

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ / ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Σ. ΔΕΛΙΔΗΣ

**ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΟΓΚΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ BCL-2 ΚΑΙ MDM2, ΤΗΣ
ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ P53, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ
ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ P21 ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΜΑΣΤΟΥ. ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ ΜΕ
ΤΗΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ, ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ
ΛΕΜΦΑΔΕΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΟΝ ΔΕΙΚΤΗ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ MIB-1.**

**ΕΛΠΙΔΑ Σ. ΓΙΑΝΝΙΚΑΚΗ-ΒΑΓΙΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ-ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000.

Στον Ευθυκλή,

Στον Ηλία και το Στέλιο,

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΓΙΑΝΝΙΚΑΚΗΣ - ΒΑΓΙΟΥ ΕΛΠΙΔΑΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Οικογενειακή κατάσταση : Έγγαμη, μητέρα 2 παιδιών
Εθνικότητα : Ελληνική
Ημερομηνία γέννησης : 9-12-1960
Τόπος γέννησης : Ρέθυμνο Κρήτης
Τόπος Διαμονής : Ηράκλειο Κρήτης

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ: 1978 : Απολυτήριο 1ου Λυκείου Ηρακλείου Κρήτης.
1984 : Πτυχίο Ιατρικής Πανεπιστήμιου Αθηνών.
1992 : Τίτλος Ειδικότητας στην Παθολογική Ανατομία.

ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ: 1. Νοέμβριος 1984 - Μάρτιος 1985: Άμισθη βοηθός στην Α' Παθολογική Κλινική Β.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου, Δ/τρια κ.Μόραλη.
2. Απρίλιος 1985 - Ιανουάριος 1987: Αγροτικός ιατρός στο Α.Ι. Αρχανών. Παράλληλα σύμβαση έργου με το ΙΚΑ.
3. Μάρτιος 1987 - Ιούνιος 1987: Ειδικευόμενη στην Β' Παθολογική Κλινική Β.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου, Δ/ντής Κος Αποστολάκης
4. Ιούλιος 1987 - Σεπτέμβριος 1988: Ειδικευόμενη στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Β.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου, Δ/τρια κα Παπαδοπούλου.
5. Οκτώβριος 1988 - Νοέμβριος 1989: Ειδικευόμενη στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Royal Free Hospital, Λονδίνο, Δ/ντής Prof. P.J.Scheuer. Το 1987 μου απενεμήθη ο τίτλος της Επίτιμου Λέκτορος (Honorary Lecturer).
6. Δεκέμβριος 1989 - Φεβρουάριος 1992: Ειδικευόμενη στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Γ.Π.Κ.Ν. Αθηνών, Δ/τρια Κα Ο. Αναστασιάδου.
7. Μαΐος 1992 - Αύγουστος 1993: Επιστημονικός Συνεργάτης στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Β.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου.

8. Σεπτέμβριος 1993 - Αύγουστος 1994: Επιστημονικός Συνεργάτης στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο ΠΕΠΑΓΝΗ
9. Σεπτέμβριος 1992 - Αύγουστος 1996: Καθηγήτρια στην ΣΕΥΠ ΤΕΙ Ηρακλείου στο μάθημα της Ιστοπαθολογίας.
10. Σεπτέμβριος 1994 - Ιούλιος 1996:
 - Επί συβάσει Νόμου 407 με την Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, στο μάθημα της Παθολογοανατομίας.
 - Συνεργασία με το παθολογοανατομικό εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν. Ηρακλείου.
 - Διατήρηση ιδιωτικού ιατρείου.
11. Αύγουστος 1996 έως σήμερα: Επιμελήτρια Β' στο Παθολογο-ανατομικό εργαστήριο του Βενιζέλιου και Πανάνειου Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

ΕΙΔ. ΕΜΠΕΙΡΙΑ – ΕΞΑΣΚΗΣΗ:

1. Καθημερινή συμμετοχή σε διάγνωση ηπατικών βιοψιών στο Royal Free Hospital London U.K. υπό του καθηγητού P.J. Scheuer, διακεκριμένου παθολογοανατόμου - ηπατολόγου.
2. Παρακολούθηση ειδικού εβδομαδιαίου σεμιναρίου για παθήσεις μαστού υπό του καθ. J. Azzopardi, Νοσοκομείο Hammersmith.
3. Παρακολούθηση ειδικού εβδομαδιαίου σεμιναρίου για δερματοπάθειες στο Νοσοκομείο Hammersmith.
4. Επισκέπτης στο Τμήμα μαστού στο Guy's Hospital London UK υπό την Dr. R. Millis (μελέτη αρχείου και παρακολούθηση καθημερινής εργασίας) επί 15θήμερον.
5. Επισκέπτης στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Νοσοκομείου Hammersmith Hospital υπό του Dr. T. Kraus (μελέτη αρχείου γυναικολογικού υλικού και μαλακών μορίων) επί 3ήμερον.
6. Επισκέπτης στο Παθολογοανατομικό Τμήμα St Bartholomieu υπό του Dr Lowe (μελέτη αρχείου

γυναικολογικού υλικού).

ΜΕΛΟΣ ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ:

1. 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής
Ηράκλειο, Απρίλιος 1994.
2. Summer Histopathology Course in thyroid and GJ Pathology
Ηράκλειο, Ιούνιος 1994.

ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΣΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΑ ΤΡΑΠΕΖΙΑ:

1. Ιστοπαθολογία της μόλυνσης - λοίμωξης από HPV. « HPV και ΤΡΑΧΗΛΟΣ ΜΗΤΡΑΣ», πρόεδρος Ε. Σταθόπουλος 1ο Αττικό Συμπόσιο Ε.Ι.Π.Σ.Ν., Ιανουάριος 1992.
2. Διάλεξη με τίτλο <<Πρώτη γνωριμία με την Παθολογική Ανατομία>> διοργάνωση <<Ροταριανός Όμιλος Ηρακλείου>>, Ιούλιος 1994.
3. << Ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των παθήσεων του μαστού>>: Σεμινάριο για Διαγνωστική Προσέγγιση των Παθήσεων του Μαστού, συντονιστής καθ. Κος Δ. Τσιφτσής, στα πλαίσια μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Ακτινολογίας, Ηράκλειο, Ιανουάριος 1997.
4. <<Ορια αξιοπιστίας της μαστογραφίας και ιστοπαθολογίας στον καρκίνο του Μαστού>> Ομιλία στα πλαίσια μετεκπαιδευτικών μαθημάτων Ακτινολογίας ΠΕΠΑΓΝΗ, Μάρτιος 1998.

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ:

1. Συμμετοχή σε εκπαίδευση φοιτητών Ιατρικής στο Αγροτικό Ιατρείο Αρχανών (1985-1987).
2. Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής του Royal Free Hospital, Λονδίνο, στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας, επί ένα έτος (1988) όπου είχα τον τίτλο «Honorary Lecturer».

3. Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου, στο μάθημα Παθολογικής Ανατομικής, από Σεπτέμβριο 1994 μέχρι σήμερα, με ειδική σύμβαση του Ν. 407.
4. Έκτακτη καθηγήτρια Τ.Ε.Ι. Σ.Ε.Υ.Π. Ηρακλείου από Σεπτέμβριο 1993 έως το 1996, στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας.
5. Εκπαίδευση νοσηλευτικού προσωπικού στο Β.Π.Γ.Ν.Η. στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομικής από το 1992 έως σήμερα.
6. Εκπαίδευση νοσηλευτικού προσωπικού στο ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η. στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας, έτος 1995.
7. Συμμετοχή στην εκπαίδευση ειδικευομένων Ιατρών στην Παθολογική Ανατομική στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Β.Γ.Π.Ν.Η. (1996-σήμερα).

ΜΕΛΟΣ ΕΤΑΙΡΕΙΩΝ:

1. Ελληνική Παθολογοανατομική Εταιρεία
2. International Society of Pathology
3. Ιατρική Εταιρεία Ηρακλείου Κρήτης.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

1. Αγγλική
2. Γαλλική

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ:

1. <<Υπερηχογράφημα και χολοκυστοπάθεια. Αναδρομή σε 104 χειρουργημένες περιπτώσεις - Διαγνωστικά προβλήματα και επιπλοκές>>.Ε. Βαγιός, Γ. Περπυράκης, Σ. Μεγρέμης, Α. Βολουδάκη, *Ε. Γιαννικάκη*, Α. Ανδριανάκη. Πρακτικά Συνεδριάσεων 4ου Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου, τόμος Β', 1987.
2. <<Αγγειομολίπωμα νεφρού>>. Ε. Ζώης, Ν. Χρονιάρης, *Ε. Γιαννικάκη*, Α. Παπαδοπούλου. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής, τόμος 2: 47-49, 1988.
3. <<Ο πρωτοπαθής καρκίνος της χοληδόχου κύστεως>> Α. Παπαδοπούλου, Ν. Χρονιάρης, Ε. Ζώης, *Ε. Γιαννικάκη*, Μ. Τζαρδή κ. α. Πρακτικά Συνεδριάσεων 4ου Παγκρήτιου Ιατρικού Συνεδρίου, τόμος Β', 1987.
4. <<Ενδωλικό εκκόλπωμα δωδεκαδάκτυλου>>. Α. Νταιλιάνας, *Ε. Γιαννικάκη*, Χ.

- Σπηλιάδης, Ζ. Μανίκα. Γαστρεντερολογικά Χρονικά 1994, 3 (4)32 - 34.
5. <<Νόσος Αδαμαντιάδη - Behcet με προσβολή παχέος εντέρου >> .Παρασκευά Κ., Γιαννικάκη Ε., Σπηλιάδης Χ. κ.α. Γαστρεντερολογικά Χρονικά 1995,4 (1) 52-54.
 6. <<Ιστοχημική και ανοσοϊστοχημική διερεύνηση εντερικής μεταπλασίας και επιθηλιακής δυσπλασίας του γαστρικού βλεννογόνου σε καλοήγη έλκη και ελκωτικά καρκινώματα>>. Σπηλιάδη Χ. - Σπηλιάδης Χ. - Πετράκη Κ., Γιαννικάκη Ε, κ.λ.π. Γαστρεντερολογικά Χρονικά 1995, 4 (1) 30- 42.
 7. <<Expression of p53 and mdm-2 proteins in Hodgkin's Disease. Absence of correlation with the presence of Epstein-Barr virus.>>Tzardi M, Kouvidou C, Panayiotides I, Koutsoumbi K, Stefanaki K, Giannikaki E, Darivianaki K. Zois E, Delides G, Rondogiarini D, Kanavaros P. Anticancer Res. 1996 Sept-Oct 16:5A 28 13-9.
 8. <<Primary angiosarcoma of the breast>. Cbristodoulakis M., Gontikakis E., Giannikaki E., Gaki V., Tsiftsis D.Eur J Surg Oncol 1998 Feb 24:1 76-8.
 9. <<p53 Protein Expression in Breast Carcinomas. Comparative Study with the Wild Type p53 Induced Proteins mdm2 and p21/waf1. >> E. Giannikaki, C.Kouvidou, M.Tzardi, K. Stefanaki, K. Koutsoumbi, M. Gregoriou, E. Zois, G. Delidis, V.Georgoulas, P. Kanavaros. Anticancer Research.17;2123-2128, 1997.
 10. <<Proliferative patterns of rectal mucosa as predictors of advanced colonic neoplasms in routinely processed rectal biopsies.>> Paspatis G., Zizi A., Clouverakis G., Giannikaki E., Vasilaraki T., Elemenoglou I., Karamanolis D. The American Journal of Gastroenterology, vol. 93, No 9,1998.
 11. <<Συμπτωματικό μυελολίπωμα επινεφριδίου. Διαγνωστική προσπέλαση και θεραπεία.>> Γωνιανάκης Κ., Σλήμαν Μ., Σαμαριτάκης Ι., Φραγκιαδάκη Ε., Γραμματόπουλος Ο., Γιαννικάκη Ε., Πετρίδης Γ.
 12. <<Ομαλός λειχήνας στοματικού βλεννογόνου.Διαφοροδιαγνωστικές σκέψεις-Θεραπεία.>> Κυρμιζάκης Δ., Σημαντιράκης Χ., Μανωλαράκης Γ., Φουντουλάκης Ε., Γιαννικάκη Ε., Αμανάκης Ζ. ΙΑΤΡΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΚΑ, 10, 449-52, Οκτώβριος 1998.
 13. <<Ascites associated with the initial presentation of Crohn's disease.>> Paspatis G., Kissamitaki V., Kyriakakis E, Aretoulaki D, Giannikaki E, Kokkinaki M, Kabbalo T, Xroniaris N. Am J Gastroenterology 1999 Jul;94(7): 1974-6.
 14. <<Συγγενής κυστική διάταση του χοληδόχου πόρου.>> Κ. Γωνιανάκης, Ε. Φραγκιαδάκη, Γ. Καραγιάννη, Ι. Σαμαριτάκη, Ε. Παπουτσοπούλου, Ε. Γιαννικάκη, Γ. Πετρίδης. Ιατρική παιδεία τόμος 7^{ος}.
 15. <<Resistance to activated protein C (APC)in patients with colorectal cancer>>. G. Paspatis, A

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ:

1. <<Υπερηχοτομογράφημα και Χολοκυστοπάθεια>>. Αναδρομή σε 104 χειρουργημένες περιπτώσεις. Διαγνωστικά προβλήματα και προοπτικές>>.Ε. Βαγιός, Γ. Περπυράκης, Σ. Μεγρέμης, Α. Βολουδάκη, *E. Γιαννικάκη*, Α. Σαββάκη. 4ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1987, Ρέθυμνο.
2. <<Πρωτοπαθής καρκίνος χοληδόχου κύστεως.>> Παπαδοπούλου Α., Χρονιάρης Ν., Ζώης Ε., *Γιαννικάκη Ε.*, Κανδηλάκης Σ., Απαλάκης Α. 4ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1987, Ρέθυμνο.
3. <<Αγγειομολίπωμα νεφρού.>> Ζώης Ε., Χρονιάρης Ν., *Γιαννικάκη Ε.* 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Δεκέμβριος 1987, Χαλκίδα.
4. <<Η συμβολή της Triplex Υ/Γ στην διάγνωση του καρκίνου του μαστού>>. Ε. Βαγιός, *E. Γιαννικάκη*, Ε. Γιαννάκος 17ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1991, Αθήνα.
5. <<Ενδοσκοπικά και ιστολογικά ευρήματα από το παχύ έντερο σε ασθενείς με κίρρωση και πυλαία υπέρταση.>> Κ. Καστανάς, Χ. Σπηλιάδης, *E. Γιαννικάκη*, Β. Ντελής, Ζ. Μανίκα, Ν. Σκανδάλης. 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Οκτώβριος 1991, Αθήνα.
6. <<Πρωτόκολλο ιστολογικής εξέτασεως λεμφαδενικού καθαρισμού επί ασθενών με πρωτοπαθές μελάνωμα δέρματος>> Κ. Φραγκιά, Α. Σταυρίδου, *E. Γιαννικάκη*, Γ. Κουλέρμου, Ι. Ιωάννιβιτς. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Νοέμβριος 1991, Θεσ/νικη.
7. <<Σπάνια περίπτωση μεταστάσεως αδενοκαρκινώματος ορθού σε θυρεοειδή αδένα>>.Ε.Μιχαηλάκης, Σ. Δενδρινος , *E. Γιαννικάκη*, Θ. Τσιλάλης . Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Μάρτιος 1992, Αθήνα.
8. <<Η συμβολή της υπερηχοτομογραφίας στην διάγνωση του συνδρόμου του παχυσμένου δέρματος του μαστού>>. *E. Γιαννικάκη*, , Ε. Βαγιός , Ι.Μανούσακας , Γ. Πατεδάκης. 6ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο, Νοέμβριος 1992.
9. <<Μαστογραφία και έγχρωμο Doppler Υ/Γ σε μαστικές μάζες >>.Ε. Βαγιός, Ρ.Αγγελάτου, Ε. Μπαμή, Κ. Ηλιόπουλος, *E. Γιαννικάκη*. International Congress of Senology, Μάιος 1992, Ρόδος.
10. <<Immunohistochemical estimation of estrogen and progesterone receptors of breast carcinomas in frozen and short fixed paraffin embedded tissue by image-analysis: correlation

- with the biochemical method>>. Κόντζογλου Κ., Καπράνος Ν., *Γιαννικάκη Ε.*, Δημητρακοπούλου Α, Κοντογεώργος Γ. - Γκόγκας Γ. 8ο International Congress of Senology, Rio de Janeiro, May, 1994.
11. <<Κυστικό ύγκωμα μαστού>> Ε. Παπαλιώδη, Π. Γιάννου, Ι. Γκόγκας, *Ε. Γιαννικάκη*, Γ. Κοντογεώργος. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομίας, Ηράκλειο, Απρίλιος 1994.
 12. << Εκτίμηση οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων σε καρκινώματα μαστού με σύστημα αναλυτού εικόνας>>. Δημητρακοπούλου Α., Καπράνος Ν, *Γιαννικάκη Ε*, Κοντογεωργός Γ. κ.α 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομίας, Ηράκλειο, Απρίλιος 1994.
 13. << Evaluation of the clarithromycin in the eradication of HP>>Ch Spiliadis ,S Gergoroylos ,P Stambolos, A. Mentis, *E. Giannikaki* et. Digestive Disease Week, May 1995, San Diego.
 14. <<Λειομυοσάρκωμα Λάρυγγος>>. *Ε. Γιαννικάκη*, Ζ.Μανίκα, Ε.Ζώης, Ζ. Παππά. 4ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο, Νοέμβριος 1994.
 15. <<Αμαρτώματα μαστού : ένας ασυνήθης καλοήθης όγκος. Παρουσίαση (14) περιπτώσεων από παθολογοανατομικής κυρίως σκοπιάς και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. >> *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Ζώης, Μ. Τζαρδή, Α. Μπουσιώτου, Ε. Βαγιός. 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο, Νοέμβριος 1994.
 16. <<Λιπώδεις μαστοί : υπερηχοτομογραφική προσέγγιση>>. Ε. Βαγιός, *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Ζώης κ.α 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ρέθυμνο, Νοέμβριος 1994.
 17. <<Ογκοι μαλακών μοριών : Αξιολόγηση και διαφορική διάγνωση με υπερηχοτομογραφία.>> Ε.Βαγιός, *Ε. Γιαννικακη*, Ι. Μανούσακας κ.α. 20ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα. Μάιος 1994.
 18. <<Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα θύμου>>*Ε. Γιαννικάκη*, Κ. Στεφανάκη, Μ. Τζαρδή, Ι. Δροσίτης , Ε Ζώης. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα, Μάιος 1996
 19. <<Ογκοι ωοθήκης από γεννητικά κύτταρα. Παρουσίαση δύο περιπτώσεων>> Κ. Στεφανάκη, Μ. Τζαρδή, Μ. Γρηγορίου, *Ε. Γιαννικάκη*, Σ.Μπολιώτου, Π. Καναβάρος , Γ.Δελίδης. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα, Μάιος 1996
 20. <<Εκφραση των πρωτεϊνών p53, p21 και mdm-2 σε λεμφαδενικά μη Hodgging λεμφώματα>> Μ. Τζαρδή, Χ. Κουβίδου ,Ι. Παναγιωτίδης , Κ. Δαριβιανάκη, Γ. Δατσέρης, Κ. Στεφανάκη, *Ε. Γιαννικάκη*, Κ. Κουτσομπή, κ.α. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα, Μάιος 1996.

21. << Proliferative patterns of rectal mucosa as predictors of advanced colonic neoplasms in routinely processed rectal biopsies.>> Paspatis G., Zizi A., Chlouverakis G. ,*Giannikaki E.*, Vasilaraki T., Elemenoglou I., Karamanolis D. Diamond Jubilee Meeting , B. S. G, Brighton., March 1997.
22. <<Immunohistochemical localisation of interleukin-6 in normal human pancreatic islet cells>>. Tsagarakis G, Kontogeorgos G, Kirodimou E, Pateraki M, *Giannikaki E.*, Thalassinos N.9th Balkan Congress of Endocrinology and Metabolism, Thess,May 1997.
23. <<Αξιολόγηση ανίχνευσης των ορμονικών υποδοχέων σε καρκινώματα του μαστού με ανοσοϊστοχημική μέθοδο και σε σχέση με τον βιοχημικό προσδιορισμό τους>> *E. Γιαννικάκη*, Α. Δημητρακοπούλου, Ν. Χρονιάρης, Χ.Μαυρουδή, Ε. Ζώης , Γ. Κοντογεώργος. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτη, Νοέμβριος 1998.
24. <<Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και των επαγομένων από το φυσικό τύπο του p53 πρωτεϊνών mdm-2 p21/waf1 σε καρκινώματα μαστού.>> *E Γιαννικάκη*, Χ. Μαυρουδή, Κ.Στεφανάκη, Μ. Γρηγορίου, Ν. Χρονιάρης , Ε. Ζώης , Μ. Τζαρδή, Γ. Δελίδης, Β. Γεωργούλιας. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτη, Νοέμβριος 1998.
25. <<Πνευμονικός άνθραξ σε κτηνοτρόφο>> Ν. Χρονιάρης , *E Γιαννικάκη*, Γ. Λυρώνης ,Ε. Ζώης. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτη, Νοέμβριος 1998.
26. <<Μυκητιασική Παραρρινοκολπίτις.>> Ν. Χρονιάρης , *E Γιαννικάκη*, Μ. Καφούση, Α. Παπαδοπούλου.9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτη, Νοέμβριος 1998.
27. << Ενδοαγγειακό λέμφωμα. Περιγραφή μιας περίπτωσης.>> Ν. Χρονιάρης , *E Γιαννικάκη*, Χ. Ματσούκα , Ε. Ζώης , Α. Παπαδοπούλου. 9ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.
28. <<Φυλλοειδείς όγκοι μαστού. Ανοσοϊστοχημική μελέτη>> *E. Γιαννικάκη*, Κ. Στεφανάκη, Ν. Χρονιάρης , Μ. Τζαρδή ,Ε. Ζώης .6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.
29. <<Η εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε βιοψίες ορθού ασθενών με ελκώδη κολίτιδα ως συμπληρωματική μέθοδος εκτίμησης της ενεργότητας της νόσου>>. Πασπάτης Γ., *Γιαννικάκη Ε.*, Ζήζης Δ., Λυδατάκη Ν, Ζώης Ε , Χρονιάρης Ν , Κυριακάκης Ε. 18ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολο-γίας, Αθήνα, Νοέμβριος 1998.
30. <<Ογκοκύττωμα παρωτίδας. Αναφορά σε μια περίπτωση. >> Ι. Λογοθέτης , Γ.Μαστοράκης , Ε. Παραβάλου, *E. Γιαννικάκη*, Ε. Ζώης. 13ο Πανελλήνιο Συνέδριο Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής. Αθήνα , Νοέμβριος 1999.
31. <<Δερμοειδής κύστη οφθαλμικού κόγχου – Χειρουργική προσπέλαση.>> Ε. Μαγκατσέλα,

- Μ. Μελισουργάκη, Χ. Φανουργιάκης, Π. Ιερομονάχου, *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Ζώης. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000, Ρέθυμνο.
32. << Διαγνωστική και προγνωστική αξία του CEA στο μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς.>> Κ. Ζιαμπάρας, Ε. Κληρονόμος, Α. Χανιωτάκη, *Ε. Γιαννικάκη*, Σ. Κατσανέβα, Κ. Πατρονίδου. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000, Ρέθυμνο.
33. <<Κύστη θυρεογλωσσικού πόρου σε ενήλικες. Αναφορά 12 περιπτώσεων.>> Σκουλάς Ι., Σημαντηράκης Χ., Στρατουδάκη Ρ., Μανωλαράκης Γ., Βρέντζος Ε., Σταυριανάκη Α., Γιαννικάκη Ε., Καρακώστας Ε., Αμανάκης Ζ. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000, Ρέθυμνο.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ POSTERS:

1. << Η αξιολόγηση δια λεπτής βελόνης υπό CT έλεγχο κυτταρολογικής εξέτασεως αλλοιώσεων, που αφορούν ή περιπλέκουν το σκελετικό σύστημα>>.Ε. Γιαννίκος, Ε. Βαγιός, *Ε. Γιαννικάκη*. 17ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1991 -Αθήνα.
2. <<Αδενοκαρκίνωμα επί εκτροφής κύστεως σε έδαφος υπολειμμάτων ουραχού και αδενοειδούς -κυστικής κυστίτιδας>>.Ε. Παπαλιώδη, *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Χορευτάκη, Α. Δημητρακοπούλου, Α. Θανός. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας - Νοέμβριος 1999. Θεσ/νίκη.
3. << Εστιακή άτυπη ξανθοκοκκιωματώδης χολοκυστίτιδα υποδύομηνη νεοπλασματική εξεργασία.>> Σ. Μεγρέμης, Μ. Κοκκινάκη, *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Ψαράκης, Σ. Δαβίδ, κ.α. 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Ηράκλειο Κρήτη, Νοέμβριος 1998.
4. << Μικτό (μυελοειδές- θηλώδες) καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένος>> *Ε. Γιαννικάκη*, Κ. Στεφανάκη. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.
5. <<Πασσαλοειδούς διαμορφώσεως μυοϊνοβλάστωμα λεμφαδένων>> Ε. Ζώης, Μ. Τζαρδή, Κ. Κουτσουμπή, Ν. Χρονιάρης, *Ε. Γιαννικάκη*, Μ. Παππά, Π. Καναβάρος. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.
6. <<Μελέτη πλασματοκυτταρικού πληθυσμού βιοψιών παχέως εντέρου για δ.δ. κολίτιδων.>> *Ε. Γιαννικάκη*, Ε. Ζώης, Ν. Χρονιάρης, Μ. Τζαρδή, Γ. Πασπάτης, Α. Ρ. Dhillon 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.
7. <<Κυστικές αλλοιώσεις σπληνός.>> *Ε. Γιαννικάκη*, Ν. Χρονιάρης, Ε. Ζώης, Ε. Βαγιός, Α. Παπαδοπούλου. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αλεξανδρούπολη, Μάιος 1998.

8. <<Τ-λέμφωμα υποδορίου του τύπου της υποδερματίτιδας. Περιγραφή δυο περιπτώσεων>>. Ροντογιάννη Δ., Καρμίρης Θ, Γιαννικάκη Ε, Κιτσαντά Π, Ευθυμιάδου Α, Μάστορης Κ, Χατζηβασίλη Α, Καναβάρος Π. 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Αθήνα 2000.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ-ΕΙΔΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΩΝ:

1. Μετεκπαιδευτικά μαθήματα στον Σακχ. Διαβήτη. 15ήμερο, Νοέμβριος 1986, Αθήνα.
2. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο στο Μεσοθελίωμα - J.S.P. Jones - Δεκέμβριος 1987, Χαλκίδα.
3. Course στην διαγνωστική ιστοπαθολογία και κυτταρολογία των παθήσεων του μαστού. J. Azzopardi, 50ήμερο, Hammersmith, Λονδίνο, Φεβρουάριος 1989.
4. Course in diagnostic Pathology. 15ήμερο. Sheffield, Ιούλιος 1989.
5. Κακόηθες Μελάνωμα, Νοσ. Μεταξά, Αθήνα, 1ήμερο, Φεβρουάριος 1990.
6. Σεμινάριο Ελληνικής Εταιρείας Γενικής Παθολογικής Ανατομικής στη Μορφομετρία, 1ήμερο, Φεβρουάριος 1990, Αθήνα.
7. Σεμινάριο της International Academy of Pathology με θέμα «Βιοψία μυελού των οστών» 2ήμερο, Δεκέμβριος 1990, Αθήνα.
- Σεμινάρια Ελληνικής Εταιρείας Παθολογικής Ανατομικής με θέματα:
8. Σύγχρονη προσέγγιση στην μορφολογική ταξινόμηση και διάγνωση όγκου και ογκοειδών εξεργασιών του ήπατος- 1ήμερο, Μάρτιος 1991, Αθήνα.
9. Slide Seminar στο μελάνωμα και σε σχετικές επεξεργασίες. 1ήμερο. Μάρτιος 1991, Αθήνα.
10. Καρκίνωμα πνεύμονος, σύγχρονες απόψεις παθογένειας – Διαφορική Διάγνωση. 1ήμερο - Νοέμβριος 1991, Αθήνα.
11. Slide Seminar και στρογγυλή τράπεζα στους όγκους του γυναικολογικού συστήματος. 1ήμερο, Δεκέμβριος 1991, Αθήνα.
12. Slide Seminar και ομιλία για τις παθήσεις των αρθρώσεων. 3ήμερο- Μάρτιος 1992. Αθήνα.
13. Ιστοπαθολογία Ενδοκρινών Αδένων (πλην Θυροειδούς), μετεκπαιδευτικό σεμινάριο. Φεβρουάριος 1996, Αθήνα.
14. <<Κοκκιώματα και Νεοπλάσματα του ήπατος>> Γ. Τηνιακός, 2ήμερο. Ιούνιος 1990, Ηράκλειο.
15. <<Υπερπλασία ενδομητρίου>> Pr. Fox. Αθήνα, 1ήμερο. Σεπτέμβριος 1992, Αθήνα.
16. <<Ιατρική Φωτογραφία>> BEMMO 2μηνο, Νοέμβριος - Δεκέμβριος 1992, Ηράκλειο.
17. <<Οργάνωση και διαχείριση πληροφοριακών συστημάτων με ιδιαίτερη έμφαση στην

- αξιοποίηση των Τραπεζών Πληροφοριών του Εξωτερικού>>, Ινστιτούτο Υπολογιστών Μαθηματικών, 3ήμερο, Ηράκλειο, Οκτώβριος – Δεκέμβριος 1992.
18. Slide seminar in Lymph Node Pathology, by B.N.Nathwani, Ηράκλειο, Απρίλιος 1994.
19. Course in Diagnostic Dermatopathology. Royal postgraduate Medical School Hammersmith, εβδομαδιαίο, Λονδίνο, Νοέμβριος 1994.
20. Summer Histopathology course in Thyroid and Gastrointestinal pathology. εβδομαδιαίο, Ηράκλειο, Ιούνιος 1995.
21. Χρόνια Γαστρίτιδα, επιστημονική ημερίδα, Αθήνα - Νοέμβριος 1995.
22. 6ο Πανελλήνιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας. Ηράκλειο, Ιανουάριος 1996.
23. Κρήτη: Πρότυπη Περιφέρεια Εφαρμογών Τηλεματικής στην Υγεία. I.T.E. Ηράκλειο, Νοέμβριος 1997.
24. Δέκα Μαθήματα Ανοσολογίας, Παθολογικός Τομέας Β.Π.Γ.Ν.Ηρακλείου, Ανοιξη 1999.
25. Δημερίδα Παθολογοανατομικής Εταιρείας με θέμα: «Μελαγχρωστικές Αλλοιώσεις Δέρματος», Αθήνα, Φεβρουάριος 2000.
26. Επιμορφωτικό Σεμινάριο I.T.E.: Εισαγωγή στην πληροφορική-MS WINDOWS 98 και Επεξεργασία κειμένου MS WORD 97, από 4-1-2000 έως 8-2-2000. Ηράκλειο.
27. Επιμορφωτικό Σεμινάριο I.T.E.: Διαχείριση λογιστικών φύλλων MS EXCEL 97 και INTERNET Tools, από 16-3-2000 έως 18-4-2000, Ηράκλειο.
28. Προσυνεδριακό σεμινάριο στα Λεμφώματα», Αθήνα, Απρίλιος 2000.
29. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο: Οι Κλινικές Εφαρμογές του Λεμφαδένος Φρουρού. Μάιος 2000, Ηράκλειο.
30. IUCP Course in «Thyroid Pathology - Oncology», εβδομαδιαίο, Μάιος 2000, Ιωάννινα.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ:

1. 3^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1985, Ρέθυμνο.
10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Νοέμβριος 1986, Αθήνα.
3. 4ο Παγκρήτιο Ιατρικό Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1987, Ρέθυμνο.
4. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Δεκέμβριος 1987, Χαλκίδα.
5. Ουρολογικό Συμπόσιο «Καρκίνος του όρχεως» Φεβρουάριος 1990, Αθήνα.
6. 2ο Πανελλήνιο Ηπατολογικό Συνέδριο, Μάρτιος 1991, Αθήνα.
7. 3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Απρίλιος 1991, Αθήνα.
8. 17ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1991, Αθήνα.
9. 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Οκτώβριος 1991, Αθήνα.

10. 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας, Δεκέμβριος 1991, Θεσ/νίκη
11. 1ο Αττικό Συμπόσιο Ειδικευομένων Ιατρών Πολιτών Στρατιωτικών Νοσοκομείων, Ιανουάριος 1992, Αθήνα.
12. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας,, Μάρτιος 1992, Αθήνα.
13. 1^η Ευρωπαϊκή Γαστρεντερολογική Εβδομάδα. (First United Gastreterology Week), Σεπτέμβριος 1992, Αθήνα.
14. 7^ο International Cogress of Senology, Μάιος 1992, Ρόδος.
15. 7^ο Διεθνές Συνέδριο Διαγνωστικής Μορφομετρίας, Οκτώβριος 1992, Ηράκλειο.
16. 6^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1992, Ρέθυμνο.
17. Ετήσιο Συμπόσιο 1992 - Η Χειρουργική Ογκολογία σήμερα - Πρόοδοι στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πεπτικού σωλήνα - Οκτώβριος 1993, Ηράκλειο.
18. Postgraduate Course in cutaneous malanomas, Ιούνιος 1993, Ηράκλειο.
19. Ετήσιο Συμπόσιο 1993 - Καρκίνος του μαστού, Οκτώβριος 1993, Ηράκλειο.
20. 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομίας, Απρίλιος 1994, Ηράκλειο.
21. 7ο Παγκρήτιο Ιατρικό Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1994, Ρέθυμνο.
22. 8ο International Cogress of Senology, Μάρτιος 1994, Rio de Janeiro.
23. 9^ο Διαπανεπιστημιακό Ιατρικό Συμπόσιο, Νοέμβριος 1995, Ηράκλειο.
24. 20^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Συνέδριο, Μάιος 1994, Αθήνα.
25. 6^ο Πανελλήνιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Ιανουάριος 1996, Ηράκλειο.
26. 5^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Μάιος 1996, Ιωάννινα.
27. 4^ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Σεπτέμβριος 1996, Ηράκλειο.
28. XXI International Congress of the International Academy of Pathology, Οκτώβριος 1996, Βουδαπέστη.
29. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Μάιος 1997, Ηράκλειο.
30. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γαστρεντερολογίας, Νοέμβριος 1997, Ηράκλειο.
31. 6^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Μάιος 1998, Αλεξανδρούπολη.
32. 9^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 1998, Ηράκλειο.
33. 17th European Congress of Pathology , September 1999, Barcelona.
34. 4th International Congress for Breast Cancer Research, Nov. 1999, Ηράκλειο.
36. 7^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής, Απρίλιος 2000, Αθήνα.
37. 6^ο Ετήσιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Χειρουργικής Ογκολογίας, Μάιος 2000, Ηράκλειο.

38. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, Νοέμβριος 2000, Ρέθυμνο

ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΩΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΗΣ:

1. Συμμετοχή σε εκπαίδευση φοιτητών Ιατρικής στο Αγροτικό Ιατρείο Αρχανών (1985-1987).
2. Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής του Royal Free Hospital, Λονδίνο, στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας, επί ένα έτος (1988) όπου απέκτησα τον τίτλο «Honorary Lecturer».
3. Συμμετοχή στην εκπαίδευση των φοιτητών της Ιατρικής Σχολής Ηρακλείου, στο μάθημα Παθολογικής Ανατομικής, από Σεπτέμβριο 1994 μέχρι Αύγουστο 1996, με ειδική σύμβαση του Ν. 407
4. Έκτακτη καθηγήτρια Τ.Ε.Ι. Σ.Ε.Υ.Π. Ηρακλείου από Σεπτέμβριο 1993 έως το 1996, στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας.
5. Εκπαίδευση νοσηλευτικού προσωπικού στο Β.Π.Γ.Ν.Η. στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομικής από το 1992 έως σήμερα.
6. Εκπαίδευση νοσηλευτικού προσωπικού στο ΠΕ.ΠΑ.Γ.Ν.Η. στο μάθημα της Παθολογικής Ανατομίας, έτος 1995.
7. Συμμετοχή στην εκπαίδευση Ειδικευομένων Ιατρών στην Παθολογική Ανατομική στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο Β.Γ.Π.Ν.Η. (1996-σήμερα).

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νεοπλασματική εξαλλαγή και η καρκινογένεση των φυσιολογικών κυττάρων είναι μια μακροχρόνια, συνεχόμενη, πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διαδικασία. Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν τεκμηριώσει ότι έχει σχέση με μη-τυχαίες και ειδικές γενετικές και μοριακές μεταβολές, που προκαλούν στη συνέχεια διαδοχικές αλλαγές στην έκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζουν τους σύνθετους μηχανισμούς της φυσιολογικής κυτταρικής ανάπτυξης του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου (1,5α).

Έχει διευκρινισθεί επίσης ότι για την ανάπτυξη ενός νεοπλάσματος δεν είναι αρκετή η δράση ενός μόνο καρκινογόνου παράγοντος αλλά απαιτείται η συμμετοχή δύο ή περισσότερων συνεργαζόμενων παραγόντων και η οποία πάλι σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί ένα αναγκαίο αλλά όχι επαρκές βήμα (2).

Γενετικές διαταραχές σε κακοήθη νεοπλάσματα μπορεί να αφορούν σε μεταβολές όλου του DNA του κυττάρου (σωματικού ή/ και γενετικού), σε δομικές ή αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων, ή σε μεταβολές σε μεμονωμένα γονίδια και στην έκφρασή τους. Σε μοριακό επίπεδο δυνατόν να υπάρχουν μεταβολές σε ογκογονίδια (γονιδιακή ενίσχυση, χρωμοσωμική διαμετάθεση, μεταλλάξεις κ.λ.π.) και ογκοκατασταλτικά γονίδια (μεταλλάξεις και/ ή απώλεια αλληλίων). Η συνεχώς αυξανόμενη γνώση των γενετικών αλλοιώσεων στα διάφορα νεοπλάσματα και η ανεύρεση νέων τεχνικών μοριακής βιολογίας που εφαρμόζονται ευρέως σε διαγνωστικά εργαστήρια βοηθούν στην ανίχνευση και μελέτη των αλλοιώσεων αυτών, σε μια προσπάθεια κατανόησης της νεοπλασματικής διεργασίας και ανεύρεσης νέων δεικτών που θα μπορούσαν να είναι χρήσιμοι για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς(6,7).

Το καρκίνωμα του μαστού είναι η αιτία του 20% των θανάτων από κακοήθεια του γυναικείου πληθυσμού, και έχει θεωρηθεί το συχνότερο κακόηθες νεόπλασμα στις γυναίκες (1,2). Η επίπτωση αυξάνεται σταθερά τα τελευταία 80 χρόνια έτσι ώστε στις

μέρες μας μια στις 12 γυναίκες στις ΗΠΑ θα εμφανίσει καρκίνωμα κατά την διάρκεια της ζωής τους. Στην Ελλάδα η ετήσια αύξηση της συχνότητας καρκινώματος του μαστού έφθασε το 3% και στην Αγγλία έχει περάσει το 4% (5a). Παρά τις εκτεταμένες έρευνες ως προς την αιτιολογία, τις διαγνωστικές μεθόδους και την θεραπεία και κυρίως όσον αφορά στην πρόωμη διάγνωση, το ποσοστό θανάτων από καρκίνωμα μαστού ουσιαστικά παραμένει σταθερό εδώ και 30 χρόνια, με σημερινούς αριθμούς θνητότητας περί τις 27 γυναίκες/100.000 ανθρώπους (2).

Έχουν μελετηθεί πολλά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια σε μεγάλες σειρές καρκινωμάτων μαστού σε μια προσπάθεια να προσδιοριστούν οι μηχανισμοί εκείνοι που λειτουργούν ή καταστέλλονται στο κύτταρο και ενέχονται στην καρκινογένεση. Κανένα όμως δεν έχει βρεθεί να είναι μοναδικό, μη-τυχαίο και επομένως ειδικός δείκτης του καρκινώματος του μαστού. Επίσης, προφανώς λόγω των ιδιαιτεροτήτων του οργάνου, δεν έχει διατυπωθεί ένα σταθερό μοντέλο που να επεξηγεί ικανοποιητικά την εξελικτική πορεία της καρκινογένεσης του μαστού. Ένα από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που φαίνεται να ενέχεται στην καρκινογένεση πολλών νεοπλασμάτων μεταξύ των οποίων και του μαστού, είναι το γονίδιο p53. Η σταθεροποίηση και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 που κωδικοποιεί μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου. Μπορεί όμως να προέλθει και εξ αιτίας απενεργοποίησής του μέσω σύνδεσής του με κυτταρικές πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες ιών, όπως το T-αντιγόνο του SV40, το X αντιγόνο της ηπατίτιδας B ή του αδενοϊού E1a (18, 210-219). Η μετάλλαξη του γονιδίου αυτού έχει βρεθεί και διερευνηθεί σε καρκινώματα παχέως εντέρου (8, 9), στομάχου (10), ήπατος (11), πνεύμονα (12) και στοματικής κοιλότητας (16), σε νεοπλάσματα του ΚΝΣ (13), σε μελανώματα (14) και σε νεοπλάσματα του αιμοποιητικού συστήματος (15, 17).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση φαίνεται να έχει η απορύθμιση του p53 δικτύου ελέγχου κυτταρικής αύξησης. Στο δίκτυο αυτό ενέχονται και οι πρωτεΐνες mdm2 και p21/waf1. Προηγούμενες μελέτες σε καρκινώματα μαστού, έχουν δείξει ότι η έκφραση και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 είναι ένα συχνό εύρημα στους όγκους αυτούς, σε ποσοστά που κυμαίνονται στη βιβλιογραφία από 14%-58%

(8,19-24). Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 στα καρκινώματα του μαστού συχνά οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου p53, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ανεξάρτητη των μεταλλάξεων (25). Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη mdm2 έχει ανιχνευθεί σε ένα ποσοστό των καρκινωμάτων του μαστού και έντονη έκφραση είχε σχετισθεί με ενίσχυση του γονιδίου mdm2 (25,26). Η έκφραση όμως της πρωτεΐνης p21 δεν έχει συστηματικά μελετηθεί, σε σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 και mdm2 σε μεγάλες σειρές καρκινωμάτων μαστού.

Σκοπός της μελέτης μας ήταν να μελετήσουμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της πρωτεΐνης p53 και των πρωτεϊνών mdm2 και p21/waf1 σε μια σειρά 144 καρκινωμάτων, ώστε να αποκτήσουμε πληροφορίες για την κατάσταση του δικτύου p53/mdm2/ p21 σ' αυτούς τους όγκους και για τους πιθανούς μηχανισμούς συμμετέχουν στην ογκογένεση του καρκινώματος του μαστού. Επίσης να συσχετίσουμε την έκφρασή τους με την ιστολογική διαφοροποίηση, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, την ανοσοϊστοχημική έκφραση των ορμονικών υποδοχέων, της πρωτεΐνης c-erbB-2, το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, και την έκφραση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2, ώστε να εκτιμήσουμε την αξία αυτής της συνδιασμένης ανοσολογικής εκτίμησης στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων αυτών.

Θεωρώ υποχρέωσή μου να εκφράσω τις βαθύτερές μου ευχαριστίες στον κ. Γεώργιο Δελίδη, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την ανάθεση και την επίβλεψη της εργασίας αυτής, για την συμπαράστασή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις και παραινέσεις του. Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές κ. κ. Π. Δάβαρη και Ε. Κουμαντάκη για την ανάθεση και την επίβλεψη της εργασίας και τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πρώην Επίκουρου Καθηγητή Κρήτης κ. Παναγιώτη Καναβάρο εκφράζω θερμότερες ευχαριστίες γιατί με καθοδήγησε σε όλες τις φάσεις της έρευνας αυτής και μου άνοιξε την πόρτα της

μοριακής παθολογικής ανατομικής, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του στο εργαστηριακό και συγγραφικό μέρος της.

Ευχαριστώ τους καθηγητές κ.κ. Δημήτρη Τσιφτσή και Βασίλη Γεωργούλια, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Σταθόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σαμώνη για τις σημαντικές συμβουλές τους.

Ευχαριστώ επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Γιάννη Βλαχονικολή για την στατιστική ανάλυση των ευρημάτων, τις βιολόγους κ. κ. Χρύσα Μαυρουδή και Κατερίνα Δαριβιανάκη και την κ. Έλλη Καρύδη, μέλος ΕΔΤΠ του Τομέα της Μορφολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την βοήθειά τους στην εφαρμογή των τεχνικών ανοσοϊστοχημείας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου, κ. Ευθυκλή Βαγιό, ιατρό ακτινολόγο για τις σημαντικές συμβουλές του στη συγγραφή της μελέτης αυτής αλλά και για την συνεχή προτροπή, την αμέριστη συμπαράσταση και την υπομονή του σε όλη την διάρκεια της εκπόνησής της, και όχι μόνο.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ

Ο μαστός είναι ένας τροποποιημένος ιδρωτοποιός αδένας που βρίσκεται μπροστά από τον πρόσθιο θωρακικό μυ και ανάμεσα στην επιπολής και εν τω βάθει περιτονία τους μυός και καλύπτεται από δέρμα και υποδόριο ιστό.

Αποτελείται από 15-20 ακανόνιστους λοβούς που διαχωρίζονται μεταξύ τους από πυκνό συνδετικό ιστό και πολύ λίπος. Ουσιαστικά ο κάθε λοβός είναι από μόνος του ένας αδένας, σύνθετου σωληνοκυψελιδικού τύπου και αποτελείται από τα μαστικά λόβια και τους γαλακτοφόρους πόρους, έχει δε δικό του απεκκριτικό πόρο που εκβάλλει ανεξάρτητα στην θηλή του μαστού.

Η ιστολογική δομή του αδένα δεν είναι καθορισμένη και αμετάβλητη. Εξαρτάται από την ηλικία και τις φυσιολογικές και ορμονικές συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό(4). Ο μαζικός αδένας αρχίζει την ανάπτυξη του στην εφηβεία, με παρουσία γαλακτοφόρων πόρων και αρχομένων σωληνοκυψελιδικών σχηματισμών στις άκρες των πόρων, φθάνει πιθανότατα σε μια ακμαιοτήτα οργανικής δομής στην γενετήσια λειτουργία και μεταχωρεί σε έκπτωση και ατροφία στην μετακλιμακτηριακή και γεροντική ηλικία. Η ακριβής ηλικία στην οποία αρχίζει η ατροφία του μαστού δεν έχει προσδιοριστεί, ούτε επίσης οι φάσεις που ακολουθεί και η τελική τους απόληξη. Δεν είναι επίσης γνωστό αν η φυσιολογική ατροφία ακολουθεί την ίδια πορεία σε όλο τον γυναικείο πληθυσμό ή αν εξατομικεύεται από επίδραση ενδογενών παραγόντων, ώστε να μην είναι δυνατή η καθολικότερη ταξινόμησή της. Σε περιόδους εγκυμοσύνης και θηλασμού ο μαστός γίνεται λειτουργικό όργανο με εκκριτική δραστηριότητα.

Για την μελέτη μας στηριχτήκαμε στην ιστολογία του φυσιολογικού μαζικού αδένα (4). Τα φυσιολογικά μαστικά λόβια έχουν ορισμένο μέγεθος που ποικίλει σε μικρά γενικώς πλαίσια, ομαλή περιφερειακά σχήμα ωοειδές ή υποστρόγγυλο ανάλογα με το επίπεδο διατομής τους. Το υπόστρωμα του λοβίου είναι χαλαρός συνδετικός ιστός με μικρή κυτταροβρίθεια, ορμονοεξαρτώμενος και με απουσία ελαστικών ινών γύρω από τα πορίδια, που βρίσκεται σε αντίθεση και παρουσιάζει σαφή διαχωρισμό από τον πυκνό

κολλαγόνο ιστό του γύρω μεσολόβιου στρώματος. Μέσα στο χαλαρό υπόστρωμα του λοβίου ανευρίσκονται σπάνια μεμονωμένα λεμφοκύτταρα και πλασματοκύτταρα.

Το μαστικό λόβιο στη λεπτή του κατασκευή αποτελεί ένα δενδρύλλιο διακλαδιζόμενων μικρών ποριδίων με πυκνή μεταξύ τους διάταξη, που εξορμάται από τον τελικό μεσολόβιο πόρο. Ο τελευταίος διαχωρίζεται (5) σε δύο μοίρες που συνεχίζονται μεταξύ τους : τον εξωλοβιακό τελικό πόρο, που βρίσκεται ακόμα μέσα στο διάμεσο μεσολόβιο στρώμα και τον τελικό ενδολοβιακό πόρο, που βρίσκεται μέσα στο χαλαρό συνδετικό ιστό του λοβίου. Το λοβιακό δενδρύλλιο εξορμάται από τον τελικό ενδολοβιακό πόρο του οποίου αποτελεί διακλαδώσεις που απολήγουν τυφλά. Οι τελικοί εξωλοβιακοί και ενδολοβιακοί πόροι και το εξαρτώμενο από αυτούς λόβιο, αποτελούν ενιαία ανατομική και λειτουργική μονάδα, την λοβιακή μονάδα (terminal duct-lobular unit).

Όλο το αδενικό σύστημα, πόροι και μαστικά λόβια, επενδύονται από εξειδικευμένο δίστοιβο επιθήλιο: η έσω στιβάδα αποτελείται από κυβοειδή κύτταρα (η απλά επιθήλια) με ωοειδές, βαθυχρωματικούς πυρήνες και λίγο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, που εμφανίζουν εκκριτικές και προσροφητικές ιδιότητες και η έσω στιβάδα, που αποτελείται από τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Η τελευταία στιβάδα φαίνεται συχνά ασυνεχής και το κυτταρόπλασμα των μυοεπιθηλιακών κυττάρων είναι πολλές φορές μη εμφανές. Ορισμένες φορές τα μυοεπιθήλια προβάλλουν έντονα και τότε το κυτταρόπλασμα τους φαίνεται διαυγές. Αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων, επιθήλια και μυοεπιθήλια έχουν ιδιαίτερα και ξεχωριστά ανοσοϊστοχημικά και υπερμικροσκοπικά χαρακτηριστικά. Τα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τις κερατίνες 7, 8, 18 και 19 (5) καθώς και τα EMA , την α-λακταλβουμίνη και το μεμβρανικό αντιγόνο για το λίπος του γάλακτος (related milk fat globule membrane antigen). Οι καλύτεροι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες για τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα είναι οι κερατίνες 5, 14 και 17 καθώς και η ακτίνη και σε λιγότερο ποσοστό η S-100 πρωτεΐνη. Τα αντισώματα για πανκερατίνες αντιδρούν και με τα δύο είδη κυττάρων.

Ανάμεσα στα μυοεπιθηλιακά και τα επιθηλιακά κύτταρα μαζικού αδένου έχουν βρεθεί ελάχιστα κύτταρα, θετικά στην ανοσοϊστοχημική χρώση χρωμογρανίνη. Τα κύτταρα αυτά θεωρούνται νευροενδοκρινικής αρχής, βρίσκονται μεμονωμένα ή σε μικρές

αθροίσεις σε μερικά πορίδια ή σε τελικούς ένδο ή έξω λοβιακούς πόρους (5a). Η βασική μεμβράνη που περιβάλλει το αδενικό επιθήλιο είναι λεπτή και φανερή με ιστοχημικές (αργύρου και PAS) καθώς και με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (λαμινίνη και κολλαγόνο τύπου IV).

Οι λοιποί πόροι του μαστού, πλην των τελικών, αποτελούν το σύστημα των μεσολόβιων πόρων και μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις τάξεις, που διαστέλλονται στις ιστολογικές τομές. Οι μεγαλύτεροι είναι οι γαλακτοφόροι πόροι της θηλής. Βρίσκονται μέσα στο συνδετικό ιστό του χορίου του δέρματος της θηλής, το σχήμα τους σε εγκάρσια διατομή είναι αστεροειδές και το επιθήλιο τους δίστοιβο. Γύρω τους υπάρχουν δεσμίδες λείων μυϊκών ινών και δεν υπάρχουν λόβια, αν και έχουν περιγραφεί σπάνια λόβια να συνδέονται απ' ευθείας με γαλακτοφόρους πόρους. Οι πρώτες διακλαδώσεις των γαλακτοφόρων πόρων κάτω από την θηλή και οι αμέσως επόμενες διακλαδώσεις τους μέσα στο μαζικό αδένια είναι ελαφρά μικρότεροι πόροι με σαφέστερη αστεροειδή διαμόρφωση και το ίδιο επιθήλιο.

Στο γύρω τους διάμεσο υπόστρωμα ανευρίσκονται μεγάλα σχετικώς αιμοφόρα αγγεία και λίγα λόβια. Όλες οι υπόλοιπες διακλαδώσεις των μεσολόβιων πόρων έχουν μικρότερο μέγεθος, το σχήμα τους είναι σαφέστερα αστεροειδές και βρίσκονται ανάμεσα σε άφθονο λοβιακό υλικό.

ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΜΑΣΤΟΥ

Εισαγωγή

Το καρκίνωμα του μαστού είναι η αιτία του 20% των θανάτων από κακοήθεια του γυναικείου πληθυσμού, και έχει θεωρηθεί ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες (1-3). Η επίπτωση αυξάνεται σταθερά τα τελευταία 80 χρόνια έτσι ώστε στις μέρες μας μια στις 12 γυναίκες στις ΗΠΑ θα εμφανίσει καρκίνωμα κατά την διάρκεια της ζωής τους (1).

Στην Ελλάδα η ετήσια αύξηση της συχνότητας καρκίνου του μαστού έφθασε το 3% και στην Αγγλία έχει περάσει το 4% (5). Λογικά λοιπόν έχει δοθεί αρκετή δημοσιότητα στο θέμα "καρκίνος του μαστού" και γίνεται το αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών ως προς την αιτιολογία, τις διαγνωστικές μεθόδους και την θεραπεία.

Αν και έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος κυρίως όσον αφορά στην πρόωμη διάγνωση και σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, με αποτέλεσμα να παρατηρείται σχετική βελτίωση στην πενταετή επιβίωση, η συνολική θνησιμότητα του καρκινώματος του μαστού ουσιαστικά παραμένει σταθερή εδώ και 30 χρόνια, έτσι ώστε περίπου το 1/3 των ασθενών να καταλήγει από τη νόσο. Κάθε χρόνο 43.000 γυναίκες πεθαίνουν από καρκίνωμα του μαστού.

Είναι ειρωνικό μα και τραγικό ότι ένα νεόπλασμα που αναπτύσσεται σε ένα εξωτερικό όργανο, που εύκολα εξετάζεται από την ίδια τη γυναίκα και διερευνάται κλινικά συνεχίζει να προκαλεί τέτοια προβλήματα (2).

Επίπτωση και Επιδημιολογία.

Το καρκίνωμα στον γυναικείο μαστό σπάνια αναπτύσσεται πριν την ηλικία των 25 ετών εκτός από ιδιαίτερες περιπτώσεις. Μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία μετέπειτα, με αυξητική τάση κατά ή μετά την εμμηνόπαυση.

Έχουν γίνει εκτεταμένες επιδημιολογικές μελέτες, όπου πλείστοι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες έχουν συσχετισθεί με την επιδημιολογία του νεοπλάσματος.

Συνοπτικά αναφέρονται:

- Γεωγραφική κατανομή : Την υψηλότερη συχνότητα καρκίνου του μαστού στον κόσμο έχουν οι ΗΠΑ και ο Καναδάς και τη χαμηλότερη η Ιαπωνία, η Κίνα και η Ουγκάντα. Δεύτερη σε συχνότητα έρχεται η Δυτική Ευρώπη. Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι οι διαφορές μεταξύ των λαών δεν έχουν μόνο φυλετική βάση. Επηρεάζονται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, τρόπο ζωής κ.λ.π. Ιαπωνίδες που ζουν στις ΗΠΑ εξομοιώνονται βαθμhdόν όσον αφορά τη συχνότητα νόσησης με τον ντόπιο πληθυσμό (5).
- Οικογενής προδιάθεση : είναι καλά αποδεδειγμένη. Το μέγεθος του κινδύνου είναι σε άμεση σχέση με τον αριθμό των στενών συγγενών με καρκίνο του μαστού και την ηλικία εμφάνισης του καρκινώματος σε συγγενείς. Όσο μικρότερη είναι η ηλικία των συγγενών την στιγμή της εμφάνισης του καρκινώματος και όσο περισσότερα αμφοτερόπλευρα καρκινώματα, τόσο πιο αυξημένη είναι η γενετική προδιάθεση. Η επικινδυνότητα νόσησης είναι 1,5 με 2 φορές παραπάνω από τον λοιπό πληθυσμό για γυναίκες με 1ου βαθμού συγγενή με καρκίνωμα μαστού και 4 με 6 φορές παραπάνω για εκείνες με δύο προσβεβλημένους συγγενείς (19).
- Ηλικιακή κατανομή : δεν είναι συχνό πριν από την ηλικία των 25 ετών. Έχουν περιγραφεί και περιπτώσεις σε μικρές ηλικίες ιδίως όταν υπάρχει οικογενής προδιάθεση. Σε πληθυσμούς με χαμηλή συχνότητα η καμπύλη νόσησης παρουσιάζει ανοδική πορεία μέχρι την ηλικία των 45 ετών και μετά επιπεδώνεται μέχρι την 7^η και την 8η δεκαετία της ζωής. Στις Δυτικές χώρες ενώ η αρχική εμφάνιση είναι η ίδια, η καμπύλη συχνότητας παρουσιάζει δύο αιχμές. Μια γύρω στα 45 χρόνια και μια υψηλότερη αιχμή στη δεκαετία 55-65 (20).
- Σχέση με τον χρόνο της αναπαραγωγικής περιόδου: Φαίνεται ότι σαφή προστασία ασκεί η πρώιμη τελειόμηνη εγκυμοσύνη από τα 18 έως τα 25 χρόνια, ενώ οι επόμενες δεν ασκούν αντίστοιχη προστασία. Αντίθετα η πρώτη τελειόμηνη εγκυμοσύνη μετά τα 40 χρόνια φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο νόσησης σε σχέση με τις άτοκες γυναίκες (19). Δευτερεύοντες παράγοντες που επίσης φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο νόσησης είναι η πρώιμη εμμηναρχή, η καθυστερημένη

εμμηνόπαυση, η παχυσαρκία καθώς και οι μαστοί μεγάλου μεγέθους. Η εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων και αντισυλληπτικών σκευασμάτων δεν φαίνεται να σχετίζεται με αύξηση του βαθμού επικινδυνότητας (2).

- Επίσης φαίνεται να υπάρχει άμεση συσχέτιση με την ινοκυστική νόσο και κυρίως. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παρουσία επιθηλιακής υπερπλασίας χωρίς ατυπία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκινώματος κατά 1,5-2 φορές σε σχέση με τον λοιπό πληθυσμό (23), ενώ η παρουσία επιθηλιακής υπερπλασίας με ατυπία κατά 4,5-5 φορές (21).

Ιστολογική Ταξινόμηση Καρκινωμάτων του Μαστού.

Τα καρκινώματα του μαστού είναι κακοήθη νεοπλάσματα του επιθηλίου του οργάνου. Υπάρχουν διάφορες ταξινομήσεις των καρκινωμάτων του μαστού που κατά καιρούς αναθεωρούνται, γεγονός που εκφράζει τις ελλειπίες γνώσεις μας για την ιστογένεση των διαφόρων μορφών του. Πάντως όλες οι ταξινομήσεις βασίζονται στην αρχική ταξινόμηση που έγινε το 1945 από τους Foot και Stewart και όλες χαρακτηρίζονται από την βασική διαίρεση τους σε δυο μεγάλες κατηγορίες: Τα πορογενή και τα λοβιακά καρκινώματα. Κάθε μια από αυτές περιλαμβάνει ενδοεπιθηλιακές (in situ) και διηθητικές μορφές. Η τελευταία ταξινόμηση της WHO είναι εκείνη που χρησιμοποιείται περισσότερο (6,7) (Πίνακας 1)

Η συνηθέστερη μορφή είναι το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα χωρίς ειδικούς χαρακτήρες και υπολογίζεται ότι σ' αυτό εμπίπτει το 70-75% των καρκινωμάτων του μαστού (22).

Προγνωστικοί Παράγοντες στο Καρκίνωμα του Μαστού.

Προγνωστικοί παράγοντες είναι τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την αξιολόγηση της κλινικής πορείας ενός καρκινοπαθούς. Ανάμεσα τους συνήθως περιλαμβάνονται ανατομικά στοιχεία του όγκου και στοιχεία που επηρεάζουν ή έχουν σχέση με την βιολογική επιθετικότητα του νεοπλασματος.

Οι κλασσικοί κλινικοπαθολογικοί προγνωστικοί παράγοντες συνεχίζουν να παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην αξιολόγηση της πορείας του ασθενούς.

Η σταδιοποίηση κατά TNM συνεχίζει να είναι ο πιο ισχυρός προγνωστικός δείκτης στο καρκίνωμα του μαστού (205,206). Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων εμφανίζει την μεγαλύτερη συσχέτιση με ελαττωμένη επιβίωση, ενώ η παρουσία μεταστάσεων σε μασχαλιαίους λεμφαδένες είναι ο επόμενος πιο ισχυρός προγνωστικός παράγοντας.

Ωστόσο η απρόβλεπτη βιολογική συμπεριφορά και ανταπόκριση στη θεραπεία ορισμένων καρκινωμάτων έγιναν αιτία για προσπάθεια ανεύρεσης επιπρόσθετων προγνωστικών παραγόντων, έτσι ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν

- α) οι ασθενείς με άριστη μετεγχειρητική πορεία, στους οποίους η συμπληρωματική θεραπεία δεν θα πρόσφερε ουσιαστικά αποτελέσματα
- β) τα νεοπλάσματα με πολύ κακή πρόγνωση που απαιτούν μια πιο επιθετική συμπληρωματική θεραπεία και
- γ) οι ομάδες των ασθενών οι οποίες πιθανά θα ανταποκριθούν ή όχι σε συγκεκριμένες μορφές θεραπείας (40).

Ένα μεγάλο εύρος πιθανών προγνωστικών παραγόντων έχει μελετηθεί, ορισμένοι καλά καθορισμένοι, άλλοι υπό μελέτην και άλλοι σε ερευνητικό ακόμα επίπεδο. Χωρίζονται σε δύο ομάδες, τους κλασσικούς, στους οποίους περιλαμβάνονται τα μορφολογικά και

ιστολογικά κυρίως χαρακτηριστικά του νεοπλάσματος, και τους νεώτερους βιολογικούς δείκτες.

A. Κλασσικοί Προγνωστικοί Παράγοντες

1. Μέγεθος του όγκου.

Η διάμετρος του πρωτοπαθούς νεοπλάσματος έχει άμεση σχέση με την πιθανότητα ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων, την επιβίωση του ασθενούς (50) και είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους διασποράς και επανεμφάνισης της νόσου.

Τα καρκινώματα με διάμετρο μικρότερη του 1εκατοστού θεωρούνται ως σαν ελάχιστα διηθητικά (minimal invasive) από τους American College of Surgeons και National Health Service Breast Screening Program (NHSBSP). Στην μελέτη του Nottingham Tenopus θεωρείται ότι το όριο για καλύτερη επιβίωση είναι η διάμετρος μικρότερη από 1,5 εκατοστά.

Το μέγεθος του όγκου πρέπει να καθορίζεται από τον παθολογοανατόμο, στο παρασκεύασμα και για όγκους μικρότερους του 1εκ. στις ιστολογικές τομές (55).

2. Ιστολογική διαφοροποίηση

Ο βαθμός διαφοροποίησης προσφέρει προγνωστικές πληροφορίες σε πολλά κακοήθη νεοπλάσματα, συμπεριλαμβανομένου και του καρκινώματος του μαστού (206).

Τα δύο πιο διαδεδομένα συστήματα για την βαθμοποίηση της ιστολογικής διαφοροποίησης του καρκινώματος του μαστού είναι της WHO (που υιοθέτησε την μέθοδο των Scarff - Bloom και Richardson) (53), η οποία βασίζεται στο συνδιασμό κυτταρικών στοιχείων και αρχιτεκτονικής (σωληνώδης διαμόρφωση, ομοιομορφία πυρήνων, αριθμός πυρηνοκινησιών) και του Black που βασίζεται κυρίως σε μορφολογικούς χαρακτήρες των πυρήνων. Το πρώτο είναι περισσότερο αποδεκτό, αν και υπάρχουν εργασίες που συζητούν την αξιοπιστία του (41) και όταν

χρησιμοποιούνται αυστηρά κριτήρια, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του είναι ικανοποιητική.

Ανεξάρτητα από την χρησιμοποιούμενη μέθοδο, μετά από πολλές μελέτες έχει πλέον αποδειχτεί ότι ο βαθμός διαφοροποίησης είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης για την επιβίωση της ασθενούς (54, 206). Ασθενείς με βαθμό I έχουν πιθανότητα 10ετούς επιβίωσης 85%, ενώ βαθμού κακοηθείας III λιγότερο από 45% (10).

3. Σταδιοποίηση.

Η σταδιοποίηση του καρκινώματος του μαστού είναι ένας από τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες (41,51,52).

Το περισσότερο διαδεδομένο σύστημα κλινικής σταδιοποίησης του βασίζεται στο σύστημα TMN και έχει υιοθετηθεί και από την UICC (International Union against Cancer) και την AJV (American Joint Commission on Cancer Staging and End Results Reporting) (Πίνακας 1).

Οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες θεωρούνται ως η πρώτη θέση καρκινωμάτους εντόπισης. Τα ποσοστά επιβίωσης επηρεάζονται τόσο από την ύπαρξη ή όχι μεταστατικής εστίας στους μασχαλιαίους λεμφαδένες όσο και από το επίπεδο εντόπισης των διηθημένων λεμφαδένων, τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων (λιγότεροι ή περισσότεροι από τέσσερις), την ποσότητα της μεταστατικής νόσου, την παρουσία ή όχι εξωλεμφαδενικής διασποράς και την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στα προσαγωγά αγγεία. Είναι ενδιαφέρον ότι ασθενείς με παρουσία μικρομεταστάσεων έχουν την ίδια πρόγνωση με αυτές με αρνητικούς λεμφαδένες.

Για προγνωστικούς σκοπούς η ομαδοποίηση είναι: αρνητικοί λεμφαδένες, ένας έως τρεις θετικοί λεμφαδένες και τέσσερις ή περισσότεροι θετικοί λεμφαδένες.

Οι πιο συνηθισμένες εστίες δευτεροπαθών εστιών είναι οι πνεύμονες, το ήπαρ, τα οστά, ο υποδόριος ιστός και το δέρμα. Επίσης μπορεί να παρουσιασθούν και στον εγκέφαλο, το περικάρδιο ή τον υπεζωκότα (42).

Το καρκίνωμα του μαστού θεωρείται από τα επιθετικά νεοπλάσματα. Φαίνεται ότι η γενικευμένη διασπορά της νόσου γίνεται σε αρχικά στάδια, γι αυτό και πολλοί ερευνητές θεωρούν ότι από τη στιγμή της διαγνώσεώς του αποτελεί γενικευμένη νόσο.

4. Ιστολογικός τύπος

Ορισμένοι ιστολογικοί τύποι του διηθητικού καρκινώματος του μαστού εμφανίζουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με πορογενές διηθητικό χωρίς ειδικούς χαρακτήρες. Αυτά είναι: το σωληνώδες (56), το ηθμοειδές, το βλενώδες (57), το θηλώδες (58), το κλασσικό διηθητικό λοβιακό, το νεανικό και το μυελοειδές καρκίνωμα (23). Ωστόσο ορισμένοι ερευνητές απέτυχαν να αποδείξουν την καλύτερη πρόγνωση του λοβιακού διηθητικού (43) και του μυελοειδούς καρκινώματος (44).

5. Αγγειακή διήθηση

Η χρήση της ως προγνωστικός παράγοντας στο καρκίνωμα του μαστού από πολλούς αμφισβητείται(45,46) . Η αγγειακή διήθηση σχετίζεται στενά με την διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων και πιθανά γι αυτό έχει υποστηριχθεί ότι μπορεί να προσφέρει πληροφορίες το ίδιο σημαντικές όσο το στάδιο διήθησης λεμφαδένων.

Πιο πρόσφατες μελέτες πάντως προτείνουν ότι η παρουσία αγγειακής διήθησης είναι ένας σημαντικός δείκτης στην πρόβλεψη τοπικής επανεμφάνισης της νόσου μετά από συντηρητική χειρουργική θεραπεία(48).

6. Νέκρωση

Η αξία της νέκρωσης του όγκου σαν πιθανός προγνωστικός δείκτης είναι υπό διερεύνηση. Ορισμένοι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι παρατηρείται ελάττωση της 10ετούς επιβίωσης (47) σε ασθενείς με νέκρωση του καρκινώματος κι άλλοι ότι η

παρουσία της είχε σχέση με την αποτυχία της θεραπείας. Τέλος έχει βρεθεί ότι υπάρχει στενή σχέση μεταξύ εκτεταμένης νέκρωσης και χαμηλής επιβίωσης. Ωστόσο χρειάζονται πιο εμπεριστατωμένες μελέτες για να παρουσιάσουν αναπαραγωγίμες εκτιμήσεις και να αποτιμήσουν τη σχέση της με άλλες προγνωστικές μεταβλητές.

Αν και καθένας ξεχωριστά οι παραπάνω παράγοντες έχουν σημαντική προγνωστική αξία για την επιβίωση της ασθενούς, αναγνωρίζεται τελευταία με πολυπαραγοντικές μελέτες ότι ο συνδιασμός τους, ίσως μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ακρίβεια ως προς την πρόγνωση και επομένως να συμβάλλει στην ομαδοποίηση ασθενών για συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα. Στην μελέτη μιας μεγάλης σειράς στο Nottingham/Tenovus (49) επινοήθηκε ένας τύπος (Nottingham Prognostic Index (NPI)) ο οποίος συνδιάζει το στάδιο διήθησης των λεμφαδένων, το μέγεθος και την ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου. Ο τύπος είναι:

$$\text{NPI} = [\text{size(cm)} * 0,2] + [\text{lymph node stage (1-3)}] + [\text{grade(1-3)}].$$

Κλινικά αναγνωρίζονται τρεις προγνωστικές ομάδες : μια «καλή» ομάδα με τιμή μικρότερη του 3,4, μια «μέτρια» με τιμή από 3,4 έως 5,4 και μια «κακή» με τιμή μεγαλύτερη από 5,4. Η αναμενόμενη 15ετής επιβίωση είναι για την πρώτη ομάδα 80%, για την δεύτερη 42% και για την τρίτη 13%.

B. Ανοσοϊστοχημικοί Βιολογικοί Δείκτες :

1. Ορμονικοί υποδοχείς

Ένα πολύ σημαντικό εύρημα στην αντιμετώπιση του καρκινώματος του μαστού ήταν η διαπίστωση ότι η παρουσία ορμονικών υποδοχέων στο νεοπλασματικό ιστό σχετίζεται με την πρόγνωση και συνδυάζεται με θετική ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία (59).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων (ER) παρατηρείται σε ποσοστό από 50-85% καρκινωμάτων μαστού. Η συχνότητα ανίχνευσης αυξάνεται με την ηλικία της ασθενούς, φθάνοντας στα μεγαλύτερα επίπεδα στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (59). Έχει βρεθεί ότι ασθενείς με ER+ νεοπλάσματα έχουν μεγαλύτερη ελεύθερη νόσου περίοδο μετά από θεραπεία, καλύτερη γενική επιβίωση και μακρύτερα μεσοδιαστήματα μεταξύ των υποτροπών, σε σχέση με τις ER- ασθενείς και ανεξάρτητα από την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (60). Οστόσο η προγνωστική τους αξία ελαττώνεται όταν συσχετισθούν με άλλες ευνοϊκές προγνωστικές παραμέτρους (61).

Το 50 - 60% των γυναικών με νεοπλασματικούς όγκους μαστού με θετικούς ER ανταποκρινόταν στην ορμονοθεραπεία, ενώ λιγότερο από 10% με νεοπλάσματα αρνητικά σε ER έδειχναν την ίδια ανταπόκριση. Μεγαλύτερο ποσοστό ανταπόκρισης παρουσίαζαν γυναίκες με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων ή/και σύγχρονη παρουσία PR+ υποδοχέων. Αρκετό ποσοστό λοιπόν ER + νεοπλασμάτων δεν ανταποκρινόταν στην ορμονοθεραπεία. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην ετερογένεια στην έκφραση ER στα νεοπλασματικά κύτταρα, κάτι που έχει αποδειχθεί ότι ισχύει, είτε όμως στην παρουσία υποδοχέων που υπάρχουν μεν αλλά είναι τροποποιημένοι και αδυνατούν να έχουν τη φυσιολογική βιολογική λειτουργία τους (60).

Η έκφραση ορμονικών υποδοχέων σε καρκινώματα μαστού σχετίζεται θετικά με το βαθμό διαφοροποίησης και με ορισμένους ιστολογικούς τύπους του καρκινώματος του

μαστού. Έτσι π.χ. έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα και τα ενδοπορικά φαγεσωρικού τύπου καρκινώματα δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς, ενώ τα βλεννώδη καρκινώματα εμφανίζουν τις μεγαλύτερες θετικές τιμές. Αντίθετα δεν έχει βρεθεί στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ πορογενούς και λοβιακού τύπου καρκινώματα.

Θετική συσχέτιση υπάρχει επίσης με την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2, την απουσία νεκρώσεων και την ηλικία της ασθενούς. Αρνητικά σχετίζεται με την υπερέκφραση των c-erbB-2, την αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα του όγκου και την ανευπλοϊδία του νεοπλάσματος(62). Φαίνεται δε, να είναι και οι δύο ορμονικοί υποδοχείς προβλεπτικοί αλλά κανείς ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης. Οι τιμές των υποδοχέων είναι πιο χρήσιμες για προγνωστικούς σκοπούς σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (62). Ωστόσο, είναι σημαντική η παρουσία τους στην επιλογή των ασθενών που πρόκειται να ανταποκριθούν σε ειδικού τύπου επιπρόσθετα θεραπευτικά σχήματα (59).

Η ανίχνευση και μέτρηση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων μπορεί να γίνει με βιοχημικές μεθόδους σε ομογενοποιημένο φρέσκο ιστό, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή με τεχνικές in situ υβριδισμού (63).

Οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι στις μέρες μας, μετά την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν επίτοπους των υποδοχέων δίνουν ευαίσθητα, αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, ακόμα και σε τομές παραφίνης έτσι ώστε να θεωρούνται πλέον οι τεχνικές εκλογής για την ανίχνευση των υποδοχέων αυτών (63).

2. Πρωτεΐνη c-erbB-2 (neu/HER-2)

Μετά την πρώτη δημοσίευση όπου αναφέρεται η σχέση ανάμεσα στην ενίσχυση του ογκογονιδίου c-erbB2 και στην πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και στην παρουσία μεταστάσεων σε μασχαλιαίους λεμφαδένες (108), ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δημοσιευθεί με συγκρουόμενα όμως αποτελέσματα.

Υπερέκφραση του c-erbB2 παρατηρείται σε περίπου ένα τέταρτο των καρκινωμάτων του μαστού. Εκφράζεται συχνότερα στα διηθητικά πορογενή και τα μυελοειδή καρκινώματα και σπάνια στα λοβιακά διηθητικά. Σε ενδοεπιθηλιακά παρατηρείται σχεδόν αποκλειστικά σ'εκείνα από μεγάλα κύτταρα. Είναι επίσης συχνότερη σε ενδοεπιθηλιακά απ' ό τι σε διηθητικά και πιο συχνή σε διηθητικά με ενδοεπιθηλιακό στοιχείο(183).

Γενικά, η ενίσχυση και/ή υπερέκφραση του c-erbB2 αναγνωρίζεται σαν μια δυσμενής προγνωστική μεταβλητή σε ασθενείς με μεταστάσεις σε μασχαλαίους λεμφαδένες (184).

Διαφορές στην επιβίωση έχουν επίσης ανιχνευθεί σε νόσο με αρνητικούς λεμφαδένες σε μερικές σειρές, αξιολογώντας την έκφραση του c-erbB2 σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους (78), αλλά μέχρι στιγμής η προγνωστική αξία του c-erbB2 σε όγκους με αρνητικούς λεμφαδένες παραμένει αδιευκρίνιστη (83, 185).

Είναι πιθανό ότι ένας μεγάλος αριθμός ασθενών θα πρέπει να ελεγχθεί σε μία μακρόχρονη προοπτική μελέτη για να λυθεί αυτό το θέμα, αξιολογώντας την μακρόχρονη επιβίωση και το μη συχνό ρυθμό επανεμφάνισης της νόσου σε ομάδες με αρνητικούς λεμφαδένες. Ίσως θα βρεθούν συγκεκριμένες υποκατηγορίες γυναικών με καρκίνωμα μαστού στις οποίες θα αποδειχθεί ότι ο c-erbB2 θα έχει αξία σαν προγνωστικός δείκτης.

Πάντως μέχρι στιγμής φαίνεται ότι δεν είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης από μόνος του και ότι θα πρέπει να χρησιμοποιείται σαν τμήμα πολυπαραγοντικής προσέγγισης στον προσδιορισμό της θεραπείας και της πρόγνωσης.

Η υπερέκφραση του c-erbB2 ίσως θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν προβλεπτικός δείκτης στην ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία (114). Ενίσχυση του c-erbB2 έχει σχετισθεί με αυξημένη ευαισθησία στην δοξορουβικίνη(186), ανθεκτικότητα στην κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη, 5- φλουοουρακίλη και συνδιασμό τους (187) και

ανθεκτικότητα στην ορμονοθεραπεία (188). Φαίνεται δε ότι επειδή μάλλον καθορίζει νεοπλάσματα με κακή ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επίσης σαν δείκτης ασθενών που χρειάζονται υψηλότερες δόσεις.

Επίσης επειδή έχει ένα εξωκυττάριο τμήμα και έχει την τάση να εκφράζεται σε πιο επιθετικά νεοπλάσματα είναι ένας πιθανός στόχος για ανοσοθεραπεία (67).

3. Πρωτεΐνη p53

Η μετάλλαξη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 είναι η συχνότερη γενετική αλλοίωση που έχει βρεθεί και μελετηθεί σε καρκινώματα του ανθρώπου, και στο μαστό (9-17, 209-213).

Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους είναι δυνατή η ανίχνευση της συσσωρευμένης p53 αλλά επηρεάζεται από πολλές μεθοδολογικές παραμέτρους και πρέπει να ερμηνευθεί με προσοχή (83).

Σε καρκινώματα του μαστού παρατηρείται ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 σε ποσοστό από 14 έως 58% (84,189,190). Οι παρατηρούμενες αποκλίσεις οφείλονται στις διαφορές στην τεχνική (επιλογή αντισώματος, μονιμοποίηση ιστού, κατεργασία ιστών, κ.λ.π.) και την αξιολόγηση.

Έκφραση της p53 παρατηρείται συχνότερα σε πορογενή διηθητικά και μυελοειδή καρκινώματα και σε ενδοεπιθηλιακά πορογενή καρκινώματα (114). Σύμφωνα έκφραση παρατηρείται επίσης σε ενδοεπιθηλιακό και διηθητικό τμήμα καρκινώματος ως και σε πρωτοπαθείς όγκους και λεμφαδενικές μεταστάσεις (114). Είναι επίσης συχνότερη σε οικογενείς περιπτώσεις, ενώ μεταλλάξεις του γονιδίου p53 έχουν βρεθεί σε 52% των περιπτώσεων με καρκίνωμα μαστού και ωοθήκης και σε όλες τις περιπτώσεις του συνδρόμου Li-Fraumeni (190).

Οι περισσότερες μελέτες μέχρι τώρα, στην πλειονότητα των οποίων η πρωτεΐνη p53 ελέγχεται ανοσοϊστοχημικά, επισημαίνουν ότι η συσσώρευση του p53, έχει σχέση με

ελαττωμένη επιβίωση (87) και ότι σχετίζεται με άλλους δυσμενείς προγνωστικούς παράγοντες, όπως χαμηλή διαφοροποίηση, υπερέκφραση c-erbB-2, ανευπλοδισμό, απουσία ER (84,86,191,192). Επίσης σε άλλες μελέτες έχουν συνδέσει τις μεταβολές του p53 με την έκβαση των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες. Θεωρείται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη p53 σχετίζεται με την πρόγνωση του καρκινώματος του μαστού, αλλά συχνά σε πολυπαραγοντικές μελέτες δεν αποδεικνύεται να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (85-90).

Ίσως όμως να είναι πολύ απλουστευμένος ο διαχωρισμός σε φυσικό και τροποποιημένο τύπο p53, ενώ είναι γνωστό ότι υπάρχουν ποικίλα γεγονότα που μπορεί να επηρεάσουν τις δραστηριότητες και τις λειτουργίες της p53 στο κύτταρο. Και ίσως θα ήταν πιο ουσιαστική η προσπάθεια διερεύνησης των μοριακών μεταβολών και των υποκείμενων μηχανισμών που προκαλούν τις συσσώρευση της p53 και η συσχέτισή αυτών με την πορεία της νόσου και ίσως με τον διαφορετικό φαινότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων.

Είναι λοιπόν πιθανόν ότι τα αποτελέσματα της μελέτης της p53 σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο να δώσουν περισσότερο κλινικά σημαντικές πληροφορίες (90).

Η έκφραση της p53 έχει σχετισθεί επίσης με την ανταπόκριση του καρκινώματος στην χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία. Ερευνητές υποστηρίζουν ότι νεοπλασματικοί όγκοι με κύτταρα που δεν εκφράζουν ανοσοϊστοχημικά την p53 είναι πιο ανθεκτικοί σε χημειοθεραπευτικά και ακτινοθεραπευτικά σχήματα (214).

4. Πρωτεΐνη bcl-2

Η πρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, και στα περιφερειακά λεμφοκύτταρα και πιστεύεται ότι αποτελεί έναν από τους καθοριστικούς ανασταλτικούς παράγοντες της απόπτωσης (98, 215).

Υπερέκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρείται συχνά σε καρκινώματα του μαστού και συνυπάρχει με άλλους καλούς προγνωστικούς παράγοντες όπως έκφραση στεροειδικών

ορμονών, ανώτερη διαφοροποίηση και μεγαλύτερη ελεύθερη νόσου περίοδο (103, 102, 104). Αν και θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας της απόπτωσης δεν φαίνεται να έχει στατιστικά σημαντική σχέση με την ανιχνεύσιμη απόπτωση στα καρκινώματα του μαστού (109).

Η έκφραση της bcl-2 δεν φαίνεται να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (103, 104, 105) στα καρκινώματα του μαστού αλλά ίσως να έχει κάποια ευνοϊκή προγνωστική σημασία (105, 106). Η προγνωστική της αξία σχετίζεται καλύτερα με ορμονοθετικά νεοπλάσματα, έτσι ώστε καρκινώματα με φαινότυπο ER+/ bcl-2+ να φαίνεται να έχουν καλύτερη πρόγνωση (110).

5. Πρωτεΐνη pS2

Η πρωτεΐνη pS2 φαίνεται ότι ανιχνεύει μια υποομάδα ER+ καρκινωμάτων με προφανώς καλύτερη πρόγνωση. Είναι μια μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη (6,4kDa) η έκκριση της οποίας ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και η λειτουργική δράση της οποίας είναι προς το παρόν άγνωστη. Ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά σε 45-70% των καρκινωμάτων του μαστού, και ίσως έχει κάποια αξία στην πρόβλεψη της ορμονικής ανταπόκρισης (176).

6. Καθεψίνη D

Η καθεψίνη D είναι μια ορμονοεξαρτώμενη λυσοσωματική πρωτεάση που παράγεται από τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού και υπερεκφράζεται στο ένα τρίτο περίπου των καρκινωμάτων του μαστού. Έχει ενοχοποιηθεί ότι ευοδώνει την διηθητική και μεταστατική ικανότητα των καρκινωμάτων του μαστού.

Υψηλά επίπεδα έκφρασης της καθεψίνης D παρατηρούνται συχνότερα σε περιπτώσεις με θετικούς λεμφαδένες. Υπερέκφραση της καθεψίνης D σχετίζεται με υψηλό ποσοστό

υποτροπών και χαμηλή επιβίωση, κυρίως εξ αιτίας της σχέσης της με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (193,194).

Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών είναι συγκρουόμενα. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν σχετική σχέση της καθεψίνης D με την πρόγνωση ασθενών με θετικούς λεμφαδένες(194-197) ενώ σε αυτές με αρνητικούς λεμφαδένες τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα (198).

Εξ αιτίας της στενής σχέσης της καθεψίνης D με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα των ανοσοϊστοχημικών αναλύσεων ο ρόλος της καθεψίνης D σαν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγων στο καρκίνωμα του μαστού παραμένει αδιευκρίνιστος.

7. Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB-1

Μια από τις μεθόδους εκτίμησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού του νεοπλασματικού ιστού είναι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 το οποίο ανιχνεύεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, G2, M) (114). Η ποσότητα του αντιγόνου διαφέρει μεταξύ των φάσεων και η μέγιστη ποσότητά του παρατηρείται στις φάσεις G2 και M (113).

Το MIB - 1 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ενός επιτόπου ανθεκτικού στη φορμαλδεΰδη του αντιγόνου Ki-67 και ταυτοποιεί τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη.

Έχει βρεθεί ότι καρκινώματα του μαστού με υψηλό ποσοστό νεοπλασματικών κυττάρων θετικών στο Ki-67/MIB-1 σχετίζονται με χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλάσματα και με παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων(114), σχετίζονται αρνητικά με την κατάσταση των οιστρογονικών υποδοχέων (114,116) και είναι ενδεικτικοί χειρότερης πρόγνωσης (117). Η παράμετρος αυτή είναι ανεξάρτητη από την ηλικία, την κατάσταση των λεμφαδένων και την παρουσία ορμονικών υποδοχέων (204).

8. Πλοϊδισμός

Η μελέτη του πλοϊδισμού των νεοπλασματικών κυττάρων, δηλ. της μέτρησης της ποσότητας του DNA στα μελετώμενα κύτταρα και του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου, γίνεται με την κυτταρομετρία ροής ή την στατική κυτταρομετρία. Φυσιολογικά, τα διπλοειδικά κύτταρα βρίσκονται στις φάσεις G0 και G1. Κύτταρα με διπλάσιο από τα φυσιολογικά ποσό DNA βρίσκονται στη φάση G2 ή M και τα κύτταρα με ενδιάμεσα ποσά DNA είναι στην φάση S. Το ποσοστό απόκλισης της ποσότητας του DNA ενός νεοπλασματικού ιστού από την ποσότητα του DNA του συγκρινόμενου φυσιολογικού ιστού είναι το DNA index του νεοπλάσματος. Ένας διπλοειδικός ιστός έχει DNA index 1.0 (199).

Στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές μελέτες σε μία προσπάθεια συσχέτισης της πλοειδικότητας των καρκινωμάτων του μαστού και της SPF(ποσοστό κυττάρων στην φάση S) με την πρόγνωση στα καρκινώματα του μαστού. Έχει βρεθεί ότι καρκινώματα χαμηλής κακοηθείας έχουν διπλοειδές ή περιδιπλοειδές DNA, ενώ η ανευπλοϊδία σχετίζεται με υψηλής κακοηθείας νεοπλάσματα (244). Στα καρκινώματα προχωρημένου σταδίου ο πλοϊδισμός φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με την ανταπόκριση στην συμπληρωματική χημειοθεραπεία και λιγότερο με την ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία, ενώ αμφισβητείται η σχέση της με την συνολική επιβίωση (199-203). Υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ αρνητικών ορμονικών υποδοχέων και ανευπλοϊδούς DNA. Επίσης τα ανευπλοϊδικά καρκινώματα έχουν υψηλό ποσοστό έκφρασης c-erbB-2 (245).

Το 1992 μια διεθνής ομάδα ερευνητών συνεκτιμώντας την κλινική χρησιμότητα εκτίμησης του πλοϊδισμού στα καρκινώματα του μαστού, κατέληξε ότι τα διπλοειδικά καρκινώματα του μαστού και τα καρκινώματα με δείκτη DNA μέχρι 1,3 είχαν σχετικά καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τα ανευπλοϊδικά καρκινώματα αλλά συνεκτιμώντας τον με άλλους προγνωστικούς δείκτες, δεν προσφέρει στατιστικά σημαντικές πληροφορίες για την πρόγνωση. Το SPF ωστόσο θεωρήθηκε να έχει σημαντική σχέση με την υποτροπή και την θνητότητα. Όμως η έντονη συσχέτισή του με το βαθμό

διαφοροποίησης έχει σαν αποτέλεσμα να ελαττώνεται η σπουδαιότητά του σαν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (202).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΕΞΑΛΛΑΓΗΣ-ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ

Η νεοπλασματική εξαλλαγή είναι μία δυναμική, πολυσταδιακή διαδικασία μετατροπής φυσιολογικών κυττάρων σε νεοπλασματικά, στην οποία διακρίνονται δύο φάσεις:

α) έναρξη (επαγωγή μη-αναστρέψιμων αλλοιώσεων στο γονιδίωμα κυττάρων, τα κύτταρα όμως αυτά δεν είναι ακόμα εξαλλαγμένα, δεν έχουν αυτονομία ανάπτυξης, ούτε μοναδικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά) και

β) προαγωγή (επαγωγή αλλοιώσεων που οδηγούν σε εξαλλαγμένες κυτταρικές μορφές - νεοπλασματικά κύτταρα). Προϋπόθεση για τη δεύτερη φάση αποτελεί η φάση της έναρξης. Μέσα από αυτές τις μεταβολές δημιουργούνται κύτταρα με μη φυσιολογικό φαινότυπο και τελικά ένας ή πολλοί κυτταρικοί κλώνοι με αυτόνομη ανάπτυξη, η οποία δεν ελέγχεται από τους φυσιολογικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και οδηγεί στη δημιουργία κακοήθους νεοπλασίας (236).

Ογκογονίδια- Ογκοκατασταλτικά Γονίδια.

Δυο ομάδες φυσιολογικών ρυθμιστικών γονιδίων έχει αποδειχθεί ότι είναι ο κύριος στόχος των ογκογενετικών παραγόντων: τα πρωτο-ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Ογκογενετικοί παράγοντες είναι οι παράγοντες που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής. Χωρίζονται σε φυσικούς (υπεριώδεις, ηλεκτρομαγνητικές και σωματιδιακές ακτινοβολίες), χημικούς (αλκυλιούντες παράγοντες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες, χρώματα ανιλίνης) και βιολογικούς (DNA και οι RNA ιοί)

Τα ογκογονίδια είναι γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στη νεοπλασματική εξαλλαγή των φυσιολογικών κυττάρων. Τα πρωτοογκογονίδια είναι φυσιολογικά κυτταρικά γονίδια τα οποία συμμετέχουν στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση.

Τα πρωτοογκογονίδια μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια μέσω μεταβολών της δομής ή/ και της λειτουργίας τους. Οι μεταβολές αυτές των πρωτο-ογκογονιδίων μπορούν να επισυμβούν με την επίδραση φυσικών , χημικών ή/ και βιολογικών παραγόντων (235).

Τα πρωτο-ογκογονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στην διέγερση του κυττάρου και στην είσοδό του στον κυτταρικό κύκλο σε φάση κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω των πρωτεϊνών που επάγουν. Αυτές ανάλογα με το ρόλο τους ταξινομούνται σε:

α) Αυξητικούς παράγοντες (Growth Factors). Φαίνεται ότι η απορύθμιση της λειτουργίας των αυξητικών παραγόντων είναι δευτερογενές φαινόμενο, δηλαδή δεν οφείλεται σε πρωτογενή βλάβη στο επίπεδο του DNA των γονιδίων που κωδικοποιούν για αυξητικούς παράγοντες αλλά οφείλεται σε ενεργοποίηση άλλων ογκογονιδίων τα οποία επιδρούν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των αυξητικών παραγόντων .

β) Πρωτεϊνοκινάσες (ένζυμα φωσφορυλίωσης). Πρόκειται για ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων σε υπόλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται σε πρωτεΐνες και εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη ή στο κυτταρόπλασμα. Οι κινάσες της τυροσίνης που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη έχουν λειτουργία υποδοχέα για αυξητικούς παράγοντες. Σε παθολογικό επίπεδο, η υπερέκφραση των υποδοχέων συνδέεται περισσότερο με υπερέκφραση φυσιολογικών υποδοχέων παρά με υπερέκφραση παθολογικών υποδοχέων (εξαίρεση αποτελεί το γονίδιο c-erb-B2 και σε μερικές περιπτώσεις το γονίδιο του EGFR).

γ) GTP-συνδέουσες πρωτεΐνες. Σ' αυτή την κατηγορία ανήκει η οικογένεια ras. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από πρωτο-ογκογονίδια της οικογένειας ras έχουν σημαντική ομολογία αμινοξέων με τις G-πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και συμμετέχουν στη μεταβίβαση του σήματος από το εξωτερικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα. Όταν η πρωτεΐνη ras p21 κωδικοποιείται από γονίδιο ras με μετάλλαξη, τότε παραμένει διαρκώς σε ενεργοποιημένη κατάσταση, γεγονός που οδηγεί σε ενίσχυση του σήματος που έχει προκαλέσει την ενεργοποίησή της. Οι μεταλλάξεις του ras είναι οι πιο συχνά απαντώμενες ανωμαλίες ογκογονιδίων στις

ανθρώπινες κακοήθειες νεοπλασίες αλλά παρατηρούνται και σε καλοήθειες νεοπλασίες, γεγονός που υπαινίσσεται πρόωμη συμμετοχή του ογκογονιδίου *ras* στην ογκογένεση.

δ) Πυρηνικές πρωτεΐνες. Τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων *myc*, *fos*, και *myc* είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και συνδέονται με ειδικές DNA αλληλουχίες. Οι περισσότερες θεωρούνται ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενέχονται στο διπλασιασμό του DNA και την κυτταρική διαφοροποίηση. Η οικογένεια *c-myc* θεωρείται ότι συμμετέχει στην παθογένεση κακοηθών νεοπλασμάτων κυρίως μέσω γονιδιακής ενίσχυσης. Εν τούτοις, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του *c-myc* και χωρίς γονιδιακή αλλοίωση και θεωρείται ότι σε αυτές τις περιπτώσεις αντανακλά περισσότερο τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Με αυτή την έννοια, η υπερέκφραση του *c-myc* θα ήταν περισσότερο αποτέλεσμα παρά αιτία ογκογένεσης.

Για τη μετατροπή ενός πρωτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο αρκεί η ενεργοποίηση του ενός μόνο αλληλόμορφου, δηλαδή, τα ογκογονίδια συμπεριφέρονται με κυρίαρχο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο. Τα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να μετατραπούν σε ογκογονίδια μέσω σημειακών μεταλλάξεων, χρωμοσωμικών διαμεταθέσεων ή/ και γονιδιακής ενίσχυσης. Σημειακές μεταλλάξεις ενεργοποιούν τα πρωτο-ογκογονίδια *ras*.

Οι χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις μπορούν να ενεργοποιήσουν πρωτο-ογκογονίδια είτε με την τοποθέτησή τους κοντά σε ισχυρούς προαγωγείς/ ενισχυτές της μεταγραφής, είτε με συγχώνευση του γονιδίου και δημιουργία νέων γενετικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν χιμαιρικές πρωτεΐνες.

Με την γονιδιακή ενίσχυση γίνεται αναδιπλασιασμός του γενετικού υλικού συγκεκριμένης περιοχής, για παράδειγμα, ενίσχυση του *cerb-B -2* πρωτο-ογκογονιδίου παρατηρείται συχνά στο καρκίνωμα του μαστού.

Μία κακοήθης νεοπλασία μπορεί να αναπτυχθεί επίσης μέσω αδρανοποίησης γονιδίων που καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (235). Αυτά τα γονίδια ονομάζονται ογκοκατασταλτικά γονίδια (αρχικά αντι-ογκογονίδια) (236) και έχουν τη δυνατότητα να

ελέγχουν αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και κατ' επέκταση να καταστέλλουν το σχηματισμό όγκων. Θεωρείται ότι τα μεταλλαγμένα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμπεριφέρονται με υπολειπόμενο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο. Κύτταρα στα οποία έχει αδρανοποιηθεί μόνο το ένα αλληλόμορφο δεν εκφράζουν νεοπλασματικό φαινότυπο. Όταν αδρανοποιηθεί και το δεύτερο αλληλόμορφο τότε παύει ο αρνητικός έλεγχος στο κυτταρικό επίπεδο και ευνοείται η δημιουργία νεοπλασίας. Δηλαδή, για την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης ενός γονιδίου είναι απαραίτητη η απώλεια ή απενεργοποίηση και των δύο αλληλόμορφων .

Χαρακτηριστικός αντιπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb gene) (220, 228).

Το γονίδιο p53 είναι επίσης ογκοκατασταλτικό, αλλά το μεταλλαγμένο p53 συμπεριφέρεται με κυρίαρχο χαρακτήρα στο κυτταρικό επίπεδο.

Ο υπέρμετρος πολλαπλασιασμός θα μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε ενεργοποίησης ογκογονιδίων, είτε απενεργοποίησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Σύμφωνα με τις τρέχουσες απόψεις, η ενεργοποίηση ενός μόνο ογκογονιδίου είναι επαρκής μόνο προσωρινά για την επαγωγή ανώμαλης κυτταρικής ανάπτυξης. Για την ανάδυση ενός αυτόνομου κυτταρικού κλώνου απαιτείται συμμετοχή πολλών ενεργοποιημένων ογκογονιδίων και αδρανοποιημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως επίσης και συμμετοχή άλλων κυτταρικών κυκλωμάτων σχετικών με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, η ανάδυση ενός αυτόνομου νεοπλασματικού κλώνου σχετίζεται με διαδικασίες επιλογής ανθεκτικών κυτταρικών κλώνων.

Κυτταρικός κύκλος, απόπτωση και ογκογένεση

Έχει αναγνωριστεί επίσης ότι η απορύθμιση των μηχανισμών ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (απορύθμιση των δικτύων p53/mdm2/p21 και Rb/p16/κυκλίνη D1 και άλλων εμπλεκόμενων μορίων όπως κυκλίνες, κυκλινοεξααρτώμενες κινάσες και αναστολείς

κυκλιοεξαρτωμένων κινασών) και της απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) ενέχεται στην ογκογένεση (214,216,217).

Ο κυτταρικός κύκλος και η απόπτωση διατηρούν την κυτταρική ομοιόσταση χρησιμοποιώντας, εν μέρει, αλληλεξαρτώμενες ρυθμιστικές οδούς. (Π.χ. το γονίδιο p53 συμμετέχει στην απόπτωση αλλά και στον κυτταρικό κύκλο- μετά από βλάβη του DNA, η έκφραση της πρωτεΐνης p53 αυξάνεται και διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση επιτρέποντας έτσι στο κύτταρο να επιδιορθώσει τη βλάβη πριν το διπλασιασμό. Εάν η βλάβη είναι μη διορθώσιμη τότε το κύτταρο αποπίπτει). Ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επάγει επίσης και το πρόγραμμα απόπτωσης το οποίο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, εκτός αν ενεργοποιηθούν σήματα επιβίωσης. Κατά συνέπεια η τελική κατάληξη (πολλαπλασιασμός ή απόπτωση) καθορίζεται από τη δυναμική σχέση προαποπτωτικών διαδικασιών κυτταρικής αύξησης / πολλαπλασιασμού και αντιαποπτωτικών μηνυμάτων κυτταρικής επιβίωσης.

Απόπτωση (226,227,228,229)

Η απόπτωση είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των φυσιολογικών ιστών (229). Είναι ο σπουδαιότερος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου στους ανθρώπους. Ρυθμίζεται από φυσιολογικά ερεθίσματα και παρατηρείται σε πολλά είδη και ιστούς. Θεωρείται ως μία μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, μια γονιδιακά κατευθυνόμενη διαδικασία που οδηγεί στην κυτταρική αυτοκτονία, με ειδικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και διαφέρει από την νέκρωση. Από βιοχημική άποψη, η απόπτωση είναι διαδικασία που απαιτεί κατανάλωση ενέργειας με τη διέγερση μεταβολικών οδών, μεταγραφή γονιδίων και πρωτεϊνοσύνθεση. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι η ενεργοποίηση ενδονουκλεασών που προκαλούν κατάτμηση του DNA σε σταθερά τμήματα.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι: συρρίκνωση του κυττάρου χωρίς διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης, πύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης, εξοίδηση του ενδοπλασματικού δικτύου, κατάτμηση του πυρήνα και τελικά κατάτμηση του κυττάρου σε σωματίδια που περικλείονται από κυτταρική μεμβράση σχηματίζοντας κυστίδια και ονομάζονται αποπτωτικά σωματίδια.

Η διαδικασία της απόπτωσης περιλαμβάνει τρεις φάσεις που περιγράφονται συνοπτικά:

α) Σήματα διέγερσης: Σημαντικό ρόλο παίζει η μεταβίβαση σήματος μέσω υποδοχέα. Η απόπτωση μπορεί να αρχίζει με τη διέγερση μιας σειράς υποδοχέων όπως CD95 (Fas/Apo1) ή TNFR (Tumour Necrosis Factor Receptor), από εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια σήματα, όπως κυτταροκίνες, ορμόνες, πρωτεΐνες ιόν, φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Τα συνδετικά μόρια (ligands) που συνδέονται με αυτούς τους υποδοχείς TNFR, ανήκουν στην υπερικογένεια παραγόντων νέκρωσης όγκων TNF (Tumour Necrosis Factor).

β) Έλεγχος και ρύθμιση: Για τη ρύθμιση της απόπτωσης συμμετέχουν ορισμένα ογκογονίδια, όπως η οικογένεια του bcl-2 και το myc, καθώς και το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Το ογκογονίδιο c-myc ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης και κατά συνέπεια μπορεί να επηρεάζει την κακοήγη εξαλλαγή μέσω μιας από τις δύο ανταγωνιστικές αυτές οδούς. Η οικογένεια bcl-2 (224,226,227) χωρίζεται σε 3 υπο-οικογένειες α) την bcl-2 β) την bax και γ) την υπο-οικογένεια BH3. Η BCL-2 υποοικογένεια συμπεριλαμβάνει Bcl-xL, mcl-1 κ.λ.π. και ευνοεί την κυτταρική επιβίωση, αναστέλλει την απόπτωση και επηρεάζεται αρνητικά από την έκφραση του p53, ενώ οι Bax και BH3 υποοικογένειες ευνοούν την απόπτωση. Η υπο-οικογένεια Bax περιλαμβάνει τις Bak και Bok, ενώ η υπο-οικογένεια BH3 τις Bik, Blk, Bad, Bid και άλλες πρωτεΐνες. Όλα τα μέλη των υπο-οικογενειών χαρακτηρίζονται από την παρουσία τουλάχιστον ενός από τα 4 (BCL-2 homology domains) BH1 ως BH4.

γ) Εκτέλεση: Οι κασπάσες λειτουργούν ως εκτελεστές της απόπτωσης και ως αποδέκτες προαποπτωτικών σημάτων. Ο τρόπος με τον οποίο οι κασπάσες επάγουν την απόπτωση έχει μερικώς κατανοηθεί και οι κάτωθι λειτουργίες έχουν ήδη καταγραφεί:

α) απενεργοποίηση πρωτεϊνών που προστατεύουν τα ζωντανά κύτταρα π.χ. (ICAD/DFP45) β) αποδόμηση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 γ) αποδόμηση των πυρηνικών λαμινών δ) απορύθμιση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνών που ενέχονται στην επιδιόρθωση του DNA (DNA-PK), στην ωρίμανση του mRNA (U1-70k) και στην αντιγραφή του DNA (αντιγραφικός παράγοντας C). Η ρύθμιση της δράσης των κασπάσων γίνεται με ένα πολύπλοκο πρωτεολυτικό σύστημα που περιλαμβάνει παράγοντες, ρυθμιστικές πρωτεΐνες και παλίνδρομη ρύθμιση (feedback). Αυτό επιτρέπει τη διατήρηση της ενεργού πρωτεάσης σε ανενεργό μορφή αλλά και τη γρήγορη ενεργοποίησή της όταν υπάρχει ανάγκη. Οι κασπάσες υφίστανται αρχικά ως πρόδρομα μόρια, τα οποία κατόπιν κατακερματίζονται σε μόρια 10-20 KDa, που δημιουργούν ετεροδιμερή και κατόπιν την ενεργό τετραμερή μορφή. Προς το παρόν 12 κασπάσες είναι γνωστές και με βάση φυλογενετικά κριτήρια διαιρούνται σε 3 κατηγορίες: α) οικογένεια CASP-1: κασπάσες 1, 4, 5, 11, 12 β) οικογένεια CASP-3: κασπάσες 3, 6, 7, 8, 10 γ) οι υπόλοιπες είναι οι 2 και 9.

Σημαντική για την απόπτωση είναι και η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα "φυσικοί φονείς" (Natural Killers-NK) μπορούν να καταστρέφουν νεοπλασματικά κύτταρα προκαλώντας απόπτωση. Εκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα, απόπτωση στα κακοήγη νεοπλασματικά κύτταρα επάγουν φυσικοί παράγοντες (γ-ακτινοβολία, υπεριώδης ακτινοβολία) και χημικοί-φαρμακευτικοί παράγοντες (σισπλατίνη, ετοποσίδη, αλκυλιωτικοί παράγοντες).

Κυτταρικός κύκλος (214,215,216)

Τα μόρια κλειδιά των ρυθμιστικών μηχανισμών των φάσεων του κυτταρικού κύκλου είναι μία ομάδα ομόλογων σερίνο-θρεονινο-κινάσων οι οποίες καλούνται κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases - CDKs). Οι καταλυτικές υπομονάδες αυτών των κινάσων είναι ενεργείς μόνον όταν σχηματίσουν συμπλέγματα με μέλη μιας κατηγορίας ασταθών ρυθμιστικών μορίων, τα επίπεδα των οποίων μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του κύκλου και γι' αυτό καλούνται κυκλίνες (Cyclins). Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί 7 CDKs και 4 ομάδες κυκλινών (D, E, A και B). Τα ενεργά αυτά

συμπλέγματα δρουν σε συγκεκριμένες φάσεις του κύκλου, κατά τις οποίες φωσφορυλιώνουν τα κατάλληλα υποστρώματα.

Υπάρχουν 2 οικογένειες κυκλινών:

- 1) Η G1 οικογένεια που περιλαμβάνει τις κυκλίνες C, D1-3 και E που μεσολαβούν τη δίοδο του κυττάρου μέσω της G1-φάσης και την είσοδο στη S-φάση και
- 2) τις μιτωτικές κυκλίνες A και B. Η κυκλίνη A συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA στην S-φάση. Οι κυκλίνες B1 και B2 μεσολαβούν τη μη αντιστρεπτή είσοδο στη μίτωση.

Η έναρξη του κύκλου του φυσιολογικού κυττάρου συνήθως πυροδοτείται από ένα εξωκυττάριο μιτογόνο ερέθισμα (π.χ. αυξητικό παράγοντα), το οποίο ενεργοποιεί μία σειρά από ενδοκυττάρια βιοχημικές μεταβολές, που καλούνται "οδός μεταγωγής του σήματος" (signal transduction pathway). Αποδέκτης αυτών των σημάτων είναι το σύμπλεγμα cyclin D-CDK4,6 το οποίο προς το τέλος της G1 φάσης με άγνωστο μηχανισμό ενεργοποιεί την cyclin E-CDK2. Οι δύο αυτές cyclin-CDKs έχουν σαν κύριο στόχο το σύμπλεγμα pRb/E2F-DP. Η φωσφορυλίωση του τελευταίου απελευθερώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F-DP, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν, μεταξύ των άλλων, μόρια της αντιγραφικής μηχανής όπως, πολυμεράση-α, κ.τ.λ. Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος pRb, E2F-DP σηματοδοτεί το σημείο χωρίς επιστροφή (Restriction point) προς την S φάση.

Η αντιγραφή του DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα ξεκινά από πολλά σημεία έναρξης (Origins of replication). Στα σημεία αυτά σχηματίζεται προς το τέλος της G1 φάσης το προαντιγραφικό σύμπλεγμα (pre-replication complex, pre RC), το οποίο είναι απαραίτητο για τη δράση των CDKs της S φάσης. Η κυριότερη εκπρόσωπος των τελευταίων είναι η cyclin A-CDK2, η οποία όχι μόνο πυροδοτεί την έναρξη της αντιγραφής αλλά εμποδίζει τον εκ νέου σχηματισμό προ-αντιγραφικών συμπλεγμάτων.

Μόλις το κύτταρο εισέλθει στην S-φάση, η κυκλίνη E φωσφορυλιώνεται από την CDK2 και αποικοδομείται μέσω της πρωτεολυτικής οδού της συμπικουϊτίνης (ubiquitin-depedent proteolysis).

Μόλις ολοκληρωθεί η αντιγραφή, το κύτταρο αρχίζει να παράγει σταδιακά κατά τη διάρκεια της G2 φάσης κυκλίνη B, η οποία συνδέεται με την CDK1(cdc2). Το σύμπλεγμα αυτό αποτελεί τον παράγοντα που προάγει την μίτωση (mitosis-promoting factor, MPF), η δράση του οποίου θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της μίτωσης. Η πλήρως ενεργοποιημένη CDK1 φωσφορυλιώνει μία σειρά από δομικές πρωτεΐνες όπως την ιστόνη H1, πυρηνικές λαμίνες, βιμεντίνη και καλδεσμόνη (caldesmon), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσπείρωση των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, την αποδιάταξη των πυρηνικών λαμινών, την αποδιάταξη των ενδιάμεσων ινιδίων, και την αναδιάταξη των μικροϊνιδίων, αντίστοιχα.

Τα βιοχημικά αυτά γεγονότα είναι καθοριστικά για την μετάβαση στην M φάση. Η μίτωση αρχίζει με την πρόφαση, η οποία ακολουθείται από το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και του μεταφασικού δίσκου (μετάφαση). Στο στάδιο αυτό οι μιτωτικές CDKs (CDK1-cdc2) ενεργοποιούν το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που προάγει την ανάφαση (Anaphase Promoting Complex, APC), το οποίο καταλύει την πρωτεόλυση μέσω της οδού της συμπικουϊτίνης, των αναστολέων της ανάφασης PDS1 και CUT2. Το APC επίσης πρωτεολύει την κυκλίνη B, στάδιο απαραίτητο για την έξοδο του κυττάρου από την τελόφαση.

Οι μηχανισμοί που αναφέρθηκαν πιο πάνω εξασφαλίζουν την αντιγραφή και την κατανομή του γενετικού υλικού αλλά δεν διασφαλίζουν την πιστότητα της αντιγραφής και της ισοκατανομής του. Επίσης οι μηχανισμοί αυτοί ευοδώνουν τον πολλαπλασιασμό, αλλά δεν δίνουν τη δυνατότητα μεταμιτωτικής διαφοροποίησης στο κύτταρο.

Έτσι, το κύτταρο έχει αναπτύξει αρνητικούς μηχανισμούς ρύθμισης και ελέγχου (ckeckpoints) του κύκλου οι οποίοι του επιτρέπουν, αφενός μεν κάτω από ορισμένες συνθήκες να διαφοροποιηθεί, αφετέρου δε να αμυνθεί στο γενοτοξικό stress του περιβάλλοντος, το οποίο μπορεί να προκαλέσει είτε βλάβη του DNA, είτε διαταραχή

στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Αν παρόλα αυτά συμβούν τέτοιες διαταραχές, αυτές οδηγούν σε μεταλλάξεις και γενωμική αστάθεια (genomic instability), οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή σε νεοπλασματική εκτροπή.

Στις φάσεις G1, S και G2 του κύκλου οι εκφραστές της αρνητικής αυτής ρύθμισης είναι δύο ομάδες μορίων με μικρό μοριακό βάρος και οι οποίες αναστέλλουν τις κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cyclin Dependent Kinases Inhibitors, CDKIs). Η πρώτη ομάδα καλείται INK4A περιλαμβάνει τους CDKIs p16, p15, p18 και p14ARF και αναστέλλει κυρίως τις CDKs 4 και 6, ενώ η δεύτερη, καλείται Cip περιλαμβάνει τους CDKIs p21WAF1, P27, p57Kip και αναστέλλει κυρίως τις CDKs 1 και 2 (Ειδικότερα η p21WAF1 αναστέλλει τις CDKs 1, 2, 4, 5 και 6, ενώ P27 τις CDKs 2, 4, 5 και 6).

Ένα κλασικό πλέον παράδειγμα της δράσης των αρνητικών ρυθμιστών αποτελεί η τυχόν ενεργοποίηση του άξονα ATM (Ataxia-Telegestasia-Mutated)-p53, η οποία οδηγεί σε G1 αναστολή (G1 arrest) μέσω της p21WAF1 και οφείλεται σε βλάβη του DNA. Εάν οι μηχανισμοί της επιδιόρθωσης του DNA αποκαταστήσουν τη βλάβη, τότε η p53 ενεργοποιεί την MDM2 η οποία με τη σειρά της αίρει την αναστολή του κύκλου, μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης. Στην περίπτωση της αποτυχίας της επιδιόρθωσης του DNA ενεργοποιείται ο μηχανισμός του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Ανάλογοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί έχουν αναπτυχθεί και στην M φάση. Έτσι, διαταραχή στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Bub, Mad και Mps 1, οι οποίες αναστέλλουν μέσω της cdc20 την APC οδηγώντας το κύτταρο σε μεταφασική αναστολή (Metaphase arrest).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ρύθμιση της p53 από την mdm-2, η οποία πραγματοποιείται α) ως αποτέλεσμα φυσικής αντίδρασης (αντίδραση πρωτεΐνης / πρωτεΐνης) μεταξύ p53 και mdm2 και β) ως δυνατότητα της mdm2 πρωτεΐνης να μειώνει τη μεταγραφική δράση της p53 και να προκαλεί την αποδόμηση της p53.

Αναλυτικότερα η ρύθμιση της αλληλοεπίδρασης p53/mdm2 επιτελείται μέσω α) αλλαγών στο p53 που οφείλονται σε ομοιοπολικές μετατροπές και β) μη ομοιοπολικών ρυθμιστών της σύνδεσης p53/mdm2. Πράγματι πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι α) φωσφορυλίωσης της p53 επαγόμενη από βλάβη του DNA μειώνει την αλληλεπίδραση p53/mdm2 και β) το προϊόν του εναλλακτικού πλαισίου ανάγνωσης (ARF) που εντοπίζεται στο γονιδιακό τόπο P16INK4A μπορεί να συνδέεται με την mdm2 και μειώνει την mdm2-επαγόμενη αποδόμηση της πρωτεΐνης p53. Κατά συνέπεια η διαταραχή της αλληλεπίδρασης p53/mdm2 μπορεί να οδηγήσει σε σταθεροποίηση και ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53.

Απόπτωση και κυτταρικός κύκλος (217,218,225)

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αλληλεξάρτηση του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης.

Το p53 έχει βρεθεί ότι καταστέλλει την έκφραση του bcl-2 και ενεργοποιεί την έκφραση του bax γονιδίου. Υψηλά επίπεδα της bcl-2 πρωτεΐνης ευνοούν την κυτταρική επιβίωση, ενώ υψηλά επίπεδα της p53 πρωτεΐνης οδηγούν σε αύξηση της bax και ελάττωση της bcl-2, οδηγώντας την ισορροπία του κυττάρου προς την κατεύθυνση της απόπτωσης.

Επίσης υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι το Rb μπορεί να παρουσιάζει γενικευμένη δράση καταστολέα απόπτωσης καθότι δρα ως τέτοιος παράγοντας σε αποπτωτικές διαδικασίες που επάγει το p53 και ο TGF-β. Επιπλέον, αποδόμηση της Rb πρωτεΐνης από κασπάσες φαίνεται να είναι σημαντική για την αποτελεσματική επαγωγή της απόπτωσης από τους TNF και CD95.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ως προς την παθογένεση των νεοπλασμάτων η διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής θα μπορούσε να είναι:

-Μεταλλάξεις του DNA των φυσιολογικών κυττάρων από ογκογόνους παράγοντες.

-Ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονοδίων και αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων .
Τα ενεργοποιημένα πρωτο-ογκογονίδια δρουν ως ογκογονίδια και προάγουν την αυτόνομη κυτταρική ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυτταρικών πληθυσμών μέσω:

- α) κωδικοποίησης για αυξητικούς παράγοντες,
- β) κωδικοποίησης για υποδοχείς αυξητικών παραγόντων οι οποίοι είναι είτε ελλειμματικοί στη δομή τους, είτε ενισχυμένοι,
- γ) κωδικοποίησης για μεμβρανικές ή/ και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σημαντικές για τη μεταβίβαση σημάτων στο εσωτερικό των κυττάρων και
- δ) κωδικοποίησης για πρωτεΐνες ρυθμιστές της απόπτωσης.

Η αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων αίρει τον αρνητικό έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και προάγει με αυτόν τον τρόπο την επέκταση κλώνων που υπό άλλες συνθήκες μπορεί να μην επιβίωσαν .

Η αναστολή των προγραμμάτων απόπτωσης είναι επίσης σημαντική στην απορύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η ανάπτυξη του καρκινώματος του μαστού είναι το αποτέλεσμα μιας συσσώρευσης γενετικών και μοριακών μεταβολών στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει για την μελέτη των μεταβολών αυτών σε οικογενείς και σποραδικές περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού (25,26,28,91) για να κατανοήσουμε καλύτερα την πορεία της καρκινογένεσης και να δοθούν πληροφορίες που μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς (240).

Υπολογίζεται ότι περίπου 70% των καρκινωμάτων του μαστού περιέχουν κυτταρογενετικές ανωμαλίες (24). Οι ανωμαλίες αυτές είναι συχνά πολύπλοκες και περιλαμβάνουν αρκετές δομικές αλλοιώσεις. Ένας σημαντικός αριθμός γονιδιακών τόπων έχει τροποποιηθεί, αλλά καμμία συγκεκριμένη χρωμοσωμική ανωμαλία δεν έχει τυποποιηθεί σταθερά σε όλα τα καρκινώματα του μαστού. Οι πιο συχνές και προφανώς μη τυχαίες ανωμαλίες παρατηρούνται στα χρωμοσώματα 1, 6, 7, 11, 3 και 19 (6,7). Οι γενετικές μεταβολές που μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί να σχετίζονται με το καρκίνωμα του μαστού προκαλούν ενίσχυση ενός αριθμού ογκογονιδίων (c-erbB2, EGFR, bcl-2, κυκλίνη D1 και c-myc) και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (p53, Rb). Σε οικογενή καρκινώματα μαστού έχουν προσδιοριστεί μεταλλάξεις σε γενετικά κύτταρα στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 (25,26,29,30). Με την εξέλιξη και απλοποίηση των μεθόδων της μοριακής βιολογίας νέα γονίδια και συσχετίσεις μεταξύ τους θα προσδιοριστούν.

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητικές προσπάθειες κατευθύνονται κυρίως προς τα γεγονότα που επισυμβαίνουν πρώιμα, στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης. Αντίστοιχα, η κλινική προσπάθεια κατευθύνεται στην πρώιμη διάγνωση με τα εκτεταμένα μαστογραφικά προγράμματα μαζικού ελέγχου (screening). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να ανιχνεύονται αλλοιώσεις του τύπου του πρώιμου (early) καρκινώματος

(συμπεριλαμβανομένου του ενδοεπιθηλιακού -in situ-) και των επιθηλιακών υπερπλαστικών αλλοιώσεων, ατύπων ή μη (32). Οι μελέτες αυτών των αλλοιώσεων ενδέχεται να οικοδομήσουν ένα θεωρητικό υπόβαθρο πάνω στο οποίο θα μελετηθούν τα αρχόμενα στάδια της καρκινογένεσης του μαστού και είναι πιθανό να αποκτηθούν χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά την πληθυσμιακή μελέτη, την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία της νόσου αυτής (239).

Αναγνωρίζοντας ότι η έναρξη και η εξέλιξη κακοηθών νεοπλασμάτων είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που προκαλεί αλλαγές στο φαινότυπο και στο γονότυπο των μεταλλαγμένων κυττάρων, έχουν αναπτυχθεί διάφορα θεωρητικά πρότυπα που σχετίζουν τις μεταβολές αυτές με τις συγκεκριμένες φάσεις της νεοπλασματικής εξέλιξης. Το καλύτερα περιγεγραμμένο πρότυπο είναι αυτό του αδενοκαρκινώματος του παχέως εντέρου (33).

Αντίστοιχο πρότυπο στο καρκίνωμα του μαστού δεν έχει πλήρως διαμορφωθεί για διάφορους λόγους. Οι μορφολογικές προκαρκινικές καταστάσεις του διηθητικού καρκινώματος του μαστού, με πιθανή εξαίρεση το ενδοεπιθηλιακό προγενές καρκίνωμα, δεν έχουν αποσαφηνισθεί.

Είναι αποδεκτό πλέον (34) ότι η τελική λοβιακή μονάδα είναι το δομικό στοιχείο όπου πιθανότατα αναπτύσσεται το καρκίνωμα του μαστού. Αποτελείται από επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Το πιθανότερο είναι ότι οι δυο αυτοί πληθυσμοί προέρχονται από ένα αρχέγονο κύτταρο. Ωστόσο τέτοιο κοινό κύτταρο δεν έχει ακόμα ανιχνευθεί .

Αρκετοί ερευνητές (35,36,37) υποστηρίζουν, βασιζόμενοι α) στην γενική υπόθεση σε διάφορα όργανα ότι η επιθηλιακή υπερπλασία εξελίσσεται μέσω μορφολογικά αναγνωρίσιμων μεταβολών σε άτυπη υπερπλασία και σε ενδοεπιθηλιακό και διηθητικό καρκίνωμα, β) στην συνύπαρξη και γειτονία των υπερπλαστικών αλλοιώσεων του μαστού με καρκινώματα και γ) στην σχέση τους με την αύξηση της επικινδυνότητας νόσησης από καρκίνωμα, ότι το πρότυπο της καρκινογένεσης του μαστού ακολουθεί την εξελικτική πορεία επιθηλιακή υπερπλασία (πόρων-λοβίων), άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία (πόρων – λοβίων), ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα (πορογενές – λοβιακό),

διηθητικό καρκίνωμα. Τα αποδεικτικά στοιχεία για τέτοια εξέλιξη στο μαστό, με πιθανή εξαίρεση της σχέσης ενδοεπιθηλιακού - διηθητικού καρκινώματος, είναι ακόμα πενιχρά.

Η μελέτη των πιθανών προκαρκινικών αλλοιώσεων είναι δύσκολη σε μοριακό επίπεδο γιατί είναι μικρού μεγέθους, μη αναγνωρίσιμες μακροσκοπικά και είναι συχνά ενδιάμεσες σε άλλες παθολογικές αλλοιώσεις ή φυσιολογικό ιστό. Έτσι οι μόνες μέθοδοι που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη αυτών των αλλοιώσεων είναι η ανοσοϊστοχημεία και ο *in situ* υβριδισμός.

Μελέτες έκφρασης του γονιδίου *c-erb-B2* απέδειξαν ότι υπερέκφραση της πρωτεΐνης *c-erb-B2* παρατηρείται συχνότερα στα ενδοεπιθηλιακά, σε ποσοστό 65 - 100% απ' ό,τι στα διηθητικά καρκινώματα (15 - 30%) (38, 78). Σε περιπτώσεις συνύπαρξης ενδοεπιθηλιακού και διηθητικού καρκινώματος υπερέκφραση παρατηρήθηκε και στα δύο τμήματα (39). Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζουν ότι η απορρύθμιση του *c-erb-B2* είναι ένα αρχικό γεγονός στην ανάπτυξη της κακοήθειας, αλλά πιθανότατα δεν είναι βασικό για την εξέλιξη του ενδοεπιθηλιακού σε διηθητικό καρκίνωμα.

Οι μεταβολές στο *c-erb B2* δεν είναι τυπικές για όλους τους τύπους των καρκινωμάτων του μαστού, αλλά ίσως να χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο πρότυπο ανάπτυξης της καρκινογένεσης που έχει σχέση με τα χαμηλής διαφοροποιήσεως καρκινώματα (216).

Σε πρόσφατη μελέτη βιολογικών δεικτών σε πιθανές προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού (239) παρατηρήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER) και γενετικές μεταβολές σε κύτταρα άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας.

Οι περαιτέρω μελέτες των προκαρκινικών αλλοιώσεων με μοριακές τεχνικές και η ταυτοποίησή τους αναμένεται να προσφέρουν χρήσιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη και πορεία του καρκινώματος του μαστού.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Το υλικό της μελέτης μας αποτελείται από 144 περιπτώσεις καρκινωμάτων μαστού, οι οποίες προέρχονται από το αρχείο των παθολογοανατομικών εργαστηρίων των νοσοκομείων ΠΕΠΙΑΓΝΗ και ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟΥ. Οι περιπτώσεις αντιστοιχούν σε γυναίκες, ηλικίας από 28 έως 82 ετών. 63 καρκινώματα εντοπίστηκαν στον αριστερό μαστό και 81 στο δεξιό μαστό. Σε 85 από αυτές είχε γίνει συγχρόνως λεμφαδενικός καθαρισμός και οι 59 είχαν καρκινωματώδη διήθηση στους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ενώ οι 26 είχαν αρνητικούς λεμφαδένες.

Όλοι οι ιστοί είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% και είχαν εμβαπτισθεί σε παραφίνη. Από τις μελετηθείσες τομές ρουτίνας ηωσίνης - αιματοξυλίνης επιλέχθηκαν εκείνες στις οποίες το υλικό ήταν επαρκές και δεν παρουσίαζε εκτεταμένες νεκρώσεις. Από τους αντίστοιχους κύβους παραφίνης κόπηκαν συνεχείς τομές πάχους 3 - 4 μ και χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας.

Τεχνική ανοσοϊστοχημείας

Η ανοσοϊστοχημική τεχνική που χρησιμοποιήσαμε στην μελέτη μας ήταν αυτή της αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφατάσης (ΑΡΑΑΡ) (207).

Μέθοδος αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφοτάσης (ΑΡΑΑΡ)

Αποπαραφίνωση πλακιδίων στον κλίβανο όλη τη νύχτα (overnight) στους 37° C. Ολοκλήρωση της αποπαραφίνωσης με διαδοχική εμβάπτιση των τομών σε 3 μπανάκια ξυλόλης, για 5 λεπτά στο καθένα. Ενυδάτωση σε κατιούσα οιοπνευμάτων από 100⁰ μέχρι 70⁰, ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό και ακολούθως εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα ΤΒS (Tris Buffer Solution-pH 7,6) για 5 λεπτά. Θέρμανση των τομών για τα αντισώματα p53, MDM-2, p21/WAF1, bcl-2 και MIB-1 εμβαπτισμένων

σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού ρυθμιστικό διαλύματος pH=6 (διάλυμα κιτρικού οξέως και κιτρικού νατρίου) σε φούρνο μικροκυμάτων επί 5 λεπτά, τρεις φορές. Αποθέρμανση πλακιδίων μέσα στο διάλυμα μικροκυμάτων. Εμβάπτυνσή τους σε απεσταγμένο νερό για 15 λεπτά και κρύωμα των πλακιδίων σε TBS. Επώαση με φυσιολογικό ορό κουνελιού (normal rabbit serum, DAKO X0902), για τα μονοκλωνικά αντισώματα και με φυσιολογικό ορό χοίρου (normal swine serum), για τα πολυκλωνικά αντισώματα, σε αραιώση 1/20 με TBS για 1/2 ώρα. Ελαφρό σκούπισμα των τομών και τοποθέτηση του πρωτογενούς αντισώματος στην κατάλληλη αραιώση με προσθήκη 1% BSA και τον κατάλληλο χρόνο. Μετά οι τομές ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα TBS για 5 λεπτά την κάθε φορά..

Τοποθέτηση του δευτερογενούς αντισώματος (rabbit ή swine anti-mouse Ig - Z0259, DAKO) με 1/20 BSA (Bovine serum albumin) για 1/2 ώρα. Ξέπλυμα των τομών δύο φορές με TBS για 5 λεπτά κάθε φορά . Πρόσθεση του συμπλέγματος αλκαλικής-αντιαλκαλικής φωσφοτάσης (D0651, DAKO mouse APAAP immunoglobulins) για ½ ώρα.

Με την μέθοδο της διπλής ενίσχυσης η ένταση της αντίδρασης ενισχύεται επαναλαμβάνοντας τα βήματα με το δευτερογενές αντίσωμα και το APAAP σύμπλεγμα προκειμένου να είναι πιο έντονη η χρωματική αντίδραση.

Ακολουθεί έκπλυση των τομών με TBS 2X5 λεπτά και επώαση με διάλυμα υποστρώματος-χρωμογόνου επί 20 λεπτά στο σκοτάδι. Το σύστημα υποστρώματος-χρωμογόνου που χρησιμοποιήσαμε είναι το Naphthol FAST RED, DAKO (K699) (208). Στη συνέχεια ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό για 10 λεπτά εμβάπτισμα σε διάλυμα αιματοξυλίνης, ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό για 10-15 λεπτά και κάλυψη με Glycergel.

Θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις τεχνικές. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες παραλήφθηκε το πρωτογενές αντίσωμα.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των περιπτώσεών μας ήταν τα bcl-2, p53, WAF/p21, MDM-2, MIB-1, cerbB-2 και ER.

Ειδικότερα για το κάθε αντίσωμα αναφέρουμε :

bcl-2 (M0887, DAKO): Η επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έγινε για 1 ώρα σε αραιώση 1/25 και ακολούθησε η APAAP μέθοδος με διπλή ενίσχυση.

p53 (D-07, M7001, DAKO): Η επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έγινε για 2 ώρες, σε αραιώση 1/100.

Πριν από το στάδιο της επώασης με το normal rabbit serum, οι τομές τοποθετήθηκαν σε μπανάκι με διάλυμα TUF (target unmasking Fluid) σε αραιώση 1/3 με απεσταγμένο νερό και το μπανάκι τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο 80° - 90° για 10 λεπτά. Οι τομές παρέμειναν στο TUF έξω από το υδατόλουτρο για άλλα 15 λεπτά έως ότου κρυσώσουν και ακολουθήθηκε ξέπλυμα δύο φορές σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και ξέπλυμα δύο φορές με TBS για άλλα 5 λεπτά (208).

WAF/p21 (Ab-1, Oncogene OP64): Η επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έγινε για 1 ώρα, σε αραιώση 1/50 και ακολούθησε η APAAP μέθοδος.

MDM-2 (Ab-1, Oncogene OP46): Η επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα έγινε για 1 ώρα, σε αραιώση 1/20 και ακολούθησε η APAAP μέθοδος.

MIB-1 (ki67) (Immunotech, 0607): Η επώαση έγινε για 1 ώρα, σε αραιώση 1/25 και ακολούθησε η APAAP μέθοδος με διπλή ενίσχυση.

cerbB-2 (Dako, Polyclonal, A 0485): Η επώαση με το πολυκλωνικό αντίσωμα έγινε για 1 ώρα, σε αραιώση 1/300 και ακολούθησε η APAAP μέθοδος.

ER (Dako, 1D5, M 7047): Η επώαση έγινε για 1 ώρα, το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε αδιάλυτο και ακολούθησε η APAAP μέθοδος.

ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΟΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Ορμονικοί υποδοχείς

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR) είναι πυρηνικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια των χρωματοσωμάτων 6 και 11 αντίστοιχα. Κάθε υποδοχέας περιλαμβάνει ένα τμήμα σύνδεσης με την ορμόνη και ένα τμήμα σύνδεσης με το DNA. Έχει βρεθεί ότι η αλληλουχία συγκεκριμένων αμινοξέων στο τμήμα σύνδεσης είναι σημαντική στην αναγνώριση της ορμόνης και ότι μεταβολή των αμινοξέων αυτών μπορεί ή να αποκλείσει τελείως την σύνδεση ή να ελαττώσει την ικανότητα σύνδεσης με την ορμόνη αυτή (177).

Η σύνδεση των ορμονών με τους υποδοχείς τους φαίνεται να επαυξάνει τη μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Μερικά από τα γονίδια αυτά άμεσα ή έμμεσα προκαλούν την εγκατάσταση και υπερλειτουργία αυτοκρινικών ή παρακρινικών αυτοτροφοδοτικών αλυσίδων. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων είναι ακόμα άγνωστος. Όσον αφορά τους οιστρογονικούς υποδοχείς μέχρι τώρα μόνο λίγα γονίδια έχουν βρεθεί να είναι άμεσοι στόχοι της δράσης των. Ανάμεσα σε αυτούς είναι ο προγεστερονικός υποδοχέας και η πρωτεΐνη pS2 (178).

Επίσης, υπάρχουν ενδείξεις ότι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγων α (TGFα) και ο ομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγων και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο υποδοχέας EGF και c-erb-B 2 μπορεί να απορυθμιστούν σε καρκινικά κύτταρα μαστού μετά από θεραπεία με οιστραδιόλη (179,180).

Η δράση των ER και PR σαν πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή στα καρκινώματα του μαστού και η έκφρασή τους στους νεοπλασματικούς ιστούς σχετίζεται με την πρόγνωση και την ανταπόκρισή του στην ορμονοθεραπεία.

Οι ακριβείς μηχανισμοί που ακολουθούνται δεν είναι εξακριβωμένοι, όμως περαιτέρω μελέτες στη μοριακή βιολογία αυτών των πρωτεϊνών θα δώσουν νέα μηνύματα για τους ρυθμιστικούς και λειτουργικούς μηχανισμούς των νεοπλασματικών κυττάρων.

Όπως είπαμε παραπάνω, σε επιλεγμένους ιστούς-στόχους έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό αλλά και τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων και του υποδοχέα της προγεστερόνης. Έτσι, αφού ο υποδοχέας προγεστερόνης επάγεται από τα οιστρογόνα, η έκφρασή του υποδηλώνει μια μη διαταραγμένη λειτουργική κατάσταση του υποδοχέα οιστρογόνων. Οι γυναίκες εκείνες, λοιπόν, των οποίων τα καρκινώματα μαστού εκφράζουν ER και PR έχουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα ανταπόκρισης σε ορμονοθεραπεία (179).

Η ανίχνευση και μέτρηση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων μπορεί να γίνει με βιοχημικές μεθόδους σε ομογενοποιημένο φρέσκο ιστό, με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ή με τεχνικές *in situ* υβριδισμού (54).

Οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι στις μέρες μας, μετά την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν επίτοπους των υποδοχέων δίνουν ευαίσθητα, αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, ακόμα και σε τομές παραφίνης έτσι ώστε να θεωρούνται πλέον οι τεχνικές εκλογής για την ανίχνευση των υποδοχέων αυτών.

2. Πρωτεΐνη c-erbB-2 (c-neu/HER-2)

Το c-erbB-2 είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 185 k DA, την p185. Η πρωτεΐνη p185 είναι ένα φυσιολογικό συστατικό των κυτταροπλασματικών μεμβρανών, έχει ένα ενδοκυττάριο συστατικό με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και ένα εξωκυττάριο συστατικό με δομικές ομοιότητες με υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (64) και εκφράζεται σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα (65,66).

Το ογκογονίδιο c-erb-B 2 είναι ενισχυμένο και υπερεκφράζεται σε περίπου ένα τέταρτο των καρκινωμάτων του μαστού. Η ενίσχυση και η υπερέκφραση τείνουν να

εμφανίζονται συγχρόνως, αν και το κάθε γεγονός μπορεί να συμβαίνει ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Αυτό το τελευταίο φαινόμενο επισυμβαίνει σε περίπου 2 - 10% των καρκινωμάτων (80,81). Λίγα είναι γνωστά για τις υποκείμενες αιτίες και τους μηχανισμούς της υπερέκφρασης και ενίσχυσης του γονιδίου σε καρκίνωμα του μαστού. Γενετικές αναδιατάξεις του c-erb-B 2 είναι σπάνιες και δεν έχουν ανιχνευθεί σημειακές μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για την ενίσχυση στα γονίδια του ανθρώπου (181).

Οι βιολογικές λειτουργίες του γονιδίου c-erb-B 2 και της πρωτεΐνης p185 στο φυσιολογικό κύτταρο παραμένουν εν πολλοίς αδιευκρίνιστες. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη p185 είναι ένας υποδοχέας χωρίς τμήμα σύνδεσης που ενισχύει τα σήματα που προέρχονται από άλλους υποδοχείς της οικογένειας c-erb-B με ετεροδιμερισμό τους. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων c-erb-B1, 3 και 4 από τον EGF έχει σαν αποτέλεσμα τον ετεροδιμερισμό τους και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση του c-erb-B 2.

Αδιευκρίνιστη είναι και η βιολογική δράση της ενίσχυσης και υπερέκφρασής τους στα νεοπλασματικά κύτταρα, αν και η υποτιθέμενη λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου σαν υποδοχέας αυξητικού παράγοντα υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση ίσως προκαλεί μία επιλεκτική αυξητική ικανότητα στα αντίστοιχα κύτταρα. Η πρωτεΐνη p185 ίσως να σχετίζεται με την κυτταρική κινητικότητα και είναι πιθανό ότι η υπερέκφραση της παίζει κάποιο ρόλο στην τοπική επέκταση των κακοηθών κυττάρων σε ενδοεπιθηλιακά καρκινώματα και στην επιδερμίδα στη νόσο του Paget (81).

Η συνέργεια ανάμεσα στις p185 και άλλων υποδοχέων στην οικογένεια του erbB ίσως στο μέλλον εξηγήσει την συμβολή της αποδιοργάνωσης του c-erbB2 στην ογκογένεση (82).

3. Πρωτεΐνη p53

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που αποτελείται από 393 αμινοξέα. Η

πρωτεΐνη p53 ρυθμίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την απάντηση σε βλάβες του DNA, την έναρξη επισκευής και αναδιπλασιασμού του DNA, την επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) και την προώθηση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ο χρόνος ημισείας ζωής της είναι ελάχιστος και πρακτικά είναι μη ανιχνεύσιμη ανοσοϊστοχημικά.

Όταν όμως τα κύτταρα εκτεθούν σε διάφορους βλαπτικούς για το DNA παράγοντες, όπως υπεριώδης ή ιονίζουσα ακτινοβολία (68), μόλυνση από διάφορους ιούς κ.λ.π., τότε το γονίδιο p53 ενεργοποιεί τη λειτουργία του με διάφορους τρόπους. Ο τρόπος ενεργοποίησης έχει σχέση με το είδος του βλαπτικού παράγοντα και τον τύπο του κυττάρου - στόχου (69). Τελικώς επιτυγχάνεται σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 και συσώρευση της μέσα στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη συνδέεται με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA και δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει θετικά ή αρνητικά την έκφραση ορισμένων γονιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G1 (70) και κατ' επέκταση την παρεμπόδιση διπλασιασμού και αντιγραφή του βεβλαμένου DNA. Στη φάση αυτή δίνεται η δυνατότητα σε μηχανισμούς επανόρθωσης να δράσουν και να διορθώσουν τις αλλοιώσεις του DNA. Αν η επιδιόρθωση επιτευχθεί, το κύτταρο επανέρχεται στην φυσιολογική πορεία του κυτταρικού κύκλου. Άλλως το κύτταρο θα οδηγηθεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης (73).

Έτσι, επιτρέποντας την επιδιόρθωση του βεβλαμένου DNA ή άλλως τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αν δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η επιδιόρθωση, το p53 αποτρέπει αποτελεσματικά την εμφάνιση γενετικά ανωμάτων κλώνων. Γι αυτό και δίκαια θεωρείται ο "φρουρός" του κυτταρικού γονιδιώματος (73).

Ο μηχανισμός της απόπτωσης προκαλείται είτε διαμέσου της ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων που προάγουν την απόπτωση (π.χ. bax), είτε από γεγονότα που σχετίζονται με τη μετάδοση σήματος διαμέσου κινασών (72).

Η δράση της πρωτεΐνης p53 είναι πολλαπλή:

- Ρυθμίζει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων, υπεύθυνων για την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (π.χ. p21/waf1) ή υπεύθυνων για την προαγωγή του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) (71) ή και γονιδίων που σχετίζονται με μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (72).
- Ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική απάντηση σε βλάβες του DNA
- Εμποδίζει τον διπλασιασμό και τη μεταγραφή του DNA
- Προάγει μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA
- Επάγει την επιδιόρθωση και αντιγραφή του DNA
- Επάγει την απόπτωση και
- Προάγει την κυτταρική διαφοροποίηση (73-75)

Όπως είπαμε η φυσιολογική πρωτεΐνη p53, που είναι προϊόν του φυσικού τύπου του γονιδίου p53 (wild type ή wt p53) είναι ασταθής (γιατί έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής) και δεν είναι ανιχνεύσιμη ανοσοϊστοχημικά (76).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της p53 υποδηλώνει είτε μετάλλαξη του γονιδίου p53 οπότε παράγεται σταθεροποιημένη και μη λειτουργική p53 (77), είτε σύνδεση της p53 με ιικές πρωτεΐνες (SV40, αδενοϊοί, HPV) ή άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες (π.χ. την πρωτεΐνη mdm2 ή μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53), οπότε καθίσταται σταθερή και ανιχνεύσιμη αλλά και απενεργοποιημένη (77).

Η απενεργοποίηση αυτή του p53 έχει σαν αποτέλεσμα ότι κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε ογκογόνους παράγοντες δεν καταστρέφονται αλλά αναδιπλασιάζουν το DNA τους δημιουργώντας την αρχή μιας πιθανής κακοήθους εξαλλαγής.

Μεταλλάξεις του γονιδίου p53 έχουν μελετηθεί και ανευρεθεί σε διάφορα όργανα (127,78) και σε καρκινώματα του μαστού (127, 80) που οδηγούν σε παραγωγή μιας πρωτεΐνης με αλλαγμένα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά (81,82). Η πλειονότητα από αυτές είναι «μεταλλάξεις αλλαγής του νοήματος» (missense mutations).

Μοριακές μεταβολές που έχουν μελετηθεί στο γονίδιο p53 σε καρκινώματα του μαστού είναι:

- Μεταλλάξεις αλλαγής νοήματος (missense mutations) στην περιοχή των εξονίων 5 - 9 (81,82)
- Απώλεια ετεροζυγωτίας ή ομόζυγη απάλειψη και των δύο αλληλίων που έχουν σαν αποτέλεσμα την απορρύθμιση της λειτουργίας του p53 σε σχέση με τα κλασσικά πρότυπα της ογκοκατασταλτικής του δραστηριότητας.

Φαίνεται όμως ότι τα μεταλλαγμένα γονίδια p53 μπορεί όχι μόνο να απωλέσουν την ογκοκατασταλτική δράση τους αλλά επίσης να δράσουν και σαν κυρίαρχα ογκογονίδια. Στην πραγματικότητα, για πολλά χρόνια μετά την ανακάλυψή του p53, εθεωρείτο μόνο ογκογονίδιο, γιατί ορισμένοι μεταλλαγμένοι τύποι του p53 έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν κύτταρα *in vitro*, όπως κάνουν πολλά ογκογονίδια. Η μοριακή βάση της συμπεριφοράς αυτής μπορεί να έχει εν μέρει σχέση με τη δραστηριότητά του ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Φαίνεται ότι ορισμένοι μεταλλαγμένοι τύποι του p53 παράγουν τροποποιημένες πρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα να συνδέονται και να απενεργοποιούν την φυσική πρωτεΐνη. Έτσι, ένα κύτταρο με ένα μεταλλαγμένο και ένα φυσιολογικό αλληλίο τελικά συμπεριφέρεται σαν να μην έχει καθόλου λειτουργική p53. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις ονομάζονται "κυρίαρχα αρνητικές" γιατί το μεταλλαγμένο αλληλίο δρα κυρίαρχικά εκμηδενίζοντας ή κρύβοντας το φυσιολογικό αλληλίο.

Με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους είναι δυνατή η ανίχνευση της συσσωρευμένης p53 σε ποικίλα νεοπλάσματα (9-17) αλλά επηρεάζεται από πολλές μεθοδολογικές παραμέτρους και πρέπει να ερμηνευθεί με προσοχή (83). Οι περισσότερες μελέτες βρίσκουν θετικότητα στην ανοσοϊστοχημική διερεύνηση του p53 σε 14-58% των καρκινωμάτων του μαστού (84), αν και υπάρχουν αρκετές αποκλίσεις λόγω των διαφορών στην τεχνική (επιλογή αντισώματος, μονιμοποίηση ιστού, κατεργασία ιστών, κ.λ.π.) και την αξιολόγηση.

Ίσως όμως να είναι πολύ απλουστευμένος ο διαχωρισμός σε φυσικό και τροποποιημένο τύπο p53, ενώ είναι γνωστό ότι υπάρχουν ποικίλα γεγονότα που μπορεί να επηρεάσουν

τις δραστηριότητες και τις λειτουργίες της p53 στο κύτταρο. Και ίσως θα ήταν πιο ουσιαστική η προσπάθεια διερεύνησης των μοριακών μεταβολών και των υποκείμενων μηχανισμών που προκαλούν τις συσσώρευση της p53 και η συσχέτισή αυτών με την πορεία της νόσου και ίσως με τον διαφορετικό φαινότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων.

Είναι λοιπόν πιθανόν ότι τα αποτελέσματα της μελέτης της p53 σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο να δώσουν περισσότερο κλινικά σημαντικές πληροφορίες (90).

4. Πρωτεΐνη MDM 2

Η πρωτεΐνη MDM 2 είναι μία πυρηνική πρωτεΐνη, 90 kDa, που κωδικοποιείται από το γονίδιο MDM 2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q13-q14. Έχει δύο περιοχές σύνδεσης μετάλλου, η μία από τις οποίες ομοιάζει με τους ενεργοποιητές της μεταγραφής που περιέχουν δακτύλιο ψευδαργύρου. Περιέχει ακόμα ένα θεωρούμενο τμήμα πυρηνικής εντόπισης και μία οξική δομή όμοια με αυτή σε ενεργοποιητές της μεταγραφής.

Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη MDM 2 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενός οργανισμού (92,93).

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η φυσική πρωτεΐνη p53 έχει την ικανότητα να προωθήσει τη μεταγραφή του γονιδίου MDM 2 (129,130).

Η πρωτεΐνη MDM 2 σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με την wt-p53 και αδρανοποιεί τη λειτουργία της (92,93). Αναστέλλει δηλαδή την ικανότητα του p53 να διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1 και να προκαλεί απόπτωση. Ακόμα μπορεί να εκτοπίσει την p53 από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, προάγοντας έτσι την ταχεία αποδόμισή της (94).

Η MDM 2 έχει την ικανότητα να συνδέεται και με την μεταλλαγμένη p53 (95). Συνεπώς, οι πρωτεΐνες p53 και mdm2 αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας έναν αυτορρυθμιζόμενο ανατροφοδοτούμενο κύκλο (130,131).

Η σταθεροποίηση και ενεργοποίηση λοιπόν της p53 μπορεί να συμβεί με παρεμβολή στην ικανότητα σύνδεσης των δύο πρωτεϊνών, π.χ. βλάβη του DNA προκαλεί φωσφορυλίωση της p53 και η φωσφορυλιωμένη p53 έχει ελαττωμένη ικανότητα σύνδεσης με την MDM-2 ή με παρεμβολή στην ικανότητα της MDM-2 να προκαλεί αποδόμηση της p53. Αυτό γίνεται μετά από σύνδεση της πρωτεΐνης MD-2 με τον παράγοντα ARF (alternate reading frame), ο οποίος ενεργοποιείται από κυτταρικά και ιικά γονίδια, με αποτέλεσμα την αναστολή της ικανότητας της MDM-2 να προκαλέσει αποδόμηση της p53. Ακόμα, η έκφραση του παράγοντα ARF ρυθμίζεται αρνητικά από την ίδια την p53. Το μοντέλο συνέργειας λοιπόν p53, MDM 2 και ARF φαίνεται να λειτουργεί ως εξής:

Η p53 ρυθμίζει θετικά την έκφραση του αναστολέα της, της MDM 2, και αρνητικά την έκφραση του ενεργοποιητή της, του ARF, διατηρώντας χαμηλό το επίπεδό της σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες.

Σε παθολογικές καταστάσεις οι δομικές αλλαγές της p53 εμποδίζουν την αλληλεπίδραση p53- MDM2, ενώ οι μεταβολές ογκογονιδίων προάγουν την έκφραση του ARF που αναστέλλει την αποδόμηση της p53 από την MDM 2. Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε αυξημένα επίπεδα p53 πρωτεΐνης.

Το γονίδιο MDM 2 αποκτά ογκογόνο δράση όταν ενισχύεται ή υπερεκφράζεται. Έχει βρεθεί να ενισχύεται σε σαρκώματα (147) και γλοιώματα, να υπερεκφράζεται χωρίς να υπάρχει σύγχρονη γονιδιακή ενίσχυση σε λεμφώματα και σε μερικούς τύπους λευχαιμιών (95) και να υπερεκφράζεται επίσης σε βρογχογενή καρκινώματα λόγω αυξημένης μεταγραφής του (96).

Επίσης, η πρωτεΐνη MDM 2 έχει ανιχνευθεί σε ένα ποσοστό καρκινωμάτων του μαστού και η έντονη έκφραση είχε σχετισθεί με γονιδιακή ενίσχυση του MDM 2 (143,144). Παράλληλα στα καρκινώματα αυτά είχε βρεθεί έκφραση της πρωτεΐνης p53. Συχνά, η έκφραση της p53 οφειλόταν σε μεταλλάξεις του p53 γονιδίου, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν ανεξάρτητη των μεταλλάξεων (140).

5. Πρωτεΐνη p21 / waf-1

Ένα ακόμα γονίδιο που έχει βρεθεί να έχει σχέση με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση είναι το γονίδιο waf 1, το οποίο κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη 21kDa, την p21. Η p21 (133) προκαλεί απενεργοποίηση των συμπλεγμάτων κυκλίνης / κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης και ως εκ τούτου εμποδίζει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S φάση (132-134). Παρατηρείται σε φυσιολογικά κύτταρα και μάλιστα παρατηρήθηκε ότι υπάρχει ακριβής τοπογραφική κατανομή της έκφρασής της στους φυσιολογικούς ιστούς, η οποία διαταράσσεται στους νεοπλασματικούς (97).

Η p21 είναι ένας καθολικός αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και επομένως ισχυρός αλλά ανατρέψιμος αναστολέας της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η p53 μετά από μεταβολές του DNA, ενεργοποιεί την μεταγραφή του waf-1, αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, η οποία συνδέεται με τα σύμπλοκα κυκλίνης / κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης και τελικά προκαλεί αναστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (132-134). Προκαλείται έτσι διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, προφανώς για να δοθεί χρόνος για την επιδιόρθωση του DNA. Παράλληλα, η πρωτεΐνη p21 αναστέλλει τη δράση του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) εμποδίζοντας έτσι το διπλασιασμό του DNA (135).

Ενεργοποίηση, όμως, του waf-1 σαν απάντηση στην καταστροφή του DNA μπορεί να συμβεί και με μηχανισμούς ανεξάρτητους από την p53, σαν απάντηση σε μιτογόνα ερεθίσματα ή ερεθίσματα διαφοροποίησης ή ακόμα σε νεοπλασματικά κύτταρα με μεταλλαγμένο DNA (156).

Το waf-1 έχει επίσης αναγνωρισθεί σαν γονίδιο που αναμειγνύεται στην γήρανση του κυττάρου.

Σε νεοπλασματικά κύτταρα που δεν εκφράζουν την p53, τα επίπεδα της p21 μειώνονται σημαντικά ή η πρωτεΐνη απουσιάζει (131, 134). Αυτό θα μπορούσε να έχει σαν

αποτέλεσμα είτε αναδιπλασιασμό ανώμαλου DNA είτε απώλεια συνεργασίας ανάμεσα στον διπλασιασμό του DNA και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (135). Και οι δύο πιθανότητες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε γονιδιακή αστάθεια και ογκογένεση (18).

6. Πρωτεΐνη bcl-2

Η πρωτεΐνη bcl-2 κωδικοποιείται από το ογκογονίδιο bcl-2, έχει MW 24-26 kD, εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μεμβράνη (99), εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, και στα περιφερειακά λεμφοκύτταρα και πιστεύεται ότι επιμηκύνει την κυτταρική επιβίωση, αναστέλλοντας την απόπτωση (98).

Υπερέκφραση της bcl-2 σαν αποτέλεσμα συγκεκριμένης χρωμοσωμικής διαμετάθεσης έχει σχετισθεί με την ανάπτυξη θυλακωδών λεμφωμάτων, αν και υπάρχουν και άλλοι μοριακοί μηχανισμοί που ίσως προκαλούν υπερέκφραση του bcl-2 (103).

Η δράση της bcl-2 φαίνεται να σχετίζεται με το διμερισμό της πρωτεΐνης bcl-2 είτε με συναγωνιστές (bcl-xl), είτε με ανταγωνιστές (bax-bcl-xs). Στην πρώτη περίπτωση έχουμε αναστολή και στη δεύτερη επαγωγή της απόπτωσης (100).

Σημαντικό ρόλο στη δράση του bcl-2 παίζει και το γονίδιο p53. Η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 είτε μέσω αύξησης της έκφρασης της πρωτεΐνης bax, ανταγωνιστού της bcl-2, είτε άμεσα ως στοιχείο αρνητικής απάντησης (99).

Ο τρόπος αναστολής της απόπτωσης από το ογκογονίδιο bcl-2 δεν είναι γνωστός, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι δρα σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας ρυθμίζοντας το επίπεδο των διαμεσολαβητών οξυγόνου και ελέγχοντας την είσοδο στην απόπτωση (100). Επιπλέον υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφραση του bcl-2 επηρεάζεται από τη δράση ανδρογόνων και οιστρογόνων όπως επίσης και από την έκφραση της πρωτεΐνης LMP-1 του ιού EBV (99).

Σε σχέση με την ανάπτυξη κακοηθείας το bcl-2 δεν θεωρείται ότι μπορεί από μόνο του να προκαλέσει έναρξη και προαγωγή νεοπλασματικών μεταβολών. Είναι πιθανότερο ότι εξασφαλίζει την αύξηση του χρόνου ζωής κυτταρικών κλώνων (αθάνατα κύτταρα), οι οποίοι μετασχηματίζονται σε κακοήθεις μετά από ενεργοποίηση ενός ή περισσότερων επιπλέον ογκογονιδίων (101).

7. Δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67/MIB-1

Η βιολογική συμπεριφορά των νεοπλασμάτων χαρακτηρίζεται από ακανόνιστα πρότυπα πολλαπλασιασμού. Έτσι ο ρυθμός του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να είναι ένας ακόμα παράγοντας για την πρόβλεψη της επιθετικότητας των νεοπλασμάτων (216). Η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων σε μικροσκοπικό επίπεδο είναι ένα ενδεικτικό στοιχείο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επηρεάζεται όμως από διάφορους παράγοντες (υποκειμενικότητα - χρόνος μονιμοποίησης υλικού, κ.λ.π.).

Άλλοι μέθοδοι εκτίμησής του είναι η κυτταρομετρία ροής και η ανίχνευση ειδικών πυρηνικών πρωτεϊνών που υπάρχουν σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, όπως το πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA-proliferating cell nuclear antigen) και του πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 (114). Η κυτταρομετρία ροής είναι χρονοβόρα διαδικασία, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και χρησιμοποιεί κυτταρικό διάλυμα που έχει ως επακόλουθο την καταστροφή των μικροανατομικών χαρακτηριστικών των κυττάρων και της ιστικής δομής. Ανοσοϊστοχημικά μπορούν να ανιχνευθούν το πυρηνικό αντιγόνο κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA) ή το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67, όμως δεν να μπορεί να εκτιμηθεί το μήκος του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, είναι μία έμμεση μέθοδος μέτρησης του πραγματικού ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Το πυρηνικό αντιγόνο Ki-67 ανιχνεύεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2, M) εκτός από την φάση ηρεμίας (G0). Η ποσότητα του αντιγόνου διαφέρει μεταξύ των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, με τη μέγιστη ποσότητα να υπάρχει στις φάσεις G2 και M (114).

Το MIB - 1 είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ενός επιτόπου ανθεκτικού στη φορμαλδεΰδη του αντιγόνου Ki-67 και ταυτοποιεί τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, σε ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη (230).

Η σήμανση με το Ki-67/MIB1 δίδει χρήσιμες πληροφορίες για το δείκτη πολλαπλασιασμού πολλών νεοπλασματικών και μη-νεοπλασματικών αλλοιώσεων. Μελέτες σε κακοήθεις όγκους συσχετίζουν υψηλό Ki-67 δείκτη με χαμηλή διαφοροποίηση και προχωρημένο στάδιο. Το επίπεδο έκφρασης του Ki-67/MIB1 βρέθηκε παράλληλο με το βαθμό διαφοροποίησης σε όγκους του εγκεφάλου (231), των οστών, πρωτοπαθή λεμφώματα του στομάχου και Non-Hodgkin λεμφώματα. Στα καρκινώματα του θύμου αδένος η έκφραση του Ki-67/MIB1 ήταν υψηλότερη στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα και χαμηλότερη στα θυμώματα μυελοειδούς τύπου (230-236).

Επίσης μελετήθηκε η προγνωστική αξία του δείκτη Ki-67/MIB1 σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων. Χαμηλός δείκτης Ki-67/MIB1 σχετίζεται με μεγαλύτερη επιβίωση σε σαρκώματα μαλακών μορίων (154), καρκινώματα μαστού χωρίς λεμφαδενική διήθηση (114), ολιγοδενδρογλοιώματα, καρκινώματα νεφρικού παρεγχύματος (232), νεφρικής πυέλου και ακανθοκυτταρικά καρκινώματα του οισοφάγου (231), ενώ σε καρκινώματα του ενδομητρίου μπορεί να είναι προγνωστικός δείκτης για τον κίνδυνο υποτροπής (158).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση με το Ki-67/MIB1 μπορεί να αποτελεί έναν επιπλέον προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση του ασθενούς. Σε αντίθεση, δε βρέθηκε συσχέτιση με την επιβίωση στα γαστρικά καρκινώματα¹⁵⁹ και στα πρωτοπαθή γαστρικά λεμφώματα (149). Πιθανόν η σήμανση με το Ki-67 να βελτιώνει την προγνωστική ακρίβεια των συμβατικών μορφολογικών συστημάτων καθορισμού της διαφοροποίησης των νεοπλασιών αλλά και να αποτελεί επιπλέον προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της νόσου σε σχέση με άλλες κλινικές και εργαστηριακές παραμέτρους.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελεί ένα επιπλέον εργαλείο για την πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς συγκεκριμένων όγκων καθώς και στην ανεύρεση νεοπλασμάτων πιο ευαίσθητων σε θεραπευτικές μεθόδους, όπως χημειοθεραπεία και ακτινοβολία (114).

Τρόπος αξιολόγησης

Αξιολογήθηκαν 2 με 3 τομές από κάθε περιστατικό, πάχους 4 μ. Οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό μέσης μεγεθύνσεως (20X) και μελετήθηκαν μέχρι 40 οπτικά πεδία / περίπτωση. Βρέθηκε το ποσοστό των θετικών κυττάρων ανά νεοπλασματικά κύτταρα και χρησιμοποιήθηκε στην παραπέρα μελέτη η μεγαλύτερη τιμή.

Αποτελέσματα :

1. Μορφολογικά αποτελέσματα

Σύμφωνα με την ιστολογική ταξινόμηση της WHO (53) τα καρκινώματα που μελετήσαμε αντιστοιχούν σε 127 διηθητικά πορογενή, 2 μικτά (πορογενή - λοβιακά), 7 λοβιακά καρκινώματα, 2 μυελοειδή, 2 θηλώδη και 4 βλενώδη καρκινώματα. Σε σχέση με τον βαθμό κακοηθείας, σύμφωνα με την ταξινόμηση της WHO, κατά Blooms και Richardson ταξινομήθηκαν σε 20 βαθμού κακοηθείας I, 73 βαθμού κακοηθείας II και 51 βαθμού κακοηθείας III.

2. Ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα

- Έκφραση της πρωτεΐνης p53

Θετική πυρηνική χρώση με το αντίσωμα p53 βρέθηκε σε 59/144 περιπτώσεις των καρκινωμάτων του μαστού (ποσοστό 41%). Τα θετικά κύτταρα αντιπροσώπευαν το 1-5%, 5-25%, 25-50% και >50% των καρκινικών κυττάρων σε 16, 24, 14 και 5 περιπτώσεις αντίστοιχα.

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο βρέθηκε ότι 54 από αυτά αφορούσαν διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 1 μικτό, 2 μυελοειδή, 2 βλεννώδη και κανένα λοβιακό ή θηλώδες καρκίνωμα. Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 8(40%) βαθμού κακοηθείας I, 22(30%) βαθμού κακοηθείας II και 29(57%) βαθμού κακοηθείας III.

- Έκφραση της πρωτεΐνης mdm-2

Θετική πυρηνική χρώση με το αντίσωμα mdm-2 βρέθηκε σε 35/144 νεοπλάσματα (ποσοστό 24%). Τα θετικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν το 1-5%, 5-25% και 25-50% των καρκινικών κυττάρων σε 24, 8 και 3 περιπτώσεις αντίστοιχα.

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο βρέθηκε ότι 29 από αυτά αφορούσαν διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 1 μικτό, 1 μυελοειδές, 3 βλεννώδη, 1 θηλώδες και κανένα λοβιακό καρκίνωμα.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 9 (40%) βαθμού κακοηθείας I, 19 (26%) βαθμού κακοηθείας II και 7 (16%) βαθμού κακοηθείας III.

- Έκφραση της πρωτεΐνης WAF/p21

Θετική πυρηνική χρώση με το αντίσωμα WAF/p21 βρέθηκε σε 54/144 καρκινώματα (ποσοστό 37%). Τα θετικά κύτταρα αντιπροσώπευαν το 1-5% των καρκινικών κυττάρων σε 39 περιπτώσεις και το 5-25% στις υπόλοιπες 15 περιπτώσεις.

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο βρέθηκε ότι 47 από αυτά ήταν διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 2 λοβιακά, 1 μικτό, 1 μυελοειδές, 2 βλεννώδη και 1 θηλώδες καρκίνωμα.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 8 (40%) βαθμού κακοηθείας I, 31 (42%) βαθμού κακοηθείας II και 15 (27%) βαθμού κακοηθείας III. Όλα τα βαθμού κακοηθείας I νεοπλάσματα εμφάνιζαν μικρό ποσοστό θετικών κυττάρων (<5%), ενώ όλα τα βαθμού κακοηθείας III εμφάνιζαν αυξημένο ποσοστό θετικών κυττάρων (>10%).

- Έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2

Θετική κυτταροπλασματική χρώση για την πρωτεΐνη bcl-2 βρέθηκε σε 61/144 καρκινώματα (ποσοστό 42%). Τα θετικά κύτταρα αντιπροσωπεύουν το <25%, 25-50% και >50% των καρκινικών κυττάρων σε 29, 23 και 9 περιπτώσεις αντίστοιχα.

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο πορογενή διηθητικά καρκινώματα ήταν 57, 2 λοβιακά, 1 βλεννώδες και 1 μυελοειδές, ενώ τα θηλώδη και τα μικτά καρκινώματα δεν εξέφραζαν θετικότητα.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 6 (30%) βαθμού κακοηθείας I, 35 (48%) βαθμού κακοηθείας II και 20 (39%) βαθμού κακοηθείας III. Όλα τα βαθμού κακοηθείας I καρκινώματα εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό θετικά χρωσμένων κυττάρων.

-Έκφραση της c-erbB-2 πρωτεΐνης

Μεμβρανική χρώση της πρωτεΐνης c-erbB2 βρέθηκε σε 39/144 (ποσοστό 29%) . Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο βρέθηκε ότι 36 από αυτά ήταν διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 1 λοβιακό και 2 μυελοειδή καρκινώματα.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 3(15%) βαθμού κακοηθείας I, 10 (14%) βαθμού κακοηθείας II και 26 (49%) βαθμού κακοηθείας III.

- Έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων

Οιστρογονικοί υποδοχείς ανιχνεύθηκαν σε 84/144 καρκινώματα (ποσοστό 58%). Η χρώση θεωρήθηκε θετική όταν τουλάχιστον 10% των πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων εμφάνιζαν ανοσοϊστοχημική θετικότητα (250, 251).

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο βρέθηκε ότι 69 από αυτά ήταν διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 7 λοβιακά, 2 μικτά, 4 βλενωβή και 2 θηλώδη ενώ το μυελοειδές καρκίνωμα δεν εξέφραζε οιστρογονικούς υποδοχείς.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας ήταν 15(75%) βαθμού κακοηθείας I, 49(67%) βαθμού κακοηθείας II και 20(39%) βαθμού κακοηθείας III.

- Έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1(Ki-67)

Σε 140/144 (ποσοστό 97%) των καρκινωμάτων βρέθηκε έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με ποσοστό θετικότητας 5-25%, 25-50% και > 50% των καρκινικών κυττάρων σε 53, 46 και 45 περιπτώσεις αντίστοιχα.

Ανάλογα δε με τον βαθμό κακοηθείας : 16 καρκινώματα βαθμού κακοηθείας I εμφάνιζαν ποσοστό θετικότητας νεοπλασματικών κυττάρων <25% και 4 ποσοστό 25-50%, από τα καρκινώματα βαθμού κακοηθείας II 29 εμφάνιζαν ποσοστό θετικότητας <25%, 28 ποσοστό θετικότητας 25-50% και 16 ποσοστό θετικότητας >50% . Αντίστοιχα για τα βαθμού κακοηθείας III ήταν 8, 14 και 29 περιπτώσεις.

3. Συσχετίσεις - Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε το χ^2 test όταν συγκρίναμε δύο παράγοντες μεταξύ τους και η μέθοδος λογιστικής παλινδρομικής ανάλυσης για πολυπαραγοντική μελέτη των στοιχείων μας.

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης bcl-2 και των πρωτεϊνών p53, mdm2, p21, c-erbB2 και των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) :

bcl-2/ p53

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 24 (ποσοστό 39,9%) από τα 61 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης p53, ενώ σε 35 (ποσοστό 42,2%) καρκινώματα από τα 83 που δεν εξέφραζαν

την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p53. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια τάση προς αντίστροφη συσχέτιση των δύο αυτών πρωτεϊνών, χωρίς όμως η σχέση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.116$; $df = 1$; $P = 0.773$).

V13 BCL-2 * P53 Crosstabulation

		P53		Total
		.00	1.00	
V13 BCL-2	.00	48 56.5%	35 59.3%	83 57.6%
	1.00	37 43.5%	24 40.7%	61 42.4%
Total		85 100.0%	59 100.0%	144 100.0%

bcl-2/ mdm2

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 12 (ποσοστό 19,7%) από τα 61 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης mdm2, ενώ σε 23 (ποσοστό 27,7%) καρκινώματα από τα 83 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης mdm2. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια ήπια τάση προς αντίστροφη συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών bcl-2 και mdm2, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 1.235$; $df = 1$; $P = 0.266$).

		MDM2		Total
		.00	1.00	
V13 BCL-2	.00	60 55.0%	23 65.7%	83 57.6%
	1.00	49 45.0%	12 34.3%	61 42.4%
Total		109 100.0%	35 100.0%	144 100.0%

bcl-2/ p21

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 22 (ποσοστό 36,1%) από τα 61 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης p21, ενώ σε 32 (ποσοστό 38,6%) καρκινώματα από τα 83 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p21. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια ήπια αντιστρόφως ανάλογη σχέση έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.093$; $df = 1$; $P = 0.761$).

	P21		Total
	.00	1.00	
V13 BCL-2 .00	51 56.7%	32 59.3%	83 57.6%
1.00	39 43.3%	22 40.7%	61 42.4%
Total	90 100.0%	54 100.0%	144 100.0%

bcl-2/c-erbB2

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 23 (ποσοστό 37,7%) από τα 61 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2, ενώ σε 16 (ποσοστό 19,3%) καρκινώματα από τα 83 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 και της c-erbB2 είναι στατιστικά σημαντική και μάλιστα η πιθανότητα να υπάρχει συνέκφραση των δυο αυτών πρωτεϊνών είναι 2,5 φορές μεγαλύτερη από το να υπάρχει έκφραση του c-erbB2 χωρίς να υπάρχει σύγχρονη έκφραση της bcl-2 ($\chi^2 = 6.046$; $df = 1$; $P = 0.014$).

	CNEU		Total
	.00	1.00	
V13 BCL-2 .00	67 63.8%	16 41.0%	83 57.6%
1.00	38 36.2%	23 59.0%	61 42.4%
Total	105 100.0%	39 100.0%	144 100.0%

bcl-2/ ER

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 32 (ποσοστό 52,5%) από τα 61 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, ενώ σε 52 (ποσοστό 62,7%) καρκινώματα από τα 83 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων. Η συσχέτιση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 1.503$; $df = 1$; $P = 0.220$).

V13 BCL-2 * ER Crosstabulation

	ER		Total
	,00	1,00	
V13 BCL-2 ,00	31 51,7%	52 61,9%	83 57,6%
1,00	29 48,3%	32 38,1%	61 42,4%
Total	60 100,0%	84 100,0%	144 100,0%

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης bcl-2 και της διαμέτρου, του βαθμού διαφοροποίησης, της ύπαρξης μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1

bcl-2/δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού (MIB1).

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε καρκινώματα με θετικό bcl-2 το αντιγόνο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό < 25% σε 24/53 (39,4%) περιπτώσεις, σε ποσοστό 25%- 50% σε 16/46 (26,2%) περιπτώσεις και σε ποσοστό >50% σε 21/45 (34,4%) περιπτώσεις. Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαχωρίζοντας τις περιπτώσεις μας σε καρκινώματα με χαμηλό($\leq 25\%$) και υψηλό ($>25\%$) ποσοστό MIB1+ κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.134$; $df = 1$; $P = 0.714$).

	MIB1		Total
	1.00	2.00	
BCL2 0,00	29 54,7%	54 59,3%	83 57,6%
1,00	24 45,2%	37 40,7%	61 42,4%
Total	53 100%	91 100%	144 100%

bcl-2/ βαθμός διαφοροποίησης

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι η πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε σε 6/20, 35/73 και 20/51 περιπτώσεις βαθμού διαφοροποίησης I, II και III αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 με τον βαθμό διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 2.391$; $df = 2$; $P = 0.303$).

V13 BCL-2 * GRADE Crosstabulation

	GRADE			Total
	1,00	2,00	3,00	
V13 BCL-2 ,00	14 70,0%	38 52,1%	31 60,8%	83 57,6%
1,00	6 30,0%	35 47,9%	20 39,2%	61 42,4%
Total	20 100,0%	73 100,0%	51 100,0%	144 100,0%

bcl-2/ διάμετρος όγκου, λεμφαδενικές μεταστάσεις

Οι παρακάτω πίνακες δείχνουν ότι η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 με την μέση διάμετρο των νεοπλασμάτων και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($t=0.510$; d.f.= 88; $P=0.611$) και ($\chi^2=0.076$; df= 1; $P=0.783$) αντίστοιχα.

V13 BCL-2 * LN lemfadenikes metastaseis Crosstabulation

	LN lemfadenikes metastaseis		Total
	,00 oxi	1,00 nai	
V13 BCL-2 ,00	11 50,0%	31 53,4%	42 52,5%
1,00	11 50,0%	27 46,6%	38 47,5%
Total	22 100,0%	58 100,0%	80 100,0%

	BCL2	N	Mean	Std. Deviation
DIAM	.00	44	3.4091	1.9334
	1.00	46	3.1870	2.1815

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης mdm2, και των πρωτεϊνών p53, p21, c-erbB2 και των οιστρογονικών υποδοχέων (ER):

mdm2/ p53

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι 20 (ποσοστό 57,1%) από τα 35 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης p53, ενώ σε 39 (ποσοστό 35,8%) καρκινώματα από τα 109 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη mdm2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p53. Η διαφορά των ποσοστών έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2=4.999$; $df=1$; $P=0.025$) και μάλιστα η πιθανότητα συνέκφρασής τους είναι περίπου 2.4 φορές παραπάνω από την πιθανότητα έκφρασης μόνον της p53, με 95% βεβαιότητα ότι μπορεί να είναι από 1,1 έως 5,2 φορές.

MDM2 * P53 Crosstabulation

		P53		Total
		.00	1.00	
MDM2	.00	70 82.4%	39 66.1%	109 75.7%
	1.00	15 17.6%	20 33.9%	35 24.3%
Total		85 100.0%	59 100.0%	144 100.0%

mdm2/ p21

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 19(ποσοστό 51,5%) από τα 35 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της

πρωτεΐνης p21, ενώ σε 34 (ποσοστό 32,2%) καρκινώματα από τα 109 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη mdm2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p21. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική ανάλογη σχέση έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών ($\chi^2= 3.461$; $df = 1$; $P = 0.063$).

	P21		Total
	.00	1.00	
Mdm2 .00	74 67,8%	35 32,2%	109 75. 5%
1.00	16 48. 5%	19 51,5%	35 24. 3%
Total	90 36. 2%	54 63, 8%	144 100%

mdm2/c-erbB2

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 7 (ποσοστό 20%) από τα 35 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2, ενώ σε 32 (ποσοστό 29,4%) καρκινώματα από τα 109 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2. Φαίνεται ότι η συσχέτιση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2= 1.175$; $df = 1$; $P = 0.278$).

	CNEU		Total
	.00	1.00	
MDM2 .00	77 73.3%	32 82.1%	109 75.7%
1.00	28 26.7%	7 17.9%	35 24.3%
Total	105 100.0%	39 100.0%	144 100.0%

mdm2/ER

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 24 (ποσοστό 68,6%) από τα 35 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση ER, ενώ σε 60 (ποσοστό 55%) καρκινώματα από τα 109 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη mdm2 παρατηρήθηκε έκφραση ER. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μια ήπια τάση συσχέτισης της έκφρασης της mdm2 και των ER, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 1.994$; $df = 1$; $P = 0.158$).

		ER		Total
		.00	1.00	
MDM2	.00	49 45.0%	60 55.0%	109 100.0%
	1.00	11 31.4%	24 68.6%	35 100.0%
Total		60 41.7%	84 58.3%	144 100.0%

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης mdm2 και της διαμέτρου, του βαθμού διαφοροποίησης, της ύπαρξης μασχαλαίων λεφιδενικών μεταστάσεων και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1.

mdm2/δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε καρκινώματα με θετικό mdm2 το αντιγόνο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό < 25% σε 15/53 (42,8%) περιπτώσεις, σε ποσοστό 25%- 50% σε 13/46 (37,2%) περιπτώσεις και σε ποσοστό >50% σε 7/45 (20%) περιπτώσεις. Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης mdm2 με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διαχωρίζοντας τις περιπτώσεις μας σε καρκινώματα με χαμηλό($\leq 25\%$) και υψηλό ($>25\%$) ποσοστό MIB1+ κυττάρων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.425$; $df = 1$; $P = 0.515$).

	Mib1		Total
	1.00	2.00	
Mdm2 .00	38 71,7%	71 78%	109 75,7%
1.00	15 28.3%	20 22%	35 24.3%
Total	53 100%	91 100%	144 100%

mdm2/ βαθμός διαφοροποίησης

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι η πρωτεΐνη mdm2 παρατηρήθηκε σε 9/20, 19/73 και 7/51 περιπτώσεις βαθμού διαφοροποίησης I, II και III αντίστοιχα. Φαίνεται ότι αυτά τα τρία ποσοστά ακολουθούν διαφορετικές τάσεις σε κάθε μια από τις δύο ομάδες έκφρασης mdm2: mdm2 θετικό (25,7%, 54,3 %, 20%), mdm2 αρνητικό (10,1%, 49,5% και 40,4% αντίστοιχα). Αυτή η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 7.876$; $df = 2$; $P = 0.019$). Επιπλέον αυτή η στατιστικά σημαντική συσχέτιση αποδίδεται σχεδόν αποκλειστικά με γραμμική ελάττωση στο επιπλέον ποσοστό στις ομάδες mdm2 θετικές με υψηλόβαθμο βαθμό διαφοροποίησης (γραμμική σχέση $\chi^2 = 7.628$; $df = 1$; $P = 0.006$).

	GRADE			Total
	1.00	2.00	3.00	
MDM2 .00	11 55.0%	54 74.0%	44 86.3%	109 75.7%
1.00	9 45.0%	19 26.0%	7 13.7%	35 24.3%
Total	20 100.0%	73 100.0%	51 100.0%	144 100.0%

mdm2/ διάμετρος όγκου, λεμφαδενικές μεταστάσεις

Οι παρακάτω πίνακες δείχνουν ότι η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης bcl-2 με την μέση διάμετρο των νεοπλασμάτων ή την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν

ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.408$; $df = 2$; $P = 0.816$) και ($t = -0.698$; $d.f. = 88$; $P = 0.487$) αντίστοιχα.

		LN lemfadenikes metastaseis		Total
		.00 oxi	1.00 nai	
MDM2	.00	15 68.2%	42 72.4%	57 71.3%
	1.00	7 31.8%	16 27.6%	23 28.8%
Total		22 100.0%	58 100.0%	80 100.0%

MDM2		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DIAM	.00	65	3.2015	1.8771	.2328
	1.00	25	3.5400	2.4868	.4974

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης p21 και των πρωτεϊνών p53, c-erbB2 και των οιστρογονικών υποδοχέων :

p21/ p53

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 27 (ποσοστό 50%) από τα 54 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p21 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης p53, ενώ σε 32 (ποσοστό 35,6%) καρκινώματα από τα 90 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη p21 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p53. Αν και η διαφορά ανάμεσα στα δυο αυτά ποσοστά δεν είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 2.912$; $df = 1$; $P = 0.088$), οστόσο φαίνεται να υπάρχει μια τάση συνέκφρασης των πρωτεϊνών p21 και p53.

		P53		Total
		.00	1.00	
P21	.00	58 68.2%	32 54.2%	90 62.5%
	1.00	27 31.8%	27 45.8%	54 37.5%
Total		85 100.0%	59 100.0%	144 100.0%

p21/c-erbB2

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 17 (ποσοστό 31,5%) από τα 54 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p21 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2, ενώ σε 22 (ποσοστό 24,4%) καρκινώματα από τα 90 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη p21 παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης c-erbB2. Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 και της c-erbB2 δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 0.846$; $df = 1$; $P = 0.358$).

		CNEU		Total
		.00	1.00	
P21	.00	68 64.8%	22 56.4%	90 62.5%
	1.00	37 35.2%	17 43.6%	54 37.5%
Total		105 100.0%	39 100.0%	144 100.0%

p21/ ER

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι σε 37 (ποσοστό 68,5%) από τα 54 καρκινώματα που παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης p21 παρατηρήθηκε σύγχρονη έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, ενώ σε 47 (ποσοστό 52,2%) καρκινώματα από τα 90 που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη bcl-2 παρατηρήθηκε έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων. Η συσχέτιση των δυο αυτών ποσοστών είναι αξιοσημείωτη και μόλις που αποτυγχάνει να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική ($\chi^2 = 3.688$; $df = 1$; $P = 0.055$). Μάλιστα η πιθανότητα παρουσίας οιστρογονικών υποδοχέων σε γυναίκες με P21θετικό είναι περίπου 2 δυο φορές εκείνης των γυναικών με P21 αρνητικό.

		ER		Total
		.00	1.00	
P21	.00	43 71.7%	47 56.0%	90 62.5%
	1.00	17 28.3%	37 44.0%	54 37.5%
Total		60 100.0%	84 100.0%	144 100.0%

Συσχέτιση της έκφρασης μεταξύ της πρωτεΐνης p21 και της διαμέτρου, του βαθμού διαφοροποίησης, της ύπαρξης μασχαλιαίων λεμφαδενικών μεταστάσεων και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1

p21/δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Σε καρκινώματα με θετικό p21 το αντιγόνο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό < 25% σε 13/53 (24,5%) περιπτώσεις, σε ποσοστό 25%- 50% σε 23/46 (50%) περιπτώσεις και σε ποσοστό >50% σε 17/45 (37,7%) περιπτώσεις.

Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1, διαχωρίζοντας τις περιπτώσεις μας σε καρκινώματα με χαμηλό(<=25%) και υψηλό (>25%) ποσοστό MIB1+ κυττάρων ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2= 4.6$; $df = 1$; $P = 0.031$).

	MIB1		Total
	1.00	2.00	
P21 .00	40 75,5%	50 55%	90 62,5%
1.00	13 24,5%	41 45%	54 37,5%
Total	53 100%	91 100%	144 100%

p21/ βαθμός διαφοροποίησης

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει ότι η πρωτεΐνη p21 παρατηρήθηκε σε 9/20 (16,7%), 31/73 (57,4%) και 14/51 (25,9%) περιπτώσεις βαθμού διαφοροποίησης I, II και III αντίστοιχα. Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 με τον βαθμό διαφοροποίησης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2= 3.445$; $df = 2$; $P = 0.179$).

		GRADE			Total
		1.00	2.00	3.00	
P21	.00	11	42	37	90
		55.0%	57.5%	72.5%	62.5%
	1.00	9	31	14	54
		45.0%	42.5%	27.5%	37.5%
Total		20	73	51	144
		100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

ρ21/ διάμετρος όγκου, λεμφαδενικές μεταστάσεις

Η συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 με την μέση διάμετρο των νεοπλασμάτων και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($\chi^2= 0.01$; $df = 1$; $P = 0.970$) και ($t=0.323$; $d.f.= 88$; $P=0.747$) αντίστοιχα.

		LN lemfadenikes metastaseis		Total
		.00 oxi	1.00 nai	
P21	.00	13	34	47
		59.1%	58.6%	58.8%
	1.00	9	24	33
		40.9%	41.4%	41.3%
Total		22	58	80
		100.0%	100.0%	100.0%

P21		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DIAM	.00	52	3.3558	2.0657	.2865
	1.00	38	3.2132	2.0660	.3351

Συσχέτιση p53/mdm2/p21 (Πίνακας 3)

Παράλληλη έκφραση των πρωτεϊνών p53+/mdm-2+ παρατηρήθηκε σε 20/144 περιπτώσεις. 11 από αυτές εξέφραζαν θετικότητα και στην πρωτεΐνη p21/WAF1. Ασυμφωνία έκφρασης p53+/mdm2- βρέθηκε σε 39 περιπτώσεις. 18 από αυτές ήταν

p21/WAF1 θετικές και οι 21 ήταν p21/WAF1 αρνητικές. 54 περιπτώσεις ήταν p53-/mdm2-/WAF1- και 8 ήταν p53-/mdm2+/ p21+.

Από τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης φαίνεται ότι μόνο μια μεταβλητή, η MDM2, έχει στατιστικά σημαντική επίδραση ($P = 0.0275$): η σχετική πιθανότητα ανίχνευσης P53 σε γυναίκες με MDM2 θετικό είναι περίπου 2.5 φορές μεγαλύτερη από ασθενείς που δεν εκφράζουν MDM2, και με εμπιστοσύνη 95% που κυμαίνεται από 1.1 – 5.2.

Συσχέτιση των φαινοτύπων p53/p21 και p53/mdm2 με βαθμό διαφοροποίησης και ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων αυτών φαίνονται στους πίνακες 8 και 9 αντίστοιχα.

4. Πολυπαραγοντική ανάλυση

Η συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων, του βαθμού διαφοροποίησης ή του συνδυασμού των και των λοιπών πιθανών παραγόντων κινδύνου που μελετήσαμε (c-erbB2, p53, p21, mdm2, ER, bcl2) έγινε με τη μέθοδο λογιστικής παλινδρομικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα έγιναν τρεις αναλύσεις μία για κάθε μια από τις τρεις παραπάνω εξαρτημένες μεταβλητές. Η λίστα των ανεξαρτήτων μεταβλητών περιλάμβανε: λεμφαδενικές μεταστάσεις, βαθμό διαφοροποίησης και λεμφαδενικές μεταστάσεις και βαθμό διαφοροποίησης

Η ανάλυση αυτή λαμβάνει υπόψη τις ανεξάρτητες επιδράσεις των παραπάνω μεταβλητών διορθωμένες ως προς άλλες διαφόρων συγχυτικών παραγόντων. Εφαρμόστηκε με βηματικό τρόπο: αδέσμευτη μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας (unconditional maximum likelihood method).

Αποτελέσματα

1. Λεμφαδενικές μεταστάσεις

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται μόνο μια μεταβλητή, ο c-erbB2, έχει αξιοσημείωτη επίδραση, μόλις έξω από τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($P = 0.0984$): ο σχετικός κίνδυνος λεμφαδενικών μεταστάσεων μεταξύ γυναικών με c-erbB2 θετικό είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από ασθενείς που δεν εκφράζουν c-erbB2, και με εμπιστοσύνη 95% κυμαίνεται 0,81 – 11,72.

Variable	B	S.E.	df	Sig
c-erbB2 (1)	1,1259	,6812	1	,0984
Constant	,7191	,2798	1	,0102
95% CI for Exp(B)				
Variable	Exp(B)	Lower	Upper	
c-erbB2(1)	3,0831	,8113	11,7171	

2. Βαθμός διαφοροποίησης (1 vs 2,3).

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται δύο μεταβλητές, MDM2 και ER, έχουν στατιστικά σημαντική επίδραση, ($P = 0.049$ και $P = 0.024$, αντίστοιχα):

(a) ο σχετικός κίνδυνος χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης μεταξύ γυναικών με MDM2 είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερος από ασθενείς που δεν έχουν MDM2, και με εμπιστοσύνη 95% κυμαίνεται μεταξύ 1.00 – 7.52,

(b) ο σχετικός κίνδυνος χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης μεταξύ γυναικών με ER είναι περίπου 0.22 φορές μικρότερος από ασθενείς που δεν έχουν ER, και με εμπιστοσύνη 95% κυμαίνεται μεταξύ 0.06 – 0.82.

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig
MDM2(1)	1,0102	,5141	3,8618	1	,0494
	,1267				
ER(1)	-1,4875	,6578	5,1140	1	,0237
	,1638				
Constant	2,1991	,6829	10,3699	1	,0013
95% CI for Exp(B)					
Variable	Exp(B)	Lower	Upper		
MDM2(1)	2,7462	1,0027	7,5218		
ER(1)	,2259	,0622	,8201		

3. Λεμφαδενικές μεταστάσεις και Βαθμός διαφοροποίησης 2 ή 3

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης. Όπως φαίνεται μόνο μια μεταβλητή, c-erbB-2, έχει αξιοσημείωτη επίδραση, μόλις έξω από τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($P = 0.0731$): ο σχετικός κίνδυνος λεμφαδενικών μεταστάσεων μεταξύ γυναικών με c-erbB2 είναι περίπου 2 φορές μεγαλύτερος από ασθενείς που δεν έχουν c-erbB2, και με εμπιστοσύνη 95% κυμαίνεται 1.98 – 4.20.

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig
R					
c-erbB-2(1)	,6850	,3823	3,2113	1	,0731
	,0800				
Constant	-,7363	,2086	12,4647	1	,0004
95% CI for Exp(B)					
Variable	Exp(B)	Lower	Upper		
c-erbB-2(1)	1,9838	,9378	4,1965		

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ
κατά WHO (54).

I. Ενδοεπιθηλιακά (in situ)

α. Λοβιακά

β. Πορογενή(φαγεσωρικός, ηθμοειδής, συμπαγής, τροχοειδής, τοιχωματικός, θηλώδης τύπος).

II. Διηθητικά

α. Λοβιακά

- κλασσικός τύπος
- κυψελιδώδης
- συμπαγής
- μικροσωληνώδης
- μικτός

β. Πορογενή

- χωρίς ειδικούς χαρακτήρες(NOS)
- χωρίς ειδικούς χαρακτήρες(NOS) με εκτεταμένο ενδοεπιθηλιακό στοιχείο.
- σωληνώδες
- μυελοειδές
- βλενωδές
- θηλώδες
- αποκρινές
- αδενοειδές
- νεανικό
- νόσος Paget της θηλής
- μεταπλαστικό
- με ακανθοκυτταρική διαφοροποίηση
- ατρακτόμορφο
- μικτό λοβιακό – πορογενές
- φλεγμονώδες
- άλλοι τύποι

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.**Σταδιοποίηση του καρκινώματος του μαστού με βάση το σύστημα T.N.M.:**

T –πρωτοπαθής όγκος

Tis- in situ καρκίνωμα

T1 - διάμετρος όγκου < 2εκ.

T1a – διάμετρος όγκου <0,5εκ.

T1b– διάμετρος όγκου >0,5εκ. και <1εκ.

T1c - διάμετρος όγκου > 1εκ. και < 2εκ.

T2 - διάμετρος όγκου 2-5 εκ.

T3 - διάμετρος όγκου>5 εκ.

T4- διήθηση θωρακικού τοιχώματος και δέρματος.

N –επιχώριοι λεμφαδένες

N0- χωρίς διήθηση

N1- μεταστατική διήθηση σε κινητούς σύστοιχους λεμφαδένες.

N2- μεταστατική διήθηση και σύμφυση λεμφαδένων μεταξύ τους

N3- μεταστατική διήθηση λεμφαδένων μασχάλης και έσω μαστικής.

M –απομακρυσμένες μεταστάσεις

M0- χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις

M1- με απομακρυσμένες μεταστάσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.**Αποτελέσματα Ανοσοϊστοχημικής Έκφρασης Μελετουμένων****Πρωτεϊνών σε σχέση με τον βαθμό διαφοροποίησης:**

Πρωτεΐνες	+ καρκινώμ.	Grade I	Grade II	Grade III
P53	59/144	8/20	22/73	29/51
P21	53/144	8/20	31/73	14/51
MDM2	35/144	9/20	19/73	7/51
Bcl-2	61/144	6/20	35/73	20/51
c-erbB 2	39/144	3/20	10/73	26/51
ER	84/144	15/20	49/73	20/51

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.**Ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο:**

	Δ.Πορογενή	Δ.Λοβιακά	Μικτά	Μυελοειδή	Βλεννώδη	Θηλώδη	Σύνολο
P53	54 (42%)	0 (0%)	1(50%)	2 (100%)	2 (50%)	0 (0%)	59
mdm-2	29 (23%)	0 (0%)	1(50%)	1 (50%)	3 (75%)	1 (50%)	35
P21/waf1	47 (36%)	2 (28%)	1(50%)	1 (50%)	2 (50%)	1 (50%)	53
bcl-2	57 (45%)	2 (28%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	61
cerbB-2	36 (28%)	1 (14%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	39
ER	69 (54%)	7 (100%)	2(100%)	0 (0%)	4 (100%)	2(100%)	84

ΠΙΝΑΚΑΣ 5.**Πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών p53/mdm2/p21:**

p53+ /mdm2+ /p21+ :	11 (8%)
p53+ /mdm2+ /p21- :	9 (6%)
p53 +/mdm2- / p21- :	21 (14%)
p53 +/mdm2- / p21+ :	18 (12%)
p53 -/mdm2- /p21+ :	17 (11%)
p53-/mdm2- / p21- :	54 (37%)
p53- /mdm2+ /p21+ :	8 (5%)
p53 -/mdm2+ / p21- :	7 (4,8%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 6.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των mdm2, p21 και bcl-2 σε σχέση με την έκφραση των p53, c-erbB-2 και ER:

		P53		CerbB2		ER		mdm2		P21	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Mdm2	-	70	39	77	32	49	60			75	34
	+	15	20	28	7	11	24			16	19
		$(\chi^2 = 4.999;$ $P = 0.025)$		$(\chi^2 = 1.175;$ $P = 0.278)$		$(\chi^2 = 1.994;$ $P = 0.158)$				$(\chi^2 = 1.866;$ $P = 0.172).$	
P21	-	58	32	68	22	43	47	75	19		
	+	27	27	37	17	17	37	34	16		
		$(\chi^2 = 2.912;$ $P = 0.088)$		$(\chi^2 = 0.846;$ $P = 0.358)$		$(\chi^2 = 3.688;$ $P = 0.055)$		$(\chi^2 = 1.866;$ $P = 0.172).$			
Bcl-2	-	48	35	67	16	31	52	60	23	51	32
	+	37	24	38	23	29	32	49	12	39	22
		$(\chi^2 = 0.116;$ $P = 0.773)$		$(\chi^2 = 6.046;$ $P = 0.014)$		$(\chi^2 = 1.503;$ $P = 0.220)$		$(\chi^2 = 1.235;$ $P = 0.266)$		$(\chi^2 = 0.093;$ $P = 0.761)$	

ΠΙΝΑΚΑΣ 7.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των mdm2, p21 και bcl-2 σε σχέση με το βαθμό διαφοροποίησης, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB-1.

		MIB-1		Βαθμός διαφοροποίησης			Λεμφ.Μεταστάσεις	
		1	2	I	II	III	-	+
mdm2	-	38	71	11	54	44	15	42
	+	15	20	9	19	7	7	16
		$(\chi^2 = 0.425;$ $P = 0.515)$		$\chi^2 = 7.628; P=0.006).$			$(\chi^2 = 0.139;$ $P = 0.709)$	
p21	-	40	50	11	42	37	13	34
	+	13	41	8	31	15	9	24
		$(\chi^2 = 4.6; P =$ $0.031).$		$(\chi^2 = 3.445; P = 0.179).$			$(\chi^2 = 0.01;$ $P = 0.970)$	
Bcl-2	-	29	54	14	38	31	11	31
	+	24	37	6	35	20	11	27
		$(\chi^2 = 0.134;$ $P = 0.714)$		$(\chi^2 = 2.391; P = 0.303)$			$(\chi^2 = 0.076;$ $P = 0.783)$	

ΠΙΝΑΚΑΣ 8.

Συσχέτιση φαινοτύπων p53 /p21 με λεμφαδενικές μεταστάσεις και βαθμό διαφοροποίησης.

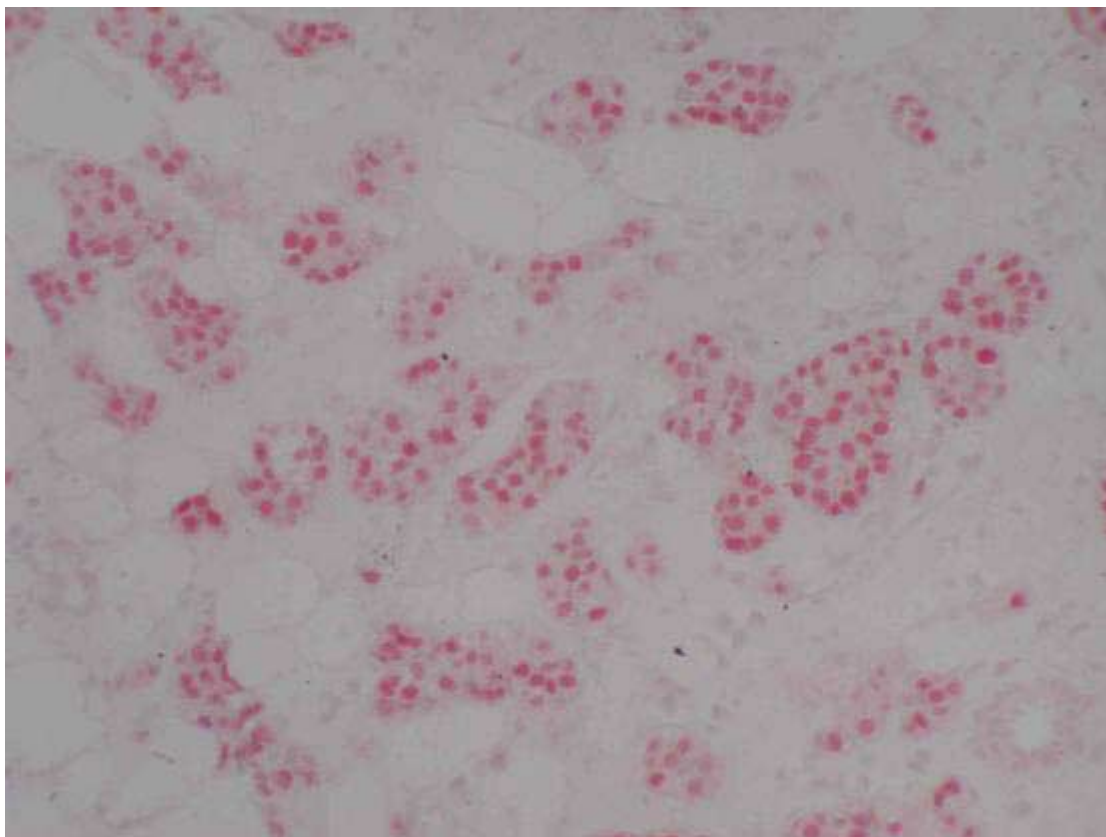
Φαινότυπος	Grade 2 και 3	Λεμφ. Μετ.
P53-/p21-	51/ 61 (84,0%)	21/36 (58,3%)
P53- / p21+	22/24 (91,6%)	12/16 (46%)
P53+/<i>p21</i>-	28/ 30 (93%)	16/17 (94%)
P53+/ <i>p21</i> +	23/ 29 (79,3%)	12/16 (75%)

ΠΙΝΑΚΑΣ 9.

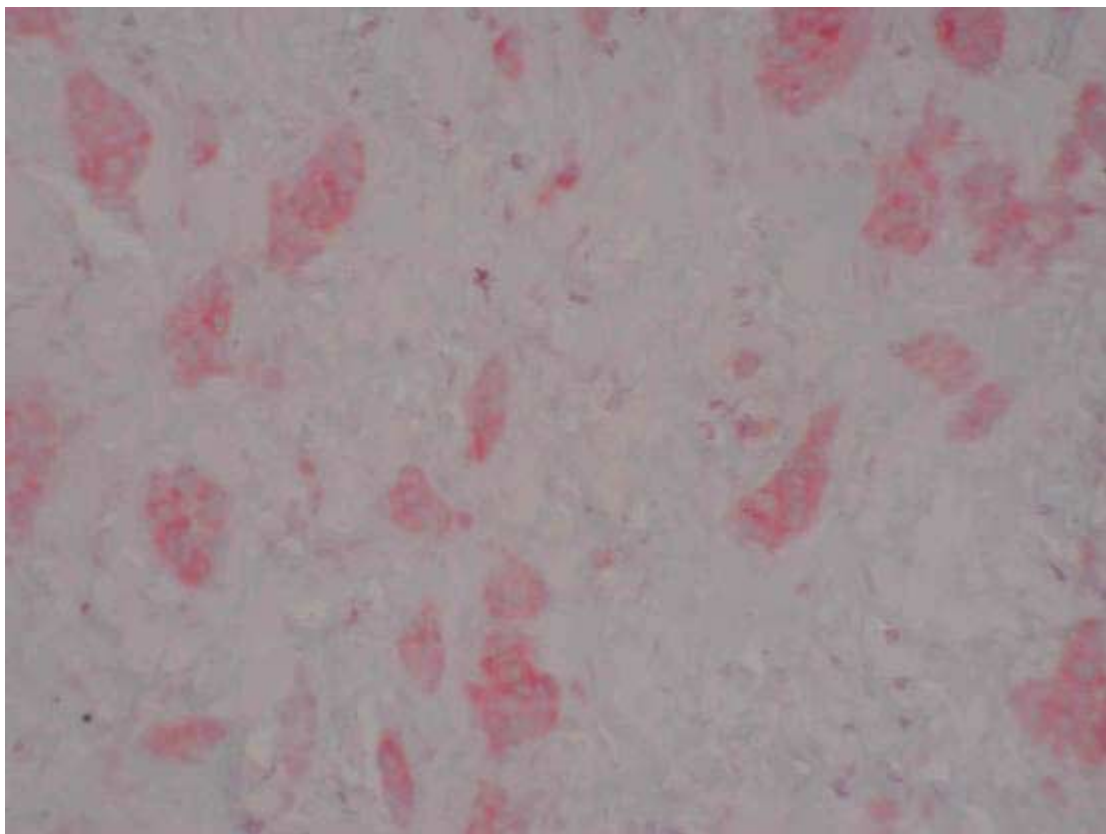
Συσχέτιση φαινοτύπων p53 /mdm2 με λεμφαδενικές μεταστάσεις και βαθμό διαφοροποίησης.

Φαινότυπος	Grade 2 και 3	Λεμφ. Μετ.
P53-/mdm2-	61/70 (87%)	28/43 (65%)
P53 / mdm2+	12/15 (80%)	5/9 (55%)
P53+/ <i>mdm2</i> -	34/39 (87%)	16/19 (66%)
P53+/<i>mdm2</i>+	17/20 (85%)	10/14 (71,4%)

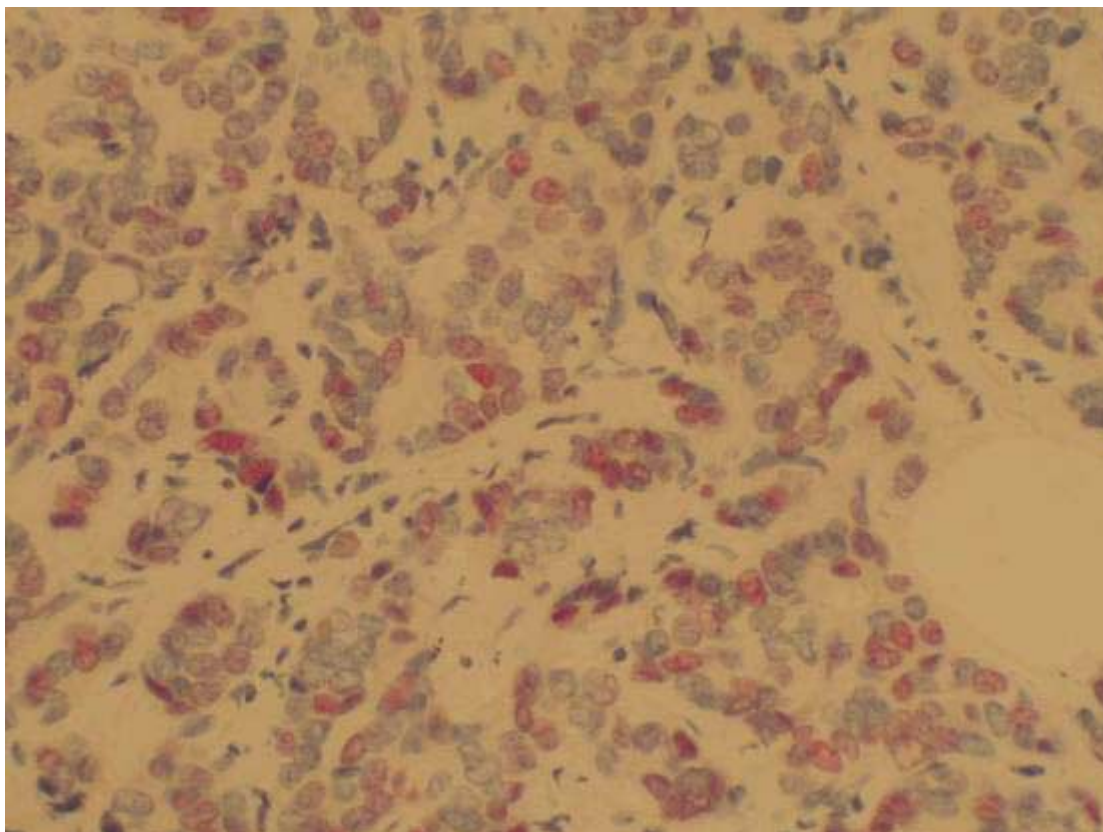
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ



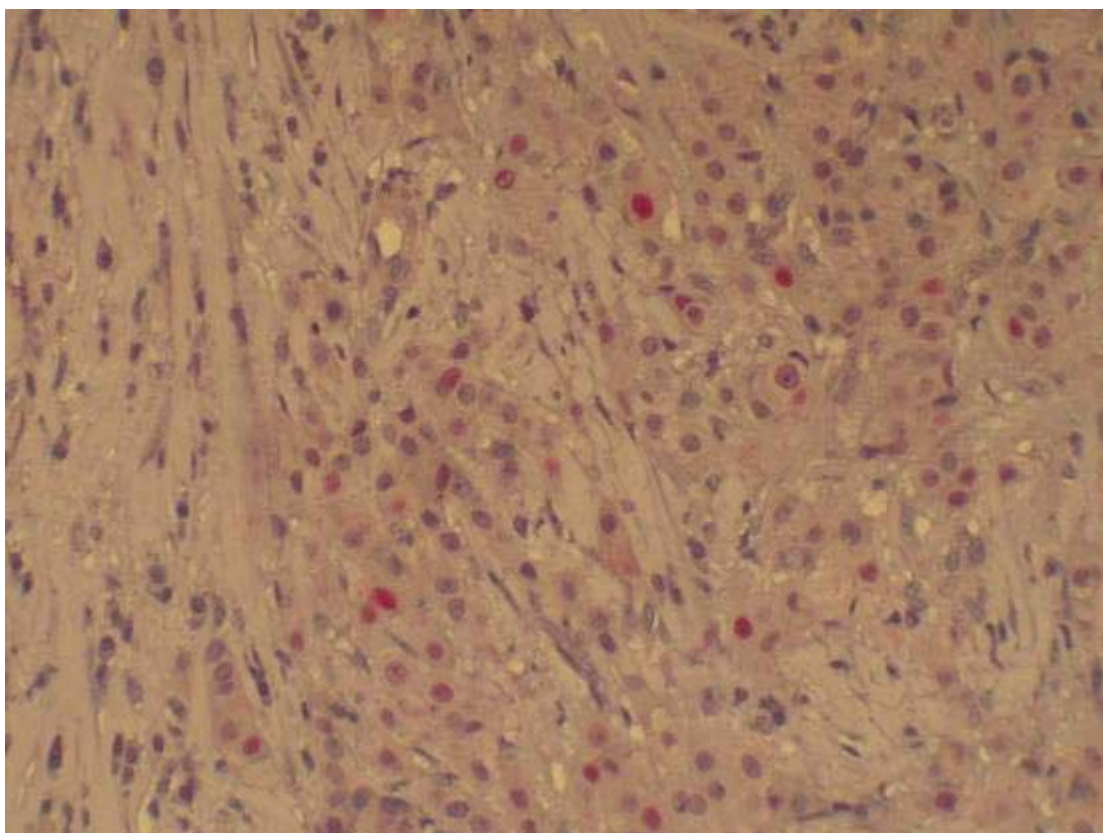
Εικόνα 1. Έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνωμα μαστού, grade II (Χ10, αντικειμενικός φακός).



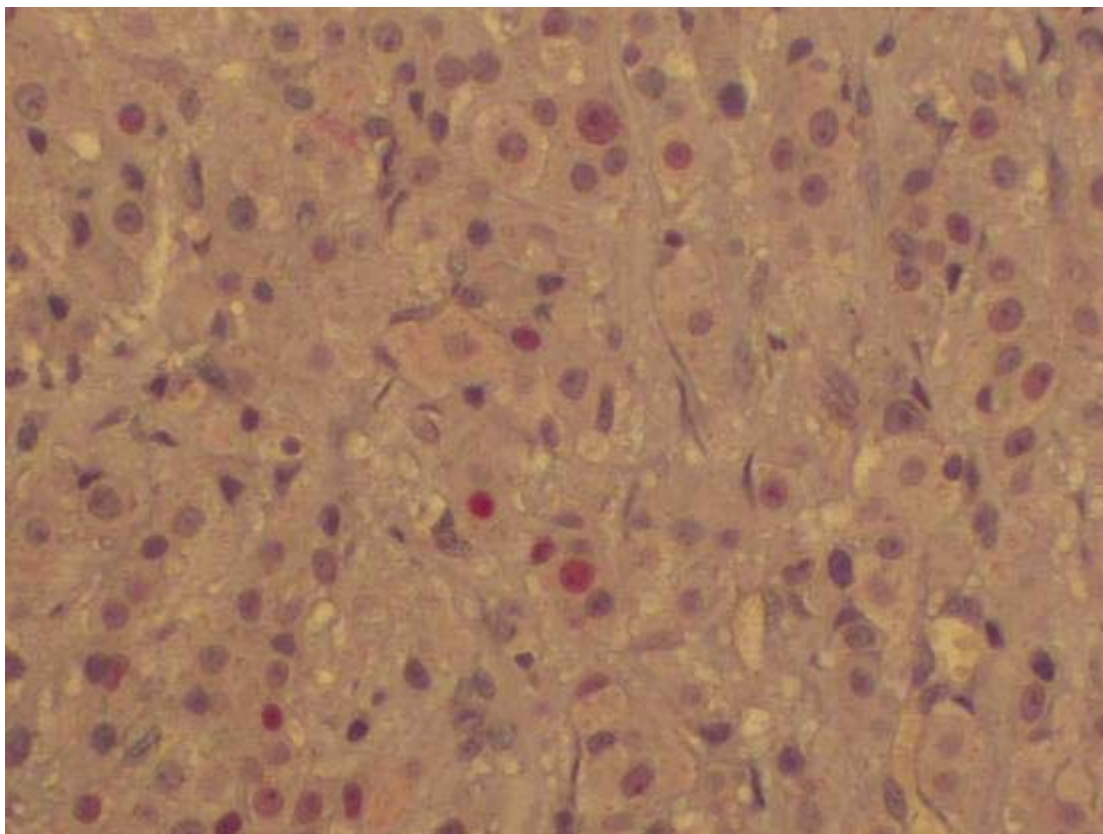
Εικόνα 2 . Έκφραση πρωτεΐνης bcl-2 στο ίδιο καρκίνωμα (Χ10, αντικειμενικός φακός).



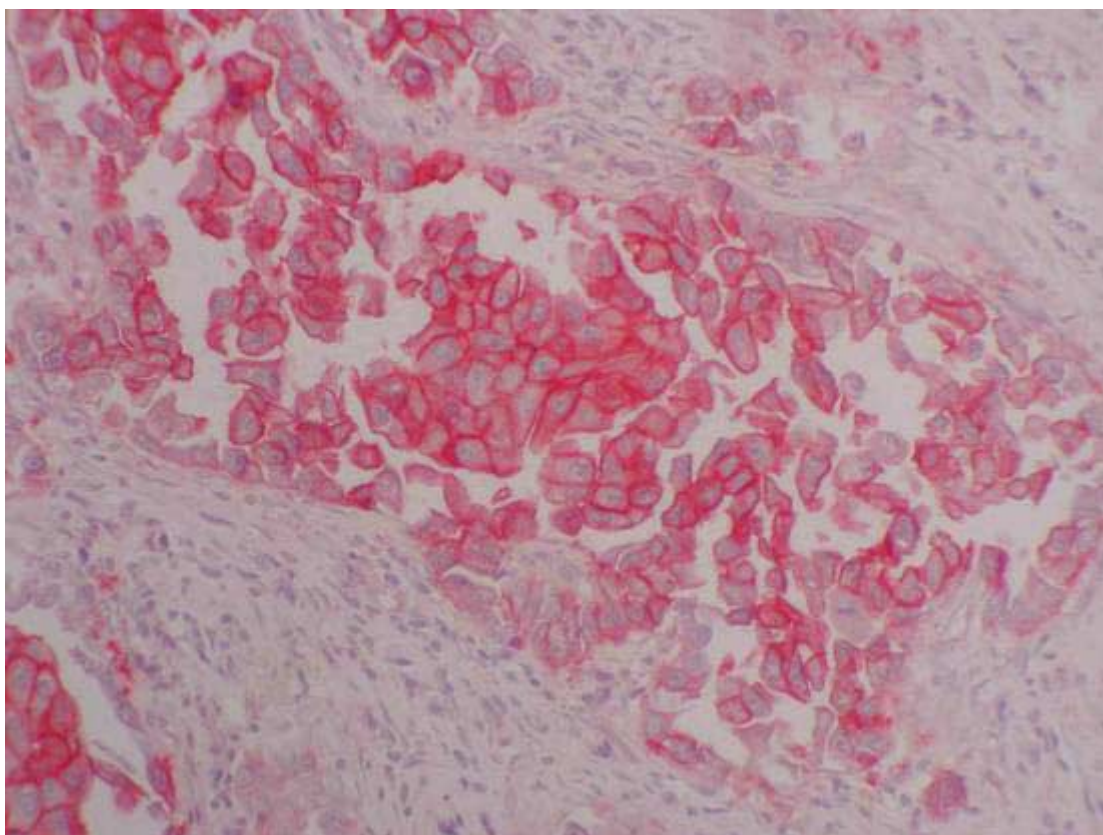
Εικόνα 3. Έκφραση πρωτεΐνης p53 σε καρκίνωμα μαστού, grade III (X20, αντικειμενικός φακός).



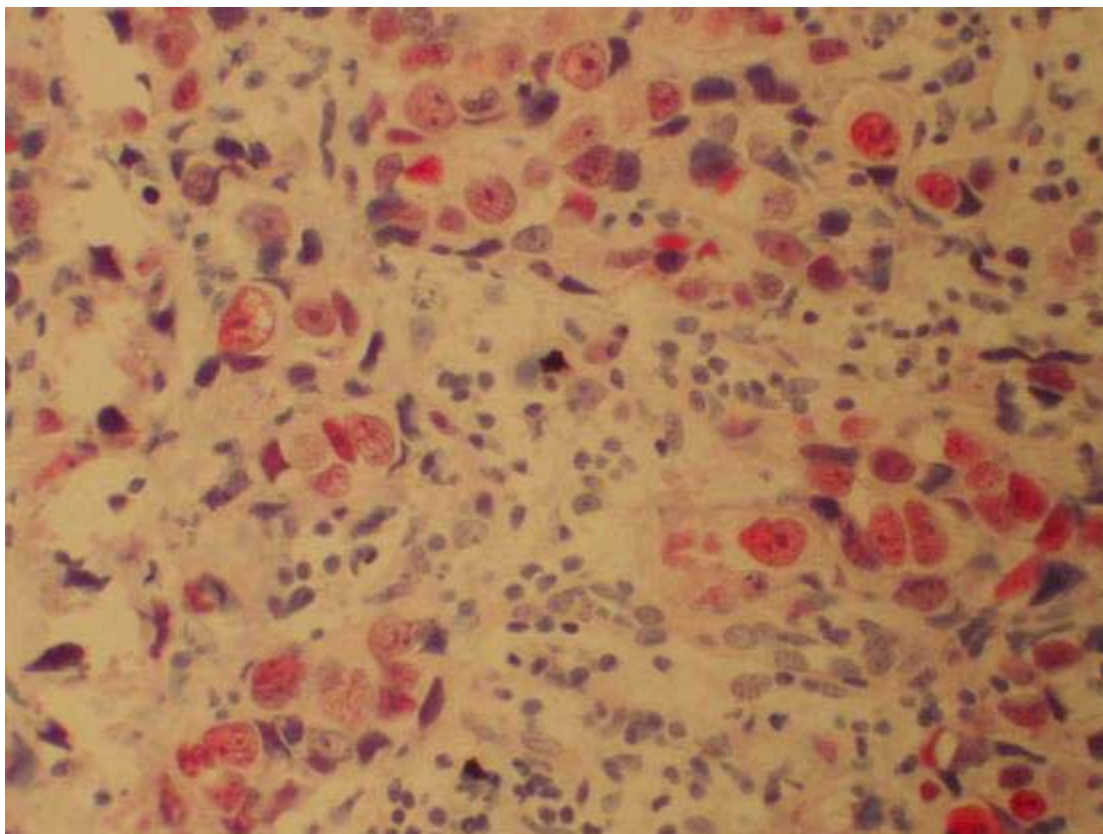
Εικόνα 4. Έκφραση πρωτεΐνης mdm-2 σε καρκίνωμα μαστού, grade III (X20, αντικειμενικός φακός).



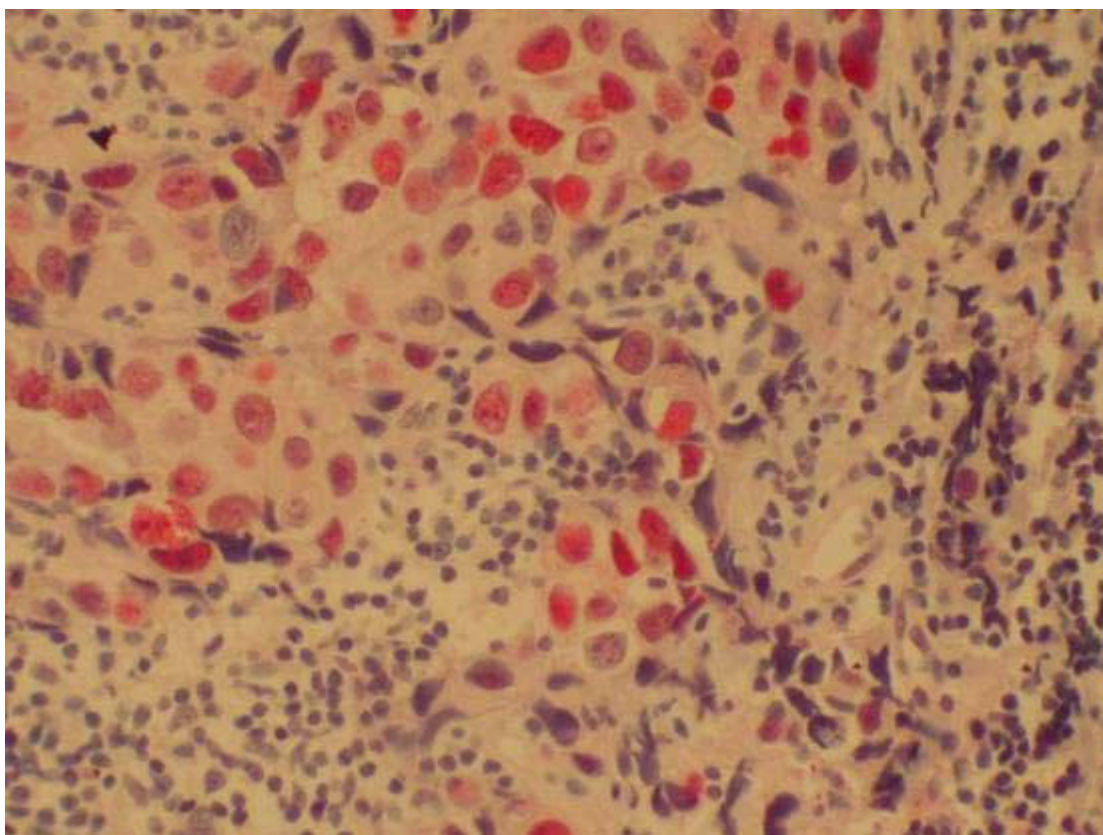
Εικόνα 5. Έκφραση πρωτεΐνης p21 σε καρκίνωμα μαστού, grade III (X20, αντικειμενικός φακός).



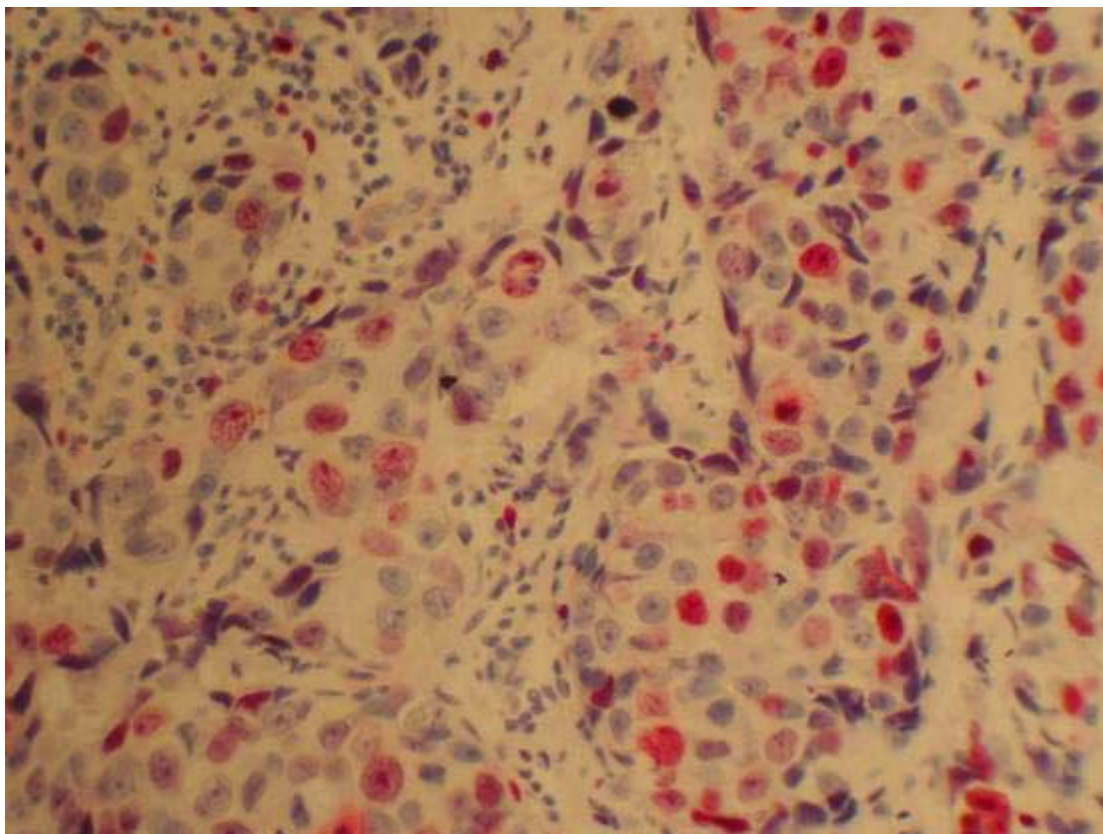
Εικόνα 6. Έκφραση πρωτεΐνης c-erbB-2 σε καρκίνωμα μαστού (X20, αντικειμενικός φακός).



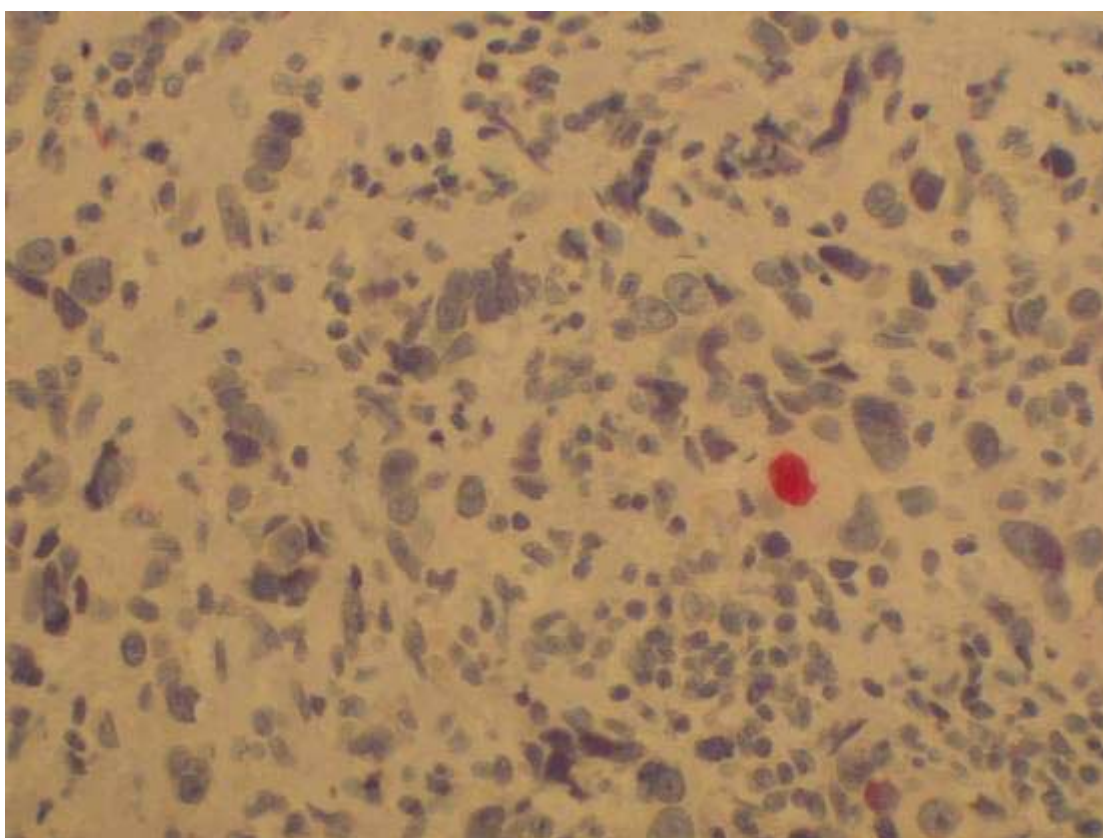
Εικόνα 7. Έκφραση πρωτεΐνης p53 σε καρκίνωμα μαστού grade III (X20, αντικειμενικός φακός).



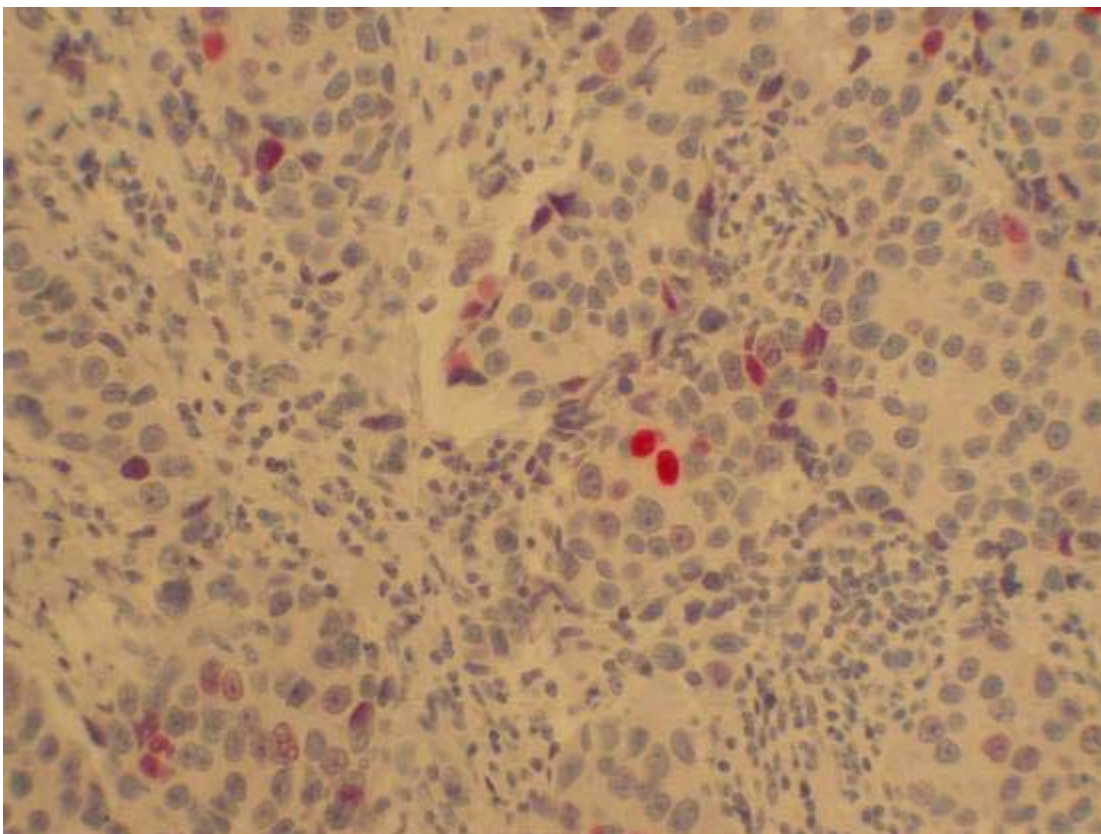
Εικόνα 8. Έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων στο ίδιο καρκίνωμα (X20, αντικειμενικός φακός).



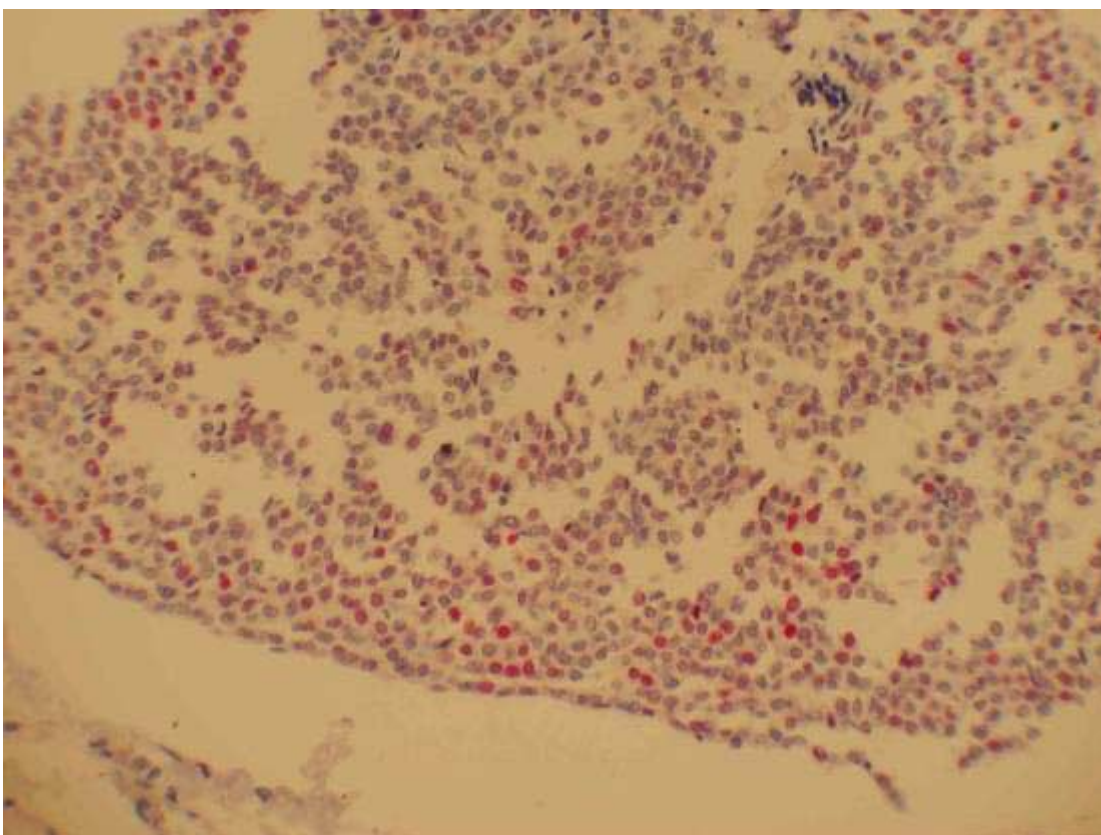
Εικόνα 9. Έκφραση πρωτεΐνης MIB-1 στο ίδιο καρκίνωμα (Χ20, αντικειμενικός φακός).



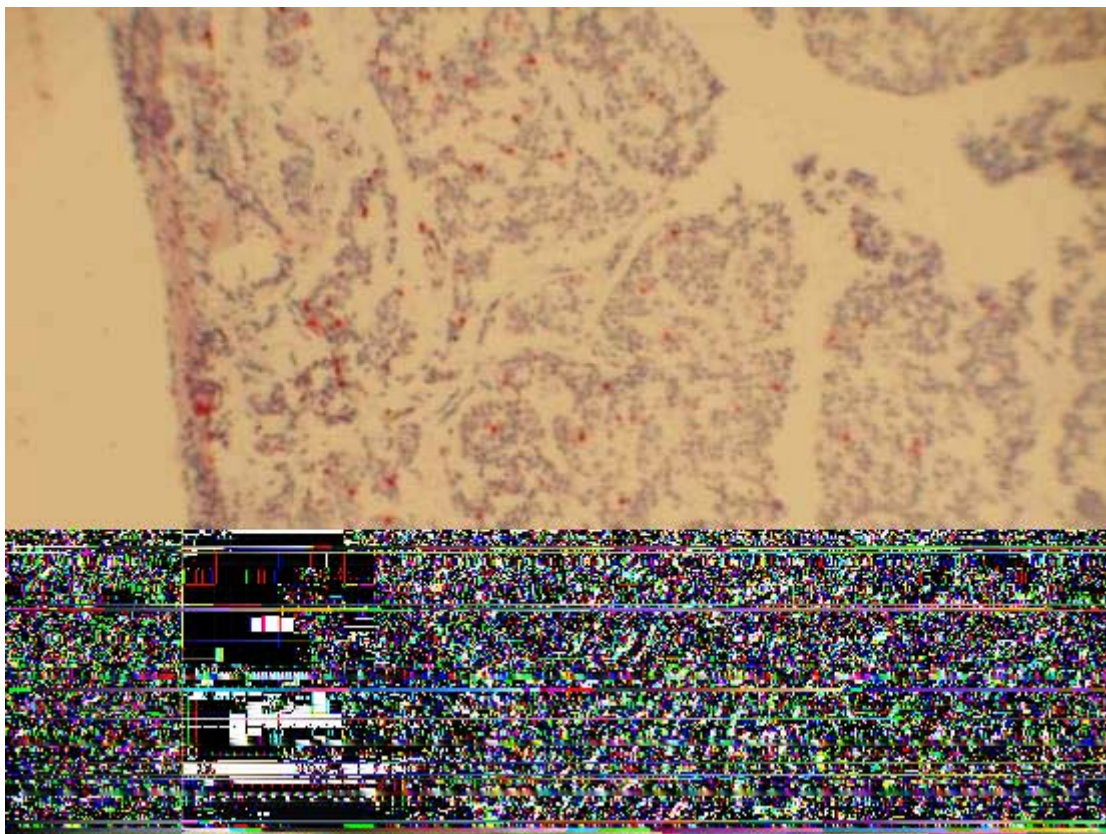
Εικόνα 10. Έκφραση πρωτεΐνης p21 σε καρκίνωμα μαστού (Χ20, αντικειμενικός φακός).



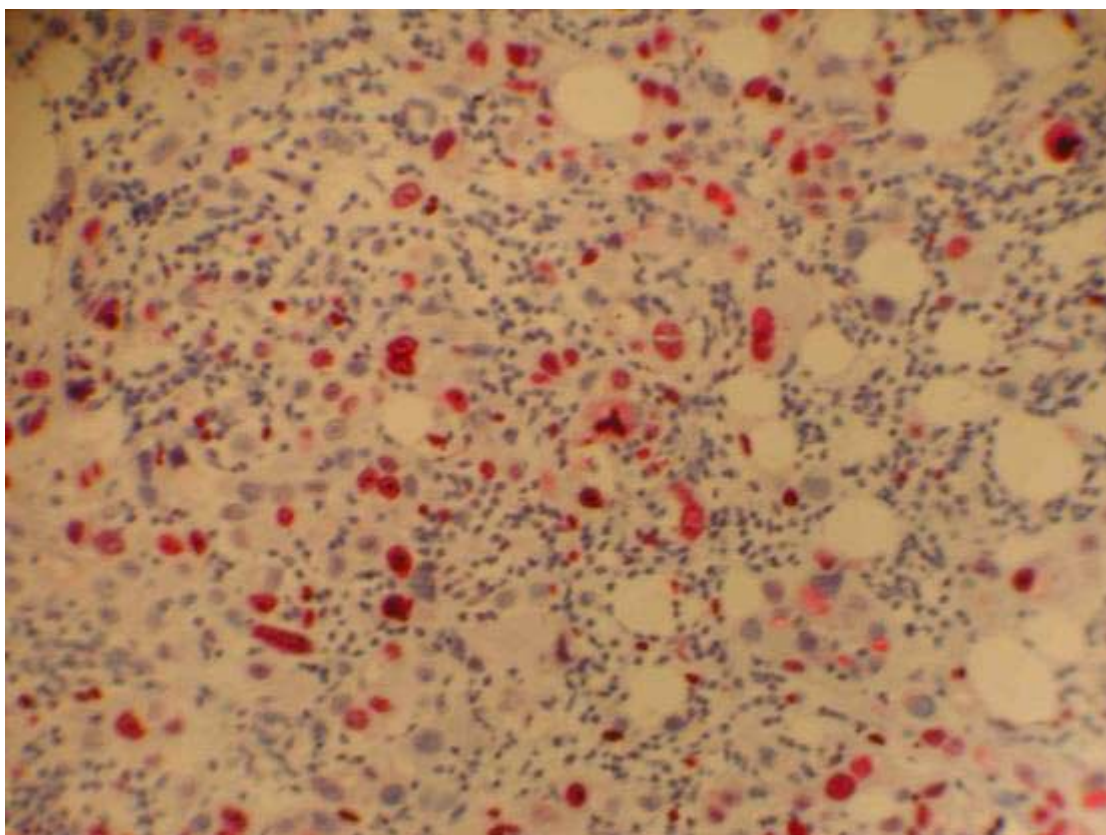
Εικόνα 11. Έκφραση πρωτεΐνης mdm-2 σε καρκίνωμα μαστού (Χ20, αντικειμενικός φακός).



Εικόνα 12. Έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνωμα μαστού (Χ10, αντικειμενικός φακός).



Εικόνα 13. Έκφραση πρωτεΐνης p53 σε καρκίνωμα μαστού (Χ10, αντικειμενικός φακός).



Εικόνα 14. Έκφραση πρωτεΐνης MIB-1 σε καρκίνωμα μαστού (Χ20, αντικειμενικός φακός).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 ρυθμίζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου και προστατεύει την σταθερότητα του κυτταρικού γονιδιώματος, επάγοντας τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της αποπτώσεως. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη p53 παράγεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα με ελάχιστο χρόνο ημισείας ζωής και πρακτικά είναι μη ανιχνεύσιμη ανοσοϊστοχημικά.

Έχει βρεθεί ότι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι ένα συχνό εύρημα σε κακοήθη νεοπλάσματα του ανθρώπου (120-123), όπως σε καρκινώματα του μαστού, του εντέρου, του πνεύμονα, της στοματικής κοιλότητας, σε γλοιώματα, σε σαρκώματα και σε κακοήθη νεοπλάσματα του αιμοποιητικού συστήματος (9-17,29,30).

Στη δική μας σειρά βρήκαμε ότι το 41% από τα καρκινώματα του μαστού που μελετήσαμε, και ειδικότερα το 13% από τα βαθμού διαφοροποίησεως I, το 37% από τα βαθμού διαφοροποίησεως II και το 50% από τα βαθμού διαφοροποίησεως III, εξέφραζαν ανοσοϊστοχημικά την πρωτεΐνη p53. Τα ευρήματά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη p53 ανιχνεύεται συχνότερα σε υψηλής ιστολογικά κακοήθειας καρκινώματα και συμφωνούν με τα αποτελέσματα άλλων μελετών που συσχετίζουν την έκφραση της p53 με χαμηλότερης διαφοροποίησης καρκινώματα (130).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του γονιδίου p53, μπορεί όμως να οφείλεται και στη σύνδεση και σταθεροποίηση της πρωτεΐνης p53 με άλλες πρωτεΐνες, ιϊκής ή κυτταρικής προέλευσης (120,123,124), ή στην μείωση της αποδόμησής της λόγω διαταραχής του δικτύου ρύθμισης p53/ mdm-2.

Ένας έμμεσος τρόπος εκτίμησης της κατάστασης του γονιδίου p53 είναι η διερεύνηση της έκφρασης των πρωτεϊνών που επάγονται από την φυσιολογική πρωτεΐνη p53, τις p21/ WAF1 και mdm-2 που σχετίζονται επίσης με την εύρυθμη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου.

Ο φυσικός τύπος του p53 (wtp53) σε συνθήκες κυτταρικού stress ή/ και βλάβης του DNA μπορεί να προκαλέσει αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου waf1, με αποτέλεσμα την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p21. Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας τα σύμπλοκα κυκλίνης – κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, που είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση ενός αριθμού δυνητικών ρυθμιστών για την εξέλιξη της πορείας του κυτταρικού κύκλου, όπως η πρωτεΐνη Rb (125-126).

Ο φυσικός τύπος του p53 επηρεάζει επίσης τη μεταγραφή του γονιδίου mdm2 (127, 128). Το γονίδιο mdm2 κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύει και απενεργοποιεί τη φυσική αλλά και την μεταλλαγμένη p53, αναστέλλοντας τον μεταγραφικό έλεγχο του p53 (129). Πιθανολογείται δηλ. ότι το φυσιολογικό mdm2 παίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου που οφείλεται στην δράση του p53. Όταν ενισχύεται και / ή υπερεκφράζεται μπορεί να αυξήσει την κυτταρική ικανότητα για δημιουργία νεοπλασμάτων. Αυτό το γονίδιο έχει βρεθεί ότι ενισχύεται σε σαρκώματα (29) και γλοιώματα (30). Υπερεκφράζεται σε καρκινώματα μαστού, σε νόσο Hodgkin, οξεία λευχαιμία, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και λεμφώματα B κυτταρικής σειράς (31 - 34).

Με βάση τα παραπάνω μελετήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 σε καρκινώματα του μαστού. Βρήκαμε ότι οι πρωτεΐνες p53, mdm2 και p21/waf1 εκφράστηκαν σε 59/144, 35/144 και 54/144 καρκινώματα μαστού αντίστοιχα. Τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τις πρωτεΐνες p53 και mdm2 είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (136, 138, 141, 142) αλλά μέχρι την δημοσίευση του άρθρου μας(18) δεν υπήρχαν πληροφορίες για την έκφραση της p21 σε μεγάλες σειρές καρκινωμάτων μαστού.

Τα ακόλουθα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 βρέθηκαν σε καρκινώματα μαστού:

Σύγχρονη έκφραση p53 / mdm2 βρέθηκε σε 20 περιπτώσεις. Οι 11 από αυτές ήταν επίσης θετικές στην πρωτεΐνη p21/waf1. Υπάρχουν αποδείξεις ότι η πρωτεΐνη mdm2

μπορεί να ανιχνευθεί κυρίως σε περιπτώσεις με φυσικό τύπο p53 (148-152). Επιπροσθέτως η πρωτεΐνη p21/waf1 επηρεάζεται από το γονίδιο του φυσικού τύπου p53 (132). Έτσι, η ανίχνευση της πρωτεΐνης p21/waf1 σε αυτές τις περιπτώσεις καρκινώματος μαστού υποδηλώνουν ότι το γονίδιο p53 δεν είναι μεταλλαγμένο και ότι η έκφραση της πρωτεΐνης p21 θα μπορούσε να οφείλεται σε επαγωγή της έκφρασής της από το p53 κάτω από συνθήκες κυτταρικού stress ή/ και DNA βλάβης, έτσι ώστε να επάγει την διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

Προηγούμενες μελέτες έχουν ερευνήσει την ενίσχυση του γονιδίου mdm2 σε καρκινώματα του μαστού (143, 144). Σε μια από αυτές, με τεχνική southern blot, μόνο σε 7 από 134 περιπτώσεις καρκινώματος μαστού που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου mdm2. Αυτό υποδηλώνει ότι μηχανισμοί ανεξάρτητοι από τη γονιδιακή ενίσχυση, πιθανόν υπερέκφραση του γονιδίου mdm2 ή αυξημένη μεταγραφή (154) ίσως παίζουν ρόλο στην απορύθμιση της έκφρασης του γονιδίου mdm2 σε καρκινώματα του μαστού.

Η έκφραση της πρωτεΐνης p53 χωρίς σύγχρονη έκφραση της mdm2 βρέθηκε σε 39 περιπτώσεις. Αυτό το πρότυπο υποδηλώνει αποδιοργάνωση του αυτορυθμιζόμενου ανατροφοδοτικού κύκλου που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών mdm2 και p53 (130, 131). Οι 21 από αυτές τις 39 περιπτώσεις καρκινωμάτων μαστού ήταν p21 αρνητικές. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι πιθανόν να έχουν επισυμβεί μεταλλάξεις του γονιδίου p53 ανίκανες να ενεργοποιήσουν mdm2 και p21/waf1. Αυτό ενισχύεται από προηγούμενα ευρήματα ότι ορισμένα καρκινώματα μαστού με p53+ / mdm2- πρότυπο πρωτεϊνών είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 (123, 155).

Οι υπόλοιπες 18 περιπτώσεις είχαν το πρότυπο p53+ / mdm2- / p21+. Είναι πιθανόν ότι σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει υπερέκφραση wtp53 η οποία επάγει την έκφραση της p21 ως προσπάθεια διακοπής του κυτταρικού κύκλου. Άλλως, εάν το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο σε αυτές τις περιπτώσεις τότε η έκφραση των πρωτεϊνών p21/waf1 ίσως να έχει συμβεί μέσω ενός τρόπου ανεξάρτητου του p53, μια και η έκφραση του

p21 in vitro μπορεί να προκληθεί από άλλους μηχανισμούς ανεξάρτητους από το p53 (156).

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η έκφραση των πρωτεϊνών mdm2 ή p21/waf1 έχουν βρεθεί με απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης p53 σε καρκινώματα του μαστού. Αυτό είναι σε αντίθεση με τα in vitro αποτελέσματα ότι δηλ. η απουσία πρωτεΐνης p53 δεν επιτρέπει έκφραση των πρωτεϊνών mdm2 και waf1/p21 (125, 126, 129, 132). Ωστόσο, είναι πιθανόν ότι περιπτώσεις με έκφραση μόνο της πρωτεΐνης p21 απεικονίζουν έκφραση του p21 ανεξάρτητη του p53 (156), ή περιπτώσεις με μη ανιχνεύσιμη ανοσοϊστοχημικά wtp53 πρωτεΐνη, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν έκφραση της πρωτεΐνης p21.

Περιπτώσεις με έκφραση μόνο της πρωτεΐνης mdm2 μπορεί να αντιπροσωπεύουν νεοπλάσματα με ενίσχυση του γονιδίου mdm2, όπως έχει περιγραφεί παλαιότερα (143, 144). Ωστόσο, δεδομένου ότι η ενίσχυση του γονιδίου mdm2 δεν είναι συχνή σε καρκινώματα του μαστού, η έκφραση της πρωτεΐνης mdm2 σε απουσία ενίσχυσης θα μπορούσε να οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς, όπως χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις ή μεταλλάξεις που θα μπορούσαν να αυξήσουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης mdm2 (143).

Σχετικά με τα καρκινώματα που δεν εκφράζουν καμιά από τις παραπάνω πρωτεΐνες (p53- / mdm2- / p21-), είναι πιθανόν ότι το γονίδιο p53 είναι φυσικός τύπος ή ότι το γονίδιο p53 είναι μεταλλαγμένο αλλά απενεργοποιημένο εξαιτίας άχρηστων ή μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frame-shift) (123, 155).

Άλλωστε, η πιθανότητα ότι μερικά καρκινώματα μαστού με χωρίς νόημα (non-sense) σημειακές μεταλλάξεις του p53 δεν αναδεικνύουν ανοσοϊστοχημικά την p53 είναι δυνατή (157), όπως συμβαίνει και σε ορισμένα λεμφώματα (124).

Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών p53, mdm2 και p21/waf1 μπορεί να αποφέρει έμμεσες πληροφορίες για την κατάσταση του γονιδίου p53 σε καρκινώματα του μαστού και πιθανά να προσφέρει πρόσθετες πληροφορίες σε μοριακές μελέτες.

Οι μελέτες μας δείχνουν ότι παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα σύμφωνης ή ασύμφωνης έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 / p21 σε καρκινώματα του μαστού, υποδηλώνοντας ότι η διατάραξη του κατασταλτικού δρόμου της κυτταρικής ανάπτυξης που έχει σχέση με τις πρωτεΐνες αυτές, ίσως παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια ενός ποσοστού αυτών των νεοπλασμάτων.

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι 37% των καρκινωμάτων που μελετήσαμε εκφράζουν την πρωτεΐνη p21. Παρατηρείται επίσης ότι υπάρχει μια τάση συνέκφρασης των p53 και p21 ($P = 0.088$). Επειδή όπως προαναφέραμε, η πρωτεΐνη p21 επάγεται από την wtp53 και δεδομένου ότι μέχρι στιγμής δεν έχει δημοσιευθεί ανεύρεση μεταλλάξεων του waf1/p21 στα καρκινώματα του μαστού, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η έκφραση της p21 στα καρκινώματα αυτά πιο συχνά οφείλεται σε φυσιολογική ή αυξημένη δράση του wtp53. Ο ίδιος μηχανισμός έχει υποτεθεί για να εξηγηθεί η έκφραση του p21 σε καρκινώματα του εντέρου (158,159).

Ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο, παρατηρήθηκε ότι έκφραση της p21 παρατηρήθηκε κυρίως στα πορογενή καρκινώματα (36%) και λιγότερο στα λοβιακά (27%). Αν και ο αριθμός των εξετασθέντων λοβιακών καρκινωμάτων είναι σχετικά μικρός, υπάρχει ένδειξη ότι η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένο φαινότυπο νεοπλασματικών κυττάρων.

Σε *in vitro* μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι η έκφραση της p21 παρατηρείται κατά την προώθηση της διαφοροποίησης σε διάφορες κυτταρικές σειρές κακοήθων κυττάρων (160). Στην δική μας μελέτη όμως δεν βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της p21 και της διαφοροποίησης των καρκινωμάτων. Ωστόσο φαίνεται να υπάρχει μια τάση για αντίστροφη συσχέτιση. Δηλ., αντίθετα από ότι έχει αναφερθεί σε καρκινώματα του πνεύμονα ή του εντέρου (158,161), ότι η p21 σχετίζεται με την διαφοροποίηση των νεοπλασμάτων, στα καρκινώματα του μαστού φαίνεται ότι εκφράζεται περισσότερο σε υψηλόβαθμα καρκινώματα. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι η p21 στα καρκινώματα του μαστού ίσως να μην συμμετέχει στην πορεία της διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά να επηρεάζεται περισσότερο από

τον βαθμό της κυτταρικής ατυπίας (163) και επομένως η έκφρασή της να σχετίζεται με ένα πιθανά πιο επιθετικό φαινοτυπικά τύπο καρκινωμάτων.

Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι όλα τα βαθμού διαφοροποίησης I νεοπλάσματα εξέφραζαν χαμηλό ποσοστό p21 (<25%) και όλα τα υψηλόβαθμα νεοπλάσματα υψηλό ποσοστό p21 (>25%). Τα ευρήματά μας συμφωνούν με αυτά των Barbareschi και συνεργατών (162). Αντίθετα σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε υψηλή έκφραση της p21 σε χαμηλόβαθμα καρκινώματα του μαστού (164).

Παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της p21 σε νεοπλάσματα με αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα (>MIB1). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως προσπάθεια ελέγχου της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, διότι η p21 πρωτεΐνη είναι αρνητικός ρυθμιστής του. Απουσία συσχέτισης των δύο παραμέτρων έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες καρκινωμάτων μαστού (165), ενώ άλλοι ερευνητές έχουν επίσης παρατηρήσει θετική συσχέτιση των δυο παραμέτρων (166).

Η συσχέτιση της έκφρασης της p21 με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων στα νεοπλασματικά κύτταρα βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική στην παρούσα μελέτη ($\chi^2 = 3.688$; $df = 1$; $P = 0.055$). Από όσο γνωρίζουμε, σε καμία άλλη αντίστοιχη μελέτη δεν έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική σχέση των δυο αυτών δεικτών (162,164). Πιθανόν οι οιστρογονικοί υποδοχείς να επάγουν την έκφραση της p21 με τρόπους ανεξάρτητους του p53 και ίσως οι οδοί αυτές να έχουν σχέση με την κυτταρική διαφοροποίηση.

Στην μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης της p21 με την έκφραση της c-erbB2, του βαθμού διαφοροποίησης, της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων ή της μεγαλύτερης διαμέτρου του νεοπλάσματος.

Μέχρι τη δημοσίευση του άρθρου μας (18), η έκφραση της πρωτεΐνης p21/WAF1 δεν είχε μελετηθεί σε μεγάλες σειρές καρκινωμάτων του μαστού.

Σε σχέση με την πρωτεΐνη mdm2, βρέθηκε ότι 24% των καρκινωμάτων που μελετήσαμε εκφράζουν την πρωτεΐνη αυτή. Κανένα από τα καρκινώματα αυτά δεν ήταν

λοβιακού τύπου, επομένως θα μπορούσαμε επίσης να υποθέσουμε ότι η έκφραση αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένο φαινότυπο νεοπλασματικών κυττάρων, όπως υποθέσαμε για την έκφραση της p21.

Επίσης βρήκαμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της mdm2 με υψηλόβαθμα καρκινώματα (Γραμμική συσχέτιση $\chi^2 = 7.628$; $df = 1$; $P=0.006$). Όμοια συσχέτιση έχει παρατηρηθεί σε μελέτες σειρών σαρκωμάτων μαλακών μορίων (167), οστεοσαρκωμάτων (168) και καρκινωμάτων μαστού (164). Ωστόσο άλλοι ερευνητές δεν έχουν βρει στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματά τους σε μελέτες καρκινωμάτων μαστού (169).

Στην μελέτη μας παρατηρήσαμε ακόμα ότι υπάρχει μια τάση σύγχρονης έκφρασης της mdm2 και των οιστρογονικών υποδοχέων ($\chi^2 = 1.994$; $df = 1$; $P = 0.158$). Όμοια αποτελέσματα με στατιστικά σημαντική συσχέτιση, έχουν δημοσιευθεί και σε άλλες μελέτες καρκινωμάτων μαστού, τόσο *in vitro*, σε κυτταρικές καλλιέργειες (169), όσο και *in vivo* (170). Τα αποτελέσματα αυτά επιτρέπουν την υπόθεση ότι η μεταγραφή του γονιδίου mdm2 εξαρτάται κατά κάποιο τρόπο από την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (170). Ωστόσο άλλες μελέτες δεν αναφέρουν συσχέτιση των δύο παραγόντων (164).

Μελετώντας την έκφραση των mdm2 και p53 βρήκαμε στατιστικά σημαντική σχέση στην συνύπαρξη των δυο αυτών πρωτεϊνών ($\chi^2 = 4.999$; $df = 1$; $P = 0.025$). Όπως είναι γνωστό, οι πρωτεΐνες αυτές αλληλορρυθμίζουν την έκφρασή τους. Η p53 προάγει την έκφραση της mdm2 και η παρουσία της mdm2 αναστέλλει την έκφραση της p53.

Με βάση τα παραπάνω και σε σχέση με τα νεώτερα μοριακά δεδομένα για τη λειτουργία και τις επιδράσεις του δικτύου του p53 μελετήσαμε την σχέση των φαινότυπων των καρκινικών κυττάρων p53/ mdm2 και p53/p21 με τους ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες που μελετήσαμε, δηλ. το βαθμό διαφοροποίησης και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων. Παρατηρήσαμε ότι οι φαινότυποι p53+/ mdm2+ και p53+/p21- σχετίζονταν με συχνότερη ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων, σε ποσοστό

71,4% και 94% αντίστοιχα και ακόμα ο φαινότυπος p53+/p21- με υψηλού βαθμού διαφοροποιήσεως νεοπλάσματα, σε ποσοστό 93% . Ίσως λοιπόν η εκτίμηση φαινοτυπικών συνδυασμών να προσφέρουν ακριβέστερες προγνωστικές πληροφορίες για την πρόγνωση και θεραπευτική προσέγγιση των καρκινωμάτων του μαστού. Αντίστοιχη συσχέτιση κυτταρικών φαινοτύπων δεν βρήκαμε μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα έκφρασης της mdm2 με τους λοιπούς δείκτες που μελετήσαμε, δεν παρατηρήθηκε να έχει στατιστικά σημαντική σχέση με την έκφραση της c-erbB2, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της ύπαρξης λεμφαδενικών μεταστάσεων ή της μεγαλύτερης διαμέτρου του νεοπλάσματος.

Όσον αφορά τέλος την μελέτη της έκφρασης της bcl2 και την σχέση της με τους υπόλοιπους παράγοντες βρέθηκε ότι η έκφραση της bcl2, αν και δεν είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 και p21, εμφάνιζε μια ήπια τάση για αντίστροφη σχέση. Αυτό είναι λογικό, δεδομένου ότι η p53 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του bcl2 (99,224). Αρκετές μελέτες αναφέρουν επίσης αντίστροφη σχέση των p53 και bcl2 (172,173) χωρίς όμως να καταφέρουν να αποδείξουν κάποια σχέση ανάμεσα σε μεταλλαγμένο τύπο p53 (περιορισμένο στα εξόνια 5-9) και bcl2 (172), ενώ σε άλλες μελέτες τέτοια σχέση δεν παρατηρήθηκε (174).

Αντίθετα από άλλες μελέτες (172,173,174) στην δική μας σειρά δεν καταφέραμε να βρούμε στατιστικά σημαντική σχέση της bcl2 με τους ER και τον βαθμό διαφοροποίησης. Είναι πάντως ενδιαφέρον ότι όλα τα βαθμού κακοηθείας I καρκινώματα εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό ανοσοθετικών κυττάρων.

Επίσης δεν βρήκαμε στατιστικά σημαντική σχέση της bcl2 με την πρωτεΐνη mdm2, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού-MIB1, τη διάμετρο του όγκου και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Αντίθετα από τα αποτελέσματα όλων των σχετικών μελετών που βρήκαμε στη βιβλιογραφία (172,173,174) στη δική μας μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική

σχέση των bcl2 και c-erbB-2, σχετίζοντας το bcl2 με ένα αποδεδειγμένα κακό προγνωστικό δείκτη. Πιθανόν έτσι να εξηγείται γιατί ορισμένα νεοπλάσματα με c-erbB2 + δεν ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Αν και οι μέχρι τώρα μελέτες θεωρούν ότι η έκφραση της πρωτεΐνης bcl2 είναι ένας καλός ενδεικτικός προγνωστικός παράγοντας, ίσως χρειάζονται παραπάνω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό τυχαίων δειγμάτων για την πληρέστερη αξιολόγησή της.

Τέλος από τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης φαίνεται ότι από όλους τους παράγοντες που μελετήσαμε (c-erbB2, p53, p21, mdm2, ER, bcl2) μόνο μια μεταβλητή, η c-erbB2, έχει αξιοσημείωτη επίδραση, μόλις έξω από τα όρια της στατιστικής σημαντικότητας ($P = 0.0984$) στην παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και ότι η πρωτεΐνη mdm2 σχετίζεται με υψηλόβαθμα καρκινώματα.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- Ένα μεγάλο ποσοστό (41%) από τα καρκινώματα του μαστού που μελετήσαμε εξέφραζε ανοσοϊστοχημικά την πρωτεΐνη p53. Η πρωτεΐνη p53 ανιχνεύεται συχνότερα σε καρκινώματα υψηλής ιστολογικά κακοήθειας.

- Παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 / p21 υποδηλώνοντας ότι η διαταραχή του κατασταλτικού δρόμου της κυτταρικής ανάπτυξης που έχει σχέση με τις πρωτεΐνες αυτές στα καρκινώματα του μαστού παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια τουλάχιστον ενός ποσοστού αυτών των νεοπλασμάτων.

- Η υπερέκφραση της p53 σχετίζεται με συνέκφραση της mdm2 ενώ η έκφραση της p21 στα καρκινώματα του μαστού πιθανώς οφείλεται σε φυσιολογική ή αυξημένη δράση του φυσικού τύπου p53.

- Η επαγωγή της p21 στα καρκινώματα του μαστού φαίνεται να είναι και p53-εξαρτώμενη και p53-ανεξάρτητη. Η έκφρασή της σχετίζεται με ένα φαινοτυπικά πιο επιθετικό τύπο καρκινωμάτων, με νεοπλάσματα με αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα αλλά και με παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων στα νεοπλασματικά κύτταρα.

- Η έκφραση της mdm2 σχετίζεται με υψηλόβαθμα καρκινώματα και με αυξημένη κυτταρική ατυπία. Σχετίζεται επίσης με την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων. Τα αποτελέσματα αυτά επιτρέπουν την υπόθεση ότι η έκφραση των γονιδίων mdm2 και p21 εξαρτώνται κατά κάποιο τρόπο από την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων.

- Οι φαινότυποι p53+/ mdm2+ και p53+/p21- σχετίζονταν με συχνότερη ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων, σε ποσοστό 50% και 53% αντίστοιχα και ο φαινότυπος p53+/p21- με υψηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα, σε ποσοστό 93% .

-Η έκφραση της *bcl2* εμφάνιζε μια ήπια τάση για αντίστροφη σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών *p53*, *p21* και *mdm2*. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της *bcl2* με τους ER, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, τη διάμετρο του όγκου, την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων ή τον βαθμό διαφοροποίησης. Αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον *c-erbB-2*.

-Από όλους τους παράγοντες που μελετήσαμε μόνο η πρωτεΐνη *c-erbB2* εμφανίζει στατιστικά αξιοσημείωτη επίδραση στην παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Συνοψίζοντας στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε τα παρακάτω στοιχεία, τα οποία μέχρι σήμερα δεν βρήκαμε να αναφέρονται στην βιβλιογραφία:

Η έκφραση των πρωτεϊνών *mdm2* και *p21* σχετίζονται με συγκεκριμένο φαινότυπο νεοπλασματικών κυττάρων.

Η έκφραση της πρωτεΐνης *p21* σχετίζεται με την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων.

Η πρωτεΐνη *bcl-2* σχετίζεται με την έκφραση της πρωτεΐνης *c-erbB-2*.

Οι φαινότυποι *p53+/mdm2+* και *p53+/p21-* σχετίζονται με δυσμενείς ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες.

Αντίθετα από άλλους ερευνητές παρατηρήσαμε θετική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης πρωτεΐνης *mdm2* και βαθμού κακοηθείας, *mdm2* και έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων, έκφρασης πρωτεΐνης *p21* και δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, καθώς και αδυναμία συσχέτισης της έκφρασης της πρωτεΐνης *bcl2* με έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων, βαθμού κακοηθείας και δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, ενώ παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης *bcl2* με την έκφραση της πρωτεΐνης *c-erbB-2*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το καρκίνωμα του μαστού είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από κακοήθεια στο γυναικείο πληθυσμό. Αν και πολλές νέες μέθοδοι χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για την πρόιμη διάγνωση και την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου η θνητότητα από καρκίνωμα του μαστού δεν έχει ουσιαστικά μεταβληθεί εδώ και 30 χρόνια.

Η ιστοπαθολογική εξέταση παίζει σημαντικό ρόλο στη διάγνωση, την θεραπευτική αντιμετώπιση και την πρόγνωση του καρκινώματος του μαστού. Προς το παρόν, φαίνεται ότι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες καθορίζονται ακόμα από τα αποτελέσματα της κλασσικής παθολογοανατομικής εξέτασης του παρασκευάσματος και τον συνδυασμό τους: βαθμός διαφοροποιήσεως, σταδιοποίηση λεμφαδένων, μέγεθος όγκου, αγγειακή διήθηση και ιστολογικός τύπος.

Με βιοχημικές ή ανοσοϊστοχημικές μεθόδους, και κυρίως για διερεύνηση έκφρασης ορμονικών υποδοχέων, επιτυγχάνονται επιπρόσθετες πληροφορίες για την ανταπόκριση σε ορισμένα θεραπευτικά σχήματα. Επίσης γίνονται εκτεταμένες έρευνες με νεώτερες μεθόδους για ανεύρεση αξιόπιστων και στατιστικά σημαντικών δεικτών που ευελπιστούμε ότι θα προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για την αιτιολογία, τη πρόγνωση και την θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκινώματος του μαστού.

Έχει παρατηρηθεί ότι ένα συχνό εύρημα στα καρκινώματα του ανθρώπου, και στο μαστό, είναι μεταλλάξεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Το γονίδιο αυτό ρυθμίζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου και προστατεύει την σταθερότητα του κυτταρικού γονιδιώματος.

Στην παρούσα μελέτη εξετάζομε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p21/WAF1 και mdm2 που επάγονται από την πρωτεΐνη p53 σε καρκινώματα μαστού, σε μια προσπάθεια να αποκτήσομε πληροφορίες για την κατάσταση των δικτύων p53/ mdm2

και p53/ p21 σ' αυτούς τους όγκους και για τους πιθανούς μηχανισμούς συμμετέχουν στην ογκογένεση του καρκινώματος του μαστού. Επίσης να συσχετίσουμε την έκφρασή τους με την ιστολογική διαφοροποίηση, την ανοσοϊστοχημική έκφραση των ορμονικών υποδοχέων και της και της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης bcl2, το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, ώστε να εκτιμήσουμε την αξία αυτής της συνδυασμένης ανοσολογικής εκτίμησης στην πρόβλεψη της βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων αυτών.

Το υλικό της μελέτης μας αποτελείται από 144 περιπτώσεις καρκινωμάτων μαστού (20 βαθμού κακοηθείας I, 73 βαθμού κακοηθείας II και 51 βαθμού κακοηθείας III) σε τομές κύβων παραφίνης.

Έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21, mdm2 και bcl-2 παρατηρήθηκαν σε 59/144, 53/144, 35/144 και 61/144 καρκινώματα. Σύγχρονη έκφραση των πρωτεϊνών p53+/mdm-2+ παρατηρήθηκε σε 20/144 περιπτώσεις. 11 από αυτές εξέφραζαν θετικότητα και στην πρωτεΐνη p21/ WAF1. Ασυμφωνία έκφρασης p53+/mdm2- βρέθηκε σε 39 περιπτώσεις. 18 από αυτές ήταν p21/WAF1 θετικές και οι 21 ήταν p21/WAF1 αρνητικές. 54 περιπτώσεις ήταν p53-/mdm2-/WAF1- και 8 ήταν p53-/mdm2+/ p21+.

Η έκφραση της p21 στα καρκινώματα του μαστού πιθανώς οφείλεται σε φυσιολογική ή αυξημένη δράση του φυσικού τύπου p53 ενώ η υπερέκφραση της p53 σχετίζεται με συνέκφραση της mdm2.

Παρατηρούνται λοιπόν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών p53 / mdm2 / p21 υποδηλώνοντας ότι η διαταραχή του κατασταλτικού δρόμου της κυτταρικής ανάπτυξης που έχει σχέση με τις πρωτεΐνες αυτές στα καρκινώματα του μαστού παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεια τουλάχιστον ενός ποσοστού αυτών των νεοπλασμάτων.

Από όλους τους παράγοντες που μελετήσαμε μόνο η πρωτεΐνη c-erbB2 εμφανίζει στατιστικά αξιολογημένη επίδραση στην παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Η έκφραση της p21 σχετίζεται με ένα φαινοτυπικά πιο επιθετικό τύπο καρκινωμάτων, με νεοπλάσματα με αυξημένη πολλαπλασιαστική ικανότητα και με παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων στα νεοπλασματικά κύτταρα.

Η έκφραση της mdm2 σχετίζεται με υψηλόβαθμα καρκινώματα και με αυξημένη κυτταρική ατυπία. Σχετίζεται επίσης με την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων. Τα αποτελέσματα αυτά επιτρέπουν την υπόθεση ότι η έκφραση των γονιδίων mdm2 και p21 εξαρτώνται κατά κάποιο τρόπο από την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων.

Οι φαινότυποι p53+/ mdm2+ και p53+/p21- σχετίζονταν με συχνότερη ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων, σε ποσοστό 50% και 53% αντίστοιχα και ακόμα ο φαινότυπος p53+/p21- με υψηλού βαθμού διαφοροποίησης νεοπλάσματα, σε ποσοστό 93% .

Η έκφραση της bcl2 εμφάνιζε μια ήπια τάση για αντίστροφη σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών p53, p21 και mdm2. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της bcl2 με τους ER, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1, τη διάμετρο του όγκου, την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων ή τον βαθμό διαφοροποίησης. Αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον c-erbB-2.

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the pattern of expression of the two wild-type (wt) p53 induced proteins mdm-2 and p21/ waf1 and bcl-2 anti-apoptotic protein in breast carcinomas in relation to the expression of p53 protein, the c-erbB-2 oncoprotein, the oestrogen receptor status, the proliferation nuclear antigen MIB1/ Ki-67, the histological grade and the lymph node status in order to obtain combined information of these proteins in the genetic pathway of breast carcinoma and to estimate the possible clinical use of these proteins in evaluating the biological behaviour of different immunotypes characterizing these tumors.

Formalin-fixed paraffin embedded tissue from 144 breast carcinomas was stained by immunohistochemistry for p53, mdm2, p21, c-erbB2, bcl-2 proteins, estrogen receptors (ER) and MIB1/ Ki-67. We found p53, p21, mdm2 and bcl-2 protein expression in 59/144, 53/144, 35/144 and 61/144 carcinomas, respectively. Parallel expression of p53/mdm2 protein was found in 20 cases. 11 were also p21 positive. Discordant p53+/mdm2- protein expression was found in 39 cases. 18 of these were p21 positive and 21 were p21 negative. 54 cases were p53-/mdm2-/p21- and 8 were p53-/mdm2-/ p21+. The expression of p21 in breast carcinomas may be due to normal or increased activation of wt-p53, while over-expression of p53 is related with co-expression of mdm2 protein.

The p21 expression is related with carcinomas with a more aggressive behavior, increased mitotic activity and ER+.

The mdm-2 expression is related with high grade carcinomas and ER+.

The immunotypes p53+/mdm2+ and p53+ /p21- are related with lymph node metastasis and high grade neoplasms.

Bcl-2 expression had a tendency for a discordant relation with p53, p21 and mdm-2 proteins expression. But there was a statistically significant relationship with the c-erb-B-2 expression.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. *Weinberg RA*: Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989,49:3713-3721.
2. *Land H, Parada LF, Weinberg RA*: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983, 304:596-602.
3. *Holford TR, et al.*: Trends in female breast cancer in Connecticut and the USA. *J. Clin. Epidemiol.* 44:29, 1991.
4. *Harris, JR, et al.*: Breast Cancer. *N. Engl.J.Med.* 327:319,1992.
5. *Marshall, et al.*: Search for a killer: Focus shifts from fats to hormones. *Science* 259:618, 1993.
6. *Cotran, Kumap, Robbins* Pathologic Basis of disease, σελ.1089-1111, Saunders, 1998.
7. *Azzopardi J*. Problems in breast pathology. Σελ. 12-25. Saunders, 1979.
8. *Cooper D, Schermer A, Tung-Tien S*. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: Strategies, applications and limitations. *Lab Invest.* Vo52, 3, 243-256, 1985.
9. *Rosen PP, Oberman HA*. Tumors of the Mammary Gland. In: *Atlas of Tumor Pathology*. 3rd ed. Fascicle 7. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology; 1993.
10. *Histological Typing of Breast Tumours*. 2nd ed. In: *International Classification of Tumours*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1981.
11. *Baker SJ, Fearon SR, Nigro JM*. Chromosome 17 deletion and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:217-221
12. *Purdie CA, O'Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC*. P53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol* 1991;138:807-813.
13. *Sanidas EE, Filipe IM, Jader S, Levinson D, et al.* Immunohistochemical detection of the p53 gene product in gastric cancer patients: aberrant expression but no prognostic significance. *Onc Reports* 1994; 1:1263-1268.
14. *Hsu JC, Metcalf RA, Sun T, Welsh JA, Wang NG, Harris CC*, Mutations hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; 350:427-428
15. *Fontanini G, Bigini D, Vignati S et al.* P53 expression in non small cell lung carcinomas: clinical and biological correlations. *Anticancer Res* 1993; 13(3):737-742.

16. *Haapasalo H, Isola J, Sallinen P et al.* Abberant p53 expression in astrocytic neoplasms of the brain: association with proliferation. *Am J Pathol* 1991;142:1347-1351.
17. *Stretch JR, Gatter KC, Lane DP, Harris AL.* Expression of mutant p53 in melanomas. *Cancer Res.* 1991;51:5976-5979.
18. *Ramqvist T, Magnusson KP, Wang V et al.* Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma line that carries mutant p53. *Oncogene* 1993;8:1495-1500.
19. *Orden G, Kiggie R, et al.* Assessment of p53 protein expression in normal, benign and malignant oral mucosa. *J Pathol* 1992;166:389-394.
20. *Sugamoto K, Toyoshima H, Sakai R et al.* Mutations of p53 gene in lymphoid leukemia. *Blood* 1991; 77:1153-1155.
21. *Giannikaki E, Kouvidou C, Tzardi M, Stefanaki K, Koutsoubi K, Gregoriou M, Zois E, Kakolyris S, Mavroudi C, Delides G, Georgoulas V, Kanavaros P.* p53 protein expression in breast carcinomas. Comparative study with the wild type p53 induced proteins mdm2 and p21/waf1. *Anticancer Res.* 1997 May-Jun; 17(3C):2123-7.
22. *Kelsey GL, Gammon MD.* The epidemiology of breast cancer. *Ca Cancer J Clin* 41:146-165, 1991.
23. *Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R et al.* Relationship of patient age to pathological features of the tumor and prognosis for patients with grade I and II breast cancer. *J Clinical Oncol.* 12:888-894, 1994.
24. *Rosen PP:* Proliferative breast disease. An unresolved diagnostic dilemma. *Cancer* 71:3798-3807, 1993.
25. *Page DL, Anderson TW, Sakamoto G.* Infiltrating carcinoma: major histological types. In Page DL, Anderson TW *Diagnostic histopathology of the breast.* WB Saunders, London, p193-235.
26. *Ellis EO, Galea M, Broughton N, et al.* Pathological prognostic factors in breast cancer. *Histopathology* 20:479-489, 1992.
27. *Oza AM, Tannock IF.* Clinical relevance of breast cancer biology. *Haematology/Oncology Clinics of North America* 1994; 8:1-14.
28. *Hall LM et al.* Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17 q21. *Science* 1990;250:1684-1689.

29. *Miki Y et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266(October 7):66-71.
30. *Gayther SA et al.* Germline mutations of the BRCA1 gene in breast/ovarian cancer families: evidence for a genotype/phenotype correlation. *Nature Genetics* 1995; 11 :428-433.
31. *Hall JT et al.* Growth retardation and tumour inhibition by BRCA I. *Nature Genetics* 1996; 12:298-30.
32. *Tavtigian S et al.* The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics* 1996;12:333-337
33. *Wooster R et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-2090.
34. *Kerangueven F et al.* Patterns of loss of heterozygosity at loci from chromosome arm 13 q suggests a possible involvement of BRCA2 in sporadic breast tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1995; 13(4):291-4.
35. *Seidman JD, Schnaper LA, Aisner SC:* Relationship of the size of the invasive component to the primary breast carcinoma to axillary lymph node metastasis. *Cancer* 75:65-71, 1995.
36. *Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al.* Genetic alterations during colorectal-tumour development. *New England Journal of Medicine* 1988; 319:525-532.
37. *Wellings SR, Jensen HM, Macrum RG:* An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *JNCL* 55:231-273, 1975.
38. *Dupont WD, Page DL.* Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312:146-151,1985.
39. *Rosai J:* Borderline epithelial lesions of the breast. *Am J Surg Pathol* 15:209-221, 1991.
40. *Bodian CA et al.* Prognostic significance of benign proliferative disease. *Cancer* 71:3896-3907, 1993.
41. *Allred DC et al.* Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Human Pathology* 1992; 23:974-979.

42. . *Maguire HC, Jr et al.* Expression of c-erbB-2 in in situ and in adjacent invasive ductal adenocarcinomas of the female breast. *Pathobiology* 1992; 60: 117-121.
43. *Clark GM.* Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Research and Treatment* 1994; 30: 117-126.
44. *Robinson IA, Mc Kee G, Nicholson A, Cook MG, et al.* Prognostic value of cytologic grading of fine-needle aspirates from breast carcinomas. *Lancet* 1994; 343:947-9.
45. *Kinne DW.* : Staging and follow up of breast cancer patients. *Cancer* 67:1196-1198, 1991.
46. *Di Costanzo D, Rosen PP, Gareen I, Franklin S, Lesser M:* Prognosis in infiltrating lobular carcinoma. An analysis of classical and variant tumors. *Am J Surg Path* 14:12-23, 1990.
47. *Fisher ER, Kenny JP, Sass R et al.* Medullary cancer of the breast revisited. *Breast Cancer Res and Treat* 16:215-229, 1990.
48. *Lee A, DeLellis R, Silverman M, Heatley GJ, Wolfe H.* Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood- vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J Clin Oncol.* 1990; 8:1457-1465.
49. *Pinder S, Ellis IO, O'Rourke S, et al.* Pathological prognostic factors in breast cancer. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large series with long-term followup. *Histopathology.* 1994; 24:41-47.
50. *Gilchrist KW, Gray R, Fowble B, Tormey DC, Taylor SG:* Tumor necrosis is aprognostic predictor for early recurrence and death in lymph node positive breast cancer. *J Clin Oncol.:* 11:1929-1935, 1993.
51. *Bonnier P, Charpin C, Lejeune C, et al.* Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition. *Int J Cancer.* 1995; 62; 382-385.
52. *Elston CW, Ellis JO.* Pathological prognostic factors in breast cancer: experience from a long study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991; 19:403-410.
53. *Leitner S, Swern AS, Weinberger D, Duncan LJ, Hutter RVP.* Predictors of recurrence for patients with small (one centimeter or less) localized breast cancer (T1a,b N0 M). *Cancer.* 1995; 76:2266-2274.

54. *Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al., eds.* AJCC Manual for Staging of Cancer. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Raven; 1997.
55. *Sobin LH, Wittekind CH, eds.* International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours. 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1997.
56. *Bloom HJG, Richardson WW.* Histological grading and prognosis in breast carcinoma: a study of 1049 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957; 11:359-377.
57. *Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M.* Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. *Cancer.* 1991; 68:2142-2149.
58. *Berg JW, Hutter RV.* Breast Cancer. *Cancer* 1995;75:257-269.
59. *Peters GN, Wolff M, Haagensen CD.* Tubular carcinoma of the breast: Clinical pathologic correlations based on 100 cases. *Ann Surg* 1981; 193:138-149.
60. *Komaki K, Sakamoto G, Sugano H, et al.* Mucinous carcinoma of the breast in Japan: A prognostic analysis based on morphologic features. *Cancer* 1988; 61:989-996.
61. *Carter D, Orr SL, Merino MJ.* Intracystic papillary carcinoma of the breast: After mastectomy, radiotherapy, or excisional biopsy alone. *Cancer* 1983; 52:14-19.
62. *Donegan WL.* Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer* 1992;70:1755-1764.
63. *Collett K, Hartveit F, Skjaerven R, Maehle BO.* Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer: relation to age and lymph node status. *J Clin Pathol.* 1996 Nov;49(11):920-5.
64. *Pinder SE, Ellis IO, Elston CW.* Prognostic factors in primary breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 1995 Nov; 48(11):981-3.
65. *Keshgegian AA, Cnaan A.* Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1.
66. *Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, et al.* Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas: Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. *Arch Surg* 1990;125:107-113.

67. *Coussens L et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to GF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; 230:1 132-1 139.
68. *Horiguchi J, Iino Y, Takei H, Yakoe T, Ishida T.* Immunohistochemical study on the expression of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. *Oncology* 1994; 51:47-51.
69. *Wen D, Peles E, Cupples R, Yarden J.* Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing a EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992;69:559-72.
70. *Drebin JA, Link VC, Greene MI.* Monoclonal antibodies specific for the neu oncogene product directly mediate anti-tumor effects in vivo. *Oncogene* 1988;2:387-94.
71. *Kastan MB et al.* Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 199; 51:6304-6311.
72. *Prives C.* Signaling to p53: breaking the mdm2-p53 circuit. *Cell* 1998;95:5-8.
73. *Kuerbitz SJ et al.* Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1992; 89:7491-7495.
74. *Jacks T, Weinberg RA.* Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 1996; 643-644.
75. *Smith ML, Chen I-T, Zhan Q, Fornace AJ.* Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of UV-type DNA damage. *Oncogene* 1995;10:1053-1059.
76. *Lane DP.* P53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358: 15-16.
77. *Levine AJ et al.* The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
78. *Levine AJ et al.* The 1993 Walter Hubert lecture: The role of the p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. *British Journal of Cancer* 1994; 69:409-416.
79. *Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989; 342:705-708.
80. *Hall PA, Lane DP.* P53 in tumor pathology, Editorial in *Journal of Pathology* ; 172:1-4, 1994.
81. *Dawkins HJS et al.* Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene *c-erbB-2* in prognosis and disease. *Pathology Research and Practice* 1993; 189:1233-1252.

82. *Sato T et al.* Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer. *Cancer Research* 1990; 50:7184-7189.
83. *Thompson AM et al.* p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinico-pathological parameters. *International Journal of Cancer* 1992; 50:528532.
84. *Hollstein M et al.* p53 mutation in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
85. *Zambetti GP, Levine AJ.* A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB Journal* 1993; 7:855-865.
86. *Battifora H.* p53 Immunohistochemistry: A word of caution. *Hum. Path.* 1994; 25:435-436.
87. *Bergh J, Norberg T, Sjorgren S, Lindgren A, Holmberg L.* Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. *Nature Medicine* 1995; 1: 1029-1034.
88. *Elledge RM, Allred DC.* The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 1994; 32:39-47.
89. *Thor AD et al.* Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1992; 84:845-855.
90. *Thor AD, Yandell DW.* Prognostic significance of p53 over expression in node-negative breast carcinoma: Preliminary studies support cautious optimism. *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85(3): 176-177.
91. *Allred DC et al.* Association of p53 protein expression with tumour cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 1993; 85(3):200-206.
92. *Silvestrini R et al.* p53 as an independent prognostic marker in lymph node-negative breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85(12):965-970.
93. *Callahan R.* p53 mutations, another breast cancer prognostic factor. *Journal of the National Cancer Institute* 1992:826-827.

94. *Bosari S, Viale G.* The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Archives* 1995; 427:229-241.
95. *Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M.* Mdm2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* 1993; 12:461-468.
96. *Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B.* Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358:80-83.
97. *Piette J, Neel H, Morechal V.* Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997;15:1001-1010.
98. *Sanchez-Beato M, Piris MA et al.* Mdm2 and p21 are regularly expressed by Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1996;180:58-64.
99. *Gorgoulis VG, Zoumpoulis V, Rassidakis G et al.* A molecule and immunohistochemical study of the mdm2 protein isoforms and p53 gene product in bronchogenic carcinoma. *J Pathol* 1996;180:129-137.
100. *El-Deiry WS, et al.* Topological control of p21/waf1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55:2910-2919.
101. *Hockenbery D et al.* Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990;348:334-336.
102. *Korsmeyer SJ.* Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*; 80: 879-886, 1992.
103. *Kernohan NM, Cox LS.* Regulation of apoptosis by bcl-2 and its related proteins: immunohistochemical challenges and therapeutic implications. *J Pathol* ; 179:1-3, 1996.
104. *Kerr JFR et al.* Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-2026.
105. *Leek RD et al.* bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *British Journal of Cancer* 1994;69(1): 135-9.
106. *Joensuu H et al.* Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *American Journal of Pathology* 1994; 145(5): 1191-1198.

107. *Silvestrini R et al.* The Bcl-2 protein: A prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(7):499-504.
108. *Hellemans P et al.* Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. *British Journal of Cancer* 1995; 72:354-360.
109. *Gasparini G et al.* Expression of bcl-2 protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node positive breast cancer. *Clinical Cancer Research* 1995; 1:189-198.
110. *Sainsbury JRC et al.* Epidermal growth factor receptor status as predictors of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987;i:1398-1402.
111. *Slamon DJ et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-181.
112. *Berardo MD, Elledge RM, DeMoor C, Allred DC.* Bcl-2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer*, Apr 1 ; 82(7) :1296-302, 1998.
113. *Visscher DW, Sarkar F, Tabaszka P, Crissman J.* Clinicopathological analysis of bcl-2 immunostaining in breast carcinoma. *Mod Pathol* Jun ; 9(6) :642-6, 1996.
114. *Nicholson S et al.* Expression of EGF receptors associated with lack of response to endocrine therapy in recurrent breast cancer. *Lancet* 1989; 1:182-185.
115. *Baselga J, Mendelson J.* The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 1994; 29: 127.
116. *Sasaki K, Murakami R, Kawasaki M, Takahashi M.* The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*; 133:579-584, 1987.
117. *Leong AS , Lee AK.* Biological indices in the assessment of breast cancer. *Clin Pathol Mod Pathol* ; 48, M224-M238, 1995.
118. *Leong AS, Raymond WA.* Prognostic parameters in breast carcinoma. *Pathology*; 21:169-75,1989.
119. *Veronese SM, Gambacorta M.* Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathological features. *Am J Clin Pathol* ; 95:30-4,1991.
120. *Sahih AA, Ro J, O JY.* Ki-67 immunostaining in node negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* ; 68:549-7, 1991.

121. *Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL.* PR. Prediction of relapse or survival in patients with node negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med*; 320:627-33, 1989.
122. *McGuire WL, Clark GM.* Prognostic factors and treatment decision in axillary node negative breast cancer. *N Engl J Med* ;326:1756-61,1992.
123. *Levine A, Momand J, Finlay C:* The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1992.
124. *Nigro MJ, Baker SJ, Preisinger AC, et al:* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342: 705- 708, 1989.
125. *Gaidano G, Ballerini P, Gonz JZ, et al:* P53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5413-5417, 1991.
126. *Villuendas R, Piris MA, Algara P, Sanchez- Beato M, Sanchez- Verde L, Martinez JC, et al:* The expression of p53 protein in breast carcinomas is not always dependent on p53 gene mutations. *Blood* 82: 3151-3156, 1993.
127. *Kocialkowski S, Pezzela F, Morrison H, Jones M, Laha S, Harris AL, et al:* Mutations in the p53 gene are not limited to classic "hot spots" and are not predictive of p53 protein expression in high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 89: 55-60, 1995.
128. *Barak Y, Oren M:* Enhanced binding of a 95 kd protein to p53 in cells undergoing p53-mediated growth arrest. *EMBO J* 11: 2115-2121. 1992.
129. *Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ:* The mdm2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245, 1992.
130. *Oliner JD, Pietenpol J, Thiagalingam S, et al:* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362: 857-860, 1993.
131. *Finlay CA:* The mdm2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth: *Mol Cell Biol* 13: 301-306, 1993. 129-175.
132. *Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S. et al.* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* .162. 857-860, 1993.

133. *Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M*: Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 8: 3411-3416, 1993.
134. *Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ*: The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: *Genes & Dev* 7: 1126-1132, 1993.
135. *Chen CY, Oliner JD, Zhan Q, Fornace AJ Jr, Vogelstein B, Kastan MB*: Interactions between p53 and mdm2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway: *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 26844-2691, 1994.
136. *EI-Deiry WS, Tokino T, Velculesku VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al*: Waf1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 75: 817-825, 1993.
137. *Harper JW, Adami GY, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ*: The p21 Cdkinteracting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell* 75: 805-816, 1993.
138. *Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D*: P21 is universal inhibitor of cyclin kinase. *Nature* 366.. 701- 704, 1993.
139. *Waga 5, Hannon GJ, Beach D, Stillman B*: The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinase controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369; 574-578, 1994.
140. *Walker RA, Dearing 51, Lane DP, Varvey JM*: Expression of p53 protein in infiltrating and in situ breast carcinomas. *J Pathol*:165, 203 -211, 1991.
141. *Bosari 5, Lee AKC, Viale G, Heatley GJ, Coggi G*: Abnormal p53 immunoreactivity and prognosis in node-negative breast carcinomas with longterm follow-up. *Virch Archiv A (Pathol and Histopathol)* 421: 291-295, 1992.
142. *Umekita Y, Takasaki T, Yoshida H*: Expression of p53 protein in benign epithelial hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, noninvasive and invasive mammary carcinoma: an immunohistochemical study. *Virch Archiv* 424: 491-494, 1994.
143. *Davidoff A, Humphrey P, Inglehas D, Marks J*: Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5006-5010, 1991.

144. *Thompson A, Anderson T, Condie A*: p53 allele losses, mutations and expression in breast cancer and their relationship to clinicopathological parameters. *Int J Cancer* 50; 528-532; 1992.
145. *Ostrowski JL, Sawan A, Henry L, Wright C, Henry JA, et al.* P53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 64; 75-81; 1991.
146. *Karameris AM, Wonhy E, Gorgoulis V, Quezado M, Anastasiades O*: P53 gene alterations in special types of breast carcinoma: a molecular and immunohistochemical study in archival material. *J Pathol* 176:361-372, 1995.
147. *Marchetti A, Buttitta F, Girlando S, Dalla Pama P, Pellegrini S, et al.* mdm2 gene alterations and mdm2 protein expression in breast carcinomas. *J Pathol* 175: 31 -38. 1995.
148. *Mc Cann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, et al* Amplification of the mdm2 gene in human breast cancer and its association with mdm2 and p53 protein status. *Br J Cancer* 71: 981-985, 1995.
149. *Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al.* Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti alkaline phosphatase (APMP COMPLEXES). *J Histochem Cytochem* 32:219-222, 1984
150. *Kanavaros P, Kouvidou Ch, Dai Y, Tzardi M, Datseris G, Darivianaki K, et al.* MDM2 protein expression in nasopharyngeal carcinomas. Comparative study with p53 protein expression. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 48:M322-M325, 1995.
151. *Ladanyi M, Cha Ch, Lewis R, et al*: MD M2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 53.. 16.18, 1993.
152. *Reiferberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP*: Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53, 2736.2739, 1993.
153. *Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Fontana JA*: The p53-binding protein MDM2 gene is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 53: 3226-3228, 1993.

154. *Bueso- Ramos CE, Yang Y, Leon E, et al.* The human MDM2 oncogene is overexpressed in leukemias. *Blood* 82: 2617-2623, 1993.33
155. *Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, et al.* The MD M2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 9.' 3158-3165. 1994.
156. *Chilosi M, Doglioni C, Menestrina F, Montagna L Rigo A, Lestani M7 et al.* Abnormal expression of the p53-binding protein MDM2 in Hodgkin's disease. *Blood* 84; 4295-4300,] 994.
157. *Landers JE, Haines DS, Straus IF, George DL:* Enhanced translation: a novel model of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumour cells. *Oncogene* 9. 2745-2751, 1994.
158. *Martinez JC, Mateo MS, Sanchez-Beato M, Villuendas R, Orrade JL, Algara P, et al.* MD M2 expression in lymphoid cells and reactive and neoplastic lymphoid tissue. *J Pathol* 177.' 27-35, 1995.
159. *Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillof C, Liebermann DA, Houseini ME:* Induction of p21 (W AF1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 9: 3389-3396, 1994.
160. *Henry JA, Piggott NH, Mallick UK, Nicholson S, et al.* Pnr-2/Ps2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer* 1991;63:615-22.
161. P53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res* Oct 1,53(19): 4665-9, 1993.
162. *Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, Macri E, Barbareschi M.* P21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa, adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol.*,1996.
163. *K.Βαλασιάδου* Ανοσοϊστοχημική μελέτη των p53 επαγομένων πρωτεϊνών p21 και mdm2 καθώς και της πρωτεΐνης bcl-2 σε αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. Διδακτορική Διατριβή, Ηράκλειο 1999.
164. *Machetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Lori A, Bevilacqua G.* Absence of somatic mutations in the coding region of the WAF1/CIP1 gene in human breast, lung and ovarian carcinomas: a polymorphism at codon 31. *Int J Oncol.*6, 187-189,1995.

165. *Machetti A, Doglioni C, Barbareschi M. et al.* P21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas : evidence of p53- independent expression and association with tumoral differentiation. *J Pathol* 1996;179:248-253.
166. *Barbareschi M, Caffo O et al.* P21 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlation with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB expression and relapse-free survival. *B J Cancer* 1996 74,208-215.
167. *Sheikh MS, Rochefort H, Garcia M.* Overexpression of p21 induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 9,3407-3414,1995.
168. *Ming J, Zhi-Ming S, Jun W et al:* P21/waf1 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis, *Int J Cancer*:74,529-534,1997.
169. *Caffo O, Doglioni C, Veronese S, et al.* Prognostic value of p21/waf1 and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study with long follow-up. *Clin Cance Res.* 2:1591-1599,1996.
170. *Rey M, Fernandez PL, Jares P, et al.* P21 is associated with cyclin D1 expression and tubular differentiation but is independent of p53 over-expression in human breast carcinoma. *J Pathol* vol.184:265-271, 1998.
171. *Cordon C, Latres E, Drobnjak M, et al.* Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54:794-799, 1994.
172. *Ladanyi M, Cha C, Lewis R, et al.* MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 53:16-18,1993.
173. *Machetti A, Buttitta F, Girlando S, Dalla Palma P, Doglioni C, Barbareschi M.* MDM2 gene alterations and MDM2 protein expression in breast carcinomas. *J Pathol*, vol.175:31-38, 1995.
174. *Sheikh MS, Shao ZM, Hussain H, Fontana JA.* The p53-binding protein mdm2 is differentially expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res.*, 53, 3226-3228,1993.
175. *Barbareschi M, Doglioni C, Veronese S, Bonsanini M, et al.* P21 and P53 immunohistochemical expression in breast carcinoma may predict therapeutic response to adjuvant treatment. *Europ. J. Cancer*,32,2182-2183(1996b).

176. *Duenas-Gonzalez A, Abad-Hernandez MM, Cruz- Hernandez JJ, Gonzalez-Sarmiento R.* Analysis of bcl2 in sporadic breast carcinoma. *Cancer Dec* 1:80(11):2100-8, 1997.
177. *Zhang GJ, Tsuda H, Adachi I, Fucotomi T, Yamatoto H, Hirohashi S.* Prognostic indicators for breast cancer patients with one to three regional lymph node metastasis with special reference to alterations in expression levels of bcl2, p53 and c-erbB-2 proteins. *Jpn J Clin Oncol. Dec:27(6):371-7, 1997.*
178. *Beraldo M, Elledge R, Moor C, Clark G, Osborn CK, Craig Allred D.* Bcl2 and apoptosis in lymph node positive breast carcinoma. *Cancer April 1, vol 82,7, 1296-1302, 1998.*
179. *Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S. et al.* Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature .162. 857-860, 1993.*
180. *Henry JA, Piggott NH, Mallick UK, Nicholson S, et al.* Pnr-2/Ps2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer 1991;63:615-22*
181. *Holmes FA, Fritsche HA, Loewy JW, et al:* Measurement of estrogen and progesterone receptors in human breast tumors: Enzyme immunoassay versus binding assay. *J Clin Oncol 1990;8:1025-1035.*
182. *Foekens JA, van Putten WLJ, Portengen H, et al:* Prognostic value of pS2 protein and receptors for epidermal growth factor (EGF-R), insulin-like growth factor-1 (IGF-1-R) and somatostatin (SS-R) in patients with breast and ovarian cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol 1990;37:815-821.*
183. *Alanko A, Heinonen E, Scheinin TM, et al:* Oestrogen and progesterone receptors and disease-free interval in primary breast cancer. *Br J Cancer 1984;50:667-672.*
184. *Shek LL, Godolphin W:* Survival with breast cancer: The importance of estrogen receptor quantity. *Eur J Cancer Clin Oncol 1989;25:243-250.*
185. *Marks JR, Humphrey PA, Wu K, et al:* Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg 1994;219:332-341.*
186. *Pierce LJ, Merino MJ, D'Angelo T, et al:* Is c-erb B-2 a predictor for recurrent disease in early stage breast cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994;28:395-403.*

187. *Pierce LJ, Merino MJ, D'Angelo T, et al:* Is c-erb B-2 a predictor for recurrent disease in early stage breast cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:395-403.
188. *Marks JR, Humphrey PA, Wu K, et al:* Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann Surg* 1994;219:332-341.
189. *Allred DC, Clark GM, Tandon AK, et al:* HER-2/neu in node-negative breast cancer: Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992;10:599-605.
190. *Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al:* c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1260-1266.
191. *Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al:* Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. *J Clin Oncol* 1992;10:1049-1056.
192. *Hayes DF:* Tumor markers for breast cancer. *Ann Oncol* 1993;4:807-819.
193. *Isola J, Visakorpi T, Holli K, Kallioniemi OP:* Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1109-1114.
194. *Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, et al:* Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: An independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:845-855.
195. *Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, et al:* Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1993;72:3641-3647.
196. *Davidoff AM, Herndon JE 2nd, Glover NS, et al:* Relation between p53 overexpression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery* 1991;110:259-264.
197. *Pujol P, Maudelonde T, Daures JP, et al:* A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol. *Cancer* 1993;71:2006-2012.
198. *Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al:* Cathepsin D expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in axillary node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:36-43.

199. *Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, et al:* Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322:297-302.
200. *Winstanley JH, Leinster SJ, Cooke TG, et al:* Prognostic significance of cathepsin-D in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1993;67:767-772.
201. *Stonelake PS, Baker PG, Gillespie WM:* Steroid receptors, pS2 and cathepsin D in early clinically node-negative breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:5-11.
202. *Ravdin PM, Tandon AK, Allred DC, et al:* Cathepsin D by western blotting and immunohistochemistry: Failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:467-474.
203. *Ewers SB, Attewell R, Baldetorp B, et al:* Prognostic potential of flow cytometric S-phase and ploidy prospectively determined in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1992;20:93-108.
204. *Yuan J, Hennessy C, Corbett IP, et al:* Node negative breast cancer: The prognostic value of DNA ploidy for long-term survival. *Br J Surg* 1991;78:844-848.
205. *Ghali VS, Liau S, Teplitz C, Prudente R:* A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. *Cancer* 1992;70:2668-2672.
206. *Hedley DW, Clark GM, Cornelisse CJ, et al:* Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast: Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993;14:482-485.
207. *Lewis WE:* Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer* 1990;65:2315-2320.
208. *Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, et al:* Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;71:3926-3931.
209. *Reed W, Hannisdal E, Boehler PJ, Gundersen S, Host H, Marthin J.* The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years. *Cancer* Feb 15;88(4):804-13, 2000.

210. *Weidner N, Cady B, Goodson WH 3rd*. Pathologic prognostic factors for patients with breast carcinoma. Which factors are important. *Surg Oncol Clin N Am*. 1997 Jul;6(3):415-62.
211. *Van Noorden S*. Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. In: *Polak JM, Van Noorden S*, eds *Immunohistochemistry. Modern Methods and Applications*. 2nd edn. Bristol: Wright, 1986; 45-48.
212. *Nordon AJ*. Microwave oven heating for antigen unmasking in routinely processed tissue sections. *J Pathol*;171:79-80; 1993.
213. *Stefanaki K, Tzardi M, Kouvidou C, Chaniotis V, Bolioti M, Vlychou M, Zois M, Kakolyris S, Delides G, Rontogianni D, Georgoulis V, Kanavaros P*. Expression of p53, p21, mdm2, Rb, bax and Ki67 proteins in lymphomas of the mucosa-associated lymphoid (MALT) tissue. *Anticancer Res*. Jul-Aug;18(4A):2403-8, 1998.
214. *Kanavaros P, Stefanaki K, Valassiadou K, Vlachonikolis J, Mavromanolakis M, Vlychou M, Kakolyris S, Gorgoulis V, Tzardi M, Georgoulis V*. Expression of p53, p21/waf, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Med Oncol*. Apr;16(1):23-30, 1999.
215. *Stefanaki K, Rontogiannis D, Vamvouka C, Bolioti S, Chaniotis V, Sotsiou F, Vlychou M, Delidis G, Kakolyris S, Georgoulis V, Kanavaros*. Immunohistochemical detection of bcl2, p53, mdm2 and p21/waf1 proteins in small-cell lung carcinomas. *Anticancer Res*. May-Jun;18(3A):1689-95, 1998.
216. *Stefanaki K, Rontogianni D, Kouvidou CH, Bolioti S, Delides G, Pantelidaki A, Sotsiou F, Kanavaros P*. Expression of p53, mdm2, p21/waf1 and bcl-2 proteins in thymomas. *Histopathology*. Jun;30(6):549-55, 1997.
217. *Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, Eliopoulos G, Kakolyris S, Rontogianni D, Gorgoulis V, Georgoulis V*. Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in Hodgkin's lymphomas. *Histol Histopathol*. Apr;15(2):445-53, 2000.
218. *Lundberg AS and Weinberg RA*. Control of the cell-cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*; 35, 1886 – 1894, 1999.
219. *Cox LS* Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol* 183: 134-140. 216, 1997.

220. *Gillet CE and Barnes DM.* Cell cycle. *J Clin Pathol: (Mol Pathol)* 51, 310-316, 1998.
221. *McDonald RE and El-Deiry WS,* Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 16, 871-886, 2000.
222. *Weinert T.* DNA damage and checkpoint pathways: Molecular anatomy and interactions with repair. *Cell*; 94, 555-558, 1998.
223. *Prives C, and Hall P.* The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126, 1999.
224. *Mulligan G and Jacks T.* The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *TIG* 14, 223-229, 1998.
225. *Harrington EA, Bruce JL, Harlow E and Dyson N.* pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad USA* 95, 11945-11950, 1998.
226. *Hsieh JK, Chan FSG, O'Connor DJ, Mittnacht S, Zhong S, and Lu X.* Rb regulates the stability and the apoptotic function of p53 via mdm2. *Molecular Cell* 3, 181-193, 1999.
227. *Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC and Scheithauer BW.* P27/KIP1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol* 154, 313-323, 1999
228. *Adams JM and Cory S.* The BCL-2 family proteins. Arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326, 1998.
229. *Evan G and Littlewood T.* A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322, 1998.
230. *Brady HJ, Gil-Gomez G, Kirberg J and Berns A.* Bax alpha perturbs T cell development and affects cell cycle entry of T cells. *EMBO J* 15, 6991-7001, 1998.
231. *Gil-Gomez G, Berns A and Brady HJ .* A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 17, 7209-7218, 1998.
232. *Haas-Kogan DA, Kogan SC, Levi D, Dazin P, Tang A, Fung YK and Israel MA .* Inhibition of apoptosis by the retinoblastoma gene product. *EMBO J* 14, 461-472, 1995.

233. *B. Γοργουλης Χ. Κίττας*. Κυτταρικός κύκλος. Αρχεία Παθολ. Ανατομίας, Τόμος 149, Παράρτημα 6, σελ. 149-152, 2000.
234. *Smith C, Lowe S*. Apoptosis and therapy. *J Pathol* 187: 127-137, 1999.
235. *Καπράνος Ν*. Απόπτωση. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής, 65-76, 1997.
236. *Lakhani S*. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*. 187: 272-278, 1999.
237. *Pan CC, et al*. Ki67 labelling index correlates with stage and histology but not significantly with prognosis in thymoma. *Histopathology*, 33, 453-458, 1998.
238. *Cox L* Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21. *J Pathol*. 183:134-140, 1997.
239. *H. Varmus and R A Weinberg*, Multistep in carcinogenesis, *Gene and biology of cancer*, Scientific American Library 1993, p44-65.
240. *Bishop JM*. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell*; 64:235-248, 1991.
241. *Marshall CJ*. Tumor suppressor genes. *Cell*; 64: 313-326, 1991.
242. *Engel P, Francis D and Graem N*. Expression of bcl-2 in fetal thymus, thymomas and thymic carcinomas. Association with p53 expression and review of the literature. *APMIS* 106, 449-455, 1998.
243. *Oyama T, et al*. P53 alteration, proliferating cell nuclear antigen, and nucleolar organizer regions in thymic epithelial tumours. *Int J Mol Med*; 1(5): 823-6, 1998.
244. *Gusterson BA*. Stem cell and human breast development. Program and abstracts of the 22nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 8-11, 1999, San Antonio
245. *Allred DC*. Biology of human premalignant breast disease. Program and abstracts of the 22nd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 8-11, 1999, San Antonio
246. *Robbins P*. *The molecular biology of breast cancer*. Long course in molecular diagnostic aspects of solid tumors. XXI International Congress of the International Academy of Pathology, October, 1996 Budapest.
247. *Fallenius A, Franz SA, Auer GU*. Predictive value of nuclear DNA content in breast cancer in relation to clinical and morphological factors. *Cancer* 62:521-530, 1988.

248. *Dittadi R, Calderazzo F, Cabrelle A, Di Fresco S, Gion M, Bianchi L. C-erbB-2 protein expression, DNA ploidity and S phase in breast cancer. Cell Prolif 29:403-412, 1996.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδες
1. Γενική Εισαγωγή	1-5
2. Στοιχεία ιστολογίας μαζικού αδένα	6-8
3. Καρκίνωμα μαστού	9-25
α. Εισαγωγή	9
β. Επίπτωση και Επιδημιολογία καρκινώματος μαστού	9-11
γ. Ιστολογική ταξινόμηση	11
δ. Προγνωστικοί παράγοντες	12-25
4. Στοιχεία βιολογίας νεοπλασματικής εξαλλαγής-Ογκογένεση	26-37
5. Μορφολογικά και γενετικά πρότυπα ανάπτυξης και εξέλιξης καρκινώματος μαστού	37-39
7. Ειδικό μέρος	40-75
α. Υλικό	42-44
β. Μελετούμενοι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες	44-56
γ. Αποτελέσματα	57-77
δ. Πίνακες	78-83
ε. Φωτογραφίες	84-91
8. Συζήτηση	92-102
9. Περίληψη	103-107
10. Βιβλιογραφία	108-128
11. Περιεχόμενα	129