ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΙΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Προγνωστική αξία ανοσοϊστοχημικών μοριακών δεικτών (άξονας SDF1 / CXCR4) σε πρωτοπαθή καρκινώματα μαστού

Χαράλαμπος Παπαθεοδώρου

Ιατρός

ΠΑΤΡΑ 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ελένη Παπαδάκη-Πέτρου,
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας- Ιστολογίας- Εμβρυολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών: Επιβλέπουσα
Παναγιώτης Δημόπουλος,
Καθηγητής Ακτινολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
Χαράλαμπος Καλόφωνος,
Καθηγητής Ογκολογίας – Παθολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ελένη Παπαδάκη-Πέτρου,
Αν.Καθηγήτρια Ανατομίας- Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Παναγιώτης Δημόπουλος
Καθηγητής Ακτινολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Χαράλαμπος Καλόφωνος,
Καθηγητής Ογκολογίας – Παθολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Ιωάννης Βαράκης
Ομότιμος Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Χρυσούλα Σκόπα,
Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Γεώργιος Παναγιωτάκης,
Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Κωνσταντίνος Γυφτόπουλος,
Επίκουρος Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών

Στην οικογένειά μου,
στη γυναικά μου,
στην κ. Παπαδάκη,
στον Θανάση,
σε όλους όσους έδειξαν υπομονή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ 4
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ 6
ΠΡΟΛΟΓΟΣ 7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8
ΜΑΣΤΟΣ 8
ΑΝΑΤΟΜΙΑ 8
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ 9
ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ 11
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ 13
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 13
ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ 13
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 14
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΜΑΣΤΟΥ 14
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ 17
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ 17
IN SITU ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ 19
ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ 20
ΔΙΑΛΟΓΗ - ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ 20
ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/ CXCR4 22
ΓΕΝΙΚΑ 22
ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ 25
HIF-1 28
ΓΕΝΙΚΑ 28
HIF-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ 30
MMP-9 33
ΓΕΝΙΚΑ 33
MMP9 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ 34
SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ HIF-1 36
SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ MMP-9 36
MMP-9 ΚΑΙ HIF-1 37
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 38
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 38
ΥΛΙΚΟ 38
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 39
ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ 39
ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ 41
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ 44
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ 44
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 46
ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ 46
SDF-1 46
CXCR4 50
HIF-1α 53
MMP-9 53
ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ 55

SDF-1 55
CXCR4 56
HIF-1α 56
MMP-9 56
ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ 57
SDF-1 57
CXCR4 57
HIF-1α 57
MMP-9 57
ΕΠΙΒΙΩΣΗ 57
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 60
ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ 60
SDF-1 60
CXCR4 60
HIF-1α 63
MMP-9 63
ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ 64
SDF-1 64
CXCR4 65
HIF-1α 66
MMP-9 66
ΕΠΙΒΙΩΣΗ 69
ΕΠΙΛΟΓΟΣ 71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 76
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 107
ABSTRACT 108

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AP-1	Activator protein 1
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3
BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
BRCA	Breast cancer susceptibility protein
CAF	Cancer associated fibroblasts
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CISK	Cytokine-independent survival kinase
CK5	Cytokeratin 5
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DCIS	Ductal carcinoma in situ
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Estrogen receptor
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FIH-1	Factor inhibiting HIF-1
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
HER2/neu	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HRE	Hypoxic responsive elements
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
LCIS	Lobular carcinoma in situ
LH	Luteinizing hormone
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	Mitogen-activated protein (MAP) kinases
MMP	Matrix metalloproteinase
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NLE	Nuclear localization element
NOS	Not otherwise specified
OS	Overall survival
PHD	Prolyl-hydroxylase domain
PKC-γ	Protein kinase C γ
PR	Prostaglandin receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFS	Relapse free survival
SDF-1	Stromal derived factor 1
TBS	Tris-HCL-buffered saline
TGF-1β	Transforming growth factor beta 1
TNF-α	Tumor necrosis factor a
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hipple Lindau
AIP4	Atrophin-1-interacting protein 4 E3 ubiquitin ligase
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
TIMP1	Tissue inhibitors of metalloproteinases 1
ΤΠΛΜ	Τελική πορολοβιακή μονάδα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθη νεοπλασία στο γυναικείο πληθυσμό, ενώ τα τελευταία 25 χρόνια έχει παρατηρηθεί αύξηση της επίπτωσής του κατά 30% στις ανεπτυγμένες χώρες (Jemal et al., 2009). Παρόλη την εκτεταμένη έρευνα στην παθογένεια της νόσου και τα όλο αυξανόμενα δεδομένα, οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη συμβολή των χημοκινών και των υποδοχέων τους στην παθοφυσιολογία των νεοπλασιών γενικά και στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα. Η υπόθεση ότι υφίστανται ομοιότητες μεταξύ των μηχανισμών διακίνησης των λευκοκυττάρων με τους μηχανισμούς μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδοθούν σε ένα κοινό μηνυματοδοτικό σύστημα κυτταροκινών, οδήγησαν στην ανάδειξη της χημοκίνης SDF-1 (Stromal Derived Factor 1) και του υποδοχέα της CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) ως σημαντικούς παράγοντες της παθοφυσιολογίας του καρκίνου του μαστού, εμπλεκόμενους σε ποικίλα στάδια της καρκινογένεσης και της εξέλιξης της νόσου (Muller et al., 2001). Οι μέχρι τώρα προσεγγίσεις της έκφρασης των μορίων αυτών με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε καρκίνο του μαστού έχουν οδηγήσει σε αντικρουόμενα αποτελέσματα τόσο όσον αφορά την ανοσοεντόπιση των μορίων, όσο και το συσχετισμό τους με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, ενώ επιπλέον η έρευνα για την ανοσοϊστοχημική έκφραση του SDF-1 είναι περιορισμένη.

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό την διερεύνηση έκφρασης των μορίων αυτών με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε ιστικά δείγματα πρωτοπαθών διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού, τόσο στα καρκινικά κύτταρα και στο καρκινικό στρώμα, όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, στόχος αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της σχέσης της έκφρασης των μορίων SDF-1/CXCR4 με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων του HIF-1α και της MMP-9. Ο HIF-1α, κεντρικός ρυθμιστής της προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων στην υποξία, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε πολλαπλά στάδια της νόσου, συμβάλει στην ανάπτυξη αντοχής σε θεραπευτικούς χειρισμούς ενώ αλληλεπιδρά με τον άξονα SDF-1/ CXCR4 (Kryczek, S. Wei, E. Keller, R. Liu, & W. Zou, 2007; Schioppa et al., 2003; Zagzag et al., 2005) . Αλληλεπίδραση με τον άξονα SDF-1/CXCR4 εμφανίζει και η

MMP-9 όπως προκύπτει από μελέτες που αφορούν τόσο στη διακίνηση των λευκοκυττάρων όσο και στην παθοφυσιολογία διαφόρων αιματολογικών και συμπαγών νεοπλασιών, με περιορισμένα ωστόσο ευρήματα για τον καρκίνο του μαστού (X. Shen et al. 2009; Yuecheng & Xiaoyan 2007; Kenig et al. 2010; C. H. Tang et al. 2008). Οι εκφράσεις των ως άνω μορίων συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους καθώς και με την επιβίωση και την πρόγνωση των ασθενών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΑΣΤΟΣ

ΑΝΑΤΟΜΙΑ

Ο μαστός αποτελεί έναν τροποποιημένο αποκρινή ιδρωτοποιό αδένα του δέρματος, ο οποίος αναπτύσσεται από τη μαστική ακρολοφία του εμβρύου και παράγει γάλα κατά τη γαλουχία. Κείτεται κατά τα δύο τρίτα πάνω και πλάγια του μείζονα θωρακικού μυ και κατά το ένα τρίτο στον πρόσθιο οδοντωτό μυ, εκτεινόμενος συνήθως μεταξύ της κλείδας και της $6^{ης}$ μέχρι $8^{ης}$ πλευράς. Μαζικός αδένας μπορεί να βρεθεί προς τα έσω μέχρι το στέρνο και προς τα έξω μέχρι τη μέση μασχαλιαία γραμμή, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι και την κορυφή της μασχαλιαίας κοιλότητας (ουρά του Spence). Επιπλέον μπορεί μικροσκοπικές εστίες ιστού να επεκτείνονται και εκτός των τυπικών ορίων, διαπερνώντας ακόμα και την περιτονία του μείζονα θωρακικού. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθότι σε περιπτώσεις ολικής μαστεκτομής δεν αφαιρείται απαραίτητα ο μαζικός αδένας στο σύνολό του. Το λίπος απαντάται διάσπαρτα στο μαστό, τον οποίο επίσης περιβάλλει ως υποδόριος και οπισθομαζικός λιπώδης ιστός.

Ο μαστός ιστολογικά αποτελείται από τρείς κύριες δομές: το δέρμα, το υποδόριο λίπος και το μαζικό αδένα, ο οποίος με τη σειρά του αποτελείται από το παρέγχυμα και το στρώμα. Ο μαζικός αδένας περιβάλλεται από μια επιπολής και μια εν τω βάθει περιτονία, ενώ διαμερισματοποιείται από ινώδεις δέσμες συνδετικού ιστού. Κάποιες εξ αυτών συνδέονται με τις περιτονίες συνιστώντας τους συνδέσμους του Cooper, οι οποίοι υποστηρίζουν το μαστό.

Η κύρια αρτηριακή παροχή του μαστού προέρχεται από τους διατιτραίνοντες κλάδους της έσω μαστικής (έσω θωρακικής) και της έξω μαστικής (έξω θωρακικής) αρτηρίας.

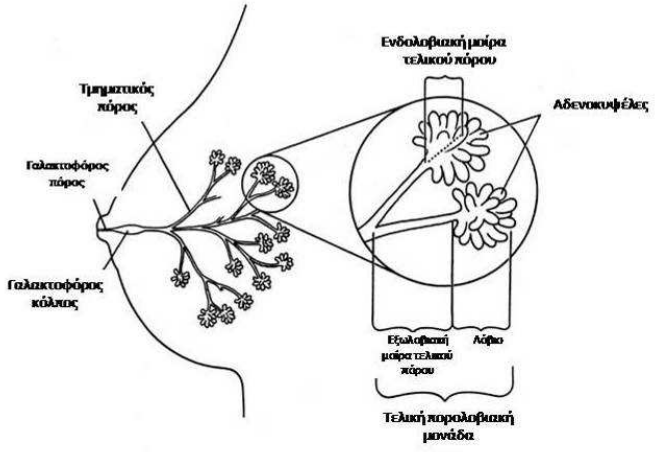
Δευτερευόντως συμβάλλουν και άλλοι κλάδοι αρτηριών όπως των ακρομυοθωρακικών, των υποπλάτιων και θωρακοραχιαίων. Οι φλεβική παροχέτευση των μαστών γίνεται κυρίως μέσω κλάδων των έσω μαστικών, των μεσοπλεύριων και των μασχαλιαίων φλεβών, ενώ η λεμφική παροχέτευση μέσω ενός επιφανειακού πλέγματος το οποίο παροχετεύει σε ένα εν τω βάθει πλέγμα και από κει το αίμα καταλήγει στους λεμφαδένες της μασχάλης και της έσω μαστικής. Οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες βρίσκονται κάτω από την μασχαλιαία φλέβα και χωρίζονται σε τρεις ομάδες σε σχέση με τον ελάσσονα θωρακικό μυ: το επίπεδο Ι επί τα εκτός του μυ, το επίπεδο ΙΙ πίσω από το μυ και το επίπεδο ΙΙΙ στην κορυφή μεταξύ του έσω χείλους του μυ, της πρώτης πλευράς και της μασχαλιαίας φλέβας. Η λέμφος παροχετεύεται από τους λεμφαδένες του πρώτου επιπέδου προς τους λεμφαδένες του δεύτερου επιπέδου και από κει στου τρίτου, ενώ υπάρχουν και εναλλακτικά μονοπάτια προς τους λεμφαδένες του τρίτου επιπέδου χωρίς παρεμβολή των ενδιάμεσων λεμφαδένων (Bundred et al., 1994).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ

Ο μαζικός αδένας χωρίζεται σε 15 έως 20 ακανόνιστα τμήματα, τους λοβούς (lobes), καθένας εκ των οποίων αποτελείται από 20 έως 40 λόβια (lobules) και αποχετεύεται από έναν γαλακτοφόρο πόρο (lactiferous duct) (M. H. Ross & Pawlina, 2006). Κάθε λοβός χωρίζεται από τους υπόλοιπους από πυκνό συνδετικό ιστό και από λίπος και στην ουσία αποτελεί έναν αδένα από μόνος του, με το δικό του γαλακτοφόρο πόρο. Οι πόροι αυτοί έχουν μήκος 2 έως 4,5 εκ. και εκβάλλουν ανεξάρτητα στη θηλή, η οποία εμφανίζει 15 έως 20 στόμια, το καθένα 0,5 χιλ. σε διάμετρο (Wheater, 1991). Λίγο πριν την εκβολή τους, οι γαλακτοφόροι πόροι εμφανίζουν ένα διατεταμένο τμήμα, τους γαλακτοφόρους κόλπους.

Η μικροανατομία του μαστού περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1959 από τον Parks (A. G. Parks, 1959). Μικροί κλάδοι των γαλακτοφόρων πόρων καταλήγουν σε τελικούς πόρους, οι οποίοι αποχετεύουν ένα λόβιο. Ο τελικός πόρος αποτελείται από ένα εξωλοβιακό και ένα ενδολοβιακό τμήμα. Το λόβιο αναπτύσσεται από τα άκρα των τελικών εξωλοβιακών πόρων, από τα οποία δημιουργούνται και πολλαπλασιάζονται οι αδενοκυψέλες του λοβίου κατά την γαλουχία (Εικόνα 1). Κάθε λόβιο διαχωρίζεται σε 10 έως 100 αδενοκυψέλες, οι οποίες αφορίζονται από βασική μεμβράνη. Οι αδενοκυψέλες συνιστούν πρακτικά τα ενδολοβιακά τελικά σωληνάρια στα άκρα των γαλακτοφόρων πόρων και αποτελούνται από σφαιρικές αθροίσεις

επιθηλιακών κύτταρων, τα οποία γίνονται εκκριτικά κατά τη γαλουχία υπό τη συνεργική επίδραση κυρίως της προγεστερόνης, των οιστρογόνων, της προλακτίνης και του ανθρώπινου πλακουντιακού γαλακτογόνου. Επίσης, το λόβιο υπόκειται κατά τη διάρκεια του κύκλου σε οιστρογονική και προγεστερονική επίδραση, με αποτέλεσμα να εμφανίζει ελάσσονες παροδικές δομικές αλλαγές. Κατά το τέλος του κύκλου, με την πτώση των επιπέδων της προγεστερόνης, τα λόβια επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση. Η επίδραση των στεροειδικών ορμονών διαμεσολαβείται από τους αντίστοιχους υποδοχείς (οιστρογονικοί - ER, προγεστερονικοί - PR).



Εικόνα Τελική πορολοβιακή μονάδα (ΤΠΛΜ) (Youngkin & M. S. Davis, 1999)**.**

Η επιθηλιακή επένδυση των πόρων εμφανίζει μια σταδιακή μετάπτωση από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο (λίγο πριν την εκβολή των γαλακτοφόρων πόρων στη θηλή) σε δυο στιβάδες κυβοειδών επιθηλιακών κυττάρων στους γαλακτοφόρους κόλπους και τελικά σε μονόστιβο κυλινδρικό ή κυβοειδές επιθήλιο στο υπόλοιπο δίκτυο των πόρων. Εντός του επιθηλίου, μεταξύ των επιφανειακών επιθηλιακών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης, παρεμβάλλονται μυοεπιθηλιακά κύτταρα εξωδερματικής προέλευσης. Τα κύτταρα αυτά, διατεταγμένα εν είδει καλαθιού, απαντώνται στην εκκριτική μοίρα των αδένων, αλλά είναι πιο εμφανή στους μεγαλύτερους πόρους (M. H. Ross & Pawlina, 2006). Λόγω της εντόπισής τους μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού και του στρώματος, τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα επικοινωνούν και με τα δύο διαμερίσματα και πιθανόν λειτουργούν ως φύλακες της ακεραιότητας του μαστικού ιστού διατηρώντας την πολικότητά του (Thorarinn Gudjonsson et al., 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με ορισμένες έρευνες εκτός από τα επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα, στο φυσιολογικό

μαστικό ιστό απαντάται και ένας τρίτος τύπος κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται διάσπαρτα και μεμονωμένα, εκφράζουν τη βασική κυττοκερατίνη CK5 και θεωρούνται προγονικά κύτταρα, με δυνατότητα διαφοροποίησης τόσο προς επιθηλιακά όσο και προς μυοεπιθηλιακά κύτταρα (Boecker & Buerger, 2003; Péchoux, T Gudjonsson, Ronnov-Jessen, M J Bissell, & O W Petersen, 1999).

Οι τελικοί πόροι και τα λόβια περιβάλλονται από εξειδικευμένο στρώμα (ενδολοβιακό - intralobular), το οποίο διαφέρει ιστολογικά από το υπόλοιπο στρώμα του μαστού (περιλοβιακό ή μεσολοβιακό – perilobular ή interlobular). Το περιλοβιακό στρώμα αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό πλούσιο σε λίπος. Αντίθετα, το ενδολοβιακό είναι λιγότερο πυκνό, έχει περισσότερο χαλαρό συνδετικό ιστό, λίγο έως καθόλου λιπώδη ιστό, ενώ είναι πλούσιο σε τριχοειδή και περιέχει και μικρό αριθμό κυττάρων όπως μακροφάγα, σιτευτικά κύτταρα και λεμφοκύτταρα.

Ένας τελικός πόρος (εξωλοβιακή και ενδολοβιακή μοίρα) και το αντίστοιχο λόβιο του συνιστούν την τελική πορολοβιακή μονάδα (ΤΠΛΜ) (Εικόνα 1), τη βασική ιστοπαθολογοανατομική και λειτουργική μονάδα του μαστού, από την οποία προέρχονται πολλές καλοήθεις και κακοήθεις αλλοιώσεις (π.χ. ινοαδενώματα, σκληρυντική αδένωση, λοβιακό και πορογενές *in situ* καρκίνωμα) (βλ. παρακάτω) (Wellings, H. M. Jensen, & Marcum, 1975). Η δομή αυτή συνιστά έναν ορμονοευαίσθητο αδένα, ικανό να παράγει γάλα, ενώ εκτός γαλουχίας το μέγεθός του κυμαίνεται από 1 έως 8 χιλ. σε διάμετρο (Paredes, 2007). Οι ΤΠΛΜ μπορεί να βρεθούν και ως άμεσες διακλαδώσεις των μείζονων γαλακτοφόρων πόρων και δεν εντοπίζονται πάντα στην περιφέρεια του δικτύου των πόρων.

ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Για την ανάπτυξη του ανθρώπινου μαστού δεν υπάρχουν πολλές λεπτομέρειες, καθότι η πλειονότητα των υπάρχουσων πληροφοριών προέρχονται από πειραματικά μοντέλα ποντικιών, τα οποία διαφέρουν από τον ανθρώπινο μαστό (Kopans, 2007). Η ανάπτυξη ξεκινά την 4^{η} εβδομάδα της κύησης με το σχηματισμό της αρχέγονης μαζικής ακρολοφίας, η οποία εκτείνεται τοξοειδώς από τη μασχαλιαία ως τη βουβωνική χώρα. Στον άνθρωπο, φυσιολογικά, οι μαστικές ακρολοφίες υποστρέφουν, εκτός από τη μαστική χώρα, όπου και εξελίσσονται στο πρωτογενές βλάστημα, το οποίο αναπτύσσεται μέσα στο χόριο (W. J. Larsen, 1993). Την 7^{η} με 8^{η} εβδομάδα παρουσιάζεται μια εγκόλπωση του μεσεγχύματος στο θωρακικό τοίχωμα.

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε λείους μυς της θηλής και στην περιθηλαία άλω (Hughes, 1950). Την 16η εβδομάδα αναπτύσσονται επιθηλιακές εκβλαστήσεις και διακλαδώσεις και στη συνέχεια, μεταξύ 20ης και 32ης εβδομάδας, υπό την επίδραση των πλακουντιακών ορμονών, οι επιθηλιακές εκβλαστήσεις δημιουργούν αυλούς και σχηματίζουν τους γαλακτοφόρους πόρους (Miliaras & Foroglou, 2001). Την 32η με 40η εβδομάδα, εμφανίζεται διαφοροποίηση του μεσεγχύματος, το οποίο επιδρά στον αναπτυσσόμενο μαστό επάγοντας το σχηματισμό λοβίων (Hughes, 1950; A. G. Parks, 1959). Καθώς η κύηση ολοκληρώνεται, ο μαστικός αδένας τετραπλασιάζεται σε μέγεθος, παροδικά προσλαμβάνει εκκριτικούς χαρακτήρες λόγω ορμονικής διέγερσης, αναπτύσσεται το σύμπλεγμα θηλής – περιθηλαίας άλου και τρεις με τέσσερις εβδομάδες μετά τη γέννηση, με τη σταδιακή μείωση των μητρικών και πλακουντιακών ορμονών, μεταπίπτει στην απλή δομή από πόρους.

Κατά τη διάρκεια της εφηβείας στις γυναίκες, η απελευθέρωση των ορμονών FSH και LH από την υπόφυση προκαλεί απελευθέρωση οιστρογόνων από τις ωοθήκες, τα οποία με τη σειρά τους επάγουν την αύξηση και ωρίμανση των μαστών. Η οιστρογονική σύνθεση επάγει την επιμήκη αύξηση των πόρων και η προγεστερονική την πρώιμη ανάπτυξη των λοβιακών εκβλαστήσεων στα τελικά τμήματα των πόρων. Τέλος, η εναπόθεση συνδετικού και λιπώδους ιστού γύρω από τους πόρους συμβάλει στην αύξηση του μεγέθους και της πυκνότητας των μαστών.

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο των γυναικών παγκοσμίως, συνιστώντας 27% όλων των νεοδιαγνωσμένων καρκίνων, ποσοστό διπλάσιο από την εμφάνιση καρκίνου στις γυναίκες οποιασδήποτε άλλης εντόπισης. Για το έτος 2009 υπολογίζεται ότι μόνο στις ΗΠΑ θα διαγνωσθούν περίπου 193000 νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού ενώ περίπου 40000 γυναίκες θα καταλήξουν από τη νόσο (Jemal et al., 2009). Μέχρι το 1990 η μείωση στη χρήση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης αλλά και η μειωμένη εφαρμογή του μαστογραφικού ελέγχου οδήγησαν σε μείωση της επίπτωσης του καρκίνου του μαστού. Έκτοτε, ενώ εμφανίζεται αύξηση της επίπτωσης, η θνησιμότητα στις αναπτυγμένες χώρες εμφανίζει τάση μείωσης, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην πρώιμη διάγνωση μέσω του τακτικού μαστογραφικού ελέγχου και στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπειών (Petrelli et al., 2009; Ravdin et al., 2007).

ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Η μετάβαση από φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά, η περαιτέρω εξέλιξη σε έναν συμπαγή όγκο και η ανάπτυξη τελικά ενός κλινικού καρκίνου συνιστά μια πολύπλοκη διεργασία πολλαπλών σταδίων. Εναρκτήριο γεγονός της όλης διαδικασίας είναι η συγκέντρωση γενετικών ή/και επιγενετικών αλλαγών οι οποίες επιτρέπουν τη διαφυγή των κυττάρων από τους φυσιολογικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και από την ομοιόσταση. Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να είναι κληρονομικές (μεταλλάξεις γεννητικών κυττάρων), σποραδικές ή να επάγονται για παράδειγμα από ιούς, ακτινοβολίες ή γενοτοξικές ουσίες. Μπορεί να αφορούν οποιαδήποτε περιοχή του γονιδιώματος αλλά συνηθέστερα το ογκογόνο μονοπάτι ξεκινά από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή από την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων, αναπτύσσεται γενομική αστάθεια και τελικά επάγεται η εξαλλαγή (transformation) των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά. Η ανάπτυξη του όγκου προϋποθέτει τα κύτταρα να αναπτύξουν λειτουργικές δυνατότητες όπως απεριόριστη δυνατότητα πολλαπλασιασμού, διαφυγή από τους μηχανισμούς απόπτωσης, αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα, επαγωγή σχηματισμού νεοαγγείων κ.α. (W. K. Hong et al., 2009). Νεότερα μοντέλα προτείνουν ότι οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές αφορούν σε κύτταρα τα οποία προσομοιάζουν στα βλαστικά,

χωρίς ωστόσο να έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά ταυτίζονται με τα βλαστικά κύτταρα του μαστού. Τέλος, έχουν προταθεί μοντέλα καρκινογένεσης τα οποία βασίζονται είτε στη φυσική επιλογή σε επίπεδο σωματικών κυττάρων είτε στην επίδραση του μικροπεριβάλλοντος στο προκαρκινικό κύτταρο (Korkola, 2010).

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η επίπτωση του καρκίνου του μαστού, όπως και με τους περισσότερους επιθηλιακούς καρκίνους, αυξάνει με την ηλικία. Οι καμπύλες έχουν χαρακτηριστική μορφολογία, με απότομη αύξηση μέχρι την εμμηνοπαυσιακή ηλικία και λιγότερο απότομη ή καθόλου αύξηση στη συνέχεια. Η επίπτωση ποικίλει μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, γεγονός το οποίο δεν φαίνεται ότι καθορίζεται πρωτίστως από διαφορές στη γενετική προδιάθεση. Όπως προκύπτει από μελέτες πληθυσμών μετακινούμενων από περιοχές χαμηλής επίπτωσης σε περιοχές υψηλής επίπτωσης, ο μετακινούμενος πληθυσμός προσεγγίζει τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού της χώρας υποδοχής σε μία ή δύο γενεές (Balzi et al., 1993; Kliewer & K. R. Smith, 1995), γεγονός το οποίο υποδηλώνει τη σημαντικότητα των περιβαλλοντικών παραγόντων (διατροφή, αναπαραγωγικοί παράγοντες και διαταραχή της ισορροπίας ορμονών, αλκοόλ κ.α.) στην παθογένεια της νόσου (πίνακας 1).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΜΑΣΤΟΥ

Οι κακοήθεις αλλά και οι καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού χαρακτηρίζονται από το επίπεδο του δικτύου των πόρων εντός του οποίου εμφανίζονται (Πίνακας 2). Ωστόσο, οι πλειονότητα των επιθηλιακών αλλοιώσεων αφορούν τις ΤΠΛΜ (Wellings et al., 1975). Λόγω της κλασσικής ονοματολογίας των αλλοιώσεων (π.χ. πορογενές και λοβιακό καρκίνωμα, λοβιακή υπερπλασία), προκύπτει μια σχετική σύγχυση καθότι αυτοί οι όροι περιγράφουν αλλοιώσεις οι οποίες εμφανίζονται στην ίδια περιοχή του μαστού, δηλ. την ΤΠΛΜ. Σύμφωνα με μια θεωρία, αυτή είναι και η περιοχή που εδράζουν βλαστικά κύτταρα και αυτά τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα είναι πιο πιθανό να εξαλλαγούν (Baik et al., 2004; Trichopoulos, Adami, Ekbom, Hsieh, & Lagiou, 2008).

Η πρόοδος της μοριακής ιατρικής και της γενετικής έχει οδηγήσει σε μια νέα κατάταξη, η οποία βασίζεται σε πρότυπα γονιδιακής έκφρασης όπως αυτά προκύπτουν από εκτεταμένες συγκρίσεις διαφορετικών τύπων ιστών σε επίπεδο DNA, mRNA ή πρωτεΐνης. Σύμφωνα με την κατάταξη αυτή ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε πέντε κύριους μοριακούς υπότυπους: αυλικού τύπου Α, αυλικού

τύπου Β, HER2, τύπου φυσιολογικού μαστού και βασικού τύπου (Perou et al., 2000). Αν και υπάρχουν πολλά θέματα τα οποία πρέπει να αποσαφηνιστούν προτού η ταξινόμηση αυτή βρει το δρόμο της στην καθ' ημέρα κλινική πράξη, είναι σίγουρο ότι δίνει μια νέα οπτική στην προσέγγιση του καρκίνου και πιθανά να αποτελέσει μελλοντικά τη βάση για διαχείριση του καρκίνου του μαστού.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (W. K. Hong et al., 2009)

(Α) Μεγάλη αύξηση του κινδύνου

- Μεταλλάξεις BRCA 1 και 2, σύνδρομο Li-Fraumeni
- Αυξανόμενη ηλικία
- Δυτικός τρόπος ζωής
- Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου μαστού ή ωοθηκών σε συγγενείς 1^{ου} βαθμού
- Καλοήθης νόσος του μαστού με άτυπη υπερπλασία
- Έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία

(Β) Μέτρια αύξηση του κινδύνου

- Προηγούμενη διάγνωση καρκίνου του μαστού
- Πρώιμη εμμηναρχή
- Όψιμη εμμηνόπαυση
- Ατοκία ή μεγάλη ηλικία πρώτης κύησης (>30 ετών)
- Υψηλό κοινωνικό-οικονομικό επίπεδο
- Κατανάλωση αλκοόλ
- Παχυσαρκία (μόνο για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες)
- Μη-ευνοϊκή μαστογραφική απεικόνιση παρεγχύματος
- Διάγνωση σαρκώματος μαλακών μορίων σε κόρη ή υιό
- Προηγούμενη διάγνωση καρκίνου ωοθηκών, ενδομητρίου ή παχέος εντέρου

(Γ) Μικρή αύξηση κινδύνου

- Καλοήθης νόσος του μαστού με επιθηλιακή υπερπλασία, αλλά όχι ατυπία
- Χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών (για > 10 έτη)
- Θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης στην εμμηνόπαυση

(Δ) Αμφισβητούμενη αύξηση

- Διακοπή πρώτης κύησης
- Ψυχοσωματικοί παράγοντες
- Διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπη
- Επιπλεγμένο ινοαδένωμα

(Ε) Μείωση του κινδύνου

- Πλήρης κύηση πριν από την ηλικία των 20 ετών
- Πολλές κυήσεις
- Ωοθηκεκτομή πριν από την ηλικία των 45 ετών
- Τακτική άσκηση, ειδικά στη διάρκεια της εφηβείας και της πρώιμης ενήλικης ζωής
- Θηλασμός

(ΣΤ) Καμία επίδραση

- Μειωτική επέμβαση στον μαστό

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 Ιστολογική ταξινόμηση επιθηλιακών όγκων του μαστού κατά τον Π.Ο.Υ. (A. F. Tavassoli & Devilee, 2003)
Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα, μη ειδικού τύπου (not otherwise specified – NOS) • μεικτού τύπου • πλειόμορφο • με γιγαντοκύτταρα τύπου οστεοκλαστών • με μελανωτικούς χαρακτήρες
Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα
Σωληνώδες καρκίνωμα
Διηθητικό ηθμοειδές καρκίνωμα
Μυελοειδές καρκίνωμα
Βλεννώδες καρκίνωμα και άλλοι όγκοι πλούσιοι σε βλέννη • βλεννώδες • κυσταδενοκαρκίνωμα και βλεννώδες καρκίνωμα από κυλινδρικά κύτταρα • καρκίνωμα με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου
Νευροενδοκρινείς όγκοι • συμπαγείς νευροενδοκρινείς • άτυπο καρκινοειδές • μικροκυτταρικό • από μεγάλα κύτταρα
Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
Διηθητικό μικροθηλώδες καρκίνωμα
Αποκρινές καρκίνωμα
Μεταπλαστικό καρκίνωμα • αμιγή επιθηλιακά μεταπλαστικά καρκινώματα • μεικτά επιθηλιακά/μεσεγχυματικά μεταπλαστικά καρκινώματα
Καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια
Εκκριτικό καρκίνωμα
Ογκοκυτταρικό καρκίνωμα
Αδενοκυστικό καρκίνωμα
Κυψελιδικό καρκίνωμα
Καρκίνωμα από διαυγή κύτταρα πλούσια σε γλυκογόνο
Σμηγματογόνο καρκίνωμα
Φλεγμονώδες καρκίνωμα
Λοβιακό *in situ* καρκίνωμα (LCIS)
Ενδοπορικές υπερπλαστικές αλλοιώσεις • απλή υπερπλασία πόρων • επίπεδη επιθηλιακή ατυπία • άτυπη υπερπλασία πόρων • πορογενές *in situ* καρκίνωμα (DCIS) (χαμηλής, μέτριας, υψηλής διαφοροποίησης)
Μικροδιηθητικό καρκίνωμα
Ενδοπορικά θηλώδη νεοπλάσματα • κεντρικό θηλώδες • περιφερικό θηλώδες • άτυπο θηλώδες • ενδοπορικό θηλώδες καρκίνωμα • ενδοκυστικό θηλώδες καρκίνωμα
Καλοήθεις υπερπλαστικές αλλοιώσεις • αδένωση • αδενώματα • ακτινωτή ουλή

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Η σταδιοποίηση παρέχει μια τυποποίηση για την ομοιόμορφη ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ των κλινικών ιατρών όσον αφορά στην έκταση της νόσου και αποτελεί τη βάση για την επιλογή των θεραπευτικών προσεγγίσεων και πιθανών συμπληρωματικών θεραπειών. Επιπλέον, αποτελεί εργαλείο των ερευνητών, επιτρέποντας τη διαστρωμάτωση των ασθενών (Greene & Sobin, 2008). Στην προσπάθεια ανάπτυξης ενός συστήματος σταδιοποίησης, αναπτύχθηκε η ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού κατά TNM (Πίνακας 4). Η αύξηση του όγκου (T) της πρωτοπαθούς εστίας συνοδεύεται από προσβολή των λεμφαδένων (N) και εμφάνιση μεταστάσεων (M). Η απλή αυτή σχηματοποίηση της σταδιοποίησης είναι ο στόχος του συστήματος TNM και επιτυγχάνει μια σχετικά ακριβή περιγραφή και καταγραφή της ανατομικής έκτασης της νόσου. Για πρακτικούς λόγους γίνεται περαιτέρω ομαδοποίηση σε στάδια (Πίνακας 3).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 Σταδιοποίηση (NCCN, 2011)

ΣΤΑΔΙΟ	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ

Αν και θεωρείται πως δεν είναι δυνατό να εφαρμοστεί απόλυτα σε όλες τις περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού ένα ενιαίο σύστημα ταξινόμησης, λόγω της μεγάλης πλειομορφίας τους, σήμερα το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο σύστημα προσδιορισμού του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας είναι το τροποιημένο κατά Nottingham σύστημα Bloom-Richardson (Πίνακας 5).

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 Ταξινόμηση κατά TNM (NCCN, 2011)

Όγκος (Tumor – T): πέντε τιμές στην ταξινόμηση του όγκου (Tis, T1, T2, T3 ή T4), οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία ή απουσία διηθητικού καρκίνου, από τις διαστάσεις του διηθητικού καρκίνου και από την παρουσία ή απουσία διήθησης εκτός μαστού (π.χ. στο δέρμα του μαστού, στου μυς ή στις πλευρές). Οι ορισμοί της ταξινόμησης είναι οι ίδιοι και για κλινική και για παθολογοανατομική ταξινόμηση. Εάν η μέτρηση έχει γίνει μέσω κλινικής εξέτασης, χρησιμοποιούνται οι μείζονες επικεφαλίδες (T1, T2 ή T4). Εάν χρησιμοποιηθούν άλλες μετρήσεις, είτε μαστογραφικές είτε παθολογοανατομικές, μπορεί να γίνει περαιτέρω ταξινόμηση στις υποομάδες του T1:

- Tx – ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αποτιμηθεί
- T0 – καμία απόδειξη παρουσίας πρωτοπαθούς όγκου
- Tis – καρκίνωμα in situ.
  - Tis (DCIS) - πορογενές καρκίνωμα in situ.
  - Tis (LCIS) - λοβιακό καρκίνωμα in situ.
  - Tis (Paget's) – νόσος Paget's της θηλής χωρίς όγκο.
- T1 – όγκος 2 εκ. ή μικρότερος στη μεγαλύτερη διάσταση.
  - T1mic – μικροδιηθητικός 0.1 εκ. ή μικρότερος στη μεγαλύτερη διάσταση.
  - T1a – όγκος μεγαλύτερος από 0.1 εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 0.5 εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση.
  - T1b - όγκος μεγαλύτερος από 0.5 εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 1.0 εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση.
  - T1c - όγκος μεγαλύτερος από 1.0 εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 2.0 εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση.
- T2 - όγκος μεγαλύτερος από 2.0 εκ. αλλά όχι μεγαλύτερος από 5.0 εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση.
- T3 - όγκος μεγαλύτερος από 5 εκ. στη μεγαλύτερη διάσταση.
- T4 – όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση σε (α) θωρακικό τοίχωμα ή (β) δέρμα όπως περιγράφεται παρακάτω:
  - T4a – επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα (δεν περιλαμβάνεται ο μείζον θωρακικός μυς).
  - T4b – οίδημα (συμπεριλαμβανομένης της όψης φλοιού πορτοκαλιού) ή εξέλκωση του δέρματος του μαστού ή δορυφόροι δερματικοί όζοι περιορισμένοι στον ίδιο μαστό.
  - T4c - και T4a και T4b.
  - T4d – φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού

Λεμφαδένες (Lymph node – N): τέσσερεις τιμές στην ταξινόμηση της λεμφαδενικής συμμετοχής (N0, N1, N2 ή N3), οι οποίες εξαρτώνται από τον αριθμό, το μέγεθος και την εντόπιση των προσβεβλημένων λεμφαδένων. Σε περίπτωση λεμφαδενικής εξαίρεσης (με ή χωρίς δορυφόρο λεμφαδένα), η ταξινόμηση της λεμφαδενικής συμμετοχής γίνεται παθολογοανατομικά (pN - δεν περιλαμβάνεται στον πίνακα):

- Nx – οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αποτιμηθούν. Πιθανόν λόγω προηγούμενης αφαίρεσης.
- N0 – χωρίς μετάσταση στους επιχώριους λεμφαδένες.
- N1 – μετάσταση σε κινητούς επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού.
- N2 - μετάσταση σε καθηλωμένους επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή μετάσταση, κλινικά ανιχνεύσιμη, σε έσω μαστικούς λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού, απουσία κλινικά εμφανών προσβεβλημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων.
  - N2a - μετάσταση σε ομόπλευρους καθηλωμένους επιχώριους μασχαλιαίους λεμφαδένες
  - N3b - μετάσταση κλινικά ανιχνεύσιμη σε έσω μαστικούς λεμφαδένες ομόπλευρα του προσβεβλημένου μαστού, απουσία κλινικά εμφανών προσβεβλημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων
- N3 - μετάσταση σε ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες με ή χωρίς συμμετοχή μασχαλιαίων λεμφαδένων ή κλινικά εμφανής προσβολή ομόπλευρων έσω μαστικών λεμφαδένων, παρουσία κλινικά εμφανών μασχαλιαίων λεμφαδένων ή μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες με ή χωρίς προσβολή μασχαλιαίων ή έσω μαστικών λεμφαδένων.
  - N3a - μετάσταση σε ομόπλευρους υποκλείδιους λεμφαδένες
  - N3b - κλινικά εμφανής προσβολή ομόπλευρων έσω μαστικών λεμφαδένων, παρουσία κλινικά εμφανών μασχαλιαίων λεμφαδένων
  - N3c - μετάσταση σε ομόπλευρους υπερκλείδιους λεμφαδένες

Μεταστάσεις (Metastases – M): δύο τιμές στην ταξινόμηση των μεταστάσεων (M0 ή M1), οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία ή την απουσία των καρκινικών κυττάρων σε περιοχές εκτός μαστού και λεμφαδένων (απομακρυσμένες μεταστάσεις, π.χ. οστά ή πνεύμονες).

- Mx – η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων δεν μπορεί να αποτιμηθεί
- M0 – απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M1 – παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Παράμετροι που καθορίζουν τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (Grade) (Elston & Ellis, 1991, 2002)	
Σωληνώδεις σχηματισμοί (% όγκου που αποτελείται από σωληνώδεις δομές)	Βαθμός
> 75%	1
10 - 75 %	2
< 10%	3
Πυρηνική πλειομορφία	Βαθμός
Μικρά ομοιόμορφα κύτταρα	1
Μέτρια αύξηση μεγέθους και ποικιλομορφία	2
Έντονη ποικιλομορφία	3
Αριθμός μιτώσεων	Βαθμός
≤ 7	1
8 - 14	2
> 15	3
Σημ.: Ανάλογα με το άθροισμα της παραπάνω βαθμολογίας προκύπτει ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας: βαθμός κακοήθειας I (άθροισμα 3 – 5), βαθμός κακοήθειας II (άθροισμα 6 – 7) και βαθμός κακοήθειας III (άθροισμα 8 – 9)	

IN SITU ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Ως *in situ* χαρακτηρίζεται ένα καρκίνωμα του μαστού με πολλαπλασιασμό κακοήθων επιθηλιακών κυττάρων εντός της ΤΠΛΜ, για το οποίο η οπτική μικροσκοπία δεν αναδεικνύει ρήξη της βασικής μεμβράνης με διήθηση του παρακείμενου στρώματος. Υπάρχουν δύο μορφές in situ καρκινώματος, το λοβιακό (LCIS) και το πορογενές (DCIS). Το LCIS συνήθως ανακαλύπτεται σε περιεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κατά τη βιοψία για κάποια άλλη αλλοίωση, δεν έχει κλινικούς χαρακτήρες και συχνά ούτε μαστογραφικούς ενώ δεν θεωρείται προκαρκινική κατάσταση. Ωστόσο, σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου οποιουδήποτε τύπου και στους δύο μαστούς και συνήθως πολλά χρόνια αργότερα (Bratthauer & F. A. Tavassoli, 2002; DeLellis, 2004). Το DCIS αποτελεί μια ετερογενή ομάδα προκαρκινικών αλλοιώσεων, συνήθως ασυμπτωματικών και μη ψηλαφητών, οι οποίες ενίοτε αναδεικνύονται μαστογραφικά ως εστίες μικροαποτιτανώσεων (R. Holland et al., 1994). Έχουν προταθεί διάφορα συστήματα ταξινόμησής τους, όπως βάσει του βαθμού κακοήθειας (χαμηλού, μέσου και υψηλού βαθμού κακοήθειας) ή των ιστολογικών χαρακτηριστικών (φαγεσορικό, συμπαγές, μικροθηλωματώδες, ηθμοειδές, από διαυγή κύτταρα κ.α.) (Jaffer & Bleiweiss, 2002).

ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού αποτελούν μια ομάδα κακοήθων επιθηλιακών όγκων οι οποίοι χαρακτηρίζονται από διήθηση παρακείμενων δομών και τάση για μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές. Ως επί το πλείστον εμφανίζονται στην ΤΠΛΜ, η πλειονότητά τους είναι αδενοκαρκινώματα και εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος μορφολογικών φαινοτύπων και ιστολογικών τύπων. Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (μη ειδικού τύπου – NOS) συνίσταται σε μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων και είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνωμα του μαστού (40 - 75%) (Fabbri, Carcangiu, & Carbone, 2007). Απαντάται συνήθως σε γυναίκες άνω των 40 ετών, δεν έχει συγκεκριμένα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά (μέγεθος, σχήμα, αρχιτεκτονική, στρώμα, μορφολογία κυττάρων κ.α.) ενώ μπορεί να συνυπάρχει με DCIS. Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα συνιστά 5 έως 15% των διηθητικών καρκινωμάτων και συχνά είναι πολυεστιακό και αμφοτερόπλευρο (D. J. Winchester et al., 1998). Χαρακτηρίζεται από ασαφή όρια, από μη έκφραση E-καντχερίνης, ενώ εμφανίζει διάφορους τύπους όπως το κλασσικό, το συμπαγές, το κυψελιδικό, το πλειόμορφο και το μεικτό (Fabbri et al., 2007). Όλοι οι τύποι μπορεί να συνδυάζονται με LCIS και σε σχέση με το DCIS απαντάται πιο συχνά σε ηλικιωμένες γυναίκες, έχει μεγαλύτερο μέγεθος και είναι συχνότερα θετικό σε οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς, αλλά εμφανίζει σπανιότερα έκφραση HER-2, p53 και EGFR (Cocquyt & Belle, 2005).

ΔΙΑΛΟΓΗ - ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΠΕΛΑΣΗ

Η διαλογή (screening) συνίσταται στον έλεγχο ασυμπτωματικών ασθενών για παρουσία υποκλινικής (occult) νόσου. Για τον καρκίνο του μαστού, η διαλογή βασίζεται στον τακτικό μαστογραφικό έλεγχο. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Αμερικανικής Εταιρείας Καρκίνου (ACS), οι γυναίκες άνω των 20 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε φυσική εξέταση ανά 3 χρόνια από τον ιατρό τους. Μετά την ηλικία των 40 ετών ξεκινά ο ετήσιος έλεγχος με μαστογραφία, της οποίας θα πρέπει να προηγείται ψηλάφηση των μαστών. Καθορισμένο ηλικιακό όριο για τη διακοπή του ετήσιου μαστογραφικού ελέγχου δεν έχει οριστεί. Η αυτοεξέταση πλέον δεν περιλαμβάνεται στις καθιερωμένες κατευθυντήριες οδηγίες. (R. A. Smith, Cokkinides, & Brawley, 2009). Οι οδηγίες αυτές αφορούν ασυμπτωματικές γυναίκες με μέσο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Στην περίπτωση γυναικών με βεβαρημένο ιστορικό (π.χ. ακτινοβόληση στα πλαίσια non-Hodgkin λεμφώματος,

βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό, γνωστή μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA1) οι οδηγίες αλλάζουν.

Η μαστογραφία αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο διαλογής καθότι αναδεικνύει βλάβες μικρού μεγέθους και πρώιμου σταδίου, επιτρέποντας λιγότερο επιθετικές χειρουργικές παρεμβάσεις, λιγότερο επιθετικές συμπληρωματικές θεραπείες και μεγαλύτερο εύρος θεραπευτικών επιλογών. Επίσης επιτυγχάνει μείωση της θνησιμότητας.

Οι διάφορες απεικονιστικές μέθοδοι ενδείκνυνται σε διαφορετικές περιπτώσεις. Η μαστογραφία διαλογής αποτελεί την ενδεδειγμένη μέθοδο για γυναίκες χωρίς σημεία ή συμπτώματα καρκίνου του μαστού. Όταν η εξέταση διαλογής αναδείξει παθολογικά ή διφορούμενα αποτελέσματα ή εάν ο ασθενής εμφανίζει κάποιο σύμπτωμα θα πρέπει να γίνεται περαιτέρω χαρακτηρισμός της βλάβης με τη βοήθεια μεθόδων όπως της διαγνωστικής μαστογραφίας, των υπερήχων και της μαγνητικής τομογραφίας. Η διαγνωστική μαστογραφία συνίσταται σε ειδικές λήψεις για καλύτερη απεικόνιση συγκεκριμένων περιοχών ενδιαφέροντος, εντοπιστικές λήψεις για απομάκρυνση επιπροβαλλόμενου παρεγχύματος ή μεγεθυντικές λήψεις για καλύτερο χαρακτηρισμό βλαβών (π.χ. μικροαποτιτανώσεων). Σε περιπτώσεις γνωστού καρκίνου του μαστού, η διαγνωστική μαστογραφία βοηθά στην εντόπιση επιπλέον εστιών, στον ίδιο ή στον άλλο μαστό (Barlow et al., 2002). Ο υπέρηχος δεν περιλαμβάνεται στα πρωτόκολλα διαλογής (W. A. Berg et al., 2008). Η στοχευμένη υπερηχογραφική εκτίμηση χρησιμοποιείται για να αξιολογηθούν συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος. Σε συνδυασμό με τη διαγνωστική μαστογραφία εκτιμά μάζες, ψηλαφητά ευρήματα, ασυμμετρίες παρεγχύματος και εστιακές διαταραχές αρχιτεκτονικής. Ο υπέρηχος μαστού μπορεί να διακρίνει αξιόπιστα κυστικές από συμπαγείς αλλοιώσεις και χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση κατευθυνόμενων βιοψιών ύποπτων αλλοιώσεων. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) μαστού αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, η οποία αποτελεί μέρος της διαλογής για καρκίνο του μαστού μόνο σε γυναίκες υψηλού κινδύνου (Saslow et al., 2007). Οι κλινικές ενδείξεις για χρήση της MRI είναι πολλές, χωρίς ωστόσο η χρήση της να αντικαθιστά την εφαρμογή της διαγνωστικής μαστογραφίας και των υπερήχων, ενώ μια αρνητική MRI δεν αποκλείει την αναγκαιότητα βιοψίας αν υπάρχουν ύποπτα ευρήματα στη μαστογραφία και στους υπερήχους. Σε πιο ειδικές περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες, πιο εξειδικευμένες μέθοδοι απεικόνισης, όπως η

μαγνητική φασματοσκοπία και η συμβατική ή μαγνητική ελαστογραφία (Itoh et al., 2006; S. Sinha & U. Sinha, 2009).

Η μαστογραφία, η οποία αποτελεί τον πυρήνα της διαγνωστικής προσέγγισης του καρκίνου του μαστού, ενώ αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο διαλογής, πρακτικά σπάνια είναι διαγνωστική. Παρά την ικανότητά της να αναδεικνύει πρωιμότερου σταδίου, μη ανιχνεύσιμο καρκίνο του μαστού, η μεγάλη επικάλυψη στα μαστογραφικά χαρακτηριστικά μεταξύ καλοήθων και κακοήθων αλλοιώσεων, συχνά καθιστά αδύνατο το χαρακτηρισμό κάποιου ευρήματος. Όταν λοιπόν, ακόμα και μετά την εφαρμογή συμπληρωματικών απεικονιστικών μεθόδων, η διάγνωση δεν είναι σαφής, κρίνεται απαραίτητη η κυτταρολογική ή η ιστολογική ταυτοποίηση.

ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/ CXCR4

ΓΕΝΙΚΑ

Ο CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) (γνωστός και ως Fusin, CD184, LESTR, Sdf1r, Cmkar4 ή PB-CKR) είναι ένας υποδοχέας ο οποίος συνδέεται με G πρωτεΐνη και εκφράζεται σε μεγάλο εύρος φυσιολογικών ιστών καθώς και σε φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα πολλών ιστών όπως του μαστού. Μοναδικός συνδέτης αυτού του υποδοχέα είναι η χημοκίνη SDF-1 (stromal derived factor 1) γνωστή και ως CXCL12, PBSF, TPAR1, SCYB12), η οποία επίσης εκφράζεται σε ποικίλους φυσιολογικούς ιστούς, όπως το πνευμονικό παρέγχυμα, το ήπαρ, οι λεμφαδένες, ο μυελός των οστών και αλλού. Μέχρι πρόσφατα η αποκλειστικότητα αυτή συνδέτη – υποδοχέα ήταν μοναδική για τις χημοκίνες, όπως προέκυπτε και από μελέτες στις οποίες ποντίκια με εξάλειψη των γονιδίων του SDF-1 και του CXCR4 (knock out) είχαν σχεδόν ταυτόσημο φαινότυπο (Q. Ma et al., 1998). Ωστόσο, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η SDF-1 μπορεί να συνδεθεί και με έναν επιπλέον υποδοχέα με επτά διαμεμβρανικές έλικες, τον CXCR7 (C-X-C chemokine receptor type 7) (X. Sun et al., 2010). Εκτός από τον υποδοχέα CXCR4, η SDF-1 αλληλεπιδρά και με τις γλυκοζαμινογλυκάνες, ικανότητα που επιτρέπει *in vivo* αφενός το σχηματισμό βαθμίδωσης συγκέντρωσης από την καθήλωση της SDF-1 (Sadir, F Baleux, Grosdidier, Imberty, & Lortat-Jacob, 2001) και αφετέρου ολιγομερισμό της SDF-1 μέσω του οποίου ενισχύεται η ενεργότητα του άξονα SDF-1/CXCR4 (Hoogewerf et al., 1997).

Μέχρι τώρα έχουν ανακαλυφθεί έξι ισομορφές της SDF-1: η SDF-1α, η SDF-1β, η SDF-1γ, η SDF-1δ, η SDF-1ε και η SDF-1φ (L. Yu et al., 2006). Η SDF-1α και η SDF-1β αποτελούν τις δύο πιο καλά μελετημένες ισομορφές, με την SDF-1α να αποτελεί την πιο έντονα εκφραζόμενη (Shirozu et al., 1995). Και οι δύο ισομορφές έχουν παρόμοια λειτουργικότητα αλλά όχι ταυτόσημο πρότυπο έκφρασης (Hall & Korach, 2003; Pillarisetti & S K Gupta, 2001; Stumm & Rummel, 2002). Επιπλέον, στο αίμα η SDF-1α, αλλά όχι η SDF-1β, υπόκειται σε πρωτεόλυση με αποτέλεσμα αφενός να μειώνεται η συγγένειά της για τον CXCR4 κατά 50% και αφετέρου η SDF-1β να έχει συγκριτικά μεγαλύτερη δραστικότητα (De La Luz Sierra et al., 2004). Οι υπόλοιπες τέσσερεις, πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσες ισομορφές έχουν διαφορετική ιστική κατανομή και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος τους.

Πέρα από τον κλασσικό ρόλο της ως χημοκίνη (P. M. Murphy, 1994), η SDF-1 μέσω του υποδοχέα της CXCR4, εμπλέκεται φυσιολογικά στην ανάπτυξη, στην οργανογένεση, στην αιμοποίηση και στο σχηματισμό αγγείων, καθώς και σε παθολογικές διεργασίες (π.χ. καρκινογένεση, HIV λοίμωξη κ.α.) (Q. Ma et al., 1998; McGrath, Koniski, Maltby, McGann, & Palis, 1999; Nagasawa, Tachibana, & T. Kishimoto, 1998; Tachibana et al., 1998; Y. R. Zou, Kottmann, Kuroda, Taniuchi, & D R Littman, 1998). Η αλληλεπίδραση SDF-1 – CXCR4 γίνεται σε δύο βήματα: αρχικά η SDF-1 επάγει αλλαγή στη στεροδιαμόρφωση του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να αποκαλύπτεται μια εσοχή στην οποία γίνεται η καθεαυτή, ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ συνδέτη – υποδοχέα (Crump et al., 1997; X. Huang et al., 2003). Στη συνέχεια, επάγεται διμερισμός του υποδοχέα, ενώ υπάρχουν στοιχεία σύμφωνα με τα οποία για την αποτελεσματικότερη λειτουργικότητά του, το σύμπλεγμα υποδοχέα / συνδέτη θα πρέπει να εγκλειστεί σε μια λιπιδική σχεδία (lipid raft) της κυτταρικής μεμβράνης (Manes et al., 2001). Τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των διεργασιών είναι η ενεργοποίηση ποικίλων ενδοκυττάριων μηνυματοδοτικών μονοπατιών [π.χ. ενεργοποίηση στοιχείων τοπικής πρόσδεσης (π.χ. Pyk-2), πρωτεϊνικής κινάσης C, φωσφολιπάσης C-γ (PKC-γ), άξονα MAPK p42/44-ELK-1 και PI-3K-AKT-NF-κB κ.α.], μέσω των οποίων επάγεται πλήθος βιολογικών δράσεων όπως η κινητικότητα, η χημειοταξία και η προσκόλληση των θετικών για CXCR4 κυττάρων (Kucia et al., 2004).

Η έκφραση και η λειτουργικότητα του CXCR4 ρυθμίζεται αφενός σε μεταγραφικό επίπεδο υπό την επίδραση ενδοκυττάριων δευτερογενών διαβιβαστών (π.χ. ασβέστιο,

cAMP), κυτταροκινών (π.χ. IL-2, IL-4, TGF-1β, TNF-α) και αυξητικών παραγόντων (π.χ. bFGF, VEGF) και αφετέρου σε μεταφραστικό επίπεδο με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ. γλυκοζυλίωση) (Busillo & Benovic, 2007). Επιπλέον, ο CXCR4 υπόκειται σε περαιτέρω έλεγχο μέσω της απευαισθητοποίησης (ομόλογης ή ετερόλογης), της ενδοκυττάρωσης και της αποδόμησης. Η σύνδεση της SDF-1 με τον CXCR4 επάγει τη φωσφορυλίωση αυτού σε συγκεκριμένα αμινοξέα (ομόλογη απευαισθητοποίηση) και την μετατόπιση του στο εσωτερικό του κυττάρου, καθιστώντας τον μη περαιτέρω προσβάσιμο σε μόρια της SDF-1. Η απευαισθητοποίηση του CXCR4 μπορεί να είναι και ετερόλογη, μέσω συγκεκριμένων κινασών, οι οποίες ενεργοποιούνται από δευτερογενείς διαβιβαστές και οδηγεί τελικά σε ενδοκυττάρωση του υποδοχέα (Haribabu et al., 1997; Orsini, Parent, Mundell, Marchese, & Benovic, 1999; Signoret et al., 1997, 1998). Μετά την ενδοκυττάρωσή του, ο CXCR4 έχει δύο εναλλακτικές: είτε να επιστρέψει στην κυτταρική μεμβράνη είτε να οδηγηθεί προς αποδόμηση, όπως συμβαίνει συνήθως μετά από διέγερση από την SDF-1 (Tarasova, Stauber, & Michejda, 1998). Η διεργασία ουβικουιτίνωσης και καθοδήγησης του CXCR4 στο λυσόσωμα προς αποδόμηση, διαμεσολαβείται από την E3 λιγάση ουβικουιτίνης AIP4 (E3 ubiquitin ligase AIP4) (Marchese & Benovic, 2001; Marchese et al., 2003). Θα πρέπει, τέλος, να επισημανθεί ότι νέα δεδομένα δείχνουν πως ο ομο-ολιγομερισμός και ο ετερο-ολιγομερισμός του CXCR4 αποτελούν έναν επιπλέον μηχανισμό τροποποίησης και ρύθμισης της μηνυματοδότησης μέσω του CXCR4 (Busillo & Benovic, 2007), ο οποίος για ορισμένους ερευνητές εμπλέκεται σημαντικά στην παθοφυσιολογία του καρκίνου (J. B. Rubin, 2009).

Η πορεία αυτή του CXCR4 μετά την ενεργοποίησή του, από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα έχει οδηγήσει ορισμένους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η κυτταροπλασματική εντόπιση του CXCR4 σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες είναι ενδεικτική ενεργοποίησης του άξονα SDF-1/CXCR4 (F. Liu et al., 2009; O Salvucci et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, πολλές ανοσοϊστοχημικές μελέτες αναφέρουν και πυρηνική εντόπιση του CXCR4 (Cabioglu, A. Sahin, Doucet, et al., 2005; L. Hao et al., 2007; Kato, Kitayama, Kazama, & Nagawa, 2003; F. Liu et al., 2009; Marini et al., 2007; O Salvucci et al., 2006; Y. C. Su et al., 2006), χωρίς ωστόσο να μπορεί να εξηγηθεί η βιολογική σημασία αυτού του ευρήματος. Μόνο οι Shim και συν. έδειξαν μέσω συνεστιακής (confocal) μικροσκοπίας ότι η σύνδεση SDF-1 / CXCR4 επάγει

μετατόπιση του CXCR4 και στον πυρήνα, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις SDF-1 (Shim et al., 2006).

ΑΞΟΝΑΣ SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η έκφραση του CXCR4 έχει ανιχνευτεί σε πάνω από 23 τύπους καρκίνου (F. Balkwill, 2004) και αποτελεί τον πιο συχνά εκφραζόμενο υποδοχέα χημοκινών σε καρκινικά κύτταρα (Zlotnik, 2006). Η επαγωγή της έκφρασης του CXCR4 στον καρκίνο έχει αποδοθεί από πολλούς ερευνητές στις υποξικές συνθήκες κατά την καρκινογένεση, λόγω του ανεπαρκούς για τον αναπτυσσόμενο όγκο αγγειακού δικτύου και των αλλαγών στην ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου των κυττάρων (K. Hirota & G. L. Semenza, 2006). Κομβικό ρόλο στις διεργασίες τις οποίες επάγει η υποξία κατέχει ο HIF-1, καθώς και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη von Hipple Lindau (VHL), η οποία εμπλέκεται στην αποδόμηση του HIF-1 (Schioppa et al., 2003; Staller et al., 2003; Zagzag et al., 2005).

Εκτός από τον HIF-1, και άλλοι παράγοντες έχουν την ικανότητα να ενισχύουν την έκφραση του CXCR4 ειδικά κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, ο VEGF (Bachelder, M. A. Wendt, & Mercurio, 2002) ή ο NF-κB (Helbig et al., 2003) ενισχύουν την έκφραση του CXCR4 σε καρκίνο του μαστού ενισχύοντας τη διεισδυτικότητα και τη μεταστατικότητα, αντίστοιχα. Το ογκογονίδιο RET/PTC, από την άλλη πλευρά, επάγοντας την έκφραση του CXCR4 ενισχύει την ικανότητα μετασχηματισμού των καρκινικών κυττάρων του μαστού (Castellone et al., 2004). Ωστόσο, στα πλαίσια του καρκίνου η αυξημένη έκφραση του CXCR4 δεν σχετίζεται αποκλειστικά με αλλαγές στη μεταγραφή και την έκφραση αλλά και με τροποποίηση των διεργασιών αποδόμησής του μέσω ουβικουιτίνωσης. Σε καρκινικά κύτταρα μαστού τα οποία εκφράζουν HER2/neu παρατηρείται αύξηση των επιπέδων CXCR4 λόγω αναστολής του ουβικουιτίνωσης. Αυτή η δράση ήταν δυνατό να ανασταλεί μέσω έκφρασης της AIP4, της υπεύθυνης για την ουβικουιτίνωση E3 λιγάσης (Y. M. Li, Pan, et al., 2004). Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η δράση αυτή του HER2/neu θα μπορούσε να σχετίζεται με την ικανότητα της κινάσης CISK να συνδέεται και να αναστέλλει τη δράση της AIP4 (Slagsvold, Marchese, Brech, & Stenmark, 2006).

Οι πολλαπλοί φυσιολογικοί ρόλοι του άξονα SDF-1/CXCR4 έχουν ως αποτέλεσμα και αντίστοιχες πολλαπλές δράσεις κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Λόγω της δράσης της SDF-1 ως χημειοτακτικού παράγοντα, προέκυψε η υπόθεση ότι ο CXCR4

σχετίζεται με τις μεταστάσεις. Η σύνδεση SDF-1 / CXCR4 επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και το σχηματισμό ψευδοπόδιων, συμβάλλοντας στις χημειοτακτικές και διηθητικές αποκρίσεις των καρκινικών κυττάρων (Muller et al., 2001). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του CXCR4 διεγείρει την παραγωγή των MMP, όπως της MMP9, πιθανόν διευκολύνοντας τα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν από την πρωτοπαθή εστία (Fernandis, Prasad, Band, Klosel, & Ganju, 2004; Janowska-Wieczorek, Marquez, Dobrowsky, M. Z. Ratajczak, & Cabuhat, 2000; Samara et al., 2004).

Επιπλέον, η SDF-1 ενισχύει την δραστηριότητα των ιντεγκρινών και κατ' επέκταση την ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται υπό συνθήκες ροής (Campbell et al., 1998; A. M. Glodek, Honczarenko, Y. Le, Campbell, & Silberstein, 2003; N. Wright et al., 2002). Αν όντως ο CXCR4 διαμεσολαβεί στη μεταστατικότητα των καρκινικών κυττάρων, μετά την είσοδό τους στο αίμα ή στο λεμφικό σύστημα, τα κύτταρα αυτά θα τείνουν να μεταναστεύσουν και να προσκολλώνται σε περιοχές με αυξημένη έκφραση της SDF-1. Οι τρέχουσες θεωρίες για τον τροπισμό των καρκινικών κυττάρων σε περιοχές με αυξημένη έκφραση SDF-1 βασίζονται στα δεδομένα μελετών για τις κατευθυνόμενες μετακινήσεις των λευκοκυττάρων (Kucia et al., 2005; P. M. Murphy, 2001). Οι καθηλωμένες στο ενδοθήλιο, μέσω των πρωτεογλυκανών θειικής ηπαρίνης, χημοκίνες κατευθύνουν την κύλιση και προσκόλληση των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων. Σε περιοχές με χαμηλή συγκέντρωση χημοκινών επάγεται ετεροδιμερισμός των υποδοχέων των χημοκινών, επάγοντας την προσκόλληση του κυττάρου στο ενδοθήλιο. Όταν το κύτταρο βρεθεί κοντά σε πηγή υψηλής συγκέντρωσης χημοκίνης, επάγεται ο ομοδιμερισμός του υποδοχέα, ενεργοποιούνται διαφορετικά μηνυματοδοτικά μονοπάτια και το κύτταρο μεταναστεύει προς την περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε χημοκίνη (Rodriguez-Frade, Mellado, & Martinez-A, 2001).

Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, οι μεταστάσεις εντοπίζονται σε περιοχές οι οποίες φυσιολογικά εμφανίζουν υψηλή έκφραση της SDF-1, όπως τα οστά, οι λεμφαδένες, οι πνεύμονες, ο εγκέφαλος και το ήπαρ (Muller et al., 2001; Polyak, 2004). Σε μελέτη της συμβολής του άξονα SDF-1/CXCR4 στις εγκεφαλικές μεταστάσεις από καρκίνο του μαστού, διαπιστώθηκε ότι ο άξονας αυτός εμπλέκεται αφενός στην αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και αφετέρου στη διενδοθηλιακή μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων (B. C. Lee, T. H. Lee, S. Avraham, & H. K. Avraham, 2004). Αντιστοίχως, αντισώματα εναντίον του CXCR4 (Muller et al.,

2001) ή η γενετική αποσιώπηση αυτού (siRNA knock down) αναστέλλουν τη μεταστατική ικανότητα και την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού (Lapteva, A. G. Yang, Sanders, Strube, & S. Y. Chen, 2005; Z. Liang et al., 2005). Παρόμοιο τροπισμό για περιοχές με αυξημένη έκφραση της SDF-1 εμφανίζουν και κύτταρα άλλων συμπαγών και αιματολογικών νεοπλασιών (π.χ. θυρεοειδούς, πνεύμονα, ήπατος κ.α.) (M. Burger et al., 2003; Geminder et al., 2001; J. H. Hwang et al., 2003; Kijima et al., 2002; Schimanski et al., 2006), χωρίς ωστόσο να υπάρχει συμφωνία για τη συσχέτιση της έκφρασης του CXCR4 με το μεταστατικό δυναμικό. Ενώ η έκφραση του CXCR4 αυξάνει με την επιθετικότητα των όγκων του προστάτη (Y. X. Sun et al., 2003), σε μελέτες στον καρκίνο του μαστού βρέθηκε μεν πιο εκτεταμένη λεμφαδενική συμμετοχή σε κύτταρα με αυξημένη έκφραση CXCR4, δεν προέκυψε, ωστόσο, συσχετισμός μεταξύ έκφρασης του CXCR4 και απομακρυσμένης μεταστατικής νόσου (Kato et al., 2003; Y. C. Su et al., 2006). Όσον αφορά στη λεμφαδενική συμμετοχή, και άλλες ανοσοϊστοχημικές μελέτες δίνουν παρόμοια αποτελέσματα (E Blot et al., 2008; L. Hao et al., 2007; Kang et al., 2005; O Salvucci et al., 2006; Woo, Bae, C. H. Kim, J. B. Lee, & Koo, 2008; Yasuoka et al., 2008), σύμφωνα με τα οποία η έκφραση του CXCR4 στην πρωτοπαθή εστία πιθανόν σχετίζεται με λεμφαδενική μεταστατική νόσο. Αντίθετα, μια άλλη μελέτη σε καρκίνο μαστού Τ1 έδειξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ πυρηνικής έκφρασης του CXCR4 και λεμφαδενικής προσβολής (Cabioglu, Yazici, et al., 2005).

Η αυξημένη έκφραση της SDF-1 σε πρωτοπαθείς εστίες καρκίνου (π.χ. μαστού, λεμφωμάτων, ωοθήκης κ.α.) καθώς και η φυσιολογική έκφραση του CXCR4 σε ορισμένες περιοχές (π.χ. επιθήλιο παχέος εντέρου) (Corcione et al., 2000; Jordan et al., 1999; Koshiba et al., 2000; Scotton et al., 2002; Y. Zhou, P. H. Larsen, C. Hao, & Yong, 2002), περιπλέκουν περαιτέρω τα πράγματα. Κατά συνέπεια, η αλληλεπίδραση SDF-1/ CXCR4 πιθανόν διατηρεί τα καρκινικά κύτταρα στην πρωτοπαθή εστία και για να επιτευχθεί η απαγκίστρωση των κυττάρων από αυτή να απαιτούνται επιγενετικές αλλαγές ώστε να κατασταλεί η έκφραση ενός ή και των δύο μορίων. Για παράδειγμα, μια μελέτη έδειξε ότι η μεθυλίωση του υποκινητή της SDF-1 προάγει τη μεταστατικότητα σε όγκους του παχέος εντέρου καθώς η μειωμένη έκφραση της SDF-1 στην πρωτοπαθή εστία πιθανόν να σχετίζεται με αυξημένη μεταστατικότητα λόγω αυξημένης απόκρισης των καρκινικών κυττάρων στην εξωγενή SDF-1 (M. K. Wendt et al., 2006).

Εκτός αυτού, ο άξονας SDF-1 / CXCR4 εμπλέκεται και στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσολογική εποπτεία του ξενιστή με τρόπο ανάλογο αυτού του HIV-1. Σε μικρές συγκεντρώσει η SDF-1 έλκει τα Τ κύτταρα ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα απωθεί (M C Poznansky et al., 2000). Σε μελέτες με κυτταρικές σειρές λευχαιμίας και μελανώματος έχει διαπιστωθεί ότι η χαμηλή συγκέντρωση της SDF-1 ασκεί αντικαρκινική δράση, γεγονός που αποδόθηκε στη χημειοτακτική έλξη των Τ κυττάρων (Dunussi-Joannopoulos et al., 2002; Vianello et al., 2006). Επιπλέον, η SDF-1 ασκεί και αποπτωτική δράση στα Τ κύτταρα (Colamussi et al., 2001).

Ενδιαφέρουν έχουν επίσης μελέτες σύμφωνα με τις οποίες σε ορισμένους καρκίνους του μαστού η έκφραση και η λειτουργικότητα του CXCR4 δεν συνδέονται (J. D. Holland et al., 2006). Μετά από μελέτη διάφορωνν κυτταρικών σειρών διαπιστώθηκε ότι η έκφραση καθεαυτή του υποδοχέα δεν προσδίδει διηθητικό φαινότυπο και πιθανολογείται ότι υπάρχουν τροποποιήσεις στη σύνδεση του υποδοχέα με τη G πρωτεΐνη. Από το σύνολο των κυτταρικών σειρών, ενώ όλες εξέφραζαν το CXCR4, μόνο οι μεταστατικές καρκινικές σειρές είχαν λειτουργικό υποδοχέα. Παρομοίως, τα Β λεμφοκύτταρα καθώς ωριμάζουν παύουν σταδιακά να αποκρίνονται στον SDF-1 παρόλο που εκφράζουν σε υψηλό βαθμό τον CXCR4 (Fedyk, Ryyan, Ritterman, & T. A. Springer, 1999; Honczarenko et al., 1999), πιθανά λόγω ανάλογων υποκείμενων μηχανισμών, οι οποίοι ακόμα δεν έχουν αποσαφηνιστεί.

HIF-1

ΓΕΝΙΚΑ

Ο HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων έλικας – βρόγχου – έλικας (helix – loop – helix) (bHLH)-PER-ARNT-Sim (PAS). Κατέχει κομβικό ρόλο στις προσαρμοστικές αποκρίσεις των κυττάρων στη μείωση του οξυγόνου και στην ουσία δρα ως μηνυματοδότης ο οποίος περνά από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφική απόκριση στην υποξία.

Ο HIF-1 αποτελείται από δύο υπομονάδες, την α (HIF-1α) και τη β (HIF-1β), οι οποίες είναι μεταγραφικοί παράγοντες έλικας – βρόγχου – έλικας και οι οποίες συνιστούν σειρά ισομορφών κωδικοποιούμενη από διακριτούς γενετικούς τόπους. Ο HIF-1β συντίθεται συνεχώς και ανεξάρτητα από τα επίπεδα του οξυγόνου, ενώ η

έκφραση του HIF-1α επάγεται από την κυτταρική υποξία καθώς και από κάποια μέταλλα μετάβασης (Co^{2+}, Ni^{2+},Mn^{2+}) και από χήλωση (chelation) του σιδήρου. Στην οικογένεια του HIF-1α ανήκουν επίσης ο HIF-2α και ο HIF-3α, οι οποίοι έχουν δομικές και βιοχημικές ομοιότητες με τον HIF-1α, αλλά διαφορετική ιστική κατανομή.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνωσης, ο HIF-1α διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (G. L. Wang & G. L. Semenza, 1993). Συγκεκριμένα, υπόκειται σε μετα-μεταγραφικό έλεγχο, κατά τον οποίο υδροξυλιώνεται σε συγκεκριμένα υπολείμματα, αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη pVHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein) (Ohh et al., 2000), ένα μέλος του συμπλέγματος ουβικουιτίνωσης E3 και τελικά αποδομείται στο πρωτεάσωμα 26S. Η επαγόμενη από την pVHL αποδόμηση του HIF-1α αποτελεί το πιο σημαντικό μηχανισμό στη φυσιολογική ρύθμιση του HIF-1α. Η απαιτούμενη για την πρόσδεση της pVHL υδροξυλίωση του HIF-1α καταλύεται από τρία ένζυμα προλυλ-υδροξυλάσης (prolyl-hydroxylase domain - PHD), τα οποία για τη δράση τους απαιτούν μεταξύ των άλλων οξυγόνο και σίδηρο. Σε καταστάσεις υποξίας, η δράση των ενζύμων προλυλ-υδροξυλάσης, αναστέλλεται λόγω χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου και κατά συνέπεια η υδροξυλίωση και η σύνδεση με την pVHL εξασθενούν και τα επίπεδα του σταθεροποιημένου HIF-1α αυξάνουν. Με τη βοήθεια της αλληλουχίας πυρηνικής εντόπισης (nuclear localization element - NLE) του HIF-1α , ο HIF-1α μετατοπίζεται στον πυρήνα, ετεροδιμερίζεται με τον HIF-1β και το σύμπλεγμα αυτό προσδένεται σε στοιχεία απόκρισης στην υποξία (hypoxic responsive elements – HREs) τα οποία βρίσκονται πριν από το εκάστοτε ρυθμιζόμενο από την υποξία γονίδιο (hypoxic-regulated gene). Έχει υπολογιστεί ότι περίπου 1% του γονιδιώματος ρυθμίζεται μέσω της υποξίας (G. L. Semenza, 2003). Στη σύνδεση του ετεροδιμερούς HIF-1 με τα HREs συμμετέχει ένας συνενεργοποιητής της μεταγραφής, ο p300/CBP (J. Gu, Milligan, & L. E. Huang, 2001), μέσω του οποίου επιτυγχάνεται ενίσχυση της μεταγραφής των αντίστοιχων γονιδίων (Forsythe et al., 1996; B. H. Jiang, Rue, G. L. Wang, Roe, & G. L. Semenza, 1996). Περαιτέρω ενίσχυση επιτυγχάνεται και από την παρουσία δύο ή περισσοτέρων λειτουργικών παρακείμενων HREs (Ebert & Bunn, 1998).

Συνεργικά με το σύστημα των PHD δρα ο ανασταλτικός του HIF-1 παράγοντας (factor inhibiting HIF-1, FIH-1), ο οποίος παρεμποδίζει τη μεταγραφική δράση του HIF-1α. Μελέτες έχουν δείξει ότι στη ρύθμιση του HIF-1α εμπλέκεται και η p53,

γεγονός σημαντικό για την καρκινογένεση (Ravi et al., 2000). Φαίνεται ότι η p53 επάγει την ουβικουιτίνωση του HIF-1α, μέσω της MDM2, μιας άλλης E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, ενώ η μετάλλαξή της, φαινόμενο συχνό στον καρκίνο, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση και τελικά την αύξηση των επίπεδων του HIF-1α.

Πέρα από την άρση της ουβικουιτίνωσης, τα επίπεδα του HIF-1α μπορούν να αυξηθούν και από αύξηση της μετάφρασής του, μηχανισμός ο οποίος όμως συμβάλει σε πολύ μικρότερο βαθμό στην αύξηση του HIF-1α. Η μετάφραση του HIF-1α, σε συνθήκες φυσιολογικού επιπέδου οξυγόνου, επάγεται από πολλά μόρια όπως η ινσουλίνη, οι IGF 1 και 2, ο EGF, ο FGF2 κ.α. Η αύξηση αυτή διαμεσολαβείται από υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, μέσω των οποίων ενεργοποιούνται ποικίλα μηνυματοδοτικά μονοπάτια (G. L. Semenza, 2002). Τέλος, οι MAP κινάσες μπορούν να ενισχύσουν τη μεταγραφή του HIF-1α, χωρίς να επιδράσουν στη σταθερότητά του (L. E. Huang & Bunn, 2003).

Ο HIF-1 ενεργοποιεί πάνω από 60 γονίδια στόχους, όπως του VEGF, της ερυθροποιητίνης κ.α. (Manuela Milani & Adrian L Harris, 2008). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται σε ποικίλες αναπτυξιακές και φυσιολογικές διεργασίες όπως η αγγειογένεση, η αγγειακή αναδόμηση, η ερυθροποίηση, η μεταφορά σιδήρου και γλυκόζης, η γλυκόλυση και ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση των κυττάρων (L. E. Huang & Bunn, 2003).

HIF-1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η υποξία αφορά ένα ευρύ φάσμα νεοπλασιών, μεταξύ των οποίων και τον καρκίνο του μαστού, καθότι ο αναπτυσσόμενος συμπαγής όγκος αυξάνεται υπερβολικά σε μέγεθος σε σχέση με το υπάρχον αγγειακό δίκτυο. Για να επιβιώσουν τα καρκινικά κύτταρα θα πρέπει να βρίσκονται εντός 1 – 2 mm^3 από την παροχή αίματος (Folkman, 1990). Κατά συνέπεια, σε υποξικές συνθήκες κινητοποιούνται προσαρμοστικοί μηχανισμοί, ούτως ώστε τα καρκινικά κύτταρα να προσαρμοστούν στο εχθρικό για αυτά περιβάλλον. Με αυτό τον τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται πιο ανθεκτικά, ενισχύεται η ικανότητά τους να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται και κατ’ επέκταση επάγεται η ανάπτυξη του όγκου (A L Harris, 2002). Κεντρικό ρόλο στις προαναφερθείσες διεργασίες κατέχει ο HIF-1. Μέσω αυτού επιτυγχάνεται, μεταξύ των άλλων, μετατόπιση του μεταβολισμού από την οξειδωτική στη γλυκολυτική οδό, μείωση της μιτοχονδριακής κατανάλωσης οξυγόνου, μείωση της

παραγωγής ελεύθερων ριζών, ενίσχυση της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού και αναστολή της απόπτωσης. Επιπλέον, ο HIF-1, μέσω κυρίως του VEGF, επάγει τη νεοαγγείωση ώστε να επιτευχθεί κατάλληλη αιμάτωση του αναπτυσσόμενου όγκου, μια διεργασία η οποία ωστόσο επιτυγχάνεται και ανεξάρτητα από τον HIF-1 (Y. Cao et al., 2005; Ferrara, 2004).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης ευρήματα ερευνών σύμφωνα με τα οποία η έκφραση του HIF-1 σχετίζεται με αποδιαφοροποιημένο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση δεικτών διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, όπως οι ER, μειώνονταν παράλληλα με την αύξηση της έκφρασης του HIF-1 (Helczynska et al., 2003; Kronblad et al., 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση του HIF-1α διαμεσολαβείται, μεταξύ των άλλων, και από υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, μέσω των οποίων ενεργοποιούνται ποικίλα μηνυματοδοτικά μονοπάτια (G. Semenza, 2002). Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του Her2, ενός υποδοχέα τυροσινικής κινάσης με σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του καρκίνου του μαστού, η ενεργοποίηση ή η υπερέκφραση του οποίου μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα (Laughner, Taghavi, Chiles, Mahon, & G. L. Semenza, 2001). Σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει επίσης δειχθεί η εμπλοκή του HIF-1 στη διαδικασία της επιθηλιακής προς μεσεγχυματικής μετατροπής (epithelial to mesenchymal transition – EMT) (Y. G. Jiang et al., 2007; M. H. Yang & K. J. Wu, 2008; M. H. Yang et al., 2008). Τέλος, πολλές γενετικές ανωμαλίες οι οποίες απαντώνται συχνά σε καρκίνο, όπως οι μεταλλάξεις με απώλεια της λειτουργικότητας ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου (π.χ. VHL, p53, PTEN), σχετίζονται με αλλαγές στην έκφραση του HIF-1α και των επαγόμενων από αυτόν γονιδίων (Greijer & van der Wall, 2004; Shuin et al., 1999, 1994; Zundel et al., 2000).

Η κλινική σημασία της υποξίας σχετίζεται με την ανάπτυξη αντίστασης του όγκου στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Αφενός μεν σε κατάσταση υποξίας μειώνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών, μέσω των οποίων δρουν ορισμένα χημειοθεραπευτικά και αφετέρου αναπτύσσεται η λεγόμενη «υποξική αντίσταση στην ακτινοβολία» (hypoxic radioresistance), φαινόμενο το οποίο οφείλεται στην έλλειψη οξυγόνου στις ακτινοβιοχημικές διεργασίες μέσω των οποίων η ιοντίζουσα ακτινοβολία αλληλεπιδρά με τα κύτταρα (Teicher, 1994).

Η εκτίμηση της υποξίας πειραματικά έχει γίνει με πολλές μεθόδους, είτε παρεμβατικές (π.χ. Eppendorf polarographic oxygen electrode) είτε με έγχυση κατάλληλων ουσιών (π.χ. πιμονιδαζόλη) (Tatum et al., 2006). Ωστόσο η ανάγκη απλούστερων, μη παρεμβατικών μεθόδων ανίχνευσης και εντόπισης περιοχών ισχαιμίας οδήγησε στη χρήση του HIF-1 ως ενός εκ των κύριων δεικτών ισχαιμίας, παρόλο που η έκφρασή του επηρεάζεται και από άλλα μονοπάτια, πέραν της υποξίας. Στα πλαίσια αυτά, ένα μεγάλο μέρος των ερευνών για το ρόλο του HIF-1 στον καρκίνο του μαστού αφορά ανοσοϊστοχημικές μελέτες έκφρασης του μορίου σε ιστικά δείγματα πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού. Όπως προκύπτει από την πλειονότητα των μελετών η έκφραση του HIF-1$^{\alpha}$ είναι διάχυτη. Ωστόσο σε μια μελέτη αναφέρεται, επιπλέον, μια εστιακή έκφραση στα πέριξ της νέκρωσης κύτταρα (Vleugel et al., 2005). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή πιθανολογείται ότι η εστιακή έκφραση εξαρτάται από την απόσταση από τα αιμοφόρα αγγεία και σχετίζεται με τη μειούμενη συγκέντρωση του οξυγόνου ενώ η διάχυτη σε όλη την έκταση του όγκου αποδίδεται σε ενεργοποίηση της έκφρασης του HIF-1α μέσω μονοπατιών ανεξάρτητων της υποξίας.

Στην εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του HIF-1α υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, σημασία έχει η έκφραση του μορίου στον πυρήνα, λόγω του βιολογικού του ρόλου και η τυχόν έκφραση αλλού (ως επί το πλείστον στο κυτταρόπλασμα) αγνοείται ως μη έχουσα βιολογική σημασία (Bos et al., 2004, 2003, 2001; Generali et al., 2006; van der Groep, Bouter, Menko, van der Wall, & van Diest, 2008; Gruber et al., 2004; Kuijper, van der Groep, van der Wall, & van Diest, 2005; Schindl et al., 2002; Schoppmann et al., 2006; Talks et al., 2000; E. Y. Tan et al., 2007, 2009; Tomes et al., 2003; Vleugel et al., 2005; M. Yan, Rayoo, E. A. Takano, Thorne, & Fox, 2009). Σύμφωνα με τη δεύτερη, λαμβάνεται υπόψη τόσο η πυρηνική έκφραση όσο και η κυτταροπλασματική έκφραση, χωρίς ωστόσο να αιτιολογείται η σημασία της έκφρασης στο κυτταρόπλασμα (Currie et al., 2004; Dales et al., 2005; Giatromanolaki et al., 2004; Zhong et al., 1999). Οι διαφορές στα αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών μελετών του HIF-1 θα μπορούσαν να αποδοθούν εν μέρει στις δύο αυτές διαφορετικές προσεγγίσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες μελέτες έχουν δείξει έκφραση του HIF-1 στο ενδοθήλιο και σε κύτταρα του στρώματος (ινοβλάστες, μακροφάγα) (Dales et al., 2005; Kuijper et al., 2005; Tomes et al., 2003).

MMP-9

ΓΕΝΙΚΑ

Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP) αποτελούν μια οικογένεια 24 ενδοπεπτιδασών ψευδαργύρου, οι οποίες μπορούν αφενός να αποδομήσουν πρακτικά όλα τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και αφετέρου να απελευθερώσουν και να ενεργοποιήσουν / απενεργοποιήσουν ένα σημαντικό αριθμό ρυθμιστών της κυτταρικής λειτουργίας. Χαρακτηρίζονται από τρεις διατηρημένες περιοχές: ένα μοτίβο σύνδεσης ψευδαργύρου (HEXXHXXGXXH) απαραίτητο για την πρωτεολυτική τους δράση, μια προπεπτιδική περιοχή κυστεΐνης (PRCGXPD), της οποίας το υπόλειμμα κυστεΐνης αλληλεπιδρά με το ιόν ψευδαργύρου στη ζυμογόνο μορφή και μια «στροφή μεθειονίνης» η οποία πιθανά διατηρεί την ακεραιότητα της περιοχής πρόσδεσης του ψευδαργύρου (Chabottaux & Noel, 2007) .

Η MMP-9 (ζελατινάση Α), μαζί με τη MMP-2 (ζελατινάση Β), συνιστούν την ομάδα των ζελατινασών, έχουν παρόμοιες δομικά περιοχές (domains) και παρόμοια αλλά όχι ταυτόσημη ειδικότητα σε υποστρώματα. Η MMP-9 συντίθεται φυσιολογικά από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, και επιθηλιακά κύτταρα και η έκφρασή της επάγεται από διαφορετικά μόρια όπως κυτταροκίνες, χημοκίνες και αυξητικούς παράγοντες. Φυσιολογικά, εμπλέκεται σε διεργασίες όπως η επούλωση, η ανάπτυξη και η αγγειογένεση, ενώ εμπλέκεται και σε παθολογικές διεργασίες όπως η φλεγμονή και ο καρκίνος (W. C. Parks & Mecham, 1998). Η MMP-9 εκκρίνεται ως ζυμογόνο και ενεργοποιείται μετά από αποκοπή του αμινοτελικού της άκρου από άλλες πρωτεϊνάσες (Nagase, Visse, & G. Murphy, 2006). Μπορεί να βρεθεί ελεύθερη εκτός κυττάρου και προσδεμένη είτε στην επιφάνεια του κυττάρου με CD44 ή με αλυσίδα κολλαγόνου τύπου ΙΙ, είτε στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία.

Η σύνθεσή της ρυθμίζεται κυρίως σε μεταγραφικό επίπεδο. Η παρουσία πολλών cis-ρυθμιστικών στοιχείων στον υποκινητή του γονιδίου της MMP-9 είναι ενδεικτική των πολλών trans-ενεργοποιητών που δρουν σε αυτό (π.χ. AP-1, NF-Kb, Sp-1, PEA3) και μέσω των οποίων επάγεται η έκφραση της MMP-9 από τα διάφορα μόρια (κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες κ.α.), διεργασία η οποία συχνά διαμεσολαβείται από MAPK. Επιπλέον, η έκφραση της MMP-9 επηρεάζεται από πολυμορφισμούς στην περιοχή του υποκινητή της, ενώ έχει δειχθεί ότι έλεγχος υπάρχει και σε μεταφραστικό και σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο (π.χ. μέσω αύξησης

του χρόνου ημιζωής του mRNA, μεθυλιώσεις) (I. Clark & Swingler, 2008). Τέλος, υπόκειται σε περαιτέρω έλεγχο μέσω της ενζυματικής ενεργοποίησής της (C. Yan & Boyd, 2007). Εκκρινόμενη από το κύτταρο μπορεί να βρεθεί ως μονομερές ή διμερές (ομοδιμερές ή ετεροδιμερές), με κάθε μορφή της να έχει διαφορετικές βιοχημικές και ενζυματικές ιδιότητες, ενώ μπορεί να σχηματίσει ετεροδιμερή με μόρια όπως η MMP-1, ο TIMP-1, ο TIMP-3, το NGAL, η απτοσφαιρίνη, με μεμβρανικές πρωτεΐνες (CD44, CD91 κ.α.) και με πρωτεογλυκάνες (Malla, Sjoli, Winberg, Hadler-Olsen, & Uhlin-Hansen, 2008). Ο σχηματισμός συμπλόκων αποτελεί σημαντικό τρόπο ρύθμισης της δράσης των ζελατινασών. Ο TIMP1, για παράδειγμα, επάγει τη δράση του ως αναστολέας της MMP-9 δημιουργώντας μαζί της ετεροδιμερή τα οποία ενδοκυτταρώνονται προς καταβολισμό με τη βοήθεια της LRP (Hahn-Dantona, Ruiz, Bornstein, & Strickland, 2001). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το σύμπλοκο του ετεροδιμερούς Ku70/Ku80 και της MMP-9, το οποίο απαντάται στην κυτταρική μεμβράνη φυσιολογικών κυττάρων και διηθητικών καρκινικών κυττάρων. Η MMP-9 καθηλώνεται, τρόπον τινά, μέσω της πρωτεΐνης Ku στην «προπορευόμενη» πλευρά των λευχαιμικών κυττάρων και των μεταναστευόντων μακροφάγων, συμβάλλοντας στην αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και στη μετανάστευση (Bjorklund & Koivunen, 2005).

MMP9 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η αποδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και των συστατικών της βασικής μεμβράνης, διευκολύνουν την απαγκίστρωση των καρκινικών κυττάρων, το πέρασμα διαμέσου ιστικών ορίων και τη διήθηση παρακείμενων ιστών. Εκ των πρωτεολυτικών ενζύμων τα οποία εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες, κομβικό ρόλο σε ευρύ φάσμα συμπαγών νεοπλασιών κατέχουν οι MMP. Από τα περίπου 22 μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων MMP, η MMP-9 μαζί με την MMP-2, σχετίζονται με τον διηθητικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων λόγω της μοναδικής ιδιότητάς τους να αποδομούν το κολλαγόνο τύπου IV, ένα μείζον συστατικό της βασικής μεμβράνης.

Ωστόσο, πέρα από αυτή την παραδοσιακή αντίληψη για το ρόλο των MMP στην καταστροφή φυσιολογικών φραγμών και κατ΄επέκταση στη συμμετοχή τους στα όψιμα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι ο ρόλος των MMP στον καρκίνο είναι πιο ευρύς. Πρωτεολύοντας πλειάδα εκκρινόμενων και μεμβρανικά συνδεόμενων πρωτεϊνών, όπως πρόδρομα μόρια και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, κυτταροκίνες, χημοκίνες και

μόρια προσκόλλησης, τροποποιούν το μικροπεριβάλλον του όγκου και εμπλέκονται εν τέλει και σε πρωιμότερα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου (McCawley & Matrisian, 2001). Απελευθερώνουν βιοενεργά μόρια τα οποία αναστέλλουν την απόπτωση και ενισχύουν την διηθητικότητα, ενώ αποδομούν συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Sternlicht & Werb, 2001). Επάγουν επίσης την αγγειογένεση και τροποποιούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις, ενισχύοντας την ανάπτυξη του όγκου και παρεμποδίζοντας την ανοσολογική εποπτεία, αντίστοιχα (M J Bissell & D. Radisky, 2001). Αξίζει να σημειωθεί ότι η MMP-9 αποτελεί ένα από τα 70 γονίδια τα οποία συνιστούν μια γονιδιακή «υπογραφή» πρόβλεψης απομακρυσμένων μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο μαστού χωρίς λεμφαδενική συμμετοχή (L J van ’t Veer, H Dai, M J van de Vijver, Y D He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, van der Kooy, Marton, Witteveen, Schreiber, Kerkhoven, Roberts, Linsley, Bernards, & Friend, 2002b). Επίσης, έχει βρεθεί ότι επάγει και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT), διεργασία η οποία ενεργοποιείται στα καρκινικά κύτταρα κατά τη διήθηση και τη μετάσταση (Orlichenko & D C Radisky, 2008).

Ωστόσο, έχει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ενώ παραδοσιακά η έκφραση των MMP θεωρείται ότι συμβάλει στην εξέλιξη του όγκου, πιο πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν και προστατευτικούς ρόλους (Martin & Matrisian, 2007). Για παράδειγμα, μελέτη σε ένα μοντέλο επίμυων για καρκίνο του δέρματος έδειξε ότι ενώ η έκφραση της MMP-9 αύξησε τον αριθμό των όγκων, είχε προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη διηθητικών ιδιοτήτων αυτών (Coussens, Tinkle, D Hanahan, & Werb, 2000). Μια άλλη μελέτη για το ρόλο της MMP-9 στο νευροβλάστωμα έδειξε ότι τα πειραματόζωα τα οποία στερούνταν MMP-9 εμφάνιζαν μείωση των πνευμονικών μεταστάσεων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται οι ηπατικές μεταστάσεις (Chantrain et al., 2004). Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι η MMP-9, η οποία εμπλέκεται σε ποικίλα στάδια της αγγειογένεσης, μπορεί να αντίκειται στο σχηματισμό αγγείων, επάγοντας την απελευθέρωση ουσιών όπως η αγγειοστατίνη (Pozzi et al., 2000). Τέλος, η έκφραση της MMP-9 έχει συσχετιστεί και με καλύτερη πρόγνωση. Συγκεκριμένα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της MMP-9 σε καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο υποτροπής και θανάτου, ενώ στην υποομάδα των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες αποτελούσε ανεξάρτητο ευνοϊκό προβλεπτικό παράγοντα της συνολικής επιβίωσης (overall survival – OS) (Scorilas et al., 2001).

Παρόμοια ευρήματα υπάρχουν και για επιθηλιακού όγκους της ωοθήκης (Sillanpaa et al., 2007).

Παρόλο που η MMP-9 συντίθεται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, εντοπίζεται και σε κύτταρα του στρώματος (π.χ. περικύτταρα, μακροφάγα, ινοβλάστες, σιτευτικά κύτταρα, ουδετερόφιλα) και κατά συνέπεια αποτελεί συνιστώσα της θεωρίας «σπόρου – εδάφους» (seed and soil) του Paget, σύμφωνα με την οποία ο καρκίνος εκλαμβάνεται ως ένα περίπλοκο εξελισσόμενο «οικοσύστημα» με συνεχή διαντίδραση μεταξύ καρκίνου και ξενιστή (Noel, Jost, & Maquoi, 2008).

SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ HIF-1

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο HIF-1 εμπλέκεται, μεταξύ των άλλων, και στον άξονα SDF-1/CXCR4. Μελέτες έχουν δείξει ότι η υποξία, εν μέρει μέσω του HIF-1, επάγει την έκφραση τόσο του SDF-1 (σε κύτταρα καρκίνου ωοθηκών και προστάτη, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε ινοβλάστες, σε πρόδρομα αιμοποιητικά κύτταρα κ.α.) (Kryczek, S. Wei, E. Keller, R. Liu, & W. Zou, 2007) όσο και του CXCR4 (σε μακροφάγα, σε καρκινικά κύτταρα μαστού, νεφρού και ωοθηκών κ.α.) (Schioppa et al., 2003; Zagzag et al., 2005). Η αυξημένη έκφραση του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα φαίνεται ότι αυξάνει το μεταστατικό τους δυναμικό προς περιοχές αυξημένης έκφρασης της SDF-1 και καθιστά τον όγκο πιο επιθετικό και την πρόγνωση χειρότερη. Όσο αφορά την SDF-1, η επαγόμενη από τον HIF-1 αυξημένη έκφρασή του στα ενδοθηλιακά κύτταρα, πιθανόν συμβάλει στη νεοαγγείωση για την κατάλληλη αιμάτωση του αναπτυσσόμενου όγκου, αφενός επιδρώντας σε υπάρχοντα στην περιοχή ενδοθηλιακά κύτταρα και αφετέρου προσελκύοντας προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Beerepoot et al., 2004; O Salvucci, L. Yao, Villalba, Sajewicz, Pittaluga, & G Tosato, 2002a; Yamaguchi et al., 2003).

SDF-1/CXCR4 ΚΑΙ MMP-9

Σε καρκινικές κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, ωοθηκών και πνεύμονα έχει δειχτεί ότι η SDF-1 επάγει την έκφραση της MMP-9, μέσω της οποίας ενισχύεται η διεισδυτικότητα των κυττάρων (Kenig, Alonso, Mueller, & Lah, 2010; X. Shen et al., 2009; C. H. Tang, T. W. Tan, W. M. Fu, & R. S. Yang, 2008; Yuecheng & Xiaoyan, 2007). Επίσης, σε πρόσφατη μελέτη η αποσιώπηση του CXCR4 σε καρκινικά κύτταρα προστάτη οδήγησε σε μείωση του mRNA και του μορίου της MMP-9 καθώς

και σε μείωση της ανάπτυξης του όγκου και των μεταστάσεων σε ζωικό μοντέλο (Q. Wang, Diao, J. Sun, & Z. Chen, 2011). Επιπλέον, στην περίπτωση του πολλαπλού μυελώματος, στον σχετιζόμενο με την SDF-1 τροπισμό των κυττάρων εμπλέκεται η MMP-9 (Parmo-Cabañas et al., 2006). Στις διεργασίες διακίνησης (trafficking) και εποικισμού (homing) κυττάρων του αίματος, στις οποίες βασίστηκαν τα μοντέλα για την εξήγηση των μηχανισμών μετάστασης, ο άξονας SDF-1 / CXCR4 και η MMP-9 κατέχουν κεντρικό ρόλο, αλληλεπιδρώντας σε πολλαπλά επίπεδα (π.χ. η MMP-9 επάγει την έκφραση του CXCR4, ο SDF-1 επάγει την έκφραση της MMP-9, η MMP-9 αποδομεί τον SDF-1) (F. Jin et al., 2008; Tsvee Lapidot, Dar, & Kollet, 2005; W. C. Parks, Mecham, Deryugina, & Quigley, 2011). Από την διερεύνηση της αγγλόφωνης βιβλιογραφίας βρέθηκε μια μόνο μελέτη σε καρκίνο του μαστού που συσχετίζει με ανοσοϊστοχημική μέθοδο την έκφραση των μορίων MMP-9 και CXCR4, η οποία ωστόσο δεν κάνει καμία μνεία για τυχούσα έκφραση των μορίων στο στρώμα (L. Hao et al., 2007). Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε κυτταροπλασματική εντόπιση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα ενώ ελάχιστη έκφραση του μορίου αναγνωρίσθηκε στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό του μαστού.

MMP-9 ΚΑΙ HIF-1

Λιγότερο σαφής είναι η συσχέτιση υποξίας και έκφρασης MMP-9 σε καρκινικά κύτταρα (Canning, Postovit, Clarke, & Graham, 2001a; Fähling, Perlewitz, Doller, & Thiele, 2004; W. Guo et al., 2002; S. Kondo et al., 2002). Μελέτες σε κυτταρικές σειρές έχουν δείξει ότι η ισχαιμία επηρεάζει την έκφραση της MMP-9, αλλά με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 από καρκίνο του μαστού, η οποία θεωρείται πολύ επιθετική, έχει παρατηρηθεί κατά την υποξία αυξημένη έκφραση της MMP-9, (Canning, Postovit, Clarke, & Graham, 2001a; Ridgway et al., 2005), εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώνεται σε μεταγενέστερη μελέτη (Muñoz-Nájar, Neurath, Vumbaca, & Claffey, 2006). Σε άλλη μελέτη, η έκφραση της MMP-9 σε καρκίνο του μαστού συσχετίστηκε με παρουσία νέκρωσης (Pacheco, Mourao, E. B. Mantovani, Nishimoto, & Brentani, 1998), ενώ σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί συσχετισμός της έκφρασης του HIF-1 και της MMP-9 (D. E. Swinson, J L Jones, et al., 2004).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της έκφρασης της SDF-1, του CXCR4, της MMP-9 και του HIF-1α με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε διηθητικά καρκινώματα του μαστού και η συσχέτιση της έκφρασης αυτών με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους των όγκων. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η σχέση της έκφρασης των υπό εξέταση μορίων με την επιβίωση και την πρόγνωση των ασθενών. Η επιλογή των συγκεκριμένων μορίων βασίσθηκε σε συνεχώς αυξανόμενες ενδείξεις για την συμμετοχή τους στην διαδικασία της καρκινογένεσης, η οποία μέχρι σήμερα δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Τα αποτελέσματα από ανοσοϊστοχημικές και μη μελέτες είναι αντικρουόμενα, καταδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου των υπό εξέταση μορίων. Ιδιαίτερη σημασία έχει η συμμετοχή των μορίων αυτών σε αλληλεπιδρώντα μηνυματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται με διεργασίες όπως η υποξία, η διήθηση, η χημειοταξία και η μετάσταση. Επιπλέον, ο άξονας SDF-1/CXCR4 αποτελεί πεδίο έντονης έρευνας με σκοπό να αποτελέσει πιθανό θεραπευτικό στόχο, χωρίς ωστόσο να υπάρχει καθολική συμφωνία ποια είναι τα κρίσιμα συστατικά στοιχεία του μονοπατιού αυτού που θα πρέπει να στοχεύσουμε θεραπευτικά.

ΥΛΙΚΟ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες βιοηθικής του Πανεπιστημίου Πατρών και έχει γίνει αποδεκτή από την επιστημονική επιτροπή ερευνών και βιοηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Πανεπιστημίου Πατρών. Το υλικό της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν 96 διηθητικά καρκινώματα μαστού τα οποία ελήφθησαν από το αρχείο του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ρίου, μονιμοποιημένα σε ουδέτερη φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Προηγήθηκε ιστολογική εξέταση όλων των δειγμάτων με χρώση αιματοξυλίνης - ηωσίνης, τέθηκε η διάγνωση και έγινε η επιλογή των περιστατικών. Από τα 96 δείγματα, 87 αφορούσαν σε διηθητικά πορογενή καρκινώματα, 6 σε διηθητικά λοβιακά καρκινώματα, 1 σε άτυπο μυελοειδές καρκίνωμα, 1 σε συμπαγές νευροενδοκρινές καρκίνωμα και 1 σε αποκρινές καρκίνωμα. Οι ασθενείς διαγνώστηκαν τη χρονική περίοδο 1995 – 2006, με μέσο όρο παρακολούθησης 55,79 μήνες (S.D.: 25.75). Η μέση ηλικία των ασθενών

κατά τη διάγνωση ήταν 56 έτη (S.D.: 12). Τα δεδομένα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των προγνωστικών δεικτών Her2, Ki 67, p53 και των ορμονικών υποδοχέων ER, PR ελήφθησαν από τις αντίστοιχες παθολογοανατομικές εκθέσεις, ενώ τα κλινικοεργαστηριακά στοιχεία από τα ιστορικά των ασθενών που είναι καταχωρημένα στο αρχείο του Ογκολογικού Τμήματος του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ρίου (Πίνακας 6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά ασθενών		
Μέση ηλικία διάγνωσης (έτη)	56	εύρος: 32 – 80
Μέσο μέγεθος όγκου (εκ.)	2.8	εύρος: 0.1 – 9.0
Στάδιο cTNM *n* (%)	I IIa IIb IIIa IIIb IIIc IV	13(13,5) 18(18,8) 24(25) 8(8,3) 4(4,2) 12(12,5) 17(17,7)
Μοριακοί ταξινόμηση όγκων	Αυλικού τύπου Α Αυλικού τύπου Β Βασικός τύπος (triple negative) Her2	49(51) 27(28,1) 16(16,7) 4(4,2)
Λεμφαδενική διήθηση , *n* (%)	Ναι Όχι	64/96 (66,7) 32/96 (33,3)
Ιστολογικός βαθμός κακοήθειας , *n* (%)	1 2 3	9/96 (9,4) 63/96 (65,6) 24/96 (24)
ER, *n* (%)*	Θετική έκφραση Αρνητική έκφραση	74/96 (77,1) 22/96 (22,9)
PR, *n* (%)*	Θετική έκφραση Αρνητική έκφραση	66/96 (68,8) 30/96 (31,3)
hER2 / c-erbB2, *n* (%)*	Θετική έκφραση Αρνητική έκφραση	31/96 (32,3) 65/96 (67,7)
p53, *n* (%)*	Θετική έκφραση Αρνητική έκφραση	47/96 (49) 49/96 (51)
Ki67, *n* (%)*	Χαμηλή Μέτρια Υψηλή	57/96 (59,4%) 18/96 (18,8%) 21/96 (21,9%)

*ER, PR: θεωρούνται θετικοί όταν >1% των κυττάρων εμφανίζει θετική πυρηνική έκφραση.
Her2: κατηγοριοποίηση σύμφωνα με τα προτεινόμενα κριτήρια του πρωτοκόλλου DAKO.
p53: θεωρείται θετικό όταν >10% των κυττάρων εμφανίζει θετική πυρηνική έκφραση.
Ki67: θεωρείται χαμηλή έκφραση όταν ≤15%, μέτρια όταν 16-30% και υψηλή όταν >30% των κυττάρων εμφανίζει θετική πυρηνική έκφραση.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος στηρίζεται στην ειδική δέσμευση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων με ενδοκυττάρια ή εξωκυττάρια αντιγόνα που βρίσκονται στον υπό μελέτη ιστό. Οι θέσεις δέσμευσης ανιχνεύονται είτε με τη χρήση φθοριζόντων μορίων (ανοσοφθορίζουσες τεχνικές) είτε, συνηθέστερα, με τη χρήση

ενζυμικής χρωμογόνου αντίδρασης (ανοσοενζυμικές τεχνικές), όπου το ένζυμο που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η υπεροξειδάση (horseradish peroxidase – HRP). 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 ευρύτερα χρησιμοποιούμενο χρωμογόνο στην ανοσοϊστοχημεία είναι η 3,3΄- τετραϋδροχλωρική-διάμινο-βενζιδίνη (DAB) που παράγει ένα σκούρο καφέ χρώμα. Οι τεχνικές ανοσοϋπεροξειδάσης διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Η άμεση ανοσοϊστοχημική μέθοδος είναι η απλούστερη, ενός βήματος διαδικασία, όπου το πρωτογενές αντίσωμα είναι συνδεμένο με κάποιο μόριο αναφοράς (label), που μπορεί να είναι φθοριόχρωμα, ένζυμο ή βιοτίνη. Η μέθοδος είναι ταχεία αλλά στερείται μεγάλης ευαισθησίας για την ανίχνευση των περισσότερων αντιγόνων στους συνηθέστερα εξεταζόμενους ιστούς. Η έμμεση μέθοδος (δύο ή τριών βημάτων) είναι η ανοσοϊστοχημική τεχνική με την ευρύτερη εφαρμογή λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της. Γενικά, στην έμμεση μέθοδο χρησιμοποιείται το πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody), ειδικό για το υπό ανίχνευση αντιγόνο και το δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody), το οποίο συνδέεται με το πρωτογενές. Το δευτερογενές αντίσωμα μπορεί να είναι συνδεμένο π.χ. με βιοτίνη (βιοτινυλιωμένο) και επομένως να απαιτείται και τρίτο βήμα, στο οποίο γίνεται σύνδεση της βιοτίνης του δευτερογενούς αντισώματος με σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-ενζύμου όπως η HRP (ABC τεχνική), ή με σύμπλεγμα αβιδίνης-ενζύμου (LAB τεχνική) ή στρεπταβιδίνης-ενζύμου (SLAB τεχνική). Οι τεχνικές αυτές έχουν το μειονέκτημα της πιθανής υψηλής μη ειδικής χρώσης. Εναλλακτικά, στην έμμεση μέθοδο δύο βημάτων πολλά μόρια δευτερογενούς αντισώματος και ενζύμου (όπως η HRP) βρίσκονται συνδεμένα σε πολυμερές δεξτράνης, πλεονεκτώντας με αυτό τον τρόπο σε απλότητα, ευαισθησία και μικρότερου βαθμού μη ειδική χρώση σε σχέση με τις τεχνικές τριών βημάτων. Σε κάθε περίπτωση, οι θέσεις δέσμευσης γίνονται ορατές μετά την εφαρμογή των παραπάνω βημάτων με την προσθήκη του κατάλληλου χρωμογόνου, εν προκειμένω της DAB για την HRP. Για την ενίσχυση της ειδικής χρώσης και τον περιορισμό της ανεπιθύμητης μη ειδικής χρώσης , στις περισσότερες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η εφαρμογή επιπλέον βημάτων στην ανοσοϊστοχημική τεχνική. Βασικό βήμα είναι η κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης των ιστών. Παρότι καταστρέφεται σε μεγάλο βαθμό κατά τη μονιμοποίηση του ιστού, εν τούτοις η υπολειμματική δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης μπορεί να προκαλέσει μη ειδική χρώση. Για το λόγο

αυτό πριν από την επώαση με το ειδικό πρωτογενές αντίσωμα συνήθως εφαρμόζεται στις τομές διάλυμα H_2O_2 για την κατανάλωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Επιπλέον, η δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος με άλλες πρωτεΐνες του ιστού λόγω υδρόφοβων δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ τους αυξάνει τη μη ειδική χρώση. Για το λόγο αυτό συνήθως εφαρμόζεται πρωτεϊνική δέσμευση (protein blocking) με διαλύματα λευκωματίνης βοείου ορού (bovine serum albumin – BSA), άπαχου γάλακτος ή καζεΐνης πριν την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος, που μειώνει τη μη ειδική δέσμευση. Επίσης, η επιλογή της κατάλληλης αραίωσης και των συνθηκών επώασης του ειδικού αντισώματος είναι καθοριστική για την αποτελεσματικότητα και την επιτυχία της μεθόδου. Τέλος, πολλές φορές η διαδικασία μονιμοποίησης του ιστού προκαλεί ενδοδιασταυρούμενες αντιδράσεις και «καλύπτει» τις αντιγονικές θέσεις δέσμευσης (antigen masking) με αποτέλεσμα την αδυναμία ανίχνευσης αυτών, οπότε κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή 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 (π.χ. θρυψίνη, πρωτεϊνάση Κ, πεψίνη) ή η θέρμανση του σε φούρνο μικροκυμάτων, συχνά με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων διαφορετικού pH (π.χ. διάλυμα κιτρικού νατρίου).

ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΧΡΩΣΗ

Για την ανοσοϊστοχημική χρώση. από τους σκηνωμένους σε παραφίνη ιστούς ελήφθησαν, με ειδικό μικροτόμο, εν σειρά ιστολογικές τομές πάχους 3-4 μm, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες Polysine και SuperfrostPlus (Menzel-Glasser®, Freiburg, Germany) για την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικής μεθόδου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε:

1. Αποπαραφίνωση των τομών σε κλίβανο θερμοκρασίας 56°C για 12 ώρες
2. Εμβάπτιση των τομών διαδοχικά σε τρεις ξυλόλες (Surgipath) σε θερμοκρασία 56°C για 5 λεπτά σε καθεμιά
3. Εμβάπτιση σε ξυλόλη σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
4. Εμβάπτιση των τομών σε ισομοριακό μίγμα ξυλόλης / αλκοόλης για 2 λεπτά
5. Ενυδάτωση των τομών σε σειρά διαλυμάτων αλκοόλης ελαττούμενης συγκέντρωσης σε αλκοόλη (100%-96%-80%) για 1 λεπτό σε κάθε διάλυμα

6. Έκπλυση με νερό βρύσης και απιονισμένο H_2O (2-3 φορές)

7. Τοποθέτηση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl [Tris - HCL-buffered saline (TBS)] 0,05 M, pH=7,6 για 5 λεπτά

8. Ανάδειξη των αντιγονικών επιτόπων

    a. με θερμική επεξεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων για την SDF-1, τον CXCR4 και την MMP-9. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου 0,01M, pH=6, και θέρμανση στα 800 Watt για 2 λεπτά και στα 300 Watt για 7 λεπτά.

    b. με τη χρήση διαλύματος πεψίνης (επώαση 30 λεπτά στους 37 ^oC) στην περίπτωση του HIF-1α.

9. Παραμονή των τομών σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά

10. Έκπλυση των τομών με απιονισμένο νερό

11. Έκπλυση των τομών με TBS για 2x5 λεπτά

12. Εξουδετέρωση της δραστικότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης σε υδατικό διάλυμα H_2O_2 1% για 20 λεπτά (σε σκοτεινό θάλαμο)

13. Έκπλυση των τομών με απιονισμένο νερό

14. Έκπλυση των τομών με TBS για 2x5 λεπτά.

15. Κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος (protein blocking) με επώαση των τομών με TBS / BSA 3% ή με TBS / nonfat milk 5% για ορισμένο χρόνο

16. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS (2x5 λεπτά)

17. Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση, χρησιμοποιώντας τον ειδικό διαλύτη Antibody Diluent ChemMate S2022 (DakoCytomation, USA). Οι συνθήκες επώασης και η αραίωση για κάθε αντίσωμα φαίνεται στον πίνακα 7. Οι κατάλληλες αραιώσεις και συνθήκες για κάθε ειδικό αντίσωμα (βλ. πίνακα) προήλθαν αφενός από τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας και αφετέρου από προεργασία (standardization), η

οποία προηγήθηκε για κάθε αντίσωμα. Η προεργασία αυτή, μέσω κατάλληλων δοκιμών για κάθε αντίσωμα, έχει ως στόχο τον καθορισμό των βέλτιστων αραιώσεων και συνθηκών, με όσο το δυνατόν εξάλειψη φαινομένων ψευδώς θετικών (μη ειδική σύνδεση του αντισώματος) και ψευδώς αρνητικών (μη σύνδεση του αντισώματος παρουσία του αντίστοιχου αντιγόνου) χρώσεων.

18. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS για 3x5 λεπτά
19. Επώαση των τομών με το ειδικό σημασμένο πολυμερές DAKO EnVision™ + HRP, (DakoCytomation, USA) για 30 λεπτά
20. Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS για 2x5 λεπτά
21. Ανίχνευση των θέσεων δέσμευσης της υπεροξειδάσης με την εφαρμογή διαλύματος H_2O_2 και 3,3΄-τετραϋδροχλωρικής διάμινο - βενζιδίνης (DAB) για 5 λεπτά
22. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης για 2x5 λεπτά
23. Χρώση αντίθεσης των πυρήνων (counterstain) με αιματοξυλίνη Harris (Surgipath) για 4 λεπτά
24. Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης
25. Αφυδάτωση του ιστού σε σειρά αλκοολών αυξανόμενης συγκέντρωσης σε αλκοόλη (80%-96%-100%-100%)
26. Διαύγαση των τομών σε ξυλόλες (3x5 λεπτά)
27. Επικόλληση καλυπτρίδων με τη χρήση διαλυτού στην ξυλόλη μέσου (Entellan, Merck, Germany)

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 Πρωτογενή αντισώματα και συνθήκες επώασης

Αντίσωμα	Προέλευση – Κλωνικότητα	Ανάδειξη αντιγόνου	Αραίωση	Επώαση
Αντί-MMP9	Novocastra (MAB439)	Φούρνος μικροκυμάτων	1:15	16 ώρες
Αντί-CXCR4	R&D Systems (MAB172)	Φούρνος μικροκυμάτων	1:350	16 ώρες
Αντί-SDF1	R&D Systems (MAB350)	Φούρνος μικροκυμάτων	1:60	16 ώρες
Αντί-HIF1a	R&D Systems (MAB1935)	Πεψίνη	1:30	16 ώρες

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές, οι οποίες επωάστηκαν με διάλυμα πρωτεϊνικής δέσμευσης (protein blocking solution) αντί του εκάστοτε πρωτογενούς αντισώματος.

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε από ένα παθολογοανατόμο και έναν ερευνητή, ανεξάρτητα, χωρίς να γνωρίζουν οποιαδήποτε πληροφορία για τα υπό εξέταση δείγματα. Οι ιστολογικές τομές από όλα τα δείγματα μελετήθηκαν με φωτονικό μικροσκόπιο και ανάλογα με την εντόπιση του αντισώματος, αξιολογήθηκε η χρώση ως κυτταροπλασματική ή/και μεμβρανική, πυρηνική ή/και κυτταροπλασματική και κυτταροπλασματική, τόσο στον νεοπλασματικό ιστό όσο και στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό ιστό. Η διαβάθμιση της έντασης έγινε με την ακόλουθη κλίμακα: 0 για μη ανιχνεύσιμη χρώση, 1 για ασθενή ένταση, 2 για μέτρια και 3 για ισχυρή. Η διαβάθμιση του ποσοστού των ανοσοθετικών κυττάρων έγινε ημιποσοτικά, με την ακόλουθη κλίμακα: 0 για ανοσοθετικότητα σε 0-10% των κυττάρων, 1 για 10 – 29%, 2 για 30 – 59% και 3 για 60 – 100%. Για κάθε δείγμα προέκυψε ένας βαθμός από το άθροισμα των βαθμών της έντασης και της κατανομής, ο οποίος κυμαίνεται από 0 έως 6. Για στατιστικούς λόγους, οι όγκοι με τελική βαθμολογία 1,2,3 εντάχθηκαν στην ομάδα χαμηλής έκφρασης και αυτοί με τελική βαθμολογία 4,5,6 στην ομάδα υψηλής έκφρασης.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS για Windows (έκδοση 15.0). Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφορετικών προτύπων έκφρασης των υπό εξέταση μορίων αξιολογήθηκαν με τη δοκιμασία συσχέτισης Spearman. Η ίδια δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθούν οι συσχετίσεις των ως άνω εκφράσεων με το στάδιο κατά TNM, με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (tumor grade) και με τους προγνωστικούς ανοσοϊστοχημικούς δείκτες ER, PR, Ki67, p53, Her2. Η δοκιμασία Wilcoxon εφαρμόστηκε για να αξιολογηθούν οι διαφορές στην έκφραση των μορίων μεταξύ παθολογικού και παρακείμενου μη νεοπλασματικού ιστού. Η επίδραση των υπό εξέταση μορίων στο μέγεθος του όγκου και στη λεμφαδενική διήθηση αξιολογήθηκε με πολλαπλή παλινδρόμηση (multiple regression). Η εκτίμηση της επίδρασης της έκφρασης των υπό εξέταση μορίων στην επιβίωση αξιολογήθηκε με τη μέθοδο

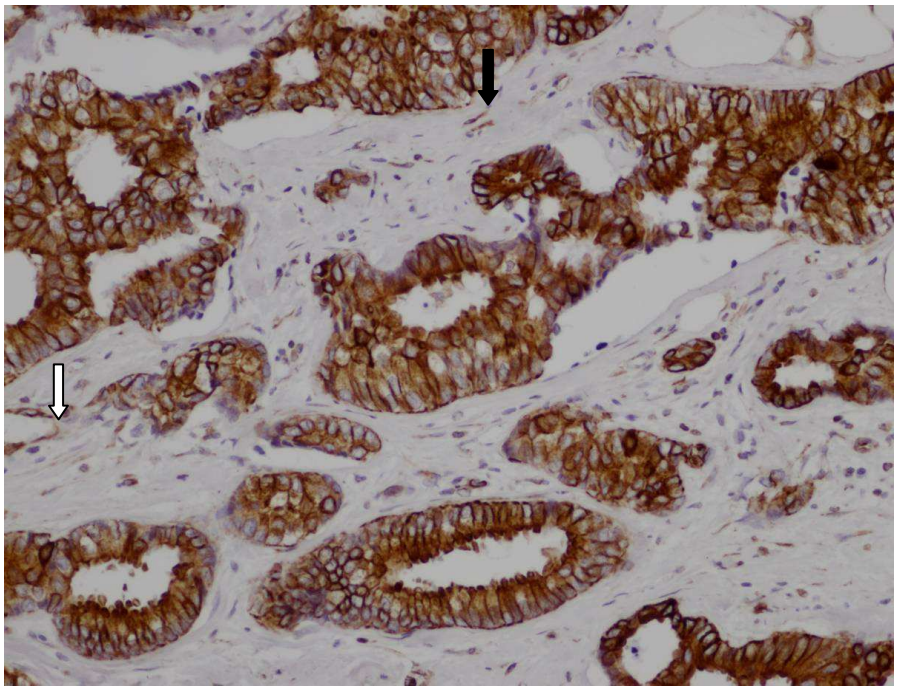
Kaplan-Meier και long rank. Η συνολική επιβίωση OS (overall survival) υπολογίστηκε από την ημερομηνία της χειρουργικής εξαίρεσης του όγκου μέχρι την ημερομηνία θανάτου ή τη λήξη της παρακολούθησης, ενώ η ελεύθερη υποτροπής επιβίωση RFS (relapse free survival) από την ίδια αρχική ημερομηνία μέχρι την ημερομηνία υποτροπής ή την ημερομηνία λήξης της παρακολούθησης. Η ταυτόχρονη επίδραση διαφορετικών ανοσοεκφράσεων αξιολογήθηκε με Cox παλινδρόμηση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ

SDF-1

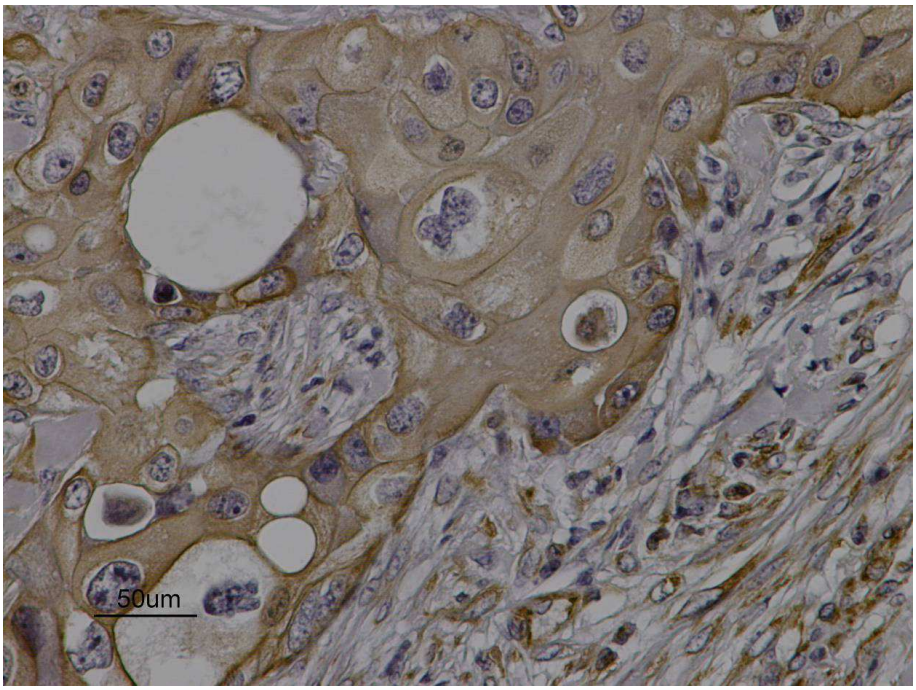
Η πρωτεΐνη SDF-1 εμφάνισε κυτταροπλασματική ή/και μεμβρανική έκφραση στα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 2 και 3), ενώ θετική χρώση παρατηρήθηκε και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος (Εικόνα 4).



Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται κυτταροπλασματική και μεμβρανική εντόπιση της πρωτεΐνης SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα με ανοσοϊστοχημική χρώση. Θετική χρώση για την πρωτεΐνη SDF-1 αναδεικνύεται και στους ινοβλάστες (μαύρο βέλος) και στα αγγεία (λευκό βέλος) του καρκινικού στρώματος (20×).

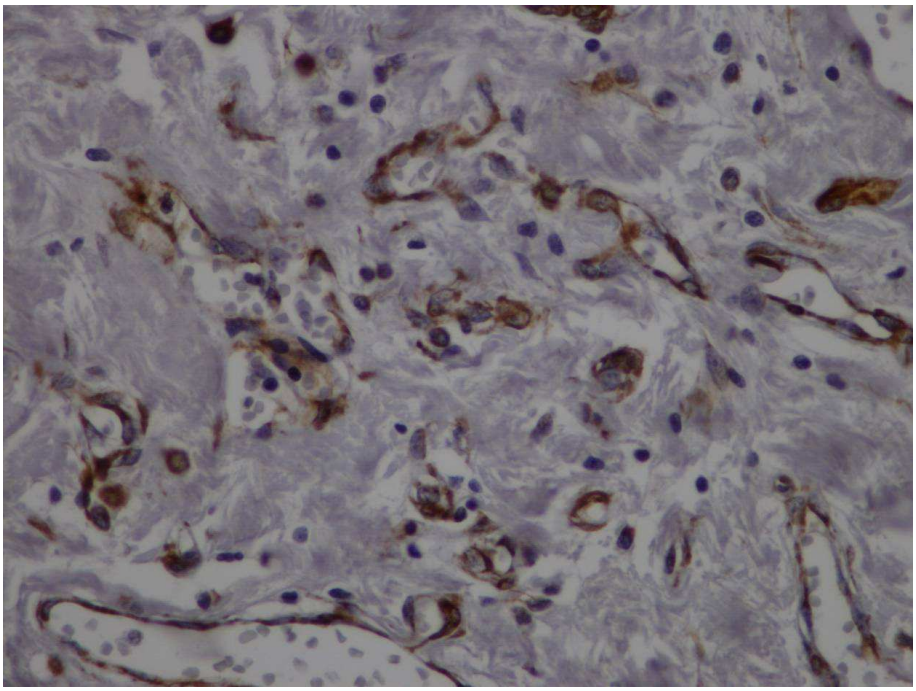
Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση μικρότερου βαθμού παρατηρήθηκε επίσης στα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του στρώματος (ινοβλάστες και ενδοθηλιακά) (Εικόνα 6) και στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό μαζικό αδένα (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, από τα 96 ιστικά δείγματα, στα καρκινικά κύτταρα υψηλή μεμβρανική εντόπιση αναδείχτηκε στα 79 (81,9%), χαμηλή στα 11 (11,7%) και αρνητική σε 6 (6,4%), ενώ τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό

ήταν 25(26%), 22 (23%) και 48 (50%) αντίστοιχα. Η κυτταροπλασματική έκφραση στα καρκινικά κύτταρα ήταν υψηλή στα 88 (91,6%), χαμηλή στα 7 (7,3%) και αρνητική σε 1 (1,1%), ενώ η αντίστοιχη έκφραση στα φυσιολογικά επιθηλιακά

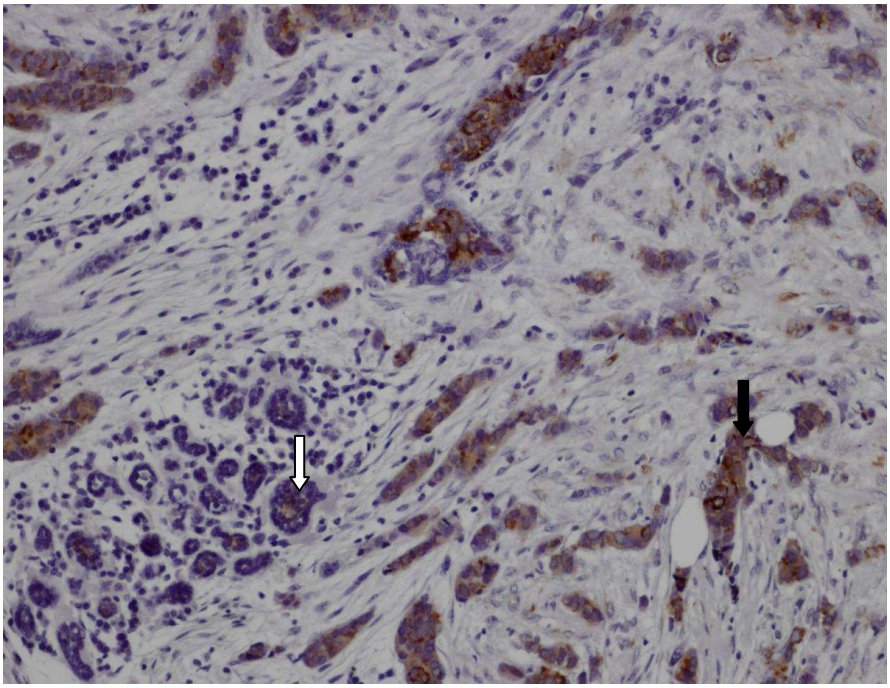


Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται κυτταροπλασματική και μεμβρανική εντόπιση της πρωτεΐνης SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα με ανοσοϊστοχημική χρώση. Θετική χρώση για την πρωτεΐνη SDF-1 αναδεικνύεται και στους ινοβλάστες κα στα αγγεία του καρκινικού στρώματος βέλη (40×).

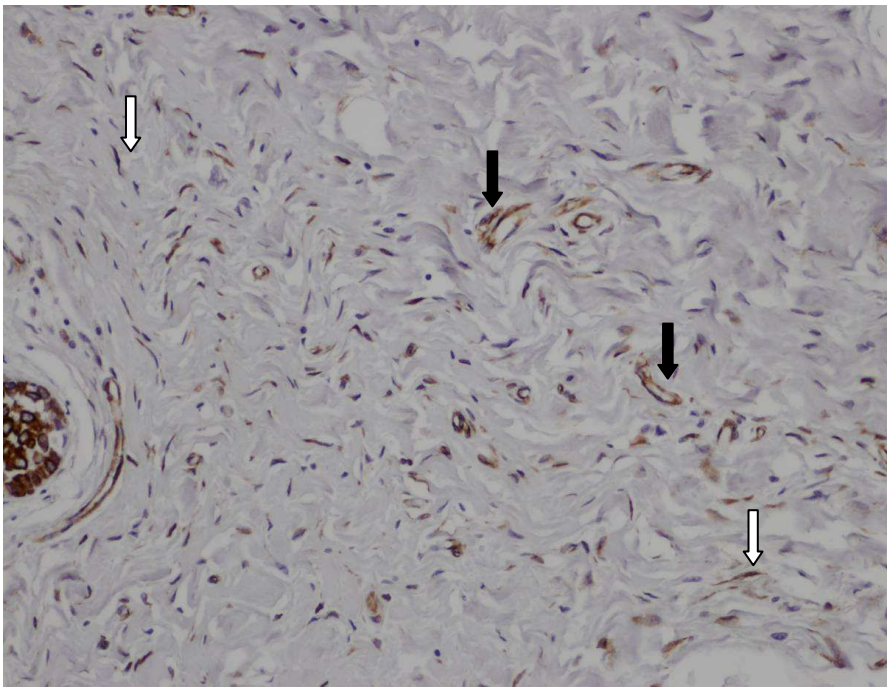
κύτταρα ήταν 26 (30,2%), 32 (37,2%) και 28 (32,6%), αντίστοιχα. Οι ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος παρουσίασαν υψηλής έντασης κυτταροπλασματική χρώση σε 61 περιπτώσεις (63,5%), χαμηλής έντασης σε 21 (21,9%) και αρνητική σε 14 (14,6%), ενώ οι φυσιολογικοί ινοβλάστες εμφάνισαν υψηλής έντασης χρώση σε 7 περιπτώσεις (7,3%), χαμηλής έντασης σε 22 (22,9%) και αρνητική σε 67 (69,8%). Όσον αφορά τα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού ιστού, υψηλής έντασης κυτταροπλασματική χρώση παρατηρήθηκε σε 90 περιπτώσεις (94,7%), χαμηλής έντασης σε 4 (4,2%) και αρνητική σε 1 (1,1%), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα ενδοθηλιακά κύτταρα του φυσιολογικού ιστού ήταν 22 (22,9%), 56 (58,3%) και 18 (18,8%) αντίστοιχα. Σύμφωνα με το τεστ Wilcoxon, η έκφραση της SDF-1 στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό διέφερε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p<0.001$).



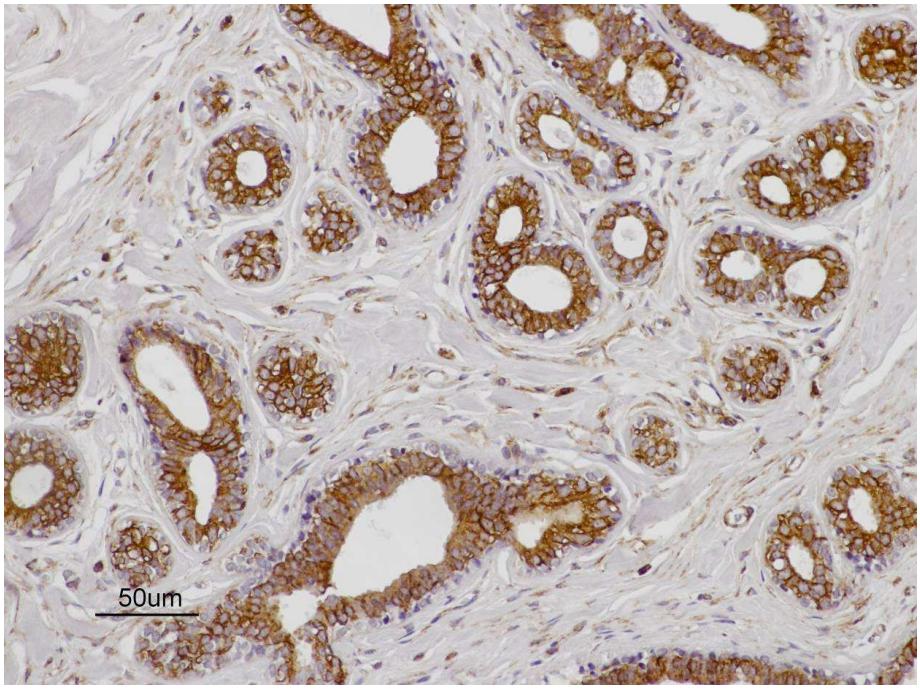
Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται θετική χρώση για την πρωτεΐνη SDF-1 κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο του καρκινικού στρώματος (40×).



Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή, η οποία δείχνει με ανοσοϊστοχημική χρώση την έκφραση της SDF-1 σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα των λοβίων του μαζικού αδένα (λευκό βέλος) και σε παρακείμενα καρκινικά κύτταρα (μαύρο βέλος) (40×).



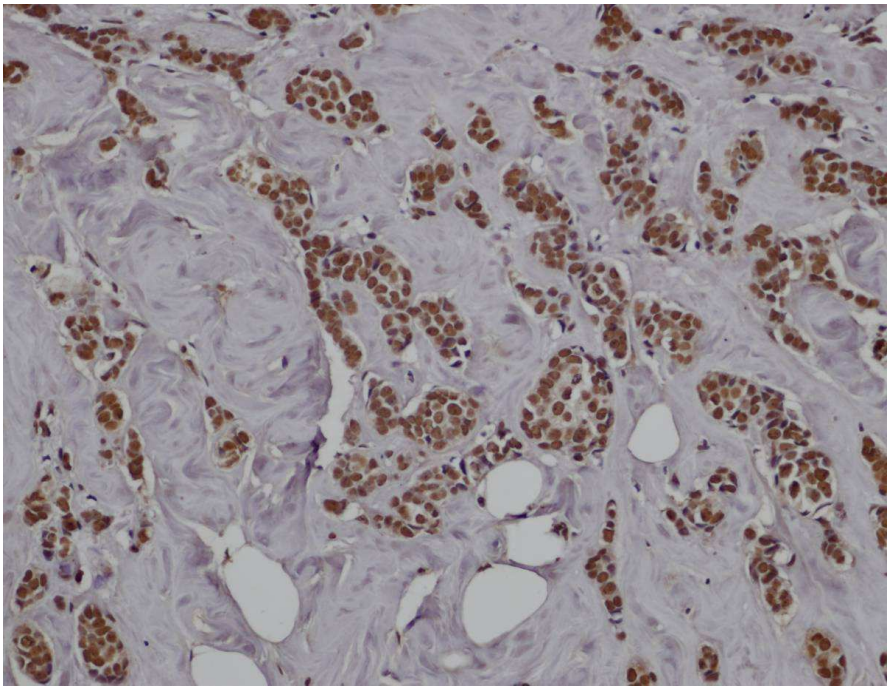
Εικόνα 6 Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή, η οποία δείχνει με ανοσοϊστοχημική χρώση την έκφραση της SDF-1 σε ινοβλάστες (λευκά βέλη) και σε αγγεία (μαύρα βέλη) μη νεοπλασματικού στρώματος του μαζικού αδένα. Στην άκρη της εικόνας αναγνωρίζεται ομάδα καρκινικών κυττάρων με θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του μορίου (40×).



Εικόνα 7 Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή που δείχνει με ανοσοϊστοχημική χρώση την έκφραση (μεμβρανική και κυτταροπλασματική) της SDF-1 σε μη νεοπλασματικά παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα των λοβίων του μαζικού αδένα (20×).

CXCR4

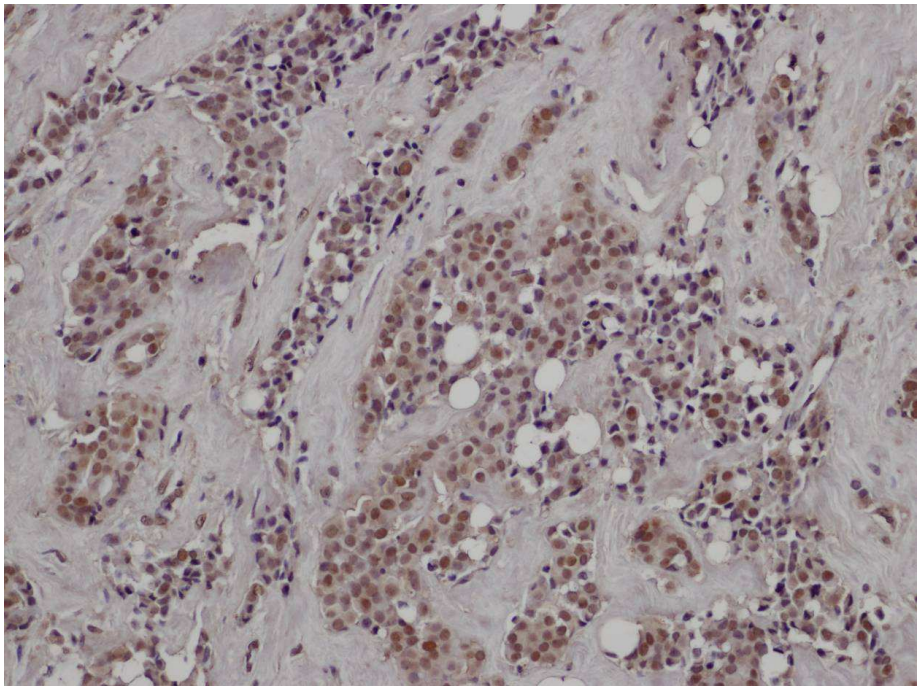
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του CXCR4 στον καρκινικό (Εικόνα 8,9 και 10) και στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό ιστό (Εικόνα 11) εντοπίστηκε στον πυρήνα ή/και στο κυτταρόπλασμα επιθηλιακών κυττάρων, σε ινοβλάστες και σε ενδοθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται κυρίως πυρηνική ανοσοϊστοχημική χρώση για την CXCR4 πρωτεΐνη στα καρκινικά κύτταρα (40×).

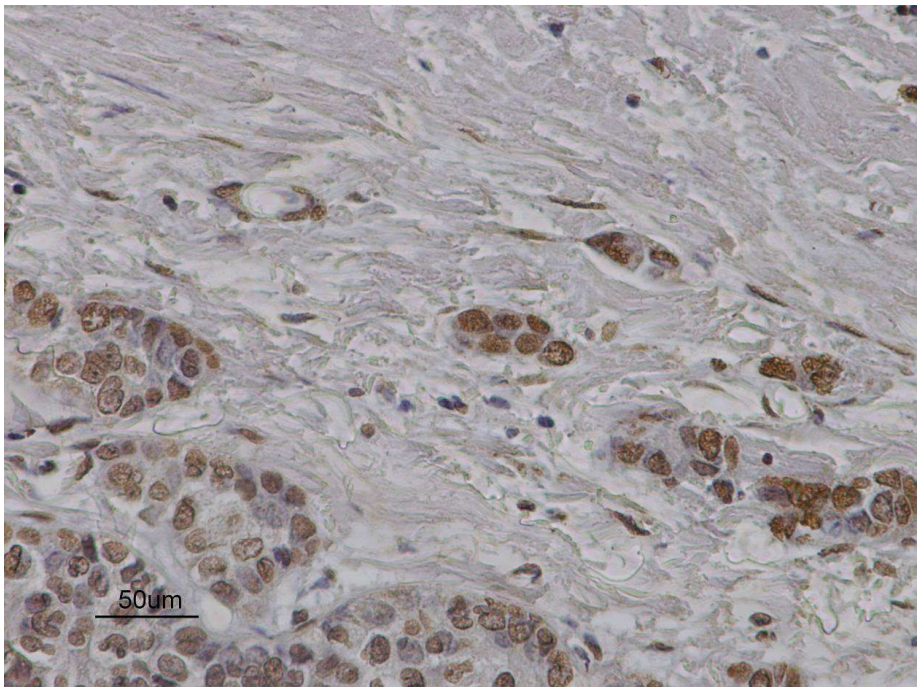
Συγκεκριμένα, από τα 96 ιστικά δείγματα, στα καρκινικά κύτταρα υψηλή πυρηνική έκφραση αναδείχτηκε στα 57 εξ αυτών (59,3%), χαμηλή στα 25 (26,1%) και αρνητική σε 14 (14,6%). Στον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό δεν αναδείχτηκε σε καμία περίπτωση υψηλή πυρηνική έκφραση, ενώ χαμηλή και αρνητική έκφραση απαντήθηκε σε 8 (8,4%) και 88 (91,6%) περιπτώσεις, αντίστοιχα. Η κυτταροπλασματική έκφραση στα καρκινικά κύτταρα ήταν υψηλή σε 22 περιπτώσεις (22,9%), χαμηλή σε 31 (32,3%) και αρνητική σε 43 (44,8%). Αντίστοιχα, στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα η έκφραση ήταν χαμηλή σε 6 περιπτώσεις (6,3%) και αρνητική σε 90 (93,7%), ενώ δεν αναδείχθηκαν επιθηλιακά κύτταρα με υψηλή έκφραση. Οι καρκινικοί ινοβλάστες εμφάνισαν υψηλή έκφραση σε 61 δείγματα

(63,5%), χαμηλή σε 27 (28,1%) και αρνητική σε 8 (8,4%). Οι φυσιολογικοί ινοβλάστες στην συντριπτική πλειονότητά (99%) τους δεν εκδήλωσαν έκφραση του CXCR4, ενώ μόλις ένα δείγμα εμφάνισε χαμηλή έκφραση (1%). Παρόμοια εικόνα παρουσίασε και η ανοσοϊστοχημική χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το

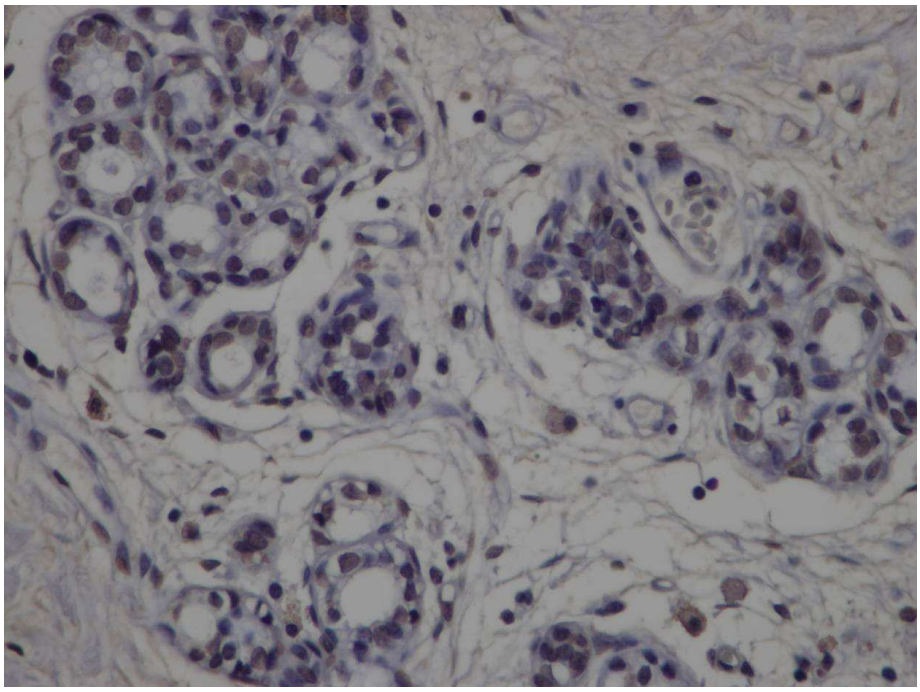


Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται πυρηνική και κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για την CXCR4 πρωτεΐνη στα καρκινικά κύτταρα, καθώς και στους ινοβλάστες (40×).

σύνολο τους στο φυσιολογικό ιστό να μην εκφράζουν το μόριο του CXCR4, ενώ στον καρκινικό ιστό υψηλής έντασης χρώση αναδείχτηκε σε 51 περιστατικά (53,1%), χαμηλής έντασης σε 38 (39,5%) και αρνητική σε 7 (7,4%). Όπως έδειξε και η ανάλυση με το τεστ Wilcoxon, η έκφραση του CXCR4 στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό διέφερε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p<0.001$).



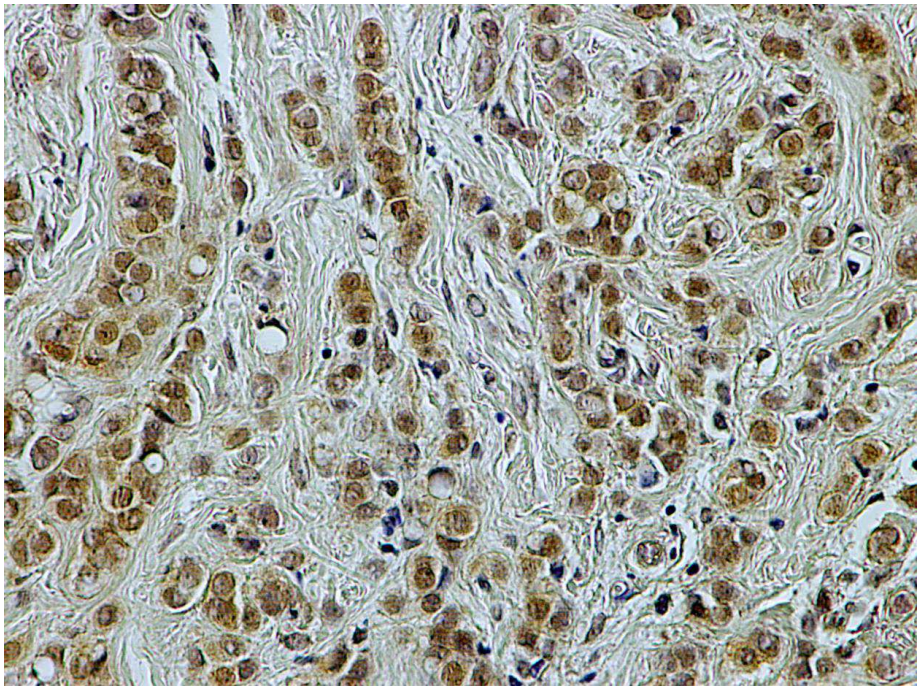
Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται ανοσοϊστοχημική χρώση για την CXCR4 πρωτεΐνη στα καρκινικά κύτταρα, καθώς στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (40×).



Εικόνα Αντιπροσωπευτική τομή που δείχνει ένα μη νεοπλασματικό λόβιο του μαζικού αδένα με ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης CXCR4 στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα (40×)

HIF-1α

Ανοσοϊστοχημική έκφραση για τον HIF-1α αναδείχθηκε στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 12) ενώ δεν παρατηρήθηκε ανοσοθετικότητα για τον HIF-1α στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό ιστό. Συγκεκριμένα, από τα 96 περιστατικά, 64 εμφάνισαν υψηλή πυρηνική έκφραση (66,7%), 18 χαμηλή (18,8%), ενώ 14 περιστατικά ήταν αρνητικά (14,6%). Υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση εμφάνισαν 74 περιστατικά (77,1%), χαμηλή 20 (20,8%), ενώ αρνητική έκφραση 2 περιστατικά (2,1%). Όπως έδειξε και η ανάλυση με το τεστ Wilcoxon, η έκφραση του HIF-1α στον καρκινικό και στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό διέφερε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p<0.001$).

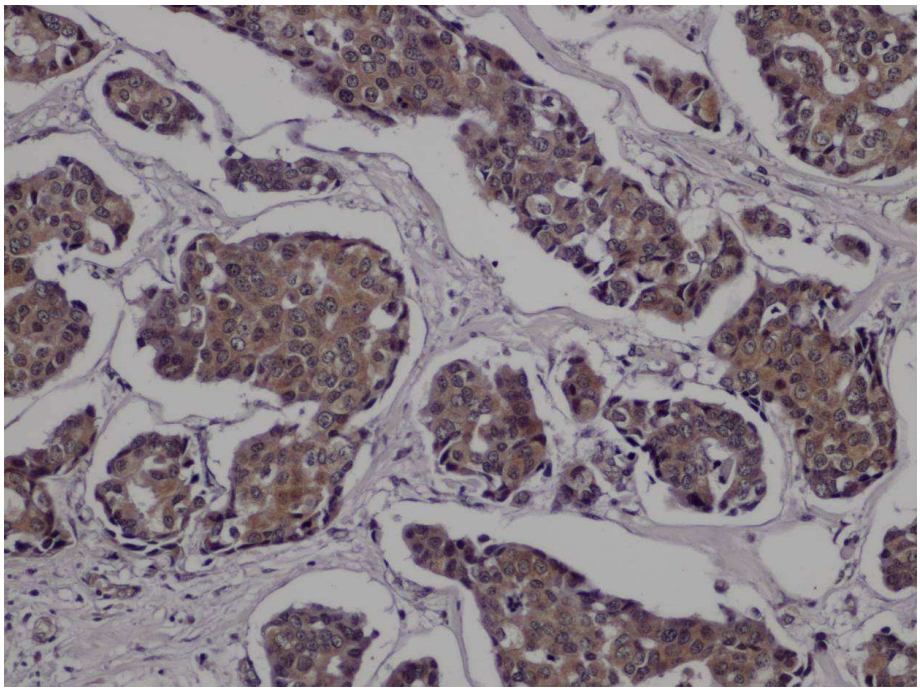


Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται πυρηνική και κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για τον HIF-1α στα καρκινικά κύτταρα (40×).

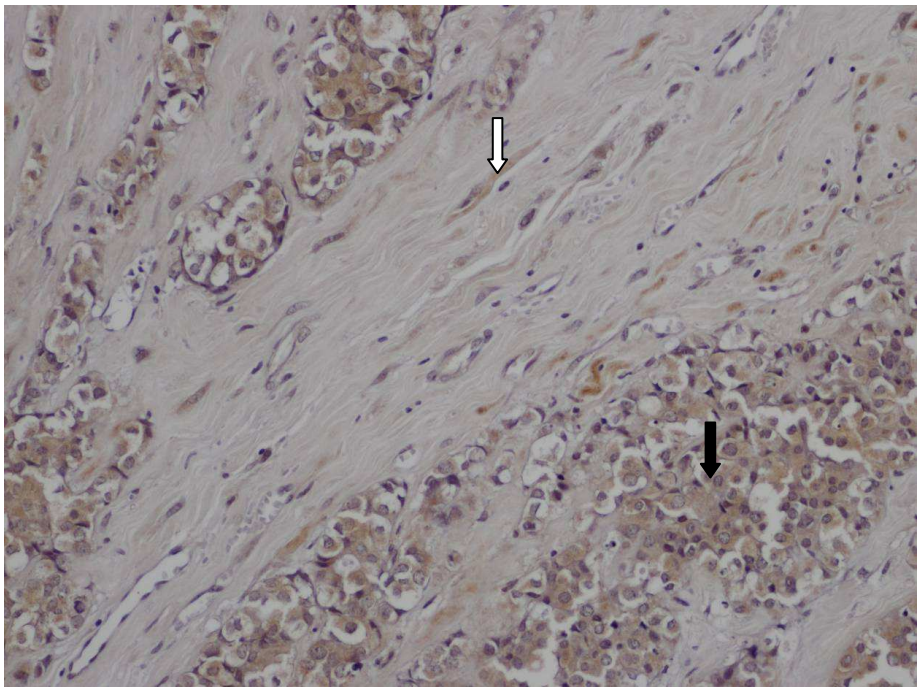
MMP-9

Στον καρκινικό ιστό θετική έκφραση παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 13 και 14), σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ινοβλάστες (Εικόνα 14). Αντίθετα, ο φυσιολογικός παρακείμενος ιστός δεν εμφάνισε έκφραση της MMP-9. Συγκεκριμένα, από τα 96 ιστικά δείγματα, υψηλή κυτταροπλασματική έκφραση

της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε σε 64 περιπτώσεις (66,6%), χαμηλή σε 22 (22,9%) και αρνητική σε 10 (10,5%). Οι ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος εμφάνισαν υψηλή έκφραση σε 8 περιπτώσεις (8,4%), χαμηλή σε 13 (13,5%) και αρνητική σε 75 (78,1%). Τέλος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος παρουσίασαν χαμηλή έκφραση σε 3 περιπτώσεις (3,1%) και αρνητική σε 93 (96,9%). Υψηλή έκφραση δεν απαντήθηκε σε καμία περίπτωση. Όπως έδειξε η ανάλυση με το τεστ Wilcoxon, η έκφραση της MMP-9 στον καρκινικό και στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό ιστό διέφερε σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ($p<0.001$).



Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα (40×).



Εικόνα Αντιπροσωπευτική ιστολογική τομή διηθητικού καρκινώματος μαστού στην οποία παρατηρείται κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για τη μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα (μαύρο βέλος) και στους ινοβλάστες (λευκό βέλος) του καρκινικού στρώματος (40×).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΕΞΕΤΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ

SDF-1

Η μεμβρανική και η κυτταροπλασματική εντόπιση της SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα εμφάνισαν θετική συσχέτιση ($r=0.376$, $p<0.01$), όπως και οι αντίστοιχες εκφράσεις στον παρακείμενο φυσιολογικό ιστό ($r=0.574$, $p<0.01$). Επιπλέον, στον φυσιολογικό ιστό θετική συσχέτιση εμφάνισε η έκφραση της SDF-1 στους ινοβλάστες με την μεμβρανική και την κυτταροπλασματική εντόπιση του μορίου στα επιθηλιακά κύτταρα ($r=0.225$, $p=0.04$ και $r=0.237$, $p=0.03$ αντίστοιχα). Η έκφραση της SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του ίδιου μορίου στους καρκινικούς ινοβλάστες ($r=0.291$, $p<0.01$) και αρνητικά με την κυτταροπλασματική έκφραση της SDF-1 στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Τέλος, η έκφραση της SDF-1 στους ινοβλάστες του φυσιολογικού στρώματος σχετίστηκε θετικά με την έκφραση αυτών του καρκινικού στρώματος ($r=0.218$, $p=0.04$).

Όσον αφορά στα υπόλοιπα υπό εξέταση μόρια, θετική συσχέτιση αναδείχθηκε μεταξύ της έκφρασης της SDF-1 στους καρκινικούς ινοβλάστες και αφενός της έκφρασης της MMP-9 και του CXCR4 στους καρκινικούς ινοβλάστες (r=0.248, p=0.01 και r=0.442, p<0.01 αντίστοιχα) και αφετέρου της έκφρασης του CXCR4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος (r=0.24, p=0.02). Επίσης, θετική συσχέτιση εμφάνισε η κυτταροπλασματική εντόπιση του μορίου της SDF-1 στα φυσιολογικά κύτταρα και η πυρηνική έκφραση του μορίου του CXCR4 στα ίδια κύτταρα (r=0.221, p=0.032). Επιπλέον, η έκφραση της SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος σχετίστηκε θετικά με την αντίστοιχη έκφραση του CXCR4 (r=0.211, p=0.04).

CXCR4

Η έκφραση του CXCR4 στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του μορίου στους καρκινικούς ινοβλάστες (r=0.45, p<0.01) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος (r=0.48, p<0.01). Παρομοίως, και η έκφραση του CXCR4 στον πυρήνα των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του μορίου στους ινοβλάστες του φυσιολογικού στρώματος (r=0.34, p<0.01). Επιπλέον, η έκφραση του CXCR4 στους καρκινικούς ινοβλάστες εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση του μορίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος (r=0.52, p<0.01). Η έκφραση του CXCR4 εμφάνισε πολλαπλές συσχετίσεις με την έκφραση της MMP-9 (βλ. παρακάτω).

HIF-1α

Η κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-1α συσχετίστηκε θετικά με την πυρηνική έκφρασή του (r=0.635, p<0.01), καθώς και με την έκφραση της MMP-9 (r=0.264, p=0.01).

MMP-9

Η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε θετικά με την έκφρασή της στους καρκινικούς ινοβλάστες (r=0.254, p=0.01). Πολλές ήταν και οι συσχετίσεις της έκφρασης της MMP-9 με την έκφραση του CXCR4. Συγκεκριμένα, η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε θετικά με την πυρηνική έκφραση του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα (r=0.3, p<0.01) και με την έκφρασή του στους καρκινικούς ινοβλάστες (r=0.2, p=0.03). Επιπλέον, η έκφραση της MMP-9 στους καρκινικούς ινοβλάστες εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση του CXCR4 στον πυρήνα των καρκινικών

κυττάρων (r=0.21, p=0.04), στους καρκινικούς ινοβλάστες (r=0.27, p<0.01) και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος (r=0.22, p=0.03).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

SDF-1

Η μεμβρανική εντόπιση της SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα σχετίστηκε θετικά με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας (grade) (r=0.275, p<0.01). Η έκφραση στους καρκινικούς ινοβλάστες εμφάνισε θετική συσχέτιση με το Ki67 (r=0.25, p=0.02) και με το στάδιο της νόσου κατά TNM (r=0.205, p=0.046). Η ενδοθηλιακή έκφραση της SDF-1 στον καρκινικό ιστό εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση του Her2 (r=0.236, p=0.02). Όσον αφορά στον φυσιολογικό παρακείμενο ιστό, η κυτταροπλασματική εντόπιση της SDF-1 στα επιθηλιακά κύτταρα συσχετίστηκε αρνητικά με το μέγεθος του όγκου (r=-0.277, p=0.01) και θετικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση (r=0.219, p=0.04).

CXCR4

Η κυτταροπλασματική έκφραση του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση (r=0.271, p<0.01).

HIF-1α

Η πυρηνική έκφραση του μορίου του HIF-1α εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των ER (r=-0.262, p=0.012). Η κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-1α εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των PR (r=-0.221, p=0.033).

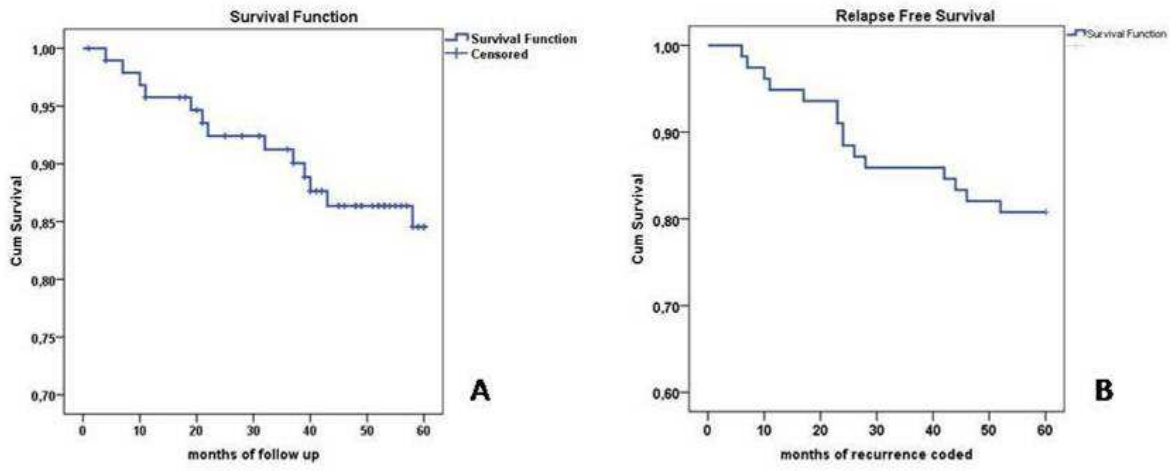
MMP-9

Η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα σχετίστηκε θετικά με την παρουσία διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων κατά τη διάγνωση (r=0.3, p<0.01), αλλά αρνητικά με το στάδιο της νόσου κατά TNM (r=-0.205, p=0.046) και με το μέγεθος του όγκου (r=-0.214, p=0.04). Η έκφραση της MMP-9 σε καρκινικούς ινοβλάστες συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση των ER (r=0.209, p=0.04).

ΕΠΙΒΙΩΣΗ

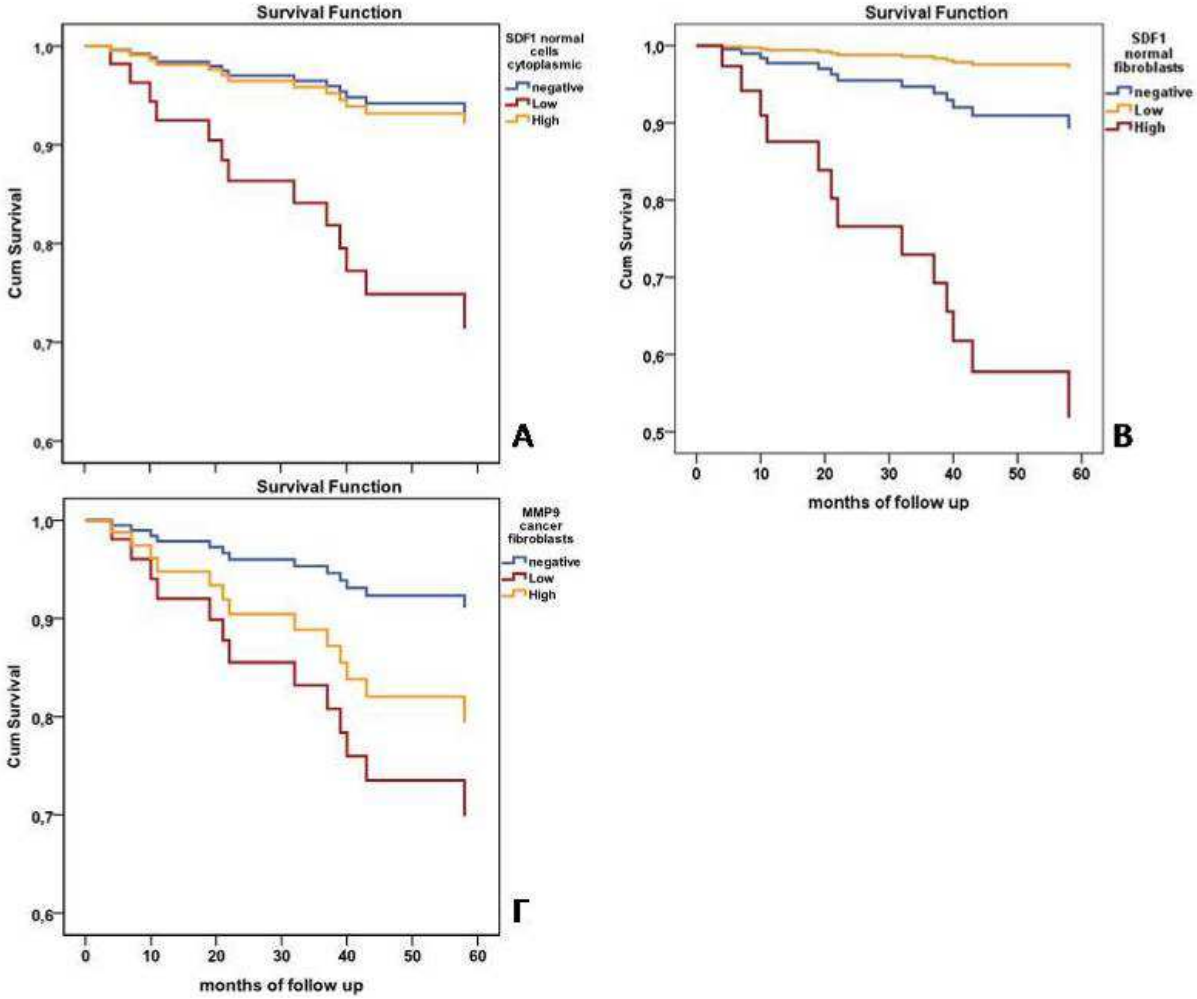
Η συνολική επιβίωση (overall survival – OS) στα 5 έτη ήταν 85% (Kaplan Meier), ενώ η ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (relapse free – FS) στα 5 έτη ήταν 81% (Kaplan Meier) (Εικόνα 16). Για να ελεγχθεί η επίδραση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης

των μορίων και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων στην επιβίωση, συγκρίθηκαν οι καμπύλες επιβίωσης (long rank test). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ευνοϊκότερη OS συσχετίστηκε με την εφαρμογή ακτινοθεραπείας (p=0.001) και ορμονοθεραπείας (p=0.004), με τη μη έκφραση του p53 (p=0.05), με την έκφραση των ER (p=0.02) και τέλος με την απουσία μεταστάσεων κατά την διάγνωση (p=0.002). Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα δεν προέκυψαν για τη RFS. Εφαρμόσθηκε ακολούθως πολυπαραγοντική ανάλυση *(Cox regression)* για την OS, στην οποία εισήλθαν όλες οι μεταβλητές οι οποίες στην μονοπαραγοντική ανάλυση εμφάνισαν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p<0.1$. Η χαμηλή έκφραση της SDF-1 στο κυτταρόπλασμα των μη νεοπλασματικών επιθηλιακών κυττάρων (HR: 4.83, 95% C.I.: 1.02 – 23, p=0.05) και η έκφραση της MMP-9 στους καρκινικούς ινοβλάστες (HR: 3.85, 95% C.I.: 1.11 – 13.4, p=0.03) ήταν ενδεικτικές χειρότερης επιβίωσης, ενώ η συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης των ίδιων μορίων με την επιβίωση δεν έφτασε σε στατιστική σημαντικότητα (Πίνακας 8). Η αυξημένη έκφραση της SDF-1 στους ινοβλάστες του φυσιολογικού στρώματος ήταν ενδεικτική χειρότερης πρόγνωσης (HR: 5.78, 95% C.I.: 1.43 -23.43, p=0.01), χωρίς η χαμηλή έκφραση να συσχετιστεί με την επιβίωση (Πίνακας 8) (Εικόνα 17).



Εικόνα Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για ολική επιβίωση (OS) (A) και για ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (RFS) (B).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης *(Cox regression)* για την OS						
Επιβαρυντικός παράγοντας	**Έκφραση**	***n***	**H.R.**	**95% C.I.**		**Τιμή p**
Κυτταροπλασματική έκφραση SDF1 σε φυσιολογικά κύτταρα	Αρνητική	37	1.00			
	Χαμηλή	30	4.83	1.02	23.00	**0.048**
	Υψηλή	28	1.18	0.16	8.56	0.869
Έκφραση SDF1 σε ινοβλάστες μη καρκινικού στρώματος	Αρνητική	66	1.00			
	Χαμηλή	22	0.26	0.03	2.13	0.210
	Υψηλή	7	5.78	1.43	23.43	**0.014**
Έκφραση MMP9 σε ινοβλάστες καρκινικού στρώματος	Αρνητική	16	1.00			
	Χαμηλή	59	3.85	1.11	13.40	**0.034**
	Υψηλή	10	2.47	0.50	12.31	0.268
Σημ.: H.R. = hazard ratio, C.I. = confidence interval						



Εικόνα Καμπύλες κατά Kaplan Meier για συνολική επιβίωση ασθενών με αρνητική, χαμηλή και υψηλή έκφραση του μορίου της SDF-1 στο κυτταρόπλασμα φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων (Α), του μορίου της SDF-1 στους ινοβλάστες του φυσιολογικού στρώματος (Β) και του μορίου της MMP-9 στους καρκινικούς ινοβλάστες (Γ).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΜΟΡΙΩΝ

SDF-1

Το μόριο της SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα εμφάνισε κυτταροπλασματική ή/και μεμβρανική εντόπιση, εύρημα σύμφωνο με δύο προηγούμενες ανάλογες μελέτες (T. Kobayashi et al., 2010; F. Liu et al., 2009). Σε άλλες ανοσοϊστοχημικές μελέτες, η έκφραση του μορίου εμφάνισε μόνο κυτταροπλασματική εντόπιση (Saima Hassan et al., 2009; Marini et al., 2007; Mirisola et al., 2009), ήταν επί της ουσίας αρνητική (Muller et al., 2001) ή η εντόπιση δεν καθοριζόταν επακριβώς (Kang et al., 2005; B. C. Lee et al., 2004). Η μεμβρανική εντόπιση του μορίου μπορεί να αποδοθεί και στην ιδιότητα της SDF-1 να συνδέεται με γλυκοζαμινογλυκάνες στην επιφάνεια των κυττάρων (Amara, 1999; Fermas et al., 2008; Hoogewerf et al., 1997; De La Luz Sierra et al., 2004). Τα δεδομένα που έχουν προκύψει από άλλες μεθόδους σε κυτταρικές σειρές και σε ιστικά δείγματα καρκίνου του μαστού είναι αντικρουόμενα (Kang et al., 2005; B. C. Lee et al., 2004; Marini et al., 2007; Muller et al., 2001). Όσον αφορά την έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα και σε ινοβλάστες, τα ευρήματα ήταν σύμφωνα με προηγούμενες ανοσοϊστοχημικές μελέτες (Allinen et al., 2004; Mirisola et al., 2009; Akira Orimo, Piyush B Gupta, et al., 2005; Serrati et al., 2008). Η έκφραση του μορίου της SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει αποδοθεί τόσο σε πρόσδεση εξωγενούς SDF-1 στον υποδοχέα CXCR4 όσο και σε ενδογενώς παραγόμενη SDF-1, η έκφραση του οποίου απαντάται σε EC φυσιολογικών ιστών αλλά επάγεται και στα πλαίσια νεοαγγείωσης (π.χ. κακοήθειες, ισχαιμία) (F. Liu et al., 2009; O Salvucci, L. Yao, Villalba, Sajewicz, Pittaluga, & G Tosato, 2002b). Τέλος, η έκφραση του μορίου σε φυσιολογικό ιστό έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες, εκ των οποίων αυτή του Lee και συν. καταγράφει στατιστικά πιο σημαντική έκφραση στον παθολογικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό (T. Kobayashi et al., 2010; B. C. Lee et al., 2004; M. K. Wendt, A. N. Cooper, & Dwinell, 2008).

CXCR4

Το μόριο του CXCR4 βρέθηκε να εκφράζεται στον πυρήνα ή/και στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών και καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων καθώς και στο καρκινικό στρώμα. Το στρώμα του φυσιολογικού παρακείμενου ιστού σε ελάχιστες περιπτώσεις εμφάνισε θετική ανοσοχρώση. Στη βιβλιογραφία απαντώνται αρκετές

ανοσοϊστοχημικές μελέτες έκφρασης του CXCR4 σε καρκίνο του μαστού, με ποικίλα αποτελέσματα όσον αφορά στην εντόπιση του μορίου. Συγκεκριμένα, στα επιθηλιακά κύτταρα έχει βρεθεί έκφραση μόνο πυρηνική (T. Kobayashi et al., 2010; Marini et al., 2007), μόνο κυτταροπλασματική (Mirisola et al., 2009), ταυτόχρονα πυρηνική και κυτταροπλασματική (L. Hao et al., 2007; Saima Hassan et al., 2009; F. Liu et al., 2009; O Salvucci et al., 2006; Y. C. Su et al., 2006), ταυτόχρονα μεμβρανική και κυτταροπλασματική (E Blot et al., 2008; Cabioglu et al., 2005; Tsoli et al., 2007), ταυτόχρονα πυρηνική, μεμβρανική και κυτταροπλασματική (Cabioglu, A. Sahin, Doucet, et al., 2005; Kato et al., 2003) ενώ άλλες μελέτες δεν καθορίζουν την ακριβή εντόπιση (Muller et al., 2001; Shim et al., 2006).

Η στρωματική έκφραση του μορίου αναφέρεται μόνο σε μια μελέτη (Mirisola et al., 2009). Υπό ορισμένες συνθήκες, το μόριο του CXCR4 μπορεί να εκφράζεται σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, συμβάλλοντας στη μετακίνησή τους (Qu et al., 2008), ενώ συγκεκριμένα σε ινοβλάστες του φυσιολογικού στρώματος του μαστού η έκφραση του μορίου επάγεται υπό την επίδραση διαλυτών καρκινικών παραγόντων, προσδίδοντάς τους πιο επιθετικό φαινότυπο (Eck, Cote, Winkelman, & Brinckerhoff, 2009). Το μόριο του CXCR4 είναι γνωστό ότι εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικούς ινοβλάστες (Bourcier et al., 2003; Qu et al., 2008), όσο και σε ινοβλάστες που εμπλέκονται σε παθολογικές διεργασίες όπως η φλεγμονή (Gomperts & Strieter, 2007) ή ο καρκίνος (Matsuo et al., 2009). Στον καρκίνο του μαστού ειδικότερα, το μόριο του CXCR4 εκφράζεται στους ινοβλάστες και μάλιστα η έκφρασή του φαίνεται να επάγεται υπό τη διαντίδραση των ινοβλαστών με τα καρκινικά κύτταρα (Eck et al., 2009). Η έκφραση του CXCR4 στους καρκινικούς ινοβλάστες έχει διττό ρόλο, καθότι επιτρέπει την επίδραση της SDF-1 σε αυτούς αφενός με αυτοκρινή από τον ενδογενώς παραγόμενο SDF-1 (Kojima et al., 2010) και αφετέρου με παρακρινή τρόπο από τον παραγόμενο από τα καρκινικά κύτταρα SDF-1. Η επίδραση αυτή επάγει πιθανόν τη μετάβαση των φυσιολογικών ινοβλαστών σε καρκινικούς ινοβλάστες, προσδίδοντάς τους πιο «επιθετικό» φαινότυπο. Επιπλέον, νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη γενετικών αλλαγών στους ινοβλάστες, οι οποίες προηγούνται της ανάπτυξης καρκίνου και επάγουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004). Τα ευρήματα αυτά ανάγουν τους ινοβλάστες από δευτερεύουσας σημασίας παθητικούς συντελεστές της

νεοπλασίας με επικουρική παρακρινή δράση, σε κομβικούς συντελεστές της καρκινογένεσης.

Η έκφραση του μορίου του CXCR4 στα ενδοθηλιακά κύτταρα έχει επιβεβαιωθεί σε φυσιολογικά αγγεία και σε καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων (Feil & Augustin, 1998; S. K. Gupta, 1998; Volin, L. Joseph, Shockley, & Davies, 1998). Όσον αφορά στην έκφραση σε αγγεία κακοήθους νεοπλασματος, έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις γλοιοβλαστώματος (Rempel, Dudas, S. Ge, & Gutierrez, 2000), μυελοβλαστώματος (J. B. Rubin et al., 2003), ηπατοκυτταρικού και παγκρεατικού καρκινώματος (Koshiba et al., 2000; W. Li, Gomez, & Z. Zhang, 2007) ενώ υπάρχει μόνο μία αναφορά σε καρκίνο του μαστού (Mirisola et al., 2009).

Όσον αφορά στο παρακείμενο φυσιολογικό παρέγχυμα του μαστού, τα ευρήματά της παρούσας μελέτης συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες ανέδειξαν σαφώς χαμηλότερη ή καθόλου έκφραση του μορίου του CXCR4 (Allinen et al., 2004; L. Hao et al., 2007; Kato et al., 2003; Muller et al., 2001; Schmid, Rudas, Rezniczek, Leodolter, & Zeillinger, 2004; Tsoli et al., 2007).

Η ερμηνεία της εντόπισης του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα είναι περίπλοκη λόγω της ασαφούς βιολογικής της σημασίας. Μετά τη διέγερση από την SDF-1, ο CXCR4 μπορεί να επιστρέψει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ή, πιθανότερα, να καταλήξει στα λυσοσώματα για αποδόμηση (Busillo & Benovic, 2007). Ως εκ τούτου, παρόλο που υπάρχει συχνή αναφορά στη βιβλιογραφία για πυρηνική ανοσοϊστοχημική εντόπιση του CXCR4 τόσο σε καρκίνο του μαστού (Cabioglu, A. Sahin, Doucet, et al., 2005; L. Hao et al., 2007; Kato et al., 2003; F. Liu et al., 2009; Marini et al., 2007; Y. C. Su et al., 2006) όσο και σε άλλους καρκίνους (X. He et al., 2010; Na et al., 2008; S.-C. Wang et al., 2010), δεν υφίσταται ακόμα τεκμηριωμένη εξήγηση για το ρόλο του μορίου του CXCR4 στον πυρήνα. Σε μία μόνο μελέτη αναφέρεται ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις της SDF-1, ο CXCR4 εντοπίζεται στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων μαστού (Shim et al., 2006). Εκτός αυτού, η κυτταροπλασματική έκφραση έχει θεωρηθεί από ορισμένους ερευνητές ως ένδειξη ενεργοποίησης του άξονα SDF-1 / CXCR4, καθώς η σύνδεση των δύο μορίων επάγει τη μεταφορά τους στο εσωτερικού του κυττάρου (O Salvucci et al., 2006; Tarasova et al., 1998).

HIF-1α

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α σε προηγούμενες μελέτες ήταν είτε πυρηνική και κυτταροπλασματική (Bos et al., 2004, 2001; Currie et al., 2004; Dales et al., 2005; Giatromanolaki et al., 2004; van der Groep et al., 2008; Kronblad, Jirstrom, Ryden, Nordenskjold, & Landberg, 2006; Schindl et al., 2002; E. Y. Tan et al., 2007; Zhong et al., 1999) είτε μόνο πυρηνική (Bos et al., 2003; Generali et al., 2006; Gruber et al., 2004; Kafousi et al., 2011; Kuijper et al., 2005; Schioppa et al., 2003; Schoppmann et al., 2006; Talks et al., 2000; E. Y. Tan et al., 2009; Tomes et al., 2003; Vleugel et al., 2005; M. Yan et al., 2009). Σε κάποιες εκ των μελετών στις οποίες αναδείχθηκε κυτταροπλασματική εντόπιση, οι ερευνητές αγνόησαν στην ανάλυσή τους την έκφραση αυτή καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα για κάποιο λειτουργικό ρόλο του μορίου του HIF-1α στο κυτταρόπλασμα. Παρ' όλα ταύτα, στην παρούσα μελέτη, εμείς όπως και άλλοι (Currie et al., 2004; Dales et al., 2005; Giatromanolaki et al., 2004; Zhong et al., 1999), συμπεριλάβαμε την κυτταροπλασματική έκφραση στην ανάλυση, όπως έχει γίνει και σε ανάλογες μελέτες άλλων τύπων καρκίνου (π.χ. παγκρέατος, παχέος εντέρου) (Couvelard et al., 2005; Wincewicz, Sulkowska, Koda, & Sulkowski, 2007).

MMP-9

Οι υπάρχουσες ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει ποικίλες εντοπίσεις του μορίου της MMP-9. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων η εντόπιση στα καρκινικά κύτταρα ήταν κυτταροπλασματική (Jobim et al., 2009; J L Jones, Glynn, & Walker, 1999; H. C. Li, D. C. Cao, et al., 2004; Mylona et al., 2007; Pellikainen et al., 2004) ενώ άλλες μελέτες ανέδειξαν κυτταροπλασματική και μεμβρανική (Scorilas et al., 2001; Z. S. Wu et al., 2008). Μόνο μία μελέτη αναφέρει απουσία χρώσης για το μόριο της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα (B. S. Nielsen et al., 1997). Όσον αφορά στη στρωματική έκφραση, αυτή αναφέρεται σε αρκετές μελέτες (Baker, Stephenson, Reed, & N. J. Brown, 2002; García et al., 2010; J L Jones et al., 1999; H. C. Li, D. C. Cao, et al., 2004; Mylona et al., 2007; B. S. Nielsen et al., 1997; Pellikainen et al., 2004; Scorilas et al., 2001). Όσον αφορά το φυσιολογικό μαστικό ιστό, σε όσες περιπτώσεις έχει αναφερθεί θετική έκφραση αυτή είναι συνήθως ασθενής και σπάνια (L. Hao et al., 2007; J L Jones et al., 1999; Lebeau, AG Nerlich, & Sauer, 1999; Pellikainen et al., 2004). Τέλος, η ανοσοϊστοχημική έκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα έχει καταγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (Lebeau et al., 1999; B. S. Nielsen et al., 1997; Pellikainen et al., 2004; Scorilas et al., 2001)

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ

SDF-1

Θετική συσχέτιση αναδείχθηκε μεταξύ της έκφρασης της SDF-1 στους καρκινικούς ινοβλάστες και της έκφρασης του CXCR4 στους καρκινικούς ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος . Επιπλέον, η έκφραση της SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος σχετίστηκε θετικά με την αντίστοιχη έκφραση του CXCR4. Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν με ένα προτεινόμενο μοντέλο των Orimo και συν. σύμφωνα με το οποίο οι ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος εμφανίζουν αυξημένη έκκριση της SDF-1 η οποία αφενός ασκεί αυτοκρινή δράση στους ινοβλάστες και αφετέρου επάγει την στρατολόγηση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό νέων αγγείων (A Orimo, P B Gupta, et al., 2005). Σε πρόσφατη έρευνα έχει προταθεί ότι η έκφραση τόσο της SDF-1 όσο και του CXCR4 στους καρκινικούς ινοβλάστες επάγονται από αυτοκρινώς δρώντα μόρια TGF-β, εγκαθιστώντας έναν αυτοκρινή βρόγχο (Kojima et al., 2010).

Είναι γνωστό ότι οι ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος εμφανίζουν αυξημένη έκφραση των SDF-1 και CXCR4 (Eck et al., 2009; Kojima et al., 2010) και ότι η SDF-1 μέσω χημειοτακτικών διεργασιών προσελκύει κύτταρα που εκφράζουν CXCR4 όπως στην προκειμένη περίπτωση τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Bian et al., 2004; S. K. Gupta, 1998; Volin et al., 1998).

Η μεμβρανική εντόπιση της SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα σχετίστηκε θετικά με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας. Οι Kang και συν. σε σχετικά πρόσφατη μελέτη διαπίστωσαν ότι η αυξημένη έκφραση της SDF-1 έτεινε να σχετίζεται με υψηλότερο ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, χωρίς ωστόσο αυτή η συσχέτιση να φτάνει σε ένα στατιστικά σημαντικό επίπεδο και χωρίς να καθορίζεται λεπτομερώς η εντόπιση της έκφρασης του μορίου (Kang et al., 2005).

Η έκφραση στους καρκινικούς ινοβλάστες εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση του Ki67 και με το στάδιο κατά TNM, ευρήματα τα οποία παρατηρούνται για πρώτη φορά στον καρκίνωμα του μαστού και βρίσκονται σε συμφωνία με ευρήματα μελετών σύμφωνα με τις οποίες η SDF-1 ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη διηθητικότητα, και τη μετανάστευση (Hall & Korach, 2003; Muller et al., 2001). Συντίθεται από τους ινοβλάστες, ασκώντας

παρακρινή δράση στα καρκινικά κύτταρα και αυτοκρινή στους ινοβλάστες (Kojima et al., 2010; A Orimo & R A Weinberg, 2006; A Orimo, P B Gupta, et al., 2005).

Η ενδοθηλιακή έκφραση της SDF-1 στον καρκινικό ιστό εμφάνισε θετική συσχέτιση με την έκφραση του Her2. Η συσχέτιση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στον κομβικό ρόλο αμφότερων των μορίων στη νεοαγγείωση του καρκίνου του μαστού. Είναι γνωστό ότι το μόριο Her2 ενέχεται στη δημιουργία νεόπλαστων αγγείων (Izumi, L. Xu, di Tomaso, Fukumura, & Jain, 2002; Vameşu, 2007; Wen et al., 2006), διεργασία η οποία προϋποθέτει χημειοτακτική μετακίνηση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων από το μυελό των οστών στην περιοχή του όγκου. Στη μετακίνηση αυτή εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό το μόριο της SDF-1, το οποίο συνδεόμενο με τον υποδοχέα του CXCR4 στην επιφάνεια των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων συμβάλει στη μετακίνησή τους προς τον όγκο, στη συγκράτησή τους στη φωλεά της νεοαγγείωσης (neo-angiogenic niche) και στη σταθεροποίηση των νεοαγγείων (Aghi, K. S. Cohen, R. J. Klein, David T Scadden, & Chiocca, 2006; Bagley, Kerbel, Bertolini, & Shaked, 2010; Akira Orimo, Piyush B Gupta, et al., 2005; I. Petit, D. Jin, & Rafii, 2007; O Salvucci, L. Yao, Villalba, Sajewicz, Pittaluga, & G Tosato, 2002a). Επιπλέον, η SDF-1 συνδέεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και μέσω γλυκοζαμινογλυκανών, επιτρέποντας τη συγκράτηση (arrest) των κυκλοφορούντων προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων (Aiuti, Webb, Bleul, T. Springer, & Gutierrez-Ramos, 1997; Netelenbos et al., 2002; Peled et al., 1999).

Τέλος, η κυτταροπλασματική έκφραση της SDF-1 στα φυσιολογικά κύτταρα του μαστικού αδένα συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση, γεγονός που θα μπορούσε να σχετιστεί με την εμπλοκή του άξονα SDF-1 / CXCR4 στον οστεοτροπισμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού (J Wang, Loberg, & R S Taichman, 2006).

CXCR4

Η κυτταροπλασματική έκφραση του CXCR4 στα καρκινικά κύτταρα, η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι ενδεικτική ενεργοποιημένου άξονα CXCR4/SDF-1, συσχετίστηκε θετικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση. Ο κομβικός ρόλος του άξονα CXCR4 / SDF-1 στην ανάπτυξη οστικών μεταστάσεων είναι καλά στοιχειοθετημένος (Cabioglu et al., 2009; J Wang et al., 2006) και έχει αποτελέσει πεδίο ερευνών για την ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά των

οστικών μεταστάσεων (Coleman et al., 2008; Hirbe, E. A. Morgan, & K N Weilbaecher, 2010; Rahman et al., 2006). Έρευνες σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου σχετίζουν την έκφραση του μορίου του CXCR4 με απομακρυσμένες μεταστάσεις γενικά (Linhui Wang et al., 2009) ή και ειδικότερα με την ύπαρξη οστικής διήθησης (H. V. Russell, Hicks, Okcu, & Nuchtern, 2004; Xiang et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, για πρώτη φορά αναδεικνύεται αυτή η συσχέτιση σε καρκίνο του μαστού.

HIF-1α

Η πυρηνική έκφραση του μορίου του HIF-1α εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των ER και η κυτταροπλασματική με την έκφραση των PR. Η αρνητική συσχέτιση της έκφρασης του HIF-1α με τους υποδοχείς ER και PR συμφωνεί με αποτελέσματα ανάλογων μελετών (Bos et al., 2003; Giatromanolaki et al., 2004; van der Groep et al., 2008; Kafousi et al., 2011; Kronblad et al., 2006; Kurebayashi, Otsuki, T Moriya, & Sonoo, 2001; M. Yan et al., 2009). Ευρήματα από κυτταρικές σειρές σε υποξία και ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποδεικνύουν ότι ο HIF-1α εμπλέκεται στην επαγωγή αποδόμησης των ER καθώς και στην αναστολή έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης (C. Cooper et al., 2004; Kurebayashi et al., 2001; Stoner, 2002).

Η κυτταροπλασματική έκφραση του HIF-1α συσχετίστηκε θετικά με την πυρηνική έκφρασή του σε συμφωνία με μελέτη των Schindl και συν. (Schindl et al., 2002). Η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 εμφάνισε θετική συσχέτιση με την αντίστοιχη του HIF-1α, εύρημα το οποίο απαντάται και στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (βλ. ενότητα MMP-9) (D. E. B. Swinson, J Louise Jones, et al., 2004).

MMP-9

Η έκφραση της MMP-9 τόσο στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος όσο και στα καρκινικά κύτταρα εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση του CXCR4 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος και στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η έκφραση στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος σχετίστηκε και με την έκφραση της SDF-1 στα ίδια κύτταρα. Τα ως άνω ευρήματα υποδηλώνουν κάποιο βαθμό αλληλεπίδρασης του άξονα SDF-1 / CXCR4 με την MMP-9. Έχει δειχτεί σε κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού και γλοιοβλαστώματος ότι η SDF-1 επάγει την έκφραση της MMP-9 (Fernandis et al.,

2004) (Kenig et al., 2010). Επίσης, είναι γνωστό, ότι στα μονοκύτταρα και στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα η SDF-1 επάγει την έκφραση της MMP-9 (Sonata Jodele, Blavier, J. M. Yoon, & Yves A DeClerck, 2006; Klier et al., 2001), εύρημα το οποίο έχει αναφερθεί και σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (H. Shao et al., 2008).

Η έκφραση της MMP-9 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων σχετίστηκε αρνητικά με το μέγεθος του όγκου. Η αρνητική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης (Pellikainen et al., 2004), ενώ οι Scorilas και συν. έδειξαν ότι οι αρνητικοί για την MMP-9 όγκοι έτειναν να είναι μεγαλύτεροι (Scorilas et al., 2001). Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη γνωστή αντιαγγειογενετική δράση της MMP-9 (Pozzi et al., 2000). Άλλωστε, όπως προκύπτει από προηγούμενες μελέτες, η έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Pellikainen et al., 2004; Scorilas et al., 2001) όσο και σε επίπεδο mRNA (Pacheco, Mourão, E. B. Mantovani, Nishimoto, & Brentani, 1998) σχετίστηκε με καλύτερη πρόγνωση. Επιπλέον, η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 εμφάνισε θετική συσχέτιση με τη διήθηση λεμφαδένων, εύρημα το οποίο συμφωνεί με αποτελέσματα παλαιότερων μελετών (L. Hao et al., 2007; Z. S. Wu et al., 2008; Yi et al., 2008). Πιθανόν η έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα αντίκειται στην ανάπτυξη του όγκου, αλλά προσδίδει ένα πλεονέκτημα ως προς τη λεμφαδενική επέκταση της νόσου.

Ωστόσο, ενδιαφέρον έχει και το γεγονός ότι στην παρούσα μελέτη η έκφραση της MMP-9 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος αναδείχθηκε ως επιβαρυντικός παράγοντας της επιβίωσης. Σε δύο παλαιότερες μελέτες η στρωματική έκφραση του μορίου της MMP-9 έχει συσχετιστεί με χειρότερη επιβίωση (Mylona et al., 2007; Pellikainen et al., 2004). Πιθανολογείται ότι η στρωματική έκφραση της MMP-9 μπορεί να αντικατοπτρίζει μια αύξηση του ενεργού ενζύμου, η οποία ενισχύει τη μεταστατικότητα και την αγγειογένεση (S. Huang, 2002; Emilia Mira et al., 2004; Pellikainen et al., 2004).

Επιπλέον, η έκφραση της MMP-9 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος σχετίστηκε θετικά με την έκφραση των ER, εύρημα σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη, στην οποία όμως η έκφραση της MMP-9 αφορά τους ινοβλάστες στην περιφέρεια του όγκου (J M Del Casar et al., 2009). Είναι γνωστό ότι σε καρκίνο του μαστού τα οιστρογόνα ενεργοποιούν την MMP-9 και σε κύτταρα καρκίνου του

ενδομητρίου η ενεργοποίηση του υποδοχέα ER-α επάγει την έκφραση της (Mizumoto et al., 2002; Paquette et al., 2003).

Η κυτταροπλασματική έκφραση της MMP-9 εμφάνισε θετική συσχέτιση με την αντίστοιχη του HIF-1α, εύρημα το οποίο απαντάται και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (D. E. B. Swinson, J Louise Jones, et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου αναφέρουν επαγωγή της έκφρασης της MMP-9 από την υποξία, χωρίς ωστόσο να εμπλέκουν τον HIF-1α στη ρύθμιση της έκφρασης της MMP-9 (Canning, Postovit, Clarke, & Graham, 2001b; S. Kondo et al., 2002; Osinsky & Ganusevich, 2005; Ridgway et al., 2005). Ωστόσο, έχει αναφερθεί μείωση της έκφρασης της MMP-9 σε κυτταρική σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού μετά από αναστολή της έκφρασης του HIF-1α (Kunigal, Lakka, P. Joseph, Estes, & Rao, 2008). Πιθανόν, ο HIF-1α ασκεί ρυθμιστική επίδραση στην έκφραση της MMP-9 ή τα δύο μόρια ελέγχονται από κοινά ερεθίσματα όπως η υποξία.

Τα ως άνω εν μέρει αντικρουόμενα αποτελέσματα προστίθενται στα ήδη περιπλεγμένα ευρήματα για το ρόλο της MMP-9 στον καρκίνο. Νεότερα ευρήματα αποδυναμώνουν τον παραδοσιακό χαρακτηρισμό της MMP-9 ως αμιγώς επιβαρυντικό παράγοντα της καρκινογένεσης, καθότι έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστέλλει την νεοαγγείωση (Pozzi et al., 2000), να σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση και λιγότερες υποτροπές (Scorilas et al., 2001; Sillanpaa et al., 2007) και να είχε προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη διηθητικών ιδιοτήτων (Coussens et al., 2000). Οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνασών (TIMP), κομβικοί ρυθμιστές της λειτουργίας των MMP, ενώ αρχικά θεωρούνταν προστατευτικοί παράγοντες, σήμερα υπάρχουν μελέτες σύμφωνα με τι οποίες έχουν μιτογόνο, αντιαποπτωτική και αγγειογενετική δράση και μπορούν να συμβάλουν σε χειρότερη πρόγνωση (Y. Jiang, I. D. Goldberg, & Shi, 2002). Από ορισμένους ερευνητές υπάρχει η αντίληψη ότι οι MMP συντίθενται από στρωματικά κύτταρα, επαγόμενες από την αλληλεπίδραση με τα καρκινικά κύτταρα (J M Del Casar et al., 2009; Heppner, Matrisian, R. A. Jensen, & Rodgers, 1996) και πιθανά στη συνέχεια αποθηκεύονται και ενεργοποιούνται στα καρκινικά κύτταρα (Polette et al., 1994). Το στρώμα εμπλέκεται στη σύνθεση της MMP-9 και κατ' επέκταση στην πορεία της νόσου όχι μόνο με τους ινοβλάστες αλλά και με άλλους τύπους κυττάρων (π.χ. μονοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κ.α.) (L O González et al., 2007; F J Vizoso et al., 2007). Ως εκ τούτου γίνεται προφανές ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα όσον

αφορά στο ρόλο της MMP-9 καρκινογένεση, καθότι τα όλο αυξανόμενα δεδομένα αδυνατούν να δώσουν μια συνεκτική εικόνα της δράσης και της ρύθμισής της. Πιθανότατα η συμβολή της καθορίζεται από μια πολύπλοκη ισορροπία μεταξύ πολλών παραγόντων (π.χ. η προ-MMP-9, η ενεργός MMP-9, οι ενεργοποιητές της και οι αναστολείς της), η οποία ρυθμίζεται από τη διαντίδραση των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του ξενιστή.

ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Η χαμηλή έκφραση της SDF-1 στο κυτταρόπλασμα των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του μαζικού αδένα και η υψηλή στους αντίστοιχους ινοβλάστες αναδείχτηκαν ως επιβαρυντικοί παράγοντες για την επιβίωση, πιθανά δημιουργώντας ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την ανάπτυξη του όγκου. Τα μέχρι τώρα αντικρουόμενα δεδομένα για την επίδραση του SDF-1 στην επιβίωση αφορούσαν την έκφραση του μορίου αυτού στον καρκινικό ιστό. Συγκεκριμένα οι Kang και συν. αναφέρουν ότι τα αυξημένα επίπεδα μεταγράφων της SDF-1 σχετίζονται με μικρότερη OS και επιβίωση ελεύθερη συμβαμάτων (Kang et al., 2005), ενώ δύο άλλες μελέτες συμπεραίνουν ότι η SDF-1 αποτελεί προστατευτικό παράγοντα για την επιβίωση (T. Kobayashi et al., 2010; Mirisola et al., 2009). Οι παραπάνω μελέτες είτε δεν αξιολογούν την έκφραση του μορίου στο φυσιολογικό ιστό, είτε αναφέρουν αρνητική έκφραση. Οι υπάρχουσες αντιλήψεις για τη συμβολή του άξονα του SDF-1 / CXCR4 στην επιβίωση περιπλέκονται περαιτέρω από το γεγονός ότι η SDF-1 σε μικρές συγκεντρώσεις έχει «αντικαρκινική» δράση επιστρατεύοντας τα Τ λεμφοκύτταρα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα απωθούν και επάγουν και την απόπτωσης τους (Colamussi et al., 2001; Dunussi-Joannopoulos et al., 2002; M C Poznansky et al., 2000; Vianello et al., 2006). Συνεπώς, οι αναντιστοιχίες των αποτελεσμάτων των μελετών μπορεί εν μέρει να αποδοθούν στην αδυναμία της ανοσοϊστοχημικής προσέγγισης να διακρίνει τις κομβικές διαφορές σε επίπεδο συγκέντρωσης, στις οποίες οφείλονται οι διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά του όγκου.

Η ανάδειξη, στην περίπτωση μας, του φυσιολογικού ιστού ως ρυθμιστή της επιβίωσης προστίθεται στα όλο αυξανόμενα δεδομένα για τη σημασία της διαντίδρασης όγκου – ξενιστή στην καρκινογένεση και στην πορεία της νόσου. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί της SDF-1 σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και χειρότερη πρόγνωση (S

Hassan, A Baccarelli, O Salvucci, & M Basik, 2008; Razmkhah, Talei, Doroudchi, Khalili-Azad, & Ghaderi, 2005), ενώ ανάλογα ευρήματα υπάρχουν και για άλλους τύπους καρκίνου (S.-C. Chang et al., 2009; Vairaktaris et al., 2008). Επίσης, τα χαμηλά επίπεδα της ενδογενώς συντιθέμενης SDF-1 στο πλάσμα πιθανόν επιτρέπουν τη δράση της SDF-1 ως χημειοτακτικού παράγοντα για τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων προς ιστούς με αυξημένη σύνθεση του μορίου, φαινόμενο που ενισχύεται για όγκους που εκφράζουν την ενεργοποιημένη (φωσφορυλιωμένη) μορφή του CXCR4 (p-CXCR4) (S Hassan et al., 2008; Saima Hassan et al., 2009). Με άλλα λόγια, οι νεότερες έρευνες καθιστούν όλο και πιο σαφές το γεγονός ότι υπάρχουν και παράγοντες ανεξάρτητοι του όγκου, οι οποίοι χαρακτηρίζουν τον ξενιστή, εμπλέκονται στις διεργασίες του καρκίνου και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην όποια προσέγγιση της νόσου.

Τέλος, ως επιβαρυντικός της επιβίωσης παράγοντας αναδείχθηκε και η έκφραση της MMP-9 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες σύμφωνα με τις οποίες η στρωματική έκφραση της MMP-9 σχετίζεται είτε με χειρότερη πρόγνωση μόνο σε ER + όγκους (Pellikainen et al., 2004), είτε με μειωμένη RFS και OS στο σύνολο των όγκων (Mylona et al., 2007).

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν τη σημαντικότητα των υπό εξέταση μορίων στην παθογένεια και την εξέλιξη του καρκίνου. Για παράδειγμα, η SDF-1 και ο CXCR4 βρέθηκαν να εκφράζονται σε στατιστικά σημαντικότερο βαθμό στον καρκινικό ιστό ενώ η HIF-1α και η MMP-9 δεν εκφράστηκαν στον παρακείμενο μη νεοπλασματικό ιστό. Για πρώτη φορά αναδεικνύεται με ανοσοϊστοχημική μέθοδο στον καρκίνο του μαστού συσχετισμός στην έκφραση της MMP-9 στα καρκινικά κύτταρα με την αντίστοιχη του HIF-1α καθώς και συσχετισμός της έκφρασης του CXCR4 με την παρουσία οστικών μεταστάσεων, εύρημα το οποίο ενισχύει τα υπάρχοντα δεδομένα για τη σημασία του άξονα SDF-1 / CXCR4 στην οστική προσβολή από τον καρκίνο του μαστού.

Αναδεικνύεται επίσης η σημαντικότητα τόσο του στρώματος όσο και του ξενιστή στις διεργασίες του καρκίνου. Η σημασία του στρώματος ως σημαντική συνιστώσα της καρκινογένεσης αναδεικνύεται όλο και περισσότερο από τα αποτελέσματα σχετικών μελετών. Υποστηρίζεται ότι επιγενετικές και πιθανόν γενετικές αλλαγές στους ινοβλάστες τροποποιούν το μικροπεριβάλλον του όγκου, επάγουν την υπερέκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και δημιουργούν το κατάλληλο έδαφος για την ανάπτυξη του καρκίνου (Allinen et al., 2004; Arendt, Rudnick, P. J. Keller, & Kuperwasser, 2010). Η σημαντικότητα του μικροπεριβάλλοντος τονίζεται και από το γεγονός ότι επί απουσίας διεγερμένων ινοβλαστών, επιθηλιακά κύτταρα με μεταλλάξεις ογκογονιδίων δεν οδηγούν στην ανάπτυξη διηθητικού καρκίνου του μαστού (M. Wu et al., 2009). Τα ευρήματα αυτά έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση πιθανών προγνωστικών δεικτών, οι οποίοι να εκφράζονται στο στρώμα, αλλά και θεραπευτικών παρεμβάσεων, οι οποίες να επιδρούν σε αυτό (ενδεικτικά (Howard Y Chang, D. S. A. Nuyten, et al., 2005; Farmer et al., 2009; Kitadai et al., 2006; Pietras, Pahler, Bergers, & Douglas Hanahan, 2008; Yauch et al., 2008). Στην παρούσα μελέτη, η έκφραση των μορίων της SDF-1, του CXCR4 και της MMP-9 σε κύτταρα του στρώματος συσχετίστηκαν με πολλαπλούς κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες και μάλιστα με διαφορετικό τρόπο από ότι η έκφραση των αντίστοιχων μορίων στα καρκινικά κύτταρα. Για παράδειγμα, όπως έχει φανεί και σε προηγούμενη μελέτη (Mylona et al., 2007), η έκφραση στο στρώμα της MMP-9 συνιστά κακό προγνωστικό δείκτη, ενώ η έκφραση του ίδιου μορίου στα καρκινικά

κύτταρα συσχετίστηκε αρνητικά με το μέγεθος του όγκου. Ως εκ τούτου υπογραμμίζεται επιπλέον και η σημαντικότητα των διαφορετικών προτύπων (pattern) έκφρασης των μορίων, καθώς διαφορετικές ανοσοεντοπίσεις ενός μορίου μπορεί να έχουν εκ διαμέτρου αντίθετη βιολογική και κλινική σημασία.

Η σημασία του ξενιστή ως σημαντική συνιστώσα της πορείας της νόσου προκύπτει από το γεγονός ότι η κυτταροπλασματική έκφραση της SDF-1 στον παρακείμενο μη καρκινικό μαζικό αδένα αναδείχθηκε ως επιβαρυντικός παράγοντας για την επιβίωση, συσχετίστηκε αρνητικά με το μέγεθος του όγκου και θετικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση. Νεώτερα δεδομένα τονίζουν τη σημασία του ξενιστή στις νεοπλασματικές διεργασίες και η σημασία του έχει σχετιστεί με τα μοντέλα ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού από «βλαστικά» κύτταρα (θεωρία όχι πλήρως ακόμα στοιχειοθετημένη), με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή κατά των καρκινικών κυττάρων, με την παροχή από το μικροπεριβάλλον του όγκου αυξητικών και αγγειογενετικών παραγόντων κ.α. (Allinen et al., 2004; Cichon, Degnim, Visscher, & Derek C Radisky, 2010). Επίσης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι έχουν παρατηρηθεί γενετικές αλλαγές όχι μόνο στους παρακείμενους των καρκινικών κυττάρων ινοβλαστών (Kurose, 2001; Kurose, Gilley, & Matsumoto, 2002; Moinfar, Man, & Arnould, 2000; Wernert & Locherbach, 2001) αλλά και σε φαινομενικά φυσιολογικά παρακείμενα επιθηλιακά κύτταρα (Deng, Y. Lu, & Zlotnikov, 1996; Försti & Louhelainen, 2001; Lakhani & Chaggar, 1999; Moinfar et al., 2000). Με άλλα λόγια, η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων στον παρακείμενο μη καρκινικό ιστό πιθανόν δεν αφορά αμιγώς φυσιολογικό μαζικό αδένα, αλλά επιθηλιακά κύτταρα με αλλαγές απότοκες τις γειτνίασης με τα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο η σχετική έρευνα είναι σε αρχικό στάδιο καθότι μέχρι πρότινος το ενδιαφέρον των περισσότερων μελετών επικεντρωνόταν στον καρκινικό ιστό.

Όσον αφορά στον άξονα SDF-1 / CXCR4, παρότι η σχετική βιβλιογραφία είναι πλούσια, ακόμα δεν έχει καταστεί δυνατή η πλήρης αποσαφήνιση του ρόλου του στον καρκίνο του μαστού, καθότι τα υπάρχοντα δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Μέχρι πρότινος η SDF-1 αποτελούσε το μοναδικό παράδειγμα χημοκίνης με μοναδικό συνδέτη, τον CXCR4, γεγονός που καθιστούσε την αλληλεπίδραση αυτών των μορίων ελκυστικό στόχο για σχεδιασμό θεραπευτικών παρεμβάσεων. Ωστόσο, σχετικά πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας νέος υποδοχέας για την SDF-1, ο CXCR7, εύρημα το οποίο περιέπλεξε περαιτέρω τα δεδομένα (Burns et al., 2006). Το μόριο

αυτό δεν πληρεί τα τυπικά χαρακτηριστικά για να χαρακτηριστεί υποδοχέας χημοκινών. Πιθανοί ρόλοι που έχουν προταθεί είναι ότι είτε συνιστά συν-υποδοχέα του CXCR4 ενισχύοντας τη μηνυματοδότηση της SDF-1, είτε συμβάλει στη βαθμίδωση συγκέντρωσης της SDF-1 επάγοντας τον καταβολισμό του στα λυσοσώματα (X. Sun et al., 2010) . Ωστόσο τα δεδομένα για τον καρκίνο του μαστού είναι περιορισμένα και αφορούν κυρίως κυτταρικές σειρές. Πιθανόν μέρος των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων που αφορούν τον άξονα SDF-1 / CXCR4 να μπορέσουν να αποσαφηνιστούν με τον καθορισμό του ρόλου του CXCR7.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των υπάρχουσων ανοσοϊστοχημικών μελετών οι οποίες αφορούν τα υπό εξέταση μόρια θα μπορούσαν να αποδοθούν εκτός από τον εκάστοτε διαφορετικό σχεδιασμό της κάθε μελέτης και στις εγγενείς αδυναμίες της μεθόδου. Μέσω της ανοσοϊστοχημείας συνήθως δεν είναι δυνατόν να γίνει διάκριση μεταξύ ενεργού και λανθάνοντος μορίου, ούτε μεταξύ ενεργοποιημένου ή όχι υποδοχέα με αποτέλεσμα η ανοσοθετικότητα να μην δίνει πληροφορίες για την ενεργότητα των αντίστοιχων μονοπατιών. Επιπλέον, στο επίπεδο της βασικής έρευνας δεν υπάρχει συμφωνία μεταξύ των ερευνητών όσον αφορά την εκτίμηση και το σύστημα βαθμολόγησης της χρώσης με αποτέλεσμα τα ευρήματα να είναι δύσκολα συγκρίσιμα. Επίσης, η χρήση αντισωμάτων διαφορετικών κλώνων τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους περιπλέκει περαιτέρω τα αποτελέσματα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετά από τα νεότερα δεδομένα για τις μοριακές διαφορές μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων έχουν προκύψει από τη χρήση νεότερων τεχνικών όπως οι μικροσυστοιχίες (microarrays) και η σειριακή ανάλυση γονιδιακής έκφρασης (SAGE - serial analysis of gene expression) (Schena & Shalon, 1995; Velculescu & L. Zhang, 1995). Οι μέθοδοι αυτοί αν και έχουν επιτρέψει τη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και έχουν αναδείξει μοριακές υπογραφές ενδεικτικές της συμπεριφοράς του όγκου (H Y Chang, D. S. Nuyten, et al., 2005; Ramaswamy, K. N. Ross, Lander, & Golub, 2003; L J van ’t Veer, H Dai, M J van de Vijver, Y D He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, van der Kooy, Marton, Witteveen, Schreiber, Kerkhoven, Roberts, Linsley, Bernards, & Friend, 2002a; M J et al van de Vijver, 2002), βασίζονται σε ιστικά δείγματα που εμπεριέχουν είτε πολλούς κυτταρικούς τύπους είτε κεκαθαρμένα (purified) επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο καθορισμός της

συμβολής των επιμέρους κυττάρων (καρκινικών, φυσιολογικών, στρώματος) στην ταξινόμηση, στις μοριακές υπογραφές και κατ' επέκταση στην παθογένεια της νόσου.

Η εστίαση των ερευνών στα καρκινικά κύτταρα είχε οδηγήσει στην ανάπτυξη θεραπευτικών παρεμβάσεων οι οποίες στοχεύουν στα καρκινικά κύτταρα τα οποία λόγω της εγγενούς γενομικής αστάθειας ανέπτυσσαν αντίσταση στη θεραπεία. Η πιο πρόσφατη μετατόπιση του ενδιαφέροντος των ερευνών και προς το μικροπεριβάλλον του όγκου, σε επίπεδο στρώματος αλλά και παρακείμενου μη καρκινικού ιστού, οδηγεί σταδιακά στη στόχευση και άλλων συνιστωσών όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία θεωρούνται φυσιολογικά και γενομικά σταθερά και κατά συνέπεια είναι λιγότερο πιθανό να αναπτύξουν αντίσταση. Επιπλέον, όπως προαναφέρθηκε, το στρώμα έχει αναδειχθεί σε σημαντικό στοιχείο της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του καρκίνου, ενώ έχουν αναγνωριστεί ακόμα και κοινές γενετικές αλλαγές επιθηλιακών και στρωματικών κυττάρων, γεγονός που για ορισμένους ερευνητές υποδηλώνει την ύπαρξη κοινού βλαστικού κυττάρου. Κατά συνέπεια, η αποσαφήνιση του ρόλου των υπό εξέταση μορίων θα μπορέσει να οδηγήσει στον καλύτερο σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων και να αιτιολογήσει την αποτυχία κάποιων εκ των υπαρχόντων. Για παράδειγμα, η παρεμπόδιση της μηνυματοδότησης του άξονα SDF-1 / CXCR4 θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη του όγκου στοχεύοντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που εκφράζουν CXCR4, στη στρατολόγηση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων και κατ' επέκταση στη νεοαγγείωση και τέλος στην μεταστατικότητα (I. Petit et al., 2007). Η ανάδειξη της MMP-9 ως αντιαγγειογενετικού παράγοντα καθώς και ο φαινομενικά παράδοξος επιβαρυντικός ρόλος των αυξημένων επιπέδων TIMP θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει την αποτυχία προηγούμενων θεραπευτικών προσεγγίσεων οι οποίες στόχευαν την MMP-9 βασιζόμενη στην παραδοσιακή αντίληψη της MMP-9 ως δείκτη επιθετικότητας (Bendrik, Robertson, Gauldie, & Dabrosin, 2008; Overall & Kleifeld, 2006). Η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης του HIF-1α θα επιτρέψει όχι μόνο την ανάπτυξη αντιαγγειογενετικών παραγόντων αλλά και το σχεδιασμό παρεμβάσεων τόσο για την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα όσο και για την ευαισθητοποίηση στην ακτινοθεραπεία (Rapisarda, 2009)

Περαιτέρω μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας και με τη βοήθεια λειτουργικών τεχνικών θα μπορέσουν να αναδείξουν την ακριβή διαντίδραση των υπό μελέτη μορίων, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας του καρκίνου του

μαστού και επιτρέποντας πιθανά και το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών και διαγνωστικών παρεμβάσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aghi, M., Cohen, K. S., Klein, R. J., Scadden, David T, & Chiocca, E. A. (2006). Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes. *Cancer research*, *66*(18), 9054-64. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3759

Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *The Journal of experimental medicine*, *185*(1), 111-120.

Allinen, M., Beroukhim, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., et al. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell*, *6*(1), 17-32.

Amara, A. (1999). Stromal Cell-derived Factor-1alpha Associates with Heparan Sulfates through the First beta -Strand of the Chemokine. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(34), 23916-23925. doi:10.1074/jbc.274.34.23916

Arendt, L. M., Rudnick, J. A., Keller, P. J., & Kuperwasser, C. (2010). Stroma in breast development and disease. *Seminars in cell & developmental biology*, *21*(1), 11-8. doi:10.1016/j.semcdb.2009.10.003

Bachelder, R. E., Wendt, M. A., & Mercurio, A. M. (2002). Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer research*, *62*(24), 7203-7206.

Bagley, R. G., Kerbel, R. S., Bertolini, F., & Shaked, Y. (2010). *The Tumor Microenvironment*. (R. G. Bagley, Ed.) (pp. 257-273-273). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4419-6615-5

Baik, I., Becker, P. S., DeVito, W. J., Lagiou, P., Ballen, K., Quesenberry, P. J., & Hsieh, C. C. (2004). Stem cells and prenatal origin of breast cancer. *Cancer causes & control : CCC*, *15*(5), 517-530.

Baker, E. A., Stephenson, T. J., Reed, M. W., & Brown, N. J. (2002). Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *Molecular pathology : MP*, *55*(5), 300-304.

Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology*, *14*(3), 171-179.

Balzi, D., Buiatti, E., Geddes, M., Khlat, M., Masuyer, E., & Parkin, D. M. (1993). Cancer in Italian migrant populations. Summary of the results by site. *IARC scientific publications*, *(123)*(123), 193-292.

Barlow, W. E., Lehman, C. D., Zheng, Y., Ballard-Barbash, R., Yankaskas, B. C., Cutter, G. R., Carney, P. A., et al. (2002). Performance of diagnostic mammography for women with signs or symptoms of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute, 94*(15), 1151-1159.

Beerepoot, L. V., Mehra, N., Vermaat, J. S., Zonnenberg, B. A., Gebbink, M. F., & Voest, E. E. (2004). Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 15*(1), 139-145.

Bendrik, C., Robertson, J., Gauldie, J., & Dabrosin, C. (2008). Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer in vivo. *Cancer research, 68*(9), 3405-12. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0295

Berg, W. A., Blume, J. D., Cormack, J. B., Mendelson, E. B., Lehrer, D., Bohm-Velez, M., Pisano, E. D., et al. (2008). Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association, 299*(18), 2151-2163.

Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature, 432*(7015), 332-337.

Bian, X. W., Chen, J. H., Jiang, X. F., Bai, J. S., Wang, Q. L., & Zhang, Xia. (2004). Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *International immunopharmacology, 4*(12), 1537-47. doi:10.1016/j.intimp.2004.07.017

Bissell, M J, & Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nature reviews.Cancer, 1*(1), 46-54.

Bjorklund, M., & Koivunen, E. (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et biophysica acta, 1755*(1), 37-69.

Blot, E, Couteulx, S. L.-L., Jamali, H., Cornic, M., Guillemet, C., Duval, C., Hellot, M. F., et al. (2008). CXCR4 membrane expression in node-negative breast cancer. *The breast journal, 14*(3), 268-274.

Boecker, W., & Buerger, H. (2003). Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell proliferation, 36 Suppl 1*, 73-84.

Bos, R., van Diest, P. J., van der Groep, P., Shvarts, A., Greijer, A. E., & van der Wall, E. (2004). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and cell cycle proteins in invasive breast cancer are estrogen receptor related. *Breast cancer research : BCR, 6*(4), R450-9.

Bos, R., van der Groep, P., Greijer, A. E., Shvarts, A., Meijer, S., Pinedo, H. M., Semenza, G. L., et al. (2003). Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha

independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer*, *97*(6), 1573-1581.

Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C. F., Mommers, E. C., Semenza, G. L., Pinedo, H. M., Abeloff, M. D., et al. (2001). Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, *93*(4), 309-314.

Bourcier, T., Berbar, T., Paquet, S., Rondeau, N., Thomas, F., Borderie, V., Laroche, L., et al. (2003). Characterization and functionality of CXCR4 chemokine receptor and SDF-1 in human corneal fibroblasts. *Molecular vision*, *9*, 96-102. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12677165

Bratthauer, G. L., & Tavassoli, F. A. (2002). Lobular intraepithelial neoplasia: previously unexplored aspects assessed in 775 cases and their clinical implications. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, *440*(2), 134-138.

Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Graff, A., Silberstein, L. E., Fujii, N., Kipps, T. J., et al. (2003). Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene*, *22*(50), 8093-8101.

Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Yu, Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E. T., et al. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine*, *203*(9), 2201-13. doi:10.1084/jem.20052144

Busillo, J. M., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta*, *1768*(4), 952-963.

Cabioglu, N., Sahin, A. A., Morandi, P., Meric-Bernstam, F., Islam, R., Lin, H. Y., Bucana, C D, et al. (2009). Chemokine receptors in advanced breast cancer: differential expression in metastatic disease sites with diagnostic and therapeutic implications. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, *20*(6), 1013-9. doi:10.1093/annonc/mdn740

Cabioglu, N., Sahin, A., Doucet, M., Yavuz, E., Igci, A., Yildirim, E. O., Aktas, E., et al. (2005). Chemokine receptor CXCR4 expression in breast cancer as a potential predictive marker of isolated tumor cells in bone marrow. *Clinical & experimental metastasis*, *22*(1), 39-46.

Cabioglu, N., Summy, J., Miller, C., Parikh, N. U., Sahin, A. A., Tuzlali, S., Pumiglia, K., et al. (2005). CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. *Cancer research*, *65*(15), 6493-6497.

Cabioglu, N., Yazici, M. S., Arun, B., Broglio, K. R., Hortobagyi, G. N., Price, J. E., & Sahin, A. (2005). CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary

lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(16), 5686-5693.

Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., & Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5349), 381-384.

Canning, M. T., Postovit, L. M., Clarke, S. H., & Graham, C. H. (2001a). Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Experimental cell research*, *267*(1), 88-94.

Canning, M. T., Postovit, L. M., Clarke, S. H., & Graham, C. H. (2001b). Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res.*, *267*(1), 88-94.

Cao, Y., Li, C. Y., Moeller, B. J., Yu, D., Zhao, Y., Dreher, M. R., Shan, S., et al. (2005). Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer research*, *65*(13), 5498-5505.

Del Casar, J M, González, L O, Alvarez, E., Junquera, S, Marín, L., González, L., Bongera, M., et al. (2009). Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. *Breast cancer research and treatment*, *116*(1), 39-52. doi:10.1007/s10549-009-0351-z

Castellone, M. D., Guarino, V., Falco, V. D., Carlomagno, F., Basolo, F., Faviana, P., Kruhoffer, M., et al. (2004). Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, *23*(35), 5958-5967.

Chabottaux, V., & Noel, A. (2007). Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clinical & experimental metastasis*, *24*(8), 647-656.

Chang, H Y, Nuyten, D. S., Sneddon, J B, Hastie, T, Tibshirani, R, Sorlie, T., Dai, H, et al. (2005). Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(10), 3738-3743.

Chang, Howard Y, Nuyten, D. S. A., Sneddon, Julie B, Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Sørlie, Therese, Dai, Hongyue, et al. (2005). Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(10), 3738-43. doi:10.1073/pnas.0409462102

Chang, S.-C., Lin, P.-C., Yang, S.-H., Wang, H.-S., Li, A. F.-Y., & Lin, J.-K. (2009). SDF-1alpha G801A polymorphism predicts lymph node metastasis in stage T3

colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, *16*(8), 2323-30. doi:10.1245/s10434-009-0501-x

Chantrain, C. F., Shimada, H., Jodele, S, Groshen, S., Ye, W., Shalinsky, D. R., Werb, Z., et al. (2004). Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer research*, *64*(5), 1675-1686.

Cichon, M. A., Degnim, A. C., Visscher, D. W., & Radisky, Derek C. (2010). Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, *15*(4), 389-97. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10911-010-9195-8

Clark, I., & Swingler, T. (2008). The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The International Journal* …. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272507004104

Cocquyt, V., & Belle, S. V. (2005). Lobular carcinoma in situ and invasive lobular cancer of the breast. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, *17*(1), 55-60.

Colamussi, M. L., Secchiero, P., Gonelli, A., Marchisio, M., Zauli, G., & Capitani, S. (2001). Stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) induces CD4+ T cell apoptosis via the functional up-regulation of the Fas (CD95)/Fas ligand (CD95L) pathway. *Journal of leukocyte biology*, *69*(2), 263-70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272277

Coleman, R. E., Guise, T. A., Lipton, A., Roodman, G. D., Berenson, J. R., Body, J.-J., Boyce, B. F., et al. (2008). Advancing Treatment for Metastatic Bone Cancer: Consensus Recommendations from the Second Cambridge Conference. *Clinical Cancer Research*, *14*(20), 6387-6395. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1572

Cooper, C., Liu, G.-Y., Niu, Y.-L., Santos, S., Murphy, L. C., & Watson, Peter H. (2004). Intermittent hypoxia induces proteasome-dependent down-regulation of estrogen receptor alpha in human breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(24), 8720-7. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1235

Corcione, A., Ottonello, L., Tortolina, G., Facchetti, P., Airoldi, I., Guglielmino, R., Dadati, P., et al. (2000). Stromal cell-derived factor-1 as a chemoattractant for follicular center lymphoma B cells. *Journal of the National Cancer Institute*, *92*(8), 628-635.

Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D, & Werb, Z. (2000). MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, *103*(3), 481-490.

Couvelard, A., O'Toole, D., Turley, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C., Ruszniewski, P., et al. (2005). Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of

microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *British journal of cancer*, *92*(1), 94-101. doi:10.1038/sj.bjc.6602245

Crump, M. P., Gong, J. H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F, Virelizier, J. L., et al. (1997). Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal*, *16*(23), 6996-7007.

Currie, M. J., Hanrahan, V., Gunningham, S. P., Morrin, H. R., Frampton, C., Han, C., Robinson, B. A., et al. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomas. *J Clin Pathol.*, *57*(8), 829-834.

Dales, J. P., Garcia, S., Meunier-Carpentier, S., Andrac-Meyer, L., Haddad, O., Lavaut, M. N., Allasia, C., et al. (2005). Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer*, *116*(5), 734-739.

DeLellis, R. A. (2004). *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs* (Vol. 8, p. 320). Lyon: IARC Press.

Deng, G., Lu, Y., & Zlotnikov, G. (1996). Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*. Retrieved from http://www.sciencemag.org/content/274/5295/2057.short

Dunussi-Joannopoulos, K., Zuberek, K., Runyon, K., Hawley, R. G., Wong, A., Erickson, J., Herrmann, S., et al. (2002). Efficacious immunomodulatory activity of the chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1): local secretion of SDF-1 at the tumor site serves as T-cell chemoattractant and mediates T-cell-dependent antitumor responses. *Blood*, *100*(5), 1551-1558. Retrieved from http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/100/5/1551

Ebert, B. L., & Bunn, H. F. (1998). Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein. *Molecular and cellular biology*, *18*(7), 4089-4096.

Eck, S. M., Cote, A. L., Winkelman, W. D., & Brinckerhoff, C. E. (2009). CXCR4 and Matrix Metalloproteinase-1 Are Elevated in Breast Carcinoma-Associated Fibroblasts and in Normal Mammary Fibroblasts Exposed to Factors Secreted by Breast Cancer Cells. *Molecular cancer research : MCR*, *7*(7), 1033-1044.

Elston, C. W., & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, *19*(5), 403-10. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757079

Elston, C. W., & Ellis, I. O. (2002). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. Histopathology 1991; 19; 403-410. *Histopathology*, *41*(3A), 151-2, discussion 152-3.

Fabbri, A., Carcangiu, M., & Carbone, A. (2007). Histological Classification of Breast Cancer. In E. Bombardieri, G. Bonadonna, & L. Gianni (Eds.), (1st ed., pp. 3-14). Berlin Heidelberg: Springer.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Anderle, P., Cameron, D., Wirapati, Pratyaksha, Wirapati, Pratyakasha, Becette, V., et al. (2009). A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nature medicine*, *15*(1), 68-74. doi:10.1038/nm.1908

Fedyk, E. R., Ryyan, D. H., Ritterman, I., & Springer, T. A. (1999). Maturation decreases responsiveness of human bone marrow B lineage cells to stromal-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of leukocyte biology*, *66*(4), 667-673.

Feil, C., & Augustin, H. G. (1998). Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochemical and biophysical research communications*, *247*(1), 38-45.

Fermas, S., Gonnet, F., Sutton, A., Charnaux, N., Mulloy, B., Du, Y., Baleux, Françoise, et al. (2008). Sulfated oligosaccharides (heparin and fucoidan) binding and dimerization of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL 12) are coupled as evidenced by affinity CE-MS analysis. *Glycobiology*, *18*(12), 1054-64. doi:10.1093/glycob/cwn088

Fernandis, A. Z., Prasad, A., Band, H., Klosel, R., & Ganju, R. K. (2004). Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene*, *23*(1), 157-167.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, *25*(4), 581-611.

Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, *82*(1), 4-6.

Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*, *16*(9), 4604-4613.

Fähling, M., Perlewitz, A., Doller, A., & Thiele, B.-J. (2004). Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, *139*(1-3), 119-26. doi:10.1016/j.cca.2004.09.013

Försti, A., & Louhelainen, J. (2001). Loss of heterozygosity in tumour-adjacent normal tissue of breast and bladder cancer. *European Journal of* …. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804901001186

García, M. F., González-Reyes, S., González, Luis Ovidio, Junquera, Sara, Berdize, N., Del Casar, José Manuel, Medina, M., et al. (2010). Comparative study of the expression of metalloproteases and their inhibitors in different localizations within primary tumours and in metastatic lymph nodes of breast cancer. *International journal of experimental pathology*, *91*(4), 324-34. doi:10.1111/j.1365-2613.2010.00709.x

Geminder, H., Sagi-Assif, O., Goldberg, L., Meshel, T., Rechavi, G., Witz, I. P., & Ben-Baruch, A. (2001). A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(8), 4747-4757.

Generali, D., Berruti, A., Brizzi, M. P., Campo, L., Bonardi, S., Wigfield, S., Bersiga, A., et al. (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(15), 4562-4568.

Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Simopoulos, C., Polychronidis, A., Gatter, K. C., Harris, A L, & Sivridis, E. (2004). c-erbB-2 related aggressiveness in breast cancer is hypoxia inducible factor-1alpha dependent. *Clin Cancer Res.*, *10*(23), 7972-7977.

Glodek, A. M., Honczarenko, M., Le, Y., Campbell, J. J., & Silberstein, L. E. (2003). Sustained activation of cell adhesion is a differentially regulated process in B lymphopoiesis. *The Journal of experimental medicine*, *197*(4), 461-473.

Gomperts, B. N., & Strieter, R. M. (2007). Fibrocytes in lung disease. *Journal of leukocyte biology*, *82*(3), 449-456.

González, L O, Pidal, I., Junquera, S, Corte, M. D., Vázquez, J., Rodríguez, J. C., Lamelas, M. L., et al. (2007). Overexpression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in mononuclear inflammatory cells in breast cancer correlates with metastasis-relapse. *British journal of cancer*, *97*(7), 957-63. doi:10.1038/sj.bjc.6603963

Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2008). The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA: a cancer journal for clinicians*, *58*(3), 180-190.

Greijer, A. E., & van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*, *57*(10), 1009-1014.

van der Groep, P., Bouter, A., Menko, F. H., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2008). High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *111*(3), 475-480.

Gruber, G., Greiner, R. H., Hlushchuk, R., Aebersold, D. M., Altermatt, H. J., Berclaz, G., & Djonov, V. (2004). Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: an independent prognostic parameter? *Breast cancer research : BCR*, *6*(3), R191-8.

Gu, J., Milligan, J., & Huang, L. E. (2001). Molecular mechanism of hypoxia-inducible factor 1alpha -p300 interaction. A leucine-rich interface regulated by a single cysteine. *The Journal of biological chemistry*, *276*(5), 3550-3554.

Gudjonsson, Thorarinn, Rønnov-Jessen, L., Villadsen, R., Rank, F., Bissell, Mina J, & Petersen, Ole William. (2002). Normal and tumor-derived myoepithelial cells differ in their ability to interact with luminal breast epithelial cells for polarity and basement membrane deposition. *Journal of cell science*, *115*(Pt 1), 39-50. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Guo, W., Ran, Y., Wang, G., Liu, J., Yu, L., Sun, L., & Yang, Z. (2002). Expression and hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in esophageal carcinoma. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*, *24*(1), 44-47.

Gupta, S. K. (1998). Chemokine Receptors in Human Endothelial Cells. FUNCTIONAL EXPRESSION OF CXCR4 AND ITS TRANSCRIPTIONAL REGULATION BY INFLAMMATORY CYTOKINES. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(7), 4282-4287. doi:10.1074/jbc.273.7.4282

Hahn-Dantona, E., Ruiz, J. F., Bornstein, P., & Strickland, D. K. (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *The Journal of biological chemistry*, *276*(18), 15498-15503.

Hall, J. M., & Korach, K. S. (2003). Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *17*(5), 792-803.

Hao, L., Zhang, C., Qiu, Y., Wang, L, Luo, Y., Jin, M., Zhang, Y., et al. (2007). Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer. *Cancer letters*, *253*(1), 34-42.

Haribabu, B., Richardson, R. M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S. C., Horuk, R., Ali, H., et al. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *The Journal of biological chemistry*, *272*(45), 28726-28731.

Harris, A L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews.Cancer*, *2*(1), 38-47.

Hassan, S, Baccarelli, A, Salvucci, O, & Basik, M. (2008). Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived marker predictive of distant metastasis in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *14*(2), 446-454.

Hassan, Saima, Ferrario, C., Saragovi, U., Quenneville, L., Gaboury, L., Baccarelli, Andrea, Salvucci, Ombretta, et al. (2009). The influence of tumor-host interactions in the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 ligand/receptor axis in determining metastatic risk in breast cancer. *The American journal of pathology*, *175*(1), 66-73. doi:10.2353/ajpath.2009.080948

He, X., Wei, Q., Zhang, Xia, Xiao, J., Jin, X., Zhu, Y., Cui, B., et al. (2010). Immunohistochemical expression of CXCR4 in thyroid carcinomas and thyroid benign lesions. *Pathology, research and practice*, *206*(10), 712-5. doi:10.1016/j.prp.2010.05.003

Helbig, G., 2nd, K. W. C., Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K. D., Broxmeyer, H. E., et al. (2003). NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry*, *278*(24), 21631-21638.

Helczynska, K., Kronblad, A., Jogi, A., Nilsson, E., Beckman, S., Landberg, G., & Pahlman, S. (2003). Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer research*, *63*(7), 1441-1444.

Heppner, K. J., Matrisian, L. M., Jensen, R. A., & Rodgers, W. H. (1996). Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *The American journal of pathology*, *149*(1), 273-82. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1865221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Hirbe, A. C., Morgan, E. A., & Weilbaecher, K N. (2010). The CXCR4/SDF-1 chemokine axis: a potential therapeutic target for bone metastases? *Current pharmaceutical design*, *16*(11), 1284-90. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20166978

Hirota, K., & Semenza, G. L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Critical reviews in oncology/hematology*, *59*(1), 15-26.

Holland, J. D., Kochetkova, M., Akekawatchai, C., Dottore, M., Lopez, A., & McColl, S. R. (2006). Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. *Cancer research*, *66*(8), 4117-4124.

Holland, R., Peterse, J. L., Millis, R. R., Eusebi, V., Faverly, D., van de Vijver, M J, & Zafrani, B. (1994). Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Seminars in diagnostic pathology*, *11*(3), 167-180.

Honczarenko, M., Douglas, R. S., Mathias, C., Lee, B., Ratajczak, M. Z., & Silberstein, L. E. (1999). SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells. *Blood*, *94*(9), 2990-2998.

Hong, W. K., Jr., R. C. B., Hait, W. N., Kufe, D. W., Pollock, R. E., Weichselbaum, R. R., Holland, J. F., et al. (2009). *Holland-Frei Cancer Medicine, 8/e* (p. 2300). pmph usa. Retrieved from http://www.amazon.com/Holland-Frei-Cancer-Medicine-MEDICINE-HOLLAND/dp/1607950146

Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A., & Wells, T. N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, *36*(44), 13570-13578.

Huang, L. E., & Bunn, H. F. (2003). Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance. *The Journal of biological chemistry*, *278*(22), 19575-19578.

Huang, S. (2002). Contributions of Stromal Metalloproteinase-9 to Angiogenesis and Growth of Human Ovarian Carcinoma in Mice. *CancerSpectrum Knowledge Environment*, *94*(15), 1134-1142. doi:10.1093/jnci/94.15.1134

Huang, X., Shen, J., Cui, M., Shen, L., Luo, X., Ling, K., Pei, G., et al. (2003). Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophysical journal*, *84*(1), 171-184.

Hughes, E. S. (1950). The Development of the Mammary Gland: Arris and Gale Lecture, delivered at the Royal College of Surgeons of England on 25th October, 1949. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, *6*(2), 99-119.

Hwang, J. H., Chung, H. K., Kim, D. W., Hwang, E. S., Suh, J. M., Kim, H., You, K. H., et al. (2003). CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *88*(1), 408-416.

Itoh, A., Ueno, E., Tohno, E., Kamma, H., Takahashi, H., Shiina, T., Yamakawa, M., et al. (2006). Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. *Radiology*, *239*(2), 341-350.

Izumi, Y., Xu, L., di Tomaso, E., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2002). Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, *416*(6878), 279-80. doi:10.1038/416279b

Jaffer, S., & Bleiweiss, I. J. (2002). Histologic classification of ductal carcinoma in situ. *Microscopy research and technique*, *59*(2), 92-101.

Janowska-Wieczorek, A., Marquez, L. A., Dobrowsky, A., Ratajczak, M. Z., & Cabuhat, M. L. (2000). Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Experimental hematology*, *28*(11), 1274-1285.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*, *59*(4), 225-249.

Jiang, B. H., Rue, E., Wang, G. L., Roe, R., & Semenza, G. L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*, *271*(30), 17771-17778.

Jiang, Y. G., Luo, Y., He, D. L., Li, X., Zhang, L. L., Peng, T., Li, M. C., et al. (2007). Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, *14*(11), 1034-1039.

Jiang, Y., Goldberg, I. D., & Shi, Y. E. (2002). Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*, *21*(14), 2245-52. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1205291

Jin, F., Zhai, Q., Qiu, L., Meng, H., Zou, D., Wang, Y, Li, Q., et al. (2008). Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone marrow transplantation*, *42*(9), 581-8. Macmillan Publishers Limited. doi:10.1038/bmt.2008.222

Jobim, F. C., Xavier, N. L., Uchoa, D. M., Cruz, D. B., Saciloto, M., Chemello, N., & Schwartsmann, G. (2009). Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]*, *42*(10), 979-87. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19787153

Jodele, Sonata, Blavier, L., Yoon, J. M., & DeClerck, Yves A. (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. *Cancer metastasis reviews*, *25*(1), 35-43. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10555-006-7887-8

Jones, J L, Glynn, P., & Walker, R. A. (1999). Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *The Journal of pathology*, *189*(2), 161-168.

Jordan, N. J., Kolios, G., Abbot, S. E., Sinai, M. A., Thompson, D. A., Petraki, K., & Westwick, J. (1999). Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, *104*(8), 1061-1069.

Kafousi, M., Vrekoussis, T., Tsentelierou, E., Pavlakis, K., Navrozoglou, I., Dousias, V., Sanidas, E., et al. (2011). Immunohistochemical Study of the Angiogenetic Network of VEGF, HIF1α, VEGFR-2 and Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) in Human Breast Cancer. *Pathology oncology research : POR*, 1-9-9. Springer Netherlands. doi:10.1007/s12253-011-9413-8

Kang, H., Watkins, G., Parr, C., Douglas-Jones, A., Mansel, R. E., & Jiang, W. G. (2005). Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, *7*(4), R402-10.

Kato, M., Kitayama, J., Kazama, S., & Nagawa, H. (2003). Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast cancer research : BCR*, *5*(5), R144-50.

Kenig, S., Alonso, M. B. D., Mueller, M. M., & Lah, T. T. (2010). Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9. *Cancer letters*, *289*(1), 53-61. doi:10.1016/j.canlet.2009.07.014

Kijima, T., Maulik, G., Ma, P. C., Tibaldi, E. V., Turner, R. E., Rollins, B., Sattler, M., et al. (2002). Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer research*, *62*(21), 6304-6311.

Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, Corazon D, & Fidler, I. J. (2006). Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *The American journal of pathology*, *169*(6), 2054-65. doi:10.2353/ajpath.2006.060653

Klier, C. M., Nelson, E. L., Cohen, C. D., Horuk, R., Schlöndorff, D., & Nelson, P. J. (2001). Chemokine-Induced secretion of gelatinase B in primary human monocytes. *Biological chemistry*, *382*(9), 1405-10. doi:10.1515/BC.2001.173

Kliewer, E. V., & Smith, K. R. (1995). Breast cancer mortality among immigrants in Australia and Canada. *Journal of the National Cancer Institute*, *87*(15), 1154-1161.

Kobayashi, T., Tsuda, H., Moriya, Tomoyuki, Yamasaki, T., Kikuchi, R., Ueda, S., Omata, J., et al. (2010). Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. *Breast cancer research and treatment*, *123*(3), 733-45. doi:10.1007/s10549-009-0672-y

Kojima, Y., Acar, A., Eaton, E. N., Mellody, K. T., Scheel, C., Ben-Porath, I., Onder, T. T., et al. (2010). Autocrine TGF-{beta} and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(46), 20009-20014. doi:10.1073/pnas.1013805107

Kondo, S., Kubota, S., Shimo, T., Nishida, T., Yosimichi, G., Eguchi, T., Sugahara, T., et al. (2002). Connective tissue growth factor increased by hypoxia may initiate angiogenesis in collaboration with matrix metalloproteinases. *Carcinogenesis*, *23*(5), 769-776.

Kopans, D. B. (2007). *Breast imaging* (p. 1114). Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip069/2006006717.html;

Korkola, J. E. et al. (2010). Breast cancer genomes--form and function. *Current opinion in genetics & development*. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/s0959-437x(09)00197-x

Koshiba, T., Hosotani, R., Miyamoto, Y., Ida, J., Tsuji, S., Nakajima, S., Kawaguchi, M., et al. (2000). Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *6*(9), 3530-3535.

Kronblad, A., Helczynska, K., Nielsen, N. H., Pahlman, E., Emdin, S., Pahlman, S., & Landberg, G. (2003). Regional cyclin D1 overexpression or hypoxia correlate inversely with heterogeneous oestrogen receptor-alpha expression in human breast cancer. *In vivo (Athens, Greece)*, *17*(4), 311-318.

Kronblad, A., Jirstrom, K., Ryden, L., Nordenskjold, B., & Landberg, G. (2006). Hypoxia inducible factor-1alpha is a prognostic marker in premenopausal patients with intermediate to highly differentiated breast cancer but not a predictive marker for tamoxifen response. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *118*(10), 2609-2616.

Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., & Zou, W. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *American journal of physiology.Cell physiology*, *292*(3), C987-95.

Kucia, M., Jankowski, K., Reca, R., Wysoczynski, M., Bandura, L., Allendorf, D. J., Zhang, J, et al. (2004). CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*, *35*(3), 233-245.

Kucia, M., Reca, R., Miekus, K., Wanzeck, J., Wojakowski, W., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., et al. (2005). Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *23*(7), 879-894.

Kuijper, A., van der Groep, P., van der Wall, E., & van Diest, P. J. (2005). Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and its downstream targets in fibroepithelial tumors of the breast. *Breast cancer research : BCR*, *7*(5), R808-18.

Kunigal, S., Lakka, S. S., Joseph, P., Estes, N., & Rao, J. S. (2008). Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-

kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. *Clin Cancer Res.*, *14*(11), 3617-26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2060

Kurebayashi, J., Otsuki, T., Moriya, T, & Sonoo, H. (2001). Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*, *92*(10), 1093-1101.

Kurose, K. (2001). Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour–microenvironment interactions. *Human molecular* …. Retrieved from http://hmg.oxfordjournals.org/content/10/18/1907.short

Kurose, K., Gilley, K., & Matsumoto, S. (2002). Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nature genetics*. Retrieved from http://www.nature.com/ng/journal/v32/n3/abs/ng1013.html

De La Luz Sierra, M., Yang, Fuquan, Narazaki, M., Salvucci, Ombretta, Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H. H., et al. (2004). Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood*, *103*(7), 2452-9. doi:10.1182/blood-2003-08-2857

Lakhani, S., & Chaggar, R. (1999). Genetic alterations in “normal”luminal and myoepithelial cells of the breast. *The Journal of* …. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-9896(199912)189:4<496::AID-PATH485>3.0.CO;2-D/pdf

Lapidot, Tsvee, Dar, A., & Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood*, *106*(6), 1901-10. doi:10.1182/blood-2005-04-1417

Lapteva, N., Yang, A. G., Sanders, D. E., Strube, R. W., & Chen, S. Y. (2005). CXCR4 knockdown by small interfering RNA abrogates breast tumor growth in vivo. *Cancer gene therapy*, *12*(1), 84-89.

Larsen, W. J. (1993). *Human embryology* (p. 479). New York: Churchill Livingstone.

Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., & Semenza, G. L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology*, *21*(12), 3995-4004.

Lebeau, A., Nerlich, AG, & Sauer, U. (1999). Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas. *Anticancer* …. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1216200

Lee, B. C., Lee, T. H., Avraham, S., & Avraham, H. K. (2004). Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Molecular cancer research : MCR*, *2*(6), 327-338.

Li, H. C., Cao, D. C., Liu, Y., Hou, Y. F., Wu, J., Lu, J. S., Di, G. H., et al. (2004). Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment, 88*(1), 75-85.

Li, W., Gomez, E., & Zhang, Z. (2007). Immunohistochemical expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and CXCR4 ligand receptor system in hepatocellular carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 26*(4), 527-533.

Li, Y. M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B. P., Tan, M., Zhou, X, et al. (2004). Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer cell, 6*(5), 459-469.

Liang, Z., Yoon, Y., Votaw, J., Goodman, M. M., Williams, L., & Shim, H. (2005). Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer research, 65*(3), 967-971.

Liu, F., Lang, R., Wei, J., Fan, Y., Cui, L., Gu, F., Guo, X., et al. (2009). Increased expression of SDF-1/CXCR4 is associated with lymph node metastasis of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Histopathology, 54*(6), 741-750.

Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., et al. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95*(16), 9448-9453.

Malla, N., Sjoli, S., Winberg, J. O., Hadler-Olsen, E., & Uhlin-Hansen, L. (2008). Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connective tissue research, 49*(3), 180-184.

Manes, S., Lacalle, R A, Gomez-Mouton, C., del Real, G., Mira, E, & Martinez-A, C. (2001). Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. *Seminars in immunology, 13*(2), 147-157.

Marchese, A., & Benovic, J. L. (2001). Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *The Journal of biological chemistry, 276*(49), 45509-45512.

Marchese, A., Raiborg, C., Santini, F., Keen, J. H., Stenmark, H., & Benovic, J. L. (2003). The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Developmental cell, 5*(5), 709-722.

Marini, G., Grisanti, S., Ruggeri, G., Ardighieri, L., Simoncini, E., Amoroso, V., Rangoni, G., et al. (2007). CXCR4/SDF-1 expression in early breast cancer (BC) is not influenced by circulating estrogens serum levels. *Journal of Clinical Oncology, Vol 25*(No. 18S (June 20 Supplement)), 21159. Retrieved from http://www.asco.org/ASCO/Abstracts+&+Virtual+Meeting/Abstracts?&vmview=abst_detail_view&confID=47&abstractID=35295

Martin, M. D., & Matrisian, L. M. (2007). The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer metastasis reviews*, *26*(3-4), 717-724.

Matsuo, Y., Ochi, N., Sawai, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., Takeyama, H., et al. (2009). CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *124*(4), 853-861.

McCawley, L. J., & Matrisian, L. M. (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology*, *13*(5), 534-540.

McGrath, K. E., Koniski, A. D., Maltby, K. M., McGann, J. K., & Palis, J. (1999). Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Developmental biology*, *213*(2), 442-456.

Milani, Manuela, & Harris, Adrian L. (2008). Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *44*(18), 2766-73. doi:10.1016/j.ejca.2008.09.025

Miliaras, D., & Foroglou, C. K. (2001). Development, normal morphological changes and homeostasis of the mammary gland: interactions between hormones, epithelial cells and stroma. *Hellenic Archives Pathol*, *15*(1-3), 4-16. Retrieved from www.mednet.gr/hsap/pdf/151-301.pdf

Mira, Emilia, Lacalle, Rosa Ana, Buesa, J. M., de Buitrago, G. G., Jiménez-Baranda, S., Gómez-Moutón, C., Martínez-A, C., et al. (2004). Secreted MMP9 promotes angiogenesis more efficiently than constitutive active MMP9 bound to the tumor cell surface. *Journal of cell science*, *117*(Pt 9), 1847-57. doi:10.1242/jcs.01035

Mirisola, V., Zuccarino, A., Bachmeier, B. E., Sormani, M. P., Falter, J., Nerlich, A, & Pfeffer, U. (2009). CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *45*(14), 2579-2587.

Mizumoto, H., Saito, T., Ashihara, K., Nishimura, M., Tanaka, R., & Kudo, R. (2002). Acceleration of invasive activity via matrix metalloproteinases by transfection of the estrogen receptor-alpha gene in endometrial carcinoma cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *100*(4), 401-6. doi:10.1002/ijc.10504

Moinfar, F., Man, Y., & Arnould, L. (2000). Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer research*. Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/9/2562.short

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, *410*(6824), 50-56.

Murphy, P. M. (1994). The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annual Review of Immunology*, *12*, 593-633.

Murphy, P. M. (2001). Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *The New England journal of medicine*, *345*(11), 833-835.

Muñoz-Nájar, U. M., Neurath, K. M., Vumbaca, F., & Claffey, K. P. (2006). Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1-MMP and MMP-2 activation. *Oncogene*, *25*(16), 2379-92. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1209273

Mylona, E., Nomikos, A., Magkou, C., Kamberou, M., Papassideri, I., Keramopoulos, A., & Nakopoulou, L. (2007). The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. *Histopathology*, *50*(3), 338-347.

NCCN. (2011). *Breast Cancer - NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*.

Na, I.-K., Scheibenbogen, C., Adam, C., Stroux, A., Ghadjar, P., Thiel, E., Keilholz, U., et al. (2008). Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Human pathology*, *39*(12), 1751-5. doi:10.1016/j.humpath.2008.04.017

Nagasawa, T., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (1998). A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Seminars in immunology*, *10*(3), 179-185.

Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, *69*(3), 562-573.

Netelenbos, T., Zuijderduijn, S., van den Born, J., Kessler, F. L., Zweegman, S., Huijgens, P. C., & Drager, A. M. (2002). Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.*, *72*(2), 353-362. Retrieved from http://www.jleukbio.org/cgi/content/abstract/72/2/353

Nielsen, B. S., Sehested, M., Kjeldsen, L., Borregaard, N., Rygaard, J., & Dano, K. (1997). Expression of matrix metalloprotease-9 in vascular pericytes in human breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *77*(4), 345-355.

Noel, A., Jost, M., & Maquoi, E. (2008). Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. *Seminars in cell & developmental biology*, *19*(1), 52-60.

Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., et al. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nature cell biology*, *2*(7), 423-427.

Orimo, A, & Weinberg, R A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(15), 1597-1601.

Orimo, A, Gupta, P B, Sgroi, D C, Arenzana-Seisdedos, F, Delaunay, T, Naeem, R, Carey, V J, et al. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335-348.

Orimo, Akira, Gupta, Piyush B, Sgroi, Dennis C, Arenzana-Seisdedos, Fernando, Delaunay, Thierry, Naeem, Rizwan, Carey, Vincent J, et al. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335-48. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034

Orlichenko, L. S., & Radisky, D C. (2008). Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clinical & experimental metastasis*, *25*(6), 593-600.

Orsini, M. J., Parent, J. L., Mundell, S. J., Marchese, A., & Benovic, J. L. (1999). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry*, *274*(43), 31076-31086.

Osinsky, S., & Ganusevich, I. (2005). Hypoxia level and matrix metalloproteinases-2 and-9 activity in Lewis lung carcinoma: correlation with metastasis. *Exp . Oncol.*, *Sep;27*(3), 202-5.

Overall, C. M., & Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, *6*(3), 227-39. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nrc1821

Pacheco, M. M., Mourao, M., Mantovani, E. B., Nishimoto, I. N., & Brentani, M. M. (1998). Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clinical & experimental metastasis*, *16*(7), 577-585.

Pacheco, M. M., Mourão, M., Mantovani, E. B., Nishimoto, I. N., & Brentani, M. M. (1998). Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clinical & experimental metastasis*, *16*(7), 577-85. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9932604

Paquette, B., Bisson, M., Therriault, H., Lemay, R., Paré, M., Banville, P., & Cantin, A. M. (2003). Activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 by 2- and 4-hydroxyestradiol. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *87*(1), 65-73. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630092

Paredes, E. S. D. (2007). *Atlas of mammography* (p. 691). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip075/2006037826.html;

Parks, A. G. (1959). The micro-anatomy of the breast. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, *25*, 235-251.

Parks, W. C., & Mecham, R. P. (1998). *Matrix metalloproteinases* (p. 362). San Diego: Academic Press. Retrieved from http://www.loc.gov/catdir/description/els033/98133584.html;

Parks, W. C., Mecham, R. P., Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2011). *Extracellular Matrix Degradation*. (W. C. Parks & R. P. Mecham, Eds.) (Vol. 2, pp. 145-191-191). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-16861-1

Parmo-Cabañas, M., Molina-Ortiz, I., Matías-Román, S., García-Bernal, D., Carvajal-Vergara, X., Valle, I., Pandiella, A., et al. (2006). Role of metalloproteinases MMP-9 and MT1-MMP in CXCL12-promoted myeloma cell invasion across basement membranes. *The Journal of Pathology*, *208*(1), 108-118. doi:10.1002/path.1876

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F, Petit, I., Ben-Hur, H., et al. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *The Journal of clinical investigation*, *104*(9), 1199-211. doi:10.1172/JCI7615

Pellikainen, J. M., Ropponen, K. M., Kataja, V. V., Kellokoski, J. K., Eskelinen, M. J., & Kosma, V. M. (2004). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(22), 7621-7628.

Perou, C. M., Sørlie, T, Eisen, M. B., van de Rijn, M, Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-52. doi:10.1038/35021093

Petit, I., Jin, D., & Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends in immunology*, *28*(7), 299-307.

Petrelli, N. J., Winer, E. P., Brahmer, J., Dubey, S., Smith, S., Thomas, C., Vahdat, L. T., et al. (2009). Clinical Cancer Advances 2009: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *27*(35), 6052-6069.

Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G., & Hanahan, Douglas. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by

pharmacological targeting. *PLoS medicine*, *5*(1), e19. doi:10.1371/journal.pmed.0050019

Pillarisetti, K., & Gupta, S K. (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*, *25*(5), 293-300. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11820456

Polette, M., Gilbert, N., Stas, I., Nawrocki, B., Nöel, A., Remacle, A., Stetler-Stevenson, W. G., et al. (1994). Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, *424*(6), 641-5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8055158

Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell*, *6*(1), 17-32.

Poznansky, M C, Olszak, I. T., Foxall, R., Evans, R. H., Luster, A. D., & Scadden, D T. (2000). Active movement of T cells away from a chemokine. *Nature medicine*, *6*(5), 543-8. doi:10.1038/75022

Pozzi, A., Moberg, P. E., Miles, L. A., Wagner, S., Soloway, P., & Gardner, H. A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(5), 2202-2207.

Péchoux, C., Gudjonsson, T, Ronnov-Jessen, L., Bissell, M J, & Petersen, O W. (1999). Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. *Developmental biology*, *206*(1), 88-99. doi:10.1006/dbio.1998.9133

Qu, Y., Mao, M., Li, X., Zhang, L., Huang, X., Yang, C., Zhao, F., et al. (2008). Enhanced migration and CXCR4 over-expression in fibroblasts with telomerase reconstitution. *Molecular and cellular biochemistry*, *313*(1-2), 45-52.

Rahman, K. M. W., Sarkar, F. H., Banerjee, S., Wang, Zhiwei, Liao, D. J., Hong, X., & Sarkar, N. H. (2006). Therapeutic intervention of experimental breast cancer bone metastasis by indole-3-carbinol in SCID-human mouse model. *Molecular cancer therapeutics*, *5*(11), 2747-56. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0221

Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature genetics; Nature genetics*, *33*(1), 49-54.

Rapisarda, A. (2009). Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resistance Updates*. Retrieved from http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764609000260

Ravdin, P. M., Cronin, K. A., Howlader, N., Berg, C. D., Chlebowski, R. T., Feuer, E. J., Edwards, B. K., et al. (2007). The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *The New England journal of medicine*, *356*(16), 1670-1674.

Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., et al. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes & development*, *14*(1), 34-44.

Razmkhah, M., Talei, A. R., Doroudchi, M., Khalili-Azad, T., & Ghaderi, A. (2005). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) alleles and susceptibility to breast carcinoma. *Cancer letters*, *225*(2), 261-266.

Rempel, S. A., Dudas, S., Ge, S., & Gutierrez, J. A. (2000). Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *6*(1), 102-111.

Ridgway, P., Ziprin, P., AlkhamesiI, N., Paraskeva, P., Peck, D., & Darzi, A. (2005). Hypoxia augments gelatinase activity in a variety of adenocarcinomas. *J Surg Res.*, *124*(2), 180-186. doi:10.1016/j.jss.2004.10.020

Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., & Martinez-A, C. (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends in immunology*, *22*(11), 612-617.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology* (p. 906). Baltimore, MD: Lippincott Wiliams & Wilkins. Retrieved from http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0712/2005050445-d.html

Rubin, J. B. (2009). Chemokine signaling in cancer: one hump or two? *Seminars in cancer biology*, *19*(2), 116-122.

Rubin, J. B., Kung, A. L., Klein, R. S., Chan, J. A., Sun, Y, Schmidt, K., Kieran, M. W., et al. (2003). A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(23), 13513-13518.

Russell, H. V., Hicks, J., Okcu, M. F., & Nuchtern, J. G. (2004). CXCR4 Expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases☆. *Journal of Pediatric Surgery*, *39*(10), 1506-1511. doi:10.1016/j.jpedsurg.2004.06.019

Sadir, R., Baleux, F, Grosdidier, A., Imberty, A., & Lortat-Jacob, H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *The Journal of biological chemistry*, *276*(11), 8288-8296.

Salvucci, O, Bouchard, A., Baccarelli, A, Deschenes, J., Sauter, G., Simon, R., Bianchi, R., et al. (2006). The role of CXCR4 receptor expression in breast

cancer: a large tissue microarray study. *Breast cancer research and treatment*, *97*(3), 275-283.

Salvucci, O, Yao, L., Villalba, S., Sajewicz, A., Pittaluga, S., & Tosato, G. (2002a). Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, *99*(8), 2703-2711.

Salvucci, O, Yao, L., Villalba, S., Sajewicz, A., Pittaluga, S., & Tosato, G. (2002b). Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, *99*(8), 2703-2711.

Samara, G. J., Lawrence, D. M., Chiarelli, C. J., Valentino, M. D., Lyubsky, S., Zucker, S., & Vaday, G. G. (2004). CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer letters*, *214*(2), 231-241.

Saslow, D., Boetes, C., Burke, W., Harms, S., Leach, M. O., Lehman, C. D., Morris, E., et al. (2007). American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA: a cancer journal for clinicians*, *57*(2), 75-89.

Schena, M., & Shalon, D. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. Retrieved from http://www.sciencemag.org/content/270/5235/467.short

Schimanski, C. C., Bahre, R., Gockel, I., Muller, A., Frerichs, K., Horner, V., Teufel, A., et al. (2006). Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. *British journal of cancer*, *95*(2), 210-217.

Schindl, M., Schoppmann, S. F., Samonigg, H., Hausmaninger, H., Kwasny, W., Gnant, M., Jakesz, R., et al. (2002). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *8*(6), 1831-1837.

Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., et al. (2003). Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *The Journal of experimental medicine*, *198*(9), 1391-1402.

Schmid, B. C., Rudas, M., Rezniczek, G. A., Leodolter, S., & Zeillinger, R. (2004). CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. *Breast cancer research and treatment*, *84*(3), 247-250.

Schoppmann, S. F., Fenzl, A., Schindl, M., Bachleitner-Hofmann, T., Nagy, K., Gnant, M., Horvat, R., et al. (2006). Hypoxia inducible factor-1alpha correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *99*(2), 135-141.

Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., Trangas, T., & Talieri, M. (2001). Overexpression of matrix-metalloproteinase-9

in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *British journal of cancer*, *84*(11), 1488-1496.

Scotton, C. J., Wilson, J. L., Scott, K., Stamp, G., Wilbanks, G. D., Fricker, S., Bridger, G., et al. (2002). Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research*, *62*(20), 5930-5938.

Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology*, *64*(5-6), 993-998.

Semenza, G. L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, *8*(4 Suppl), S62-7.

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews.Cancer*, *3*(10), 721-732.

Serrati, S., Margheri, F., Fibbi, G., Cara, G. D., Minafra, L., Pucci-Minafra, I., Liotta, F., et al. (2008). Endothelial cells and normal breast epithelial cells enhance invasion of breast carcinoma cells by CXCR-4-dependent up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR, CD87) expression. *The Journal of pathology*, *214*(5), 545-554.

Shao, H., Tan, Y., Eton, D., Yang, Zhe, Uberti, M. G., Li, S., Schulick, A., et al. (2008). Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *26*(5), 1376-84. doi:10.1634/stemcells.2007-0785

Shen, X., Wang, S., Wang, H., Liang, M., Xiao, L., & Wang, Zehua. (2009). The role of SDF-1/CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, *29*(3), 363-7. Huazhong University of Science and Technology. doi:10.1007/s11596-009-0320-0

Shim, H., Lau, S. K., Devi, S., Yoon, Y., Cho, H. T., & Liang, Z. (2006). Lower expression of CXCR4 in lymph node metastases than in primary breast cancers: potential regulation by ligand-dependent degradation and HIF-1alpha. *Biochemical and biophysical research communications*, *346*(1), 252-258.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., & Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, *28*(3), 495-500. doi:10.1006/geno.1995.1180

Shuin, T., Kondo, K., Ashida, S., Okuda, H., Yoshida, M., Kanno, H., & Yao, M. (1999). Germline and somatic mutations in von Hippel-Lindau disease gene and its significance in the development of kidney cancer. *Contributions to nephrology*, *128*, 1-10.

Shuin, T., Kondo, K., Torigoe, S., Kishida, T., Kubota, Y., Hosaka, M., Nagashima, Y., et al. (1994). Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer research*, *54*(11), 2852-2855.

Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P. J., Tran, T., Brass, L. F., Rosenkilde, M. M., et al. (1997). Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of cell biology*, *139*(3), 651-664.

Signoret, N., Rosenkilde, M. M., Klasse, P. J., Schwartz, T. W., Malim, M. H., Hoxie, J. A., & Marsh, M. (1998). Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *Journal of cell science*, *111 (Pt 1*(Pt 18), 2819-2830.

Sillanpaa, S., Anttila, M., Voutilainen, K., Ropponen, K., Turpeenniemi-Hujanen, T., Puistola, U., Tammi, R., et al. (2007). Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, *104*(2), 296-303.

Sinha, S., & Sinha, U. (2009). Recent advances in breast MRI and MRS. *NMR in biomedicine*, *22*(1), 3-16.

Slagsvold, T., Marchese, A., Brech, A., & Stenmark, H. (2006). CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4. *The EMBO journal*, *25*(16), 3738-3749.

Smith, R. A., Cokkinides, V., & Brawley, O. W. (2009). Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA: a cancer journal for clinicians*, *59*(1), 27-41.

Staller, P., Sulitkova, J., Lisztwan, J., Moch, H., Oakeley, E. J., & Krek, W. (2003). Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature*, *425*(6955), 307-311.

Sternlicht, M. D., & Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *17*, 463-516.

Stoner, M. (2002). Hypoxia Induces Proteasome-Dependent Degradation of Estrogen Receptor alpha in ZR-75 Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, *16*(10), 2231-2242. doi:10.1210/me.2001-0347

Stumm, R., & Rummel, J. (2002). … adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *The Journal of* …. Retrieved from http://neuro.cjb.net/content/22/14/5865.short

Su, Y. C., Wu, M. T., Huang, C. J., Hou, M. F., Yang, S. F., & Chai, C. Y. (2006). Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *15*(4), 533-539.

Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, Xiaoming, Zhang, Jian, Taichman, Russell S, et al. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer metastasis reviews*, *29*(4), 709-22. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10555-010-9256-x

Sun, Y. X., Wang, J, Shelburne, C. E., Lopatin, D. E., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A., Pienta, K J, et al. (2003). Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *Journal of cellular biochemistry*, *89*(3), 462-473.

Swinson, D. E. B., Jones, J Louise, Cox, Giles, Richardson, Donna, Harris, Adrian L, & O'Byrne, Kenneth J. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *Int J Cancer*, *111*(1), 43-50. doi:10.1002/ijc.20052

Swinson, D. E., Jones, J L, Cox, G, Richardson, D, Harris, A L, & O'Byrne, K J. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *111*(1), 43-50.

Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., et al. (1998). The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, *393*(6685), 591-594.

Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Harris, A L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *The American journal of pathology*, *157*(2), 411-421.

Tan, E. Y., Campo, L., Han, C., Turley, H., Pezzella, F., Gatter, K. C., Harris, A L, et al. (2007). Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, *9*(6), R89.

Tan, E. Y., Yan, M., Campo, L., Han, C., Takano, E., Turley, H., Candiloro, I., et al. (2009). The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *British journal of cancer*, *100*(2), 405-411.

Tang, C. H., Tan, T. W., Fu, W. M., & Yang, R. S. (2008). Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis. *Carcinogenesis*, *29*(1), 35-43.

Tarasova, N. I., Stauber, R. H., & Michejda, C. J. (1998). Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *The Journal of biological chemistry*, *273*(26), 15883-15886.

Tatum, J. L., Kelloff, G. J., Gillies, R. J., Arbeit, J. M., Brown, J. M., Chao, K. S., Chapman, J. D., et al. (2006). Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the

management of cancer therapy. *International journal of radiation biology*, *82*(10), 699-757.

Tavassoli, A. F., & Devilee, P. (2003). *World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, France: IARCPress-WHO.

Teicher, B. A. (1994). Hypoxia and drug resistance. *Cancer metastasis reviews*, *13*(2), 139-168.

Tomes, L., Emberley, E., Niu, Y., Troup, S., Pastorek, J., Strange, K., Harris, A., et al. (2003). Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast cancer research and treatment*, *81*(1), 61-69.

Trichopoulos, D., Adami, H. O., Ekbom, A., Hsieh, C. C., & Lagiou, P. (2008). Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *122*(3), 481-485.

Tsoli, E., Tsantoulis, P. K., Papalambros, A., Perunovic, B., England, D., Rawlands, D. A., Reynolds, G. M., et al. (2007). Simultaneous evaluation of maspin and CXCR4 in patients with breast cancer. *Journal of clinical pathology*, *60*(3), 261-266.

Vairaktaris, E., Vylliotis, A., Spyridonodou, S., Derka, S., Vassiliou, S., Nkenke, E., Yapijakis, C., et al. (2008). A DNA polymorphism of stromal-derived factor-1 is associated with advanced stages of oral cancer. *Anticancer research*, *28*(1A), 271-5. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18383856

Vameşu, S. (2007). Angiogenesis and c-erbB-2 (HER2/neu) overexpression status in primary breast cancer patients: an analysis of 158 needle core biopsies. *Romanian journal of morphology and embryology Revue roumaine de morphologie et embryologie*, *48*(2), 121-129. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641798

van ’t Veer, L J, Dai, H, van de Vijver, M J, He, Y D, Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002a). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, *415*(6871), 530-536.

van ’t Veer, L J, Dai, H, van de Vijver, M J, He, Y D, Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002b). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, *415*(6871), 530-536.

Velculescu, V., & Zhang, L. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*. Retrieved from http://www.sciencemag.org/content/270/5235/484.short

Vianello, F., Papeta, N., Chen, T., Kraft, P., White, N., Hart, W. K., Kircher, M. F., et al. (2006). Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 176*(5), 2902-14. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16493048

van de Vijver, M J et al. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine, 347*(25), 1999-2009.

Vizoso, F J, González, L O, Corte, M. D., Rodríguez, J. C., Vázquez, J., Lamelas, M. L., Junquera, S, et al. (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *British journal of cancer, 96*(6), 903-11. doi:10.1038/sj.bjc.6603666

Vleugel, M. M., Greijer, A. E., Shvarts, A., van der Groep, P., van Berkel, M., Aarbodem, Y., van Tinteren, H., et al. (2005). Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1alpha expression in invasive breast cancer. *Journal of clinical pathology, 58*(2), 172-177.

Volin, M. V., Joseph, L., Shockley, M. S., & Davies, P. F. (1998). Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. *Biochemical and biophysical research communications, 242*(1), 46-53.

Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90*(9), 4304-4308.

Wang, J, Loberg, R., & Taichman, R S. (2006). The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. *Cancer metastasis reviews, 25*(4), 573-587.

Wang, Linhui, Wang, Liang, Yang, B., Yang, Q., Qiao, S., Wang, Yingming, & Sun, Yinghao. (2009). Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis. *Clinical & experimental metastasis, 26*(8), 1049-54. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10585-009-9294-3

Wang, Q., Diao, X., Sun, J., & Chen, Z. (2011). Regulation of VEGF, MMP-9, and metastasis by CXCR4 in a prostate cancer cell line. *Cell biology international*. doi:10.1042/CBI20100744

Wang, S.-C., Lin, J.-K., Wang, H.-S., Yang, S.-H., Li, A. F.-Y., & Chang, S.-C. (2010). Nuclear expression of CXCR4 is associated with advanced colorectal cancer. *International journal of colorectal disease, 25*(10), 1185-91. Springer Berlin / Heidelberg. doi:10.1007/s00384-010-0999-1

Wellings, S. R., Jensen, H. M., & Marcum, R. G. (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *Journal of the National Cancer Institute, 55*(2), 231-273.

Wen, X.-F., Yang, G., Mao, W., Thornton, A., Liu, J., Bast, R. C., & Le, X.-F. (2006). HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy. *Oncogene*, *25*(52), 6986-96. doi:10.1038/sj.onc.1209685

Wendt, M. K., Cooper, A. N., & Dwinell, M. B. (2008). Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene*, *27*(10), 1461-71. Nature Publishing Group. doi:10.1038/sj.onc.1210751

Wendt, M. K., Johanesen, P. A., Kang-Decker, N., Binion, D. G., Shah, V., & Dwinell, M. B. (2006). Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. *Oncogene*, *25*(36), 4986-4997.

Wernert, N., & Locherbach, C. (2001). Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers. *Anticancer …*. Retrieved from http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14133646

Wheater, P. R. (1991). *Basic histopathology : a colour atlas and text* (p. 252). Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone.

Wincewicz, A., Sulkowska, M., Koda, M., & Sulkowski, S. (2007). Clinicopathological significance and linkage of the distribution of HIF-1α and GLUT-1 in human primary colorectal cancer. *Pathology & Oncology Research*, *13*(1), 15-20. Springer Netherlands. doi:10.1007/BF02893436

Winchester, D. J., Chang, H. R., Graves, T. A., Menck, H. R., Bland, K. I., & Winchester, D. P. (1998). A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *Journal of the American College of Surgeons*, *186*(4), 416-422.

Woo, S. U., Bae, J. W., Kim, C. H., Lee, J. B., & Koo, B. W. (2008). A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. *Annals of surgical oncology*, *15*(1), 281-285.

Wright, N., Hidalgo, A., Rodriguez-Frade, J. M., Soriano, S. F., Mellado, M., Parmo-Cabanas, M., Briskin, M. J., et al. (2002). The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *168*(10), 5268-5277.

Wu, M., Jung, L., Cooper, A. B., Fleet, C., Chen, L., Breault, L., Clark, K., et al. (2009). Dissecting genetic requirements of human breast tumorigenesis in a tissue transgenic model of human breast cancer in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(17), 7022-7. doi:10.1073/pnas.0811785106

Wu, Z. S., Wu, Q., Yang, J. H., Wang, H. Q., Ding, X. D., Yang, F, & Xu, X. C. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *122*(9), 2050-2056.

Xiang, Z.-L., Zeng, Z.-C., Tang, Z.-Y., Fan, J., Zhuang, P.-Y., Liang, Y., Tan, Y.-S., et al. (2009). Chemokine receptor CXCR4 expression in hepatocellular carcinoma patients increases the risk of bone metastases and poor survival. *BMC cancer*, *9*(1), 176. doi:10.1186/1471-2407-9-176

Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., et al. (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, *107*(9), 1322-1328.

Yan, C., & Boyd, D. D. (2007). Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of cellular physiology*, *211*(1), 19-26.

Yan, M., Rayoo, M., Takano, E. A., Thorne, H., & Fox, S. B. (2009). BRCA1 tumours correlate with a HIF-1alpha phenotype and have a poor prognosis through modulation of hydroxylase enzyme profile expression. *British journal of cancer*, *101*(7), 1168-1174.

Yang, M. H., & Wu, K. J. (2008). TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *7*(14), 2090-2096.

Yang, M. H., Wu, M. Z., Chiou, S. H., Chen, P. M., Chang, S. Y., Liu, C. J., Teng, S. C., et al. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nature cell biology*, *10*(3), 295-305.

Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Nakahara, M., Kodama, R., Sanke, T., & Nakamura, Y. (2008). Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. *BMC cancer*, *8*, 340.

Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., et al. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, *455*(7211), 406-10. doi:10.1038/nature07275

Yi, X., Li, C.-ying, Zhang, S.-hua, Wang, X.-hua, Li, Z.-qing, & Yang, Fang. (2008). [Relationship and clinical significance of KiSS-1, nuclear factor kappa B (NF-kappaB), p50, and matrix metalloproteinase 9 expression in breast cancer]. *Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology*, *37*(4), 238-42. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18844032

Youngkin, E. Q., & Davis, M. S. (1999). *Women's Health: A Primary Care Clinical Guide (3rd Edition)* (p. 960). Prentice Hall. Retrieved from http://www.amazon.com/Womens-Health-Primary-Clinical-Guide/dp/0131100262

Yu, L., Cecil, J., Peng, S. B., Schrementi, J., Kovacevic, S., Paul, D., Su, E. W., et al. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, *374*, 174-179.

Yuecheng, Y., & Xiaoyan, X. (2007). Stromal-cell derived factor-1 regulates epithelial ovarian cancer cell invasion by activating matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *16*(5), 430-5. doi:10.1097/01.cej.0000236259.88146.a4

Zagzag, D., Krishnamachary, B., Yee, H., Okuyama, H., Chiriboga, L., Ali, M. A., Melamed, J., et al. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer research*, *65*(14), 6178-6188.

Zhong, H., Marzo, A. M. D., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., et al. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.*, *59*(22), 5830-5835.

Zhou, Y., Larsen, P. H., Hao, C., & Yong, V. W. (2002). CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *The Journal of biological chemistry*, *277*(51), 49481-49487.

Zlotnik, A. (2006). Chemokines and cancer. *International journal of cancer.Journal international du cancer*, *119*(9), 2026-2029.

Zou, Y. R., Kottmann, A. H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, *393*(6685), 595-599.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., et al. (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes & development*, *14*(4), 391-396.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου των γυναικών. Παρότι η σχετική έρευνα είναι αρκετά εκτεταμένη, οι υποκείμενοι μηχανισμοί δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τη σημαντικότητα της διαντίδρασης των καρκινικών κυττάρων και του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος ως μια κομβική συνιστώσα στη παθοφυσιολογίας της νόσου. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφραση του υποδοχέα CXCR4, της χημοκίνης SDF-1, της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-9 και του παράγοντα HIF-1α σε διηθητικά καρκινώματα του μαστού και στον παρακείμενο μη καρκινικό ιστό (τόσο στο επιθηλιακό όσο και στο στρωματικό στοιχείο), καθώς και οι συσχετίσεις των ποικίλων ανοσοεντοπίσεων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την επιβίωση. η επιλογή των μορίων έγινε βάσει της σημαντικότητάς τους σε ποικίλα στάδια της παθογένειας της νόσου (υποξία, νεοαγγείωση, ανάπτυξη κτλ). Η έκφραση όλων των υπό εξέταση μορίων ήταν στατιστικά σημαντικότερη στον καρκινικό ιστό σε σχέση με τον παρακείμενο μη νεοπλασματικό. Από τα αποτελέσματα προκύπτει επίσης συσχέτιση μεταξύ ανοσοϊστοχημικών εντοπίσεων της MMP-9 και των υπολοίπων υπό διερεύνηση μορίων. Προέκυψαν επίσης ποικίλες συσχετίσεις μεταξύ συγκεκριμένων προτύπων έκφρασης (pattern) και προγνωστικών παραγόντων. Η έκφραση της MMP-9 στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων σχετίστηκε θετικά με τη λεμφαδενική προσβολή, αλλά αρνητικά με το μέγεθος του όγκου. Επίσης, η έκφραση του CXCR4 και της SDF-1 στα καρκινικά κύτταρα σχετίστηκε με την παρουσία οστικών μεταστάσεων και με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ανοσοεντόπιση της SDF-1 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του Ki67 και με το στάδιο κατά TNM, ενώ η ανοσοεντόπιση της SDF-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα του καρκινικού στρώματος με την έκφραση του Her2. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του HIF-1α συσχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση των στεροειδικών υποδοχέων ER και PR. Επιπλέον, η έκφραση της MMP-9 στους ινοβλάστες του καρκινικού στρώματος και η έκφραση της SDF-1 στα επιθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες του παρακείμενου μη καρκινικού ιστού συσχετίστηκαν με δυσμενέστερη επιβίωση. Το εύρημα αυτό τονίζει τη σημαντικότητα τόσο του στρώματος όσο και του ξενιστή στην παθογένεια του καρκίνου. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημαντικότητα των υπό μελέτη μορίων στην καρκινογένεση και στην εξέλιξη της νόσου. Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων αυτών απαιτείται η διενέργεια μελετών μεγαλύτερης κλίμακας ενώ προσεγγίσεις με λειτουργικές μεθοδολογίες θα μπορούσαν να αναδείξουν πιθανώς κοινά ή διαπλεκόμενα υποκείμενα μηνυματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται τα ως άνω μόρια.

ABSTRACT

PROGNOSTIC IMPACT OF IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF BIOLOGICAL MARKERS (SDF1/CXCR4 AXIS) IN BREAST CARCINOMA

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women. Despite the ongoing research in breast cancer tumorigenesis the underlying mechanisms are not yet well elucidated. In recent years, the interaction between tumour cells and tumour microenvironment has gained appreciation as an active participant in cancer pathophysiology. In the present study we attempt to investigate the immunohistochemical staining of CXCR4, SDF-1, MMP-9 and HIF-1a in invasive breast cancer and adjacent normal breast tissue (including epithelial and stromal components) and to determine the relationship between different expression patterns and various tumor clinicopathological parameters and survival. The understudy molecules where chosen due to their crucial role in different steps of breast cancer progression (tumor growth, hypoxia, neovascularisation, invasiveness etc). All molecules showed statistically significant higher expression in cancer tissue compared to expression in the adjacent noncancerous tissue. Our results reveal a correlation between expression patterns of MMP9 and the other understudy molecules (SDF1, CXCR4 and HIF-1a). Furthermore, MMP9 expression in fibroblasts of cancer stroma and SDF1 expression in normal epithelial cells and fibroblasts of adjacent normal stroma were associated with poorer survival, underscoring the importance of tumor microenvironment and host derived molecules in tumor progression. There were also various correlations between specific expression patterns and prognostic factors: MMP9 expression in cancer cells was positively correlated with lymph node involvement, but negatively with tumor size, while CXCR4 and SDF-1 expression in cancer cells was positively correlated with bone metastases and tumor grade, respectively. Furthermore, SDF-1 immunoexpression of cancer stromal fibroblasts was positively correlated with Ki67 expression and TNM stage, whereas SDF1 immunoexpression in endothelial cells of cancer stroma was positively correlated with Her2 expression. HIF-1a expression in cancer cells was negatively correlated with expression of steroid receptors. The abovementioned results underline the importance of the understudy molecules in carcinogenesis and tumor progression. Larger scale studies are necessary to confirm our results, while functional approaches could possibly reveal common or interwoven molecular pathways for the understudy molecules.