211. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmir.2022.03.072>.

Bray, F., McCarron, P. and Parkin, D.M. (2004) “The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality,” *Breast Cancer Research*, 6(6). Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr932>.

Brown, A.L. *et al.* (2021) “ACR Appropriateness Criteria® Transgender Breast Cancer Screening,” *Journal of the American College of Radiology*, 18(11), pp. S502–S515. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2021.09.005>.

Byler, S. *et al.* (2014) “Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy,” *PubMed*, 34(3), pp. 1071–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24596345>.

Chang, J.M. *et al.* (2020) “Axillary Nodal Evaluation in Breast Cancer: State of the Art,” *Radiology*, 295(3), pp. 500–515. Available at: <https://doi.org/10.1148/radiol.2020192534>.

Chang, M. (2011) “Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis,” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2011.44.7.423>.



- Chen, L., Wang, Y., Zhang, S., Yu, L., Guo, C., & Xu, H. (2017). Transcriptional and posttranscriptional regulation of HOXA13 by lncRNA HOTTIP facilitates tumorigenesis and metastasis in esophageal squamous carcinoma cells. *Oncogene*, *36*(38), 5392–5406. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.133>
- Cho, S. W., Xu, J., Sun, R., Mumbach, M. R., Carter, A. C., Chen, Y. G., Yost, K. E., Kim, J., He, J., Nevins, S., Chin, S. F., Caldas, C., Liu, S. J., Horlbeck, M. A., Lim, D. A., Weissman, J. S., Curtis, C., & Chang, H. Y. (2018). Promoter of LNCRNA gene PVT1 is a Tumor-Suppressor DNA boundary element. *Cell*, *173*(6), 1398-1412.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.068>
- Choi, S. K., Kim, H. S., Jin, T., Hwang, E., Jung, M., & Moon, W. K. (2016). Overexpression of the miR-141/200c cluster promotes the migratory and invasive ability of triple-negative breast cancer cells through the activation of the FAK and PI3K/AKT signaling pathways by secreting VEGF-A. *BMC Cancer*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2620-7>
- Choi, Y.D. (2022) “Estrogen Receptor  $\beta$  Expression and Its Clinical Implication in Breast Cancers: Favorable or Unfavorable?,” *Journal of Breast Cancer*, *25*(2), p. 75. Available at: <https://doi.org/10.4048/jbc.2022.25.e9>.
- Chu, P.-Y. *et al.* (2019) “Cell reprogramming in tumorigenesis and its therapeutic implications for breast cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), p. 1827. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20081827>.
- Clusan, L. *et al.* (2023) “A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), p. 6834. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24076834>.
- Conti, A. *et al.* (2021) “Radiomics in breast cancer classification and prediction,” *Seminars in Cancer Biology*, *72*, pp. 238–250. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.04.002>.
- Cooper, A. (1840) *On the Anatomy of the Breast*.
- Cui, W., Qing-Zhang, L., Li, F., & Ding, W. (2011). MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *355*(1–2), 17–25. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0834-1>

Damavandi, Z., Torkashvand, S., Vasei, M., Soltani, B. M., Tavallaei, M., & Mowla, S. J. (2016). Aberrant expression of breast Development-Related MicroRNAs, MIR-22, MIR-132, and MIR-212, in breast tumor tissues. *Journal of Breast Cancer*, 19(2), 148. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.2.148>

Dempsey, J.L. and Cui, J.Y. (2016) “Long Non-Coding RNAs: A Novel Paradigm for toxicology,” *Toxicological Sciences*, 155(1), pp. 3–21. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw203>.

Dhanao, J.K. *et al.* (2018) “Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review,” *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0183-7>.

Dixon-Suen, S.C. *et al.* (2022) “Physical activity, sedentary time and breast cancer risk: a Mendelian randomisation study,” *British Journal of Sports Medicine*, 56(20), pp. 1157–1170. Available at: <https://doi.org/10.1136/bjsports-2021-105132>.

Dorling, L. *et al.* (2021) “Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women,” *The New England Journal of Medicine*, 384(5), pp. 428–439. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1913948>.

Dowsett, M. *et al.* (2010) “Prediction of Risk of Distant Recurrence Using the 21-Gene Recurrence Score in Node-Negative and Node-Positive Postmenopausal Patients With Breast Cancer Treated With Anastrozole or Tamoxifen: A TransATAC Study,” *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), pp. 1829–1834. Available at: <https://doi.org/10.1200/jco.2009.24.4798>.

Duffy, S.W., Vulkan, D., Cuckle, H., Parmar, D., Sheikh, S., Smith, R., Evans, A., Blyuss, O., Johns, L., Ellis, I.O., Sasieni, P., *et al.* (2020) “Annual mammographic screening to reduce breast cancer mortality in women from age 40 years: long-term follow-up of the UK Age RCT,” *Health Technology Assessment*, 24(55), pp. 1–24. Available at: <https://doi.org/10.3310/hta24550>.

Duffy, S.W., Vulkan, D., Cuckle, H., Parmar, D., Sheikh, S., Smith, R., Evans, A., Blyuss, O., Johns, L., Ellis, I.O., Myles, J., *et al.* (2020) “Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality (UK Age trial): final results of a randomised, controlled trial,” *Lancet Oncology*, 21(9), pp. 1165–1172. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(20\)30398-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(20)30398-3).

Ebrahimi, F., Gopalan, V., Wahab, R., Lu, C., Smith, R. A., & Lam, A. K. (2015). Deregulation of miR-126 expression in colorectal cancer pathogenesis and its clinical

significance. *Experimental Cell Research*, 339(2), 333–341.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.004>

Elston, C.W. and Ellis, I.O. (1991) “pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up,” *Histopathology*, 19(5), pp. 403–410. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>.

*ESMO Interactive Guidelines* (no date). Available at: [https://interactiveguidelines.esmo.org/esmo-web-app/gl\\_toc/index.php?GL\\_id=73](https://interactiveguidelines.esmo.org/esmo-web-app/gl_toc/index.php?GL_id=73).

Feng, Y. *et al.* (2018) “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis,” *Genes and Diseases*, 5(2), pp. 77–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

Feng, J., Zhang, J., Li, Y., Cheng, W., Liu, Y., Chen, Z., Duan, Y., Yu, T., Hu, A., Wang, T., Zhang, H., Li, M., Rong, Z., Ma, F., & Guo, B. (2023). Inhibition of lncRNA PCAT19 promotes breast cancer proliferation. *Cancer Medicine*. <https://doi.org/10.1002/cam4.5872>

Filippova, E. A., Fridman, M. V., Burdenny, A. M., Loginov, V. I., Pronina, I. V., Lukina, S. S., Dmitriev, A. A., & Braga, E. A. (2021). Long noncoding RNA GAS5 in breast cancer: Epigenetic mechanisms and biological functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6810. <https://doi.org/10.3390/ijms22136810>

Fox, S.B., Speirs, V. and Shaaban, A.M. (2021) “Male breast cancer: an update,” *Virchows Archiv*, 480(1), pp. 85–93. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03190-7>.

Freudenheim, J.L. (2020) “Alcohol’s Effects on Breast Cancer in Women,” *Alcohol Research*, 40(2). Available at: <https://doi.org/10.35946/arcr.v40.2.11>.

Fu, Z., Chen, C., Zhou, Q., Wang, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Li, W., Zheng, S., Ye, H., Wang, L., He, Z., Q, L., Li, Z., & Chen, R. (2017). LncRNA HOTTIP modulates cancer stem cell properties in human pancreatic cancer by regulating HOXA9. *Cancer Letters*, 410, 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.019>

G, D. *et al.* (2001) “Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution,” *European Journal of Cancer*, 37(5), pp. 591–596. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00435-4](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00435-4).

Galea, M.H. *et al.* (1992) “The Nottingham prognostic index in primary breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 22(3), pp. 207–219. Available at: <https://doi.org/10.1007/bf01840834>.

García, A.M.P. and Fernández, D.M. (2019) “Tomosíntesis de la mama: estado actual,” *Radiología*, 61(4), pp. 274–285. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rx.2019.01.002>.

Geddes, D.T. (2007) “Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research,” *Journal of Midwifery & Women’s Health*, 52(6), pp. 556–563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2007.05.004>.

Ghafouri-Fard, S., Dashti, S., & Taheri, M. (2020). The HOTTIP (HOXA transcript at the distal tip) lncRNA: Review of oncogenic roles in human. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110158. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110158>

Giannakeas, V., Lim, D.J. and Narod, S.A. (2021) “The risk of contralateral breast cancer: a SEER-based analysis,” *British Journal of Cancer*, 125(4), pp. 601–610. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01417-7>.

Giaquinto, A.N. *et al.* (2022) “Breast Cancer Statistics, 2022,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(6), pp. 524–541. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21754>.

Ginestier, C. *et al.* (2007) “ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome,” *Cell Stem Cell*, 1(5), pp. 555–567. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>.

Giuliano, A.E., Edge, S.B. and Hortobagyi, G.N. (2018) “Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer,” *Annals of Surgical Oncology*, 25(7), pp. 1783–1785. Available at: <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6486-6>.

Goldhirsch, A. *et al.* (2011) “Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011,” *Annals of Oncology*, 22(8), pp. 1736–1747. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.

Guo, R. *et al.* (2018) “Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review,” *Ultrasound in Medicine and Biology*, 44(1), pp. 37–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.09.012>.

Hamada, T. *et al.* (2019) “Family history of cancer, Ashkenazi Jewish ancestry, and pancreatic cancer risk,” *British Journal of Cancer*, 120(8), pp. 848–854. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0426-5>.

- Han, J., Jiang, Y., Zhang, C. H., Yang, Y., Pang, D., Song, Y., & Zhang, G. Q. (2017). A novel panel of serum miR-21/miR-155/miR-365 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 92(2), 55. <https://doi.org/10.4174/astr.2017.92.2.55>
- Han, S., Jin, X., Liu, Z., Xing, F., Han, Y., Yu, X., He, G., & Qiu, F. (2019). The long noncoding RNA HOTTIP promotes breast cancer cell migration, invasiveness, and epithelial–mesenchymal transition via the Wnt– $\beta$ -catenin signaling pathway. *Biochemistry and Cell Biology*, 97(5), 655–664. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0313>
- Hansen, J. (2017) “Night Shift Work and Risk of Breast Cancer,” *Current Environmental Health Reports*, 4(3), pp. 325–339. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0155-y>.
- Hassanzarei, S., Hashemi, M., Sattarifard, H., Bahari, G., & Ghavami, S. (2017). Genetic polymorphisms of HOTAIR gene are associated with the risk of breast cancer in a sample of southeast Iranian population. *Tumor Biology*, 39(10), 101042831772753. <https://doi.org/10.1177/1010428317727539>
- Hennighausen, L. *et al.* (1997) “Prolactin Signaling in Mammary Gland Development,” *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), pp. 7567–7569. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7567>.
- Hortobagyi, G.N., Edge, S.B. and Giuliano, A.E. (2018) “New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer,” *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (38), pp. 457–467. Available at: [https://doi.org/10.1200/edbk\\_201313](https://doi.org/10.1200/edbk_201313).
- Hou, Y., Peng, Y., & Li, Z. (2022). Update on prognostic and predictive biomarkers of breast cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 39(5), 322–332. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2022.06.015>
- Houghton, S.C. and Hankinson, S.E. (2021) “Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer,” *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 30(5), pp. 822–844. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-20-1193>.
- Howlader, N. *et al.* (2018) “Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States,” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 27(6), pp. 619–626. Available at: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-17-0627>.

Hu, C. *et al.* (2021) “A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer,” *The New England Journal of Medicine*, 384(5), pp. 440–451. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmoa2005936>.

Huber-Keener, K.J. (2022) “Cancer genetics and breast cancer,” *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 82, pp. 3–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2022.01.007>.

Hussen, B.M. *et al.* (2022) “Signaling pathways modulated by miRNAs in breast cancer angiogenesis and new therapeutics,” *Pathology Research and Practice*, 230, p. 153764. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153764>.

Ian, T.W.M., Tan, E.Y. and Chotai, N. (2021) “Role of mammogram and ultrasound imaging in predicting breast cancer subtypes in screening and symptomatic patients,” *World Journal of Clinical Oncology*, 12(9), pp. 808–822. Available at: <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i9.808>.

Ibarra, I., Erlich, Y., Muthuswamy, S. K., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells. *GENES & DEVELOPMENT*, 21(24), 3238–3243. <https://doi.org/10.1101/gad.1616307>

Inno, A. *et al.* (2015) “Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: Current Evidence and Future Perspectives,” *Oncologist*, 21(1), pp. 28–32. Available at: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0309>.

*Invasive Ductal Carcinoma (IDC): Grade, Symptoms & Diagnosis* (no date). Available at: <https://www.breastcancer.org/types/invasive-ductal-carcinoma>.

Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-05-1783>

Jansen, L.A., Backstein, R. and Brown, M.A. (2014) “Breast size and breast cancer: A systematic review,” *Journal of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 67(12), pp. 1615–1623. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2014.10.001>.

Jenkins, S.M. *et al.* (2021) “Rare Breast Cancer Subtypes,” *Current Oncology Reports*, 23(5). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01048-4>.

- Ji, W., Xie, S., Yang, J., Xiong, H., Jia, Y., Zhou, Y., Chen, Y., Ying, X., Chen, C., Ye, C., Wang, L., & Zhou, J. (2019). The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0747-0>
- Jin, X., Xu, X., Jiang, Y., Liu, Y., Sun, W., Guo, Y., Ren, Y., Zuo, W., Hu, X., Huang, S., Shen, H., Lan, F., He, Y., Hu, G. H., Di, G., He, X., Li, D. Q., Liu, S., & Yu, K. (2019). The endogenous retrovirus-derived long noncoding RNA TROJAN promotes triple-negative breast cancer progression via ZMYND8 degradation. *Science Advances*, 5(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat9820>
- Jones, M.P. *et al.* (2017) “Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort,” *Breast Cancer Research*, 19(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0908-4>.
- Kang, C. and LeRoith, D. (2018) “Diabetes, Obesity, and Breast Cancer,” *Endocrinology*, 159(11), pp. 3801–3812. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2018-00574>.
- Kashyap, D. *et al.* (2022a) “Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures,” *BioMed Research International*, 2022, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>.
- Kashyap, D. *et al.* (2022b) “Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures,” *BioMed Research International*, 2022, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/9605439>.
- Khan, M.S. *et al.* (2022) “An overview on Estrogen receptors signaling and its ligands in breast cancer,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 241, p. 114658. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114658>.
- Kim, J., Piao, H. L., Kim, B. J., Yao, F., Han, Z., Wang, Y., Xiao, Z., Siverly, A. N., Lawhon, S. E., Ton, B. N., Lee, H., Zhou, Z., Gan, B., Nakagawa, S., Ellis, M. J., Liang, H., Hung, M., You, M. J., Sun, Y., & Ma, L. (2018). Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nature Genetics*, 50(12), 1705–1715. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0252-3>
- Khorkova, O., Hsiao, J., & Wahlestedt, C. (2015). Basic biology and therapeutic implications of lncRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.012>

- Kobayashi, S. *et al.* (2012) “Reproductive history and breast cancer risk,” *Breast Cancer*, 19(4), pp. 302–308. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12282-012-0384-8>.
- Kothari, C., Diorio, C. and Durocher, F. (2020) “The Importance of Breast Adipose Tissue in Breast Cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), p. 5760. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms21165760>.
- Koual, M. *et al.* (2020) “Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance,” *Environmental Health*, 19(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00670-2>.
- Kumar, N. *et al.* (2015) “Prevalence of molecular subtypes of invasive breast cancer: A retrospective study,” *Medical Journal, Armed Forces India*, 71(3), pp. 254–258. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2015.04.006>.
- Landskroner-Eiger, S. *et al.* (2010) “Morphogenesis of the developing mammary gland: Stage-dependent impact of adipocytes,” *Developmental Biology*, 344(2), pp. 968–978. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.06.019>.
- Lee, K.-W. *et al.* (2019) “The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment,” *Current Oncology Reports*, 21(5). Available at: <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0787-1>.
- Lee, R., Feinbaum, R.L. and Ambros, V.R. (1993) “The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*,” *Cell*, 75(5), pp. 843–854. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).
- Li, F. (2019). Expression and correlation of miR-124 and miR-126 in breast cancer. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10184>
- Li, J. *et al.* (2015) “Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer,” *PubMed*, 8(7), pp. 8500–5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26339424>.
- Li, X., Liang, T., Chen, S., Wang, M., Wang, R., Li, K., Wang, J., Xu, C., Du, N., Qin, S., & Ren, H. (2019). Matrine suppression of self-renewal was dependent on regulation of LIN28A/Let-7 pathway in breast cancer stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(3), 2139–2149. <https://doi.org/10.1002/jcb.29396>
- Li, Z. *et al.* (2022) “The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer,” *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 16, pp. 305–314. Available at: <https://doi.org/10.2147/dddt.s336643>.



Li, Z., Jin, C., Chen, S., Zheng, Y., Huang, Y., Jia, L., Ge, W., & Zhou, Y. (2017). Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 433(1–2), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3015-z>

*Li-Fraumeni Syndrome* (2022). Available at: <https://www.cancer.net/cancer-types/li-fraumeni-syndrome>.

Liang, H., Yan, Y., Zhao, L., Liu, Y., Lv, X., Zhang, L., Zhao, Y., Zhao, H., He, M., & Wei, M. (2020). LncRNA HOTTIP facilitates the stemness of breast cancer via regulation of miR-148a-3p/WNT1 pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 6242–6252. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15261>

Liang, J., Chun, Y., Chen, K., Gao, Z., Lu, F., & Ke, W. (2023). Non-coding RNAs in breast cancer: with a focus on glucose metabolism reprogramming. *Discover Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1007/s12672-023-00687-2>

Lin, Y., Guo, W., Li, N., Fu, F., Lin, S., & Wang, C. (2017). Polymorphisms of long non-coding RNA HOTAIR with breast cancer susceptibility and clinical outcomes for a southeast Chinese Han population. *Oncotarget*, 9(3), 3677–3689. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23343>

Liu, S., Sun, Y., Hou, Y., Yang, L., Wan, X., Qin, Y., Liu, Y., Wang, R., Zhu, P., Teng, Y., & Liu, M. (2021). A novel lncRNA ROPM-mediated lipid metabolism governs breast cancer stem cell properties. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01194-z>

Liu, L. *et al.* (2021) “Correlation between family history and characteristics of breast cancer,” *Scientific Reports*, 11(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85899-8>.

Liu, M. *et al.* (2018) “Transcriptional profiles of different states of cancer stem cells in triple-negative breast cancer,” *Molecular Cancer*, 17(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0809-x>.

Liu, P.-H. *et al.* (2022) “Female breast cancer incidence predisposing risk factors identification using nationwide big data: a matched nested case-control study in Taiwan,” *BMC Cancer*, 22(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09913-6>.

Login (no date). Available at:  
[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast-screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast-screening.pdf).

Loibl, S. *et al.* (2021) “Breast cancer,” *The Lancet*, 397(10286), pp. 1750–1769. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32381-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32381-3).

Lopes, S.M. *et al.* (2022) “Prognostic Factors and Survival According to Tumor Subtype in Women With Breast Cancer Brain Metastases,” *Current Problems in Cancer*, 46(6), p. 100866. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2022.100866>.

Luan, T., Zhang, X., Wang, S., Song, Y., Zhou, S., Lin, J., An, W., Yuan, W., Yang, Y., Cai, H., Zhang, Q., & Wang, L. (2017). Long non-coding RNA MIAT promotes breast cancer progression and functions as ceRNA to regulate DUSP7 expression by sponging miR-155-5p. *Oncotarget*, 8(44), 76153–76164. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19190>

Luck, A.A. *et al.* (2008) “The Influence of Basal Phenotype on the Metastatic Pattern of Breast Cancer,” *Clinical Oncology*, 20(1), pp. 40–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.10.002>.

Ma, Y., Yu, L., Yan, W., Qiu, L., Zhang, J., & Jia, X. (2022). LNCRNA GAS5 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation by inhibiting DNA repair. *BioMed Research International*, 2022, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2022/1987519>

Macias, H. and Hinck, L. (2012) “Mammary gland development,” *Wiley Interdisciplinary Reviews-Developmental Biology*, 1(4), pp. 533–557. Available at: <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.

Mahmoud, S. *et al.* (2011) “Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer,” *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), pp. 1949–1955. Available at: <https://doi.org/10.1200/jco.2010.30.5037>.

McKeown, S.R. *et al.* (2015) “Radiotherapy for benign disease; assessing the risk of radiation-induced cancer following exposure to intermediate dose radiation,” *British Journal of Radiology*, 88(1056), p. 20150405. Available at: <https://doi.org/10.1259/bjr.20150405>.

Mishra, S., Yadav, T., & Rani, V. (2016). Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 98, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.003>

- Moo, T.-A. *et al.* (2018) “Overview of Breast Cancer Therapy,” *Pet Clinics*, 13(3), pp. 339–354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>.
- Moore, K.L., Dalley, A.F. and Agur, A.M.R. (2013) *Clinically Oriented Anatomy*. 7th edn. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mouabbi, J.A. *et al.* (2022a) “Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 193(2), pp. 253–264. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06572-w>.
- Mouabbi, J.A. *et al.* (2022b) “Invasive lobular carcinoma: an understudied emergent subtype of breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 193(2), pp. 253–264. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-022-06572-w>.
- Nagini, S. (2017) “Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players,” *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(2), pp. 152–163. Available at: <https://doi.org/10.2174/1871520616666160502122724>.
- Narod, S.A. *et al.* (2015) “Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ,” *JAMA Oncology*, 1(7), p. 888. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2510>.
- Narod, S.A. (2021) “Which Genes for Hereditary Breast Cancer?,” *The New England Journal of Medicine*, 384(5), pp. 471–473. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejme2035083>.
- Narod, S.A. and Sopik, V. (2022) “Countercurrents: DCIS or Cancer? Why All the Confusion?,” *Current Oncology*, 29(7), pp. 4936–4940. Available at: <https://doi.org/10.3390/curroncol29070392>.
- Nazari, S. and Mukherjee, P. (2018) “An overview of mammographic density and its association with breast cancer,” *Breast Cancer*, 25(3), pp. 259–267. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12282-018-0857-5>.
- NCCN Guidelines /Breast Cancer Screening and Diagnosis Version 1.* (2023).
- Nicolini, A., Ferrari, P. and Duffy, M. (2018) “Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future,” *Seminars in Cancer Biology*, 52, pp. 56–73. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.010>.

Nounu, A. *et al.* (2022) “Sex steroid hormones and risk of breast cancer: a two-sample Mendelian randomization study,” *Breast Cancer Research*, 24(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-022-01553-9>.

Ouzounova, M., Vuong, T., Ancey, P., Ferrand, M., Durand, G., Calvez-Kelm, F. L., Croce, C. M., Matar, C., Herceg, Z., & Hernandez-Vargas, H. (2013). MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-139>

P, F. *et al.* (2022) “Positive association between dietary exposure to polybrominated diphenyl ethers and breast cancer risk in the French E3N cohort: The role of vegetable oil consumption,” *Environment International*, 167, p. 107444. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107444>.

Pandya, S.V. and Moore, R.D. (2011) “Breast Development and Anatomy,” *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54(1), pp. 91–95. Available at: <https://doi.org/10.1097/grf.0b013e318207ffe9>.

Panni, S. *et al.* (2020) “Non-coding RNA regulatory networks,” *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(6), p. 194417. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>.

Park, H.A. *et al.* (2021) “Mendelian randomisation study of smoking exposure in relation to breast cancer risk,” *British Journal of Cancer*, 125(8), pp. 1135–1145. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01432-8>.

Patel, J. *et al.* (2016) “Non-coding RNA as mediators in microenvironment–breast cancer cell communication,” *Cancer Letters*, 380(1), pp. 289–295. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.016>.

Pavet, V. *et al.* (2010) “Towards novel paradigms for cancer therapy,” *Oncogene*, 30(1), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1038/onc.2010.460>.

Peinado, P., Herrera, A. M., Baliñas, C., Martin-Padron, J., Boyero, L., Cuadros, M., Coira, I. F., Rodriguez, M. I., Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., Lupiáñez, J. A., & Medina, P. (2018). Long Noncoding RNAs as Cancer Biomarkers. In *Cancer and Noncoding RNAs*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811022-5.00006-1>

Pellegrino, B. *et al.* (2021) “Luminal Breast Cancer: Risk of Recurrence and Tumor-Associated Immune Suppression,” *Molecular Diagnosis and Therapy*, 25(4), pp. 409–424. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40291-021-00525-7>.

- Peng, F., Shi, X., Yin, M., Dong, B., Xu, G., Hou, T., Shi, Y., & Liu, T. (2018). Long non-coding RNA HOTTIP is upregulated in renal cell carcinoma and regulates cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of LATS2. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *105*, 1133–1140. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.081>
- Perou, C.M. *et al.* (2000) “Molecular portraits of human breast tumours,” *Nature*, *406*(6797), pp. 747–752. Available at: <https://doi.org/10.1038/35021093>.
- Phung, M.T., Tin, S.T. and Elwood, J.M. (2019) “Prognostic models for breast cancer: a systematic review,” *BMC Cancer*, *19*(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5442-6>.
- Pizot, C. *et al.* (2016) “Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies,” *European Journal of Cancer*, *52*, pp. 138–154. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.10.063>.
- Prabhu, K.S. *et al.* (2020) “Non-Coding RNAs as regulators and markers for targeting of breast cancer and cancer stem cells,” *Cancers*, *12*(2), p. 351. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12020351>.
- Provenzano, E. (2021) “Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Moving Beyond Pathological Complete Response in the Molecular Age,” *Acta Medica Academica*, *50*(1), p. 88. Available at: <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.328>.
- Qiu, J., Guo, Y., Wang, S., Ren, Q., Zheng, D., Gao, M., Ma, J., Chen, S., & Liu, S. (2023). Newly identified lncRNA-45 promotes breast cancer metastasis through activating the mTOR signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *640*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.11.099>
- Quagliata, L., Matter, M. S., Piscuoglio, S., Arabi, L., Ruiz, C., Procino, A., Kovac, M., Moretti, F., Makowska, Z., Boldanova, T., Andersen, J. B., Hämmerle, M., Tornillo, L., Heim, M. H., Diederichs, S., Cillo, C., & Terracciano, L. (2014). Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology*, *59*(3), 911–923. <https://doi.org/10.1002/hep.26740>
- Radecka, B. and Litwiniuk, M. (2016) “Breast cancer in young women,” *Ginekologia Polska*, *87*(9), pp. 659–663. Available at: <https://doi.org/10.5603/gp.2016.0062>.

- Rakha, E.A. and Pareja, F. (2021) “New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology,” *Seminars in Cancer Biology*, 72, pp. 102–113. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.03.014>.
- Reed, A.B. *et al.* (2021) “Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype,” *Breast Cancer Research*, 23(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01384-6>.
- Rehnke, R.D. *et al.* (2018) “Anatomy of the Superficial Fascia System of the Breast,” *Plastic and Reconstructive Surgery*, 142(5), pp. 1135–1144. Available at: <https://doi.org/10.1097/prs.0000000000004948>.
- Rijnkels, M., Kabotyanski, E. B., Montazer-Torbati, M. B., Beauvais, C. H., Vassetzky, Y. S., Rosen, J. M., & Devinoy, E. (2010). The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(1), 85–100. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9170-4>
- Roth, M. J., & Moorehead, R. A. (2021). The miR-200 family in normal mammary gland development. *BMC Developmental Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12861-021-00243-7>
- Roulot, A. *et al.* (2016) “Tumoral heterogeneity of breast cancer,” *Annales De Biologie Clinique*, 74(6), pp. 653–660. Available at: <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1192>.
- Roush, S.F. and Slack, F.J. (2008) “The let-7 family of microRNAs,” *Trends in Cell Biology*, 18(10), pp. 505–516. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.07.007>.
- Rozenberg, S. *et al.* (2021) “Menopausal hormone therapy and breast cancer risk,” *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35(6), p. 101577. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101577>.
- Samadder, N.J. *et al.* (2019) “Hereditary Cancer Syndromes—A Primer on Diagnosis and Management,” *Mayo Clinic Proceedings*, 94(6), pp. 1084–1098. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.02.017>.
- Samuel, D. *et al.* (2005) “The transcriptional landscape of the mammalian genome,” *Science*, 309(5740), pp. 1559–1563. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1112014>.
- Sarhadi, V., & Armengol, G. (2022). Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*, 12(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/biom12081021>

Saw, P.E. *et al.* (2020) “Non-coding RNAs: the new central dogma of cancer biology,” *Science China-life Sciences*, 64(1), pp. 22–50. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1700-9>.

Schatzkin, A. *et al.* (1987) “Alcohol Consumption and Breast Cancer in the Epidemiologic Follow-up Study of the First National Health and Nutrition Examination Survey,” *The New England Journal of Medicine*, 316(19), pp. 1169–1173. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejm198705073161901>.

Secretan, B. *et al.* (2015) “Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group,” *The New England Journal of Medicine*, 372(24), pp. 2353–2358. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejmsr1504363>.

Sessa, C. *et al.* (2023) “Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline,” *Annals of Oncology*, 34(1), pp. 33–47. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.004>.

Shahbandi, A., Nguyen, H. and Jackson, J.S. (2020) “TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines,” *Trends in Cancer*, 6(2), pp. 98–110. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.007>.

Shang, A., Wang, W., Gu, C., Chen, C., Zeng, B., Yang, Y., Ji, P., Sun, J., Wu, J., Lu, W., Sun, Z., & Liu, D. (2019). Long non-coding RNA HOTTIP enhances IL-6 expression to potentiate immune escape of ovarian cancer cells by upregulating the expression of PD-L1 in neutrophils. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1394-6>

Shekhar, M. P., Tait, L., Pauley, R. J., Wu, G. S., Santner, S. J., Nangia-Makker, P., Shekhar, V., Nassar, H., Visscher, D. W., Heppner, G. H., & Miller, F. R. (2008). Comedo-Ductal carcinoma in situ: A paradoxical role for programmed cell death. *Cancer Biology & Therapy*, 7(11), 1774–1782. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.11.6781>

Shen, Y., Peng, X., & Shen, C. (2020). Identification and validation of immune-related lncRNA prognostic signature for breast cancer. *Genomics*, 112(3), 2640–2646. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.015>

Sheridan, C. *et al.* (2006) “CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis,” *Breast Cancer Research*, 8(5). Available at: <https://doi.org/10.1186/bcr1610>.

- Shi, S., Jiang, J., Sun, L., Zhang, W., & Zhuang, Z. (2020). Dynamic Regulative biomarker: Long Noncoding RNA (LNCrNA) in metastatic breast cancer. *Clinical Laboratory*. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2020.191140>
- Shoemaker, M.L. *et al.* (2018) “Differences in breast cancer incidence among young women aged 20–49 years by stage and tumor characteristics, age, race, and ethnicity, 2004–2013,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 169(3), pp. 595–606. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4699-9>.
- Silwal-Pandit, L., Langerød, A. and Børresen-Dale, A.L. (2016) “TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1), p. a026252. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026252>.
- Singh, D., Assaraf, Y. G., & Gacche, R. N. (2022). Long non-coding RNA mediated drug resistance in breast cancer. *Drug Resistance Updates*, 63, 100851. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2022.100851>
- Skandalakis, J.E. (2008) “Embryology and Anatomy of the Breast,” in *Springer eBooks*, pp. 3–24. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-78948-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-78948-2_1).
- Sokolova, A. and Lakhani, S.R. (2021) “Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates,” *Modern Pathology*, 34, pp. 8–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00689-3>.
- Stanton, S.E. and Disis, M.L. (2016) “Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer,” *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.
- Stone, J.P., Hartley, R.S. and Temple-Oberle, C. (2018) “Breast cancer in transgender patients: A systematic review. Part 2: Female to Male,” *Ejso*, 44(10), pp. 1463–1468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.06.021>.
- Straver, M.E. *et al.* (2009) “The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer,” *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(3), pp. 551–558. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0333-1>.
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in Hiv and Aids*, 5(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/coh.0b013e32833ed177>
- Sukumar, J.S. *et al.* (2021) “Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development,” *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(2), pp. 135–148. Available at: <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1840984>.



Sun, Y. *et al.* (2017) “Risk Factors and Preventions of Breast Cancer,” *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), pp. 1387–1397. Available at: <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>.

Sun, Y., Zeng, C., Gan, S., Li, H., Cheng, Y., Chen, D., Li, R., & Zhu, W. (2018). LNCRNA HOTTIP-Mediated HOXA11 expression promotes cell growth, migration and inhibits cell apoptosis in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 472. <https://doi.org/10.3390/ijms19020472>

Sung, H. *et al.* (2021) “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Tanaka, T., Haneda, S., Imakawa, K., Sakai, S., & Nagaoka, K. (2009a). A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation*, 77(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2008.10.001>

Tang, S., Zheng, K., Tang, Y., Li, Z., Zou, T., & Liu, D. (2019). Overexpression of serum exosomal HOTAIR is correlated with poor survival and poor response to chemotherapy in breast cancer patients. *Journal of Biosciences*, 44(2). <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9861-y>

Tirada, N. *et al.* (2018) “Breast Cancer Tissue Markers, Genomic Profiling, and Other Prognostic Factors: A Primer for Radiologists,” *Radiographics*, 38(7), pp. 1902–1920. Available at: <https://doi.org/10.1148/rg.2018180047>.

Trabert, B. *et al.* (2019) “Progesterone and breast cancer,” *Endocrine Reviews*, 41(2), pp. 320–344. Available at: <https://doi.org/10.1210/endrev/bnz001>.

Ursin, G. *et al.* (2005) “Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology,” *British Journal of Cancer*, 93(3), pp. 364–371. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602712>.

Valko-Rokytovská, M. *et al.* (2021) “Breast Cancer: Targeting of Steroid Hormones in Cancerogenesis and Diagnostics,” *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), p. 5878. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22115878>.

Varol, U. *et al.* (2018) “BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2.,” *PubMed*, 23(4), pp. 862–866. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30358186>.

- Venkatesh, J., Wasson, M. D., Brown, J. M., Fernando, W., & Marcato, P. (2021). LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack. *Cancer Letters*, 509, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.04.002>
- Vorherr, H. (1974) *The Breast: Morphology, Physiology, and Lactation*. Available at: <https://babordplus.u-bordeaux.fr/notice.php?q=id:2187133>.
- Waks, A.G. and Winer, E.P. (2019) “Breast Cancer Treatment,” *JAMA*, 321(3), p. 288. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
- Wallden, B. *et al.* (2015) “Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay,” *BMC Medical Genomics*, 8(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0129-6>.
- Wang, G. *et al.* (2021) “Prognostic significance of occult lymph node metastases in breast cancer: a meta-analysis,” *BMC Cancer*, 21(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08582-1>.
- Wang, K.K.W. and Chang, H.Y. (2011) “Molecular mechanisms of long noncoding RNAs,” *Molecular Cell*, 43(6), pp. 904–914. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>.
- Wang, K. C., Yang, Y. W., Liu, B., Sanyal, A., Corces, M. R., Chen, Y., Lajoie, B. R., Protacio, A., Flynn, R. A., Gupta, R. A., Wysocka, J., Lei, M., Dekker, J., Helms, J. A., & Chang, H. Y. (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature*, 472(7341), 120–124. <https://doi.org/10.1038/nature09819>
- Wang, S. S., Wuputra, K., Liu, C., Lin, Y. C., Chen, Y. T., Chai, C., Chen, L., Kuo, K. K., Tsai, M. H., Wang, S. W., Chen, K. K., Miyoshi, H., Nakamura, Y., Saito, S., Hanafusa, T., Wu, D. C., Lin, C., & Yokoyama, K. K. (2016). Oncogenic function of the homeobox A13-long noncoding RNA HOTTIP-insulin growth factor-binding protein 3 axis in human gastric cancer. *Oncotarget*, 7(24), 36049–36064. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9102>
- Wang, Y., Gong, G., Xu, J., Zhang, Y., Wu, S., & Wang, S. (2020). Long noncoding RNA HOTAIR promotes breast cancer development by targeting ZEB1 via sponging miR-601. *Cancer Cell International*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01410-9>

- Wang, Z., Yang, B., Zhang, M., Guo, W., Wu, Z., Wang, Y., Jia, L., Li, S., Xie, W., & Yang, D. (2018). lncRNA Epigenetic Landscape Analysis Identifies EPIC1 as an Oncogenic lncRNA that Interacts with MYC and Promotes Cell-Cycle Progression in Cancer. *Cancer Cell*, 33(4), 706-720.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.006>
- Wei, F., Chen, W. and Lin, X. (2021) “Night-shift work, breast cancer incidence, and all-cause mortality: an updated meta-analysis of prospective cohort studies,” *Sleep and Breathing*, 26(4), pp. 1509–1526. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11325-021-02523-9>.
- Weigelt, B., Geyer, F.C. and Reis-Filho, J.S. (2010) “Histological types of breast cancer: How special are they?,” *Molecular Oncology*, 4(3), pp. 192–208. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>.
- Weissenberger, C., Von Plehn, G., Otto, F., Barke, A., Momm, F., & Geissler, M. (2005). Adjuvant radiochemotherapy of stage II and III rectal adenocarcinoma: role of CEA and CA 19-9. *PubMed*, 25(3A), 1787–1793. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16033101>
- Wen, H.Y. and Brogi, E. (2018) “Lobular Carcinoma In Situ,” *Surgical Pathology Clinics*, 11(1), pp. 123–145. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>.
- Wilkinson, L.C. and Gathani, T. (2021) “Understanding breast cancer as a global health concern,” *British Journal of Radiology*, 95(1130). Available at: <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>.
- Willett, W.C. *et al.* (1987) “Moderate Alcohol Consumption and the Risk of Breast Cancer,” *The New England Journal of Medicine*, 316(19), pp. 1174–1180. Available at: <https://doi.org/10.1056/nejm198705073161902>.
- Wojciechowska, J. *et al.* (2016) “Diabetes and Cancer: a Review of Current Knowledge,” *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 124(05), pp. 263–275. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0042-100910>.
- World Health Organization: WHO (2021) “Breast cancer,” *www.who.int* [Preprint]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
- Xia, C., Yang, Y., Kong, F., Kong, Q., & Shan, C. (2018). MiR-143-3p inhibits the proliferation, cell migration and invasion of human breast cancer cells by modulating the expression of MAPK7. *Biochimie*, 147, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.01.003>

- Yan, H., & Bu, P. (2021). Non-coding RNA in cancer. *Essays in Biochemistry*, 65(4), 625–639. <https://doi.org/10.1042/ebc20200032>
- Yip, C.H. and Rhodes, A. (2014) “Estrogen and progesterone receptors in breast cancer,” *Future Oncology*, 10(14), pp. 2293–2301. Available at: <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>.
- Yu, B., You, W., Chen, G., Yu, Y., & Yang, Q. (2019). RETRACTED ARTICLE: MiR-140-5p inhibits cell proliferation and metastasis by regulating MUC1 via BCL2A1/MAPK pathway in triple negative breast cancer. *Cell Cycle*, 18(20), 2641–2650. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1653107>
- Zagorac, S., De Giorgio, A., Dabrowska, A., Kalisz, M., Casas-Vila, N., Cathcart, P., Yiu, A., Ottaviani, S., Degani, N., Lombardo, Y., Alistair, T., Nissan, T., Vance, K. W., Ulitsky, I., Stebbing, J., & Castellano, L. (2021). SCIRT LNCrRNA restrains tumorigenesis by opposing transcriptional programs of Tumor-Initiating cells. *Cancer Research*, 81(3), 580–593. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-2612>
- Zhang, M. *et al.* (2017) “Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis,” *Oncotarget*, 8(19), pp. 31347–31354. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15532>.
- Zhang, P. *et al.* (2019) “Non-Coding RNAs and their Integrated Networks,” *Journal of Integrative Bioinformatics*, 16(3). Available at: <https://doi.org/10.1515/jib-2019-0027>.
- Zhang, R., Tu, J. and Liu, S. (2022) “Novel molecular regulators of breast cancer stem cell plasticity and heterogeneity,” *Seminars in Cancer Biology*, 82, pp. 11–25. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.008>.
- Zhang, S., Yang, J., Xie, J., & Lc, Z. (2016). Long noncoding RNA HOTTIP contributes to the progression of prostate cancer by regulating HOXA13. *PubMed*, 62(3), 84–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27064878>
- Zhang, Y., Dong, X., Guo, X., Li, C., Fan, Y., Liu, P., Yuan, D., Ma, X., Wang, J., Zheng, J., Liu, H., & Gao, P. (2023). LncRNA-BC069792 suppresses tumor progression by targeting KCNQ4 in breast cancer. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01747-5>
- Zhang, X. (2022) “Molecular Classification of Breast Cancer: Relevance and Challenges,” *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 147(1), pp. 46–51. Available at: <https://doi.org/10.5858/arpa.2022-0070-ra>.

Zhang, Z., Fang, T. and Lv, Y. (2022) “Prognostic and clinicopathological value of Slug protein expression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis,” *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02825-6>.

Zhou, Q., Guo, J., Huang, W., Yu, X., Xu, C., & Long, X. (2020). Linc-ROR promotes the progression of breast cancer and decreases the sensitivity to rapamycin through miR-194-3p targeting MECP2. *Molecular Oncology*, 14(9), 2231–2250. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12700>

Zhou, T., Kang, L., Nie, J., Pan, B., He, B., Pan, Y., Sun, H., Xu, T., & Wang, S. (2021). LncRNA SPINT1-AS1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by sponging let-7 a/b/i-5p. *Pathology Research and Practice*, 217, 153268. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153268>

Zhou, W., Fong, M., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., Yu, Y., Chow, A., O’Connor, S. T. F., Chin, A. R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E. G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A. X., Li, Z., Gao, H., . . . Wang, S. E. (2014). Cancer-Secreted MIR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 25(4), 501–515. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.007>

Zong, Y., Zhang, Y., Hou, D., Xu, J., Cui, F., Qin, Y., & Sun, X. (2020). The lncRNA XIST promotes the progression of breast cancer by sponging miR-125b-5p to modulate NLRC5. *PubMed*, 12(7), 3501–3511. <https://pubme>

## Παράρτημα



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΗΘΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ

Αθήνα 7/12/2016

Αρ. Πρωτ.: 199

Καθηγήτρια Χρ. Λεμονίδου

Καθηγητής Ι. Μαντάς

Καθηγήτρια Δ. Παπαδάτου

Αναπλ. Καθηγητής Α. Σταματάκης

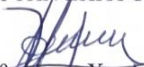
Αναπλ. Καθηγήτρια Μ. Μητροσύλη

**Θέμα:** Έγκριση πραγματοποίησης ερευνητικής μελέτης με θέμα «Διερεύνηση της πιθανής χρήσης κυκλοφορούντων μικρομοριακών (miRNAs) και μη κωδικών μορίων RNA (lncRNAs) ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού».

Η Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Νοσηλευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, εγκρίνει το συνημμένο ερευνητικό πρωτόκολλο για την πραγματοποίηση επιστημονικής έρευνας με θέμα «Διερεύνηση της πιθανής χρήσης κυκλοφορούντων μικρομοριακών (miRNAs) και μη κωδικών μορίων RNA (lncRNAs) ως προγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού» καθώς και η έρευνα δεν προσκρούει σε θέματα ηθικής και δεοντολογίας.

Η ως άνω αναφερόμενη μελέτη θα πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο διδακτορικής διατριβής του υποψηφίου διδάκτορα Ψαθά Ιωάννη, με Επιβλέποντα τον Αναπλ. Καθηγητή Ιωάννη Κακλαμάνο.

ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

  
Καθηγήτρια Χρ. Λεμονίδου

1<sup>η</sup> ΥΠε Αττικής  
ΓΟΝΚ «Οι Άγιοι Ανάργυροι»  
Καλυφτάκι, Ν.Κηφισιά 14564  
Τηλ. 2103501145

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Γ. ΜΠΟΝΑΤΣΟΣ

## ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΑΣΘΕΝΟΥΣ

Η υπογεγραμμένη ..... του  
..... **ΕΝΗΜΕΡΩΘΗΚΑ** λεπτομερώς από τους ιατρούς της  
Πανεπιστημιακής Χειρουργικής κλινικής για την κλινική έρευνα (Ερευνητικό  
Πρωτόκολλο στα πλαίσια διδακτορικής διατριβής του κ. Ιωάννη Ψαθά) που  
διενεργούν με θέμα «Διερεύνηση της χρήσης του κυκλοφορούντος μακρού μη  
κωδικού RNA (LncRNA) HOTTIP ως βιοδείκτη στον καρκίνο του μαστού» και  
**ΣΥΜΦΩΝΩ** να υποβληθώ σε απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος, όπως  
και όποτε αυτή απαιτείται σύμφωνα με τις οδηγίες των ιατρών.

Κηφισιά, .....

Ο Ιατρός

Η Ασθενής