**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΠΑΤΡΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΣΙΚΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**‘Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGF-B-R ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
SMAD ΚΑΙ SKI ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ’
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΚΟΥΜΟΥΝΔΟΥΡΟΥ ΔΗΜΗΤΡΑ
ΙΑΤΡΟΣ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΒΑΡΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΠΑΤΡΑ 2007

Τριμελής Επιτροπή:

Βαράκης Ιωάννης

Τζωρακοελευθεράκης Ευάγγελος

Ζολώτα Βασιλική

Μέλη επταμελούς επιτροπής:

Νικηφορίδης Γεώργιος

Σωτηροπούλου Γεωργία

Ασημακοπούλου Μάρθα

Κουρέα Ελένη

Πρόλογος.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανατομίας- Ιστολογίας- Εμβρυολογίας του πανεπιστημίου Πατρών καθώς και στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πατρών. Η διατριβή αυτή αποτελεί τη συνέχεια της διπλωματικής εργασίας του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (2003-2004) και πραγματοποιήθηκε κατά τη χρονική περίοδο 2004-2007.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου, πρώτα απ' όλους, στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητή κ. Ιωάννη Βαράκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας, αλλά κυρίως για την αμέριστη συμπαράσταση του και την πολύπλευρη στήριξη που μου παρείχε. Τον ευχαριστώ από καρδιάς και είναι αναμφίβολη τιμή για μένα η συνεργασία μου μαζί του.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω επίσης, στον Καθηγητή Χειρουργικής κ. Ευάγγελο Τζωρακοελευθεράκη, για τη συνεχή βοήθειά του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Ακόμη, ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κ. Βασιλική Ζολώτα, για τη σημαντική συμμετοχή της στην

εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων αλλά και για τη γενικότερη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον καθηγητή κ. Γιώργο Νικηφορίδη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ Γεωργία Σωτηροπούλου, την Επίκουρη Καθηγήτρια κ Μάρθα Ασημακοπούλου, και τη Λέκτορα κ Ελένη Κουρέα για την τιμή που μου έκαναν και για την καθ' όλα άψογη συνεργασία τους.

Δε θα μπορούσα σε καμιά περίπτωση να παραβλέψω την ουσιαστική βοήθεια της Αν. Διευθύντριας του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής κ. Παναγιώτας Ραβαζούλα, η οποία μου παρείχε μεγάλο μέρος από το αρχειακό υλικό της ενώ ταυτόχρονα συνέβαλε σημαντικά στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της μελέτης. Για όλα τα παραπάνω, την ευχαριστώ από καρδιάς.

Τέλος, θα πρέπει οπωσδήποτε να ευχαριστήσω τον κ Κασιμάτη Θεόδωρο, για την απόλυτα επιτυχή συνεργασία που είχα μαζί του όλα αυτά τα χρόνια και για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μαστός ή μαζικός αδένας (λέξη που προέρχεται από την αρχαία ελληνική μαζός που σημαίνει «αυτός που υγροποιείται, γίνεται νωτερός»), είναι ένα όργανο με πολλές ιδιαιτερότητες. Πρώτον είναι ένας αδένας που αναπτύσσεται διαφορετικά στο κάθε φύλο και δεύτερον, στις γυναίκες, υφίσταται συνεχείς μεταβολές κατά τη διάρκεια τόσο της ανάπτυξης όσο και του εμμηνορυσιακού κύκλου αλλά και κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία, επηρεαζόμενος διαρκώς από τα επίπεδα των γενετικών ορμονών.

ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ

Ο μαστός αναπτύσσεται κατά την 6^η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής, από μια εκβλάστηση του εξωδέρματος η οποία είναι το μόνο τμήμα της γαλακτικής γραμμής που δεν υποστρέφει φυσιολογικά και βρίσκεται στη θωρακική περιοχή, στη θέση ανάπτυξης του μελλοντικού μαζικού αδένα (1, Bland KI et al 1991). Συγκεκριμένα, κατά την 35^η μέρα μια πάχυνση της στοιβάδας του εξωδέρματος δημιουργεί τη μαστική ταινία από την οποία στη συνέχεια θα προκύψει η μαστική λωρίδα (36^η μέρα) που θα δώσει την 40^η μέρα το μαστικό λοφίο (εικόνα 1). Από αυτό, μέσω πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και συσσώρευσης των προγονικών κυττάρων δημιουργείται την 49^η μέρα η μαστική ακρολοφία η οποία

διαφοροποιείται προς πρωτογενείς εκβλαστήσεις, που είναι οι πρόδρομοι των μελλοντικών γαλακτοφόρων πόρων, και, κατά τη δέκατη εβδομάδα, προς δευτερογενείς εκβλαστήσεις οι οποίες δίνουν γένεση στη δεξαμενή των πόρων (Wysolmerski John et al 2002).

Ο σχηματισμός των πόρων και του βοθρίου της θηλής λαμβάνει χώρα κατά την 20^η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής. Έτσι σχηματίζεται από κάθε πόρο ένα λόβιο το οποίο περιβάλλεται από ένα ινώδες έλυτρο και εισδύει στο υποκείμενο μεσέγγχυμα λιπώδους ιστού. Η ανάπτυξη του επιθηλίου του μαστού πραγματοποιείται τόσο με πλευρική διακλάδωση (side branching) όσο και με διχασμό των τελικών εκβλαστήσεων (terminal end buds). Η εμβρυϊκή προέλευση του λιπώδους υποστρώματος είναι μεσοδερματική.

Όσον αφορά στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης του μαστικού αδένα, πρέπει να τονιστεί ότι αυτή γίνεται κυρίως μέσω τοπικών σημάτων, αυξητικών παραγόντων και ρυθμιστικών γονιδίων ενώ οι ορμόνες δε διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη φάση της ανάπτυξης, αντίθετα με ότι συμβαίνει, ως γνωστό, σε μεταγενέστερα στάδια. Η μοναδική ορμόνη που τελευταία έχει αποδειχθεί πως είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη του μαστού είναι η Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP) η οποία συνδεόμενη με τον υποδοχέα της PTHrP-R επάγει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και πρωτεϊνών, απαραίτητων για την ανάπτυξη του μαστού.

Τα γονίδια που κατά κύριο λόγο εμπλέκονται στη ρύθμιση της εμβρυϊκής φάσης της ανάπτυξης είναι αυτά της οικογένειας homeobox genes, τα οποία, όπως είναι γνωστό, είναι γονίδια που καθορίζουν την τύχη και την ταυτότητα των αρχέγονων κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ζωή σε μια πληθώρα ιστών (Wysolmerski John et al 2002). Ενδέχεται δε, να είναι απαραίτητα και στην μετέπειτα ανάπτυξη και διαφοροποίηση του μαστού. Η φάση αυτή λοιπόν της ανάπτυξης του μαστού είναι η μοναδική που δε βρίσκεται υπό τον άμεσο έλεγχο των φυλετικών ορμονών. Συγχρόνως κάποιοι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο FGF (Arman E et al 1998) και ο TGF- β έχουν ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της αλληλεπίδρασης επιθηλίου – στρώματος που είναι καθοριστική στη συγκεκριμένη (εμβρυϊκή) αναπτυξιακή φάση (Pittius et al 1988).

Εικόνα 1: Εμβρυϊκή ανάπτυξη μαζικού αδένος, έως το στάδιο της εκβλάστησης (Wysolmerski John et al 2002)

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΓΕΝΝΗΣΗ.

Κατά τη γέννηση, παρατηρείται αναστροφή του βοθρίου της θηλής ενώ στα άκρα των δευτερογενών διακλαδώσεων αναγνωρίζονται συμπαγείς ομάδες κυττάρων που ίσως συνιστούν πρόδρομες μορφές κυψελίδων, από τις οποίες μάλιστα συχνά παρατηρείται κάποια υποτυπώδης έκκριση, πιθανά υπό την επίδραση των μητρικών ορμονών (witch's milk). Κατά την ίδια περίοδο έχουμε ανάπτυξη των αγγείων, των λεμφαγγείων και του συνδετικού ιστού του οργάνου η οποία συνεχίζεται μέχρι την εφηβεία με ρυθμούς ανάλογους της ανάπτυξης των άλλων οργάνων του σώματος (ισομετρική ανάπτυξη) (Vorherr H. et al 1974).

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΦΗΒΕΙΑ.

Η αύξηση της τεστοστερόνης στους άρρενες κατά την εφηβεία επιδρά στα μεσεγγυματικά κύτταρα του μαστού και δρα ανασταλτικά στην παραπέρα ανάπτυξη του μαστού. Αντίθετα, στα θήλεα, τα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων δρουν στο μεσέγγυμα και επάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του επιθηλιακού ιστού του αδένα (Vorherr H. et al 1974). Στη συγκεκριμένη φάση αύξησης, στα θηλυκά άτομα η ανάπτυξη του μαστού είναι αλλομετρική, πραγματοποιείται δηλαδή με πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς σε σχέση με την ανάπτυξη των υπολοίπων οργάνων του σώματος. Η δράση των οιστρογόνων έχει να κάνει κυρίως με την επιμήκυνση και τη διακλάδωση του δένδρου των πόρων ενώ η προγεστερόνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των μικρών πόρων και τη διεύρυνση τους. Και οι δύο ορμόνες ασκούν τη δράση τους μέσω των υποδοχέων τους (ER, PR) που βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα του αναπτυσσόμενου μαστού (Henninghausen, L et al 1997).

Υπό την επίδραση των γενετικών ορμονών, τα άπω άκρα του επιθηλίου των πόρων διογκώνονται και σχηματίζουν σφαιρικές δομές αποτελούμενες από πολύστοιβο κυβοειδές επιθήλιο, οι οποίες συνιστούν τις τελικές εκβλαστήσεις (TEBs: Terminal End Buds) (εικόνα 2). Οι TEBs είναι τα εισδύοντα άκρα των πόρων που πολλαπλασιάζονται, εκτείνονται στο λιπώδες μεσέγγυμα, και διακλαδίζονται μέχρις ότου οι

πόροι φτάσουν στο άκρο του περιβάλλοντος λιπώδους υποστρώματος, οπότε και οι TEBs υποστρέφουν (Anbazhagan R. et al 1998).

Εικόνα 2: Δομή της τελικής εκβλάστησης (TEB) στον αναπτυσσόμενο μαστό (Wysolmerski John et al 2002).

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ ΚΑΙ ΤΗ ΓΑΛΟΥΧΙΑ.

Στην εγκυμοσύνη, η ραγδαία αύξηση των ορμονών, η πρόσθετη παραγωγή τους από το ωχρό σώμα της κύησης καθώς και η σημαντική αύξηση της παραγωγής, τόσο κορτικοστεροειδών από τα επινεφρίδια όσο και προλακτίνης από την υπόφυση, έχει ως αποτέλεσμα την επιταχυνόμενη ανάπτυξη του μαστικού αδένος. Στο χρόνο αυτό έχουμε επίσης ελάττωση του συνδετικού και του λιπώδους ιστού του οργάνου καθώς και σημαντικού βαθμού ανάπτυξη των λοβίων.

Πιο αναλυτικά, κατά το πρώτο τρίμηνο παρατηρείται επιμήκυνση, διακλάδωση και πολλαπλασιασμός των ενδολοβιακών πόρων από προγονικά κύτταρα, για να ακολουθήσει στο δεύτερο τρίμηνο ο σχηματισμός των λοβίων από τις τελικές εκβλαστήσεις (terminal end buds) και η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε δύο στοιβάδες: την εσωτερική που αποτελείται από τα εκκριτικά κύτταρα του αδένα και την εξωτερική, δηλαδή τη στοιβάδα των μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Στο τελευταίο τρίμηνο της κύησης επιτελείται κυρίως η τελική ωρίμανση των λοβίων τα οποία αποτελούνται από κυβοειδή κύτταρα με βασικά τοποθετημένο πυρήνα ενώ στο κυτταρόπλασμα παρατηρούνται πολλαπλά κοκκία και σταγονίδια λίπους. (Osin PP. et al 1998).

Στον τοκετό, τα επίπεδα των γενετικών ορμονών πέφτουν αλλά η αυξημένη προλακτίνη είναι αρκούντως ικανή για τη διατήρηση της δομής του μαζικού αδένα (Burdon T et al 1991). Στο επόμενο στάδιο, αυτό της γαλουχίας, αρχίζει να ελαττώνεται η ικανότητα διαίρεσης των εκκριτικών κυττάρων χωρίς εν τούτοις να παρατηρείται απότομη διακοπή της ανάπτυξης του μαστού. Διακρίνουμε δύο στάδια σε αυτή την περίοδο:

A) Την πρώτη φάση της γαλουχίας (lactogenesis I) (Topper W J et al 1980), που τοποθετείται χρονικά μετά το μέσο της εγκυμοσύνης οπότε και επάγεται η έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την παραγωγή πρωτεϊνών του γάλακτος, όπως η λακταλβουμίνη και η καζεΐνη και

B) Τη δεύτερη φάση που αρχίζει αμέσως μετά τον τοκετό, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση πρωτεϊνών του γάλακτος, δημιουργία στενών συνδέσεων (tight junctions) μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του αδένου και έκκριση εντός του αυλού των λοβίων.

Πρέπει να σημειωθεί ότι και οι δύο φάσεις της γαλακτογένεσης επάγονται από την προλακτίνη (Pittius C W. et al 1988, Vonderhaar B.K. et al 1987), ενώ ο ρόλος άλλων ορμονών όπως του πλακουντιακού γαλακτογόνου (PL) είναι αβέβαιος, αφού σε γυναίκες με ανεπάρκεια PL η γαλουχία δεν εμφανίζει καμιά διαταραχή. Όσον αφορά στην προγεστερόνη, έχει βρεθεί ότι αυτή επάγει την πρώτη (lactogenesis I) αλλά αναστέλλει τη δεύτερη φάση της γαλακτογένεσης. Έτσι με την πτώση των επιπέδων της κατά τον τοκετό, αίρεται η ανασταλτική της δράση και ξεκινάει η παραγωγή γάλακτος από το μαζικό αδένου (lactogenesis II).

Επομένως, η γαλουχία είναι μια κατάσταση οιστρογονοανεπάρκειας, με αυξημένο, όπως και κατά την εμμηνόπαυση, κίνδυνο ανάπτυξης οστεοπόρωσης.

ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΜΕΤΑ ΤΗ ΓΑΛΟΥΧΙΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ.

Μετά την παύση του θηλασμού και το τέλος της παραγωγής γάλακτος, τα επίπεδα της προλακτίνης έχουν φτάσει ένα κατώφλι και έτσι προκαλείται απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων των κυψελίδων, αναδόμηση του κολλαγόνου από ινοβλάστες καθώς και επαγωγή ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση των συστατικών της θεμέλιας ουσίας. Επίσης παρατηρείται διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα και αύξηση του λιπώδους ιστού του μαστού. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται υποστροφή των λοβιοκυψελιδικών δομών με αποτέλεσμα να έχουμε πάλι ένα απλό σύστημα πόρων όπως και πριν την έναρξη της όλης διαδικασίας, η οποία φυσικά είναι αντιστρεπτή και επαναλαμβάνεται σε κάθε νέα εγκυμοσύνη και γαλουχία.

Στη δε εμμηνόπαυση, με την πτώση των επιπέδων των ωοθηκικών ορμονών έχουμε εκφύλιση του δένδρου των πόρων και αντικατάσταση του πυκνού συνδετικού, από χαλαρό συνδετικό ιστό, με παράλληλη αύξηση των ελαστικών ινών και ελάττωση της κυτταροβρίθειας του οργάνου.

Ο ελεγχόμενος πολλαπλασιασμός των πόρων και των κυψελίδων καθώς και η ρύθμιση της κατάλληλης, χρονικά και ποσοτικά, διαδικασίας παλινδρομήσεως του μαζικού αδένος καθορίζονται από τη δράση τόσο των ορμονών όσο και μιας ποικιλίας ρυθμιστικών παραγόντων, μεταξύ

των οποίων εξέχουσα θέση κατέχει ο TGF- β (Transforming Growth Factor – beta) με το πολύπλοκο σηματοδοτικό του μονοπάτι. Ο TGF- β είναι παρών στη μεσοκυττάρια ουσία γύρω από τους πόρους και επιλεκτικά καταστέλλεται σε θέσεις όπου έχει ξεκινήσει η πλευρική διακλάδωση (side branching) (Vonderhaar, B.K. et al 1987).

Σε πειράματα με knock –out ποντίκια για τον υποδοχέα του TGF- β , παρατηρείται ανεξέλεγκτη διακλάδωση του δένδρου των πόρων και υψηλότερα ποσοστά επιθηλιακής υπερπλασίας και δυσπλασίας κατά τη μετέπειτα ανάπτυξη σε σχέση με τα φυσιολογικά. (Arman E et al 1998).

ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΩΡΙΜΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο φυσιολογικός μαστός της ενήλικης γυναίκας μπορεί να ζυγίζει λιγότερο από 30 έως και πάνω από 500 γραμμάρια, βάρος το οποίο είναι σε μεγάλο βαθμό εξαρτώμενο από το σωματικό βάρος, αφού όπως είναι γνωστό ο μαζικός αδένας είναι μια σημαντική αποθήκη λίπους.

Ο μαστός βρίσκεται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα πάνω από το μείζονα θωρακικό και τον πρόσθιο οδοντωτό μυ. Προς τα πίσω βρίσκεται σε επαφή με την πρόσθια θωρακική περιτονία και εκτείνεται, στα πλάγια μεταξύ της στερνικής και πρόσθιας μασχαλιαίας γραμμής και κατά τον κατακόρυφο άξονα από τη δεύτερη έως την έβδομη πλευρά (Kordon et al 1995, Sternberg S. S. 1992). Εκτεινόμενος προς τη μασχάλη, εμφανίζει μια πυραμοειδή προσεκβολή, που ονομάζεται ουρά του Spence (Haagensen CD 1971). Εμφανίζει δύο επιφάνειες, πρόσθια και οπίσθια, και περιφέρεια. Η πρόσθια επιφάνεια καλύπτεται από δέρμα και εμφανίζει τη θηλή και τη θηλαία άλω (Medina D 1996) (εικόνα 3). Το σύμπλεγμα θηλής – άλω βρίσκεται επί της γαλακτικής γραμμής, η οποία ξεκινάει από τη μασχάλη και καταλήγει στην ηβική χώρα.

Εικόνα 3: Δομή του φυσιολογικού ώριμου μαστού όπου φαίνονται τα λόβια, οι πόροι και το σύμπλεγμα θηλής-άλω (Sandra W Cohen, medical encyclopedia)

Η θηλή αποτελείται από σμηγματογόνους και αποκρινείς αδένες. Περίπου 15-25 γαλακτοφόροι πόροι εισέρχονται στη βάση της όπου και διατείνονται για να σχηματίσουν τους γαλακτοφόρους κόλπους (Kordon E.C et al 1995), οι οποίοι, ακριβώς κάτω από την επιφάνεια της θηλής, μεταπίπτουν σε κωνοειδούς σχήματος φύματα. Η θηλή αποτελείται επίσης από λείες μυϊκές ίνες, κολλαγόνο και ελαστικό ιστό.

Στην περιοχή της θηλαίας άλω, υπάρχουν τροποποιημένοι εκκριτικοί αδένες, οι αδένες του Montgomery οι οποίοι, μέσω μικρών πόρων καταλήγουν στα φυμάτια Morgagni στην επιδερμίδα. Τέλος, στο δέρμα της περιοχής, υπάρχουν τρίχες καθώς επίσης σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί αδένες.

Το παρέγχυμα του μαζικού αδένος αποτελείται από 15-25 λοβούς που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τους μεγάλους πόρους. Οι λοβοί περιβάλλονται από πυκνό συνδετικό ιστό και διαιρούνται περαιτέρω σε λόβια και κυψελίδες.

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ.

Ο μαστός μικροσκοπικά αποτελείται από δύο βασικές δομές: τους πόρους και τις λοβιοκυψελιδικές δομές, που, και τα δύο, περιβάλλονται από βασική μεμβράνη και στρώμα συνδετικού ιστού, ινοβλάστες, αγγεία και λιπώδη ιστό. Κάθε γαλακτοφόρος πόρος εκβάλλει ξεχωριστά στη θηλή. Κάθε πόρος παροχετεύει ένα λοβό, ο οποίος με τη σειρά του υποδιαιρείται σε λόβια από τα οποία εξέρχονται μικρότεροι πόροι (τμηματικοί και υποτμηματικοί).

Το επιθήλιο στον ανώριμο μαστό αποτελείται από δύο στοιβάδες κυττάρων: μια βασική με κυβοειδή και μια επιφανειακή με χαμηλά κυλινδρικά κύτταρα. Υπό ορμονική επίδραση το επιθήλιο των κυψελίδων διαφοροποιείται αποτελούμενο από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων: Τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου A, τα τύπου B_ και τα μυοεπιθηλιακά (Osín PP et al 1998). Τα κύτταρα τύπου A είναι κυλινδρικά βασεόφιλα κύτταρα, πλούσια σε ριβοσώματα που συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της έκκρισης. Τα τύπου B κύτταρα θεωρούνται τα προγονικά των A κυττάρων ενώ τα μυοεπιθηλιακά είναι διαυγή κύτταρα με στρογγυλό πυρήνα που βρίσκονται σε επαφή με τη βασική μεμβράνη. Τα μυοεπιθηλιακά είναι κύτταρα συσταλτά που περιέχουν μικροϊνίδια, με χαρακτηριστικά τόσο επιθηλιακών, όσο και λείων μυϊκών κυττάρων.

Ιστολογικά ο μαστός με το σύστημα του δένδρου των πόρων και των λοβίων μπορεί να διακριθεί σε δύο βασικά μέρη (εικόνα 4):

A) Την τελική πορολοβιακή μονάδα (Terminal Duct-Lobular Unit ή TDLU) (Osin PP et al 1998) που περιλαμβάνει το λόβιο και τους τελικούς ενδολόβιους πόρους και συνιστά την εκκριτική μονάδα του μαζικού αδένου και

B) Το σύστημα των μεγάλων πόρων (large duct system) που περιλαμβάνει τους γαλακτοφόρους πόρους και κόλπους και αποτελεί το συλλεκτικό και μεταφορικό τμήμα του μαστού.

Ο συνδετικός ιστός περιβάλλει σαν περιχειρίδα τα λόβια και τους πόρους και είναι ιδιαίτερα αγγειοβριθής και κυτταροβριθής. Περιέχει επίσης λεπτές κολλαγόνες και άφθονες προκολλαγόνες ίνες (Osin PP et al 1998).

Ο συνδετικός ιστός που βρίσκεται γύρω από τους πόρους, περιέχει σημαντικό ποσό ελαστικών ινών, ποσό το οποίο μειώνεται όσο προχωρούμε σε μικρότερους πόρους ενώ στο μεσέγχυμα γύρω από τα λόβια δεν υπάρχουν καθόλου ελαστικές ίνες. Ο συνδετικός ιστός που περιβάλλει τα λόβια και τους πόρους, ενώνεται με τους, πυραμοειδούς σχήματος, συνδέσμους του Cooper οι οποίοι επεκτεινόμενοι τόσο στην εν τω βάθει περιτονία όσο και προς το δέρμα, αποτελούν το σύστημα στήριξης του μαστού.

Εικόνα 4: Ιστολογική τομή μαζικού αδένος όπου φαίνεται ένα λόβιο (πράσινο βέλος) και ένας μεγάλος πόρος (μπλε βέλος) (Hollinger et al 2002).

Λεμφική αποχέτευση -Αιμάτωση - Νεύρωση

Όσον αφορά στο λεμφικό δίκτυο του μαστού, αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία αφού αποτελεί την κυριότερη οδό μετάστασης για τον καρκίνο του οργάνου. Τα λεμφαγγεία του μαστού απάγουν τη λέμφο προς τα μασχαλιαία, τα υποκλείδια, τα υπερκλείδια και τα λεμφογάγγλια της έσω μαστικής αρτηρίας, τα οποία είναι αναστομούμενα μεταξύ τους. (Snell τόμος Α σελ 414). Χειρουργικά, οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες διακρίνονται σε τρία επίπεδα, ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με τον ελάσσονα θωρακικό μυ: Στο επίπεδο I ανήκουν οι λεμφαδένες που βρίσκονται επί τα εκτός του έξω χείλους του ελάσσονα θωρακικού μυός, στο επίπεδο II περιλαμβάνονται όσοι ανευρίσκονται όπισθεν του μυός και στο επίπεδο III οι λεμφαδένες που εντοπίζονται επί τα εντός και άνω του έξω χείλους του ελάσσονα θωρακικού. Υπάρχουν και ενδομαστικοί λεμφαδένες οι

οποίοι βρίσκονται στην άνω έξω μοίρα του μαστού, στην περιοχή της ουράς του Spence.

Ο μαστός αιματώνεται από την ακρωμιοθωρακική, πλάγια θωρακική και υποπλάτια αρτηρία που αποτελούν κλάδους της μασχαλιαίας αρτηρίας καθώς και από την έσω θωρακική (έσω μαστική) που αποτελεί κλάδο της υποκλειδίου αρτηρίας. Το όργανο δέχεται επίσης διατιτραίνοντες κλάδους από τις άνω μεσοπλεύριες αρτηρίες. Το φλεβικό δίκτυο, ιδιαίτερα έντονο και εμφανές κάτω από τη θηλή, καταλήγει στις μεσοπλεύριες, μασχαλιαίες και έσω θωρακικές φλέβες.

Η νεύρωση του μαστού είναι πλούσια στο σύμπλεγμα θηλής - άλω όπου καταλήγουν πολλαπλές σωματικές αισθητικές απολήξεις ενώ η νεύρωση του παρεγχύματος γίνεται κυρίως από κλάδους του αυτόνομου νευρικού συστήματος.

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Επιπολασμός : Ο καρκίνος του μαστού είναι κατά κανόνα νόσος περιεμμηνοπαυσιακή. Έτσι θα λέγαμε ότι πρακτικά δε συναντάται πριν από την ηλικία των 20 ετών και είναι εξαιρετικά σπάνια η εμφάνιση του σε γυναίκες μικρότερες των 28 ετών. Από την ηλικία αυτή και μετά παρατηρείται μια σταθερή αύξηση της επίπτωσης, που φτάνει στο υψηλότερο επίπεδο κατά την εμμηνόπαυση, για να συνεχιστεί, με μικρότερους ρυθμούς ανόδου, στις μεγαλύτερες ηλικίες όπου υπάρχει σταθερά ένας αρκετά αυξημένος κίνδυνος.

Στις Η.Π.Α και στον Καναδά 1 στις 8 γυναίκες θα αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, κάποια στιγμή στη ζωή τους (Feuer EJ et al 1993) και παρόμοιο είναι το ποσοστό αυτό σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες. Στην Ασία ωστόσο, άγνωστο γιατί, ο επιπολασμός της νόσου είναι αρκετά μικρότερος. Μεταξύ των ετών 1973 και 1991 το ποσοστό επίπτωσης καρκίνου του μαστού στις Η.Π.Α αυξήθηκε κατά 24% ενώ αντιθέτως η θνησιμότητα από τη νόσο παρέμεινε σταθερή. Με το πέρασμα των χρόνων διαγιγνώσκονται πιο πρώιμες περιπτώσεις καρκίνου. Είναι φανερό ότι ο προληπτικός έλεγχος που εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια, συμπεριλαμβανομένης της μαστογραφίας, έχει διαδραματίσει ένα σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση αυτών των πρώιμων μορφών καρκίνου.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο και τη δεύτερη αιτία θανάτου στο γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα (Greenlee RT et al 2000, Τζωρακοελευθεράκης Ευ. 1992). Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 58 έτη.

Αν και καμιά αιτία δεν έχει αποδειχθεί ως υπεύθυνη για την εκδήλωση της νόσου, εντούτοις πολλοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί και συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της, όπως:

- ✚ Συγγενής πρώτου βαθμού με καρκίνο μαστού. Γυναίκες με μητέρα ή αδελφή πάσχουσα, εμφανίζουν κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου 1.5 έως 3 φορές μεγαλύτερο (Ottman R et al 1983), ιδίως σε περιπτώσεις ανάπτυξης της νόσου προεμμηνοπαυσιακά ή σε ύπαρξη αμφοτερόπλευρου καρκίνου (Claus EG et al 1994).
- ✚ Γονιδιακές μεταλλάξεις, όπως αυτές που αφορούν στα ογκογονίδια BCRA1 και BCRA2 (Miki Y et al 1994 21 Wooster R et al 1994) οι οποίες συνοδεύονται από κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού 50-85% (Struewing JP et al 1997). Η παρουσία τους μπορεί να αποτελεί εξήγηση για τις οικογενείς μορφές καρκίνου καθώς και για το 1% των συνολικών περιπτώσεων εμφάνισης της νόσου (Ford et al 1994).
- ✚ Αυξημένη (χρονικά ή ποσοτικά) έκθεση τόσο σε ενδογενή όσο και σε εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα. Έτσι γυναίκες που

δεν έχουν τεκνοποιήσει ή που η πρώτη τους εγκυμοσύνη έλαβε χώρα μετά το 30^ο έτος της ηλικίας τους, έχουν 3 με 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο. Επιπλέον, αυτές που είχαν πρόωμη εμμηναρχή και /ή καθυστερημένη εμμηνόπαυση (Rosner B et al 1996) έχουν αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου. Το αντίθετο ισχύει για το μητρικό θηλασμό ο οποίος μειώνει τον κίνδυνο (Furberg H et al 1999), και είναι λογικό αφού όπως αναφέραμε, αποτελεί μια περίοδο οιστρογονοανεπάρκειας. Όσον αφορά στα εξωγενώς χορηγούμενα οιστρογόνα, αυτά σχετίζονται με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου (Colditz GA et al 1995, Schairer C et al 2000), και μάλιστα ανάλογη του χρονικού διαστήματος λήψης των ορμονών. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα οιστρογόνα επάγουν την καρκινογένεση, είναι μέσω διέγερσης αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF- α . Δεν έχει διαπιστωθεί ανάλογη σχέση με τη λήψη αντισυλληπτικών σκευασμάτων (Hankinson S et al 1997) ενώ πιστεύεται ότι η καταστολή της λειτουργίας των ωοθηκών έχει, αντιθέτως, προστατευτικό ρόλο (Trichopoulos D et al 1972) .

✚ Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης μετάχρονου καρκίνου στον άλλο μαστό σε 5-8% και είναι περισσότερο αυξημένο σε οικογενείς περιπτώσεις με

μεταλλάξεις των BCRA1 και BCRA2 καθώς και σε λοβιακά καρκινώματα (Robson M et al 1998).

✚ Παχυσαρκία: Αύξηση του σωματικού βάρους μετά την ηλικία των 18 ετών καθώς και αυξημένη πρόσληψη διατροφικού λίπους έχειδειχθεί πως αυξάνει την επίπτωση καρκίνου μετεμμηνοπαυσιακά (Hunter D et al 1996), γεγονός το οποίο πιθανότατα έχει να κάνει με την αυξημένη σύνθεση οιστρογόνων στο λιπώδη ιστό (Huang Z et al 1997). Μελέτη σε Ελληνίδες ωστόσο, έδειξε πως σε αυξημένη διαιτητική πρόσληψη λίπους, δεν προκύπτει αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Katsouyanni K et al), έτσι τα υπάρχοντα δεδομένα είναι μάλλον αλληλοσυγκρουόμενα.

✚ Ιστορικό αδενοκαρκινώματος ενδομητρίου αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου και στο μαστό

✚ Η κατανάλωση μεγάλων ή ακόμη και μετρίων ποσοτήτων αλκοόλ (Longnecker M et al 1994) έχει θετική συσχέτιση με την εμφάνιση καρκίνου, όπως και το ιστορικό έκθεσης σε ιοντίζουσα ακτινοβολία (Willett WC et al 1987).

✚ Τέλος η παρουσία στο μαζικό αδένα αλλοιώσεων, του τύπου της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας, ή η παρουσία θηλωμάτων (πολλαπλών, προερχόμενων από την τελική πορολοβιακή μονάδα), ιδίως σε γυναίκες με θετικό οικογενειακό ιστορικό

(Dupont W et al 1985), αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Σε περιπτώσεις γυναικών με επιθηλιακή υπερπλασία με ατυπία, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι πέντε φορές μεγαλύτερος από ότι στο γενικό πληθυσμό. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των θηλωμάτων ο κίνδυνο αυξάνει περίπου δύο φορές. Κάτι τέτοιο δεν έχει τεκμηριωθεί για τις ινοκυστικές αλλοιώσεις του μαστού που σε καμιά περίπτωση δε θεωρούνται προκαρκινωματώδης κατάσταση

Συγκεντρωτικά, οι παράγοντες κινδύνου παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα, όπου και διακρίνονται σε αυτούς με πολύ αυξημένο, μέτρια και ελαφρώς αυξημένο κίνδυνο (Atlas of breast cancer, Daniel F Hayes).

Πολύ αυξημένος κίνδυνος (σχετικός κίνδυνος πάνω από 4 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του γενικού πληθυσμού)	Μέτρια αυξημένος κίνδυνος (2-4 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του γενικού πληθυσμού)	Ελαφρώς αυξημένος κίνδυνος (1-2 φορές μεγαλύτερος από αυτόν του γενικού πληθυσμού)
Φύλο	Συγγενής πρώτου βαθμού με ιστορικό καρκίνου του μαστού	Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ
Ηλικία > 50	Υψηλό κοινωνικοοικονομικό επίπεδο	Πρώιμη εμμηναρχή (<12 ετών)
Γέννηση σε χώρα Βόρειας Αμερικής ή Βόρειας Ευρώπης	Παρατεταμένη, χωρίς διακοπή, περίοδος εμμηνορυσίας (άτοκες, γυναίκες με καθυστερημένη πρώτη εγκυμοσύνη)	Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης μετεμμηνοπαυσιακά.
Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού	Μετεμμηνοπαυσιακή παχυσαρκία.	Παρουσία επιθηλιακής υπερπλασίας του μαστικού αδένα, χωρίς ατυπία
Οικογενειακό ιστορικό αμφοτερόπλευρου, προεμμηνοπαυσιακού ή οικογενούς καρκίνου	Ατομικό ιστορικό καρκινώματος ενδομητρίου ή ωοθηκών	Λήψη από του στόματος αντισυλληπτικών ?
Κληρονομική γενετική ευπάθεια (BCRA1,2)	Αλλοιώσεις του τύπου της επιθηλιακής υπερπλασίας με ατυπία	Δίαιτα ?

(Greenlee RT et al 2000)

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα καρκινώματα του μαστού ταξινομούνται ιστολογικά με βάση τον τύπο των κυττάρων που τα αποτελούν και τον τρόπο ανάπτυξής τους. Έτσι, μπορεί να είναι διηθητικά (να επεκτείνονται στο περιβάλλον στρώμα) ή μη διηθητικά (in situ, να μη διασπούν τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα λόβια ή τους πόρους).

Στον πίνακα που ακολουθεί αναφέρονται οι κύριοι ιστολογικοί τύποι, η σχετική τους συχνότητα καθώς και το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης του καθενός από αυτά.

ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Ιστολογικός τύπος	Συχνότητα %	5 ετής επιβίωση (%)
Πορογενές διηθητικό NOS	63.6	79
Λοβιακό διηθητικό	5.9	84
Μικτό διηθητικό	1.6	85
Μυελοειδές	2.8	82
Βλεννώδες	2.1	95
Σωληνώδες	1.4	87
Αποκρινές	0,5	80
Μεταπλαστικό	0,3	60

ΜΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ (IN SITU) ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Ιστολογικός τύπος	Συχνότητα	5 ετής επιβίωση
Ενδοπορικό	3.6	>99%
Θηλώδεις	0.4	>99%
Φαγεσωρικό (comedo)	0.3	>99%
Clinging	0.1	>99%
Λοβιακό in situ	1.6	>99%
Ενδοπορικό και λοβιακό in situ	0.2	>99%

(Greenlee RT et al 2000)

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ (GRADING).

Αν και θεωρείται πως ένα ενιαίο σύστημα ταξινόμησης δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί απόλυτα σε όλες τις περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού, λόγω της μεγάλης πλειομορφίας τους, σήμερα, το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σύστημα grading είναι η τροποποίηση κατά Nottingham του συστήματος Scarff-Bloom-Richardson.

Παράμετροι που καθορίζουν το βαθμό κακοηθείας (Grading).

Σωληνώδεις σχηματισμοί (% ποσοστό του όγκου που αποτελείται από σωληνώδεις δομές)	Βαθμολογία
>75%	1
10-75	2
<10%	3
Πυρηνική πλειομορφία	Βαθμολογία
Μικρά ομοιόμορφα κύτταρα	1
Μέτρια αύξηση μεγέθους και ποικιλομορφία	2
Εξέχουσα ποικιλομορφία	3
Αριθμός μιτώσεων (σε 10 μεγάλης μεγέθυνσης οπτικά πεδία, διάμετρος πεδίου 0,52mm)	Βαθμολογία
Μέχρι 7	1
8-14	2
>15	3

Πίνακας1.Παράμετροι που λαμβάνονται υπ'όψιν στον προσδιορισμό του βαθμού κακοηθείας των καρκινωμάτων του μαστού.

Ο βαθμός κακοηθείας (Grade) προκύπτει από το άθροισμα των παραπάνω βαθμολογιών (πίνακες 1,2). Η συσχέτιση του Grade με την επιβίωση έχει ως εξής:

Grade	Βαθμολογία	5ετής επιβίωση	7ετής επιβίωση
1	3-5	95	90
2	6-7	75	65
3	8-9	50	45

Πίνακας 2 Υπολογισμός του βαθμού κακοηθείας και ποσοστά πενταετούς και επταετούς επιβίωσης.

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ TNM (WHO Classification 2002)

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού σύμφωνα με το AJCC

Πρωτοπαθής όγκος (T)

T_x : πρωτοπαθής όγκος μη εκτιμήσιμος

T₀: δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου

T_{is}: καρκίνωμα in situ: πορογενές ή λοβιακό καρκίνωμα in situ, ή νόσος

Paget της θηλής χωρίς όγκο

T₁ : μέγεθος όγκου ≤ 2 εκ

T_{1 mic}: μικροδιήθηση 0.1 εκ ή λιγότερο

T_{1a}: όγκος μεγαλύτερος από 0.1 και μικρότερος από 0.5 εκ

T_{1b}: όγκος μεγαλύτερος από 0.5 και μικρότερος από 1 εκ

T_{1c}: όγκος μεγαλύτερος από 1εκ και μικρότερος από 2 εκ

T₂ : μέγεθος όγκου > 2 εκ και ≤ 5 εκ

T₃ : μέγεθος όγκου > 5 εκ

T₄ : όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα (a) ή στο δέρμα (b), όπως περιγράφεται παρακάτω:

- T_{4a} : επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα
- T_{4b} : εξέλκωση δέρματος, οίδημα ή δορυφόρα οζίδια, περιορισμένα στον ένα μαστό
- T_{4c} : T_{4a} και T_{4b}

- T4d : φλεγμονώδες καρκίνωμα (καρκίνωμα με διάχυτη σκληρία του δέρματος και ερυσιπελατοειδή όχθο, χωρίς υποκείμενη ψηλαφητή μάζα, οφειλόμενο σε καρκινικά έμβολα εντός των δερματικών λεμφαγγείων)

Λεμφαδένες (N)

N_x: Λεμφαδένες μη εκτιμήσιμοι

N₀: Μασχαλιαίοι λεμφαδένες χωρίς μεταστάσεις

N1 mi : Μικρομετάσταση σε ένα λεμφαδένα (<2mm)

N1: Μεταστάσεις σε 1-3 ομόπλευρους μασχαλιαίους

N1_a: 1-3 ομόπλευροι μασχαλιαίοι λεμφαδένες με μικρομεταστάσεις
(≤ 0,2εκ)

N1b: Ομόπλευροι μασχαλιαίοι λεμφαδένες με μεταστάσεις >0,2 εκ

N1bi :1 έως 3 λεμφαδένες διηθημένοι (>0,2εκ και < 2 εκ)

N1bii : 4 ή περισσότεροι λεμφαδένες διηθημένοι (> 0,2εκ και < 2εκ)

N1biii: Επέκταση του όγκου πέρα από την κάψα, λεμφαδένα < 2 εκ

N1biv: Οποιοσδήποτε λεμφαδένας ≥2 εκ

N2: Ομόπλευροι μασχαλιαίοι λεμφαδένες με μεταστάσεις, συμφυόμενοι μεταξύ τους ή σε άλλες δομές

N3: Ομόπλευροι έσω μαστικοί λεμφαδένες με μεταστάσεις

Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M).

Mo: απύσες

M1: παρούσες

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ TNM (WHO Classification 2002)

Στάδιο	Ταξινόμηση κατά TNM	5ετής επιβίωση (%)
0	TisNoMo	92
I	T1NoMo	87
IIA	ToN1Mo T1N1Mo T2NoMo	78
IIB	T2N1Mo T3NoMo	68
IIIA	ToN2Mo T1N2Mo T2N2Mo T3N1Mo T3N2Mo	51
IIIB	T4 οποιοδήποτε N,Mo Οποιοδήποτε TN3 Mo	42
IV	Οποιοδήποτε Τα Οποιοδήποτε N M1	13

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Όπως είναι γνωστό, η παραγωγή των οιστρογόνων από τις ωοθήκες επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη, διαφοροποίηση, και απόπτωση σε μια ποικιλία κυττάρων (Osborne, C.K et al 2000, Chen, H et al 1999). Επίσης γνωρίζουμε πως οι δράσεις των οιστρογόνων στους διάφορους ιστούς, διαμεσολαβούνται μέσω της σύνδεσης των ορμονών στον υποδοχέα τους ER (Evans, R. M. 1988)

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς, όπως είναι ευρέως γνωστό, είναι μέλη της υπερικογένειας των στεροειδικών- πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων (Beato, M 1995, McKenna, N. J et al 1999 Klinge, C. M.2000, Shang, Y et al 2002 Blankenstein MA et al 1992).

Υπάρχουν δύο είδη οιστρογονικών υποδοχέων: ο ER-α και ο ER-β (Estrogen- Receptor).

Ο ER-α ήταν ο πρώτος υποδοχέας που ταυτοποιήθηκε (εικόνα 5) και είναι ένα ενεργοποιητικό μόριο το οποίο μετά τη σύνδεση του με τον αντίστοιχο προσδέτη, κινείται προς τον πυρήνα όπου δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Συγκεκριμένα συνδέεται στο γενετικό υλικό και αλληλεπιδρά με την αλληλουχία ERE του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την απάντηση στα οιστρογόνα (ERE, Estrogen-Response Elements), Η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται είτε με άμεση πρόσδεση στην

ακολουθία 5' GGTCAnnnnTGACC-3' (Richer JK et al) είτε με σύνδεση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Sp1 και ο AP1 (Shang et al 2002). Να σημειωθεί ότι ο ER μπορεί να αλληλεπιδρά με μόρια που έχουν είτε ρόλο συν-ενεργοποιητή (p300), ή συν-καταστολέα (N-CoR) της μεταγραφικής του δραστηριότητας.

Εικόνα 5: Δομή οιστρογονικού υποδοχέα (Shang, Y et al 2002).

Η περιοχή πρόσδεσης του ER στο DNA αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες που σταθεροποιούνται μέσω δακτυλίων ψευδαργύρου. Οι δακτύλιοι αυτοί είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση της ERE περιοχής του DNA (εικόνα 6)

Εικόνα 6: Δομή της DNA-Binding-Domain του οιστρογονικού υποδοχέα

Ο ρόλος του ER-β είναι επίσης ενεργοποιητικός της μεταγραφής, ωστόσο ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι ακόμη απόλυτα ξεκαθαρισμένος.

Σε καρκινώματα μαστού με θετική έκφραση ER-α έχουν βρεθεί ελαφρώς υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα καρκινώματα που ήταν αρνητικά στους οιστρογονικούς υποδοχείς, γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με την καλύτερη ανταπόκριση της πρώτης ομάδας στην ορμονική θεραπεία. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι πάνω από το 50% των ασθενών με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς ανταποκρίνονται σε θεραπεία με ταμοξιφένη (Abel MG et al 2002), η οποία αναστέλλει τη λειτουργία του ER-α.

ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ο PR (Progesterone- Receptor) ανήκει επίσης στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Mangelsdorf DJ et al 1995) που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων ως απάντηση στον ορμονικό ερεθισμό.

Τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια, έχουν αναγνωριστεί δύο ισομορφές του προγεστερονικού υποδοχέα: ο PR-α και ο PR-β μόρια που προέρχονται από το ίδιο γονίδιο, με έναρξη της μεταγραφής από δύο διαφορετικά κωδικόνια έναρξης πράγμα που συμβαίνει υπό τον έλεγχο διαφορετικού υποκινητή (Giangrande PH et al 1997). Ο PR-α αποτελεί «κολόβωμα» του PR-β αφού στερείται μιας περιοχής του αμινοτελικού άκρου του PR-β που αποτελείται από 164 αμινοξέα. Εντός του μορίου

και των δύο υποδοχέων αναγνωρίζονται δύο κοινές ενεργοποιητικές περιοχές, η AF-1, στο αμινοτελικό άκρο, της οποίας η ενεργοποίηση είναι ανεξάρτητη της παρουσίας συνδέτη και η AF-2, στο καρβοξυτελικό άκρο που είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη. Τέλος υπάρχει και μια κεντρική περιοχή που αντιστοιχεί στην περιοχή σύνδεσης με το DNA, ενώ στο αμινοτελικό άκρο του PR-β αναγνωρίζεται και η AF-3 στην περιοχή που λείπει από τον PR-α.

Πειράματα έχουν δείξει ότι οι δύο υποδοχείς δεν είναι λειτουργικά πανομοιότυποι, και ότι ο PR-β είναι ο κύριος ενεργοποιητής της γονιδιακής έκφρασης ενώ ο PR-α καταστέλλει την έκφραση τόσο του PR-β όσο και άλλων πυρηνικών υποδοχέων (Xiuhua Gao et al 2002). Έχει επίσης διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας περιοχής τόσο στον PR-α όσο και στον PR-β (Xiuhua Gao et al) που έχει κατασταλτική δράση στις AF-1 και AF-2 περιοχές αλλά όχι στην AF-3 περιοχή, πράγμα που εξηγεί την, μονίμως ενεργοποιητική δράση του PR-β.

Σε απουσία προγεστερόνης ο υποδοχέας απομονώνεται σε ανενεργό μορφή σχετιζόμενος με κάποιες πρωτεΐνες όπως οι heat shock proteins (HSP) και είναι ανίκανος να επηρεάσει το συγγενή υποκινητή (McDonnell DP et al 1995) και να συμμετέχει στην έκφραση της γονιδιακής ρύθμισης.

Η σύνδεση της προγεστερόνης επιφέρει αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα, αποσύνδεση του από τις HSP, διμερισμό, φωσφορυλίωση

και τελικά μετάθεση του στον πυρήνα όπου γίνεται η σύνδεση με τα Progesterone-Response Elements (PRE) της ρυθμιστικής περιοχής των γονιδίων στόχων. Συγχρόνως στρατολογούνται διάφορα άλλα μόρια, συνενεργοποιητές της μεταγραφής και έχουμε έτσι το τελικό αποτέλεσμα της επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης.

Η σχετική αναλογία έκφρασης PR-α/ PR-β στα κύτταρα καρκινωμάτων του μαζικού αδένα, εξαρτάται από το είδος του καρκινώματος (76 Conneely OM et al 2000) και την ορμονική κατάσταση της ασθενούς και είναι αυτή που καθορίζει την ανταπόκριση σε φαρμακευτική αγωγή με προγεστερόνη. Στις γυναίκες είναι σταθερή σε όλο το διάστημα ανάπτυξης του μαστού από την εφηβεία μέχρι την εγκυμοσύνη.

ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TRANSFORMING GROWTH FACTOR beta

(TGF-β) ΩΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΡΙΟΥ

Ο TGF-β όπως είναι γνωστό, είναι μέλος της υπεροικογένειας των transforming growth factors, που απαριθμεί σήμερα πάνω από 40 πρωτεΐνες – μέλη (Massague J., and Chen , Y.G.2000) Σε αυτές, εκτός από τον TGF-β περιλαμβάνονται οι BMPs (bone morphogenetic proteins), οι Ακτιβίνες (activins), οι Nodals, η decapentaplegic καθώς και οι anti- Mullerian Hormones.

Ο TGF-β, που είναι το πιο γνωστό μέλος της οικογένειας, ανακαλύφθηκε το 1978 (De Larco et al 1978). Η αρχική του ονομασία ήταν Sarcoma

Growth Factor, καθώς είχε βρεθεί ότι επάγει την ανάπτυξη και το σχηματισμό αποικιών σε ινοβλάστες ήπατος αρουραίου. Ωστόσο ο ρόλος του δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένος, αφού τα περισσότερα πειράματα έχουν δείξει ότι η κύρια δράση του είναι κατασταλτική της κυτταρικής αύξησης και πολλαπλασιασμού (Holley R. W et al 1980). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι για παράδειγμα, κατά την επούλωση τραύματος, ο TGF-beta μπορεί είτε να διεγείρει είτε να αναστείλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ανάλογα με το αν το κύτταρο στόχος είναι ένας ινοβλάστης ή ένα κερατινοκύτταρο (Ashcroft Gs et al 1999) (Massague J and Wottom 2000). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι πρόκειται μάλλον για ένα πολυλειτουργικό μόριο σηματοδότησης (prototypic multifunctional signaling molecule) (Hong-Jian Zhu et al 2001, Roberts AB et al 1985). Μερικά από τα γονίδια –στόχοι του TGF-β είναι διάφορα ρυθμιστικά της μεταγραφής γονίδια όπως τα c-jun, c-fos, c-myc, άλλα ρυθμιστικά του κυτταρικού κύκλου γονίδια όπως τα p15, p21, cyclins D1 και cyclin A (Mahmood Hussein 2005)

Αν και η δράση του δεν είναι ταυτοποιημένη, είναι ωστόσο βέβαιο πως ο TGF-β διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης όσο και στη ρύθμιση της εξωκυττάριας ουσίας και της κυτταρικής προσκόλλησης σε μια ποικιλία ιστών, μεταξύ των οποίων, φυσικά και ο μαστός (Hong-Jian Zhu et al 2001, Massague, J 1998).

Στο όργανο αυτό έχει συσχετιστεί τόσο με τη φυσιολογική ανάπτυξη όσο και με την καρκινογένεση (Di Loreto, C et al 1999, Robinson, G. W et al 1997, Gorska, A. E et al 1998, Derynck, R., et al 2001, Ying, Y. S., et al 1995). Σε *in vitro* πειράματα έχει βρεθεί ότι αποτελεί αναστολέα της αντιγραφής των επιθηλιακών κυττάρων του αδένου (Hosobuchi M, et al 1989). Επίσης έχει βρεθεί ως κύριος υπεύθυνος της ρύθμισης, κατά την ανάπτυξη, του πολλαπλασιασμού του επιθηλίου, τόσο των πόρων όσο και των κυψελίδων (Pierce, D. J., et al 1995, Jhappan C. Et al 1993 C.W.Daniel et al 1996), και ακόμη ως κύριος ρυθμιστής του κυτταρικού θανάτου μέσω απόπτωσης που συμβαίνει όπως έχουμε περιγράψει, κατά την παλινδρόμηση (H. Joseph et al 1999 E. C. Kordon et al 1995 A. E. Gorska et al 1998, Nguyen AV et al 2000) των κυψελιδικών κυττάρων που ακολουθεί τη γαλουχία. (Strange, R., et al 1992). Η έκφραση του ωστόσο, δεν περιορίζεται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού μαστού. Έχει βρεθεί επίσης να εκφράζεται και στην εξωκυττάρια ουσία του αναπτυσσόμενου αδένου, καταστέλλοντας ίσως την πλάγια εκβλάστηση (budding) σε αδρανείς πόρους, όταν το δένδρο των πόρων έχει ολοκληρωθεί (Daniel CW et al 1996).

Ο TGF- β επιτυγχάνει αυτού του είδους τη ρύθμιση, μέσω ανταγωνισμού της δράσης πολλών μιτωγόνων αυξητικών παραγόντων. (98 Massague, J., and Chen, Y. G. 2000, 99 Massague, J. 1998)). Σε *in vivo* μελέτες εξάλλου έχει αποδειχθεί ο προστατευτικός ρόλος του TGF- β όσο αφορά

τη δημιουργία νεοπλάσματος (Pierce, D. F., et al 1995, Tang. B et al 1998 Böttinger E. P et al 1997), αφού έλλειψη του TGF-β ή απενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ογκοκατασταλτικής δράσης του, ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Attissano, L et al 1994) και ποικίλες άλλες κυτταρικές απαντήσεις που συμβάλλουν στον επιθετικό φαινότυπο ορισμένων μορφών καρκίνου. Σύμφωνα με κάποιες άλλες μελέτες η επίδραση του TGF-β στα επιθηλιακά κύτταρα του μαζικού αδένου μπορεί να είναι αναστολή της ανάπτυξης ή αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, ανάλογα με τα ευρισκόμενα στο κύτταρο επίπεδα της Ras πρωτεΐνης (Oft et al 1996). Με βάση άλλες έρευνες, (Reiss et al 1995) καρκινικά κύτταρα μαστού είναι ανθεκτικά in vitro στην ανασταλτική ως προς την αύξηση δράση του TGF-beta και δεν ανταποκρίνονται σε θεραπεία με TGF-beta. Με βάση τα παραπάνω, δικαιολογείται ο χαρακτηρισμός του TGF-β ως πολυλειτουργικό σηματοδοτικό μόριο και προκαλεί τεράστιο ενδιαφέρον η μελέτη της βιολογικής του συμπεριφοράς. Εξάλλου πρέπει να σημειώσουμε και το ρόλο του TGF-β στη διέγερση της παραγωγής πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας, επάγοντας την ίνωση σε μια ποικιλία ιστών (Kassimatis TI et al 2007)

Υπάρχουν τρεις ισομορφές του TGF-β, μόρια δηλαδή προερχόμενα από το ίδιο γονίδιο με εναλλακτικό μάτισμα (splicing). Και οι τρεις ισομορφές του TGF-β εκφράζονται στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του

μαζικού αδένος και φαίνεται να ρυθμίζουν τόσο την κινητική των προγονικών κυττάρων όσο και τη διατήρηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μια λειτουργικά αδιαφοροποίητη κατάσταση. Η ενεργότητα όλων των ισομορφών περιορίζεται μέσω έκκρισης τους σε ανενεργές, λανθάνουσες, μορφές –σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά, που ονομάζονται LTGF- β (latent TGF- β) αποτελούνται από μια κυτταροκίνη μοριακού βάρους 24 kDa και ένα διμερές βάρους 80 kDa που ονομάζεται LAP (Latency Associated Peptide), το οποίο και περιέχει τη σηματοδοτική αλληλουχία για την έκκριση. Το όλο σύμπλεγμα είναι ενωμένο με δισουλφιδικούς δεσμούς όπως φαίνεται στο σχήμα:

Εικόνα 7: Δομή της λανθάνουσας μορφής του TGF- β (Zhu et al 2001, Cohen M 2003).

Έτσι, η βιολογική ενεργότητα του TGF- β καθορίζεται κυρίως από το ποσοστό της απελευθέρωσης του από το παραπάνω σύμπλοκο, ενώ αυξημένη παραγωγή του LTGF- β δεν αντικατοπτρίζει υψηλή βιολογική δραστηριότητα (Barcellos M.H 1996). Αντίθετα, η ενεργοποίηση του TGF- β χωρίς παρατηρούμενη διαφορά στο ρυθμό σύνθεσης, (Knabbe C et al 1987) θα επηρεάσει σαφώς το βιολογικό σύστημα (Flaumenhalf R et al 1993)

ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGF- β

Ένα μόριο με τις πολλαπλές βιολογικές δράσεις που προαναφέραμε, είναι λογικό να έχει και μια ποικιλία υποστρωμάτων, μέσω των οποίων διαμεσολαβεί τις δράσεις του. Τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος του TGF-beta οφείλουν να είναι πολυάριθμα και πολύπλοκα εξηγώντας έτσι την ποικιλότητα των βιολογικών αποκρίσεων (Massague J and Wotton 2000). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει αποσαφηνιστεί ένα απλό σύστημα που διαμεσολαβεί την κυτταρική απόκριση στον TGF-beta, αυτό των Smad πρωτεϊνών, στο οποίο θα αναφερθούμε ενδελεχώς στη συνέχεια.

Η δράση του TGF- β στα κύτταρα ασκείται μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του ο οποίος κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1991 και αποδείχτηκε πως είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με δράση κινάσης σερίνης θρεονίνης.

Για να συνδεθεί με τον υποδοχέα του, ο TGF- β πρέπει προηγουμένως να ενεργοποιηθεί (Saharinen J. et al 1999), αποχωριζόμενος από τα άλλα μόρια του συμπλόκου LTGF. Αυτό γίνεται, είτε με πρωτεόλυση από τις πρωτεΐνες πλασμίνη, τρανσγλουταμίνη και καλπαΐνη, (Massague, J, et al 1992), είτε μέσω του συστήματος της ουβικουΐτινης. Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση του μπορεί να γίνει, με άγνωστο προς το παρόν μηχανισμό, μετά τη λήψη φαρμάκων όπως τα αντιοιστρογόνα, τα ρετινοειδή, η βιταμίνη A και τα γλυκοκορτικοειδή (Massague, J, et al 1992)

Όσον αφορά τους υποδοχείς του TGF- β , έχει βρεθεί ότι υπάρχουν τρεις τύποι υποδοχέων, ο TGF- β RI (Transforming Growth Factor beta Receptor I, TbRI), ο TGF- β II (TbRII) και ο TGF- β III (TbRIII). (Massague, J., et al 1994). Έχει βρεθεί ότι στα κύτταρα των θηλαστικών είναι παρών μόνο ο T β RII υποδοχέας ενώ δύο υποδοχείς, οι ALK-1 και ALK-5 (Activin receptor-like Kinase) χρησιμεύουν ως υποδοχείς τύπου I για τον TGF-beta. Από αυτούς μόνο ο ALK-5 είναι παρών σε όλα τα, ευαίσθητα στον TGF-beta, κύτταρα και μεταφέρει σήματα που αφορούν την αναστολή της ανάπτυξης και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας. Αντίθετα ο ALK-1 εκφράζεται επιλεκτικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και δεν κάνει μεταγωγή σήματος. (Miyasono et al 2003)

Δομή των υποδοχέων: Οι δυο πιο σημαντικοί υποδοχείς όπως είπαμε, είναι οι TGF- β I-R (ALK-5) και TGF- β II-R οι οποίοι αποτελούνται από τρία τμήματα: (εικόνα 8):

TGF- β Receptors I & II

Εικόνα 8: Δομή του υποδοχέα του TGF- β (Cohen et al)

- Μια μικρή εξωκυττάρια περιοχή μέσω της οποίας γίνεται η σύνδεση με τον TGF- β
- Μια απλή διαμεμβρανική και
- Μια ενδοκυττάρια με δράση κινάσης σερίνης θρεονίνης (Massague J et al 1998)

Υπάρχει περίπου 40% ομολογία μεταξύ των δύο υποδοχέων στις περιοχές με δράση κινάσης (Zhu et al 2001).

Ο TGF- β III υποδοχέας, που είναι μια πρωτεογλυκάνη (betaglycane), δεν αναμιγνύεται άμεσα στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Απλώς παρουσιάζει το συνδέτη (ligand) στον υπεύθυνο για τη σηματοδότηση υποδοχέα ενώ παράλληλα πιστεύεται πως είναι το κύριο διαμεσολαβητικό μόριο της αρχικής φάσης της παλινδρόμησης του μαζικού αδένα.

Ο TGF- β I υποδοχέας σε κατάσταση ηρεμίας (όταν δηλαδή δεν έχουμε σύνδεση ligand στον TGF- β IR), έχει τη δυνατότητα να παραμένει ανενεργός, διότι μια περιοχή του μορίου με σχήμα γέφυρας, η GS περιοχή (που ονομάζεται έτσι από τις πολλαπλές επαναλαμβανόμενες GSGSGS αλληλουχίες που περιέχει), πιέζει την περιοχή με δράση κινάσης ser/thr, προκαλώντας αλλαγές στο καταλυτικό της κέντρο (Saharinen, J., et al 1999). Πιστεύεται μάλιστα ότι μεταξύ των δύο υποδοχέων, ακόμη και σε κατάσταση ηρεμίας, σχηματίζεται σύμπλοκο που ωστόσο είναι ανενεργό λόγω ενός συγκεκριμένου προσανατολισμού των μορίων των δύο υποδοχέων, που εμποδίζει τη φωσφορυλίωση του TbRI και επομένως, την ενεργοποίηση του συστήματος (Zhu et al 2001).

Μετά τη σύνδεση του προσδέτη στον TGF- β II R προκαλούνται αλλαγές στη στερεοδιάταξη του συμπλόκου, (Ventura F et al 1994) γεγονός που καθιστά δυνατή τη φωσφορυλίωση της GS περιοχής του TGF- β RI σε ένα υπόλειμμα gly/ser που περιέχει. Έτσι λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση της κινάσης του TGF- β I που με τη σειρά του θα φωσφορυλιώσει τις πρωτεΐνες του ενδοκυττάριου μονοπατιού, δηλαδή τις Smad πρωτεΐνες.

Εικόνα 9 Σύνδεση του TGF-beta στον υποδοχέα του και ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μονοπατιού του.

Για να ευοδωθεί η σηματοδότηση, είναι απαραίτητος ο ετεροδιμερισμός των δύο υποδοχέων (I και II) (Wrana, J. L., et al 1992, Moustakas, A., et al 1993 Okadome, T., et al 1994).

Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα αποτελούνται από δύο μόρια του κάθε υποδοχέα και πρέπει να τονιστεί ότι η δομική ακεραιότητα και των δύο μορίων είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή σήματος (Miyazono K et al 2003).

Ακόμη να τονίσουμε την ιδιαιτερότητα των υποδοχέων του TGF- β ως προς την παρουσία της κινάσης Ser/Thr στο καταλυτικό κέντρο που βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα τους. Αντίθετα, όλοι σχεδόν οι

υποδοχείς αυξητικών παραγόντων περιέχουν περιοχές τυροσινικής κινάσης στο ενδοκυττάριο τμήμα τους (Miyasono K et al 2003).

Η περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί τον, τύπου II, υποδοχέα, περιλαμβάνει μια αλληλουχία 10 συναπτών νουκλεοτιδίων αδενίνης, και οποιαδήποτε αλλαγή στον αριθμό τους καταλήγει σε λειτουργικά αδρανή υποδοχέα. Πρέπει δε, να αναφερθεί ότι η απώλεια της λειτουργίας του υποδοχέα είναι το πιο συχνό φαινόμενο που αίρει την ογκοκατασταλτική δράση του TGF- β και ενισχύει την ογκογένεση (Mahmood Hussein 2005).

Και επιπροσθέτως, ότι ο TβRII είναι πολύ συχνή θέση μεταλλαξιογόνου απενεργοποίησης (Goggins M et al 1998) ενώ μεταλλάξεις του υποδοχέα τύπου I είναι σπάνιες.(Markovitz SD 1996). Οι λόγοι που οδηγούν σε μειωμένη έκφραση του TβRII μπορεί να είναι είτε η μεταγραφική αποσιώπηση ή υπερμεθυλίωση του υποκινητή του, με αποτέλεσμα συμπύκνωση της χρωματίνης, είτε μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποκινητή (Mahmood Hussein 2005). Τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι συχνές σε καρκινώματα στομάχου, ενδομητρίου καθώς και σε περιπτώσεις οικογενούς καρκίνου παχέος εντέρου που δε σχετίζεται με πολυποδίαση (non-polyposis colon cancer) (Markovitz et al 1995).

ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Όπως έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες, οι Smad πρωτεΐνες είναι τα κύρια ενδοκυττάρια υποστρώματα που διαμεσολαβούν την απάντηση στον TGF- β (Markowitz, S. et al 1995, Grady, W. M. Et al 1998). Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών (Liu, F et al 1996 Heldin, C.H et al 1997) απαριθμεί 9 μέλη. Ονομάζονται έτσι από το μέγεθος τους (small proteins) στον *C. Elegans* και την πρωτεΐνη Mad (mothers against decapentaplegic)*¹ (Sekelsky JJ et al 1995), που ήταν το πρώτο μόριο της οικογένειας του TGF- β που ανακαλύφθηκε σε γενετικό έλεγχο στη *Drosophila* (Sekelsky, J. J et al 1995, Raftery LA et al 1995) ως σηματοδοτικό μόριο του καταρράκτη αντιδράσεων του dpp (decapentaplegic), μόριο ανάλογο του TGF- β στη *Drosophila*. Μια ομόλογη σειρά πρωτεϊνών οι sma2, sma3 και sma4 (small proteins), ταυτοποιήθηκαν ως οι διαμεσολαβητές του ίδιου μονοπατιού στον *Caenorhabditis elegans* (Savage C, et al 1996).

Η γενική δομή των Smad πρωτεϊνών είναι παρόμοια για όλα τα μέλη της οικογένειας, αποτελούμενη από τρεις περιοχές (εικόνα10):

¹ Η πρωτεΐνη MAD (mothers against decapentaplegic) είναι μέρος του σηματοδοτικού καταρράκτη της πρωτεΐνης decapentaplegic, του μοριακού ομόλογου του TGF- β στη *Drosophila*. Τρεις πρωτεΐνες ομόλογες της MAD, διαμεσολαβούν την κυτταρική απόκριση στον TGF- β στον *C. Elegans*.

R-Smads
(Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8)

Εργαστήριο Ανατομίας-Ιστολογίας- Εμβρυολογίας Πανεπιστημίου Πατρών

Οι πρωτεΐνες Smad ανάλογα με τη δράση τους χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (εικόνα 11)

α) τις ρυθμιζόμενες από τον υποδοχέα, R-Smad (Receptor-regulated Smads) στις οποίες ανήκουν οι Smad 1,2,3, 5 και 8

β) τις κοινές διαμεσολαβητικές, Co- Smads (Common Mediator Smads) στις οποίες ανήκει η Smad 4 και

γ) τις I- Smads (Inhibitory Smads) με κατασταλτική, ως προς τις υπόλοιπες, δράση, στις οποίες ανήκουν οι Smad 6 και 7 και από τις οποίες, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, λείπει η MH1 περιοχή

Εικόνα 12: Τα είδη των Smad πρωτεϊνών και τα μόρια που τις ενεργοποιούν (Wakefield et al 2001)

Οι R-Smad χωρίζονται περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με το είδος του μορίου από το οποίο ενεργοποιούνται:

- ο Στις AR-Smad που ενεργοποιούνται από την Ακτιβίνη και τον TGF- β οι οποίες περιλαμβάνουν τις Smad 2,3
- ο Στις BR-Smad που ενεργοποιούνται από τις BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) και στις οποίες περιλαμβάνονται οι Smad 1,5 και 8 (εικόνα 12)

Η L3 αγκύλη που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο, είναι αυτή που καθορίζει την ειδικότητα των Smad πρωτεϊνών ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που διαμεσολαβούν. Έτσι οι Smad 2 και 3 σχετίζονται με τον TGF- β και τις ακτιβίνες, ενώ οι Smad 1,5,8 με τις BMPs.

Η MH1 περιοχή είναι υπεύθυνη και για την αυτοκαταστολή των Smad πρωτεϊνών, εμποδίζοντας τον ετεροδιμερισμό τους απουσία σήματος (Huwiler A et al 1994).

Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, μετά τη σύνδεση του TGF- β στον υποδοχέα του, ακολουθεί ένας καταρράκτης αντιδράσεων μεταξύ των οποίων και η φωσφορυλίωση κάποιων ρυθμιστικών Smad πρωτεϊνών (R-Smads) όπως είναι οι Smad 2 και 3 από την ενεργοποιημένη κινάση-υποδοχέα TGF- β I. Αυτό γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης της L45 αγκύλης του υποδοχέα με την L3 αγκύλη των R-Smad πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών γίνεται σε ένα υπόλειμμα σερίνης

μιας επαναλαμβανόμενης SXSS περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου των R-Smads (περιοχή που λείπει από τις Co-Smad).

Το πρώτο απαραίτητο βήμα για την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών είναι η πρόσβαση στον ενεργοποιημένο υποδοχέα TGF-βI. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας άλλης μεμβρανικής πρωτεΐνης, της SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Η SARA είναι μια πρωτεΐνη με διπλό δακτύλιο ψευδαργύρου, με τον οποίο αλληλεπιδρά με τις Smad 2 και 3, διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση τους στον ενεργοποιημένο υποδοχέα TβRI (Tsukazaki T, et al 1998). Πιο συγκεκριμένα, το καρβοξυτελικό άκρο της SARA, συνδέεται με τον ενεργοποιημένο TGF-βI-R, σχηματίζοντας έτσι μια γέφυρα μεταξύ αυτού και της MH1 περιοχή των Smad πρωτεϊνών (Tsukazaki, T et al 1998). Μετά τη φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου των R-Smad από τον υποδοχέα ελαττώνεται η συγγένεια των Smad πρωτεϊνών για την πρωτεΐνη SARA και αυξάνεται η συγγένεια για σχηματισμό ομο- και ετερο-τριμερών (Frederick et al 2002). Πιο συγκεκριμένα, η SARA συνδέεται μέσω συγκεκριμένων περιοχών (των Smad Binding Elements) που διαθέτει, με τρία υδρόφοβα τμήματα που βρίσκονται στην MH2 περιοχή των R-Smad2 και 3, τμήματα που αποτελούν το λεγόμενο υδρόφοβο διάδρομο των Smad πρωτεϊνών (Frederick et al 2002). Η περιοχή των Smad η οποία «μαγκώνει» πάνω στη SARA, βρίσκεται στην MH2 περιοχή, αλλά η σύνδεση αυτή δεν μπλοκάρει την επιφάνεια της Smad με την οποία

γίνεται η αναγνώριση του υποδοχέα. Αυτή η σύνδεση μάλιστα, κρατά τις Smad σε ανενεργό μορφή, διευκολύνοντας έτσι τη σύνδεση τους με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα (Frederick JP et al 2002)

Μετά τη φωσφορυλίωση της R-Smad από τον TGF-βRI στην αλληλουχία SSXS του καρβοξυτελικού της άκρου (J Massague 1998), αίρεται η ανασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών MH1 και MH2 των Smad πρωτεϊνών. Μετά τη φωσφορυλίωση, οι Smad πρωτεΐνες αποκτούν τη δυνατότητα αποσύνδεσης από το σύμπλοκο SMAD-SARA- TGF-βIR και σχηματισμού ενός νέου, αυτή τη φορά με τη Smad 4 (Wakefield M et al 2001). Με διάφορες μελέτες έχειδειχθεί, ότι στο κυτταρόπλασμα, οι Smad πρωτεΐνες 2, 3 και 4 συνδέονται και με πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων, κυρίως με την τουμπουλίνη, και έτσι σκηνώνονται, κατά κάποιο τρόπο, εντός του κυτταροπλάσματος (Dong, C, et al 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή, αίρεται με την ενεργοποίηση των Smad από τον TGF-βIR (Hong-Jian Zhu et al 2001). Μια ρυθμιστική δράση των μικροσωληνίσκων στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών (Dong, C, et al 2000) θεωρείται πολύ πιθανή, αφού δυνητική αποσύνδεση από την τουμπουλίνη και φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών, μπορεί να προκαλέσει μεταγραφική απόκριση στο κύτταρο όμοια με αυτή που λαμβάνει χώρα κατόπιν ενεργοποίησης του TGF-β (Dong C et al 2000).

Εικόνα 13: Δημιουργία ομο- και ετερο-μερών από τις Smad πρωτεΐνες (Moustakas et al 2001)

Εικόνα 14: Ενδοκυττάριο μεταγωγή σήματος μέσω των Smad πρωτεϊνών και σύνδεση με το DNA (Miyazono K et al 2003).

Στη συνέχεια και αφού σχηματίσουν ετερομερές σύμπλοκο (εικόνα 13) με την Smad4 (η οποία στερείται SSXS περιοχής) οι Smad πρωτεΐνες κατευθύνονται προς τον πυρήνα του κυττάρου. Η καθοδήγηση του Smad συμπλόκου προς τον πυρήνα γίνεται μέσω της MH2 περιοχής των πρωτεϊνών (Massague and Wotton 2000). Στον πυρήνα λαμβάνει χώρα αλληλεπίδραση με ποικίλες άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες (J. Massague et al 2000, P. ten Dijke et al 2000 M. P. de Caestecker et al 2000) (partner proteins) και σύνδεση του συμπλέγματος με το DNA (εικόνα 14). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες (partner proteins), καθορίζουν την ακριβή αλληλουχία του DNA πάνω στην οποία θα συνδεθεί το Smad σύμπλοκο (Massague J 2000).

Η Smad4 πρωτεΐνη έχει ρόλο μεταγραφικού ενεργοποιητή, οφειλόμενο στην MH2 περιοχή, αλλά μπορεί να συνδεθεί και άμεσα με το DNA. Αυτό γίνεται μέσω μιας δομής b-hairpin της MH1 περιοχής, η οποία αλληλεπιδρά με μία κοινή συνδετική αλληλουχία (CAGA) του DNA η οποία είναι γνωστή ως SBE (Smad Binding Element) και βρίσκεται στην περιοχή των υποκινητών πολλών γονιδίων –στόχων του TGF-beta (Wakefield M. L 2001). Αντίθετα, η πρωτεΐνη Smad2 στερείται αυτής της ικανότητας απευθείας σύνδεσης με το DNA, λόγω ενός επιπλέον εξονίου που διαθέτει στην περιοχή της b-hairpin. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα η σύνδεση μεταξύ DNA και MH1 περιοχής των R-Smad

να είναι χαμηλής συγγένειας (10^{-7} M). Επιπλέον, η σύνδεση αυτή στερείται ειδικότητας, αφού παρόμοιο βαθμό συγγένειας με τα Smad Binding Elements έχουν, εκτός από τη Smad 4, τα «ανασταλτικά» μέλη της οικογένειας, Smad 1 και Smad 3. Επομένως η αύξηση της συγγένειας της εν λόγω σύνδεσης είναι απαραίτητη και επιτυγχάνεται με την παρουσία πρωτεϊνών με ρόλο συν-ενεργοποιητών όπως ο p300 (Shi, Y. et al 1998) οι οποίες και προσφέρουν επιπρόσθετες θέσεις επαφής μεταξύ του Smad συμπλόκου και του DNA (εικόνα 14). Ανάλογα δε, με τον παράγοντα που προστίθεται κάθε φορά στο σύμπλοκο μπορεί να έχουμε ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του κυττάρου.

Όπως είναι φυσικό και όπως έχουμε διαπιστώσει επανειλημμένα με τη μελέτη της διαδικασίας της νεοπλασίας, το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών δεν είναι αποκομμένο και ανεξάρτητο από τα υπόλοιπα, λιγότερο ή περισσότερο μέχρι σήμερα γνωστά, μονοπάτια που σχετίζονται με την έναρξη και πρόοδο της νεοπλασίας στο κύτταρο. Αυτή η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω διαντίδρασης (cross-talk) με το μονοπάτι των MAPK, μέσω απενεργοποίησης του ογκογονιδίου c-myc και επαγωγής των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, και έτσι επιτυγχάνεται, διαφορετική κάθε φορά, TGF- β εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση (Attisano L et al 1994). Η πιο ενδιαφέρουσα και πιο καλά μελετημένη αλληλεπίδραση, είναι αυτή με το μονοπάτι των MAPK.

Έχει βρεθεί σε ανθρώπινους ινοβλάστες, ότι η «σύζευξη» (coupling) των δύο αυτών οδών, γίνεται μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης C (Wakefield M L et al 2001). Μάλιστα πιστεύεται ότι ο TGF-beta μπορεί να ενεργοποιήσει και τα τρία μονοπάτια των MAPK (ERK1,2, SAPK/JNK, p38) ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (MP de Caestecker 2000). Αν και η κυτταρική απόκριση στον TGF-beta, όπως προαναφέρθηκε ποικίλλει, το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ενδοκυττάρων υποστρωμάτων του, δηλαδή των Smad πρωτεϊνών είναι στις περισσότερες περιπτώσεις, το G1 arrest, το σταμάτημα δηλαδή του κυττάρου στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου.

SMAD4-SMAD2/3

Η Smad 4 πρωτεΐνη (Co- Smad) είναι το κύριο μόριο του ενδοκυττάριου μονοπατιού του TGF- β και κωδικοποιείται στους ανθρώπους από το γονίδιο 4 που χάνεται στο 50% των παγκρεατικών καρκινωμάτων (DPC4 : Deleted in Pancreatic Cancer) (MP de Caestecker 2000) και εδράζεται στο χρωμόσωμα 18q21.1146. Συχνή είναι η απώλεια της πρωτεΐνης και σε περιπτώσεις καρκίνου παχέος εντέρου (Miyaki M et al 1999) και ως εκ τούτου, έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο.

Εικόνα 15: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β (Massague J et al 2000)

Στο μαστό, οι Smad πρωτεΐνες εκφράζονται και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αμέσως μετά τη γέννηση, ενώ έχει βρεθεί ότι σχετίζονται και με τις αλλαγές του επιθηλίου που συντελούνται κατά τη γαλουχία (Jeruss, J S et al 2003). Πρέπει να τονίσουμε ότι η Smad 4 δεν είναι ειδικό

υπόστρωμα του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β αφού όπως προαναφέραμε, φτιάχνει σύμπλοκο και με τις BR-Smads. Ορισμένες μάλιστα μελέτες έχουν δείξει δράση του TGF- β ανεξάρτητη της Smad 4 (Iehara N et al 1996), πράγμα που μπορεί να υποδηλώνει ενεργοποίηση των AR-Smad απουσία της Smad 4. Στον *Xenopus* έχει βρεθεί μια πρωτεΐνη παρόμοια λειτουργικά με τη Smad 4, η xSmad4b, που ίσως βρεθεί να έχει όμοια λειτουργία και στον άνθρωπο. Τέλος να σημειώσουμε ότι ο ρόλος της Smad 4 είναι σαφώς η ρύθμιση της μεταγραφής και όχι η μετάδοση σήματος (Hong SW et al 2001), ενώ έχει βρεθεί να ενεργοποιείται και από παράγοντες όπως ο TNF- α και ο NF- κ b, καθώς και από τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Wakefield et al 2001)

Οι λειτουργικές περιοχές της Smad4 φαίνονται στην εικόνα 16.

Εικόνα 16: Λειτουργικές περιοχές του μορίου της πρωτεΐνης Smad 4 Miyazono K et al 2001).

Οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα μεταξύ τους, ωστόσο διαφέρουν στην ικανότητα τους να συνδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Miyazono et al 2000). Η Smad 2 κατά την πρόιμη εμβρυογένεση είναι ο κύριος μεταγωγός σήματος της

Activin ενώ η Smad3 κατέχει σπουδαίο ρόλο στην TGF- β σηματοδότηση, όσον αφορά στην κυτταρική αύξηση και κινητικότητα καθώς και την ανοσολογική απόκριση σε ώριμους ιστούς. Η Smad3 εξάλλου, έχει βρεθεί μεταλλαγμένη σε ποντίκια με μεταστατικά καρκινώματα παχέος εντέρου (Zhu Y et al 1998). Πάντως σε πρόσφατες έρευνες (Miyazono et al 2003) έχειδειχτεί ότι και οι δύο πρωτεΐνες ενεργοποιούνται από τον TGF- β ενώ δομικά, δεν είναι εύκολη η διάκριση τους με τις συνήθεις μεθόδους.

Οι Smad 1,2,3,4 εμφανίζουν μοριακές αλληλεπιδράσεις με τον ER- α οι οποίες πιθανώς είναι σημαντικές στην ελεγχόμενη από τον TGF- β ρύθμιση της σηματοδότησης του ER- α (Matsuda, T., et al 2001, Yamamoto T et al 2002). Πιο αναλυτικά, η Smad4 ενσωματώνεται στο σύμπλοκο που σχηματίζει ο ER- α με το DNA ασκώντας κατασταλτική δράση στη γονιδιακή ρύθμιση είτε άμεση (δομική), είτε έμμεση, στρατολογώντας άλλους συν-καταστολείς (co-repressors), που συνδέονται στο σύμπλοκο και μπλοκάρουν την οιστρογονοεξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση.

Εκτός από το ότι η Smad4 καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού των ER, έχει επίσης βρεθεί ότι η αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων που επιτυγχάνεται με την ταμοξιφένη, διαμεσολαβείται από τον TGF- β (Pouliot, F et al 1999, Perry RR et al 1995)

Τέλος να σημειώσουμε ότι οι ανασταλτικές (inhibitory) Smads αναστέλλουν δυνητικά την όλη διαδικασία. Επαγόμενες δε από τον TGF- β αποτελούν σημείο αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης, σημαντικό για τη βιολογική απάντηση. Πιο συγκεκριμένα η Smad 7 ανταγωνίζεται τις R-Smad ως προς την πρόσβαση τους στον ενεργοποιημένο υποδοχέα T β RI, αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίησή τους (Jang CW et al 2002 Kawata Y, et al 2002, Kim RH, et al 2000).

Ανασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών έχουν επίσης ο EGF καθώς και η πρωτεΐνη Ras. Οι εν λόγω πρωτεΐνες, μέσω ενεργοποίησης της Erk Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (Kretzschmar M et al 1999 Labbe E, et al 1998, Lai CF et al 2000) φωσφορυλιώνουν τη συνδετική περιοχή των R Smad και έτσι τις απενεργοποιούν αναστέλλοντας τη μεταφορά τους στον πυρήνα. Έχουμε αναφέρει εξάλλου και την αυτοαναστολή των Smad πρωτεϊνών που αποδίδεται στην MH1 περιοχή και συνίσταται στην παρεμπόδιση του ετεροδιμερισμού τους απουσία συνδέτη. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, (Wakefield et al 2001), η αλληλεπίδραση των Smads με το μονοπάτι των MAPK σε πυρηνικό επίπεδο μπορεί να είναι και ενεργοποιητική. Και αυτό γιατί οι θέσεις σύνδεσης των Smad στον πυρήνα βρίσκεται κοντά στη θέση στην οποία προσδένεται ο AP-1 και είναι δυνατό οι συνδέσεις αυτές να ανταγωνίζονται ή να ενισχύουν η μια την άλλη (MP de Caestecker et al 2000)

Οι Smad πρωτεΐνες αποδομούνται ενδοκυττάρια μέσω του συστήματος της ουβικουΐτινης, και η αποδόμηση τους αυτή, πιστεύεται πως είναι ένας επιπλέον σημαντικός ρυθμιστής της δράσης τους.

Τέλος θα πρέπει να σημειώσουμε, ότι κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των Smad πρωτεϊνών κατέχουν και οι μικροσωληνίσκοι οι οποίοι είναι οι κυτταροπλασματικές θέσεις, στις οποίες «σκηνώνονται» οι Smad πρωτεΐνες. Έχειδειχτεί πως για την έναρξη της διαδικασίας ενεργοποίηση τους είναι απαραίτητη η αποσύνδεση τους από την τουμπουλίνη. Αν δε, για οποιοδήποτε λόγο υπάρξει διαταραχή της δομής της β -tubulin, μπορεί να έχουμε φωσφορυλίωση των Smad με επακόλουθη απρόσφορη ενεργοποίηση του καταρράκτη των αντιδράσεων και TGF- β -εξαρτώμενη, μεταγραφική απόκριση του κυττάρου, απουσία συνδέτη (Donc C et al 2000). Ένα από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα εμπλοκής των Smad πρωτεϊνών στη διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής, είναι στην MEN I όπου η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη menin «διακόπτει» τη σύνδεση της Smad3 στο DNA, με αποτέλεσμα απορρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και σχηματισμό όγκου (Cohen M et al 2003).

SKI ΠΡΩΤΕΪΝΗ.

Η πρωτεΐνη Ski ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά ως πρωτεΐνη τουavian Sloan Kettering ρετροϊού (v-ski) η οποία επάγει τη μεταμόρφωση εμβρυϊκών κυττάρων κοτόπουλου και ορτυκιού (Li Y, Turck 1986), καθώς και την τελική διαφοροποίηση μυϊκών ινών σε εμβρυϊκά κύτταρα ορτυκιού (Colmenares C 1989, 1991). υποδεικνύοντας

Στον άνθρωπο, η ομόλογη πρωτεΐνη είναι η c-ski (cellular ski), ενώ έχουν επίσης κλωνοποιηθεί η άμεσα σχετιζόμενη πρωτεΐνη c-SnoN (Ski-related Novel gene) και τρεις ισομορφές της (SnoN2, SnoI και SnoA). (Nomura T.1989., Pearson-White S 1993). Κι ενώ όπως προαναφέραμε όλα τα μέλη της οικογένειας φαίνεται να έχουν ογκογόνο δράση, υπάρχουν και πειράματα έχουν δείξει ότι ποντίκια με ετερόζυγη απώλεια της Ski πρωτεΐνης (Ski+/Ski-) είναι πιο ευάλωτα στη δημιουργία όγκου (Shinagawa T et al 2001) καθιστώντας έτσι τις πρωτεΐνες ιδιαιτέρως ενδιαφέρουσες για μοριακή μελέτη.

Η c-ski είναι πυρηνική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 728 αμινοξέα. Το αμινοτελικό της άκρο είναι υψηλά διατηρημένο, ενώ το καρβοξυτελικό έχει μικρή ομολογία μεταξύ των μελών της οικογένειας.(Luo Kunxin 2004).

Η ομόλογη περιοχή της Ski πρωτεΐνης (αμινοτελικό άκρο) είναι εκείνη που είναι αναγκαία και ταυτόχρονα ικανή για τη δραστηριότητα μεταμόρφωσης και διαφοροποίησης που έχει η πρωτεΐνη, ενώ το

καρβοξυτελικό άκρο της είναι αυτό που διαμεσολαβεί τον ομο- και ετερο- τριμερισμό της πρωτεΐνης. (Colmenares C et al 1989, 1991).

Επειδή όπως έχει βρεθεί, η πρωτεΐνη Ski δεν περιέχει κάποια περιοχή με ενδογενή καταλυτική δράση, πιστεύεται πως διαμεσολαβεί τη δράση της μέσω αλληλεπίδρασης με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες. (Luo Kunxin 2004)

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί, πως η πρωτεΐνη Ski είναι σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης που επάγεται από τον TFG-beta και από τις BMPs, μέσω της αλληλεπίδρασης με τις Smad πρωτεΐνες. (Luo K et al 1999, Xu W et al 2000)

Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται αυτή η εν λόγω ρύθμιση είναι μέσω σύνδεσης της Ski με τις πρωτεΐνες Smad2, Smad3 και Smad4 γεγονός που καταστέλλει την ικανότητα των Smad συμπλόκων να ενεργοποιούν την έκφραση γονιδίων στόχων του TGF-beta. (Sun Y 1999, Akiyoshi S. 1999)

Η περιοχή πρόσδεσης της Ski πρωτεΐνης με τη Smad4 (Smad binding domain) εντοπίζεται σε μια I αγκύλη που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 203 και 239 (αλληλουχία βάσεων GTCTAGAC) η οποία ενώνεται μέσω δεσμού υψηλής συγγένειας με την L3 αγκύλη της Smad4. Τρία υπολείμματα Trp της συγκεκριμένης αγκύλης είναι ειδικά για τη σύνδεση με τη Smad4 και λόγω της παρουσίας τους, δημιουργείται ένα

εντυπωσιακό δίκτυο δεσμών Van Der Waals που είναι η οδηγός δύναμη γι' αυτήν την, υψηλής συγγένειας, σύνδεση (Frederick JP 2002).

Επίσης στην αμινοτελική περιοχή της Ski και πιο συγκεκριμένα μεταξύ των αμινοξέων 16 και 40 εντοπίζεται η περιοχή σύνδεσης με τη Smad3. Με τη σύνδεση αυτή αποφράσσεται ο υδρόφοβος διάδρομος των R-Smads, η περιοχή δηλαδή με την οποία γίνεται η αλληλεπίδραση τους με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα (Frederick JP 2002).

Η επιφάνεια της Smad4 που συνδέεται με τη Ski αλληλεπικαλύπτεται με την περιοχή όπου γίνεται η σύνδεση με το φωσφορυλιωμένο άκρο των R-Smad, γεγονός που προκαλεί διάσπαση των ενεργών Smad συμπλόκων (εικόνα 17). Αυτός είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η Ski προκαλεί καταστολή της λειτουργίας των Smad πρωτεϊνών (Luo Kunxin 2004). Επίσης, έχει γίνει γνωστό πως η περιοχή με την οποία η Smad3 αλληλεπιδρά με τη Ski είναι ταυτόσημη με την περιοχή σύνδεσης της Smad πρωτεΐνης με τον συν-ενεργοποιητή p300.

Πρέπει ακόμη να τονιστεί ότι η Ski αλληλεπιδρά με άλλους συν-καταστολείς όπως είναι ο N-Cor (Nuclear Hormone receptor corepressor) και το σύμπλεγμα της δεακετυλάσης των ιστονών, HDAC (Histone Deacetylase Complex), τους οποίους φαίνεται να στρατολογεί μετά τη σύνδεση της με τα Smad σύμπλοκα (Nomura T 1999, Tokitoy F 1999).

Επιπλέον, ο μηχανισμός απενεργοποίησης της TGF-beta εξαρτώμενης κυτταρικής απόκρισης, μπορεί να είναι και μέσω στόχευσης από τη Ski

πρωτεΐνη του μονοπατιού του ρετινοβλαστώματος (επαγωγή του p21, αύξηση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης CDK2 και φωσφορυλίωση, με επακόλουθη απενεργοποίηση, του Rb) (Medrano et al 2003, Reed et al 2001). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα είτε να «απομονώνονται» οι Smad πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα είτε να γίνεται αδύνατη η πρόσβαση στο DNA λόγω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τέλος έχειδειχτεί ότι η Ski μπορεί να καταστέλλει και άμεσα τη σύνδεση των Smad συμπλόκων με το DNA μέσω παρεμβολής της στις θέσεις της μεταξύ τους συνδέσεως (Frederick et al 2002).

Εικόνα 17: Μηχανισμός ανασταλτικής δράσης των Ski και Sno πρωτεϊνών στην TGF-β εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα (Luo K 2004).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ

Η παρούσα μελέτη συμπεριέλαβε 146 ασθενείς με πορογενή καρκινώματα μαστού, εκ των οποίων 125 διηθητικά και 21 ενδοπορικά (in situ) καθώς και 8 ασθενείς με αλλοιώσεις άτυπης υπερπλασίας. Όλα τα 125 διηθητικά καρκινώματα ήταν σταδίου T1 και T2 με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες (T1,2N0M0 ή κλινικού σταδίου I και IIΑ αντίστοιχα). Για όλες τις προαναφερθείσες ασθενείς υπήρχαν διαθέσιμα δείγματα των νεοπλασματικών και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών σε κύβους παραφίνης. Οι ασθενείς και τα δείγματα που μελετήθηκαν προέρχονται από το Πανεπιστημιακό Γενικό νοσοκομείο Πατρών. Η προεγχειρητική χορήγηση χημειοθεραπείας αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού των ασθενών από τη μελέτη. Πέρα από τις πληροφορίες που ελήφθησαν από τις ιστολογικές εκθέσεις (μέγεθος του όγκου, βαθμός κακοηθείας, κατάσταση χειρουργικών ορίων) και από την ανασκόπηση των ιατρικών φακέλων για ανεύρεση στοιχείων σχετιζόμενων με την έκβαση της νόσου και την κλινική πορεία των ασθενών (διάστημα ελεύθερο νόσου, συνολική επιβίωση), έγινε επανεξέταση αντιπροσωπευτικών ιστολογικών τομών του όγκου, για καταγραφή του βαθμού διαφοροποίησης και του ιστολογικού υποτύπου.

ΜΕΘΟΔΟΣ: ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Επιλογή της μεθόδου

Η μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης μπορεί να γίνει με διάφορες ερευνητικές μεθόδους, βιοχημικές, ανοσολογικές ή μορφολογικές. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας που έχει ευρεία και επιτυχή εφαρμογή στον τομέα της διαγνωστικής και ερευνητικής Παθολογικής Ανατομικής και Μοριακής Ογκολογίας. Η επιλογή βασίστηκε στα κάτωθι πλεονεκτήματα:

- Επιτρέπει τη μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών in situ στον υπό εξέταση ιστό. Το γεγονός αυτό, δίνοντας τα δυνατότητα εντόπισης των πρωτεϊνών (είδος κυττάρου, μεμβρανική πυρηνική ή κυτταροπλασματική ανοσοχρώση) και άμεσης συσχέτισης της πρωτεϊνικής έκφρασης με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά (μορφολογία των καρκινικών κυττάρων, βαθμός κακοηθείας, παρουσίας διηθητικού στοιχείου) συμβάλλει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το μηχανισμό δράσης των πρωτεϊνών και το ρόλο τους στην παθογένεια της συγκεκριμένης νόσου.
- Είναι ευαίσθητη και ειδική μέθοδος καθώς στηρίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου-αντισώματος
- Είναι σχετικά γρήγορη, απλή και οικονομική
- Δίνει μόνιμα αποτελέσματα, επιτρέποντας την επανεκτίμηση τους και τέλος

- ο Η εφαρμογή της σε μονιμοποιημένους ιστούς δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλου αριθμού περιστατικών σε σύντομο χρόνο καθώς και τη διεξαγωγή αναδρομικών μελετών

Βασικές αρχές ανοσοϊστοχημείας.

Η ανοσοϊστοχημεία βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντισωμάτων (μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών) σε ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια αντιγόνα που βρίσκονται *in situ* στον υπό μελέτη ιστό. Η ανίχνευση των θέσεων δέσμευσης γίνεται με τη χρήση είτε φθορίζόντων μορίων (ανοσοφθορίζουσες τεχνικές) είτε, συνηθέστερα, με τη χρήση ενζυμικής χρωμογόνου αντίδρασης (ανοσοενζυμικές τεχνικές).

Στις ανοσοενζυμικές τεχνικές το ένζυμο που κυρίως χρησιμοποιείται για τη σήμανση των αντισωμάτων είναι η υπεροξειδάση. Άλλα ένζυμα (αλκαλική φωσφατάση, οξειδάση γλυκόζης) χρησιμοποιούνται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις ιστών (π.χ. ιστοί με άφθονη ενδογενή υπεροξειδάση) ή σε ταυτόχρονη ανίχνευση δύο διαφορετικών αντιγόνων (double immunostaining). Η υπεροξειδάση καταλύει, παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων, τη διάσπαση του υπεροξειδίου σε νερό και οξυγόνο. Ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται ουσίες οι οποίες οξειδούμενες, παράγουν χρώμα (χρωμογόνα). Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο χρωμογόνο στην ανοσοϊστοχημεία είναι η 3,3

τετραυδροχλωρική διάμινο-βενζιδίνη (DAB) που, κατά την οξείδωση της, παράγει ένα σκούρο καφέ χρώμα.

Οι τεχνικές ανοσοϋπεροξειδάσης διακρίνονται σε άμεσες (σημασμένο πρωτογενές αντίσωμα), και έμμεσες τριών βημάτων. Στην τελευταία κατηγορία ανήκει η μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP), η μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC) και η μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης (BSA).

Η έμμεση μέθοδος τριών βημάτων βιοτίνης-στρεπταβιδίνης είναι η ανοσοϊστοχημική τεχνική με την ευρύτερη εφαρμογή καθώς σε σύγκριση με τις άμεσες ή τις έμμεσες δύο βημάτων, επιφέρει μεγαλύτερη ενίσχυση της έντασης του σήματος, ενώ σε σχέση με τις υπόλοιπες έμμεσες, τριών βημάτων, τεχνικές εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και μικρότερου βαθμού μη ειδική χρώση. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της βιοτίνης να συνδέεται ειδικά, ισχυρά και μη ανοσολογικά με τη στρεπταβιδίνη, μια πρωτεΐνη του βακτηρίου *streptomyces avidini*. Όπως σε όλες τις μεθόδους τριών βημάτων χρησιμοποιούνται τα εξής αντιδραστήρια:

- ✓ Το πρώτο αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για το υπό ανίχνευση αντιγόνο
- ✓ Το δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (link) το οποίο αναγνωρίζει το πρώτο και συνδέεται με αυτό και

- ✓ Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (label), που συνδέεται με το δεύτερο αντίσωμα. Οι θέσεις δέσμευσης γίνονται κατόπιν ορατές με την προσθήκη του χρωμογόνου DAB.

Βασικά βήματα της τεχνικής που συνολικά αποσκοπούν στην, κατά το δυνατό βελτίωση της έντασης της χρώσης, με το μικρότερο βαθμό μη ειδικής χρώσης (background), είναι η κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης των ιστών, η πρωτεϊνική δέσμευση (blocking) πριν την προσθήκη του πρώτου αντισώματος για τη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης και η επιλογή της κατάλληλης αραίωσης και των κατάλληλων συνθηκών επώασης του ειδικού αντισώματος. Επίσης, επειδή πολλές φορές η διαδικασία μονιμοποίησης του ιστού προκαλεί συγκάλυψη των αντιγονικών θέσεων δέσμευσης (antigen masking), με αποτέλεσμα την αδυναμία ανίχνευσης τους, σημαντική είναι η εφαρμογή κάποιας μεθόδου ανάδειξης των αντιγονικών επιτόπων (antigen epitope retrieval). Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ανάδειξης των επιτόπων είναι, ανάλογα με το αντίσωμα, η πέψη του ιστού με πρωτεολυτικά ένζυμα ή η θέρμανση του σε φούρνο μικροκυμάτων.

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η υποκειμενικότητα στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων που μπορεί να υπερπηδηθεί είτε με την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων από περισσότερους του ενός

ανεξάρτητους εκτιμητές είτε με τη χρήση συστημάτων ψηφιακής ανάλυσης και ποσοτικοποίησης της ιστοπαθολογικής εικόνας.

Προετοιμασία ιστών

Τα δείγματα των ιστών αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 10% και στη συνέχεια εγκλείσθηκαν σε κύβους παραφίνης. Από τον επιλεγμένο για κάθε περιστατικό κύβο, ελήφθησαν τομές πάχους 5μm. Ακολούθησε μεταφορά των τομών σε έτοιμες προς χρήση αντικειμενοφόρους πλάκες.

Στη συνέχεια έγινε αποπαραφίνωση των τομών με τη χρήση ξυλόλης (10 min x2) και ενυδάτωσή τους σε κατιούσα αλκοολών:

Αλκοόλη 100 (5 min X 2)

Αλκοόλη 96 (2 min X 1)

Αλκοόλη 80 (2 min X 1)

Αλκοόλη 70 (2 min X 1)

και ακολούθως σε απεσταγμένο νερό για 5 min.

Για την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων οι τομές επωάσθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων (5 min X 2), εντός ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού Na (500ml H₂O με 1.05 g κιτρικού Na) με pH 6,0. Ακολούθησε η διαδικασία της κατανάλωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης, με την εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα: 98% μεθανόλη και 2ml H₂O₂ 30% και ξέπλυμα (5 min X 3) με TBS (900

ml NaCl 0.9% +100ml Tris (500 ml H₂O με 3.05g Tris hydroxymethylo aminomethamin) με ph 7.6.

Το επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη του κατάλληλα αραιωμένου πρωτογενούς αντισώματος και η επώαση των τομών για 30'. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ER: mouse monoclonal antibody (Novocastra laboratories Ltd UK) σε αραιώση 1:100
- PR: mouse monoclonal antibody (Novocastra laboratories Ltd UK) σε αραιώση 1:100
- Anti-TGF-β-RII mouse polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Ink UK) σε αραιώση 1;100
- Anti-Smad4 : mouse monoclonal antibody (B-8) (Santa Cruz Biotechnology Ink UK) με αραιώση 1: 500
- Anti-pSmad 2/3 : mouse monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology Ink UK) με αραιώση 1: 500
- Anti-Ski: rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) σε αραιώση 1:100

Μετα το ξέπλυμα του αντισώματος (X 3) με TBS, αντί προσθήκης δεύτερου και τρίτου αντισώματος (link και label) χρησιμοποιήθηκε το

Envision detection kit της Dako (δεξτράνη συζευγμένη με αντίσωμα αιγός έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικίου και κουνελιού).

Ακολούθησε έκπλυση με TBS και προσθήκη του χρωμογόνου DAB στο οποίο οι τομές επωάσθηκαν για 5’

Ανοσοϊστοχημική εκτίμηση.

Μετά την ολοκλήρωση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, ανεξάρτητα από δύο παθολογοανατόμους.

Η χρώση για τους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς αξιολογήθηκε ως θετική όταν ποσοστό πάνω από 5% των νεοπλασματικών κυττάρων εμφάνιζαν σαφή πυρηνική ανοσοχρώση.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες TβRII, Smad2/3p, Smad4 και Ski για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ελήφθησαν υπόψιν δύο παράγοντες

- Η ένταση της χρώσης (ασθενής ή έντονη)
- Το ποσό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων.

Με βάση τις παραπάνω παραμέτρους:

ως αρνητική (score 0) ελήφθη η χρώση ποσοστού μικρότερου του 5% των νεοπλασματικών κυττάρων ανεξαρτήτως εντάσεως,

ως ασθενώς θετική (score 1) η ασθενής (+) ή έντονη (++), (+++)

ανοσοθετικότητα ποσοστού 5 – 40% των νεοπλασματικών

κυττάρων ή η ασθενής ανοσοχρώση (+) ποσοστού μεγαλύτερου του 40% αυτών και τέλος,

ως ισχυρώς θετική (score 2) θεωρήθηκε η έντονη ανοσοχρώση (+++) σε περισσότερο από το 40% των νεοπλασματικών κυττάρων.

Για την πρωτεΐνη TbRII η εντόπιση της χρώσης ήταν κυρίως κυτταροπλασματική ενώ σε μικρό ποσοστό παρατηρήθηκε και μεμβρανική ανοσοχρώση.

Το χρησιμοποιηθέν αντίσωμα για την πρωτεΐνη pSmad 2/3 είχε τις εξής ιδιαιτερότητες: πρώτον αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης και δεύτερον στερείται ειδικότητας ως προς συγκεκριμένο μόριο αφού αντιδρά και με τις δύο BR-Smads, δηλαδή τη Smad2 και τη Smad3 οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό δομική ομολογία. Το συγκεκριμένο αντίσωμα, όπως ήταν εξάλλου αναμενόμενο, εμφάνισε αμιγώς πυρηνική ανοσοέκφραση ενώ στην περίπτωση της Smad4 η παρατηρηθείσα ανοσοχρώση αφορούσε τόσο τον πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων. Τέλος στην πρωτεΐνη Ski αναγνωρίστηκε κυρίως κυτταροπλασματική και κοκκιώδης ανοσοαντίδραση αν και σε ορισμένα δείγματα ιστών παρατηρήθηκε συνοδός ή ακόμη και αποκλειστική πυρηνική ανοσοθετικότητα.

Ως control χρησιμοποιήθηκε ο παρακείμενος, σε διάφορες ιστολογικές τομές, φυσιολογικός ιστός τόσο για τους ορμονικούς υποδοχείς όσο και για τις πρωτεΐνες Smad, Ski και τον TβRII. Επιπλέον, για τη Smad 4, χρησιμοποιήθηκαν τομές από παγκρεατικά καρκινώματα στα οποία έχει βρεθεί συχνή απώλεια έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Για τον ίδιο λόγο, για την πρωτεΐνη pSmad2/3 χρησιμοποιήθηκαν ως control τρεις τομές καρκινώματος παχέος εντέρου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 26 έως 80 έτη (διάμεση ηλικία 55 έτη). Όλες οι ασθενείς με καρκίνο είχαν αντιμετωπιστεί χειρουργικά με ολική ή μερική μαστεκτομή και λεμφαδενικό καθαρισμό της σύστοιχης μασχάλης. Σε 46 από τις 146 ασθενείς (ποσοστό 32,2%), εφαρμόστηκε συντηρητική χειρουργική επέμβαση, ενώ οι υπόλοιπες 99 (67,8%) υποβλήθηκαν σε τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή. Σε όλες τις περιπτώσεις τα εγχειρητικά όρια ήταν ελεύθερα νόσου. Ο διάμεσος αριθμός λεμφαδένων που εξετάστηκαν παθολογοανατομικά στις περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων, ήταν 13 (εύρος 6-24). Για τα διηθητικά καρκινώματα, η μέγιστη διάμετρος του πρωτοπαθούς όγκου κυμαινόταν μεταξύ 1 και 5 εκ (διάμεση τιμή 2.6), ενώ σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM ο όγκος ήταν σταδίου T₁ σε 46 από

τα 125 περιστατικά (ποσοστό 36,5%) και T2 σε 79 περιπτώσεις (ποσοστό 63,5%).

Για κάθε περίπτωση μελετήθηκαν από 1 έως 5 ιστολογικές τομές. Στον πίνακα 1, συνοψίζονται τα ποσοστά των in situ και διηθητικών καρκινωμάτων σε σχέση με το βαθμό κακοηθείας.

Όσον αφορά στο βαθμό διαφοροποίησης των διηθητικών καρκινωμάτων 24 ήταν grade I (ποσοστό 19,5%), 71 ήταν Grade II (ποσοστό 56,1%), 30 ήταν Grade III (ποσοστό 24,4%).

type * Grade Crosstabulation						
			Grade			Total
			gradeI	gradeII	gradeIII	
type	insitu	Count	8	0	13	21
		% within type	38,1%	,0%	61,9%	100,0%
		% within Grade	25,0%	,0%	30,2%	14,4%
		% of Total	5,5%	,0%	8,9%	14,4%
	ductal	Count	24	71	30	125
		% within type	19,2%	56,8%	24,0%	100,0%
		% within Grade	75,0%	100,0%	69,8%	85,6%
		% of Total	16,4%	48,6%	20,5%	85,6%
Total	Count		32	71	43	146
	% within type		21,9%	48,6%	29,5%	100,0%
	% within Grade		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% of Total		21,9%	48,6%	29,5%	100,0%

Πίνακας 1: Ποσοστό Grade I, II, III στα in situ και διηθητικά καρκινώματα.

Το καρκίνωμα ήταν πορογενές μη ειδικού τύπου σε 102 περιπτώσεις, ενώ υπήρχαν 9 βλεννώδη, 4 σωληνώδη, 3 μυελοειδή και 2 αποκρινή. Όσον αφορά στα in situ (ενδοπορικά) καρκινώματα, έγινε διάκριση σε Low και High Grade με βάση τα κριτήρια που περιλαμβάνονται στην “Pathology reporting of breast disease” του Ιανουαρίου του 2005. Σύμφωνα με αυτά

ελήφθη υπόψιν η πυρηνική πλειομορφία (μέγεθος, όρια πυρήνα, κατανομή χρωματίνης, πυρήνιο), ο αριθμός των μιτώσεων καθώς και η παρουσία άτυπων μιτώσεων και τέλος η παρουσία ή η απουσία νέκρωσης. Από τα ενδοπορικά καρκινώματα 8 (38,1%) ήταν low Grade (βαθμολογήθηκαν ως Grade 1 κατά τη στατιστική ανάλυση) και 13 (61,9%) ήταν High Grade (βαθμολογήθηκαν ως Grade 3 κατά τη στατιστική ανάλυση) (πίνακας 1).

Τέλος για τις περιπτώσεις άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας, τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για να συμπεριληφθούν στη μελέτη ήταν από την ίδια αναφορά (“Pathology reporting of breast disease”) και βασίστηκαν τόσο στα ποιοτικά (ομοιόμορφα κύτταρα και κατανομή, σχηματισμός αυλών άκαμπτων ή tapering, υπερχρωματικοί πυρήνες και τέλος, ηθμοειδής μικροθηλώδης ή συμπαγής τρόπος ανάπτυξης), όσο και στα ποσοτικά κριτήρια (εστίες μικρότερες από 2-3 mm).

Μετά από ένα διάμεσο διάστημα παρακολούθησης 96 μηνών (εύρος από 70 έως 126), 47 από τις ασθενείς με τα διηθητικά καρκινώματα εμφάνισαν τοπική υποτροπή ή απομακρυσμένες μεταστάσεις από τις οποίες οι 31 απεβίωσαν.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της έκφρασης των συγκεκριμένων μορίων σε καρκινώματα πρώιμου σταδίου (ενδοπορικά καθώς και διηθητικά σταδίου I και IIa) καθώς και σε περιπτώσεις άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας που θεωρείται ένας από τους παράγοντες

αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Και αυτό γιατί, αφενός μειώνοντας τις μεταβλητές (πορογενή καρκινώματα, αρχικού σταδίου, μεγέθους μικρότερου από 5 εκ, με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τη στιγμή της διάγνωσης) μπορούμε να έχουμε πιο ασφαλή και εμπεριστατωμένα συμπεράσματα για την επίδραση άλλων παραγόντων στην έκβαση των ασθενών (στη συγκεκριμένη περίπτωση την έκφραση των μορίων που εμπλέκονται στον καταρράκτη αντιδράσεων του TGF-beta). Ο λόγος δε, για τον οποίο συμπεριλάβαμε τις περιπτώσεις *in situ* καρκινωμάτων καθώς και άτυπης υπερπλασίας, ήταν για να διαπιστωθεί αν και κατά πόσο κάποια μοριακά συμβάντα λαμβάνουν χώρα στα αρχικά στάδια της κακοήθους εξαλλαγής και συνεπώς στην έναρξη της νεοπλασίας, ή η απορρύθμιση τους είναι όψιμο κυτταρικό γεγονός. Ειδικά για τα μόρια που μελετήθηκαν υπήρχαν αρκετές αντικρουόμενες απόψεις στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, κάτι που έκανε ακόμη πιο δελεαστική την αναζήτηση ενδείξεων για τον τρόπο δράσης τους και στοιχείων που να τεκμηριώνουν τη συμβολή τους στην εκτροπή του κυττάρου από το φυσιολογικό του κύκλο με αποτέλεσμα την εκδήλωση ενός κακοήθους φαινοτύπου.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS13 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Εκτός από την ηλικία των ασθενών και τους μήνες επιβίωσης που ήταν συνεχόμενα αριθμητικά δεδομένα, όλα τα υπόλοιπα ήταν ποιοτικά (qualitative data) και ordinal. Γι αυτό το λόγο , σε όλες τις συσχετίσεις της ανοσοέκφρασης τόσο των διαφόρων πρωτεϊνών μεταξύ τους όσο και με τις διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, χρησιμοποιήθηκε το chi square test.

Για τη μελέτη της συσχέτισης των διαφόρων μορίων με την επιβίωση των ασθενών χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη επιβίωσης Kaplan- Meier (product limit method). Το ελεύθερο νόσου διάστημα (Distant Disease Free Survival) υπολογίστηκε από τη μέρα της διάγνωσης έως το χρονικό σημείο εκδήλωσης απομακρυσμένης μεταστάσεως ή θανάτου, αναλόγως με το ποιο από τα δύο συμβάντα αναγνωρίστηκε πρώτο. Πολυπαραγοντική ανάλυση έγινε με τη χρήση της Cox Regression analysis εισάγοντας ως συν-μεταβλητές: την παρουσία ή απουσία έκφρασης των μελετηθέντων μορίων (θετικό versus αρνητικό), την ηλικία των ασθενών (αριθμητική μεταβλητή), το μέγεθος του όγκου (<2εκ, versus 2-5εκ) το βαθμό κακοηθείας (Grade 1 versus Grade 2, versus Grade 3). Η Cox regression διεξήχθη χρησιμοποιώντας την ανάδρομη επιλογή (backward stepwise selection) των μεταβλητών. Από

την ίδια ανάλυση υπολογίστηκε και το $\exp(B)$ δηλαδή το ανάλογο του Odd's ratio, που υποδηλώνει το σχετικό κίνδυνο ενός συμβάματος (θανάτου ή μετάστασης) σε σχέση με την παρουσία μιας μεταβλητής.

Η επιβίωση των υποομάδων ασθενών ελέγχθηκε με το log rank test. Το binary logistic regression model χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί η σχετική σημασία της έκφρασης των διαφόρων μορίων ως προς τη δυνατότητα πρόβλεψης της υποτροπής της νόσου (απομακρυσμένη μετάσταση) ή ακόμη και το θάνατο των ασθενών. Όλα τα στατιστικά τεστ ήταν δύο κατευθύνσεων (two-sided).

Προκειμένου να εκτιμήσουμε τη σημαντικότητα και την ακρίβεια των διαφορών σε όλες τις αναλύσεις, υπολογίστηκε για κάθε μια από αυτές το 95% Διάστημα Εμπιστοσύνης (95%- Confidence Interval).

Σε κάθε περίπτωση, το p που ήταν μικρότερο από 0,05 θεωρήθηκε στατιστικώς σημαντικό.

ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Τα συνολικά αποτελέσματα για όλα τα περιστατικά και όλα τα μόρια συνοψίζονται στον πίνακα 2.

	Διηθητικά καρκινώματα	Insitu καρκινώματα	Άτυπη υπερπλασία
ER+	84(67,2%)	21(100%)	8 (100%)
ER-	41(32,8%)	-	-
PR+	74(59,2%)	13(61,9%)	8 (100%)
PR-	51 (40,8%)	8(38,1%)	-
TbRII-	68(54,4%)	13(61,9%)	5(62,5%)
TbRII+	39(31,2%)	7(33,3%)	1(12,5%)
TbRII++	18(14,4%)	1(4,8%)	2(25%)
PSmad2/3-	56(44,8%)	10(47,6%)	3(37,5%)
PSmad2/3+	50(40%)	5(23,8%)	4(50%)
PSmad2/3++	19(15,2%)	6(28,6%)	1(12,5%)
Smad4-	56(44,8%)	9(42,9%)	3(37,5%)
Smad4+	51(40,8%)	7(33,3%)	3(37,5%)
Smad4++	18(14,4%)	5(23,8%)	2(25%)
Ski-	38(30,4%)	12(57,1%)	5(62,5%)
Ski+	55(44%)	8(38,1%)	3(37,5%)
Ski++	32(25,6%)	1(4,8%)	-

Πίνακας 2 Ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα όλων των περιστατικών για τις μελετηθείσες πρωτεΐνες.

Οιστρογονικοί και προγεστερονικοί υποδοχείς.

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα για τους ER και PR συνοψίζονται στους πίνακες 3 και 4 ενώ στις εικόνες 1 και 2 παρουσιάζονται περιπτώσεις θετικής ανοσοέκφρασης όγκων, τόσο για τους οιστρογονικούς όσο και για τους προγεστερονικούς υποδοχείς. Όπως προαναφέραμε, η χρώση για τους ορμονικούς υποδοχείς είναι πυρηνική και είχαμε σαφή πυρηνική έκφραση και στο παρακείμενο, μη νεοπλασματικό, επιθήλιο τόσο των πόρων όσο και των λοβίων (θετικό εσωτερικό control).

ER * type Crosstabulation

			type			Total
			insitu	ductal	hyperplasia	
ER	negative	Count	0	41	0	41
		% within type	,0%	32,8%	,0%	26,6%
	positive	Count	21	84	8	113
		% within type	100,0%	67,2%	100,0%	73,4%
Total	Count	21	125	8	154	
	% within type	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 3: Ποσοστό έκφρασης του ER στα διηθητικά, ενδοπορικά καρκινώματα και στις περιπτώσεις άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας

PR * type Crosstabulation

			type			Total
			insitu	ductal	hyperplasia	
PR	negative	Count	8	51	0	59
		% within type	38,1%	40,8%	,0%	38,3%
	positive	Count	13	74	8	95
		% within type	61,9%	59,2%	100,0%	61,7%
Total		Count	21	125	8	154
		% within type	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Πίνακας 4: Ποσοστά έκφρασης του PR στα μελετηθέντα περιστατικά

Από τα 156 μελετηθέντα περιστατικά, θετική ανοσοέκφραση για τον ER είχαμε σε 84 περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων (ποσοστό 67,2%), καθώς και σε όλα τα δείγματα των ενδοπορικών καρκινωμάτων και της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας. Για τον PR, 74 από τα 125 διηθητικά καρκινώματα (ποσοστό 59,2%), επέδειξαν θετική ανοσοχρώση 13 από τα 21 in situ καρκινώματα (61,9%) καθώς και όλες οι περιπτώσεις άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας.

Η έκφραση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων ελέγχθηκε με τη χρήση του chi square test σε σχέση τόσο με το Grade και την επιβίωση, όσο και με την έκφραση των πρωτεϊνών TβRII, Smad2/3p, Smad4 και Ski. Αναδείχτηκε στατιστικώς σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του ER και της Ski πρωτεΐνης ($p < 0,001$ Pearson's $r = -0,306$) καθώς και μεταξύ ER και TβRII ($p = 0,035$, Pearson's $r = -0,170$). Όσον αφορά στη συσχέτιση με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, «οριακή» (borderline) αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων και θανάτου των ασθενών ($p = 0,058$, Pearson's $r = -0,158$). Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση βρέθηκε, όπως αναμενόταν, στην έκφραση των ορμονικών υποδοχέων ER και PR μεταξύ τους ($P < 0,001$, Pearson's $r = 0,371$)

Εικόνα 1 : Θετική ανοσοέκφραση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον οιστρογονικό υποδοχέα (ER)

Εικόνα 2: Θετική ανοσοέκφραση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον προγεστερονικό υποδοχέα (PR)

TbRII.

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα για τον TbRII απεικονίζονται στον πίνακα 3. Πρέπει να πούμε ότι ο TbRII ήταν παρών, αν και σε μικρά ποσά, στο επιθήλιο των πόρων και των λοβίων ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε κάποια ανοσοαντίδραση και σε φλεγμονώδη κύτταρα, ευρήματα που συνάδουν με τα αναφερόμενα σε άλλες μελέτες περί ανοσοθετικότητας του στην πλειοψηφία των φυσιολογικών κυττάρων και ιστών (Wakefield et al 2001). Σε αρκετά δείγματα, η ανοσοαντίδραση του επιθηλίου των λοβίων και των μικρών ενδολόβιων πόρων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του επιθηλίου των μεγάλων πόρων. Ωστόσο έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης δεν παρατηρήθηκε στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα (εικόνα 3). Τα αποτελέσματα της ανοσοέκφρασης για τον TbRII συνοψίζονται στον πίνακα 5.

TbRII * type Crosstabulation

			type			Total
			insitu	ductal	hyperplasia	
TbRII	negative	Count	13	68	5	86
		% within type	61,9%	54,4%	62,5%	55,8%
	weakly positive	Count	7	39	1	47
		% within type	33,3%	31,2%	12,5%	30,5%
	strongly positive	Count	1	18	2	21
		% within type	4,8%	14,4%	25,0%	13,6%
Total	Count	21	125	8	154	
	% within type	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 5: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του TbRII στα μελετηθέντα περιστατικά.

Πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι, για τις πρωτεΐνες TβRII, pSmad2/3, Smad4 και Ski η βαθμολογία της ανοσοαντίδρασης έγινε με τη χρήση κλίμακας από 0 έως 2+ όπως προαναφέρθηκε (αρνητική, ασθενώς θετική, έντονα θετική). Εξαιτίας της έλλειψης εμπειρίας ως προς τον ουδό θετικότητας των εν λόγω μορίων όλες οι συσχετίσεις έγιναν και με κριτήριο τη θετικότητα του 5% των νεοπλασματικών κυττάρων χωρίς κλιμάκωση. Σε λίγες περιπτώσεις, ωστόσο, αυτό επέφερε διαφορετικό αποτέλεσμα (όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο) και φυσικά επισημαίνεται στην αναφορά των αποτελεσμάτων.

Ασθενώς θετική ανοσοαντίδραση (score1+) για τον TβRII παρατηρήθηκε σε 39 από τα 125 διηθητικά καρκινώματα (ποσοστό 31,2%) ενώ έντονη ανοσοαντίδραση (score 2+) αναγνωρίστηκε σε 18 περιπτώσεις (ποσοστό 14,4% των διηθητικών καρκινωμάτων). Από τα in situ καρκινώματα, 7 ήταν ασθενώς και 1 έντονα θετικό (ποσοστό 33,3 και 4,8% αντίστοιχα), ενώ από τις περιπτώσεις της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας 1(12,5%) εμφάνισε ασθενή (1) και 2 (25%) έντονη ανοσοέκφραση για τον εν λόγω παράγοντα (εικόνες 3,4).

Εικόνα 3: Έκφραση του TbRII σε ένα φυσιολογικό πόρο, σε περίπτωση υπερπλασίας, σε *in situ* καρκίνωμα

Εικόνα 4: Παράδειγμα ασθενούς και έντονης ανοσοέκφρασης του TbRII σε περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων.

Ως προς τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, οριακή αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ έκφρασης του TβRII και έκφρασης οιστρογονικών υποδοχέων όπως προηγούμενα αναφέρθηκε ($p=0,058$, Pearson's $r=-0,158$).

Η έκφραση του TβRII αποδείχτηκε ότι έχει στατιστικώς σημαντική σχέση με την έκφραση της Ski πρωτεΐνης ($p=0,04$, ($p=0,058$, Pearson's $r=0,231$).

Ακόμη η έλλειψη ανοσοθετικότητας των νεοπλασματικών κυττάρων στα διηθητικά καρκινώματα στο συγκεκριμένο παράγοντα, εμφάνισε

σημαντική συσχέτιση με την εμφάνιση αιματογενών μεταστάσεων ($p=0,017$, Pearson's $r = -0,220$) (Πίνακας 6, Γράφημα1) Έτσι το DDFS ήταν σημαντικά μικρότερο σε ασθενείς με απώλεια έκφρασης του υποδοχέα, (88 μήνες με διάστημα εμπιστοσύνης 95% από 73-103) σε σχέση με τους ασθενείς με θετικό ΤβRII(110 μήνες με 95%CI από 95-126 μήνες).

metastases * TbRII Crosstabulation

			TbRII			Total
			negative	weakly positive	strongly positive	
metastases	non blood metastases	Count	34	23	12	69
		% within TbRII	50,7%	67,6%	80,0%	59,5%
	blood metastases	Count	33	11	3	47
		% within TbRII	49,3%	32,4%	20,0%	40,5%
Total	Count	67	34	15	116	
	% within TbRII	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 6 Έκφραση του ΤβRII σε σχέση με την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων

Bar Chart

Γράφημα 1. ποσοστά έκφρασης του ΤβRII στους όγκους των ασθενών που δεν εμφάνισαν, (non blood metastases) και σε αυτούς που εμφάνισαν απομακρυσμένες μεταστάσεις (blood metastases)

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ απώλειας του υποδοχέα και θανάτου από τη νόσο ($p=0,035$) με μέση επιβίωση 107 μήνες (95% CI από 93-121) στους αρνητικούς και 123 μήνες (95% CI από 110-136) στους θετικούς για την πρωτεΐνη όγκους.

Καμπύλη Kaplan-Meier 1: Συσχέτιση της παρουσίας θετικής ΤβRΠ ανοσοέκφρασης και επιβίωσης των ασθενών.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την έκφραση του τόσο στα ενδοπορικά όσο και στα διηθητικά καρκινώματα, ανευρέθη στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ της απώλειας έκφρασης του ΤβRΠ και του βαθμού κακοηθείας των όγκων ($p=0,029$, Pearson's $r=-0,181$)

Τέλος, δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του TβRII με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό υπότυπο, την παρουσία διηθητικού στοιχείου (διαφορά δηλαδή στην έκφραση μεταξύ των διηθητικών και *in situ* αλλοιώσεων), ούτε διαφορά στην έκφραση μεταξύ των περιπτώσεων καρκινωμάτων (τόσο *in situ* όσο και διηθητικών) και υπερπλασίας.

pSmad2/3

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα για την pSmad2/3 απεικονίζονται στον πίνακα 7. Πρέπει να πούμε ότι η πρωτεΐνη pSmad2/3 ήταν παρούσα, αν και σε μικρά ποσά, στο επιθήλιο των πόρων και των λοβίων ενώ ενίοτε παρατηρήθηκε κάποια ανοσοαντίδραση και σε κύτταρα του στρώματος (εικόνα 5). Απώλεια της έκφρασης της παρατηρήθηκε σε δύο από τα τρία περιστατικά αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα για την εν λόγω πρωτεΐνη, συνοψίζονται στον πίνακα 7.

Smad2p * type Crosstabulation

			type			Total
			insitu	invasiveductal	hyperplasia	
Smad2p	negative	Count	10	52	3	65
		% within type	47,6%	41,6%	37,5%	42,2%
	weakly positive	Count	5	54	4	63
		% within type	23,8%	43,2%	50,0%	40,9%
	strongly positive	Count	6	19	1	26
		% within type	28,6%	15,2%	12,5%	16,9%
Total	Count	21	125	8	154	
	% within type	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 7: Εκγραση της pSmad2/3 στα ενδοπορικά, διηθητικά καρκινώματα και στις περιπτώσεις άτυπης υπερπλασίας.

Η χρώση για την πρωτεΐνη pSmad2/3 ήταν πυρηνική (αφού το αντίσωμα αναγνωρίζει τη φωσφορυλιωμένη και συνεπώς ενεργοποιημένη μορφή της) και ήταν: ασθενώς θετική σε 50 και έντονα θετική σε 19 περιστατικά διηθητικών καρκίνων (ποσοστό 40 και 15,2% αντίστοιχα). Από τα ενδοπορικά καρκινώματα 5 (ποσοστό 23,8%) εμφάνισαν ασθενή και 6 (28,6%) έντονη ανοσοχρώση, ενώ από τα δείγματα της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας 4 ήταν ασθενώς και 1 έντονα θετικό (ποσοστά 50 και 12,5% αντίστοιχα).

Εικόνα 5: Ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pSmad2/3 σε φυσιολογικό πόρο, σε άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία και σε in situ και διηθητικό καρκίνωμα.

Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης pSmad2/3 και της πρωτεΐνης Smad4 ($p < 0,001$, Pearson's $r = 0,396$). Επιπλέον, η έκφραση της pSmad2/3 συνδυάστηκε με τη θετική έκφραση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον TβRII ($p < 0,001$, Pearson's $r = 0,293$). Παρατηρήθηκε επίσης αρνητική, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης (η συσχέτιση γίνεται πιο εμφανής αν χρησιμοποιήσουμε ως κριτήριο τη θετικότητα της πρωτεΐνης) και της εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων ($p = 0,004$, Pearson's

$r=-0,305$) Έτσι, το ελεύθερο νόσου διάστημα παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση από 111 μήνες (CI από 98-124) στις περιπτώσεις θετικής ανοσοέκφρασης της πρωτεΐνης, σε 80 μήνες (CI από 65-98) στα περιστατικά στα οποία δεν ανιχνεύτηκε pSmad2/3 ανοσοέκφραση (καμπύλη Kaplan-Meier 2)

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της απώλειας της pSmad2/3 ανοσοέκφρασης και της κυτταροπλασματικής θετικότητας των νεοπλασματικών κυττάρων για τη Ski πρωτεΐνη ($p=0,036$, Pearson's $r=0,289$). (Γράφημα 2)

Γράφημα 2: Συσχέτιση της απώλειας της pSmad2/3 και της κυτταροπλασματικής Ski ανοσοέκφρασης

Καμπύλη Kaplan-Meier 2: Συσχέτιση της έκφρασης pSmad2/3 και του διαστήματος ελεύθερου νόσου των ασθενών.

Καμπύλη Kaplan-Meier 3: Συσχέτιση του ποσοστού pSmad2/3 ανοσοθετικότητας με την επιβίωση των ασθενών στους όγκους υψηλής κακοηθείας (Grade2 και 3)

Στην ανάλυση υποομάδων ασθενών (subgroup analysis) αναδείχτηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του ποσοστού έκφρασης της pSmad2/3 με την επιβίωση των ασθενών τόσο στα Grade 2 και 3 διηθητικά καρκινώματα $p=0,028$ με μέσο χρόνο επιβίωσης 92 μήνες (CI από 73-111) για τα αρνητικά καρκινώματα, 108 μήνες (CI από 85-131) για τα καρκινώματα με ασθενή (+) pSmad2/3 ανοσοέκφραση και 120 μήνες (CI από 104-136) για τις περιπτώσεις με έντονα θετική pSmad2/3 ανοσοαντίδραση (καμπύλη Kaplan-Meier 3).

Το εντυπωσιακό ήταν ότι στις ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοηθείας διηθητικά καρκινώματα (Grade I) το ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης είχε **ανεξάρτητη** προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών και στην πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox Regression analysis), ($p=0.024$), λαμβάνοντας υπόψιν το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοηθείας και την έκφραση όλων των υπολοίπων πρωτεϊνών.

Όσον αφορά στην προβλεπτική αξία της έκφρασης της πρωτεΐνης τόσο για την εκδήλωση μετάστασης ή θανάτου των ασθενών, με τη χρήση του binary logistic regression model, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με καρκινώματα με απώλεια του εν λόγω μορίου, έχουν 3 φορές (Odd's ratio) μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν μετάσταση και 2,6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να πεθάνουν από τη νόσο σε σχέση με αυτές με έκφραση της pSmad2/3 στα κύτταρα του όγκου τους.

Smad 4

Η ανοσοαντίδραση για την πρωτεΐνη Smad 4 ήταν τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Σε ορισμένα περιστατικά, παρατηρήθηκε, ωστόσο και αμιγώς κυτταροπλασματική ή αμιγώς πυρηνική ανοσοαντίδραση. Η Smad 4 ήταν επίσης θετική στο, περιβάλλον τον όγκο φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα των λοβίων και λιγότερο στα κύτταρα των μεγάλων πόρων (εικόνα 6). Σε ένα από τα δύο παγκρεατικά καρκινώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της έκφρασης της Smad 4 ενώ σπάνια κύτταρα ήταν Smad 4 θετικά στη δεύτερη περίπτωση (<5%).

Τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα για την Smad 4 συνοψίζονται στον πίνακα 8.

Ασθενώς θετική έκφραση για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη παρατηρήθηκε σε 51 διηθητικά καρκινώματα (ποσοστό 40,8%) ενώ έντονα θετική ανοσοέκφραση παρατηρήθηκε σε 18 περιπτώσεις (ποσοστό 14,4%). Στα *in situ* καρκινώματα είχαμε 7 περιστατικά με ασθενή και 5 με έντονη ανοσοθετικότητα (ποσοστό 33,3 και 23,8% αντίστοιχα). Όσον αφορά στις περιπτώσεις υπερπλασίας, 3 επέδειξαν ασθενή (ποσοστό 37,5% και 2 έντονη ανοσοχρώση (ποσοστό 25%)

Εικόνα 6: Εκφραση της Smad4 πρωτεΐνης σε φυσιολογικό πόρο και λόβιο, καθώς και σε περίπτωση άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας.

Εικόνα 7: Παράδειγμα Smad4 ανοσοέκφρασης σε in situ καρκίνωμα καθώς και παραδείγματα ασθενούς και έντονης ανοσοέκφρασης σε διηθητικά καρκινώματα.

type * Smad4 Crosstabulation

			Smad4			Total
			negative	weakly positive	strongly positive	
type	insitu	Count	9	7	5	21
		% within Smad4	13,2%	11,5%	20,0%	13,6%
	invasiveductal	Count	56	51	18	125
		% within Smad4	82,4%	83,6%	72,0%	81,2%
	hyperplasia	Count	3	3	2	8
		% within Smad4	4,4%	4,9%	8,0%	5,2%
Total	Count	68	61	25	154	
	% within Smad4	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 8: Ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης Smad4 στα περιστατικά που μελετήθηκαν

Η ανοσοθετικότητα της Smad4, όπως προαναφέραμε συσχετίστηκε τόσο με τη θετική έκφραση της p Smad2/3 όσο και του TGF- β –R ($p < 0,001$ και Pearson's $r = 0,396$ στην πρώτη περίπτωση και $p = 0,001$ και Pearson's $r = 0,272$ στη δεύτερη). Στις περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων, αρνητική συσχέτιση προέκυψε μεταξύ έκφρασης Smad4 και εμφάνισης αιματογενών μεταστάσεων ($p = 0,026$, Pearson's $r = -0,184$). Το ελεύθερο νόσου διάστημα είχε και σε αυτήν την περίπτωση στατιστικώς σημαντική μείωση από 109 μήνες (CI από 95-123) σε ασθενείς με θετική Smad4 ανοσοέκφραση σε 85 μήνες (CI από 68-101) στα Smad4 αρνητικά καρκινώματα (καμπύλη Kaplan-Meier 1). Αναδείχτηκε επίσης σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας ανοσοθετικότητας της πρωτεΐνης Smad4 (στα διηθητικά καρκινώματα) και της επιβίωσης των ασθενών όπως φαίνεται και από την καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier (καμπύλη 4) ($p = 0,017$, Pearson's $r = 0,189$). Ο μέσος χρόνος επιβίωσης σε ασθενείς

με Smad4 αρνητικούς όγκους ήταν 104 μήνες (95% C.I από 89 έως 119 μήνες) ενώ για αυτούς με θετική ανοσοέκφραση ήταν 123 μήνες (95% C.I από 111 έως 136 μήνες) (Η διαφορά ήταν οριακή με τη χρήση της κλιμάκωσης της έντασης της Smad 4 ανοσοχρώσης)

Καμπύλη Kaplan-Meier 4 Σημαντική ελάττωση του DDFS σε περιστατικά με αρνητική Smad4 ανοσοέκφραση.

Καμπύλη Kaplan-Meier 5 : Συσχέτιση της επιβίωσης των ασθενών με την παρουσία ή όχι ανοσοαντίδρασης για τη Smad4.

Στη μελέτη δε, υποκατηγοριών ασθενών (subgroup analysis) η **θετικότητα** της πρωτεΐνης Smad4 ανεδείχθη ισχυρός προγνωστικός παράγοντας στους ER θετικούς όγκους ($\log \text{rank}=0,028$) (όπως φαίνεται στην κάτωθι καμπύλη επιβίωσης) Παρομοίως, η έκφραση της πρωτεΐνης είχε ανεξάρτητη προγνωστική αξία και στους όγκους με μέγεθος μεγαλύτερο από 2 εκατοστά (T2, Σταδίου ΙΙΑ) ($p=0,023$).

Καμπύλη Kaplan-Meier 6: Καμπύλη στην οποία φαίνεται η μείωση της επιβίωσης των ασθενών σε απουσία έκφρασης Smad4 σε ER θετικούς όγκους.

Τέλος, στατιστικώς σημαντική «αντίστροφη» συσχέτιση ήταν αυτή μεταξύ Smad4 ανοσοέκφρασης και μεγέθους των όγκων ($p=0,039$, Pearson's $r=-0,184$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της ανοσοέκφρασης της Smad4 με το βαθμό κακοηθείας ή τον ιστολογικό υπότυπο.

SKI

Η πρωτεΐνη ski εμφάνισε κυτταροπλασματική και κοκκιώδη ανοσοχρώση στην πλειοψηφία των διηθητικών καρκινωμάτων ενώ σε ορισμένα η χρώση εντοπιζόταν μόνο στον πυρήνα, και σε άλλα παρατηρήθηκε τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική ανοσοχρώση των νεοπλασματικών κυττάρων. Αντίθετα στις περιπτώσεις ενδοπορικών καρκινωμάτων ή άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας η ανοσοαντίδραση ήταν κατά κύριο λόγο πυρηνική (εικόνες 8,9). Σπάνια πυρηνική ανοσοέκφραση για τη Ski πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε σε κύτταρα φυσιολογικών πόρων (εικόνα 8). Δεν παρατηρήθηκε Ski ανοσοαντίδραση σε κύτταρα των λοβίων ή του στρώματος.

Για τη Ski πρωτεΐνη τα ανοσοϊστοχημικά αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 9.

Ski * type Crosstabulation

			type			Total
			insitu	invasiveductal	hyperplasia	
Ski	negative	Count	12	38	5	55
		% within type	57,1%	30,4%	62,5%	35,7%
	weakly positive	Count	8	54	3	65
		% within type	38,1%	43,2%	37,5%	42,2%
	strongly positive	Count	1	33	0	34
		% within type	4,8%	26,4%	,0%	22,1%
Total	Count	21	125	8	154	
	% within type	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Πίνακας 9: Εκφραση της Ski πρωτεΐνης στις τρεις κατηγορίες αλλοιώσεων.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα, ασθενώς θετική ανοσοχρώση είχαμε σε 55 διηθητικά (ποσοστό 44%), 8 ενδοπορικά (ποσοστό 38,1%) και 3 περιπτώσεις υπερπλασίας (ποσοστό 37,5%). Ισχυρή ανοσοαντίδραση για

τη Ski πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε σε 32 περιπτώσεις διηθητικών (ποσοστό 35,6%) και 1 περίπτωση (4,8%) *in situ* καρκινώματος.

Εικόνα 8: Παραδείγματα Ski ανοσοέκφρασης σε φυσιολογικό πόρο, σε περίπτωση άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας και *in situ* καρκινώματος.

Εικόνα 9: Παρδείγματα ασθενούς και έντονης κυτταροπλασματικής κοκκιώδους Ski ανοσοθετικότητας σε περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων.

Όσον αφορά στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την πρωτεΐνη Ski, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της έντασης της έκφρασης της πρωτεΐνης και του TbRII ($p=0,04$, Pearson's $r=0,231$). Επιπλέον η παρουσία θετικής ανοσοχρώσης καθώς και η ένταση αυτής παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με το βαθμό κακοηθείας των διηθητικών νεοπλασμάτων ($p<0,001$, Pearson's $r=0,463$), όπως φαίνεται και στο ιστόγραμμα 3, και αυτή ήταν μία από τις σημαντικές παρατηρήσεις που ανέδειξε η παρούσα μελέτη.

Ακόμη πιο βαρύνουσα και οπωσδήποτε δυνητικά χρησιμότερη ήταν η διαπίστωση πως η έκφραση της Ski πρωτεΐνης συσχετίζεται ισχυρά, τόσο όσον αφορά στην παρουσία (θετικά ή αρνητικά για την εν λόγω πρωτεΐνη περιστατικά), αλλά ακόμη και όσο αφορά στην ένταση της ανοσοθετικότητας, με την επιβίωση των ασθενών. Έτσι, όπως φαίνεται και στην καμπύλη επιβίωσης Kaplan-Meier 7, η Ski πρωτεΐνη σχετίζεται με πτωχή έκβαση της νόσου, είτε αυτό έχει να κάνει με παρουσία αιματογενών μεταστάσεων είτε με το θάνατο των ασθενών ($p<0,001$, Pearson's $r=0,335$ για τις απομακρυσμένες μεταστάσεις και $p<0,001$, Pearson's $r=0,350$ για το θάνατο των ασθενών).

Από τη συσχέτιση της Ski με την επιβίωση προκύπτει επίσης (means for survival time) πως ο μέσος χρόνος επιβίωσης μειώνεται από 136 μήνες σε ασθενείς με Ski-αρνητικούς όγκους (διάστημα εμπιστοσύνης C.I. 95% από 124-148) σε 114 μήνες (C.I. 95% από 98-129) σε αυτούς με ασθενή

ανοσοθετικότητα και τέλος, σε 96 μήνες (C.I 95% από 76-115) στις ασθενείς με ισχυρή Ski ανοσοέκφραση

Επιπρόσθετα, μια πολύ σημαντική παρατήρηση ήταν η στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της Ski πρωτεΐνης με την επιβίωση των ασθενών και στην πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης (Cox regression analysis).

Στην εν λόγω ανάλυση, λαμβάνοντας υπ' όψιν ως συν-μεταβλητές την έκφραση των πρωτεϊνών ER, PR, pSmad2/3, Smad4 καθώς και το μέγεθος του όγκου, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της Ski πρωτεΐνης αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών ($p=0,006$) με το $\exp(B) = 4,968$ (95%CI από 1,644 έως 15,014), $= 0,209$ με CI από 0,068 έως 0,639) πράγμα που σημαίνει ότι ασθενείς με αρνητική Ski έχουν στατιστικά μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν πιο μακρό χρονικό διάστημα επιβίωσης σε σχέση με όσους έχουν θετική Ski ανοσοέκφραση.

Από τη binary logistic regression analysis και με συν-μεταβλητές : το μέγεθος του όγκου, το βαθμό κακοηθείας την έκφραση των ER, PR, pSmad2/3, Smad4, TbRII προέκυψε επίσης ότι η παρουσία της Ski πρωτεΐνης ήταν σημαντικός ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας για το θάνατο των ασθενών ($p=0,003$, Wald=7) με το $\exp B = 6,41$ (95%CI από 1,84-22,2), πράγμα που σημαίνει ότι οι ασθενείς με Ski θετικούς όγκους έχουν 6,5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν από τη νόσο τους σε σχέση με τους ασθενείς με Ski αρνητικούς.

Μια επιπλέον σημαντική παρατήρηση που ανέκυψε, από τη στατιστική ανάλυση αφορά στην ισχυρή συσχέτιση της, αμιγώς κυτταροπλασματικής Ski ανοσοέκφρασης και της απώλειας έκφρασης της πυρηνικής πρωτεΐνης pSmad2/3 ($p < 0,001$).

Εξάλλου, από τη binary logistic regression analysis και με τις προαναφερθείσες συν-μεταβλητές, βρέθηκε ότι η παρουσία κυτταροπλασματικής Ski ήταν ισχυρός προγνωστικός παράγοντας για την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων ($p = 0,018$, $\exp B = 3,742$, $\text{Wald} = 7$). Δηλαδή ασθενείς με κυτταροπλασματική Ski είχαν 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο να παρουσιάσουν απομακρυσμένες μεταστάσεις σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Επιπλέον, η παρουσία έκφρασης της Ski πρωτεΐνης είχε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την παρουσία διηθητικού στοιχείου, συγκρινόμενη με το ποσό της έκφρασης της τόσο στα ενδοπορικά (in situ) καρκινώματα όσο και στις περιπτώσεις άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας ($p = 0,001$, Pearson's $r = 0,261$), όπως φαίνεται και στο γράφημα 4.

Από την ανάλυση δε, υποομάδων ασθενών (subgroup analysis) προέκυψαν και κάποιες ακόμη ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις. Για παράδειγμα παρατηρήσαμε ότι η Ski χάνει την προγνωστική της αξία για την επιβίωση των ασθενών, σε TbRII θετικά διηθητικά καρκινώματα, η σε συνέκφραση του υποδοχέα με τις Smad πρωτεΐνες. Αντίθετα η

προγνωστική της αξία είναι οριακή σε καρκινώματα με ταυτόχρονη έκφραση των Smad πρωτεϊνών. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση της Ski ήταν σημαντικός προγνωστικός παράγοντας και στους ER θετικούς όγκους (Log Rank $p=0,002$) όπως φαίνεται και στην καμπύλη Kaplan Meier (καμπύλη 8)

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης με το μέγεθος ή τον ιστολογικό υπότυπο των διηθητικών καρκινωμάτων.

Γράφημα 3: Γράφημα στο οποίο φαίνεται η αύξηση του ποσοστού των Ski θετικών καρκινωμάτων, με την αύξηση του βαθμού κακοηθείας τους

Γράφημα 4: Γράφημα στο οποίο φαίνεται η διαφορά στην έκφραση της Ski στις υποκατηγορίες των αλλοιώσεων που μελετήθηκαν.

Καμπύλη Kaplan-Meier 7: Καμπύλη στην οποία φαίνεται η μείωση της επιβίωσης των ασθενών με αύξηση της Ski ανοσοέκφρασης

Καμπύλη Kaplan-Meier 8: Εμφανής πτώση της επιβίωσης των ασθενών ανάλογα με το ποσό έκφρασης της Ski πρωτεΐνης σε ER θετικούς όγκους

Ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών pSmad2/3 και Smad4.

Μελετήθηκαν επίσης ως ξεχωριστή κατηγορία όλες εκείνες οι περιπτώσεις δειγμάτων που είχαν ταυτόχρονη θετική ανοσοέκφραση για τις πρωτεΐνες pSmad2/3 και Smad4 και αναζητήθηκαν οι πιθανές συσχετίσεις με την έκφραση των υπολοίπων μορίων καθώς και με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Έτσι, στατιστικώς σημαντική, συσχέτιση ανεδείχθη μεταξύ θετικότητας των δύο πρωτεϊνών και έκφρασης του TbRII υποδοχέα ($p < 0,001$, Pearson's $r = 0,397$), ενώ αρνητική συσχέτιση ανέκλυψε μεταξύ της ταυτόχρονης έκφρασης pSmad2/3 και Smad4 και της θετικότητας για τους προγεστερονικούς υποδοχείς ($p = 0,021$, Pearson's $r = -0,186$).

Η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση είχε να κάνει με την αρνητική συσχέτιση της συνέκφρασης των πρωτεϊνών και της πτωχής έκβασης της νόσου στα διηθητικά καρκινώματα. Για την παρουσία αιματογενών μεταστάσεων το p στη log rank ανάλυση ήταν μικρότερο από 0,001 γεγονός που δηλώνει ότι η διαφορά στο ελεύθερο νόσου διάστημα μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών είναι στατιστικώς σημαντική DDFS:123 μήνες στους Smad θετικούς όγκους (CI από 109-137) και μόνο 82 μήνες (CI από 68-96) στους υπόλοιπους. Στην περίπτωση θανάτου των ασθενών το p ήταν 0,012 στη log rank και οι μήνες επιβίωσης 130 (CI από 118-142) και 111 (CI από 98-123) σε θετικούς και αρνητικούς όγκους αντίστοιχα. (Καμπύλες Kaplan- Meier 7,8)

Καμπύλη Kaplan-Meier 2 : Πτώση του DDFS σε όγκους που δεν έχουν συνέκφραση των Smad πρωτεϊνών.

Καμπύλη Kaplan-Meier 3; Καμπύλη στην οποία φαίνεται η διαφορά στο χρόνο επιβίωσης σε ασθενείς που έχουν ταυτόχρονη θετική ανοσοέκφραση των Smad πρωτεϊνών, σε σχέση με τις υπόλοιπες.

Επίσης η ταυτόχρονη έκφραση των πρωτεϊνών ήταν σημαντικός προγνωστικός παράγοντας και σε ER θετικούς όγκους (log rank.p= 0,015).

Καμπύλη Kaplan-Meier 4: Καμπύλη στην οποία διαφαίνεται η διαφορά στην επιβίωση ασθενών με ταυτόχρονη έκφραση των Smad πρωτεϊνών σε σχέση με τις υπόλοιπες σε ER θετικά καρκινώματα.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά στους παράγοντες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, και αρχίζοντας από τους ορμονικούς υποδοχείς πρέπει να υπογραμμίσουμε, ότι αυτοί αποτελούν μόρια με, τουλάχιστον, προβλεπτική αξία για τα καρκινώματα του μαστού. Πολλοί μάλιστα ερευνητές πιστεύουν πως, σε καρκινώματα με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ανταπόκρισης εκτός από την ορμονική και στη χημειοθεραπεία,.

Από τη δική μας μελέτη αναδείχτηκε στατιστικώς σημαντική, αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των οιστρογονικών υποδοχέων και της έκφρασης τόσο του TbRII, όσο και της Ski πρωτεΐνης. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι για την περίπτωση της Ski η σχέση αυτή ενισχύει την ήδη υπάρχουσα άποψη της δράσης της Ski ως ογκογονιδίου που σχετίζεται με έναν σαφώς πιο επιθετικό φαινότυπο και επομένως ενός λιγότερου διαφοροποιημένου κυττάρου που δεν εξαρτάται από συγκεκριμένο ορμονικό περιβάλλον για την επιβίωση του. Από την άλλη πλευρά η αρνητική συσχέτιση μεταξύ ER και TbRII ενισχύει τις απόψεις προηγούμενων μελετών στις οποίες έχει καταδειχτεί ότι τα οιστρογόνα καταστέλλουν τον TGF- β (Pouliot F. Et al 1999), επιτυγχάνοντας έτσι την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των ορμονοευαίσθητων κυττάρων. Έχει δειχθεί μάλιστα, πως καρκινικά κύτταρα μαστού θετικά για τον οιστρογονικό υποδοχέα είναι ανθεκτικά στη δράση του TGF β , λόγω

ελαττωμένης έκφρασης του TβRII (Pouliot F et al 1999, Brattain MG, et al 1996). Αντίστροφα, θεραπεία με αντιοιστρογόνα, όπως η ταμοξιφένη επάγει την ενεργοποίηση του TGF-beta σηματοδοτικού μονοπατιού (Knabbe et al 1987) και αυτός είναι ένας από τους τρόπους με τους οποίους επιτυγχάνεται η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (ο ER σχηματίζει σύμπλοκο και απενεργοποιείται από τη Smad4).

Ακόμη έχει αναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες Smad 2,3 και 4 διαντιδρούν με τον οιστρογονικό υποδοχέα. Θεωρείται μάλιστα, ότι η Smad 3 μόνη της, ενεργοποιεί την ER εξαρτώμενη μεταγραφή γονιδίων, ενώ το σύμπλοκο Smad3-Smad4 καθώς και ο TGF-β την αναστέλλουν (Wu L et al 2003).

Τέλος, η οριακή συσχέτιση της απώλειας της έκφρασης του ER με χειρότερη έκβαση για τους ασθενείς (θάνατος) στα μελετηθέντα περιστατικά, συνάδει με ένα μεγάλο αριθμό μελετών που έχει κατατάξει τους ορμονικούς υποδοχείς στην κατηγορία παραγόντων με δεδομένη **προγνωστική** αξία για την περίπτωση ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Πολύ σημαντική ήταν και η ανάδειξη αντίστροφης συσχέτισης μεταξύ έκφρασης προγεστερονικού υποδοχέα και της πρωτεΐνης Smad4.

Αναφέρθηκε προηγουμένως ότι η πρωτεΐνη Smad4 ενσωματώνεται στο σύμπλοκο που σχηματίζει ο ER-α με το DNA και στρατολογεί ποικίλους συν-καταστολείς αναστέλλοντας έτσι την έκφραση ER- εξαρτώμενων γονιδίων (Pouliot et al 1999). Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι, πιθανή είναι, η διαντίδραση και με τα σύμπλοκα του PR.Εξάλλου είναι γνωστό

πως η έκφραση του PR στα καρκινικά κύτταρα είναι ένα δείγμα της ακεραιότητας του ER σηματοδοτικού μονοπατιού (Karayiannakis AJ et al 1996). Επιπλέον ο PR πιστεύεται πως είναι ένα σημαντικό σηματοδοτικό μόριο που εμπλέκεται και σε άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, ενώ η δυνητική ενεργοποίηση του σε κάποιες περιπτώσεις, και από τον ER-β δεν πρέπει να αποκλείεται. Σε περιπτώσεις λοιπόν, που ο ER-β είναι απρόσβλητος, το βιολογικό αποτέλεσμα φαίνεται να εξαρτάται από το ποσοστό ER-α/ER-β που υπάρχει στο κύτταρο (Wu et al 2003).

TβRII

Ο TGF-β είναι μια κυτταρική πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί αρκετά ως τώρα και έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην παθογένεση ποικίλων κλινικών οντοτήτων. (Cohen M. M et al 2003, Kassimatis et al 2007). Είναι επίσης γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β διαφέρει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και την κυτταρική σύνθεση. Στο μαστό, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο του, τόσο στη φυσιολογική ανάπτυξη όσο και για την εμπλοκή του TGF-β στη δημιουργία όγκου.

Η απώλεια της έκφρασης του TGF-β σε κακοήγη νεοπλασματικό ιστό, έχει δειχθεί σε μια σειρά από πειράματα. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις του υποδοχέα του TβR II ή λειτουργικά ανενεργός υποδοχέας, έχει διαπιστωθεί σε περιπτώσεις καρκίνου παχέος εντέρου, στομάχου,

ενδομητρίου (Markovitz et al 1995, Markovitz et al 1996) καθώς και σε λεμφώματα από T κύτταρα (Knaus et al 1996). Ωστόσο υπάρχουν στη βιβλιογραφία και μελέτες, οι οποίες αποδίδουν στον TGF- β ρόλο προαγωγού και όχι κατασταλτικού του όγκου γονιδίου. Για παράδειγμα σύμφωνα με άλλους αναλυτές, (Machara et al 1999, Blobe et al 2000), σε περιπτώσεις ελλείμματος στο σηματοδοτικό μονοπάτι TGF β /Smad πρωτεϊνών, έχουμε αντιδραστική αύξηση της παραγωγής TGF β από τα περιβάλλοντα στρωματικά κύτταρα με επακόλουθη παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, αγγειογένεση και αλλαγή στην κυτταρική προσκολλητικότητα, χαρακτηριστικά που μπορεί να δίνουν στον TGF β ένα ρόλο προαγωγού του όγκου σε κάποιο όψιμο στάδιο της κακοήθους εξαλλαγής. Η παρουσία, όπως είπαμε, πλήθους ενεργοποιητικών και κατασταλτικών για τον TGF- β ενδοκυττάρων μορίων και η πολύπλοκη αλληλεπίδραση τους, είναι αυτή που καθορίζει τελικά και την ειδικότητα της κυτταρικής απόκρισης.

Στη δική μας μελέτη η παρουσία έκφρασης του υποδοχέα συσχετίστηκε ισχυρά με την έκφραση των ενδοκυττάρων υποστρωμάτων του, των Smad πρωτεϊνών και αυτό επιβεβαιώνει τον, εγκατεστημένο και κοινά πλέον αποδεκτό, τρόπο ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος του συγκεκριμένου μορίου (Zhu et al 2001, Massague J et al 2000 Moustakas et al 2001). Παρατηρήθηκε δε, ότι η απώλεια έκφρασης για τον υποδοχέα, ήταν το πιο συχνό σύμβαμα στη δική μας μελέτη και μάλιστα

παρατηρήθηκε ακόμη και σε περιπτώσεις άτυπης υπερπλασίας (πιθανά πρώιμο γεγονός στη διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής).

Η συσχέτιση της έκφρασης του υποδοχέα με τη Ski πρωτεΐνη ήταν μια, παρατήρηση που αρχικά ήταν αιτία προβληματισμού, ωστόσο ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία (Zhang F et al 2003) έγινε κατανοητό ότι η ερμηνεία αυτής της συσχέτισης μπορεί να εδράζεται στα ακόλουθα: Η Ski πρωτεΐνη, όπως και η ομόλογη της SnoN λειτουργεί ως διακόπτης για τη μεταγωγή του σήματος του TGF-β. Πιο αναλυτικά σε απουσία TGF-β διαντιδρά με τις Smad, τις μπλοκάρει και καταστέλλει τη μεταγωγή σήματος (Sun Yet al 1999, Akiyoshi S et al 1999). Με την προσθήκη TGF-β οι πρωτεΐνες αποδομούνται μέσω του συστήματος ουβικουΐτινης – πρωτεασώματος, διαδικασία που διαμεσολαβείται από είτε από το APC (Anaphase Promoting Complex) είτε από τη Smurf λιγάση (Sun Y et al 1999). Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του TGF-β του συστήματος, οδηγεί δυνητικά σε αντιδραστική αύξηση της SKI και SnoN πρωτεϊνών μέσω επαγωγής του mRNA τους (Stroschein SL et al 1999). Με βάση τα παραπάνω είναι δυνατό να πούμε ότι από τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, ενισχύεται και η δράση της Ski ως αρνητικού παλίνδρομου ρυθμιστή TGF-beta καταρράκτη. Μια δεύτερη πιθανή εξήγηση είναι ότι η Ski πρωτεΐνη ενεργοποιείται συχνά κατά τη διάρκεια της πορείας της κακοήθους εξαλλαγής στο μαστό μέσω διαφόρων κυτταρικών μονοπατιών και όπως ανέκυψε από τη μελέτη μας, είναι

συνήθως παρούσα σε καρκινικά κύτταρα για να ανταγωνιστεί τη δράση ποικίλων ογκοκατασταλτικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων βρίσκεται φυσικά και ο TGF-beta.

Αυτό που ήταν ωστόσο περισσότερο ουσιαστικό, ήταν η θετική συσχέτιση της απώλειας έκφρασης του TbRII υποδοχέα και του αυξανόμενου Grade των διηθητικών όγκων, όπως επίσης και η θετική συσχέτιση του με μεγαλύτερο DDFS των ασθενών. Από τις παραπάνω συσχετίσεις, επιβεβαιώνεται και στη δική μας μελέτη, η ογκοκατασταλτική δράση του TGF-beta εξαρτώμενου κυτταρικού μονοπατιού, το οποίο ελέγχει την κυτταρική αύξηση και ρυθμίζει την κυτταρική διαφοροποίηση. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα TbRII (όσο και των Smad πρωτεϊνών όπως θα δούμε στη συνέχεια) «προφυλάσσει» το κύτταρο εμποδίζοντας την εμφάνιση ενός κακοήθους μορφολογικά φαινοτύπου (Grade) αλλά και τη δυνατότητα υψηλού μεταστατικού δυναμικού.

Επιπλέον, η απώλεια της έκφρασης του σε περιπτώσεις τόσο *in situ* καρκινωμάτων όσο και σε περιπτώσεις άτυπης υπερπλασίας, δεικνύει ότι η απώλεια της λειτουργικότητας του υποδοχέα είναι ένα γεγονός που μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και πρώιμα στη διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής στο μαζικό αδένα, όπως εξάλλου γίνεται και στο ενδομήτριο (Markovitz et al 1995).

Παράλληλα η τελευταία παρατήρηση που προέκυψε από την ανάλυση υποομάδων ασθενών (subgroup analysis) αφορούσε την προγνωστική αξία της έκφρασης του TbRII στα διηθητικά, μεγαλύτερα από 2 εκ καρκινώματα. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει και με τις προαναφερθείσες μελέτες αλλά και με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας μας (Koumoundourou et al 2007) σύμφωνα με την οποία η απώλεια της έκφρασης του TGF-beta είναι κρίσιμη και σε πιο «όψιμα» στάδια της καρκινογένεσης στο μαζικό αδένα καθορίζοντας κατά κάποιο τρόπο την πρόοδο της νεοπλασίας.

Συνοψίζοντας, θα πρέπει να πούμε ότι ο υποδοχέας του TGF-β είναι ένα μόριο κρίσιμης σημασίας όσον αφορά στην κακοήγη εξαλλαγή στο μαζικό αδένα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της πολυπαραγοντικής διαδικασίας της καρκινογένεσης. Φαίνεται λοιπόν πως, όπως και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, για την οποία είμαστε πεπεισμένοι πως αποτελεί ένα ιδιάζον πρότυπο κυτταρικού πολλαπλασιασμού το οποίο σε πολλά βήματα μιμείται η νεοπλασία, έτσι λοιπόν και στη διαδικασία κακοήθους εξαλλαγής, η καταστολή του TGF-beta και του σηματοδοτικού του μονοπατιού φαίνεται πως είναι ένα κρίσιμης σημασίας μοριακό γεγονός.

Ενδεχόμενη ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω μοριακής στόχευσης, είναι πιθανό να επιβραδύνει την εξέλιξη κακοήθων αλλοιώσεων με σημαντικό κλινικό όφελος για τις ασθενείς.

pSmad2/3

Η «ανάλογη» έκφραση της pSmad2/3 πρωτεΐνης με αυτή της Smad4, και η στατιστική συσχέτιση τόσο μεταξύ τους όσο και με τον TβRII, επιβεβαιώνει το ρόλο τους ως ενδοκυττάρων υποστρωμάτων του TGF-β σηματοδοτικού μονοπατιού.

Επίσης, σε συμφωνία πάντα με την έκφραση των δύο άλλων πρωτεϊνών (Smad4 και TβRII), και η απώλεια έκφρασης της p Smad2/3, σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με την εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων και μικρότερο –ελεύθερο νόσου διάστημα, συνεπώς με χειρότερη κλινική έκβαση των ασθενών. Να τονιστεί ότι η p Smad2/3 θα πρέπει να θεωρηθεί ως το πιο ειδικό μόριο που σχετίζεται με τον TGF-β καταρράκτη. Αυτό γιατί αφενός σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι τελείως ειδική για το συγκεκριμένο συνδέτη (Miyasono et al 2003) και αφετέρου διότι το χρησιμοποιηθέν αντίσωμα ανιχνεύει τη φωσφορυλιωμένη και συνεπώς την ενεργοποιημένη μορφή της πρωτεΐνης.

Για το λόγο αυτό αποκτά ιδιαίτερη αξία η συσχέτιση της με την επιβίωση των ασθενών με διηθητικά καρκινώματα καθώς και η ανάδειξη ανεξάρτητης προγνωστικής αξίας στα χαμηλού βαθμού κακοηθείας νεοπλάσματα. Όσον αφορά στη δεύτερη παρατήρηση, θα μπορούσαμε να πούμε ότι όγκοι που έχουν, κατά τη χρονική στιγμή της εμφάνισέως τους ένα χαμηλό (τουλάχιστον φαινοτυπικά) κακόηθες δυναμικό, δεν έχουν

πολλές πιθανότητες να προοδεύσουν σε έναν πιο κακοήγη μορφολογικά και λειτουργικά φαινότυπο, εφόσον διατηρούν την έκφραση μορίων κομβικής σημασίας για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τέλος θα πρέπει να υπογραμμίσουμε την πολύ ενδιαφέρουσα συσχέτιση που ανεδείχθη μεταξύ απώλειας pSmad2/3 έκφρασης και κυτταροπλασματικής εντόπισης της Ski πρωτεΐνης. Όπως έχει ειπωθεί και από άλλους αναλυτές (Mahmood Hussein 2003) η μετατόπιση αυτή της Ski από τη φυσιολογική πυρηνική της θέση στο κυτταρόπλασμα, είναι ένα κρίσιμης σημασίας γεγονός για την παρεμπόδιση της μετακίνησης της pSmad2/3 πρωτεΐνης προς τον πυρήνα όπου, συνδεδεμένη με το γενετικό υλικό δυνητικά επάγει την, TGF- β εξαρτώμενη γονιδιακή ρύθμιση. Φαίνεται λοιπόν ότι η τροχοπέδηση της pSmad2/3 από την κυτταροπλασματική Ski είναι ικανή να οδηγήσει πιο γρήγορα το κύτταρο στην πρόοδο της νεοπλασματικής εξεργασίας και την ανάπτυξη ενός περισσότερο επιθετικού φαινότυπου

Smad 4

Ο ρόλος της πρωτεΐνης Smad 4 στην παθογένεση διαφόρων νόσων καθώς και στην καρκινογένεση, δεν είναι επαρκώς μελετημένος. Ενδείξεις υπάρχουν ότι, όπως και ο TGF- β και ως κύριος διαμεσολαβητής του κυτταρικού του μονοπατιού, η πρωτεΐνη Smad έχει επίσης ρόλο ογκοκατασταλτικού παράγοντα. Εξάλλου, όπως είπαμε, έχει βρεθεί ότι

λείπει σε πολλές περιπτώσεις παγκρεατικού καρκίνου (DPC4) (Hahn et al 1996).

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη για, την πρωτεΐνη Smad 4 ήταν αρκετά και ενδιαφέροντα. Έτσι η εν λόγω πρωτεΐνη, βρέθηκε να έχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση τόσο με την έκφραση του TβRII, όσο και με την έκφραση της pSmad2/3. Η παρατήρηση αυτή συνάδει, όπως προηγουμένως αναφέραμε, με τα όσα έχουν αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια για τη διαμεσολάβηση της TGF-β εξαρτώμενης κυτταρικής απόκρισης μέσω των AR- και Co-Smad πρωτεϊνών.

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση αναδείχτηκε μεταξύ απώλειας έκφρασης της Smad4 πρωτεΐνης και παρουσία θετικών PR υποδοχέων ενώ συγχρόνως, διαπιστώθηκε ότι η Smad4 είναι σημαντικός προγνωστικός παράγοντας στα ER θετικά καρκινώματα.

Οι παρατηρήσεις αυτές ήταν αρκετά ενδιαφέρουσες και σχολιάστηκαν εκτενώς σε προηγούμενη παράγραφο. Το τελικό συμπέρασμα είναι, πως ο TGF-β μπορεί να ρυθμίζει τη «μοίρα» του κυττάρου μέσω Smad4 διαμεσολαβούμενης διεπικοινωνίας με τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Αυτό μπορεί να παρέχει και τη μοριακή βάση για την εξήγηση του ευρέως φάσματος των αποτελεσμάτων της διαταραχής της έκφρασης των πρωτεϊνών του εν λόγω μονοπατιού σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Wu L et al 2003) προφανώς μέσω σύνδεσης των

παραγόντων στις SERM περιοχές και εκλεκτικής τροποποίησης της γονιδιακής έκφρασης. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου μπορεί να εξηγηθούν τα παραπάνω, είναι ότι σε απώλεια της Smad4 ο TGF- β δεν είναι πλέον ικανός να αναστείλει την οιστρογονοεπαγόμενη γονιδιακή έκφραση γεγονός που δυνητικά οδηγεί σε πρόοδο του όγκου (Wu L et al 2003).

Το παραπάνω γεγονός δεικνύει τη σημασία της αρτιότητας των υποστρωμάτων του TGF- β ως προς τον έλεγχο της εξέλιξης των κακοηθειών του μαστού.

Επιπλέον, και σε συμφωνία με όσα προηγούμενα αναπτύξαμε, η απώλεια της έκφρασής της πρωτεΐνης Smad 4, συνδυάστηκε με αυξημένο μέγεθος όγκου και χειρότερη έκβαση κυρίως γι' αυτές τις ασθενείς παρατήρηση που ενισχύει τον προστατευτικό ρόλο της πρωτεΐνης ως προς την ανάπτυξη τόσο του πρωτοπαθούς όγκου όσο και απομακρυσμένων μεταστάσεων. Καθώς δηλαδή η νεοπλασία προοδεύει, το κύτταρο χάνει την ικανότητα διατήρησης μορίων κατασταλτικών της κυτταρικής αύξησης. Ένα τέτοιο λοιπόν μόριο πρέπει, αναμφίβολα να θεωρείται και η πρωτεΐνη Smad4 για το μαζικό αδένα.

Το γεγονός ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε απώλεια της έκφρασης του T β RII, χωρίς ταυτόχρονη απώλεια της έκφρασης των Smad πρωτεϊνών, μπορεί να εξηγείται από την ενεργοποίηση, όπως προαναφέραμε, των Smad πρωτεϊνών, και από άλλα σηματοδοτικά

μόρια, όπως οι ακτιβίνες. Επίσης δε θα πρέπει να ξεχνάμε τη δυνητική επίδραση που ασκούν στο σύστημα οι ανασταλτικές Smad πρωτεΐνες.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι η βαθμιαία αποδιοργάνωση των σηματοδοτικών μονοπατιών και η σταδιακή απώλεια από το κύτταρο των μορίων που συμμετέχουν σε αυτά κατά την πολυσταδιακή διαδικασία της καρκινογένεσης.

Ski

Η ογκοπρωτεΐνη Ski είναι, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ένας αρνητικός ρυθμιστής της σηματοδότησης που επάγεται από τον TGF-beta, μέσω της αλληλεπίδρασης της με τα Smad σύμπλοκα (Luo K et al 1999, Xu W et al 2000). Στα φυσιολογικά κύτταρα η εντόπιση της είναι πυρηνική ενώ κατά τη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής του κυττάρου μετακινείται από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα.

Από την παρούσα μελέτη, ανέκυψε το συμπέρασμα, ότι η Ski πρωτεΐνη διαδραματίζει αναμφίβολα ρόλο ογκογονιδίου στο μαστό, ενώ ενδιαφέρουσα ήταν και η διαπίστωση του ρόλου της ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα για την έκβαση των ασθενών στην πολυπαραγοντική ανάλυση.

Στατιστικώς σημαντική συσχέτιση αναδείχτηκε μεταξύ Ski και TbRII και όπως είπαμε αυτή η συσχέτιση αποτελεί ένδειξη του ρόλου της Ski ως

αρνητικού παλίνδρομου ρυθμιστή του TGF- β μονοπατιού. Και θα λέγαμε στηριζόμενοι και σε προηγούμενους μελετητές (Frederick J et al 2002) ότι είτε η γρήγορη επαγωγή του Ski mRNA και έκφραση της πρωτεΐνης, είτε ακόμη και η αποτυχία του TGF- β να οδηγήσει την πρωτεΐνη για αποδόμηση, είναι κρίσιμα κυτταρικά συμβάντα που ενισχύουν την ογκογόνο δράση του εν λόγω μορίου.

Η αντίστροφη συσχέτιση που εμφάνισε η έκφραση της πρωτεΐνης με αυτή του οιστρογονικού υποδοχέα, σχολιάστηκε προηγούμενα.

Η πρωτεΐνη είχε επίσης σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ διηθητικών και μη βλαβών, διαπίστωση που παρέχει την εντύπωση ενεργοποίησης της σε προχωρημένα στάδια της κακοήθους εξαλλαγής. Τόσο στις περιπτώσεις άτυπης υπερπλασίας όσο και στα *in situ* καρκινώματα, η έκφραση της Ski, όπου υπήρχε, περιορίστηκε στον πυρήνα του κυττάρου και η παρατήρηση αυτή συνάδει, σε κάποιο βαθμό, με παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε κακοήθη μελανώματα. (Mahmood Hussein 2002). Αντίθετα, στις διηθητικές βλάβες, η χρώση ήταν κυρίως κυτταροπλασματική κοκκιώδης με κάποιες περιπτώσεις ταυτόχρονης ή και αποκλειστικής, πυρηνικής ανοσοθετικότητας.

Η ισχυρή συσχέτιση της Ski με το βαθμό κακοηθείας των όγκων, μας δίνει άλλη μια ισχυρή ένδειξη του ρόλου της στην αποδιαφοροποίηση του κυττάρου και στην ανάπτυξη ενός κακοήθους φαινοτύπου που παρέχει στο κύτταρο και την ικανότητα να διαφεύγει των φυσιολογικών

κυτταρικών σημάτων ελέγχου της αύξησης και να αναπτύσσει αυξημένο μεταστατικό δυναμικό. Η τελευταία υπόθεση επιβεβαιώνεται μέσα από τη δική μας μελέτη και από τη συσχέτιση της Ski με την εμφάνιση αιματογενών μεταστάσεων ή θανάτου των ασθενών τόσο στην univariate, όσο και στην Cox regression analysis. Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι όπως και σε άλλες μελέτες, η Ski πρωτεΐνη είναι ένα από τα λίγα μέχρι στιγμής γνωστά μόρια, των οποίων η δράση τροποποιείται με τη δυνητική ενδοκυττάρια μετακίνηση τους. Έτσι με βάση τη σχέση της κυτταροπλασματικής ανοσοεντόπισης της Ski και της απώλειας της pSmad2/3 πρωτεΐνης, καθώς και της στατιστικώς σημαντικής σχέσης μεταξύ κυτταροπλασματικής Ski και αυξημένου μεταστατικού δυναμικού του κυττάρου, μπορούμε με ασφάλεια να συμπεράνουμε ότι τόσο η επαγωγή της έκφρασης της Ski πρωτεΐνης όσο και η ενδοκυτταροπλασματική εντόπιση της αποτελεί δείκτη της κυτταρικής απορύθμισης και απώλειας των φυσιολογικών αμυντικών μηχανισμών έναντι του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Από όλα τα παραπάνω γίνεται σαφές πως τόσο ο TGF- β όσο και τα ενδοκυττάρια υποστρώματα του, οι Smad πρωτεΐνες μπορεί να αποτελέσουν μέσα μελλοντικής θεραπευτικής παρέμβασης είτε σε κακοήθειες είτε σε μια ποικιλία άλλων διαταραχών στις οποίες έχουν βρεθεί να εμπλέκονται (Cohen et al 2003).

Μια μεγάλη ευκαιρία για τη μοριακή ιατρική θα είναι να διευρύνει την κατανόηση των σηματοδοτικών μορίων, κυρίως σε ότι αφορά το μηχανισμό ενδοκυττάρωσης του TβR υποδοχέα και του τρόπου ενεργοποίησης, ολιγομερισμού και στοιχειομετρίας των Smad πρωτεϊνών ώστε να καταστρωθούν μοριακές στρατηγικές για τον έλεγχο των προκαλούμενων διαταραχών.

Ακόμη, η μοριακή στόχευση και η πιθανή εξουδετέρωση της Ski πρωτεΐνης, φαίνεται να αποτελεί έναν ακόμη θεραπευτικό στόχο και για τις κακοήθεις νεοπλασίες του μαστού. Το όφελος από μία τέτοιου είδους παρέμβαση ενδέχεται να είναι μεγάλο αφού οι αλληλεπιδράσεις των μορίων που καταστέλλει, δηλαδή των Smad πρωτεϊνών, με μια πληθώρα άλλων καθοριστικών για την καρκινογένεση μορίων είναι αποδεδειγμένα.

Οπωσδήποτε, θα πρέπει να διερευνηθεί και η ύπαρξη άλλων σηματοδοτικών οδών, μέσω των οποίων μπορεί να δρα εναλλακτικά ο TGF-β.

Αποτελεί κοινό τόπο, ότι η πληρέστερη κατανόηση της μοριακής βιολογίας της καρκινογένεσης, είναι αυτή που κατά βάση ενισχύει τις δυνατότητες μας, τόσο στη διάγνωση των διαφόρων νοσημάτων, αλλά κυρίως στην αιτιολογική αντιμετώπιση τους.

Όσον αφορά δε, στην αναζήτηση αξιόπιστων προγνωστικών παραγόντων στον καρκίνο του μαστού, αυτό αποτελεί ένα πεδίο έντονης ερευνητικής

δραστηριότητας, ιδίως τα τελευταία χρόνια. Στόχος όπως είναι φυσικό, είναι η ανακάλυψη νέων φαρμάκων για τη βέλτιστη αντιμετώπιση των ασθενών. Οι μελλοντικές εξελίξεις στη θεραπεία, θα επιτευχθούν πιθανότατα, μέσω βαθύτερης κατανόησης της βιολογίας του όγκου και μεγαλύτερης ικανότητας πρόβλεψης της έκβασης της νόσου.

Οι ασθενείς με καρκίνο μαστού και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες αποτελούν μια υποκατηγορία με μεγαλύτερη επιβίωση έναντι ασθενών με διηθημένους από τη νόσο λεμφαδένες. Στις ασθενείς αυτές, το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης και η ηλικία αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες (Goldhirsch A et al 2001). Η αναγνώριση των ασθενών με το μεγαλύτερο κίνδυνο για υποτροπή της νόσου απαιτεί την ανάδειξη νέων προγνωστικών παραγόντων και αυτός ακριβώς ήταν ο στόχος της διατριβής αυτής. Αν και η αξιολόγηση ποικίλων παραμέτρων λαμβάνεται υπόψη στην εκτίμηση της πρόγνωσης των ασθενών και στη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων, η κλινική έκβαση ποικίλλει ακόμα και σε ασθενείς με το ίδιο στάδιο νόσου και τα ίδια χαρακτηριστικά (Gasparini G et al 1993) παρατήρηση η οποία δείχνει την ανάγκη περαιτέρω αναζήτησης νέων και αξιόπιστων προγνωστικών παραγόντων. Παρόλο που η χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας, μπορεί να συμβάλλει στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού, η τοξικότητα της θεραπείας εξακολουθεί να αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα. Έτσι συχνά ο

κλινικός γιατρός αναγκάζεται συχνά να αξιολογήσει και να συγκρίνει τους κινδύνους και το κόστος της χημειοθεραπείας έναντι του οφέλους. Η ανάδειξη προγνωστικών παραγόντων σχετιζόμενων με το μεταστατικό δυναμικό του πρωτοπαθούς όγκου θα βοηθούσε αναμφίβολα στον καθορισμό εκείνης της υποομάδας ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες που θα ωφελείτο από τη χορήγηση συμπληρωματικής χημειοθεραπείας. Τα ενδοκυττάρια υποστρώματα του TGFβ₂ καθώς και τα μόρια που καταστέλλουν ή ακόμη αυτά που ενεργοποιούν την TGFβ εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα είναι δυνητικά μοριακά εργαλεία όσον αφορά στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης. Η περαιτέρω διερεύνηση του σε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών και η σύνδεση του με άλλα, κρίσιμα για την κακοήγη εξαλλαγή μόρια και μονοπάτια, αποτελούν αναμφίβολα στόχους μελλοντικής μας μελέτης.

Βιβλιογραφία

AJCC Cancer Staging Manual fifth edition 1997

Akiyoshi S., Inoue H., hanai J., Kusanagi k., Nemoto N., Miyazono_K., Kawabata M (1999). C-ski acts as a transcriptional co-repressor in TGF-beta signaling through interaction with smads *J Biol Chem* 274: 35269-35277

Anbazhagan R, Osin PP, Bartcova J, Nathan B, Lane EB, Gusterson BA (1998) The development of epithelial phenotypes in the human fetal and infant breast. *J Pathol* 184 : 197-206

Arman, E., Haffner Crausz, R., Chen, Y., Heath, J K. and Lonai, P. (1998) Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signalling in pregastrulation mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95 5082-5087

Aschroft G.S 1999. mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response *Natural cell Biol.* 1: 260-266

Atlas of Breast Cancer Daniel F Hayes 1993

Attissano, L., Wrana, J. L., Lopez-Cassilas, F. and Massague, J. (1994) "TGF-beta receptors and actions", *Biochimica et Biophysica Acta* 1222, 71-80

Attisano, L., and Tuen Lee-Hoeflich, S. The Smads, *Genome Biol.* 2: 3010.1–3010.8,

M. H. Barcellos-Hoff (1996). Latency and activation in the control of TGF- β . *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 1:353-363.

Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995) Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot *Cell* 83, 851-857

Bland KI, Romrell L, Congenital and acquired disturbances of breast development and growth. In : Bland KI, copelant EM, eds. *The breast comprehensive management of benign and malignant diseases*. Philadelphia: WB Saunders, 1991: 69-86

Blankenstein MA , Maitimu-Smeele I, Donker GH, Daroszewski J, Milewicz A: On the significance of in situ production of oestrogens in human breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992, 41:891-896.

Blobe GC., Schiemann WP., Lodish HF 2000. Role of TGF-beta in human disease. *N. Engl. J med* 342:1350-1358

Böttinger, E. P., Jakubczak, J. L., Haines, D. C., Bagnall, K., and Wakefield, L. M. Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor β receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[α]-anthracene. *Cancer Res.*, 57:5564-5570, 1997.

Brattain, M. G., Ko, Y., Banerji, S. S., Wu, G., and Willson, J. K. (1996) Defects of TGF-beta receptor signaling in mammary cell tumorigenesis *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1, 365–372

Burdon T., Sancaran L., Wall R. J., Spencer M., and Hennighausen L Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. Evidence for different mechanisms of regulation during pregnancy and lactation (1991) *J Biol Chem.* 266, 6909-6914

Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R. M., Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. (1999) *Cell* 98, 675-686.

Claus EG, Risch N, Thompson WD. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer: implications for risk prediction. *Cancer* 1994;73:643-51.

Cohen M M. TGF β /Smad Signaling system and its Pathologic Correlates (2003) *Am J Med Genetics.* 116A: 1-10

Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995;332:1589-93.

Colmenares C Stavnezer E. the ski oncogene induces muscle differentiation in quail embryo cells *Cell* 1989 59:293-303

Colmenares C, Suttrave P., Stavnezer E Hughes SH. Activation of the c-ski oncogene by overexpression

Conneely OM, Lydon JP, De Mayo F, O'Malley BW: Reproductive functions of the progesterone receptor . *J Soc Gynecol Investing* 2000, 7(1 suppl):S25-S32.

- Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Boiological and clinical implications for human neoplasia. Am J Pathol 1995;147:545-60.
- C.W.Daniel, S. Robinson, and G.B.Silberstein (1996). The role of TGF- β in patterning and growth of the mammary ductal tree. J. Mamm. Gland Biol. Neoplasia 1:331-341.
- De Caestecker, M. P., Hemmati, P., Larisch- Bloch: the SMAD activation domain is a proline rich, P300 dependent transcriptional activation domain, Journal of Biological Chemistry 275, 2115-2122
- M. P. de Caestecker, E. Piek, and A.B. Roberts (2000). The role of TGF- $\emptyset$ signaling in cancer. J. Natl. Cancer Inst. 92:1388–1402.
- De Larco, J.E., and Todaro, G.J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4001-4005.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. Nat. Genet. 29: 117–129, 2001
- P. ten Dijke, K. Miyazono, and C. H. Heldin (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\emptyset$ signaling. Trends Biochem. Sci. 25:64–70.
- Di Loreto, C., Reis, F. M., Cataldi, P., Zuiani, C., Luisi, S., Beltrami, C. A., and Petraglia, F. Human mammary gland and breast carcinoma contain immunoreactive inhibin/activin subunits: evidence for a secretion into cystic fluid. Eur. J. Endocrinol., 141: 190–194, 1999
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Jr., Feng, X. H., and Goldschmidt-Clermont, P. J. microtubule binding to Smad may regulate TGF-beta activity (2000) Mol. Cell 5, 27–34.
- Dupont W, Page D. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. N Engl J Med 1985;312:146-51.
- Evans, R. M. (1988) Science 240, 889-895.
- Fang, L., Poupponnot, C and Massague, J. (1997) "Dual roles of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF- β -inducible transcriptional complexes" Genes and development 11, 3157-3167
- Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, et al. The lifetime risk of developing breast cancer. J Natl Cancer Inst 1993; 85 :892-97.
- Flaumenhaft R, Rifkin DB: The extracellular regulation of growth factor action. Mol Biol Cell 199, 3: 1057-1065
- Ford D, Easton D, Bishop T, et al. Risks of cancer in BRCA 1 mutation carriers. Lancet 1994;343:692-95.
- Frederick JP., Wang X. Smads "freeze" when they Ski. Structure 2002 vol 10:1607-1611
- Furberg H, Newman B, Moorman P, et al. Lactation and breast cancer risk. Int J Epidemiol 1999;28:396-402.
- Xiuhua Gao and Zafar Nawaz Review: Progesterone receptors – animal models and cell signaling in breast cancer. Role of steroid receptor coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer..
- Xiuhua Gao, Zafar Nawaz: role of steroid receptors coactivators and corepressors of progesterone receptors in breast cancer: Breast Cancer res 2002, 4: 182-186
- Giangrande PH, Pollio G, Mc Donnell DP: Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. J Biol Chem 1997, 272:32889-32900.
- Greenlee RT, Murray T, Boldens S, et al. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000;50:7-33.
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. (1998) Cancer Res. 58, 5329–5332
- A. E. Gorska, H. Joseph, R. Derynck, H. L. Moses, and R. Serra (1998). Dominant-negative interference of the transforming growth factor β type II receptor in mammary gland epithelium results in alveolar hyperplasia and differentiation in virgin mice. Cell Growth Differ. 9:229-238.
- Grady, W. M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D. F., Kwon, K., Willis, J., and Markowitz, S. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. (1998) Cancer Res. 58, 3101–3104
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1996) Science 271, 350–353

- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk C.A., (1996) *DPC4 a candidate tumor supressor gene at human chromosome, "18q21.1"*, Science 271, 350-353.
- Hata, A., Shi, Y., and Massague, J. *TGF-beta signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads.* (1998) *Mol. Med. Today* 4, 257-262
- Haagensen CD *Anatomy of the mammary gland in diseases of the breast* 2nd ed, chapter I WBSannders Co 1971
- Hankinson S, Colditz G, Manson J, et al. *A prospective study of oral contraceptive use and risk of breast cancer (Nurses' Health, United States).* *Cancer Causes Control* 1997;8:65-72.
- He, W., Cao, T., Smith, D. A., Myers, T. E., and Wang, X. J. *Smads mediate signaling of the TGFbeta superfamily in normal keratinocytes but are lost during skin chemical carcinogenesis* (2001) *Oncogene* 20, 471-483
- Heldin, C.H., Miyazono K. And ten Dijke, P. (1997) *TGF-β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.* *Nature*, 390, 465-471
- Henninghausen, L., Robinson, GW., Wagner, K.-U., and Liu, X 1997 *Prolactin signaling in the mammary gland.* *J. Biol. Chem.*, 272, 7567-7569
- Holley, R. W., Bohlen, P., Fava, R., Baldwin, J. H., Kleeman, G., and Armour, R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5989-5992.
- Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-de la Cruz MC, Han DC, and Ziyadeh FN. *Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse.* *Am J Pathol* 158: 1653-1663, 2001.
- Hosobuchi, M., and Stampfer, M.R. *Effects of transforming growth factor β on growth of human mammary epithelial cells in culture.* *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25:705-713, 1989.
- Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, et al. *Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk.* *JAMA* 1997;278:1407-11.
- Hunter D, Spiegelman D, Adami H, et al. *Cohort studies of fat intake and the risk of breast cancer – a pooled analysis.* *N Engl J Med* 1996;334:356
- Hussein Mahmood: *Transforming Growth Factor β and malignant melanoma: molecular mechanisms* (2005) *J. Cut. Pathology* 32:389-395
- Huwiler A and Pfeilschifter J. *Transforming growth factor-2 stimulates acute and chronic activation of the mitogenactivated protein kinase cascade in rat renal mesangial cells.* *FEBS Lett* 354: 255-258, 1994
- Iehara N, Takeoka H, Ysuiji H, Imabayashi T, Foster DN, Strauch AR, Yamada Y, Kita T, and Doi T. *Differentiation of smooth muscle phenotypes in mouse mesangial cells.* *Kidney Int* 49: 1330-1341, 1996
- Jhappan, C., Geiser, A. G., Kordon, E.C., Bagheri, D., Hennighausen, A.B., Roberts, A.B., Smith, G.H., and Merlino, G. *Targeting expression of a transforming growth factor β1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation.* *EMBO J.*, 12:1835-1845, 1993.
- H. Joseph, A. E. Gorska, P. Sohn, H. L. Moses, and R. Serra (1999). *Overexpression of a kinase-deficient transforming growth factor-β type II receptor in mouse mammary stroma results in increased epithelial branching.* *Mol. Biol. Cell.* 10:1221-1234.
- Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, and Chen RH. *TGF-β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase.* *Nat Cell Biol* 4: 51-58, 2002
- Jeruss, J. S., Santiago, J. S., and Woodruff, T. K. *Localization of activin and inhibin subunits, receptors and Smads in the mouse mammary gland.* *Mol. Cell. Endocrinol.*, 203: 185-196, 2003
- Karayiannakis AJ, Bastounis EA, Chatzigianni EB, Makri GG, Alexiou D, Karamanakis P: *Immunohistochemical detection of oestrogen receptors in ductal carcinoma in situ of the breast.* *Eur J Surg Oncol* 22: 578-582, 1996.
- Theodoros I. Kassimatis, Ioanna Giannopoulou, Dimitra Koumoundourou, Emily Theodopakopoulou, Ioannis Varakis, Lydia Nakopoulou: *Immunohistochemical evaluation of phosphorylated SMAD2/SMAD3 and the co-activator P300 in human glomerulonephritis: correlation with renal injury.* *JCMM*

- Katsouyanni K., Willett W., Trichopoulos D., Boyle P., Trichopoulou A., Vasilaros S., Papadiamantis G., Macmahon B. : Risk of breast cancer among Greek women in relation to nutrient intake. *Cancer*, 61: 181-185 Kawata Y, Suzuki H, Higaki Y, Denisenko O, Schullery D, Abrass CK, and Bomsztyk K. Bcn-1 element-dependent activation of the laminin α 1 chain gene by the cooperative action of transcription factor E2 (TFE3) and Smad proteins. *J Biol Chem* 277: 11375–11384, 2002..
- Kim RH, Wang D, Tsang M, Martin J, Huff C, de Caestecker MP, Parks WT, Meng X, Lechleider RJ, Wang T, and Roberts AB. A novel smad nuclear binding protein, SNIP1, suppresses p300-dependent TGF- β signal transduction. *Genes Dev* 14: 1605–1616, 2000
- Klinge, C. M. Role of estrogen receptor ligand and estrogen response element sequence on interaction with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF). (2000) *Steroids Biochem Mol Biol*. 1999 65, 227-251.
- Knabbe C, Lippman ME, Wakefield LM, et al: Evidence that Transforming Growth Factor- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 1987, 48: 417-428
- Kmaus PI, lindemann D, Decoteau FJ, 1996. A dominant inhibitory mutant of the type II TGF β receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma *Mol Cell Biol* 16: 3480-3489
- Kordon E.C., McKnight, R.A., Jhappan, C. Henninghausen, L., Merlino, G and Smith, G.H (1995) Ectopic TGF β 1 expression in the secretory mammary epithelium induces early senescence of the epithelial stem cell population. *Dev. Biol.*, 168: 47-61
- Koumoundourou D, Kassimatis TI., Zolota V., Tzorakoeleftherakis E., Ravazoula P., Vassiliou V., Kardamakis D., Varakis J. Prognostic significance of TGF β -1 and pSmad2/3 in breast Cancer patients with T1-2N0 tumours. *Anticancer Research* 2007;27: 2613-2620
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, and Massague J. A mechanism of repression of TGF- β / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13: 804–816, 1999.
- Labbe´ E, Silvestri C, Hoodless PA, Wrana JL, and Attisano L. Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF- β -dependent transcription through the forkhead DNA binding protein FAST2. *Mol Cell* 2: 109–120, 1998.
- Lai CF, Feng X, Nishimura R, Teitelbaum SL, Avioli LV, Ross FP, and Cheng SL. TGF- β upregulates α 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad signaling. *J Biol Chem* 275: 36400–36406, 2000.
- Liu , F., Hata, A., Baker, J.C., et al. (1996) A human Mad protein acting as a BMP regulated transcriptional activator. *Nature* 381 620-623
- Li Y, Turck CM, Teumer JK, Stavnezer E: Unique sequence ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol* 1986 57:1065-1072
- Luo Kunxin. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr. opinion in genetics and development*. 2004 14: 65-70
- Luo K, Strohkein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, Zhou Q. The ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes Dev* 1999, 13:2196-2206
- Longnecker M. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast cancer : meta-analysis and review. *Cancer Causes Control* 1994;5:73-82.
- Machara Y., Kakeji Y., Kabashima A. 1999. role of transforming Growth Factor beta1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma *J. Clin Oncol.* 17:607-614
- Massague, J. TGF β signal transduction . *Annu. Rev. Biochem.*, 67 :753-791, 1998.
- Massague, J., and Chen, Y. G. Controlling TGF-beta signaling. (2000) *Genes Dev*. 14, 627-644.
- Massague, J., How cells read TGFbeta signals. *Nat Rev Mol. Cell Biol*. 2000;1:169
- Massague, J. 1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791
- Massague, J., Andres, J., Attisano, L. et al. (1992) TGF-beta receptors. *Mol. Reprod. Dev.*, 32, 99-104.
- Massague, J., Attisano, L. and Wrana, J. L. (1994) The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol.*, 4, 172-178.

- J. Massague and D. Wotton (2000). Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19:1745–1754.
- Markowitz SD, Roberts AB. Tumor suppressor activity of TGF-beta pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:93
- Markowitz S D, Wang J, Myerof L, Pearsons R, Sun L, Lutterbauch J, Fan RS Zborowska, E., Kinzler, K. W., Voglestein, B., Brattain, M., and Wilson, J. K. V 1995. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability *Science* 268: 1336-1338
- McDonnell DP: Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway . *Trends Endocrinol Metab* 1995, 6:133-138.
- McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 3-12.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. The nuclear receptor superfamily: the second decade (1995) *Cell* 83,835-839.
- Matsuda, T., Yamamoto T., Muraguchi A. and Saatcioglu, F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. (2001) *J Biol Chem* 276 42908-42914
- Medina, D The mammary gland: A unique organ for the study of Development and Tumorigenesis. *J Mammary gland Biol. Neoplasia*, 1: 5-19
- Medrano EE. Repression of TGFbeta signalling by the oncoprotein Ski in human melanomas: Consequences for proliferation survival and metastasis. *Oncogene* 2003; 22:3123
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA 1. *Science* 1994;266:66-71.
- Miyaki, M., Iijima, T., Konishi, M., Sakai, K., Ishii, A., Yasuno, M., Hishima, T., Koike, M., Shitara, N., Iwama, T., Utsunomiya, J., Kuroki, T., and Mori, T. Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. (1999) *Oncogene* 18, 3098–3103
- Miyasono K., ten Dijke P., Heldin CH., Tgf-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol* 2000; 75-115
- Miyasono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors (2003) *Cancer Sci* 94; 3: 230
- Moustakas, A., Lin, H. Y., Henis, Y. I., et al . (1993) The transforming growth factor beta receptors types I, II, and III form hetero-oligomeric complexes in the presence of ligand. *J. Biol. Chem.*, 268, 22215-22218.
- Nomura T, Khan MM, Kaul SC, Dona H-D, Wadhwa R, Colmenares C, Kohno I, Ishii S: Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcription repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev* 1999 13 412-423
- Nomura N, Sasamoto S, Ishii S, Date T, Matsui M, Ishizaki R: Isolation of human c-DNA clones of ski and ski-related gene, sno. *Nucleic Acids Res* 1989 17:5489-5500
- A. V. Nguyen and J. W. Pollard (2000). Transforming growth factor β 3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development* 127:3107-3118.
- Oft M, Peli j., Rudaz, C., Schwarz H., Beug H., and Reichmann E. 1996 TGF- β 1 and Ha- ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* 10:2642-2677
- Okadome, T., Yamashita, H., Franzén, P. et al . (1994) . Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 269, 30753-30756.
- Osborne, C. K., Zhao, H., and Fuqua, S. A. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use (2000) *J. Clin. Oncol.* 18, 3172-3186.
- Osin PP, Anbazhagan R, Bartcova J, Nathan B, Gusterson BA (1998) Breast development gives insight into breast disease. *Histopathology* 33 : 275-283
- Ottman R, Pike MC , King MC, et al. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* 1983;2:556-58.
- Pearson White S: Snol, a novel alternatively spliced isoform of the ski protooncogene homolog, sno *Nucleic Acids Research* 1993 21: 4632-4638

- Perry, R. R., Kang, Y., and Greaves, B. R. Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. (1995) *Br. J. Cancer* 72, 1441–1446
- Pierce, D. J., Johnson, M. D., Matsui, Y., Robinson, S. D., Gold, L. I., Purchio, A. F., Daniel, C. W., Hogan, B. L., and Moses, H. L. Inhibition of mammary duct development but not alveolar outgrowth during pregnancy in transgenic mice expressing active TGF- β 1. *Genes Dev.*, 7:2308-2317, 1993.
- Pierce, D. F., Jr., Gorska, A. E., Chytil, A., Meise, K. S., Page, D. I., Coffey, R. J., Jr., and Moses, H. L. Mammary tumor suppression by transforming growth factor β 1 transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:4254-4258, 1995.
- Pittius C W., Sancar, S., Topper, Y., and Henninghausen, L., (1988) Comparison of the regulation of the whey acidic protein gene with that of a hybrid gene containing the whey acidic protein gene promoter in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 2 1027-1032
- Pouliot, F., and Labrie, C. Expression profile of agonistic Smads in human breast cancer cells: absence of regulation by estrogens. (1999) *Int. J. Cancer* 81, 98–103
- Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K., and Gelbart, W. M. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. (1995) *Genetics* 139, 241–254.
- Reed JA, Bales E, Xu W, et al Cytoplasmic localisation of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanoma in vivo: functional implication for TGF β signaling. *Cancer res* 2001; 61:8074
- Reiss M and Barcellos-Hoff MH: The role of transforming growth factor- β in breast cancer- a working hypothesis *Breast Cancer Res Treat* 45: 81-95, 1995.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Wakefield, L. M., Roche, N. S., Stern, D. F., and Sporn, M. B. Type β transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:119-123, 1985.
- Robinson, G. W., and Hennighausen, L. Inhibins and activins regulate mammary epithelial cell differentiation through mesenchymal-epithelial interactions. *Development*, 124: 2701–2708, 1997.
- Robson M, Gilewski T, Haas B, et al . BRCA-associated breast cancer in young women. *J Clin Oncol* 1998;16:1642-49.
- Rosner B, Colditz G. Nurses' Health Study. Log-incidence model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:359-64.
- Saharinen, J., Hyytiäinen, M., Taipale, J., and Keski-Oja, J. (1999) Cytokine Growth Factor Rev. 10, 99-117
- Savage, C., Das, P., Finelli, A. L., Townsend, S. R., Sun, C. Y., Baird, S. E., and Padgett, R. W. *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 790–794]]
- Schairer C, Lubin J, Troisi R, et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 2000;283:485-91.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H., and Gelbart, W. M. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster* (1995) *Genetics* 139, 1347–1358
- Shang, Y., and Brown, M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. (2002) *Science* 295, 2465-2468.
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N. P. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. (1998) *Cell* 94, 585–594.
- Shinagawa T., Nomura T., Colmenares C, Ohira M, Nakagawara A, Ishii S.: Increased susceptibility to tumorigenesis of Ski deficient heterozygous mice. *Oncogene* 56: 8100-8108, 2001
- Snell Anatomy 1992
- Sternberg S. S : *Histology for pathologists*. Raven Press L.t.d New York 1992
- Stoica, A., Saceda, M., Fakhro, A., Solomon, H. B., Fenster, B. D., and Martin, M. B. The role of transforming growth factor-beta in the regulation of estrogen receptor

expression in the MCF-7 breast cancer cell line. (1997) *Endocrinology* 138, 1498–1505

Strange, R., Li., F., Saurer, S., Burkhardt, A., and Friis, R. R. Apoptotic cell death and tissue remodeling during mouse mammary gland involution. *Development*, 115:49-58, 1992

Stroschein SL, Onni S, Wrana JL, Luo K. Smad3 recruits the APC for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* 15: 2822-2835, 2001

Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA 1 and among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 1997;336:1401-08.

Sun, L., Wu, G., Willson, J. K., Zborowska, E., Yang, J., Rajkarunanayake, I., Wang, J., Gentry, L. E., Wang, X. F., and Brattain, M. G. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 26449–26455

Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lane WS, Lodish HF, Weinberg RA: interaction of the ski oncoprotein with Smad3 regulates TGFβ signaling. *Mol Cell* 1999, 4:499-509

Tang. B., Bottinger, E. P., Jakowlew, S. B., Bagnall, K. M., Mariano, J., Anver, M. R., Letterio, J. J., and Wakefield, L. M. Transforming growth factor-β 1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat. Med.*, 4:802-807, 1998.

Topper W J, and Freeman, C. S. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. 1980 *Physiol. Rev* 60, 1049-1056

Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFβ receptor. (1998) *Cell* 95, 779–791

Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1972;48:605-13.

Tzorakoelefttherakis EV: χειρουργικές παθήσεις του μαστού 1992

Ventura, F., Doody, J., Liu, F. et al. (1994) Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptors complexes. *EMBO J.*, 13, 5581-5589.

Vonderhaar, B.K. (1987) in the mammary gland (Neville M.C., and Daniel, C.W eds) pp 383-438, Plenum Press, New York

Vorherr H. The breast: morphology, physiology and lactation. New York, Academic Press, 1974

Wang W, Mariani FV, Harland RM, Luo K. Ski represses bone morphogenic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:14394-14399

Wakefield. M., Piek E, Bottinger. P. E., TGF-β signaling in mammary gland development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6 67-82 2001

Willett WC., Stampfer M.I., Golditz G.A., Rosner B.A., Hennekens C.H., Speizer F.E.: moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer *N Engl J Med.*, 316: 1174-1180, 1987

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA 2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994

Wrana, J. L., Attisano, L., C'rcamo, et al . (1992) TGF-beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*, 71, 1003-1014.

John Wysolmerski, Joshua N Van Houten, Normal mammary gland development and disorders of breast development and function, 2002, Chapter 5

Wu L, Wu Y, Gathingw B, wan M, Li X, Grizzle W, Liu Z, Lu Ch, Mao Zh, Cao X. 2003 Smad4 as a transcription co-repressor for Estrogen Receptor α *J. Biol. Chemistry* 278;17:15192-15200

Xu W, Angeliw K, Danielpoor D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE. Ski acts as a corepressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type β transforming growth Factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97:5924-5929

Yamamoto T., Saatcioglu, F and Matsuda, T. Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling (2002) *Endocrinology* 143 2635-2642

Ying, Y. S., Zhang, Z., Huang, G., and Hsieh, F. C. Inhibin/activin subunits and activin receptors in human breast cell lines and lactating rat mammary glands. *J. Oncol.*, 7: 481–485, 1995

Hong-Jian Zhu and Antony W. Burgess. Regulation of Transforming Growth Factor- β Signaling. Ludwig Institute for Cancer Research, P.O. 2008, Royal Melbourne Hospital , Molecular Cell Biology Research Communication 2001 4: 321-330
Zhu, Y., Richardson, J. A., Parada, L. F., and Graff, J. M. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer (1998) Cell 94,703–714

Περιεχόμενα

ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ	σελ 4
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΦΗΒΕΙΑ	σελ 7
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΖΙΚΟΥ ΑΔΕΝΑ	σελ 14
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	σελ 18
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΟΡΜΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ	σελ.31
ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	σελ 34
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TRANSFORMING GROWTH FACTOR beta	
(TGF-β) ΩΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΜΟΡΙΟΥ	σελ 36
ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	σελ 47
ΥΛΙΚΟ	σελ 66
ΜΕΘΟΔΟΣ	σελ 67
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ 75
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	σελ 79
ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ	
ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	σελ 81
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ 116
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ 131