

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

...μικρές προσδοκίες	228
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ	
Κινάσες της Τυροσίνης και Καρκίνος. Η SYK Κινάση της Τυροσίνης <i>K. Ρεπανά, K. Παπαζήσης, Π. Φούκας</i>	229
Tamoxifen resistance: an old story with new implications <i>D. Pliorou, A. Kouvatsi</i>	242
ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	
Συχνότητα της καρδιακής ανεπάρκειας σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Τραστοζουμάμπη <i>Δ. Πλατογιάννης, X. Λαφάρας, Γ. Γαλακτίδου, Α. Κορτσάρης, Ε. Χατζηνικολάου, Θ. Μπισχινώτης, Δ. Χατσέρας</i>	252
Ανοσοιστοχημική μελέτη παραγόντων της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης στα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας <i>B. Καραθασίλης, B. Μαλάμου-Μήτση, Ε. Μπριασούλης¹, Ε. Τσάνου, Ε. Κίτσου, Θ. Φώτσης, X. Καλόφωνος, Γ. Φούντζηλας, Ν. Παυλίδης</i>	260
Συσχέτιση της μαστογραφικής απεικόνισης, της έκφρασης των υποδοχέων EGFR, HER-2, HER-3, HER-4 και της έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού <i>Φ.Α. Μπάδρα, Μ.Β. Καραμούζης, Ε. Λυκάκη-Καρατζά, Π. Ραβασούλα, Ε. Τζωρακοελευθεράκης, Γ. Οικονόμου, Δ. Κούκουρας, Α.Γ. Παπαθασιλείου, X.Π. Καλόφωνος</i>	273
Η διαγνωστική προσέγγιση των αλλοιώσεων της στοματο-γναθό-προσωπικής περιοχής με την κυτταρολογία υγρής φάσης (Thinprep) <i>P.M. Βαλερή, Α. Παντίδου, Κ. Βαχτσεβάνος, Ε. Ασλανίδου, X. Δεστούνη, Κ. Αντωνιάδης</i>	290
ΑΝΤΙΚΑΤΟΠΤΡΙΣΜΟΙ	
Πότε πρέπει να «εγκαταλείπει» ο ογκολόγος; <i>A. Αρδαβάνης</i>	296
ΣΕΛΙΔΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ	
RAS <i>putin</i> : a short autobiography <i>S. Murray, M. Μανωλούκος</i>	302
ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ	
Το πρόβλημα με τη διάθεση ογκολογικών φάρμακων στην Ελλάδα <i>Γ. Αραβαντινός</i>	307
ΒΗΜΑΤΙΣΜΟΙ	310
ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ	315
Οδηγίες για τους συγγραφείς	317



FORUM OF CLINICAL ONCOLOGY

Official Journal of the Hellenic Society of Medical Oncology

Volume 4(B), Issue 4, October - December 2005

ΒΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

Επίσημο περιοδικό της Εταιρείας Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος

ISSN 1107-5384

Περίοδος Β, Τόμος 4, Τεύχος 4 • Οκτώβριος - Δεκέμβριος 2005



BOARD OF THE HELLENIC SOCIETY OF MEDICAL ONCOLOGY

President: D. Bafaloukos
Vice President: G. Aravantinos
Secretary: P. Papakostas
Special Secretary: E. Samantas
Treasurer: G. Samelis
Members: A. Ardabanis
E. Briasoulis

ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ ΟΓΚΟΛΟΓΩΝ ΠΑΘΟΛΟΓΩΝ ΕΛΛΑΔΑΣ

Πρόεδρος: Δ. Μπαφαλιούκος
Αντιπρόεδρος: Γ. Αραβαντινός
Γενικός Γραμματέας: Π. Παπακώστας
Ειδικός Γραμματέας: Ε. Σαμαντάς
Ταμίας: Γ. Σαμέλης
Μέλη: Α. Αρδαβάνης
Ε. Μπριασούλης

EDITORIAL BOARD

Editor in chief: E. Briasoulis
Associate Editor: E. Linardou
Secretary: Ch. Andreadis

Members of the Board

A. Ardavanis	S. Droufakou
I. Varthalitis	M. Xidakis
M. Vaslamatzis	Ch. Panopoulos
N. Karvounis	S. Rigatos
D. Mavroudis	Ch. Christodoulou
A. Bamias	

ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Διευθυντής Σύνταξης: Ε. Μπριασούλης
Αναπληρωτής: Ε. Λινάρδου
Γενικός Γραμματέας: Χ. Ανδρεάδης

Μέλη

A. Αρδαβάνης	Σ. Ντρουφάκου
I. Βαρθαλίτης	Μ. Ξυδάκης
Μ. Βασιλαματζής	Χ. Πανόπουλος
N. Καρβούνης	Σ. Ρηγάτος
Δ. Μαυρουδής	Χ. Χριστοδούλης
A. Μπάμιας	

*Quarterly official publication
of Hellenic Society of Medical Oncology*

Address for correspondence:
HESMO, 105 Alexandras Av., 4th floor
Tel./Fax: 210 6457971, E-mail: hesmo@otenet.gr

Publisher:

"EPSILON", 4 Papadiamantopoulou Str., Athens 11528
Tel.: +30 2107254360-2, Fax: +30 2107254363
e-mail: epsilonb@hol.gr

Press:

TECHNOGRAMMA, Tel.: +30 2106000643 - Fax: +30 2106002295

Ιδιοκτησία - Σύνταξη:

Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος
Διεύθυνση για αλληλογραφία - Γραμματεία:
Ε.Ο.Π.Ε. Λεωφόρος Αιεξάνδρας 105, 4ος όροφος
Τηλ.: 210 6457971 E-Mail: hesmo@otenet.gr

Εκδότης:

"ΕΪΣΙΛΟΝ", Παπαδιαμαντοπούλου 4
115 28 Αθήνα, Τηλ.: 210 7254360-2 - Fax: 210 7254363
e-mail: epsilonb@hol.gr

Εκτύπωση:

TECHNOGRAMMA, Τηλ.: 210 6000643 - Fax: 210 6002295

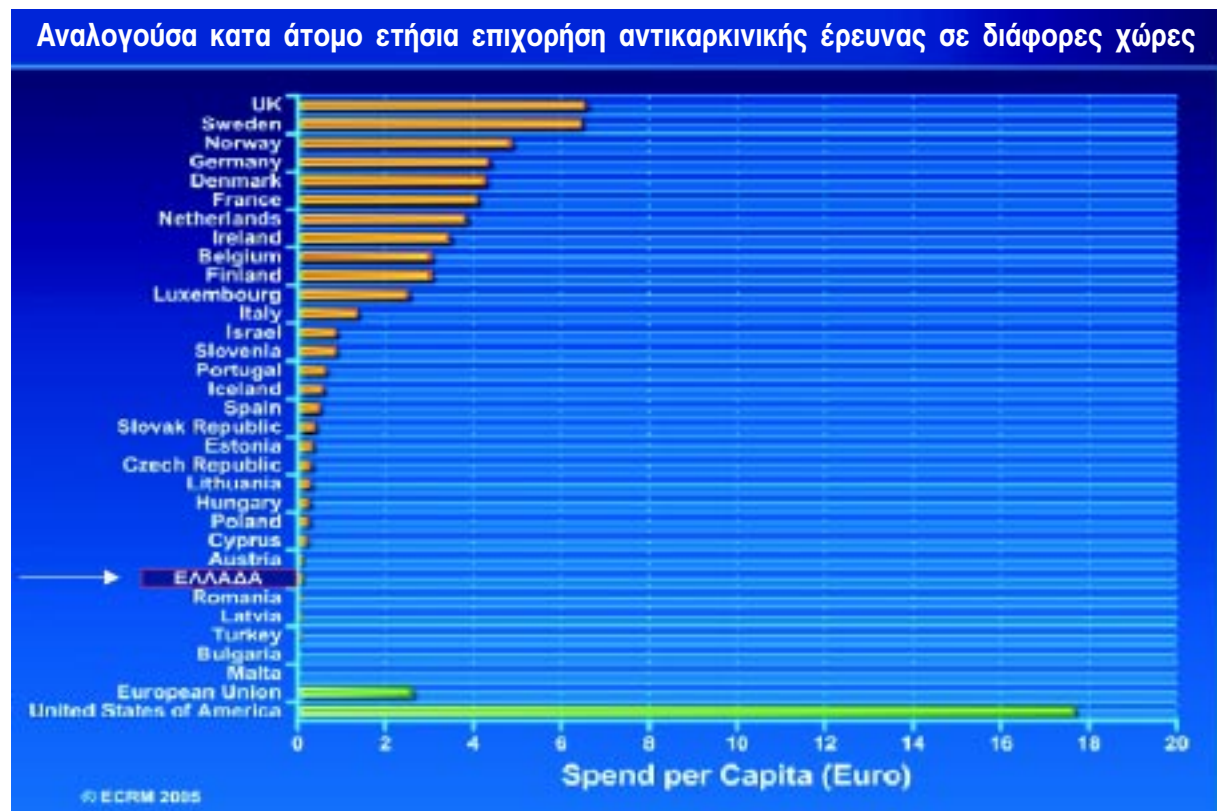
Περιεχόμενα

...μικρές προσδοκίες	228
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΕΙΣ	
Κινήσεις της Τυροσίνης και Καρκίνος. Η SYK Κινάση της Τυροσίνης	229
<i>Κ. Ρεπανά, Κ. Παπαζήσης, Π. Φούκας</i>	
Tamoxifen resistance: an old story with new implications	242
<i>Δ. Ιλιόπουλος, Α. Κουνάτσι</i>	
ΠΡΩΤΟΤΥΠΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	
Συχνότητα της καρδιακής ανεπάρκειας σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Τραστοζουμάμπη	252
<i>Δ. Πλατογιάννης, Χ. Λαφάρας, Γ. Γαλακτίδου, Α. Κορτσάρης, Ε. Χατζηνικολάου, Θ. Μπισχιγιώτης, Δ. Χατσέρας</i>	
Ανοσοϊστοχημική μελέτη παραγόντων της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης στα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας	260
<i>Β. Καραβασίλης, Β. Μαλάμου-Μήτση, Ε. Μπριασούλης¹, Ε. Τσάνου, Ε. Κίτσου, Θ. Φώτης, Χ. Καλόφωνος, Γ. Φούντζηλας, Ν. Παυλίδης</i>	
Συσχέτιση της μαστογραφικής απεικόνισης, της έκφρασης των υποδοχέων EGFR, HER-2, HER-3, HER-4 και της έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού	273
<i>Φ.Α. Μπάδρα, Μ.Β. Καραμούζης, Ε. Λυκάκη-Καρατζά, Π. Ραβαζούλα, Ε. Τζωρακοελευθεράκης, Γ. Οικονόμου, Δ. Κούκουρας, Α.Γ. Παπαθασιλίου, Χ.Π. Καλόφωνος</i>	
Η διαγνωστική προσέγγιση των αλλοιώσεων της στοματο-γναθο-προσωπικής περιοχής με την κυτταρολογία υγρής φάσης (Thinprep)	290
<i>Ρ.Μ. Βαλερή, Α. Παντίδου, Κ. Βαχτσεβάνος, Ε. Ασλανίδου, Χ. Δεστούνη, Κ. Αντωνιάδης</i>	
ΑΝΤΙΚΑΤΟΠΤΡΙΣΜΟΙ	
Πότε πρέπει να «εγκαταλείπει» ο ογκολόγος;	296
<i>Α. Αρδαβάνης</i>	
ΣΕΛΙΔΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ	
RAS <i>putin</i> : a short autobiography	302
<i>S. Murray, Μ. Μανωλούκος</i>	
ΕΙΔΙΚΟ ΑΡΘΡΟ	
Το πρόβλημα με τη διάθεση ογκολογικών φάρμακων στην Ελλάδα	307
<i>Γ. Αραβαντινός</i>	
ΒΗΜΑΤΙΣΜΟΙ	310
ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ	315
Οδηγίες για τους συγγραφείς	317

Contents

Small expectations	228
REVIEWS	
Protein Tyrosine Kinases and Cancer. Focus on Syk	229
<i>K-Repana, K. Papazisis, P. Foukas</i>	
Tamoxifen resistance: an old story with new implications	242
<i>D. Iliopoulos, A. Kouvatsi</i>	
ORIGINAL REPORTS	
Prevalence of heart failure in women with metastatic breast cancer during Trastuzumab treatment	252
<i>D. Platogiannis, C. Lafaras, G. Galaktidou, A. Kortsaris, E. Hatzinikolaou, Th. Bishiniotis, D. Hatseras</i>	
Angiogenesis and proteolysis in cancer of unknown primary: an immunohistochemical study	260
<i>V. Karavasilis, V. Malamou-Mitsi, E. Briasoulis, E. Tsanou, E. Kitsou, Th. Fotsis, Ch. Kalofonos, G. Fountzilias, N. Pavlidis</i>	
Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications, epidermal growth factor receptor (egfr) family and apoptosis related proteins expression	273
<i>F.A. Badra, M.V. Karamouzis, E. Likaki-Karatza, P. Ravazoula, E. Tzorakoleftherakis, G. Iconomou, D. Koukouras, A.G. Papavassiliou, H.P. Kalofonos</i>	
Liquid Based Cytology in diagnosis of oral, maxillary and facial region lesions	290
<i>R. Valeri, A. Pantidou, K. Vahtsevanos, E. Aslanidou, Ch. Destouni, K. Antoniadis</i>	
REFLECTIONS	
When to give up?	296
<i>A. Ardavanis</i>	
MOLECULAR ONCOLOGY PAGES	
RAS <i>putin</i> : a short autobiography	302
<i>S. Murray, M. Manoloukos</i>	
The problem for anticancer drug prescription	307
<i>G. Aravantinos</i>	
NEWS AND COMMENTS	310
CALENDAR	315
Guidelines for authors	317

...μικρές προσδοκίες



http://www.ecrmforum.org/report/ECRM_report.pdf 2005

Κινάσες της Tyrosίνης και Καρκίνος. Η SYK Κινάση της Tyrosίνης

Κ. Ρεπανά^{1*}, Κ. Παπαζήσης², Π. Φούκας³

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κινάσες της tyrosίνης αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της μεταγωγής σήματος από το εξωτερικό στο εσωτερικό των κυττάρων ελέγχοντας λειτουργίες όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση και η διαφοροποίησή τους. Πολύ σημαντική για την ομοιοστάση του οργανισμού παρουσιάζεται η ισορροπία μεταξύ των μηχανισμών που επάγουν τη λειτουργία των κινάσων της tyrosίνης και αυτών που περιορίζουν τη δράση τους. Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης επιλέχθηκαν ως μηχανισμοί ελέγχου των κινάσων της tyrosίνης γιατί είναι ταχείες, αντιστρεπτές και τροποποιούν σημαντικά τη δομή στο χώρο μιας πρωτεΐνης. Οι κινάσες της tyrosίνης αποτελούν πολύ συχνούς στόχους γενετικών μεταλλάξεων ή/και λειτουργικών απορρυθμίσεων. Γι' αυτό το λόγο, σημαντικός αριθμός τους έχει αναγνωριστεί ως τώρα να ανήκει στην κατηγορία των ογκογονιδίων και σε ορισμένες περιπτώσεις, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων του καρκίνου. Η κινάση της tyrosίνης Syk αποτελεί ένα από τα λίγα παράδειγμα πιθανού ογκοκατασταλτικού γονιδίου του καρκίνου του μαστού. **Λέξεις κλειδιά:** Κινάση Tyrosίνης, Φωσφορυλίωση, Ογκοκατασταλτικό Γονίδιο, Syk. **Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):229-241.**

Εισαγωγή

Ένας από τους θεμελιώδεις τρόπους επικοινωνίας των κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι η μεταγωγή σήματος από το εξωτερικό στο εσωτερικό *cas*, μέσω μιας ομάδας πρωτεϊνών, τις ονομαζόμενες κινάσες της tyrosίνης

(Protein Tyrosine Kinases-PTKs). Τα ένζυμα αυτά αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης, της επικοινωνίας, της μετανάστευσης και των μεταβολικών αλλαγών των κυττάρων¹. Η καταλυτική τους δράση είναι η εξής: Μεταφέρουν μία φωσφορική ομάδα, χρησιμοποιώντας ως δότη φωσφόρου τη γ' φωσφορική ομάδα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), στο υδροξύλιο συγκεκριμένων tyrosινών των ιδίων (αυτοφωσφορυλίωση) ή άλλων PTKs. Οι φωσφορυλιωμένες ενεργοποιημένες πλέον κινάσες εμπλέκονται στα μεταγωγικά μονοπάτια μεταφοράς ενδοκυττάρου μηνύματος. Στο πέρας του μονοπατιού το σήμα φτάνει τελικά στον πυρήνα για να πραγματοποιηθεί η ζητούμενη λειτουργία. Η πολύ σημαντική χρησιμότητα των κινάσων της tyrosίνης φαίνε-

¹Βιολόγος - Βιοχημικός, Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, 54124, Ελλάδα. *Υπεύθυνη αλληλογραφίας, Fax: 2310-234185, Email: krepana@auth.gr. ²Παθολόγος Ογκολόγος, 3^ο Τμήμα Κλινικής Ογκολογίας, «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης, Αλεξάνδρου Συμεωνίδη 2, Θεσσαλονίκη, 54007, Ελλάδα. ³Παθολογοανατόμος, Εργαστήριο Ιστοπαθολογίας και Κυτταροπαθολογίας, Νοσοκομείο «ΕΡΡΙΚΟΣ ΝΤΥΝΑΝ», Μεσογείων 107, Αθήνα, 115 26, Ελλάδα.

ται από το γεγονός ότι από τα ~32.000 ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως φάνηκε από το πρόγραμμα αποκωδικοποίησης του γονιδιώματος του ανθρώπου το 20% περίπου είναι ένζυμα εμπλεκόμενα στη μεταγωγή σήματος. Από αυτά, τα περισσότερα από 520 είναι κινάσες, εκ των οποίων πάνω από 90 κινάσες τυροσίνης.

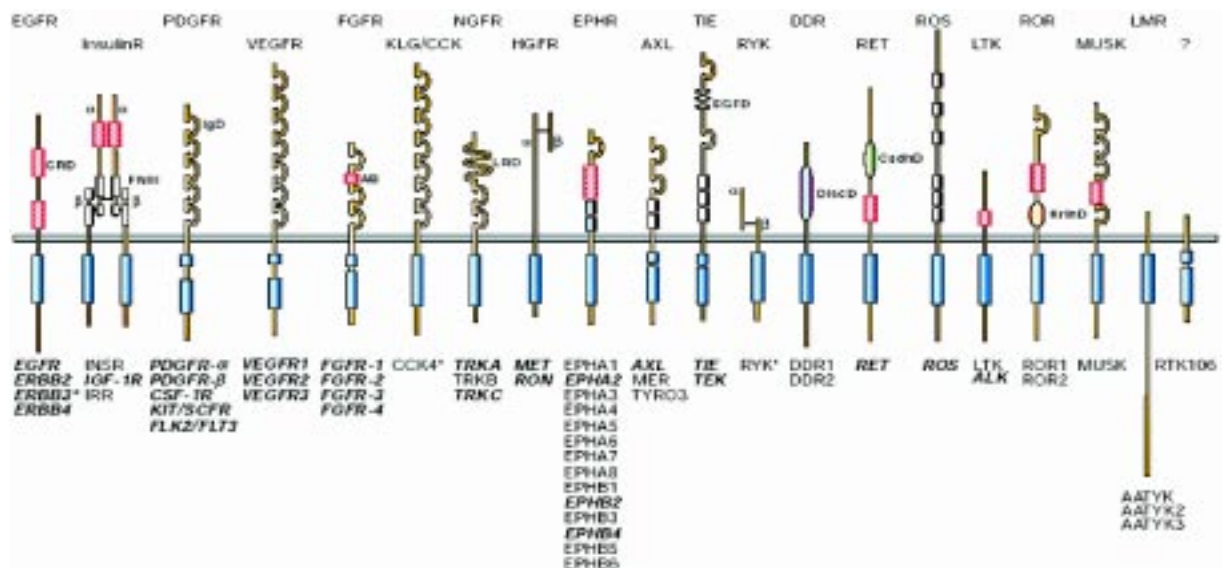
Η πολυπλοκότητα των οργανικών μορίων των κινασών της τυροσίνης καθώς και των λειτουργιών που επάγουν στο κύτταρο καθιστά απαραίτητο το στενό έλεγχο της δράσης τους. Η επιλογή των αντιδράσεων φωσφορυλίωσης-αποφωσφορυλίωσης, ως μηχανισμών ελέγχου των πρωτεϊνών αυτών, δεν είναι καθόλου τυχαία. Εξελικτικά αυτοί οι δρόμοι επικράτησαν γιατί οι αντιδράσεις είναι ταχείες, αντιστρεπτές, τροποποιούν σημαντικά τη δομή στο χώρο μιας πρωτεΐνης, ανοίγοντας ή κλείνοντας με αυτόν τον τρόπο τα ενεργά κέντρα των ενζύμων και χρησιμοποιούν το ATP που είναι άφθονη και εύκολη πηγή φωσφορικών ομάδων.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης προκαλεί αρκετά συχνά τη δυσλειτουργία των κινασών της τυροσίνης. Υπερέκφραση, υποέκφραση, μόνιμη ενεργοποίηση/απενεργοποίηση πολλών κινασών της τυροσίνης έχουν ανιχνευτεί σε διάφορους τύπους ανθρωπίνων καρκινωμάτων ενώ μεγάλο μέρος τους αποτελεί ογκογονίδια ή ογκοκατα-

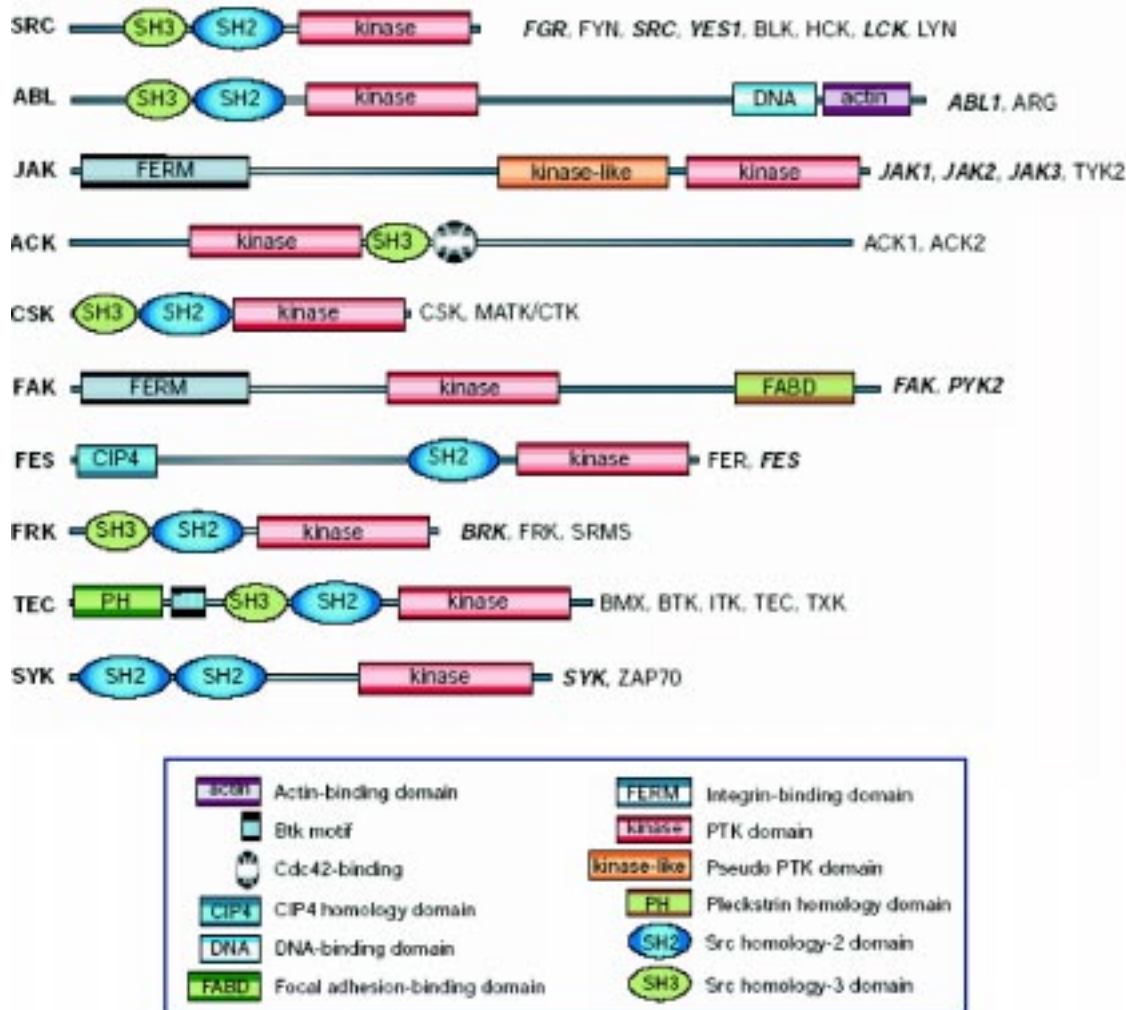
σταλτικά γονίδια του καρκίνου². Ένα παράδειγμα ογκοκατασταλτικού γονιδίου του καρκίνου του μαστού είναι η Syk κινάση της τυροσίνης. Η έκφρασή της βρέθηκε να μειώνεται σημαντικά σε ιστό διηθητικού καρκινώματος μαστού καθώς και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού³⁻⁹. Η Syk παρεμπόδιζε τη δημιουργία μεταστατικών αποικιών σε *in vivo* πειράματα με αθυμικά ποντίκια³ όπως και καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται ανεξαρτήτως προσφύσεων και να δημιουργούν διηθητικές αποικίες *in vitro*^{3,8}. Η μείωση της έκφρασης της θεωρήθηκε ως κακός προγνωστικός δείκτης και συνδέθηκε με αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης μεταστάσεων^{4,9}. Η ανίχνευση της ελάττωσης των επιπέδων έκφρασης της Syk πρωτεΐνης θα μπορούσε να αποτελέσει μέσο διάλογής του διηθητικού καρκινώματος του μαστού^{6,8}.

Κατηγορίες Κινασών της Τυροσίνης

Με βάση την εντόπιση και τις δομικές ομοιότητες τους οι κινάσες της τυροσίνης χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Τους υποδοχείς (Receptor Protein Tyrosine Kinases - RPTKs) και τις κυτταροπλασματικές (Non Receptor -NRPTKs). Από τις περίπου 90 κινάσες της τυροσίνης που έχουν αναγνωριστεί οι 58 ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων και οι υπόλοιπες 32 στις κυτταρο-



Σχήμα 1. Υποδοχείς Κινάσες της Τυροσίνης (RPTKs). Το εξωκυττάριο κομμάτι τους είναι από επάνω και το ενδοκυττάριο από κάτω. Ο πρωτότυπος υποδοχέας της κάθε οικογένειας φαίνεται επάνω ενώ τα μέλη της αναγράφονται κάτω. Τα σύμβολα α και β υποδηλώνουν τις διαφορετικές υπομονάδες του υποδοχέα ενώ ο αστερίσκος σημαίνει ότι το μέλος αυτό δεν παρουσιάζει ενδογενή δράση κινάσης. Οι RPTKs που έχουν εμπλακεί σε ανθρώπινες κακοήθειες είναι σε έντονη πλάγια γραφή.



Σχήμα 2. Ανθρώπινες NRPTKs και οι συντηρημένες περιοχές τους. Τα μέλη κάθε οικογένειας φαίνονται δεξιά και η ονομασία της αριστερά. Η ονομασία κάθε συντηρημένης περιοχής φαίνεται στον πίνακα επάνω. Οι PTKs που έχουν εμπλακεί σε ανθρώπινες κακοήθειες είναι σε έντονη πλάγια γραφή.

πλασματικές¹⁰. Οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μία αμινοτελική εξωκυτάρια περιοχή που δεσμεύει τον προσδέτη, μία διαμεμβρανική, υδρόφοβη έλικα και ένα καρβοξυτελικό ενδοκυττάριο τμήμα που εμπεριέχει την περιοχή κινάσης (Σχήμα 1).

Οι κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης (NRPTKs) είναι πιο απλές δομικά, περιέχοντας την περιοχή της κινάσης και άλλες ρυθμιστικές περιοχές που είναι, σε πολύ μεγάλο ποσοστό, συντηρημένες στην ομάδα αυτή των κινάσων (Σχήμα 2). Οι περιοχές αυτές ευθύνονται για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, πρωτεϊνών-λιπιδίων και πρωτεϊνών-DNA και συνεπώς, τη μετάδοση σήματος.

- Περιοχή SH2¹¹ (Src homology 2 domain): Η περιοχή αυτή αναγνωρίστηκε αρχικά σε ογκογονίδιο του ιού των πουλερικών Rous Sarcoma. Είναι μία συμπαγής περιοχή των 100 περίπου αμινοξέων που έχει την ιδιότητα, με την αναδίπλωση που δημιουργούν τα αμινοξέα της, να δεσμεύεται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες. Τα 3-6 αμινοξέα C-τελικά της φωσφορυλιωμένης τυροσίνης είναι αρκετά σημαντικά για τη δέσμευση, δημιουργώντας έτσι μία αλληλουχία ειδικεύσης για την αλληλεπίδραση.
- Περιοχή PTB¹¹ (Protein Tyrosine Binding domain): Περιοχή που δεσμεύεται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες.

- Περιοχή SH3¹¹ (Src homology 3 domain): Η μικρότερη αυτή περιοχή, περίπου 60 αμινοξέα, δεσμεύεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη.
- Περιοχή PH (Pleckstrin Homology domain): Η περιοχή αυτή δεσμεύεται σε φωσφατιδυλινοσιτολικά λιπίδια που είναι φωσφορυλιωμένα σε συγκεκριμένες θέσεις¹². Οι συγκεντρώσεις τέτοιων λιπιδίων αυξάνονται αρκετά στην κυτταρική μεμβράνη σαν αποτέλεσμα κάποιας ενεργοποίησης συγκεκριμένης λειτουργίας του κυττάρου. Έτσι, οι κυτταροπλασματικές κινάσες συλλέγονται στην μεμβράνη για περαιτέρω ενεργοποίηση άλλων μορίων.

Έλεγχος δράσης των κινασών της τυροσίνης

Η φωσφορυλίωση αποτελεί την πιο κοινή μετά-μεταφραστική, ομοιοπολική τροποποίηση πρωτεϊνών και εξυπηρετεί απαραίτητους ρόλους στη μεταγωγή σήματος και στη ομοιόσταση πολυκύτταρων οργανισμών¹³. Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης συμβαίνει σε λεπτά ή ακόμη και δευτερόλεπτα μετά το κατάλληλο σήμα και είναι εύκολα αντιστρέψιμη μέσω φωσφατάσων (Protein-Tyrosine Phosphatases-PTPs), μιας ομάδας ενζύμων που καταλύουν την αντίστροφη διεργασία: την αφαίρεση της φωσφορικής ομάδας από την τυροσίνη. Ο στενός έλεγχος της αντίδρασης και γενικά της τροποποίησης αυτής από τις φωσφατάσες φαίνεται από τον αριθμό τους, ανευρίσκονται περίπου 120 στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Διαφορετικές ομάδες φωσφατάσων, άλλες πιο ειδικές, που αποφωσφορυλιώνουν μόνο συγκεκριμένες κινάσες και άλλες πιο γενικής δράσης, ισορροπούν την ομαλή λειτουργία του κυττάρου¹⁴.

Η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων θέσεων τυροσίνης μπορεί να οδηγήσει στην μέγιστη ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή της κινάσης λόγω της δομικής αλλαγής που προκαλεί στο μόριο της η φωσφορική ομάδα. Φωσφορυλίωση τυροσινών στην περιοχή ενεργοποίησης για παράδειγμα, παρακινεί την ενεργοποίησή της¹⁵⁻¹⁶ διότι, στις περισσότερες περιπτώσεις η μη φωσφορυλιωμένη περιοχή εμποδίζει δομικά την δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Με τη φωσφορυλίωσή της, εναποτίθεται μακριά και αφήνει ελεύθερη την πρόσβαση στο ενεργό της κέντρο. Η φωσφορυλίωση τυροσινών εκτός της περιοχής ενεργοποίησης από την άλλη, μπορεί να οδηγήσει στην αρνητική δράση της. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση της Tyr-527 στο καρβοξυτελικό άκρο της κυτταροπλασματικής κινάσης

Src (Sarcoma) εμποδίζει τη δράση της¹⁷.

Λειτουργία των Κινασών της Τυροσίνης

Λειτουργία των υποδοχέων κινασών της τυροσίνης

Η ενεργοποίηση των RPTKs συνεπάγεται την ενεργοποίηση της ενδογενούς καταλυτικής τους δράσης και τη δημιουργία θέσεων δέσμευσης για τις μετέπειτα πρωτεΐνες του μεταγωγικού μονοπατιού. Η δέσμευση του προσδέματος στις θέσεις δέσμευσης των υποδοχέων προκαλεί το διμερισμό ή ολιγομερισμό τους, διαδικασία απαραίτητη για την ενεργοποίηση της καταλυτικής τους δράσης¹⁸. Ακολουθεί η αυτοφωσφορυλίωσή-τους με τους εξής τρόπους:

- α) αυτοφωσφορυλίωση *in cis*, όπου ο υποδοχέας αυτοφωσφορυλιώνει εσωτερικές του τυροσίνες
- β) αυτοφωσφορυλίωση *in trans*, όπου ο υποδοχέας φωσφορυλιώνει τυροσίνες του διπλανού υποδοχέα.

Και στις δύο περιπτώσεις σημειώνονται οι απαραίτητες δομικές αλλαγές του υποδοχέα που οδηγούν στη μέγιστη ενεργοποίησή του.

Η φωσφορυλίωση των τυροσινών της κυτταροπλασματικής υπομονάδας του υποδοχέα δημιουργεί παράλληλα και τις θέσεις δέσμευσης (docking-sites), μέσω των περιοχών SH2 και PTB, των υπόλοιπων πρωτεϊνών της μεταγωγής σήματος που με τη σειρά τους φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς ή αυτοφωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται.

Λειτουργία των κυτταροπλασματικών κινασών της τυροσίνης

Παρόμοια με τη διαδικασία ενεργοποίησης της καταλυτικής δράσης των RPTKs, γίνεται και η ενεργοποίηση των NRPTKs. Η φωσφορυλίωση των τυροσινών τους γίνεται με:

- α) *cis* ή *trans* αυτοφωσφορυλίωση τους
- β) φωσφορυλίωση από άλλη κινάση της τυροσίνης.

Η μέγιστη καταλυτική τους δράση ή η επαναφορά της δράσης τους σε βασικό επίπεδο γίνεται με τα επίπεδα φωσφορυλίωσης, ποσοτικά ή δομικά, συγκεκριμένων τυροσινών τους.

Κινάσες της τυροσίνης και καρκίνος

Οι κινάσες της τυροσίνης αποτελούν συνήθως πιο συχνούς στόχους λειτουργικών απορυσ-

μίσεων που οδηγούν στην ογκογένεση, σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες¹⁹ δίνοντας έμφαση στην ιδιαίτερα σημαντική λειτουργία τους. Τα ένζυμα αυτά διαθέτουν πολύ ανεπτυγμένους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησης, που παρουσιάζονται δυσλειτουργικοί σε καρκινικές καταστάσεις. Για την κατανόηση της διαδικασίας της ογκογένεσης είναι σημαντικό να εξετάζονται όλοι οι τρόποι που διαταράσσουν αυτούς τους φυσιολογικούς μηχανισμούς και όχι μόνο οι μεταλλάξεις σε γενετικό επίπεδο. Η ικανότητα αυτό-σύνθεσης αυξητικών παραγόντων από καρκινικά κύτταρα για παράδειγμα αποτελεί ένα μη γενετικό μηχανισμό. Οι κινάσες της tyροσίνης που ανήκουν στην κατηγορία των υποδοχέων θα ανταποκριθούν στους αυξητικούς αυτούς παράγοντες δημιουργώντας μία θετική περιοχή ανάδρασης, τη λεγόμενη αυτοκρινή διέγερση²⁰. Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διεγείρουν τα γειτονικά τους φυσιολογικά κύτταρα να παράγουν αυξητικούς παράγοντες, το λεγόμενο παρακρινές σύστημα. Η 'συνεργασία' μεταξύ των καρκινικών και των γειτονικών τους φυσιολογικών κυττάρων έχει αποδειχθεί απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου²¹⁻²².

Όσον αφορά στο γενετικό επίπεδο, σωματικές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές και δομικές αναδιατάξεις που οδηγούν στην υπερέκφραση, υποέκφραση, μόνιμη ενεργοποίηση/απενεργοποίηση πολλών PTKs, είναι ικανές να οδηγήσουν στην ογκογένεση. Από τα περίπου 30 κατασταλτικά γονίδια του όγκου και τα περισσότερα από 100 ογκογονίδια που έχουν αναγνωριστεί μέχρι τώρα² μεγάλο μέρος των ομάδων των PTKs, περίπου 19, ανήκουν στην κατηγορία των δευτέρων²³. Τέσσερις είναι οι βασικοί τρόποι μετάλλαξης των PTKs που οδηγούν στην απορύθμισή τους και σε πιθανή ογκογένεση:

- α)** Ενσωμάτωση ιϊκού γενετικού υλικού σε ευκαρυωτικό. Το κομμάτι του δεύτερου αντιστοιχεί σε PTK και ονομάζεται πρωτο-ογκογονίδιο. Οι αλλαγές που προκαλούνται στο γενετικό υλικό του ξενιστή είναι ικανές να οδηγήσουν στην δημιουργία ενός ογκογονιδίου.
- β)** Γονιδιακές αναδιατάξεις, όπως χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, μπορούν να οδηγήσουν σε ογκοπρωτεΐνες σύντηξης που εμπεριέχουν την καταλυτική περιοχή μιας PTK.
- γ)** Μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερλειτουργία (gain of function) ή μεταλλάξεις εξαλείψεως πολλών PTKs.
- δ)** Υπερέκφραση, από γονιδιακές επεκτάσεις, των PTKs.

Διατάραξη των υποδοχέων κινασών της tyροσίνης οδηγεί στην αυτό-επάρκεια των καρκινικών κυττάρων στα αυξητικά σήματα. Οι υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs/erbBs), (Σχήμα 1) που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, υπερεκφράζονται²⁴ ή παρουσιάζονται διαρκώς ενεργοί λόγω χιμαιρισμού²⁵ σε πολλές περιπτώσεις συμπαγών νεοπλασιών όπως του στομάχου του εγκεφάλου του πνεύμονα και του μαστού. Παράλληλα, μεταγωγή σήματος ανεξαρτήτου προσδέματος υφίσταται δια μέσου των EGFRs. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις εξαλείψεως του EGFR, που οδηγεί στην αποκοπή της περιοχής της κινάσης, τον καθιστά μόνιμα ενεργοποιημένο²⁰. Επιπρόσθετα, στην αποφυγή της τελικής διαφοροποίησης καθώς και της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων εμπλέκονται κυτταροπλασματικές κινάσες της tyροσίνης. Για παράδειγμα, στο 90% όλων των περιπτώσεων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και σε πολλές περιπτώσεις οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας ανιχνεύεται η χιμαιρική πρωτεΐνη bcr/abl, με διαρκώς ενεργή την Abl κινάση. Η bcr/abl φαίνεται να αναστέλλει την απόπτωση²⁶ ενώ η αναστολή της στα κύτταρα χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας K562 τα οδηγεί στην απόπτωση και επάγει τη διαφοροποίησή τους σε ερυθροβλάστες²⁷.

Οι κυτταροπλασματικές κινάσες της tyροσίνης Src μετάγουν σήματα πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης, επιβίωσης²⁸ κλπ. Οι κινάσες αυτές βρίσκονται συχνά υπερενεργοποιημένες ή/και υπερεκφρασμένες σε κακοήθειες²⁹ και εμπλέκονται στην αυτό-επάρκεια αυξητικών σημάτων, στην αποφυγή απόπτωσης και στη δυνατότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η ενεργοποίησή τους σχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό και το βαθμό κακοήθειας³⁰⁻³¹, ενώ ενοχοποιούνται για την ορμονοεξαρτώμενη ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού³². Η έκφρασή τους βρέθηκε αυξημένη και σε καρκίνο του πνεύμονος³³, των ωοθηκών³⁴ του οισοφάγου³⁵ και του στομάχου³⁶. Σημαντική είναι η επίδρασή της src κινάσης στην αναστολή της απόπτωσης, δια μέσου του μονοπατιού της κινάσης PKB³⁷. Αυξημένη συγκέντρωση ή δράση πολλών φωσφατασών εμπλέκονται με την απορύθμιση της³⁸.

Η ομάδα των υποδοχέων κινασών της tyροσίνης του αυξητικού παράγοντα των αγγειακών ενδοθηλίων (VEGF-R) εμπλέκεται με τις αγγειογενετικές ικανότητες της κακοήθειας. Η σύνδεση του VEGF σε αυτούς διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ένα βήμα απα-

ραίτητο στη διαδικασία της αγγειογένεσης³⁹. Η έκφραση του υποδοχέα Fik-1/KDR της ομάδας έχει βρεθεί αυξημένη σε καρκίνο του παχέος εντέρου⁴⁰, σε γλοιώματα⁴¹ και σε άλλες περιπτώσεις. Η έκφραση του υποδοχέα αυτού βρέθηκε αυξημένη στα ενδοθηλιακά κύτταρα των όγκων και όχι στα καρκινικά κύτταρα, τα οποία εξέφραζαν μόνο τον VEGF, χαρακτηριστικό παρακρινικής δράσης.

Οι ομάδες των υποδοχέων κινασών της τυροσίνης των αυξητικών παραγόντων των αιμοπεταλίων (PDGF-R) και των ινοβλαστών (FGF-R), που επάγουν τον πολλαπλασιασμό και την κυτταρική μετακίνηση⁴²⁻⁴³ έχουν εμπλακεί με το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Οι PDGFRs εκφράζονται σε νεοπλάσματα ωοθηκών⁴⁴ και σε κακοήγη γλοιώματα⁴⁵. Ο c-kit (μέλος των PDGFRs), βρίσκεται υπερεκφρασμένος σε μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, σε μελάνωμα, στους στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού (GISTs) και στα αδενοκυστικά καρκινώματα⁴⁶. Οι FGFRs φαίνεται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Τα γονίδια των FGFR1 και FGFR4 παρουσιάζονται ενισχυμένα σε 20% και 30% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού αντίστοιχα⁴⁷⁻⁴⁸, ενώ μεταλλάξεις του FGFR3, που καθιστούν τον υποδοχέα συνεχώς ενεργό, ανιχνεύονται σε σημαντικό ποσοστό των καρκίνων του τραχήλου της μήτρας και της ουροδόχου κύστεως⁴⁹. Παράλληλα, χρωμοσωμικές μεταθέσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του FGFR1 ευθύνονται για περιπτώσεις λευχαιμιών/λεμφωμάτων⁵⁰.

Syk κινάση της τυροσίνης

Η κυτταροπλασματική κινάση της Τυροσίνης Syk⁵¹ (Spleen Tyrosine Kinase) ανήκει στην οικογένεια των κινασών Syk (Syk και Zap70 κινάσες). Ένα μικρότερο κομμάτι, προερχόμενο από εναλλασσόμενο μάτισμα της Syk, βρέθηκε σε φυσιολογικά αλλά και καρκινικά κύτταρα⁵². Η Syk B είναι μικρότερης αποδοτικότητας όσον αφορά τη δράση της⁵². Στη Syk βρίσκονται δύο SH2 περιοχές και μία καρβοξυτελική περιοχή κινάσης. Η καθεμιά περιοχή SH2 περιέχει μία κοιλότητα πρόσδεσης (binding pocket) που δεσμεύεται σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες. Ανάμεσα σε καθεμιά περιοχή SH2 και στην περιοχή της κινάσης υπάρχουν δύο εσωτερικές περιοχές (interdomains) A και B. Δέκα θέσεις τυροσινικής αυτοφωσφορυλίωσης βρίσκονται στο μόριό της⁵³.

Η κυτταροπλασματική κινάση Syk απαντάται σε όλα τα κύτταρα του άνοσο-αιμοποιητικού συστή-

ματος που περιλαμβάνει τα B και T λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα, τα βασεόφιλα κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια και τα κύτταρα φυσικούς φονιάδες. Το εσωτερικό τμήμα όλων των υποδοχέων των παραπάνω κυττάρων περιέχει τη συντηρημένη περιοχή ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), με δύο τυροσίνες. Η Syk είναι από τις πρώτες κινάσες που, πολύ γρήγορα, προσδένεται μέσω των SH2 περιοχών της, στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες των άνοσο-υποδοχέων, δέσμευση που προκαλεί την ενεργοποίησή της. Λόγω της θέσης της, πολύ ψηλά, στα μονοπάτια μετάδοσης σήματος ο ρόλος της Syk στα κύτταρα του άνοσο-αιμοποιητικού συστήματος είναι πολύπλευρος.

Η Syk επάγει τη διαφοροποίηση και την ωρίμανση των B κυττάρων⁵⁴. Επίσης, επάγει την κλωνική επέκταση και την επάνοδο τους στο κυκλοφορικό σύστημα⁵⁵ ενώ εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής δομής τους⁵⁶. Στα T κύτταρα η Syk προάγει τη θετική επιλογή⁵⁷ και τη διαφοροποίησή τους⁵⁸. Παράλληλα, η Syk θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση των NK (natural killer – φυσικοί φονιάδες) κυττάρων. Η έλλειψη της Syk στα NK κύτταρα επηρεάζει αρνητικά την εξαρτώμενη από αντίσωμα κυτταροτοξικότητά τους⁵⁹. Ο ρόλος της Syk είναι πολύ σημαντικός για την ενεργοποίηση και λειτουργία των ουδετερόφιλων, βασεόφιλων κυττάρων, αιμοπεταλίων και μακροφάγων⁶⁰⁻⁶³. Ατελής είναι η φαγοκυττάρωση των μακροφάγων, ενώ καμία ανταπόκριση στο κολλαγόνο δεν έχουν τα αιμοπετάλια που δεν εκφράζουν Syk. Στα βασεόφιλα κύτταρα η Syk εμπλέκεται στην αποκοκκίωση, στην παραγωγή κυτοκινών και στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

Αρνητική ρύθμιση της Syk προκαλεί η δέσμευση της πρωτεΐνης Cbl (Casitas B-lineage lymphoma protein) στο μόριό της. Η Cbl φαίνεται να αποτελεί την E3 λιγάση της Syk που επάγει την ουβικιτινυλίωσή και την αποικοδόμησή της από το πρωτεόσωμα⁶⁴. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρεμπόδιση της μεταγωγής σήματος μέσω του υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων (BCR) από τον ιό Epstein-Barr, διαμέσου της αποικοδόμησης της Syk. Η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη LMP2A του ιού έχει πολλαπλές τυροσίνες στις οποίες δεσμεύεται η Syk μέσω SH2 αλληλεπιδράσεων. Παράλληλα, διαθέτει περιοχές που δεσμεύουν και E3 λιγάσες με αποτέλεσμα να ουβικιτινυλιώνουν την Syk και να την οδηγούν στην αποικοδόμηση, αναστέλλοντας έτσι τη μεταγωγή του σήματος⁶⁵.

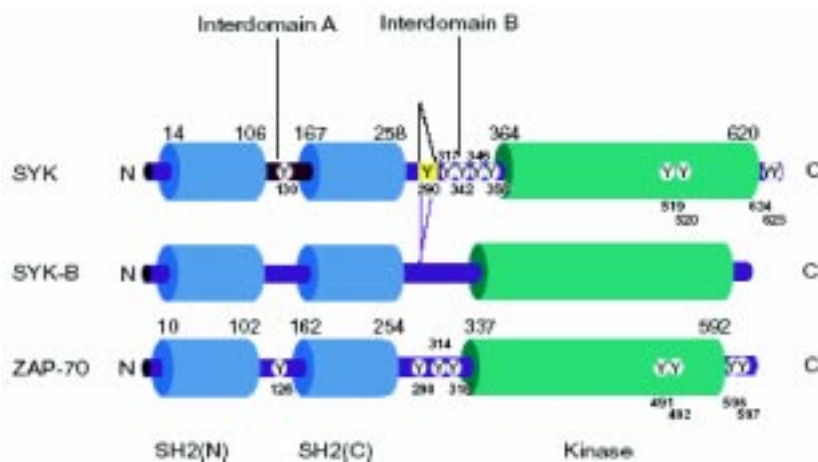
Syk Κινάση και Καρκίνος

Η εμπλοκή της κινάσης Syk στον καρκίνο ξεκίνησε το 2000 όπου προτάθηκε ως πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο του καρκίνου του μαστού³. Η έκφρασή της βρέθηκε φυσιολογική στα επιθηλιακά κύτταρα, στο φυσιολογικό μαστό, σε καλοήθεις αλλοιώσεις μαστού, ακόμη και σε χαμηλού δυναμικού κακοήθειας ανθρωπίνων καρκινικών κυτταρικών σειρών μαστού (όπως MCF7, BT474). Αντίθετα, από πειράματα υβριδισμού *in situ* φάνηκε ότι η έκφρασή της μειωνόταν σημαντικά ή και εξαφανιζόταν σε ιστό διηθητικού καρκινώματος μαστού. Παράλληλα, η Syk εξαφανιζόταν και σε υψηλού βαθμού διηθητικότητας κυτταρικές σειρές καρκινώματος μαστού (όπως MDA-MB-231, MDA-MB-234). Από πειράματα επιμόλυνσης αυθιμικών ποντικών βρέθηκε ότι αυτά που επιμολύνθηκαν με τον Syk-αρνητικό φορέα δημιούργησαν όγκους μαστού 5 φορές μεγαλύτερους από αυτά με τον Syk-θετικό φορέα ενώ ανέπτυξαν και πολλαπλές μεταστατικές αποικίες στον πνεύμονα σε σύγκριση με αυτά του Syk-θετικού φορέα στα οποία βρέθηκε μόνο μία. *In vitro* πειράματα καλλιέργειας κυττάρων μαστού έδειξαν ότι σε αυτά που η Syk εκφραζόταν, εμπόδιζε την ανάπτυξη τους ανεξαρτήτως προσφύσεων και τη δημιουργία διηθητικών αποικιών σε σύγκριση με αυτά που δεν εξέφραζαν Syk.

Η ογκοκατασταλτική ιδιότητα της Syk αποδείχθηκε και από άλλες μελέτες. Δείγματα από 90 ασθενείς με καρκίνο μαστού απομονώθηκαν από μαστεκτομή και εξετάστηκαν για την έκφραση Syk

με real time Αντίστροφη Μεταγραφή-Αντίδραση της Αλυσωτής Πολυμεράσης (Reverse-Transcription Polymerase Chain reaction). Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι μειωμένη έκφραση της Syk στον αρχικό όγκο συνδέεται με σημαντικά αυξημένες πιθανότητες ανάπτυξης μεταστάσεων με $p=0.0003$. Στη μελέτη αυτή η μειωμένη Syk θεωρήθηκε ως κακός προγνωστικός δείκτης για τον καρκίνο του μαστού⁴. Παράλληλα, μειωμένη έκφραση της Syk, σε επίπεδο πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε στο 70% ($n=53$) των ασθενών με διηθητικό καρκίνωμα μαστού⁵. Επιπρόσθετα, *in situ* πειράματα υβριδοποίησης απέδειξαν την σταδιακή μείωση της έκφρασης της Syk από το *in situ* στο διηθητικό καρκίνωμα μαστού από 52 δείγματα ασθενών που εξετάστηκαν⁶ με $p < 0,0001$. Η μείωση της έκφρασης της syk παραλληλίστηκε με την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με βάση την έκφραση της Ki-67 πρωτεΐνης. Η σχέση μεταξύ της μείωσης της έκφρασης της Syk και της αύξησης της Ki-67 βρέθηκε στατιστικά σημαντική με $r=0,7435$. Στη μελέτη αυτή η syk προτάθηκε ως κατασταλτικό γονίδιο της ανάπτυξης του όγκου, διαμέσου του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με την πιθανή ρύθμιση της κινάσης Src⁶.

Υπερμεθυλίωση του γονιδίου της Syk που οδηγεί στην μειωμένη έκφρασή της, βρέθηκε σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού καθώς και σε αντίστοιχο ιστό⁷⁻⁸. Παράλληλα, 61 δείγματα ασθενών με καρκίνωμα του στομάχου εξετάστηκαν για πιθανή μεθυλίωση του γονιδίου της Syk. Στα 31 από αυτά το γονίδιο βρέθηκε μεθυλιωμένο ενώ, οι



Σχήμα 3. Η οικογένεια των SYK κινασών. Τα τρία μέλη της οικογένειας, Syk, syk-B και ZAP-70 φαίνονται. Η syk-B προέρχεται από εναλλασσόμενο μάτισμα της Syk και είναι κατά 23 αμινοξέα λιγότερη. Απεικονίζονται οι συντηρημένες δομικές περιοχές SH2 και κινάσης, καθώς και οι θέσεις της τυροσινικής φωσφορυλίωσης.

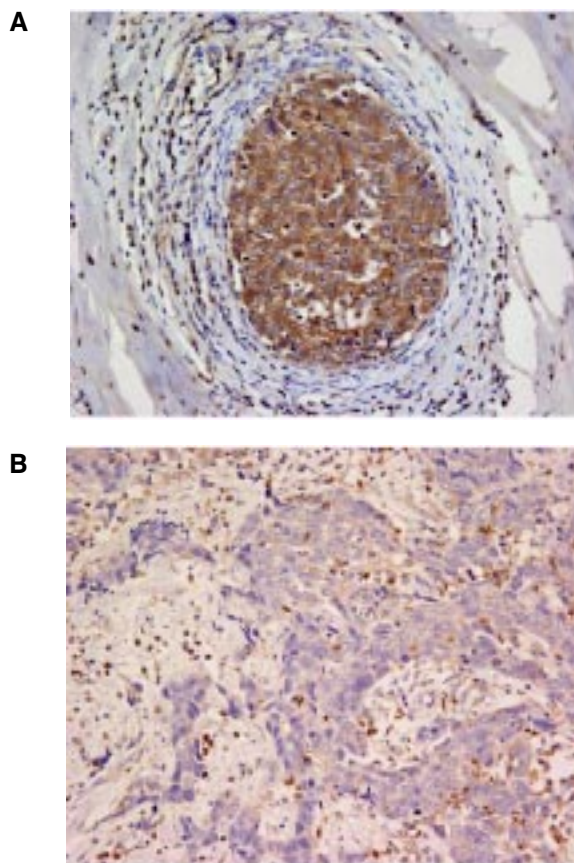
17 ασθενείς είχαν ήδη αναπτύξει μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Και πάλι η Syk θεωρήθηκε σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο⁹. Αναστολή της μεθυλίωσης του γονιδίου της syk και συνεπώς, αποκατάσταση της έκφρασής της εμπόδιζε κατά 40-70% την διηθητικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού, όπως φάνηκε από *in vitro* πειράματα προσδιορισμού χημειο-εισβολής. Το φαινόμενο αυτό αντιστράφηκε όταν τα κύτταρα επωάστηκαν με τον ειδικό αναστολέα της syk πικεατανόλη⁸.

Τέλος, αποδείχθηκε πως υπάρχει σχέση μεταξύ της Syk και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR. Υπερέκφραση του EGFR, όπως έχει προαναφερθεί, έχει βρεθεί πολλές φορές να σχετίζεται με ανθρώπινες κακοήθειες όπως, καρκινώματα μαστού, πνευμόνων, εγκέφαλου, παχέος εντέρου ενώ γενικά αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη⁶⁶. Η Syk βρέθηκε αρνητικός-ρυθμιστής του EGFR σε ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά μαστού⁶⁷. Κατά τη μελέτη αυτή, η Syk παρεμβαίνει στη δράση του EGFR και άλλων μορίων που μετέχουν στο μεταγωγικό του μονοπάτι, ελαττώνοντας τα επίπεδα της φωσφορυλίωσής τους και συνεπώς τη δράση τους. Παρεμπόδιση της έκφρασής της στα ίδια κύτταρα αύξησε την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και την φωσφορυλίωση / δραστικότητα του EGFR μετά τη δέσμευση του προσδέματος σε αυτόν.

Μελέτη έκφρασης της Syk σε ασθενείς με καρκίνο μαστού

Δείγματα από 41 ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο του μαστού (τομές παραφίνης), μελετήθηκαν για τα επίπεδα έκφρασης της κυτταροπλασματικής κινάσης Syk με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Όλα τα καρκινώματα των υπό εξέταση ασθενών ανήκουν στην κατηγορία των διηθητικών, στον τύπο του διηθητικού πορογενούς (*invasive ductal*) ή του διηθητικού λοβιακού (*invasive lobular*) καρκινώματος. Στα *in situ* καρκινώματα γενικά παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της syk προσεγγίζει τα επίπεδα έκφρασης αυτής του φυσιολογικού μαστού. Παράλληλα, σε αρκετές περιπτώσεις η έκφραση της syk παρουσιάστηκε μεγαλύτερη σε *in situ* καρκινικό ιστό μαστού σε σχέση με τον φυσιολογικό. Σε όλα τα διηθητικά καρκινώματα που εξετάστηκαν (πορογενή ή λοβιακά) παρατηρήθηκε ασθενής έκφραση της syk (Σχήμα 4).

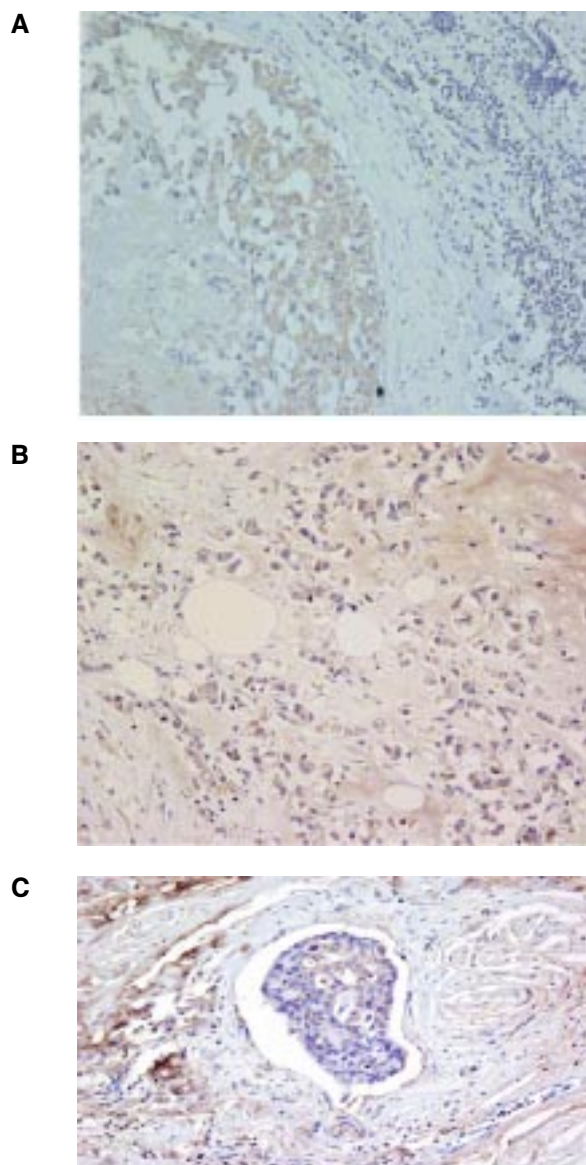
Στους λίγους ασθενείς που παρουσίασαν ενδοαγγειακά έμβολα (πιθανή μεταστατική νόσος), η έκφραση της syk σε αυτά ήταν αρνητική. Η



Σχήμα 4. Μελέτη της έκφρασης της Syk με ανοσοϊστοχημεία. Καρκίνωμα μαστού *in situ* και διηθητικό καρκίνωμα μαστού του ίδιου ασθενούς στις εικόνες A και B αντίστοιχα. Έντονη έκφραση της syk 3+ (x 400) στον *in situ* και ασθενής έκφραση της syk 1+ (x 400) στο διηθητικό ιστό.

ύπαρξη ενδοαγγειακών εμβόλων αποτελεί σημαντική ένδειξη της επέκτασης του όγκου, διαμέσου της αιματογενούς διασποράς, για τη μετανάστευση του σε άλλα όργανα. Η σταδιακή μείωση της έκφρασης της syk από το *in situ* στο διηθητικό καρκίνωμα και η εξαφάνισή της στα ενδοαγγειακά έμβολα ήταν χαρακτηριστική σε όλους τους ασθενείς που εμφάνισαν έμβολα (Σχήμα 5). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την σημαντική λειτουργία της, στην ελεγχόμενη επέκταση των καρκινικών κυττάρων. Η προσπέλαση αυτού του αρνητικού μηχανισμού ρύθμισης από τον όγκο ίσως αποτελεί και ένα από τα ρυθμο-καθοριστικά βήματα στην ανάπτυξη του που έγκειται στην υπερνίκηση ενός ακόμη εμποδίου, αυτού της syk κινάσης.

Διερευνήθηκε η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της Syk στους 41 ασθενείς υπό μελέτη. Δε φάνηκε



Σχήμα 5. Μελέτη της έκφρασης της Syk με ανοσοϊστοχημεία. Καρκίνωμα μαστού *in situ* στην εικόνα A, διηθητικό στην εικόνα B και καρκινικό ενδοαγγειακό έμβολο στην εικόνα C του ίδιου ασθενούς. Μέτρια έκφραση της syk 2+ (x 400) στον *in situ*, ασθενής έκφραση της syk 1+ (x 400) στον διηθητικό ιστό και αρνητική έκφραση syk (0) (x 400) στο ενδοαγγειακό έμβολο.

να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της έκφρασης της syk και της ύπαρξης ή μη λεμφαδενικών μεταστάσεων. Ο μέσος όρος της έκφρασης της syk για θετικούς λεμφαδένες βρέθηκε 1,9 και για αρνητικούς 1,875 αντίστοιχα. Για τη διαφορά της έκφρασής της μεταξύ νόσου με ή χωρίς θετικούς λεμφαδένες η τιμή p βρέθηκε να

είναι 0,46 στατιστικά-μη σημαντική ενώ, και σε όλες τις επιμέρους συγκρίσεις, για αρνητικούς λεμφαδένες, 1-4 λεμφαδένες, και >4 λεμφαδένες, η τιμή p βρέθηκε να κυμαίνεται περίπου στα ίδια όρια (0.4-0.5). Το ίδιο φάνηκε να ισχύει και σε άλλη, μικρή βέβαια ομάδα ασθενών (n=10) που μελετήθηκε.

Φαίνεται πως η ύπαρξη ή όχι λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της syk, στα δείγματα ασθενών που εξετάστηκαν. Ίσως, άλλα σημεία-στόχοι μεταστάσεων του καρκίνου του μαστού να εμπλέκονται με τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης syk. Πειράματα σε ποντίκια³ φανέρωσαν την ύπαρξη μεταστατικών αποικιών στον πνεύμονα, σε αυτά όπου η syk δεν εκφραζόταν. Ωστόσο, η λεμφαγγειακή / λεμφαδενική μετάσταση από την μία και η αιματογενής διασπορά από την άλλη, πιθανότατα αποτελούν δύο τελείως διαφορετικές διεργασίες που χρησιμοποιούν διαφορετικούς δρόμους επαγωγής της αγγειογένεσης / λεμφαγγειογένεσης και διαφορετική έκφραση κυτοκινών / μορίων προσκόλλησης για την μετακίνηση των κυττάρων. Είναι πιθανό η syk να σχετίζεται κύρια με την αιματογενή και όχι με τη λεμφαδενική μετάσταση. Αυτό ίσως επιβεβαιώνεται και από τα επίπεδα έκφρασης της syk σε σχέση με αυτά του υποδοχέα των κυτοκινών CXCR4 (σε επίπεδο mRNA), σε κάποια άλλα, λίγα περιστατικά, που εξετάστηκαν (n=8). Τα δείγματα με υψηλότερη έκφραση syk βρέθηκε να εκφράζουν χαμηλότερα τον CXCR4 ενώ η εμπλοκή του στην ανάπτυξη μεταστάσεων, διαμέσου της αιματογενούς διασποράς, έχει αποδειχθεί⁶⁸.

Συμπεράσματα

Οι κινάσες της τυροσίνης αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της μεταφοράς του ενδοκυττάρου σήματος και αποτελούν συχνούς στόχους λειτουργικών απορυθμίσεων που οδηγούν στη δημιουργία ενός καρκινώματος. Δυσλειτουργία πολλών υποδοχέων κινάσων της τυροσίνης έχει εμπλακεί με την αυτοεπάρκεια των καρκινικών κυττάρων σε αυξητικά σήματα, με τις αγγειογενετικές ικανότητες και τη μεταστατικότητα του όγκου ενώ, κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης εμπλέκονται στην αποφυγή τελικής διαφοροποίησης και απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων, στη δυνατότητα μετάστασης και στον αυξημένο πολλαπλασιασμό τους. Γι' αυτό το λόγο μεγάλος αριθμός τους έχει αναγνωριστεί να έχει ιδιότητες ογκογονιδίου και σε ορισμένες περι-

πτώσεις, ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Η κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης syk αποτελεί ένα από τα λίγα παραδείγματα ογκοκατασταλτικού γονιδίου που έχουν βρεθεί. Ο πιθανός ρόλος της τυροσίνης στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού θέτει το ερώτημα της επίδρασής της σε μεταγωγικά μονοπάτια

ως σημαντικό στοιχείο στην έρευνα της νόσου. Η επιλογή επαρκούς αριθμού ασθενών και η διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης της syk προτείνονται ως στόχοι της έρευνας και αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού και ίσως και άλλων τύπων ανθρώπινων καρκινωμάτων.

ABSTRACT

K-REPANA, K. PAPAISIS, P. FOUKAS: **Protein Tyrosine Kinases and Cancer. Focus on Syk**

Protein Tyrosine Kinases are important regulators of the signal transduction pathways from the exterior to the interior of cells, mediating functions like cellular proliferation, differentiation movement and apoptosis. The balance between the mechanisms that induce the activity of tyrosine kinases and those that repress them has proven to be very important for body homeostasis. Phosphorylation-dephosphorylation are the selected mechanisms of control of tyrosine kinases because they are fast, reversible while, they change effectively the tertiary structure of a protein. Tyrosine Kinases are targeted much more frequently by genetic mutations or/and functional deregulations leading to malignant transformation. This is why a large fraction of those has proven to act like an oncogene or, in certain cases, as a tumor suppressor gene. Syk tyrosine kinase comprises one of the few examples of a possible tumor suppressor gene of breast cancer. **Key words:** Tyrosine Kinase, Phosphorylation, Tumor Suppressor Gene, Syk. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):229-241, 2005.**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Schlessinger J and Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 1992, 9: 383-391.
- Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R and Stratton MR, Cancer and genomics. *Nature* 2001, 409: 850-852.
- Coopman PJ, Do MT, Barth M, Bowden ET, Hayes AJ, Basyuk E, Blancato JK, Vezza PR, McLeskey SW, Mangeat PH and Mueller SC, The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 2000, 406: 742-747.
- Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, Zhang Z and Fuji Y. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Letters* 2003, 189: 97-102.
- Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin SO, Vogel WF, Landberg G and Andersson T. Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clinical Cancer Research* 2005, 11: 520-528.
- Moroni M, Soldatenkov V, Zhang L, Zhang Y, Stoica G, Gehan E, Rashidi B, Singh B, Ozdemirli M and Mueller S. Progressive Loss of Syk and Abnormal Proliferation in Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 2004, 64: 7346-7354.
- Yuan Y, Mendez R, Sahin A and Le Dai J. Hypermethylation Leads to Silencing of the SYK Gene in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 2001, 61: 5558-5561.
- Yuan Y, Liu H, Sahin A and Le Dai J. Reactivation of Syk expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness. *Int J Cancer* 2005, 113: 654-659.
- Wang S, Ding Y, Chen G, Xia J and Wu Z. Hypermethylation of Syk gene in promoter region associated with oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004, 10: 1815-1818.
- Robinson DR, Wu YM and Lin SF. The protein Tyrosine Kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000, 19: 5548-5557
- Kuriyan J and Cowburn D. Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1997, 26: 259-288.
- Lemmon MA and Ferguson KM. Pleckstrin ho-

- mology domains. *Curr Top Microbiol. Imuunol* 1998, 228: 39-74.
13. Kennelly PJ. Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J* 2003, 370: 373-389.
 14. Tonks NK and Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 1996, 87: 365-368.
 15. Hubbard SR, Mohammadi M and Schlessinger J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases *J Biol Chem* 1998, 273: 11987-11990.
 16. Favelyukis S, Till JH, Hubbard SR and Miller WT. Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat Struct Biol* 2001, 8: 1058-1063.
 17. Nada S, Okada M, MacAuley A, Cooper JA and Nakagawa H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src *Nature* 1991, 351: 69-72.
 18. Ullrich A and Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990, 61: 203-212.
 19. Hunter T. The Croonian Lecture, 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil Trans R Soc Lond* 1998, B 353: 583-605.
 20. Fedi P, Tronick SR and Aaronson SA. 'Growth factors. Cancer Medicine', ed. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW and Weichselbaum RR (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 1997, 41-64.
 21. Skobe M and Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 1050-1055.
 22. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S and Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999, 59: 5002-5011.
 23. Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell* 2000, 100: 113-127.
 24. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987: 235, 177-182.
 25. Harari D. and Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000, 19: 6102-6114.
 26. Fernandes RS, Gorman AM, McGahon A, Lawlor M, McCann S, Cotter TG. The repression of apoptosis by activated abl oncogenes in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1996, 10 (Suppl. 2), 17-21.
 27. Deora AB, Miranda MB, Rao SG. Down-modulation of p210bcr/abl induces apoptosis/differentiation in K562 leukemic blast cells. *Tumori* 1997, 83: 756-761.
 28. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13: 513-609.
 29. Biscardi JS, Tice DA, Parsons SJ. c-Src, receptor tyrosine kinases, and human cancer. *Adv Cancer Res* 1999, 76: 61-119.
 30. Mao W, Irby R, Coppola D, Fu L, Wloch M, Turner J, Yu H, Garcia R, Jove R, Yeatman TJ, Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells (8)
 31. Cartwright C, Coad C, Egbert B. Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia of ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 1994, 93: 509-515.
 32. Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO J.* 1999, 18: 2500-2510.
 33. Mazurekno NN, Kogan EA, Zborovskaya IB, Kiseljov FL. Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. *Eur J Cancer* 1992, 28: 372-377.
 34. Wiener JR, Nakano K, Kruzelock RP, Bucana CD, Bast Jr RC, Gallick GE. Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model. *Clin Cancer Res* 1999, 5: 2164-2170.
 35. Kumble S, Omary MB, Cartwright CA, Triadafilopoulos G. Src activation in malignant and premalignant epithelia of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1997, 112: 348-356.
 36. Takeshima E, Hamaguchi M, Watanabe T, Akiyama S, Kataoka M, Ohnishi Y, Xiao HY, Nagai Y, Takagi H. Aberrant elevation of tyrosine-specific phosphorylation in human gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1991, 82: 1428-1435.
 37. Schlessinger J. New roles for src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 2000, 100: 293-296.
 38. Bjorge JD, Jakymiw A and Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*, 2000, 19: 5620-5635.
 39. Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1995, 36: 127-137.
 40. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates

- with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995, 55: 3964-3968.
41. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W: Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992, 359: 845-848.
 42. Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994, 269: 32023-32026.
 43. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987, 235: 442-447.
 44. Henriksen R, Funa K, Wilander E, Backstrom T, Ridderheim M, Oberg K. Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 1993, 53: 4550-4554.
 45. Smits A, Funa K. Platelet-derived growth factor (PDGF) in primary brain tumours of neuroglial origin. *Histol Histopathol* 1998, 13: 511-520.
 46. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumors. *Ann. Med.* 2001, 33: 451-455. (a)
 47. Theillet C, Adelaide J, Louason G, Bonnet-Dorion F, Jacquemier J, Adnane J, Longy M, Katsaros D, Sismondi P, Gaudray P et al. FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1993, 7: 219-226.
 48. Penault-Llorca F, Bertucci F, Adelaide J, Parc P, Coulier F, Jacquemier J, Birnbaum D, deLapeyriere O. Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer* 1995, 61: 170-176.
 49. Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervical carcinoma. *Nature Genet* 1999, 23: 18-20.
 50. Xiao S, Nalabolu SR, Aster JC, Ma J, Abruzzo L, Jaffe ES, Stone R, Weissman SM, Hudson TJ, Fletcher JA. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nature Genet* 1998, 18: 84-87.
 51. Taniguchi T, Kobayashi T, Kondo J, Takahashi K, Nakamura H, Suzuki J, Nagai K, Yamada T, Nakamura S and Yamamura H. Molecular cloning of a porcine syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high-susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 15790-15796.
 52. Latour S, Zhang J, Siraganian RP and Veillette A. A unique insert in the linker domain of syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *EMBO J* 1998, 17: 2584-2595.
 53. Furlong MT, Mahrenholz AM, Kim K, Ashendol CL, Harrison ML and Geahlen RL. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein tyrosine kinase syk. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1355: 177-190.
 54. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL and Tybulewicz VLJ. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase syk. *Nature* 1995, 378: 298-302.
 55. Cheng AM, Rowley B, Pao W, Hayday A, Bolen JB and Pawson T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995, 378: 303-306.
 56. Faruki S, Geahlen RL and Asai DJ. Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Science* 2000, 113: 2557-2565.
 57. Cheng AM, Negishi I, Anderson SJ, Chan AC, Bolen JB, Loh DY and Pawson T. The Syk and Zap-70 SH2-containing tyrosine kinases are implicated in pre-T cell receptor signalling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94: 9797-9801.
 58. Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP and Tybulewicz VLJ. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 2000, 21: 148-154.
 59. Brumbaugh K, Binstadt BA, Billadeau DD, Schoon RA, Dick CJ, Ten RM and Leibson PJ. Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1997, 186: 1965-1974.
 60. Kiefer F, Brumell J, Al-Alawi N, Latour S, Cheng A, Veillette A, Grinstein S and Pawson T. The syk protein tyrosine kinase is essential for Fcγ receptor signalling in macrophages and neutrophils. *Mol Cell Biol* 1998, 18: 4209-4220.
 61. Zhang J, Berenstein EH, Evans RL and Siraganian RP. Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a syk-negative variant of rat basophilic leukaemia RBL-2H3 cells. *J Exp Med* 1996, 184: 71-79.
 62. Poole A, Gibbins JM, Turner M, Van Vugt MJ, Van de Winkel JGJ, Saito T, Tybulewicz VLJ and Watson SP. The Fc receptor γ-chain and the tyrosine kinase syk are essential for activation and mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997, 16: 2333-2341.
 63. Crowley MT, Costello PS, Fitzer CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VLJ and De Franco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ

- receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997, 186: 1027-1039.
64. Rao N, Ghosh A, Ota S, Zhou P, Reddi AL, Hakezi K, Druker B, Wu J and Band H. The non-receptor tyrosine kinase syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation. *EMBO J* 2001, 20: 7085-7095.
65. Winberg G, Matskova L, Chen F, Plant P, Rotin D, Gish G, Ingham R, Ernberg I and Pawson T. Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr Virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 2000, 20: 8526-8535.
66. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F and Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19: 183-232.
67. Ruschel A and Ullrich A. Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells. *Cellular Signalling* 2004, 16: 1249-1261.
68. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Carton D, Buchanan E, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner N, Barrera J, Mohar A, Verastegui E, and Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410: 50-56.

Tamoxifen resistance: an old story with new implications

D. Iliopoulos^{1*}, A. Kouvats²

ABSTRACT

Tamoxifen is the only drug approved for use in breast cancer chemoprevention and it remains the number one choice of treatment for most women with estrogen receptor positive breast cancer. While tamoxifen has been available since the early '70s we still do not understand its mechanism of action and resistance. This is mainly due to the complexity of the estrogen receptor pathway. The mechanisms that membrane and intracellular estrogen receptors are involved in addition to the nuclear estrogen receptor pathway should be studied in more detail. Signaling pathways involving proteins, such as Akt, ErbB2, p38 and protein kinase A (PKA) seem to play an essential role in the tamoxifen effectiveness. New technologies such as proteomic analyses would help to find all the proteins involved in the tamoxifen effectiveness and create the tamoxifen protein network. This network will give the researchers the opportunity to find novel targets or even combinational therapies. **Key words:** breast cancer, estrogen receptor, tamoxifen resistance. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):242-251, 2005.**

Introduction

Tamoxifen, a selective estrogen receptor (ER) modulator, is the most used drug for the treatment of ER-positive breast cancer. Adjuvant therapy studies of tamoxifen show a 50% reduction in the odds recurrence and reduced mortality¹. Tamoxifen also provides temporary remissions in 40-50% of patients with metastatic disease, and it is effective in prevention². Although aromatase inhibitors may be slightly more effective than tamox-

ifen, it remains an important drug because of its documented benefits in sequence with these agents for adjuvant therapy and because it will continue to have a role in metastatic disease^{3,4}. Despite the obvious benefits of tamoxifen, as many as 40% of patients receiving adjuvant tamoxifen relapse and die from their disease. The biological mechanisms underlying *de novo* and acquired resistance to tamoxifen are therefore of considerable clinical significance. Better understanding of these mechanisms may suggest novel strategies to overcome tamoxifen resistance and make further improvements in breast cancer survival.

Mechanisms of Estrogen Receptor signaling: Genomic and Non-Genomic actions on target genes

The target of tamoxifen is the estrogen receptor alpha (ERα) and the levels of ERα expression

¹Comprehensive Cancer Center, School of Medicine, Ohio State University, Columbus, OH, USA, ²School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, GREECE. Correspondence: 410 W. 12th Ave, Rm 463, Wiseman Hall, Ohio State University, Columbus, OH, USA. Phone: +1-614-688-3317; fax: +1-614-292-3312; email: dimiliopou@yahoo.com. *D.I received a young investigator award in breast cancer research from the Breast Cancer Program of the US Department of Defense.

are the best predictor of benefit from tamoxifen. Therefore understanding the biology of the ER α is critical to understanding how resistance to tamoxifen may develop. Although the ER α signaling mechanism is studied for many years, only recently new mechanisms of ER α action are revealed.

Genomic classical mode of ER action

Estrogens are steroid hormones that regulate growth, differentiation and function in a broad range of target tissues in the human body. The biological effects of estrogens are mediated through estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β), which are members of a large superfamily of nuclear receptors. These receptors act as ligand-activated transcription factors. The **classical** mechanism of ER action involves estrogen binding to receptors in the nucleus, after which the receptors dimerize and bind to specific response elements known as estrogen response elements (EREs) located in the promoter of target genes⁵ (Figure 1A). The binding of ER to the ERE leads to alterations in transcription of estrogen regulated genes. Estrogen treatment in MCF7 breast cancer cells down-regulated most of the estrogen receptor genes⁶. These down-regulated genes were mainly transcriptional repressors and pro-apoptotic genes. On the other hand there was up-regulation of proliferation regulators including genes involved in cell cycle progression. The up-regulation is mediated by two distinct transactivation domains (AF-1 and AF-2). AF-1 activity is regulated by phosphorylation and is hormone independent, while AF-2 is integral to the ligand-binding domain and therefore is hormone-dependent. AF-1 and AF-2 act synergistically in most cells, but certain gene promoters can be independently transactivated by AF-1 or AF-2 alone^{7,8}. ER-mediated transcription is modulated by the presence of co-regulatory proteins which are recruited to and interact with promoter-bound receptor-ligand complexes⁹. Co-activators include the p160 family which stimulate ER activity via interaction with AF-2. The three members are the nuclear-receptor co-activator 1 (SRC1)¹⁰, TIF2¹¹ and AIB1^{12,13}. Other co-activators include the SWI/SNF complexes, CREB-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (PCAF)¹⁴. These proteins associate with each other and the general transcription machinery of the cell to form large complexes capable of synergistically activating estro-

gen-driven transcription. Co-repressors such as SMRT influence transcription at least in part by recruitment of histone-deacetylase inhibitors which lead to chromatin condensation and decreased rates of transcriptional initiation¹⁵.

Genomic non-classical mode of ER action

ERs can also regulate gene expression without interacting with DNA directly, via other transcription factors such as the Fos/Jun activating protein-1 (AP-1) complex¹⁶. This mechanism of ER action is called **non-classical** (Figure 1B). Around one third of the genes in humans that are regulated by ERs do not contain ERE-like sequences¹⁷. The molecular mechanisms by which ERs regulate transcription at alternative response elements are not fully understood, but are becoming increasingly clear. The interaction of ERs with the AP-1 transcription factor complex is the typical example of such ERE-independent genomic actions. Several genes are activated by 17 β -estradiol through the interaction of ERs with Fos and Jun proteins at AP-1 binding sites. Such genes include IGF-1¹⁸, collagenase¹⁹ and cyclin D1²⁰. Genes that contain GC rich promoter sequences are regulated in a similar manner through interaction of ERs with the Sp1 transcription factor²¹. Increasing number of genes is being found that are activated by estradiol through ER-Sp1 complexes, including c-fos and cyclin D1 genes. ERE-independent genomic actions that involve tethering of ERs to other DNA-binding transcription factors do not require an interaction between receptor and DNA, as is the case in the classical mechanism of ER action. However, the DNA-binding domain (DBD) of the receptors is frequently involved, although intact DNA binding activity is not required²². Mutational analysis has revealed specific residues within the second zinc finger structure of the ER β DBD that discriminate between the classical mechanism of ER action and the modulation of AP-1 and STAT5 activities through tethering²³.

Non-genomic mode of ER action

Recent data also indicate that cytoplasmic membrane ER activity may interact directly with key growth-factor dependent kinases, although the biological significance of these **non-genomic** effects of ER is not fully understood (Figure 1C). The non-genomic actions of estradiol that have been reported include the mobilization intracellu-

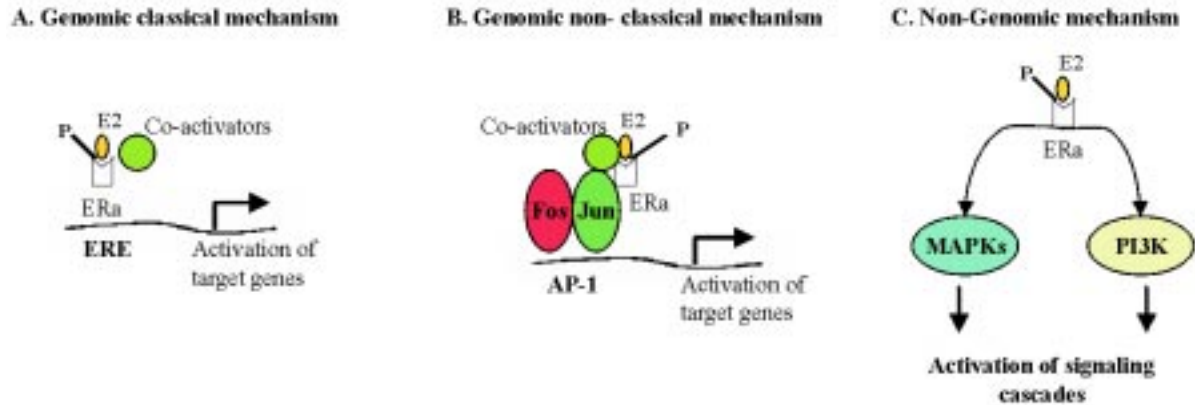


Figure 1

lar calcium²⁴ and the stimulation of adenylate cyclase activity and cAMP production²⁵. Activation of the MAP-kinase signaling pathway by 17 β -estradiol has been extensively studied in several cell types, including breast cancer cells²⁶. 17 β -estradiol also activates the PI3K signaling pathway in breast cancer cells²⁷. Some authors have suggested that the non-genomic actions of estrogens are mediated through a subpopulation of the classical ERs, ER α and ER β , that is located at the plasma membrane²⁸. In addition an isoform of ER α that is alternatively spliced and that has a truncated N-terminal domain has been identified in endothelial cells²⁹. ERs do not contain a transmembrane domain and the ability of ER α to associate with the plasma membrane may be due to palmitoylation of the receptor. Plasma membrane ER associate with a variety of proximal signaling molecules such as G proteins³⁰, Src-kinase and ras³¹, the p85 α regulatory subunit of PI3-kinase³². In addition, ER α activated by 17 β -estradiol activates the epidermal growth factor receptor (EGFR) by a mechanism that involves activation of G-proteins, Src-kinase and matrix metalloproteinases, leading to an increase in MAP-kinase and Akt activities³³.

Few months ago Revankar *et al* discovered a transmembrane intracellular estrogen receptor³⁴. GPR30, a G protein-coupled receptor, is localized to the endoplasmic reticulum and binds estrogen resulting in intracellular calcium mobilization and synthesis of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in the nucleus³⁴. It seems that mechanisms of estrogen-mediated cellular activation have become increasingly complex. The resolution of all these different mechanisms of action of ER will contribute into studying the different possible mecha-

nisms responsible for the tamoxifen resistance in breast cancer cells.

Mechanisms of tamoxifen resistance

1. Loss of estrogen receptors expression or function

The degree of ER transcription is a strong predictor of responses to tamoxifen and loss of ER expression could confer resistance to therapy. Lack of ER expression is the dominant mechanism of de novo resistance to tamoxifen with the majority of ER negative tumors not responding to tamoxifen³⁵. Patients whose tumors were treated with tamoxifen and responded prior to developing acquired resistance, frequently remained ER-positive. Although mutations in the ER which alter the effects of bound anti-estrogens can be generated in vitro, and can be detected in some resistant cell lines it is relatively uncommon to detect such mutations in patients. In addition to genetic changes, epigenetic changes such as DNA methylation may cause transcriptional inactivation of the ER gene³⁶. Re-activation of methylated ER using demethylating agents may be useful for restoring tamoxifen effectiveness (Figure 2- target 1).

Since loss of ER α is relatively uncommon as an acquired antiestrogen mechanism, it seems unlikely that many resistant tumors acquire a true ER α -/ER β + phenotype. If there is a role for ER β , it may be driven by changes in its expression level relative to ER α , since heterodimers are functionally important³⁷. When introduced into MDA-MB-231 (ER negative) breast cancer cells, ER β produced ligand-independent inhibition of proliferation whereas ER α -mediated effects are ligand-de-

pendent³⁸. Determining the relative importance of ER β expression in tamoxifen responsiveness is limited by the lack of adequate data regarding ER β protein expression in responsive and resistant breast tumors. However, more work is required to establish whether altered expression of ER β and its variants are important components of tamoxifen resistance.

2. Alterations in co-regulators of ER function.

The most widely studied modifiers of ER-mediated transcription are the co-activators which induce gene expression and co-repressors which inhibit gene expression. While most studies of co-regulator action have been carried out with ER α , ER β function is also affected³⁹. The ability of an ER-driven transcription complex to recruit co-regulators can be strongly ligand-dependent. For example 4-hydroxytamoxifen induces a conformation that blocks the co-activator recognition groove in ER⁴⁰. Altered patterns of co-regulator expression may contribute to the tamoxifen resistance phenotype (Figure 2-target 2).

AIB1 is a steroid hormone receptor co-activator that has recently received attention as a possible contributor to tamoxifen responsiveness. AIB1 binds ER and enhances the expression of cyclin D⁴¹. AIB1 is over-expressed in over 50% of breast tumors⁴². AIB1 appears to have a rate-limiting role in hormone-dependent human breast tumor growth and in culture cells AIB1 enhances the agonist activity of tamoxifen⁴³. A novel AIB1 isoform (AIB- Δ 3) has been recently reported that increases hormone and growth factor sensitivity⁴⁴. The association of AIB1 with ER status is difficult to determine from the small number of studies available. While AIB1 amplification has been associated with ER-positivity, increased AIB1 mRNA expression has been associated with ER-negativity⁴⁵. One recent study compared AIB1 and ErbB2 expression. The five year disease-free survival was lower in those tumors expressing high levels of both AIB1 and ErbB2 when compared to those expressing high levels of AIB1 and low levels of ErbB2. AIB1 and number of positive lymph nodes were also correlated with shorter disease-free survival in tamoxifen-treated compared with untreated patients⁴⁶.

On the other hand alterations in co-repressors of ER can affect the tamoxifen responsiveness. When the co-repressors are recruited to ER, they form multi-subunit repressor complexes, which in-

clude histone deacetylases, facilitating chromatin condensation and inhibition of gene transcription⁴⁷. The co-repressors are usually only recruited when an antagonist, such as tamoxifen, is bound to ER and under these circumstances result in a repression of its agonist activity. Expression of the co-repressor N-CoR is lower in tamoxifen-stimulated MCF7 xenografts than in wildtype xenografts, but the functional relevance of the observation in human cancers is unclear⁴⁸. Chan *et al* studied a small cohort of tamoxifen-resistant human breast tumors but found no difference in the expression of TIF-1, RIP140 or the co-repressor SMRT⁴⁹.

3. Cross talk between signal transduction pathways and ERs

a. PI3K/Akt signaling pathway

The Akt kinase is a serine/threonine protein kinase that has been implicated in mediating a variety of biological responses. Studies showed that high Akt activity in breast carcinomas is associated with a poor pathophenotype, as well as hormone and chemotherapy resistance. ER activity may be also influenced by the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K) pathway⁵⁰ (Figure 2-target 3). Akt is one of the downstream targets, whose activation promotes cellular proliferation and anti-apoptotic responses⁵¹. Recent data suggest that ER α can bind in a ligand-dependent manner with the p85 α regulatory subunit of PI3K, leading to the activation of Akt and subsequent downstream targets³². The relationship between Akt and ER α is reciprocal, in that PI3K activates Akt which phosphorylates the ER α at ser-167 resulting in ligand-independent activation⁵². Aberrant activation of the PI3K/Akt pathway can suppress the apoptotic response, undermine cell cycle control and selectively enhance the production of key growth and survival factors⁵³. Several studies have demonstrated that this pathway provides these cell signals through activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR)⁵⁴ (Figure-target 4). mTOR is a serine-threonine kinase that is activated by Akt and regulates the function of the transcriptional regulators p70s6 kinase and 4E-BP¹⁵⁵. In preclinical studies, rapamycin resulted in G1 cell cycle arrest, induced apoptosis and had anti-proliferative effects in several cancer models. An ester of rapamycin, CCI-779, is currently developed for the treatment of patients with cancer, including breast cancer. A recent study showed that inhibition of mTOR activity by CCI-779 re-

stored tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt activity⁵⁶ (Figure 2- target 4). Clark *et al* measured tamoxifen-induced apoptosis in different cell lines with and without the PI3K pathway inhibitor LY294002⁵⁷. The addition of LY294002 to tamoxifen, was found to significantly increase the pro-apoptotic effects of tamoxifen.

b. Stress signaling pathways

Stress signaling pathways may also contribute resistance to tamoxifen (Figure 2-target 5). Pre-clinical⁵⁸ and clinical⁵⁹ studies suggest that elevated levels of phosphorylated jun N-terminal kinase (JNK) are associated with tamoxifen resistance and new data also implicate activation of p38⁶⁰. p38 is a member of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family that is activated by environmental stresses such as ionizing radiation, oxidative stress, inflammatory cytokines and tissue ischemia⁶¹. The downstream targets of p38 MAPK pathway include further protein kinases and transcription factors. In cell lines expressing the ER, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) has been shown to activate the p38 pathway and to induce apoptosis⁶². Under these circumstances inhibition of the p38 signaling pathway greatly reduces the ability of 4-OHT to induce apoptosis. A new clinical study revealed that tamoxifen resistant breast cancers have a marked increase in phosphorylated p38⁶³.

c. HER2 (ErbB2) signaling pathway

There is a considerable body of experimental evidence to implicate the HER2 pathway in the tamoxifen resistance. Stable transfected clones of HER2 cDNA into MCF7 cells generate MCF7/HER2 cells which express the HER2 receptor at a level 45-fold higher than the parental cell line⁶⁴. When these cells were implanted into nude mice, no tumors were produced in the absence of estrogen. In estrogen-supplemented mice the MCF7/HER2 xenograft grew most rapidly. When estrogen was stopped and tamoxifen started MCF7 tumor growth ceased immediately, while MCF7/HER2 tumors continued to grow. These data suggest that HER2 transfected MCF7 cells are estrogen dependent but tamoxifen resistant. Other studies demonstrate that overexpression of HER2 leads to the down-regulation of ER and increase in ligand-independent ER phosphorylation and transcriptional activation⁶⁵.

According to all these and many other studies, it seems that enhanced growth factor signaling

pathway activity alters tamoxifen effectiveness and contributes to endocrine resistance. The possibility of such mechanism has very important clinical implications as it infers that HER-2 targeted therapy by trastuzumab (Herceptin) may be useful to prevent tamoxifen resistance (Figure 2-target 6). Argiris *et al* recently showed that the combination of tamoxifen and Herceptin resulted in synergistic growth inhibition and G0/G1 cell cycle arrest⁶⁶. In a clinical study Ellis *et al* showed that in ER-positive tamoxifen-treated patients the response rate was 21% for those who expressed HER2 and 42% in those who were HER2 negative⁶⁷. These results suggest that combined inhibition of ER and HER-2 signaling may represent a powerful approach to the treatment of breast cancer. However most of the published studies show the contribution of HER2 overexpression to tamoxifen resistance, but not describe any specific mechanism. A new study by Yang *et al* in Clinical Cancer Research, revealed that HER2 modulates subcellular localization and interaction with ERα in breast cancer cells⁶⁸. Stable or transient or natural HER2 overexpression in ER-positive breast cancer cells promoted relocalization of ER from nucleus to cytoplasm, enhanced interactions of ER with HER2, inhibited ER transactivation function and induced resistance to tamoxifen-mediated growth inhibition of breast cancer cells. HER2 overexpression stimulated ERK1/2 kinase, a downstream signaling effector of HER2. Down-regulation of HER2 by Herceptin led to suppression of ERK1/2 stimulation, restoration of ER to the nucleus and potentiation of the growth inhibitory action of tamoxifen⁶⁸.

d. Protein kinase A (PKA) activation

It is known that protein kinase A can phosphorylate ERα (Figure 2-target 7). Michalides *et al* showed recently in *Cancer Cell* using a novel approach that detected changes in the ERα conformation, that phosphorylation of serine-305 in the hinge region of ERα by PKA induced resistance to tamoxifen⁶⁹. Tamoxifen was able to bind ERα but failed to induce the inactive conformation, inducing ERα-dependent transactivation. PKA activity induced a switch from antagonistic to agonistic effects of tamoxifen on ERα. In the same study it was studied the relevance of PKA activation for tamoxifen resistance in 70 ER positive primary breast cancers that were isolated before tamoxifen treatment, of which 20 patients showed recurrence of the tumor (these tumors were clas-

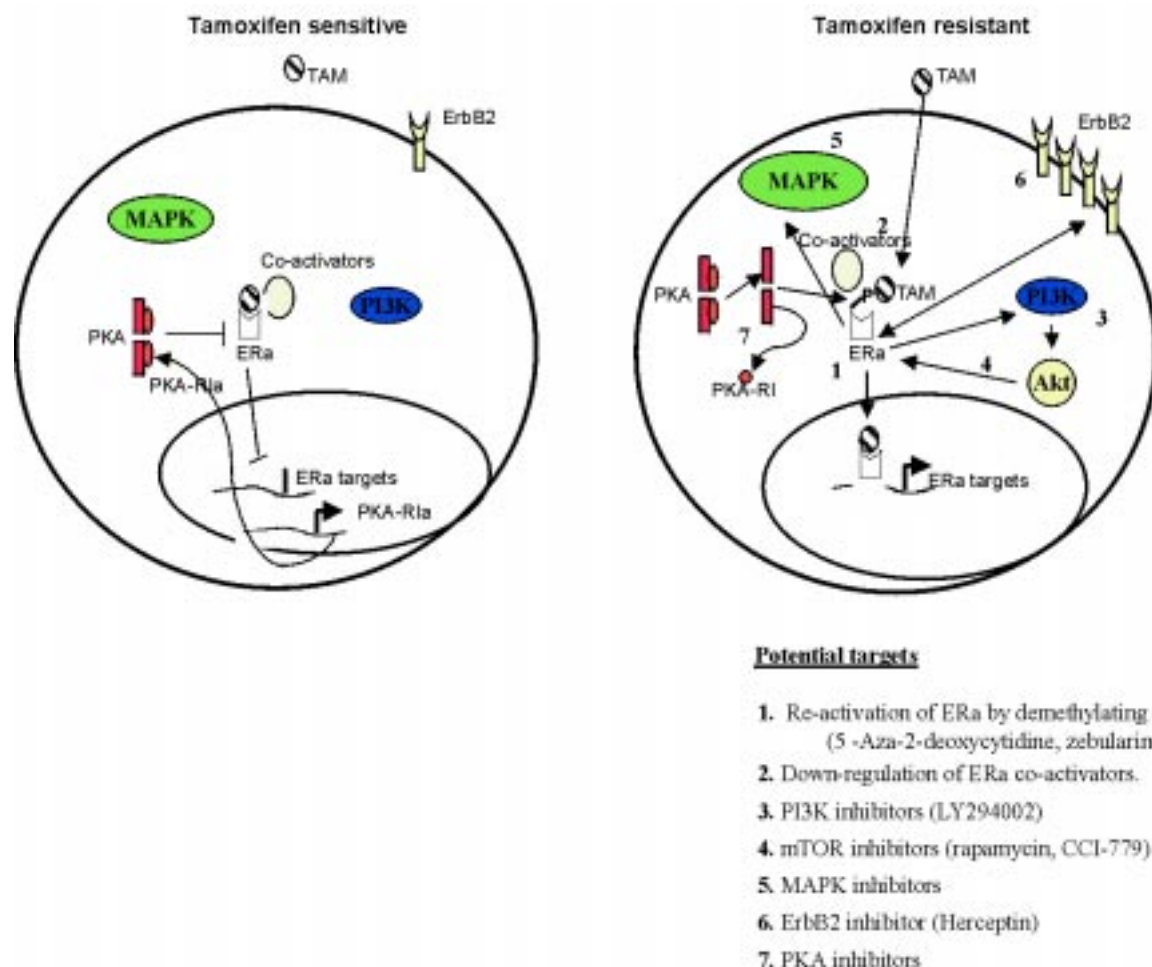


Figure 1

sified as tamoxifen resistant). The remaining 50 patients showed no recurrence in the form of metastasis after a follow-up period of 132 months, which classified these tumors as potentially tamoxifen sensitive. It was found that down-regulation of the negative regulator of PKA, PKA-R1a, was associated with tamoxifen resistance prior to treatment. Down-regulation of PKA-R1a, activated PKA catalytic subunit which phosphorylation of ser-305 ERα and converted tamoxifen from an ERα inhibitor into a growth stimulator, without any effect on ICI 182,780 (Fulvestrant). This is the first detailed study that describes exactly a new mechanism of anti-estrogen resistance specific only for tamoxifen.

e. Pharmacologic tolerance

Acquired resistance to tamoxifen may be associated with reduced intra-tumoral concentrations in the presence of maintained serum levels⁷⁰. The

mechanism responsible for altered tamoxifen accumulation is not understood, although P-glycoprotein is probably not responsible. Sensitivity to tamoxifen could also be affected by a reduction on the intracellular availability of tamoxifen due to presence of intracellular anti-estrogen sites. The extent to which such a mechanism contributes to clinical resistance is not known. Increased metabolism of tamoxifen to agonistic metabolites is a further potential resistance mechanism. Tamoxifen is metabolized into N-desmethyltamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. N-desmethyltamoxifen is the major metabolite detected in the serum; although 4-OHT has a greater affinity for the ER than tamoxifen, the levels in the serum are very low. A recent study identified a further active metabolite (4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen) which was present in the blood at higher concentrations than 4-OHT⁷¹. The generation of this metabolite de-

pended on CYP2D6 and patients carrying the CYP2D6 allele who were treated with paroxetine (selective serotonin inhibitor administered with tamoxifen in order to ameliorate hot flushes) had a decreased plasma concentration of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen. Women with a variant CYP2D6 allele receiving tamoxifen also had lower plasma concentrations of the metabolite⁷². These results indicate that pharmacogenomic alterations may affect the tamoxifen effectiveness.

Conclusions

It is obvious that ER signaling pathway is very complicated and regulated also by other signaling pathways. Altered levels of the different proteins in these signaling pathways and co-regulatory molecules are common findings in endocrine resistance. A comparison between tamoxifen sensitive vs tamoxifen resistant pathways is shown on figure 2. In a tamoxifen sensitive cell, ERα is expressed, co-activators are not highly expressed, the PI3K/Akt pathway is not activated, ErbB2 expression levels are very low, and PKA can not phosphorylate ERα because is inhibited by the negative regulator PKA-R1α. On the other hand in a tamoxifen resistant cell, ERα is inactivated frequently by DNA hypermethylation, co-activators are highly expressed, the PI3K/Akt pathway is activated, the MAPK cascade is also active, ErbB2 is highly expressed and PKA-R1α down-regulation allows PKA to phosphorylate ERα. Of course one or some (but not all simultaneously) of these mechanisms are responsible tamoxifen resistance in each patient. *It is very important to realize that there may be multiple resistance pathways that are highly important in some patients but irrelevant in others. Each patient should be treated as a different case, because different signaling pathways are responsible for the tamoxifen resistance.* A number of pharmacological agents targeting these pathways are available in clinic or are in development.

The most commonly used anti-estrogen is tamoxifen and it has been calculated that about one million years of life saved by tamoxifen per year in the developed countries. Although the very promising results of the use of the aromatase inhibitors the American Society of Clinical Oncology Group continues to recommend 5 years of adjuvant tamoxifen as a standard therapy for women with ER positive breast cancer. In addition in terms of chemoprevention, the recommendations

include the use of tamoxifen vs participation in a clinical trial that involves the administration of raloxifene, any aromatase inhibitor, or any retinoid only within the context of chemoprevention.

REFERENCES

1. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1998, 339:1609-18.
2. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.* 1998, 90:1371-88.
3. Ingle JN. Sequencing of endocrine therapy in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:362S-7S.
4. Goss PE, Ingle JN, Martino S et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med.* 2003, 349:1793-802.
5. Nilsson S, Makela S, Treuter E et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001, 81:1535-65.
6. Frasor J, Danes JM, Komm B et al. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 2003, 144:4562-74.
7. Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet.* 1991, 25:89-123.
8. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA et al. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res.* 2001, 7:4338-4342.
9. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR et al. Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Horm Res.* 2000, 55:163-93.
10. Zhao C, Koide A, Abrams J et al. Mutation of Leu-536 in human estrogen receptor-alpha alters the coupling between ligand binding, transcription activation, and receptor conformation. *J Biol Chem.* 2003, 278:27278-86.
11. Heldring N, Nilsson M, Buehrer B et al. Identification of tamoxifen-induced coregulator interaction surfaces within the ligand-binding domain of estrogen receptors. *Mol Cell Biol.* 2004, 24:3445-59.
12. Tikkanen MK, Carter DJ, Harris AM et al. Endogenously expressed estrogen receptor and coactivator AIB1 interact in MCF-7 human breast

- cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97:12536-40.
13. Louie MC, Zou JX, Rabinovich A et al. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol*. 2004, 24:5157-71.
 14. Inoue E, Hanai M, Yamada K et al. Transcriptional coactivator p300/CBP-associated factor and p300/CBP-associated factor type B are required for normal estrogen response of the mouse uterus. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004, 68:2209-11.
 15. Sharma D, Blum J, Yang X et al. Release of Methyl CpG Binding Proteins and Histone Deacetylase 1 from the Estrogen Receptor Alpha (ER) Promoter upon Reactivation in ER-negative Human Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol*. 2005
 16. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000, 74:311-7.
 17. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK et al. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 2004, 18:1859-75.
 18. Karl M, Potier M, Schulman IH et al. Autocrine activation of the local insulin-like growth factor I system is up-regulated by estrogen receptor (ER)-independent estrogen actions and accounts for decreased ER expression in type 2 diabetic mesangial cells. *Endocrinology*. 2005, 146:889-900.
 19. Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat*. 2003, 77:145-55.
 20. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK et al. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett*. 2004, 567:243-7.
 21. Duan R, Porter W, Samudio I et al. Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol Endocrinol*. 1999, 13:1511-21.
 22. Faulds MH, Pettersson K, Gustafsson JA et al. Cross-talk between ERs and signal transducer and activator of transcription 5 is E2 dependent and involves two functionally separate mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2001, 15:1929-40.
 23. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1). *J Biol Chem*. 2002, 277:48479-83.
 24. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F et al. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96:4686-91.
 25. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994, 91:8517-21.
 26. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 1996, 15:1292-300.
 27. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J*. 2001, 20:6050-9.
 28. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J*. 1995, 9:404-10.
 29. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100:4807-12.
 30. Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C et al. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem*. 2001, 276:27071-6.
 31. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *EMBO J*. 1998, 17:2008-18.
 32. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase *Nature*. 2000, 407:538-41.
 33. Razandi M, Pedram A, Park ST et al. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem*. 2003, 278:2701-12.
 34. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005, 307:1625-30.
 35. Paridaens R, Sylvester RJ, Ferrazzi E et al. Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptors in advanced breast cancer. *Cancer*. 1980, 46:2889-95.
 36. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF et al. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1994, 54:2552-5.

37. Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Comparison of transcriptional synergy of estrogen receptors alpha and beta from multiple tandem estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2000, 165:151-61.
38. Lazennec G, Bresson D, Lucas A et al. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology.* 2001, 142:4120-30.
39. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F et al. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res.* 1998, 58:877-81.
40. Shiau AK, Barstad D, Loria PM et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.* 1998, 95:927-37.
41. Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL et al. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res.* 2001, 61:3858-62.
42. Anzick SL, Kononen J, Walker RL et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science.* 1997, 277:965-8.
43. Webb P, Nguyen P, Shinsako J et al. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol.* 1998, 12:1605-18.
44. Reiter R, Wellstein A, Riegel AT. An isoform of the coactivator AIB1 that increases hormone and growth factor sensitivity is overexpressed in breast cancer. *J Biol Chem.* 2001, 276:39736-41.
45. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res.* 2001, 61:903-7.
46. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95:353-61.
47. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999, 20:321-44.
48. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T et al. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:2920-5.
49. Chan CM, Lykkesfeldt AE, Parker MG et al. Expression of nuclear receptor interacting proteins TIF-1, SUG-1, receptor interacting protein 140, and corepressor SMRT in tamoxifen-resistant breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1999, 5:3460-7.
50. Torres-Arzayus MI, De Mora JF, Yuan J et al. High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. *Cancer Cell.* 2004, 6:263-74.
51. Geffroy N, Guedin A, Dacquet C et al. Cell cycle regulation of breast cancer cells through estrogen-induced activities of ERK and Akt protein kinases. *Mol Cell Endocrinol.* 2005, 237:11-23.
52. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem.* 2001, 276:9817-24.
53. Hutchinson J, Jin J, Cardiff RD et al. Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Mol Cell Biol.* 2001, 21:2203-12.
54. Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD et al. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, 95:7772-7.
55. Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene.* 2000, 19:6680-6.
56. deGraffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH et al. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:8059-67.
57. Clark AS, West K, Streicher S et al. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2002, 1:707-17.
58. Schiff R, Reddy P, Ahotupa M et al. Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J Natl Cancer Inst.* 2000, 92:1926-34.
59. Johnston SR, Lu B, Scott GK et al. Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance. *Clin Cancer Res.* 1999, 5:251-6.
60. Buck MB, Pfizenmaier K, Knabbe C. Antiestrogens induce growth inhibition by sequential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and transforming growth factor-beta pathways in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2004, 18:1643-57.
61. Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE.* 2003, 167:

62. Zhang CC, Shapiro DJ. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000, 275:479-86.
63. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol.* 2005, 23:2469-76.
64. Benz CC, Scott GK, Sarup JC et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat.* 1993, 24:85-95.
65. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene.* 1995, 10:2435-46.
66. Argiris A, Wang CX, Whalen SG et al. Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clin Cancer Res.* 2004, 10:1409-20.
67. Ellis MJ, Coop A, Singh B et al. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol.* 2001, 19:3808-16.
68. Yang Z, Barnes CJ, Kumar R. Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004, 10:3621-8.
69. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A et al. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004, 5:597-605.
70. Johnston SR, Haynes BP, Smith IE et al. Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer and reduced intra-tumoral drug concentration. *Lancet.* 1993, 342:1521-2.
71. Clarke R, Skaar TC, Bouker KB et al. Molecular and pharmacological aspects of antiestrogen resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001, 76:71-84.
72. Stearns V, Johnson MD, Rae JM et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst.* 2003, 95:1758-64.

Συχνότητα της καρδιακής ανεπάρκειας σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Τραστουζουμάμπη

Δ. Πλατογιάννης¹, Χ. Λαφάρας¹, Γ. Γαλακτίδου², Α. Κορτσάρης³, Ε. Χατζηνικολάου⁴, Θ. Μπισχινιώτης¹, Δ. Χατσέρας⁴

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Τραστουζουμάμπη είναι μονοκλωνικό αντίσωμα, που χορηγείται για την θεραπεία γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ο οποίος υπερεκφράζει τον υποδοχέα HER2. Η χορήγησή του συνοδεύεται με καρδιοτοξικές εκδηλώσεις (καρδιακή ανεπάρκεια, ανεπάρκεια μιτροειδούς βαλβίδας). **Σκοπός** της παρούσας μελέτης ήταν η καταγραφή της συχνότητας των καρδιοτοξικών εκδηλώσεων από την Τραστουζουμάμπη και η αναζήτηση του πιθανού μηχανισμού πρόκλησης. **Υλικό:** Μελετήθηκαν 50 γυναίκες με ιστολογικά τεκμηριωμένο καρκίνο του μαστού, διάμεσης ηλικίας 51 χρόνων (εύρος 30-68 έτη), που υποβάλλονταν σε θεραπεία με Τραστουζουμάμπη μία φορά την εβδομάδα με δόση 2mg/Kg μετά από προηγούμενη δόση εφόδου 4mg/Kg. Όλες οι γυναίκες είχαν λάβει προηγουμένως χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνη, ταξάνες και είχαν υποβληθεί σε ακτινοβολία του θωρακικού τοιχώματος (32 στο αριστερό ημιθώρακιο και 18 στο δεξιό). Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες μαρτύρων (ομάδες ελέγχου). Την μία ομάδα απετέλεσαν 20 νοσηλεύτριες του νοσοκομείου (ομάδα Α) και την άλλη ομάδα, 20 γυναίκες οι οποίες επισκέφθηκαν το ιατρείο μαστού και η διάγνωση ήταν καλόηθες ιναδένωμα μαστού(ομάδα Β). **Μέθοδοι:** Όλες οι ασθενείς πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου υποβλήθηκαν σε λεπτομερή λήψη ιστορικού και κλινική εξέταση, σε ηλεκτροκαρδιογραφικό και υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο, καθώς και σε προσδιορισμό των φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-a) και του νατριουρητικού πεπτιδίου pro-BNP. Στον παραπάνω έλεγχο υποβλήθηκαν και οι δύο ομάδες ελέγχου. **Συμπέρασμα:** Η συχνότητα εμφάνισης καρδιοτοξικότητας σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που υποβάλλονται σε θεραπεία με τραστουζουμάμπη μετά προηγούμενη χημειοθεραπεία με ανθρακυκλίνες είναι υψηλή (38%) και συνήθως εκδηλώνεται ως καρδιακή ανεπάρκεια. Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 και του TNF-a, καθώς και ο αποκλεισμός των HER2 υποδοχέων, αποτελούν τους πιθανούς μηχανισμούς πρόκλησης καρδιοτοξικότητας. **Λέξεις κλειδιά:** καρδιοτοξικότητα, τραστουζουμάμπη, φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, υποδοχείς HER₂. **Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):252-259.**

¹Καρδιολογική Μονάδα Α.Ν.Θ.Θεαγένειο Θεσσαλονίκη, ²Συμεωνίδιο Ερευνητικό Κέντρο Α.Ν.Θ. Θεαγένειο, Θεσσαλονίκη. ³Εργαστήριο Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης. ⁴Πανεπιστημιακή

Καρδιολογική Κλινική, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης. Υπεύθυνος επικοινωνίας Δρ. Λαφάρας Θ. Χρήστος, Καρόλου Ντηλ 12, Θεσσαλονίκη, Τ.Κ: 54 623, Τηλ. 2310 224 428, e-mail: iatros_the@panafonet.gr

Εισαγωγή

Η Τραστοζουμάμπη είναι το ανασυνδυασμένο ανθρώπινο αντί-HER₂ μονοκλωνικό αντίσωμα που παρήχθη από το μονοκλωνικό αντίσωμα του ποντικού 4D5.Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος². Η σημαντικότερη παρενέργεια από την θεραπευτική χορήγηση του φαρμάκου είναι η καρδιακή δυσλειτουργία. Ως επιβαρυντικοί παράγοντες για την πρόκληση καρδιακής ανεπάρκειας ενοχοποιήθηκαν η προηγούμενη έκθεση και/ή ταυτόχρονη χορήγηση ανθρακυκλίνης^{6,7}, η μεγάλη ηλικία, η προηγούμενη ακτινοβολία του αριστερού ή δεξιού ημιθωρακίου και η παρουσία κλασικών παραγόντων κινδύνου όπως η υπερλιπιδαιμία και καρδιακή ανεπάρκεια σταδίου \geq II κατά New York Heart Association (NYHA). Η πρόκληση καρδιακής δυσλειτουργίας είναι αναστρέψιμη στην πλειονότητα των ασθενών με την χορήγηση της συνήθους φαρμακευτικής αγωγής για καρδιακή ανεπάρκεια. Στην παρούσα μελέτη έγινε καταγραφή της συχνότητας εμφάνισης των καρδιοτοξικών εκδηλώσεων από τη Τραστοζουμάμπη, σε γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και υπερέκφραση του υποδοχέα HER2. Επίσης έγινε συσχέτιση των επιπέδων του pro-BNP, των φλεγμονωδών κυτταροκινών και ιδιαίτερα της ιντερλευκίνης -6 (IL-6) και του παράγοντα νέκρωσης (TNF- α), στη φάση της καρδιοτοξικότητας, καθώς και του αποκλεισμού των HER2 υποδοχέων, με τους πιθανούς μηχανισμούς πρόκλησης καρδιακής δυσλειτουργίας.

Υλικό-μέθοδοι

Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη.

Στη μελέτη εντάχθηκαν πενήντα (50) γυναίκες με ιστολογικά τεκμηριωμένο καρκίνο του μαστού και παρουσία μεταστατικής νόσου, για την οποία χρειαζόταν να υποβληθούν σε συστηματική θεραπεία. Όλες είχαν υπερέκφραση του υποδοχέα HER2 που προσδιορίστηκε με ανοσοιστοχημική μέθοδο, ήταν ηλικίας <70 χρόνων και είχαν υποβληθεί σε προηγούμενη χημειοθεραπεία με βάση την ανθρακυκλίνη. Για την έναρξη χορήγησης της Τραστοζουμάμπης έπρεπε να μεσολαβήσει χρονικό διάστημα άνω των έξι μηνών χωρίς άλλη θεραπεία με κυτταροτοξική ή άλλη καρδιοτοξική θεραπεία. Αποκλείστηκαν γυναίκες με προηγούμενο καρδιολογικό ιστορικό (στεφανιαία νόσο, μυο-περικαρδίτιδα, μυοκαρδιοπάθεια, βαλβιδοπάθεια, αρτηριακή υπέρταση, κολπική μαρμα-

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Χαρακτηριστικό	Τιμή(%)
Αριθμός ασθενών	50(100)
Ηλικία	51
Διάμεση (έτη)	31-68
Διακύμανση (έτη)	
Έμμηνος κατάσταση	
Προεμμηνοπαυσιακές	33 (66%)
Μετέμμηνοπαυσιακές	17 (34%)
Ορμονικοί υποδοχείς	
O ₊ Π ₋	15 (30%)
O ₋ Π ₊	5 (10%)
O ₋ Π ₊	2 (4%)
OΠ	28 (56%)
Προηγούμενη ΑΚΘ θωρακικού τοιχώματος	50 (100%)
	32στο αριστερό ημιθωράκιο, 18 στο δεξιοί
Προηγούμενη θεραπεία με ανθρακυκλίνες	50 (100%)
Αθροιστική δόση επιρουμπικίνης	(επιρουμπικίνη) >900mg/m ²

ΑΚΘ: Ακτινοθεραπεία, O: Οιστρογονικοί υποδοχείς, Π: Προγεστερονικοί υποδοχείς, +:θετικοί, -:αρνητικοί.

ρυγή) καθώς και με παθήσεις (αναιμία, υπερθυρεοειδισμό, υποθυρεοειδισμό, αμφοτερόπλευρη νόσο του μαστού, εγκεφαλικές μεταστάσεις). Επίσης αποκλείστηκαν γυναίκες με κακή γενική κατάσταση (score Karnofsky <60), παρουσία δεύτερου νεοπλάσματος και σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών.

Μεθοδολογία -Παρακολούθηση

Πριν από την έναρξη τους στη μελέτη οι γυναίκες υποβάλλονταν σε λεπτομερή λήψη ιστορικού, κλινική εξέταση, ηλεκτροκαρδιογραφικό και υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο για τον αποκλεισμό εκείνων με προηγούμενο καρδιολογικό ιστορικό, καθώς και παθήσεων που θα αλλοίωναν τις τιμές των μετρούμενων παραμέτρων. Η χορήγηση της Τραστοζουμάμπης γινόταν μία φορά την εβδομάδα ενδοφλεβίως σε δόση 2mg/Kg αφού προηγούνταν δόση εφόδου 4mg/Kg.

Μετά την έναρξη τους στη μελέτη οι γυναίκες υποβάλλονταν σε **α) λεπτομερή λήψη ιστορικού και κλινική εξέταση**, για τον αποκλεισμό όλων των γυναικών που παρουσίαζαν συμπτώματα, από καρδιακή ή εξωκαρδιακή πάθηση, και τα οποία θα μπορούσαν να εκληφθούν ότι οφείλονται σε καρ-

διακή δυσλειτουργία, η οποία επαναλαμβάνονταν κάθε εβδομάδα πριν της χορήγησης της θεραπείας **β) σε ηλεκτροκαρδιογραφικό έλεγχο** ο οποίος επαναλαμβάνονταν κάθε εβδομάδα πριν τη θεραπεία **γ) σε υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο** για τον προσδιορισμό των δεικτών λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας (κλάσμα εξώθησης με την μέθοδο Simpson, κλάσμα βράχυνσης, τελοσυστολική και τελοδιαστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας και διάμετρος του αριστερού κόλπου). Ο υπερηχοκαρδιογραφικός έλεγχος επαναλαμβάνονταν κάθε μήνα και εκτάκτως επί εμφανίσεως συμπτωμάτων καρδιακής ανεπάρκειας. Όταν παρουσιάζονταν καρδιοτοξικές εκδηλώσεις, όπως εύκολη κόπωση, δύσπνοια, ορθόπνοια, παροξυντική νυχτερινή δύσπνοια, οξύ πνευμονικό οίδημα ή από την ακρόαση τρίτος καρδιακός τόνος, υγροί ρόγχοι το πρωτόκολλο καθόριζε: **1)** αν διαπιστώνονταν πτώση του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας >10% της αρχικής τιμής, αλλά ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια, οι ασθενείς δεν έπαιρναν καμία θεραπεία, **2)** αν διαπιστωνόταν πτώση του κλάσματος εξώθησης >10%, με τιμές 45-50% χορηγούνταν μικρές δόσεις καρβεδιλόλης και λυσινοπρίλης χωρίς διακοπή της Τραστοουζουμάμπης, ενώ **3)** αν η τιμή του κλάσματος ήταν <40% σταματούσε η χορήγηση της και ακολουθούσε φαρμακευτική αγωγή για την αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας με φουροσεμίδη, λυσινοπρίλη, δακτυλίτιδα και καρβεδιλόλη. Η επαναχορήγηση της Τραστοουζουμάμπης γινόταν όταν υποχωρούσε η συμπτωματολογία της καρδιακής ανεπάρκειας και όταν το κλάσμα εξώθησης (KE) της αριστερής κοιλίας ήταν >40%. Και στις δύο περιπτώσεις η φαρμακευτική αγωγή για την καρδιακή ανεπάρκεια συνεχίζονταν κανονικά παρά την επαναχορήγηση της Τραστοουζουμάμπης, ο δε επανέλεγχος περιελάμβανε εβδομαδιαία, πριν τη θεραπεία, κλινική εκτίμηση και υπερηχοκαρδιογραφικό έλεγχο μέχρι τη σταθεροποίηση των ασθενών. Μετά την αντιμετώπιση των εκδηλώσεων της καρδιακής ανεπάρκειας και την επαναχορήγηση της Τραστοουζουμάμπης, στην ίδια δοσολογία, οι ασθενείς δεν επανεμφάνισαν συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας. Στη συνέχεια οι υπερηχοκαρδιογραφικές μετρήσεις γίνονταν δύο και έξι μήνες μετά. Επίσης υποβάλλονταν σε αιμοληψία για τον προσδιορισμό των φλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF-a) και του νατριουρητικού πεπτιδίου pro-BNP. Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες ελέγχου. Την μία ομάδα αποτέλεσαν 20 υγιείς νοσηλεύτριες του νοσοκομείου (ομάδα Α)

και την άλλη ομάδα, 20 γυναίκες οι οποίες επισκέφθηκαν το ιατρείο μαστού και η διάγνωση ήταν καλοήθες ιναδένωμα μαστού (ομάδα Β). Η ομάδα ελέγχου Β χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί εάν οι βιολογικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν επηρεάζονται από την ύπαρξη καλοήθων όγκων του μαστού.

Οι κυτταροκίνες συμμετέχουν σε πολλές εκδηλώσεις του συνδρόμου της καρδιακής ανεπάρκειας. Επιδρούν στην λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας, μέσω των αυξημένων επιπέδων του TNF-a που ενεργοποιούν το σύστημα της σφιγγομυελινάσης, τους β-αδρενεργικούς υποδοχείς και απελευθερώνουν την IL-8 που ασκεί αρνητική ινότροπο δράση στο μυοκάρδιο. Επηρεάζουν την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας προκαλώντας υπερτροφία και απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων καθώς και μεταβολές στην έκφραση εμβρυϊκών γονιδίων και την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μειώνοντας την παραγωγή ή αυξάνοντας την αποδόμηση του NO και αυξάνοντας την ενδοθηλίνη. Επηρεάζουν την λειτουργική ικανότητα των περιφερικών μυών, προκαλώντας διαταραχές στη δομή και λειτουργία τους, ως αποτέλεσμα της μειωμένης περιφερικής αιμάτωσης, της ελαττωμένης μυϊκής μάζας, της παρατεταμένης αδράνειας τους και των ενδογενών βιολογικών και μεταβολικών ανωμαλιών των κυττάρων. Το BNP προσδιορίστηκε ως ένας επιπλέον δείκτης διάγνωσης της μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα προσδιορίστηκε το pro-BNP γιατί παρουσιάζει τα παρακάτω πλεονεκτήματα έναντι του BNP: είναι πιο σταθερό σε κλινικές συνθήκες, τα επίπεδα του δεν παρουσιάζουν διακύμανση κατά την διάρκεια του 24ωρου, παρουσιάζει μεγαλύτερη αναλογική και απόλυτη αύξηση έναντι του BNP. Συνεπώς είναι πιο αξιόπιστος δείκτης για την εκτίμηση της δυσλειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Ως παθολογικές θεωρήθηκαν τιμές >100 pg/ml. Οι μετρήσεις γίνονταν πριν από την έναρξη της θεραπείας και επαναλαμβάνονταν επί εμφανίσεως συμπτωμάτων καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς επίσης δύο και έξι μήνες μετά. Οι τιμές των παραπάνω παραμέτρων προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Elisa (two site Elisa 'sandwich' Format).

Στατιστική ανάλυση: Τα αποτελέσματα δίδονται σαν μέσες τιμές, με (θετική και αρνητική) σταθερή απόκλιση (Standard deviation). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη δοκιμασία Student t-test (unpaired data) και με γραμμική συσχέτιση στα παραμετρικά μεγέθη. Τιμές του $p < 0,05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

Αποτελέσματα

Οι γυναίκες της μελέτης ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες, με βάση την εμφάνιση (ομάδα Γ) ή όχι (ομάδα Δ) καρδιοτοξικών εκδηλώσεων από την χορήγηση της Τραστουζουμάμπης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων όλων των παραμέτρων των ασθενών της μελέτης, πριν τη θεραπεία, δεν διέφεραν από εκείνα των ομάδων ελέγχου Α και Β (Πίν. 2). Αντίθετα διέφεραν σημαντικά από τα αποτελέσματα των γυναικών της ομάδας Γ, που εμφάνισαν καρδιοτοξικές εκδηλώσεις ($p < 0,001$, πίνακας 3). Πιο συγκεκριμένα καρδιοτοξικές εκδηλώσεις παρατηρήθηκαν σε 19 από τις 50 γυναίκες ($n=38\%$), και εμφανίσθηκαν μετά από 2 έως 9 εβδομάδες θεραπείας (διάμεσο διάστημα 5,7 εβδομάδες). Σε 18 από τις 19 γυναίκες (94,7%) που ανέπτυξαν συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας, παρατηρήθηκε και ποικίλου βαθμού ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας. Μία γυναίκα εμφάνισε 1+ ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας (5,5%), 10 γυναίκες εμφάνισαν 2+ ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας (55%) και τέλος 7 γυναίκες εμφάνισαν 3+ ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας (39,5%), ενώ τρεις γυναίκες απεβίωσαν (6%). Όλες οι γυναίκες που ανέπτυξαν συμπτωματική καρδιακή ανεπάρκεια, πλην των τριών που απεβίωσαν από μη αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια, βελτιώθηκαν με την χορήγηση κατάλληλης φαρμακευτικής αγωγής. Η απάντηση στην θεραπεία ανήλθε στο 84,8% (16/19 γυναίκες). Η

συμπτωματολογία των ασθενών βελτιώθηκε κατά ένα με δύο στάδια κατά NYHA, η δε ανεπάρκεια της μιτροειδούς κατά 2+ σε 5 γυναίκες με αρχική ανεπάρκεια 3+ (71,4%) και κατά 1+ στις υπόλοιπες 2 (18,6%). Οι 10 γυναίκες με αρχικά 2+ ανεπάρκεια μετέπεσαν σε 1+ (100%), ενώ η μία γυναίκα με 1+ ανεπάρκεια δεν άλλαξε. Στη διάρκεια της κλινικής εμφάνισης της καρδιοτοξικότητας, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική άνοδος των επιπέδων της IL-6 του TNF- α και του pro-BNP, σε σύγκριση με τα προ της θεραπείας επίπεδα (πίνακας 3). Οι τρεις γυναίκες που εμφάνισαν την σοβαρότερη εκδήλωση καρδιακής ανεπάρκειας (οξύ πνευμονικό οίδημα) παρουσίασαν και τις υψηλότερες τιμές της IL-6 (μέση τιμή 22,3pg/ml), του TNF- α (108pg/ml) και του Pro-BNP (1428pg/ml) σε συνδυασμό με την χαμηλότερη μέση τιμή του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας (KE=36%). Τα επίπεδα της IL-6, του TNF- α και του pro-BNP, υποχώρησαν σημαντικά ($p < 0,001$) 2 μήνες μετά από την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής και μετά από 6 μήνες έφτασαν στα προ της θεραπείας επίπεδα ($p < 0,001$). Στατιστικά σημαντική βελτίωση ($p < 0,001$) παρουσίασαν και οι ηχοκαρδιογραφικοί δείκτες λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας, όπως επίσης και οι διαστάσεις του αριστερού κόλπου ($p < 0,001$, πίνακας 5).

Συζήτηση

Η Τραστουζουμάμπη χρησιμοποιείται για την

Πίνακας 2. Σύγκριση των μετρούμενων παραμέτρων των ομάδων Γ και Δ (πριν την εμφάνιση καρδιοτοξικών εκδηλώσεων) με τις ομάδες ελέγχου Α και Β.

Παράμετρος	Ομάδα Γ (προ θεραπείας) $n=19$	Ομάδα Ελέγχου Α $n=20$	Ομάδα Δ (προ θεραπείας) $n=31$	Ομάδα Ελέγχου Β $n=20$	p
TΔΔΑΚ(mm)	48,3+/-5,7	47,6+/-6,2	49,1+/- 5,1	47,65+/-6	NS
TΣΔΑΚ(mm)	31,9+/-5,1	28,6+/-6	32,3+/-4,2	28,9+/-6,2	NS
ΚΕ(%)	64+/-6	66+/-5,5	64,0+/-5,8	69+/-9,8	NS
ΚΒ(%)	35+/-4	36+/-5	34,8+/-4,4	38+/-9,2	NS
LA(mm)	29+/-3	31+/-4	32+/-5	31,3+/-4,9	NS
TNF-α(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	
IL-2(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	
IL-6(pg/ml)	1,8+/-3,2	1,3+/-3	5,6+/-4,0	1,32+/-3	NS
IL-3(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	NS
IL-4(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	NS
IL-8(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	NS
IL-1b(pg/ml)	ND	ND	ND	ND	NS
Pro-BNP(pg/ml)	31,7+/-8,6	22+/-12	68+/-5	31+/-13	NS

Συντμήσεις: TΔΔΑΚ= τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας TΣΔΑΚ= τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας, LA=αριστερός κόλπος, ΚΕ=κλάσμα εξώθησης, ΚΒ=κλάσμα βράχυνσης, IL=Ιντερλευκίνη, ND=μη ανιχνεύσιμο, NS=μη στατιστικά σημαντικό

Πίνακας 3. Σύγκριση των μετρούμενων παραμέτρων της ομάδας Γ (n=19) πριν και μετά την εμφάνιση καρδιοτοξικών εκδηλώσεων.

Παράμετρος	Πριν την έναρξη της θεραπείας	Κατά την εμφάνιση καρδιοτοξικών εκδηλώσεων	p
ΤΔΔΑΚ(mm)	48,3+/-5,7	59,5+/-5,5	<0,001
ΤΣΔΑΚ(mm)	31,9+/-5,1	44,0+/-4,0	<0,001
ΚΕ(%)	64+/-6	46,7+/-4,3	<0,001
ΚΒ(%)	35+/-4	23,8+/-2,7	<0,001
LA(mm)	29+/-3	39+/-7	<0,001
TNF-a(pg/ml)	ND	100,2+/-26	<0,001
IL-2(pg/ml)	ND	17,4+/-35	NS
IL-6(pg/ml)	1,8+/-3,2	9,3+/-4,1	<0,001
IL-3(pg/ml)	ND	0,9+/-1,2	NS
IL-4(pg/ml)	ND	1,5+/-2,2	NS
IL-8(pg/ml)	ND	83+/-160	NS
IL-1b(pg/ml)	ND	0,5+/-1,4	NS
Pro-BNP(pg/ml)	31,7+/-8,6	1451+/-175,9	<0,001

Πίνακας 4. Συσχέτιση της βαρύτητας των συμπτωμάτων της καρδιακής ανεπάρκειας με τα επίπεδα των φλεγμονωδών κυτταροκινών, του Pro-BNP και του κλάσματος εξώθησης (ΚΕ).

Συμπτώματα	Αδυναμία Εύκολη κόπωση	Δύσπνοια Κόπωσης	Ορθόπνοια Παροξυσμική νυχτερινή δύσπνοια	Οξύ Πνευμονικό οίδημα
Αριθμός Ασθενών (%)	9(47,8%)	5(26,3%)	2(10,5%)	3(15,7%)
IL-6 pg/ml	9,85	12,7	18,4	22,3
TNF-a pg/ml	47	63	89	108
Pro-BNP pg/ml	453	794	1056	1428
ΚΕ (κλάσμα εξώθησης)	43	40	37,5	36

Πίνακας 5. Μεταβολές των μετρούμενων παραμέτρων δύο και έξι μήνες από την θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας.

Χρόνος	Κατά την Εμφάνιση Καρδιοτοξικών Εκδηλώσεων	Δύο μήνες μετά	p	Έξι μήνες μετά	p
TNF-a (pg/ml)	100,2+/-26	41,30+/-61,67	<0,001	18,11+/-21,92	<0,001
IL-6 (pg/ml)	9,3+/-4,1	4,63+/-4,2	<0,001	2,36+/-4,08	<0,001
Pro-BNP (pg/ml)	1451+/-175,9	431+/-59,3	<0,001	129+/-11	<0,001
ΤΔΔΑΚ (mm)	59,5+/-5,5	56,3+/-5,3	<0,001	55,3+/-4,4	<0,001
ΤΣΔΑΚ (mm)	44+/-4,0	40,9+/-3,9	<0,001	40,1+/-3,7	<0,001
ΚΕ (%)	46,7+/-4,3	52,26+/-5,0	<0,001	56,26+/-4,96	<0,001
ΚΒ (%)	23,8+/-2,7	27,31+/-3,26	<0,001	29,94+/-3,6	<0,001
LA (mm)	39+/-7	35+/-2,9	<0,001	33,9+/-2,4	<0,001

θεραπεία των γυναικών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού και υπερέκφραση του υποδοχέα HER2. Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το θεραπευτικό της όφελος, διότι ελαττώνει τον κίνδυνο θανάτου κατά 20% και αυξάνει την επιβίωση κατά

9 μήνες⁸. Σε τυχαίοποιημένες μελέτες αποδείχτηκε ότι η αποτελεσματικότητα της αυξάνει όταν χορηγείται σε συνδυασμό με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα (ταξάνες, βινορελπίνη)⁹⁻¹¹. Όμως, η αυξανόμενη κλινική εμπειρία από τη χρήση της

Τραστοζουμάμπης έδειξε και την τοξικότητα του φαρμάκου και ιδίως την καρδιοτοξικότητα. Σε πρόσφατες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η καρδιοτοξικότητα ανέρχεται στο 27% όταν η Τραστοζουμάμπη συνδυάζεται με ανθρακυκλίνη και κυκλοφωσφαμίδη, ενώ μειώνεται στο 13% όταν συνδυάζεται με paclitaxel¹². Αντίθετα, όταν χορηγείται σαν μονοθεραπεία, η καρδιοτοξικότητα μειώνεται στο 4%. Η τυχαιοποιημένη μελέτη CREC, περιλάμβανε 469 γυναίκες με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, και συνέκρινε την καρδιοτοξικότητα του συνδυασμού Τραστοζουμάμπης και χημειοθεραπείας με την αντίστοιχη της Τραστοζουμάμπης ως μονοθεραπεία. Η καρδιοτοξικότητα του συνδυασμού ανθρακυκλίνη+κυκλοφωσφαμίδη+ τραστοζουμάμπη ανήλθε στο 27%, του συνδυασμού ανθρακυκλίνη+ κυκλοφωσφαμίδη ήταν 8%, του συνδυασμού paclitaxel+Trastuzumab 13%. Η καρδιοτοξικότητα είτε της paclitaxel είτε της Τραστοζουμάμπης ως μονοθεραπεία, ήταν 1% και 3-7%, αντίστοιχα. Η θνητότητα λόγω της καρδιοτοξικότητας, ήταν 1% τόσο στην ομάδα των γυναικών που ελάμβανε χημειοθεραπεία και Τραστοζουμάμπη, όσο και σ' αυτές που ελάμβαναν μονοθεραπεία με Τραστοζουμάμπη¹³.

Στη δική μας μελέτη η καρδιοτοξικότητα της τραστοζουμάμπης ήταν 38% (19 από τις 50 γυναίκες), ενώ η θνητότητα 6% (3 από 50 γυναίκες) λόγω μη αντιρροπούμενης καρδιακής ανεπάρκειας. Επιπλέον, 18 από τις 50 γυναίκες (36%) εμφάνισαν ποικίλου βαθμού ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας. Οι διαφορές στην συχνότητα καρδιοτοξικότητας και τη θνητότητα της δικής μας μελέτης αποδίδονται στο ότι οι γυναίκες έλαβαν αυξημένη ολική αθροιστική δόση επιρουμπικίνης (>900mg/m² έναντι 450mg/m² στις άλλες μελέτες), υπήρξε συγχρόνηση ταξάνων με επιρουμπικίνη πριν έξι μήνες και προηγήθηκε ακτινοβολία του ημιθωρακίου (προ εξαμήνου και περισσότερο). Η πιο συχνή εκδήλωση καρδιοτοξικότητας ήταν, αδυναμία-εύκολη κόπωση στο 47,8% των γυναικών, ακολούθησε η δύσπνοια κόπωσης στο 26,3%, ορθόπνοια-παροξυστική νυχτερινή δύσπνοια στο 10,5% και τέλος οξύ πνευμονικό οίδημα στο 15,7%. Στις γυναίκες που εμφάνισαν σοβαρές καρδιοτοξικές εκδηλώσεις έγινε διακοπή της Τραστοζουμάμπης και φαρμακευτική αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας με διουρητικά, α-MEA, δακτυλίτιδα και μικρές δόσεις β-αναστολέα. Η απάντηση στη θεραπεία ανήλθε στο 84%, ενώ η συμπτωματολογία των ασθενών βελτιώθηκε κατά ένα με δύο στάδια κατά NYHA. Ανάλογα ποσοστά βελτίωσης παρατηρήθηκαν και

στη μελέτη CREC (79%), καθώς και σε άλλες μελέτες¹³. Η Τραστοζουμάμπη χορηγήθηκε ξανά όταν σταθεροποιήθηκε η κλινική εικόνα των ασθενών και όταν το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας ήταν >40%, χωρίς διακοπή της θεραπείας για την καρδιακή ανεπάρκεια. Τα επίπεδα της προορμόνης του νατριουρητικού πεπτιδίου (pro-BNP) στον ορό των ασθενών εμφάνισαν υψηλή ευαισθησία (95%) στη διάγνωση της καρδιακής ανεπάρκειας, σχετίζονταν με την βαρύτητα της καρδιακής λειτουργίας μετά από την κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή. Οι πιθανοί μηχανισμοί της καρδιοτοξικής δράσης της Τραστοζουμάμπης είναι οι ακόλουθοι: ο ανταγωνισμός της ιδιοστασιακής δράσης της οδού HER₂ στην κυτταρική ανάπτυξη, η επιτάχυνση της αποδόμησης της πρωτεΐνης των υποδοχέων HER₂, η προαγωγή της προσέλκυσης κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος και η καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω του μηχανισμού κυτταροτοξικότητας και η ελάττωση της δραστηριότητας του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) καθώς και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων²⁻⁵.

Από την δική μας μελέτη δεν προέκυψαν αποδείξεις οι οποίες να ενοχοποιούν σαφείς παθογενετικούς μηχανισμούς. Ωστόσο, η πρόκληση των καρδιοτοξικών εκδηλώσεων σχετίζονταν με τα αυξημένα επίπεδα των κυτταροκινών IL-6 και TNF-α στον ορό των ασθενών. Οι φλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην εμφάνιση πολλών εκδηλώσεων του συνδρόμου της καρδιακής ανεπάρκειας. Επιδρούν στη λειτουργικότητα και στην αναδιάρθρωση της αριστερής κοιλίας¹⁴⁻²¹, προκαλούν δυσλειτουργία του ενδοθηλίου²²⁻²⁴ και ατροφία των περιφερικών μυών²⁵. Η παρουσία των HER₂ υποδοχέων, στα μυοκαρδιακά κύτταρα είναι γνωστό ότι σχετίζεται με την ικανότητα αυτών των κυττάρων για υπερτροφική απάντηση, όπως επίσης και στην παρεμπόδιση της αποπτωτικής διαδικασίας²⁶⁻³². Ο μηχανισμός με τον οποίο οι HER₂ υποδοχείς ασκούν την καρδιοπροστατευτική τους δράση δεν είναι απόλυτα σαφής. Φαίνεται ότι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση σημαντικών μεταβολικών δρόμων, όπως της αποπρωτεΐνης-1 (apo-1) και του πυρηνικού παράγοντα Kb (NF-Kb). Η apo-1 ρυθμίζει την έκφραση μιας ομάδας καρδιακών πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση υπερτροφίας, ενώ ο NF-Kb ρυθμίζει τα γονίδια που ελέγχουν την απάντηση των κυττάρων στο stress. Η ενεργοποίηση του NF-Kb εμποδίζει την απόπτω-

ση την οποία επάγει ο TNF- α . Ο αποκλεισμός των HER₂ διευκολύνει την απόπτωση. Έτσι ενώ είναι απόλυτα επιθυμητός για τον έλεγχο της κακοήθειας του μαστού, λειτουργεί ανασταλτικά στην προσπάθεια των μυοκαρδιακών κυττάρων να αποκαταστήσουν την βλάβη που προκλήθηκε από τις ανθρακυκλίνες (επιρουμπικίνη σε δόση >900mg/m²). Ο αποκλεισμός τους στερεί από το μυοκαρδιακό κύτταρο την προσαρμοστική υπερτροφία και την αναστολή της απόπτωσης, απαραίτητα στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάταση και τη

σφαιρική διαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, καθώς και τη διάταση του μιτροειδικού δακτυλίου που οδηγεί σε ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας. Συνεπώς ο αποκλεισμός των μυοκαρδιακών HER2 υποδοχέων πιθανόν προκαλεί την εμφάνιση μυοκαρδιοπάθειας από τραστοζουμάμπη. Τέλος για τη μείωση της καρδιοτοξικότητάς της θα μπορούσε να προταθεί η ολική αθροιστική δόση της επιρουμπικίνης να μην ξεπερνά τα 450 mg/m² ή αν αυτό δεν είναι δυνατό να προτιμάται η χρήση της λιποσωμιακής επιρουμπικίνης.

ABSTRACT

D. PLATOIANNIS, C. LAFARAS, G. GALAKTIDOU, A. KORTSARIS, E. HATZINIKOLAOU, TH. BISHINIOTIS, D. HATSERAS: **Prevalence of heart failure in women with metastatic breast cancer during Trastuzumab treatment**

Introduction: Trastuzumab is a monoclonal antibody used for the treatment of women with metastatic breast cancer and Her-2 receptor overexpression. The administration of trastuzumab commonly induces cardiotoxicity (congestive heart failure, mitral valve regurgitation). The aim of this study was the evaluation of the incidence of cardiotoxic events and the possible mechanism of the cardiovascular toxicity in women with metastatic breast cancer under trastuzumab therapy. **Methods:** Fifty consecutive women, (mean age 51, range 30-68 years) with metastatic breast cancer who were under trastuzumab treatment (2 mg/kg/week after an initial dose of 4mg/Kg) were included in this study. In all of them 6 cycles of FEC chemotherapy had been proceeded. All our patients underwent (a) routine cardiologic examination, (b) ecg and echocardiogram (c) calculation of proinflammatory cytokine levels (IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) and pro-BNP (brain natriuretic peptide) levels. The patients were examined before trastuzumab administration, monthly and by the appearance of cardiotoxic manifestations. **Results:** Symptoms of congestive heart failure observed in 19/50 patients (38%) and echocardiography / Doppler examination revealed mitral valve regurgitation in 18/50. At the time of clinically important cardiotoxicity there was significant increase in IL-6, TNF- α , and pro-BNP values. **Conclusion:** The incidence of cardiotoxicity in women with metastatic breast cancer under trastuzumab following anthracycline chemotherapy is high (38%) and is commonly manifested as heart failure. It is possibly mediated by Her-2 blockade and increased IL-6 and TNF- α levels. **Key-words:** Cardiotoxicity, trastuzumab, Her-2 receptor, proinflammatory cytokines. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):252-259, 2005.**

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Carter P, Presta L, Gorman CM, et al. Humanization of an anti-p185 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci. 1992; 89: 4285-9.
2. Baselga J, Norton L, Albanell J et al. Recombinant humanized anti-HER2 antibody enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2 neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res 1998; 58: 2825-31.
3. Pegram M, Hsu S, Lewis G et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/ neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. Oncogene 1999; 18: 2241-51.
4. De Santes K, Slamon D Andersen SK, et al. Radiolabeled antibody targeting of the HER2/ neu oncoprotein. Cancer Res 1992; 52: 1916-23.
5. Kumar R, Shepard HM, Mendelsohn J. Regulation of phosphorylation of the c-erbB2/HER2 gene

- product by a monoclonal antibody and serum growth factors in human mammary carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1991;11: 976-86..
6. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18: 4-25
 7. Ewer MS, Gibbs HR, Swafford J, et al. Cardiotoxicity in patients receiving Trastuzumab: primary toxicity, synergistic or sequential stress, or surveillance artifact. *Semin Oncol* 1999; 26: 99-101.
 8. Pegram MD, Baly D, Wirth C, et al. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in breast cancer patients in Phase III clinical trials of a humanized anti-HER2 antibody. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1997a; 38: 602.
 9. Lohrisch C., Piccart M. An overview of HER2: *Seminars in Oncology* 2001; 28(suppl 6): 3-11.
 10. Thomssen C. Trials of new combinations of Herceptin in metastatic breast Cancer. *Anti-Cancer drugs* Dec 2001; 12 (suppl 4): 19-25
 11. Smith I.E: Efficacy and safety of Herceptin in women with metastatic breast Cancer: results from pivotal clinical studies. *Oncol* 1999; 26: 60-70.
 12. Leonard DS, Hill AD, Kelly L et al. Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody therapy for breast cancer. *British Journal of Surgery* 2002 ;89(3): 262-71.
 13. Keefe D.L. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *American Cancer Society* May 2002.
 14. Seidman AD, Fornier M, Esteva F, et al. Final report: weekly Herceptin and taxol for metastatic breast cancer: analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000; 19: 83a (abstract319).
 15. Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumour necrosis factor in severe chronic heart failure. *N.Engl, J.Med.*1990; 323: 236-41
 16. Baumgarten G, Knueferman P, Mann DL, et al. Cytokines as emerging target in the treatment of heart failure. *Trends Cardiovasc.Med.*2000; 10: 216-23.
 17. Tracey K.J, Beutler B, Lowry SF, et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-4.
 18. Dinarello C.A. Interleukin-18. *Methods* 1999; 19: 121-32
 19. Young JB, Abraham WT, Stevenson LW, et al. Intravenous nisiritide vs. nitroglycerin for treatment of decompensated congestive heart failure: a randomized controlled trial *JAMA* 2002; 287: 1531-1540.
 20. Krown K.A, Page MT, Nguyen C, et al. TNF- α induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J.Clin.Invest* 1996; 98: 2854-65.
 21. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific over expression of TNF- α . *Circ.Res.* 1997; 81: 627-35.
 22. Li YY, Feng YQ, Kadokami T et al. Myocardial extra cellular matrix remodelling in transgenic mice over expressing tumour necrosis factor Alfa can be modulated by anti-tumour necrosis factor alpha therapy. *Proc.Natl.Acad Sci.* 2000; 97: 12746-51.
 23. Yu D, Liu B, Tan M, et al. Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene* 1996; 13: 1359-65.
 24. Agnoletti, Curello S, Bachetti T, et al. Serum from patients with severe heart failure downregulates Enos and is proapoptotic role of tumour necrosis factor- α . *Circulation* 1999; 100: 1983-91.
 25. Drexler H, Horning B. et al. Endothelial dysfunction in human disease L. *Mol.Cell.Cardiol.*1999; 31: 51-60.
 26. Mancini DM., Walter G, Reicher N, Et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1364-1373.
 27. Chien K.R. Myocyte survival pathways and cardiomyopathy: implication for trastuzumab cardiotoxicity. *Seminars in oncology* 2000; 27(suppl 11): 9-14.
 28. Sawyer D.B, Zuppinger C, Miller TA, et al. Modulation of anthracycline-induced myofibrillar disarray in rat ventricular myocytes by neuregulin-1b and anti-erbB2 potential mechanism for trastuzumab-induced cardiotoxicity. *Sem.Oncol.*2001; 28(suppl 5): 18-26.
 29. Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: : requirement for Datp and cytochrome c. *Cell* 1996;86: 147.
 30. Van Oers, Van der Heygen AA, Aarden LA. Interleukin-6 in serum and urine of renal transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol.*71, 314ff.
 31. Crone S.A, Zhao YY, Fan L, et al. HER2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *J.Natl.Cancer.Inst. (USA)* 2002May 1: 94(9): 650-1
 32. Garratt A.N, Ozcelik C, Birchmeier C. ErbB2 pathways in heart and neural disease. *Trends cardiovasc Med* 2003.13(2): 80-6

Ανοσοϊστοχημική μελέτη παραγόντων της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης στα καρκινώματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας

B. Καραβασίλης^{1,2}, B. Μαλάμου-Μήτση³, E. Μπριασούλης¹, E. Τσάνου³, E. Κίτσου⁴, Θ. Φώτσης⁵, X. Καλόφωνος⁶, Γ. Φούντζηλας⁷, N. Παυλίδης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κακοήθη νεοπλάσματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελούν μια ετερογενή ομάδα επιθετικών συμπαγών όγκων, των οποίων η βιολογική ταυτότητα ελάχιστα είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της έκφρασης αγγειογενετικών και πρωτεολυτικών παραγόντων στο ΚΑΠΕ σαν πιθανό δείκτη επιθετικότητας. Σε βιοπτικό υλικό παραφίνης 81 περιπτώσεων ΚΑΠΕ εκτιμήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία α) η μικροαγγειακή πυκνότητα (ΜΠ) με την έκφραση του CD-34 αντιγόνου, η έκφραση του VEGF και της θρομβοσποντίνης -1 (TSP-1) και β) η έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9 (MMP-2, MMP-9) και του αναστολέα τους TIMP-1. Η διάμεση τιμή της ΜΠ ήταν 69 μικροαγγεία/mm². Υψηλότερη ΜΠ παρατηρήθηκε στις λιγότερο ευνοϊκές περιπτώσεις ΚΑΠΕ. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF ανιχνεύθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων και της TSP-1 στο 80%. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της ΜΠ και του VEGF και αρνητική μεταξύ της ΜΠ και της TSP-1. Β) Ανοσοϊστοχημική έκφραση της MMP-2 ανιχνεύθηκε στο 69%, της MMP-9 στο 52% και του TIMP-1 στο 75% των περιπτώσεων. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ των MMP-2 και MMP-9 με τον TIMP-1. Χαμηλότερα επίπεδα TIMP-1 συσχετίστηκαν με καλύτερη επιβίωση (7.5 vs. 10.5 μήνες). Συμπερασματικά οι μηχανισμοί της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης βρέθηκαν ενεργοποιημένοι στο ΚΑΠΕ. Ο VEGF και ο TIMP-1 θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς μοριακούς θεραπευτικούς στόχους, σε μια ομάδα ασθενών που η επιβίωσή τους παραμένει φτωχή. **Λέξεις κλειδιά:** αγγειογένεση, μετάσταση, πρωτεόλυση, καρκίνος άγνωστου πρωτοπαθούς εστίας, VEGF, ΜΠ, TSP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1. **Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):260-272.**

¹Ογκολογική κλινική Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Ιωάννινα. ²Royal Marsden Hospital, Sarcoma Unit, London, UK. ³Παθολογοανατομικό εργαστήριο Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Ιωάννινα. ⁴Παθολογοανατομικό εργαστήριο Περιφερειακού γενικού νοσοκομείου Ιωαννίνων Γ. Χατζηκώστα, Ιωάννινα. ⁵Τμήμα Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα. ⁶Ογκολογικό τμήμα Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, Ρίο. ⁷Πανεπιστημιακό Ογκολογικό

τμήμα, Νοσοκομείου ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη. Το τμήμα που αφορά την αγγειογένεση έχει δημοσιευθεί στο περιοδικό BMC Cancer με τίτλο: "Angiogenesis in cancer of unknown primary: clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1", *BMC Cancer* 2005, 5:25. Υπεύθυνος αλληλογραφίας: Vasilios Karavasillis, Royal Marsden Hospital, Sarcoma Unit, Fulham road, London SW3 6JJ, UK, Tel +44(0) 207 808 2200, e-mail: vasilios.karavasillis@rnh.nhs.uk

Εισαγωγή

Τα κακοήθη νεοπλάσματα άγνωστης πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελούν περίπου το 3% του συνόλου των ανθρώπινων νεοπλασιών και αντιπροσωπεύουν μια ετερογενή ομάδα μεταστατικών όγκων για τους οποίους η πρωτοπαθής εστία δεν μπορεί να ανιχνευθεί κατά το χρόνο της αρχικής διάγνωσης, παρά την ενδελεχή διαγνωστική έρευνα¹. Η πρώιμη διασπορά, το απρόβλεπτο μεταστατικό πρότυπο και η επιθετικότητα αποτελούν τα κοινά χαρακτηριστικά των όγκων αυτών. Αν και η φυσική ιστορία των ΚΑΠΕ έχει επαρκώς χαρακτηρισθεί, εντούτοις η σε βάθος έρευνα για την αναζήτηση της μοριακής τους ταυτότητας παραμένει περιορισμένη²⁻⁴.

Για την εξέλιξη της μεταστατικής διαδικασίας η αγγειογένεση και η πρωτεόλυση αποτελούν δύο καθοριστικά βήματα. Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός νέων αγγείων, είναι ουσιαστική διαδικασία για την αύξηση των περισσότερων όγκων τόσο κατά το αρχικό τους στάδιο, αλλά και κατά το στάδιο της ανάπτυξης των μεταστάσεων σε απομακρυσμένες περιοχές του οργανισμού. Η αγγειογένεση προκύπτει από διαταραχή της ισορροπίας προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων με υπεροχή των πρώτων, ως απάντηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και του παρακείμενου στρώματος στα ερεθίσματα που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα. Από τα πιο μελετημένα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της αγγειογένεσης είναι ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου (VEGF) και η θρομβοσποντίνη-1 (TSP-1), ενώ ποσοτικά η αγγειογένεση εκτιμάται με τη μέτρηση της μικροαγγειακής πυκνότητας (ΜΠ)⁵.

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εγκαθίστανται και αναπτύσσονται σε απομακρυσμένες περιοχές (μετάσταση), εξαρτάται από τη δυνατότητά τους να διασπών και να διέρχονται από διαδοχικές βασικές μεμβράνες, οι οποίες παίζουν το ρόλο φραγμού. Κεντρικό ρόλο στη διάσπαση των μεμβρανών και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων παίζουν οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), μια μεγάλη οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων^{6,7}. Από τη άλλη, οι αναστολείς των MMP, TIMP, φάνηκε να έχουν διπλό ρόλο στη μετάσταση των όγκων, τόσο αναστέλλοντας όσο και προάγοντάς την, ανάλογα με τις συνθήκες του ιστικού μικροπεριβάλλοντος⁸. Οι διαδικασίες της αγγειογένεσης και της πρωτεόλυσης είναι συζευγμένες και εξαρτώνται από κοινούς ρυθμιστικούς παράγοντες⁹.

Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση της ανοσοιστοχημικής έκφρασης των παραγόντων της αγγειογένεσης, VEGF, TSP-1 και ΜΠ και των πρωτεολυτικών ενζύμων MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 και η συσχέτιση τόσο μεταξύ τους όσο και με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Υλικό και μέθοδοι

Συνολικά επιλέχθηκαν 81 περιπτώσεις ΚΑΠΕ που διαγνώστηκαν και αντιμετωπίστηκαν σε 3 Πανεπιστημιακά Ογκολογικά κέντρα (Ιωαννίνων, Ρίου και Θεσσαλονίκης) κατά χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο του 1998 έως τον Δεκέμβριο του 2003 με βάση τη διαθεσιμότητα του βιοπτικού υλικού και την πρόσβαση στους ιατρικούς φακέλους. Το παθολογοανατομικό υλικό ανασκοπήθηκε ανεξάρτητα από δύο παθολογοανατόμους, χωρίς γνώση της προηγούμενης ιστολογικής διάγνωσης και επιλέχθηκε ένας αντιπροσωπευτικός κατά περίπτωση κύβος παραφίνης για εφαρμογή ανοσοιστοχημείας.

Οι περιπτώσεις που επιλέχθηκαν διαχωρίστηκαν σε ευνοικότερες και λιγότερο ευνοϊκές υποομάδες¹⁰. (Τα χαρακτηριστικά των ασθενών και τα δεδομένα που αφορούν τη θεραπεία και την κλινική έκβαση παραθέτονται στους πίνακες 1 και 2). Χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα κατανομής μέσης γραμμής, θηλώδη αδενοκαρκίνωμα της περιτοναϊκής κοιλότητας, μονήρης εστία αδενοκαρκινώματος μασχαλιαίων λεμφαδένων, πλακώδες καρκίνωμα λεμφαδένων περιοχής τραχήλου και χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινικά καρκινώματα χαρακτηρίζονται ως ευνοϊκότεροι υπότυποι. Αντίθετα, μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα ήπατος, πολλαπλές σπλαχνικές εντοπίσεις και εκτεταμένη οστική μεταστατική νόσος χαρακτηρίζονται ως λιγότερο ευνοϊκοί υπότυποι ΚΑΠΕ.

Οι περισσότεροι ασθενείς (78%) αντιμετωπίστηκαν με χημειοθεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό, ενώ 4 ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις έλαβαν ολοκράνια ακτινοβολία. Αντικειμενική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία διαπιστώθηκε σε 34 ασθενείς (53%), ενώ ένας ασθενής με εγκεφαλικές μεταστάσεις ανταποκρίθηκε στην ακτινοθεραπεία. Η διάμεση επιβίωση όλων των ασθενών ήταν 10.5 μήνες (γράφημα 1). Οι ασθενείς της ομάδας ευνοικότερης πρόγνωσης ένα οριακά υψηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης στη θεραπεία (Fisher's t-test, $p = 0.04$) και μια σχετικά καλύτερη επιβίωση 11.5 έναντι 8.5 months ($p = 0.01$).

Οι αγγειογενετικοί παράγοντες μελετήθηκαν στο σύνολο των περιστατικών, ενώ οι πρωτεολυ-

Πίνακας 1. Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

Χαρακτηριστικά	No	(%)
Ασθενείς	81	
Φύλο		
Άνδρες	39	48
Γυναίκες	42	52
Ηλικία (έτη)		
Διάμεση	66	
Διακύμανση	37-84	
Κατάσταση φυσικής ικανότητας (PS)		
Διάμεση		
Διακύμανση	0-3	
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκινώματα	62	77
Καλής και μέσης διαφοροποίησης	27	43
Πτωχής διαφοροποίησης	35	57
Αδιαφοροποίητα καρκινώματα	15	18
Με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες	5	33
Άλλα αδιαφοροποίητα νεοπλάσματα	11	67
Πλακώδη καρκινώματα	4	5
Μεταστατικές εστίες κατά τη διάγνωση		
Ηπατικές ή/και πολλαπλές σπλαχνικές εντοπίσεις	17	21
Λεμφαδενική νόσος	23	29
Μεσοθωράκιο - οπισθοπεριτόναιο	17	74
Μασχαλαία χώρα	2	9
Τραχηλική χώρα	4	17
Περιτοναϊκή κοιλότητα	19	23
Αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου σε γυναίκες	14	74
Κακοήθης ασκίτης και άλλες εστίες	5	26
Πνευμονικές μεταστάσεις	5	6
Οστικές μεταστάσεις	5	6
Εγκεφαλικές μεταστάσεις	4	5
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	4	5
Πολλαπλές μεταστατικές εστίες	4	5

Πίνακας 2. Κλινικοί υπότυποι ΚΑΠΕ και η κλινική τους έκβαση.

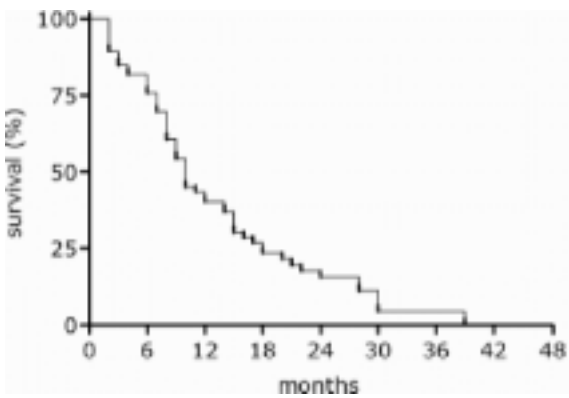
	No	(%)
Υπότυποι		
Ευνοϊκοί	50	62
Μη ευνοϊκοί	31	38
Θεραπευτικοί χειρισμοί		
Χημειοθεραπεία (με βάση την πλατίνα)	64	78
Ακτινοθεραπεία	4	6
Διάμεση επιβίωση (μήνες)		
Όλοι οι ασθενείς	10.5	
Ευνοϊκές περιπτώσεις	11.5	
Μη ευνοϊκές περιπτώσεις	8.5	

τικοί παράγοντες σε 75 περιπτώσεις, λόγω εξάτλησης του υλικού.

Ανοσοϊστοχημεία

Σε ιστικές τομές παραφίνης πάχους 5 mm,

που είχαν προηγουμένως μονιμοποιηθεί σε φορμαλδεύδη, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (μέθοδος LSAB). Συνοπτικά οι τομές παραφίνης υπέστησαν αποπαραφίνωση σε διάλυμα ξυλόλης και αφυδάτωση. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διά-



Γράφημα 1. Επιβίωση του συνόλου των ασθενών με ΚΑΠΕ της μελέτης.

λυμα κιτρικού οξέος (0,1m, pH 0,6) και ακολούθως τοποθετήθηκαν δύο φορές σε φούρνο μικροκυμάτων από 15 λεπτά. Έπειτα όλες οι τομές επώασθησαν για 30 λεπτά με μεθανολικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 0,3% για καταστολή της ενδογενούς δραστηριότητας της υπεροξειδάσης. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν τα κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών έναντι των ανθρώπινων αντιγόνων CD34 (code M 7165, Dako) σε διάλυση 1/50 θ) VEGF Ab-3 (code Jh121, Neomarkers) σε διάλυση 1/50 γ) thrombospondin (code Mob 315, DBS) σε διάλυση 1/50, δ) MMP-2 (MNCL-MMP-2-507, Novocastra) σε διάλυση 1/3000, ε) MMP-9 (NCL-MMP-9, Novocastra) σε διάλυση 1/2000 και στ) TIMP-1 (NCL-TIMP-1, Novocastra) σε διάλυση 1/30. όλες οι διαλύσεις έγιναν σε διάλυμα TBS-1% BSA και ακολούθησε ολονύκτια επώαση σε όλες τις περιπτώσεις. Η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση έγινε με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Αγγειογενετικοί παράγοντες

Η χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων με το αντίσωμα CD34 χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ΜΠ. Κάθε ξεχωριστή ομάδα θετικών στο CD34 κυττάρων θεωρήθηκε ότι αποτελεί ένα μετρήσιμο νεοαγγείο. Η ύπαρξη βασικής μεμβράνης δεν ήταν απαραίτητη για τη διάκριση των νεοαγγείων. Μεγαλύτεροι αγγειακοί σχηματισμοί που έφεραν λεπτό μυϊκό χιτώνα αποκλείστηκαν από τη μέτρηση. Ως Μικροαγγειακή πυκνότητα (ΜΠ) ορίστηκε η μέση τιμή των παρατηρούμενων μικροαγγείων σε τρεις περιοχές υψηλής νεοαγγείωσης (hot spots) σε μεγέθυνση χ 400. Η μέ-

τρηση των νεοαγγείων έγινε από δύο παρατηρητές, ανεξάρτητα, χωρίς να υπάρχει γνώση των κλινικών πληροφοριών. Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης ο καθορισμός υψηλής και χαμηλής ΜΠ έγινε με όριο (cut off point) τη διάμεση τιμή του CD 34.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF παρατηρήθηκε κατεξοχήν στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και σε στρωματικά. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μόνο η επιθηλιακή έκφραση. Για την εκτίμηση του VEGF συνυπολογίστηκε η χρωστική ένταση (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση και το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων που εμφάνιζαν κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα (0, 1: <25%, 2: 26-50% και 3: >50%). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση καθοριζόταν από το άθροισμα των επιμέρους χαρακτηριστικών. Μέγιστο άθροισμα ήταν το 6. Οι τιμές 1-2 αντιπροσώπευαν χαμηλή έκφραση, η τιμή 3 ενδιάμεση και τιμές >3 υψηλή έκφραση του VEGF.

Η Ανοσοϊστοχημική έκφραση της TSP-1 έγινε με βάση τη χρωστική ένταση της στρωματικής έκφρασης (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση).

Πρωτεολυτικοί παράγοντες

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 παρατηρήθηκε κατεξοχήν στα νεοπλασματικά κύτταρα και λιγότερο στους ινοβλάστες και τα λεμφοκύτταρα. Η στρωματική έκφραση των πρωτεολυτικών παραγόντων, αν και εκτιμήθηκε, δεν συμπεριλήφθηκε στη στατιστική ανάλυση. Για την εκτίμηση των παραγόντων της πρωτεόλυσης συνυπολογίστηκε ο βαθμός της χρωστικής έντασης (0= αρνητική έκφραση, 1= μικρή ένταση, 2=μέτρια ένταση και 3= υψηλή ένταση) και το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων που εμφάνιζαν κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα (0: αρνητική χρώση, 1: <25%, 2: 26-50% και 3: >50%). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση καθοριζόταν από το άθροισμα των επιμέρους χαρακτηριστικών. Για τους σκοπούς της στατιστικής ανάλυσης ο διαχωρισμός υψηλής και χαμηλής έκφρασης έγινε με όριο (cut off point) τη διάμεση τιμή της ανοσοϊστοχημικής βαθμονόμησης.

Στατιστικές δοκιμασίες

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης αναλύ-

θηκε τόσο μεταξύ των επιμέρους παραγόντων μεταξύ τους, όσο και ως προς διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που έχουν προγνωστική σημασία στα ΚΑΠΕ (ηλικία, ιστολογική διαφοροποίηση, κλινικές υποομάδες, ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και η επιβίωση). Χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ακριβούς πιθανότητας του Fisher, η ανάλυση παλινδρόμησης (logistic regression analysis), η δοκιμασία student's (t-test δύο δειγμάτων) για έλεγχο της διαφοροποίησης των τιμών μεταξύ των διαφόρων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων, το διάγραμμα Kaplan-Meier για την εκτίμηση της επιβίωσης και η δοκιμασία log-rag για σύγκριση της καμπύλης επιβίωσης ανάμεσα σε ομάδες ασθενών με διαφορετικές τιμές των αγγειογενετικών και πρωτεολυτικών παραγόντων. Για τη στατιστική ανάλυση και τα γραφικά χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά υπολογιστικά προγράμματα Graphpad Instat version 3.05 (Graphpad Software, Inc, San Diego, CA) and Prism version 4 (Graphpad Software, Inc, San Diego, CA).

Αποτελέσματα

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των VEGF, CD 3, και TSP-1

Η Ανοσοϊστοχημική έκφραση των VEGF CD 34 και TSP-1 αξιολογήθηκε και στις 81 περιπτώσεις της μελέτης.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF παρατηρήθηκε στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κύτταρων σε όλες τις μελετηθέντες περιπτώσεις. Η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 5 (με διακύμανση 3-6). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση ήταν ισχυρή στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (83%) και ενδιάμεση στο υπόλοιπο 17%. (Πίνακας 3) Η ένταση της χρωστικής πα-

ρουσίαζε ετερογένεια μεταξύ των δειγμάτων με περιοχές πολύ ισχυρής αλλά και ασθενέστερης έντασης. Σε μικρό αριθμό δειγμάτων παρατηρήθηκε επίσης εστιακή στρωματική έκφραση του VEGF που αφορούσε κυρίως μακροφάγα και ινοβλάστες. Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του VEGF απεικονίζεται στην εικόνα 1.

Μικροαγγειακή πυκνότητα

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CD34 αντιγόνου παρατηρήθηκε στο σύνολο των περιπτώσεων. Η διάμεση τιμή των παρατηρούμενων νεοαγγείων στις περιοχές της υψηλότερης νεοαγγείωσης ήταν 59 μικροαγγεία/mm² (διάμεση τιμή 16-300 mm²). (Πίνακας 3) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του CD34 απεικονίζεται στην εικόνα 2. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της ΜΠ με τον VEGF (Spearman $r = 0.36$, $p = 0.0016$).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της TSP-1

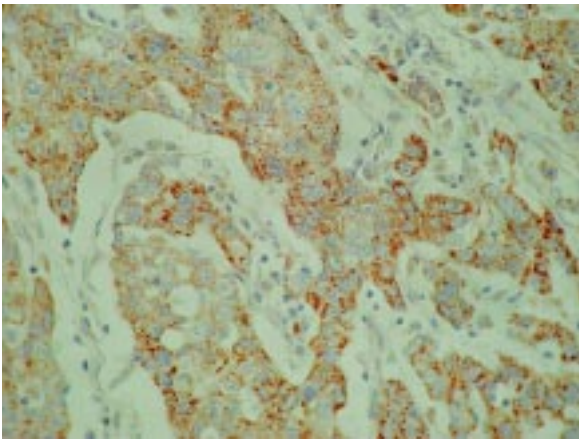
Η TSP-1 ανιχνεύθηκε κατά αποκλειστικότητα στα στρωματικά κύτταρα γύρω από το νεόπλασμα. Θετική ανοσοϊστοχημική χρώση παρατηρήθηκε σε ποσοστό 80%. Στο 20% των περιπτώσεων η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης χαρακτηρίστηκε ισχυρή και στο 60% ασθενής και ενδιάμεση. (Πίνακας 3) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της TSP-1 απεικονίζεται στην εικόνα 3. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της ΜΠ με τη TSP-1 (Spearman $r = -0.3426$, $p = 0.003$).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση των MMP-2, MMP-9 ΚΑΙ TIMP-1

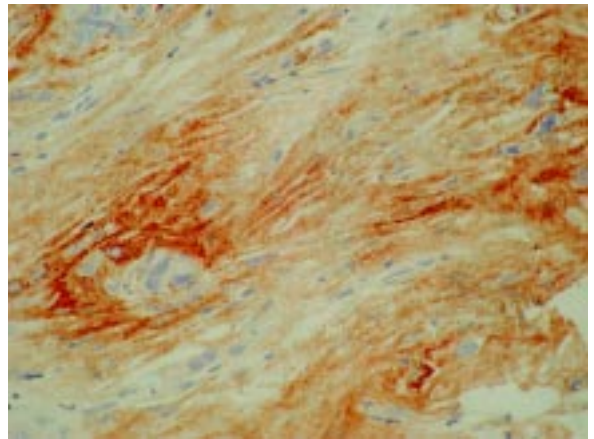
Η Ανοσοϊστοχημική έκφραση των MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 αξιολογήθηκε στις 75 από τις 81 περιπτώσεις της μελέτης, λόγω εξάντλησης του υλικού.

Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της αγγειογένεσης: CD 34, VEGF και TSP-1.

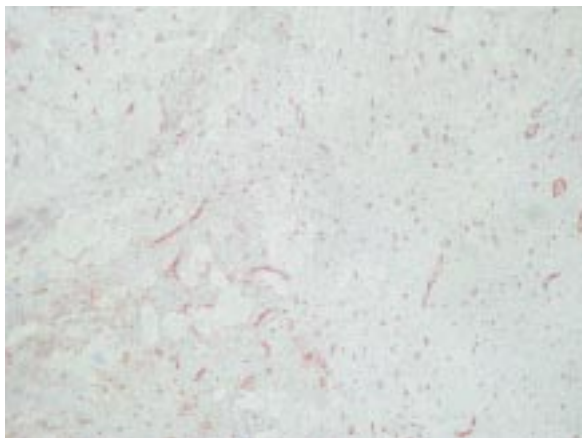
	VEGF	TSP-1	MVD (CD34)
<i>Ανοσοϊστοχημικό άθροισμα</i>			
Διάμεση τιμή (διακύμανση)	5 2-6	2 0-3	59 μικροαγγεία/ mm ² 16-300
<i>Χαρακτηρισμός ανοσοϊστοχημικής έκφρασης</i>			
Αρνητική	0	20	
Ασθενής	0	30	
Ενδιάμεση	17	30	
Ισχυρή	83	20	



Εικόνα 1. Ισχυρή κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων για τον VEGF σε περίπτωση χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας. Επισημαίνεται το χαρακτηριστικό κοκκιώδες πρότυπο της χρώσης και η κατά τόπους ασθενής αντίδραση των στρωματικών κυττάρων. (μεγέθυνση x400)



Εικόνα 3. Διάχυτη ισχυρή ανοσοαντιδραστικότητα της εξωκυττάριας ουσίας στην TSP 1, πλησίον νεοπλασματικής περιοχής (μεγέθυνση x400)



Εικόνα 2. Περίπτωση χαμηλής διαφοροποίησης ΚΑΠΕ που παρουσιάζει υψηλή πυκνότητα νεοπλασματικών νεοαγγείων, χαρακτηριζόμενα με το αντιγόνο CD 34 (μεγέθυνση x200).

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της MMP-2

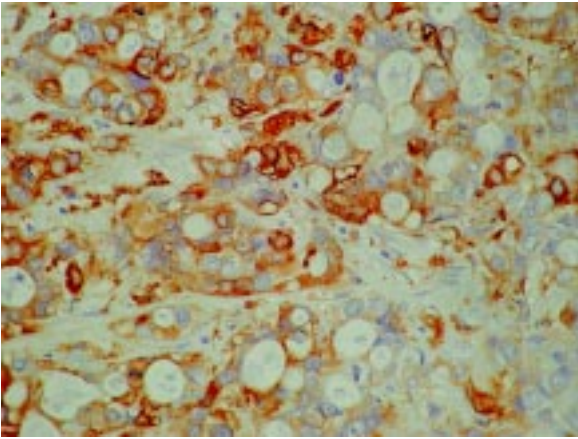
Η MMP-2 βρέθηκε θετική στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων σε ποσοστό 69%. Η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 4 (διακύμανση 0-6). Στο υπόλοιπο 31% η ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-2 χαρακτηρίστηκε ως αρνητική. Στις μισές σχεδόν περιπτώσεις (49%) η έκφραση της MMP-2 χαρακτηρίστηκε ισχυρή και στο 20% ως ασθενής και ενδιάμεση. Ασθενής στρωματική έκφραση της MMP-1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <30% των θετικών περιπτώσεων. (Πίνακας 4) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-2 απεικονίζεται στην εικόνα 4.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση της MMP-9

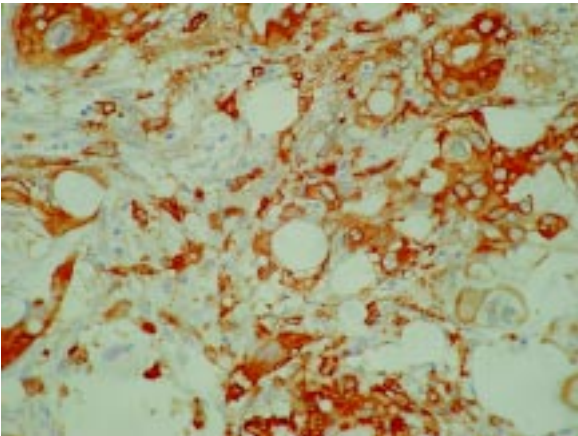
Η MMP-9 βρέθηκε θετική στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων στις μισές σχεδόν περιπτώσεις (ποσοστό 49%), ενώ στις υπόλοιπες ήταν αρνητική (ποσοστό 51%). Η διάμεση

Πίνακας 4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2, MMP-9 και TIMP-1

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1
	<i>Ανοσοϊστοχημικό άθροισμα</i>		
Διάμεση τιμή	4	0	3
Διακύμανση	0-6	0-5	0-6
	<i>Χαρακτηρισμός της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (%)</i>		
Αρνητική	31	51	21
Ασθενής και ενδιάμεση	20	13	35
Ισχυρή	49	36	44



Εικόνα 4. Ισχυρή με ενδιάμεση κυτταροπλασματική χρώση της MMP 2 που εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας. (μεγέθυνση x400)



Εικόνα 5. Διάχυτη κυτταροπλασματική ανοσοαντιδραστικότητα της MMP 9 σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας. (μεγέθυνση x200)

τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 0 (διακύμανση 0-5). Ισχυρή έκφραση της MMP-9 παρατηρήθηκε στο 36% των περιπτώσεων, ενώ στο υπόλοιπο 13% η έκφραση ήταν ασθενής και ενδιάμεση. Ασθενής στρωματική έκφραση της MMP-9 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <25% των θετικών περιπτώσεων. (Πίνακας 4) Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση της MMP-9 απεικονίζεται στην εικόνα 5.

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του TIMP-1

Θετική ανοσοϊστοχημική έκφραση του TIMP-1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό 79%, ενώ στο υπόλοι-

πο 21% η χρώση ήταν αρνητική. Η διάμεση τιμή του ανοσοϊστοχημικού αθροίσματος ήταν 3 (διακύμανση 0-6). Στο 44% των περιπτώσεων η ανοσοϊστοχημική χρώση χαρακτηρίστηκε ισχυρή, ενώ στο 35% ασθενής και ενδιάμεση. Ασθενής στρωματική έκφραση του TIMP-1 παρατηρήθηκε σε ποσοστό <40% των θετικών περιπτώσεων (Πίνακας 4). Χαρακτηριστική ανοσοϊστοχημική χρώση του TIMP-1 απεικονίζεται στην εικόνα 6. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των MMP και του TIMP-1. Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του VEGF και της ΜΠ με τους παράγοντες της πρωτεόλυσης.

Συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Υψηλότερη νεοαγγείωση παρατηρήθηκε στις λιγότερο ευνοϊκές περιπτώσεις ΚΑΠΕ (70 έναντι 46 μικροαγγεία/ mm², $\rho=0.034$). Εντούτοις δεν παρατηρήθηκε στατιστική συσχέτιση με την επιβίωση. Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της ΜΠ με την ιστολογική διαφοροποίηση, την ηλικία και την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Όμοια για τον VEGF και τη TSP-1 δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που αναλύθηκαν. (Πίνακας 5)

Η έκφραση του TIMP-1 βρέθηκε στατιστικά σημαντική στις ευνοϊκές περιπτώσεις ΚΑΠΕ ($p = 0.005$, Fisher's Exact Test). Υψηλότερα επίπεδα TIMP-1 σχετίστηκαν με φτωχότερη επιβίωση (7.5 έναντι 12 μήνες, $p=0.016$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης του TIMP-1 με την έκφραση των MMP ή τις υπόλοιπες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των MMP και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων της μελέτης. (Πίνακας 6)

Συζήτηση

Η μέχρι σήμερα έρευνα για την αναζήτηση της βιολογικής ταυτότητας του ΚΑΠΕ παραμένει περιορισμένη. Διάφορες μελέτες έδειξαν την υπερέκφραση διαφόρων ογκοπρωτεονών, αλλά δυστυχώς, λόγω της απουσία συσχετίσεων με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους δεν συνέβαλαν αρκετά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών¹¹⁻¹³. Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση διαφόρων μορίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και την πρωτεόλυση: του σημαντικότερου διεγέρτη της αγγειογένεσης VEGF, της ποσοτικής έκφρασης της αγγειογένε-

Πίνακας 5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της αγγειογένεσης CD34 (MVD), VEGF, and TSP-1 και συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Παράμετρος	MVD (counts)		VEGF (%)		TSP-1 (%)			
	Διάμεση τιμή CD 34	P value	Χαμηλό (<4)	υψηλό (≥3)	P value	Χαμηλή (<2)	Υψηλή (≥2)	P value
Ηλικία								
< 65	62		20	80		35	27	
> 65	58	ns	15	85	ns	22	16	ns
Ιστολογική διαφοροποίηση								
Υψηλή και μέση διαφορ.	55		3	28		12	20	
Χαμηλή διαφορ και αδιαφοροποίητα	59	ns	14	55	ns	32	36	ns
Κλινικές υποομάδες								
Ευνοϊκές	46		6	46		28	23	
Μη ευνοϊκές	70	0.034	11	37	ns	22	27	ns
Θεραπευτικό αποτέλεσμα								
Ανταποκριθέντες	58		11	39		22	28	
Μη ανταποκριθέντες	59	ns	4	46	ns	25	25	ns
Επιβίωση (μήνες)	10.5		9.8	11	ns	10	10.5	ns

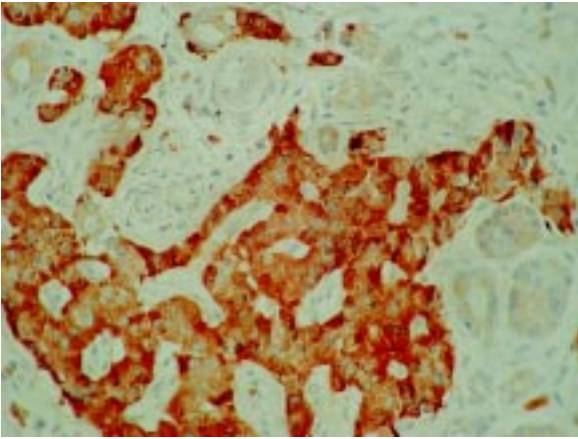
Πίνακας 6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των παραγόντων της πρωτεόλυσης MMP-2, MMP-9 και TIMP-1 και συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Παράμετρος	MMP-2 (%)		P value	MMP-9 (%)		P value	TIMP-1 (%)		P value
	χαμηλή (<4)	Υψηλή (≥4)		Αρνητική	Θετική		Χαμηλή (<3)	Υψηλή (≥3)	
Ηλικία									
< 65	21	29		20	40		35	27	
> 65	32	18	ns	15	25	ns	22	16	ns
Ιστολογική διαφοροποίηση									
Καλής και μέσης διαφορ.	32	34		23	19		12	20	ns
Χαμηλής διαφορ. και αδιαφορ	18	16	ns	33	25	ns	32	36	ns
Κλινικές υποομάδες									
Ευνοϊκές	24	26		36	16		43	15	
Μη ευνοϊκές	29	21	ns	26	22	ns	16	26	0.005
Θεραπευτικό αποτέλεσμα									
Ανταποκριθέντες	37	21		11	39		22	28	
Μη ανταποκριθέντες	31	11	ns	4	46	ns	25	25	ns
Επιβίωση (μήνες)	11	9	ns	11.8	11.2	ns	12	7.5	0.016

σης που εκφράζεται με τη ΜΠ, του ενδογενή αντιαγγειογενετικού παράγοντα TSP-1, των αντιπροσωπευτικών μελών MMP-2 και MMP-9 από την οικογένεια των μεταλλοπρωτεονασών και του αναστολέα TIMP-1.

Συνολικά, δείξαμε ότι στα ΚΑΠΕ υπάρχει μια υψηλή αγγειογενετική δραστηριότητα αναφορικά

με την έκφραση του VEGF και της ΜΠ. Σε μια παρόμοια ανοσοϊστοχημική μελέτη του Hillen και συν. έγινε προσπάθεια σύγκρισης της ΜΠ (εκτιμώμενης με τον παράγοντα Willebrand και με το CD34 μεταστατικών αδενοκαρκινωμάτων ήπατος προερχόμενων από ΚΑΠΕ και από γνωστές πρωτοπαθείς εστίες καρκίνου του μαστού και του



Εικόνα 6. Διάχυτη ετερογενής έκφραση της TIMP-1 σε περίπτωση αδενοκαρκινώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας. Διακρίνεται η παρουσία χαρακτηριστικής κυτταροπλασματικής έκφρασης των καρκινικών κυττάρων και η παρουσία ασθενούς χρώσης των στρωματικών κυττάρων. (μεγέθυνση x400)

παχέος εντέρου και παρατήρησαν υψηλή ΜΠ και στις δύο ομάδες¹⁴. Στη δική μας μελέτη βρέθηκε υψηλότερη νεοαγγείωση στις λιγότερο ευνοϊκές υποομάδες ΚΑΠΕ. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν ως ένα βαθμό να ερμηνεύσουν την μεγαλύτερη επιθετικότητα κάποιων υποτύπων ΚΑΠΕ.

Ο VEGF παίζει κεντρικό ρόλο και η ΜΠ αποτελεί την ποσοτική έκφραση στον καταρράκτη της αγγειογένεσης¹⁵. Ο VEGF βρέθηκε να εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων σε όλες τις μελετηθέντες περιπτώσεις και σε ποσοστό 83% παρατηρήθηκε υπερέκφρασή του. Επίσης βρέθηκε θετική συσχέτιση της έκφραση του VEGF με την ΜΠ. Παρόμοια συσχέτιση του VEGF και της ΜΠ έχει βρεθεί να έχει προγνωστική αξία σε ποικίλους όγκους¹⁶⁻¹⁸. Αποτύχαμε όμως να καταδείξουμε οποιαδήποτε συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (ηλικία, ιστολογική διαφοροποίηση, κλινικές υποομάδες, ανταπόκριση στη θεραπεία και επιβίωση), γεγονός που αποδόθηκε στην σχεδόν απόλυτη υπερέκφραση του VEGF, στην υψηλή τιμή της ΜΠ και στην ετερογένεια του υλικού.

Από την άλλη πλευρά, βρήκαμε υπερέκφραση της TSP-1 σε μόλις 20% των περιπτώσεων, ενώ στις μισές περιπτώσεις βρέθηκε απύουσα ή ασθενώς εκφραζόμενη. Επιπλέον παρατηρήσαμε μια αντίστροφη συσχέτιση της TSP-1 με τη ΜΠ, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες σε καρκινώματα παγκρέατος και στομάχου^{19,20}. Ο ρόλος της TSP-1 στον πολλαπλασιασμό των

επιθηλιακών κυττάρων και στην ανάπτυξη μεταστάσεων παραμένει αντιφατικός. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η TSP-1 μπορεί να προωθήσει την προσκόλληση και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης του ενεργοποιητή της ουροκινάσης του πλασμινογόνου και του υποδοχέα του²¹, της ενεργοποίησης του TGF-beta¹²² και της ενεργοποίησης των μεταλλοπρωτεϊνών 2 και 9^{23,24}. Σε κλινικές μελέτες η υπερέκφραση της TSP-1 έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων και δυσμενούς κλινική έκβασης σε μια πλειάδα συμπαγών όγκων²⁵⁻²⁸. Εντούτοις, άλλες κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η TSP-1 σχετίζεται με χαμηλή ΜΠ και εμποδίζει την πρόοδο και την ανάπτυξη των όγκων αποτελώντας δείκτη χαμηλότερης επιθετικότητας και ευνοϊκότερης πρόγνωσης σε καρκινώματα μαστού, παχέος εντέρου και ουροδόχου κύστης²⁹⁻³¹. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα υποθέτουμε ότι η σχετικά χαμηλή έκφραση της TSP-1 στο ΚΑΠΕ αντανακλά σε μια σχετική καταστολή των ανασταλτικών μηχανισμών της, γεγονός που επίσης συμβάλει στην επιθετικότητα αυτών των όγκων. Δυστυχώς όμως και πάλι δεν βρήκαμε συσχέτιση της TSP-1 με τις κλινικές υποομάδες ΚΑΠΕ και την κλινική πορεία, πιθανώς λόγω της ετερογένειας του υλικού.

Οι ασθενείς με ΚΑΠΕ έχουν γενικά δυσμενή πρόγνωση και η διάμεση επιβίωσή τους δεν ξεπερνά τους 10 μήνες^{32,33}. Πρέπει να τονίσουμε ότι υπό τον όρο ΚΑΠΕ συμπεριλαμβάνονται ετερογενείς όγκοι που όμως ομαδοποιούνται μαζί σε διάφορες βιολογικές και κλινικές μελέτες για στατιστικούς λόγους. Ωστόσο μερικοί ασθενείς, παρόλο που αποτελούν διακριτές ομάδες με ιδιαίτερη βιολογική ταυτότητα, έχουν ευνοϊκότερη πρόγνωση και απολαμβάνουν μεγαλύτερης επιβίωσης, από ότι οι άλλες υποομάδες, εντούτοις εντάσσονται στον όρο ΚΑΠΕ. Τέτοι είναι οι νέοι ασθενείς με όγκους μέσης κατανομής και οι γυναίκες με αδενοκαρκινωμάτωση περιτοναίου ή μεμονωμένη μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια³⁴⁻³⁷. Στη μελέτη μας η ΜΠ βρέθηκε χαμηλότερη στην ομάδα της ευνοϊκότερης πρόγνωσης, αλλά ούτε αυτή ούτε ο VEGF ή η TSP-1 σχετίστηκαν με γνωστούς προγνωστικούς παράγοντες³⁸. Σχεδόν παρόμοια αποτελέσματα είχε και η μικρή σε αριθμό μελέτη του Hillen και συν. που βρήκαν σε ηπατικές μεταστάσεις ΚΑΠΕ ότι η ΜΠ σχετίστηκε με οριακή μικρότερη επιβίωση³⁹.

Αναφορικά με την έκφραση των πρωτεολυτικών παραγόντων, βρήκαμε μια διαφορετικού βαθμού έκφραση των MMP 2 και 9 σε μεταστάσεις

ΚΑΠΕ. Η MMP-2 βρέθηκε να εκφράζεται στα δύο τρίτα των μελετημένων περιπτώσεων και η MMP-9 στις μισές από αυτές. Αυξημένη έκφραση MMP-2 και 9 έχει βρεθεί σε πολυάριθμους τύπους συμπαγών όγκων^{40,41}. Το επίπεδο έκφρασής τους έχει συσχετιστεί με την επιθετικότητα των όγκων και συγκεκριμένα με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, το προχωρημένο κλινικό στάδιο, τα αυξημένα ποσοστά υποτροπής και τη φτωχότερη επιβίωση⁴²⁻⁴⁵. Επίσης η έκφραση διαφόρων μελών της οικογένειας των MMP έχει φανεί ότι αυξάνεται στα προχωρημένα στάδια και σχετίζεται με την επιθετικότητα και τη δημιουργία μεταστάσεων^{46,47}. Ωστόσο και πάλι δεν καταδείξαμε συσχέτιση της έκφρασης των MMP με την επιβίωση, η οποία είναι ούτως ή άλλως φτωχή στα ΚΑΠΕ.

Η συνέκφραση διάφορων μελών της οικογένειας των MMP με τους αναστολείς τους φαίνεται να είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών καρκινωμάτων⁴⁸. Σε αυτήν την μελέτη, σημαντική συνέκφραση των MMP-2 και 9 με τον TIMP-1 παρατηρήθηκε σε ένα μεγάλο ποσοστό των μελετηθέντων περιπτώσεων ΚΑΠΕ. Παρόλαυτά δεν παρατηρήθηκε καμιά συσχέτιση μεταξύ των MMP με τον TIMP-1. Αυτό ενδεχομένως εξηγείται από το γεγονός ότι ο TIMP-1 είναι ένας μη ειδικός αναστολέας, αναστέλλοντας παράλληλα τη δράση πολλαπλών μελών της οικογένειας των MMP^{49,50}. Επιπλέον υπάρχουν ισχυρά βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι TIMP έχουν πολυπαραγοντική δράση, με ιδιότητες όχι μόνο ανασταλτικές αλλά και ευοδωτικές των μεταστατικών διεργασιών⁵¹.

Υπερέκφραση του TIMP-1 έχει συνδεθεί με εμφάνιση μεταστάσεων και επομένως χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου⁵² και καρκίνο του μαστού⁵³⁻⁵⁵, εντούτοις

η έκφρασή του στις μεταστάσεις δεν έχει μελετηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα. Στη δική μας μελέτη ο TIMP-1 βρέθηκε να εκφράζεται στην πλειοψηφία των μελετηθέντων περιπτώσεων ΚΑΠΕ και περίπου στις μισές από αυτές η έκφραση θεωρήθηκε ισχυρή. Σημαντικά υψηλότερη έκφραση TIMP-1 παρατηρήθηκε στις λιγότερο ευνοϊκές περιπτώσεις ΚΑΠΕ. Στη μονοπαραγοντική ανάλυση, η υψηλότερη έκφραση TIMP-1 σχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση (7.5 έναντι 12 μηνών), δείχνοντας τον πιθανό προγνωστικό του ρόλο στα ΚΑΠΕ, αλλά και εξηγώντας εν μέρει την επιθετικότητα αυτών των υποομάδων.

Αν και οι διεργασίες της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης δεν είναι ανεξάρτητες αλλά συζευγμένες, ενεργοποιούμενες και ρυθμιζόμενες από κοινούς παράγοντες, εντούτοις η ταυτόχρονη μελέτη διαφόρων παραγόντων είναι πολύ περιορισμένη. Σε δύο μελέτες που αφορούσαν καρκίνο του νεφρού δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης του VEGF και της ΜΠ με τις MMP-2 και 9^{56,57}. Στη δική μας μελέτη επίσης δεν βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης των παραγόντων της αγγειογένεσης με τους παράγοντες της πρωτεόλυσης, πιθανώς για τους λόγους που έχουμε εξηγήσει πιο πάνω.

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι οι μηχανισμοί της πρωτεόλυσης και της αγγειογένεσης είναι ενεργοποιημένοι στο ΚΑΠΕ, γεγονός που υποδηλώνει και την επιθετική συμπεριφορά αυτών των νεοπλασμάτων. Η σχεδόν απόλυτη υπερέκφραση του VEGF και η πιθανή σημασία του TIMP-1 ως αρνητικού προγνωστικού παράγοντα, θέτει το ερώτημα της εφαρμογής στην κλινική πράξη στοχευμένων θεραπειών στους ασθενείς αυτούς που η δόκιμη θεραπεία και η βελτίωση της επιβίωσης παραμένουν ζητούμενα.

ABSTRACT

V. KARAVASILIS, V. MALAMOU-MITSI, E. BRIASOULIS, E. TSANOU, E. KITSOU, TH.FO-TSIS, CH. KALOFONOS, G. FOUNTZILAS, N. PAVLIDIS: **Angiogenesis and proteolysis in cancer of unknown primary: an immunohistochemical study**

Cancer of unknown primary (CUP) is a unique clinical entity characterized by early dissemination, unpredictability of metastatic pattern and aggressiveness constitute fundamental characteristics. Up to date little is known about the underlying biology of CUP. Aim of our study was to investigate angiogenesis and proteolysis in cup and to find of possible significance. Paraffin embedded tumor material from 81 patients diagnosed with CUP was used and Immunohistochemistry was performed by using monoclonal antibodies against CD34, VEGF, TSP-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. All tumors expressed VEGF (strong in 83%). Stromal expression of TSP-1 was seen in 80% of cases. MVD mean value was 59 and was higher in unfavourable cases.

MVD was positively associated with VEGF and negatively with TSP-1. No association was found between the expression of VEGF or TSP-1 and clinicopathological parameters. MMP-2 was found expressed in 69%, MMP-9 in 49% and TIMP-1 in 79% of studied cases. TIMP-1 was significantly higher in unfavorable compared tumors and was associated with a shorter survival of patients (7.5 vs 12 months). No other associations were detected. Angiogenesis and proteolysis are both activated in CUP. Investigation of anti-VEGF or TIMP-1 treatments is warranted in patients diagnosed with CUP who otherwise lack any potent therapeutic options. **Keywords:** angiogenesis, proteolysis, metastases, cancer of unknown primary, VEGF, MVD, TSP-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-1. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):260-272, 2005.**

REFERENCE LIST

1. Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary Origin. *Oncologist* 1997; 2(3): 142-152.
2. Briasoulis E, Tsokos M, Fountzilias G et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications. A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998; 18(3B): 1907-1914.
3. Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, Fountzilias G, Agnantis N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2563-2567.
4. Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39(14): 1990-2005.
5. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25(4): 581-611.
6. Remacle AG, Noel A, Duggan C et al. Assay of matrix metalloproteinases types 1, 2, 3 and 9 in breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 77(6): 926-931.
7. Rha SY, Yang WI, Kim JH et al. Different expression patterns of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer. *Oncol Rep* 1998; 5(4): 875-879.
8. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21(14): 2245-2252.
9. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(10): 960-970.
10. Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer* 2003; 39(14): 1990-2005.
11. Pavlidis N, Briassoulis E, Bai M, Fountzilias G, Agnantis N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995; 15(6B): 2563-2567.
12. Hainsworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of Her-2 in patients with poorly differentiated carcinoma or poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000; 18(3): 632-635.
13. Briasoulis E, Tsokos M, Fountzilias G et al. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: biological and clinical implications. A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998; 18(3B): 1907-1914.
14. Hillen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74(1): 81-85.
15. Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 1998; 184(2): 119-122.
16. Adams J, Carder PJ, Downey S et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Res* 2000; 60(11): 2898-2905.
17. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 73(7): 931-934.
18. Borre M, Offersen BV, Nerstrom B, Overgaard J. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Br J Cancer* 1998; 78(7): 940-944.
19. Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438(2): 116-120.
20. Zhang J, Ito R, Oue N et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6): 563-568.
21. Albo D, Rothman VL, Roberts DD, Tuszynski GP. Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the uroki-

- nase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer* 2000; 83(3): 298-306.
22. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta 1 in vivo. *Cell* 1998; 93(7): 1159-1170.
 23. Hayashido Y, Nakashima M, Urabe K et al. Role of stromal thrombospondin-1 in motility and proteolytic activity of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2003; 12(4): 447-452.
 24. Qian X, Wang TN, Rothman VL, Nicosia RF, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1997; 235(2): 403-412.
 25. Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438(2): 116-120.
 26. Kodama J, Hashimoto I, Seki N et al. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in epithelial ovarian tumor. *Anticancer Res* 2001; 21(4B): 2983-2987.
 27. Poon RT, Chung KK, Cheung ST et al. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 1): 4150-4157.
 28. Zhang J, Ito R, Oue N et al. Expression of thrombospondin-1 is correlated with microvessel density in gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2003; 442(6): 563-568.
 29. Rice AJ, Steward MA, Quinn CM. Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol* 2002; 55(12): 921-925.
 30. Kaio E, Tanaka S, Oka S et al. Clinical significance of thrombospondin-1 expression in relation to vascular endothelial growth factor and interleukin-10 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23(4): 901-911.
 31. Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(3): 219-227.
 32. Levi F, Te VC, Erler G, Randimbison L, La Vecchia C. Epidemiology of unknown primary tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38(13): 1810-1812.
 33. van de Wouw AJ, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW, Hillen HF. Epidemiology of unknown primary tumours; incidence and population-based survival of 1285 patients in Southeast Netherlands, 1984-1992. *Eur J Cancer* 2002; 38(3): 409-413.
 34. Hess KR, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL. Classification and regression tree analysis of 1000 consecutive patients with unknown primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5(11): 3403-3410.
 35. Greco FA, Vaughn WK, Hainsworth JD. Advanced poorly differentiated carcinoma of unknown primary site: recognition of a treatable syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104(4): 547-553.
 36. Pavlidis N, Kosmidis P, Skarlos D et al. Subsets of tumors responsive to cisplatin or carboplatin combinations in patients with carcinoma of unknown primary site. A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Ann Oncol* 1992; 3(8): 631-634.
 37. Strnad CM, Grosh WW, Baxter J et al. Peritoneal carcinomatosis of unknown primary site in women. A distinctive subset of adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 1989; 111(3): 213-217.
 38. Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, Raber MN, Lenzi R, Frost P. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol* 1994; 12(6): 1272-1280.
 39. Hillen HF, Hak LE, Joosten-Achjanie SR, Arends JW. Microvessel density in unknown primary tumors. *Int J Cancer* 1997; 74(1): 81-85.
 40. Davies B, Waxman J, Wasan H et al. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 1993; 53(22): 5365-5369.
 41. Waas ET, Wobbles T, Lomme RM, DeGroot J, Ruers T, Hendriks T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis. *Br J Surg* 2003; 90(12): 1556-1564.
 42. Davies B, Waxman J, Wasan H et al. Levels of matrix metalloproteinases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res* 1993; 53(22): 5365-5369.
 43. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 1997; 47(7): 461-469.
 44. Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002; 80(2): 105-110.
 45. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996; 14(12): 3133-3140.
 46. Schwartz GK. Invasion and metastases in gastric cancer: in vitro and in vivo models with

- clinical correlations. *Semin Oncol* 1996; 23(3): 316-324.
47. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8): 2396-2404.
48. Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002; 21(14): 2245-2252.
49. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1(8): 899-906.
50. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1260-1270.
51. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18(5): 1135-1149.
52. Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG. Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. *Clin Cancer Res* 1995; 1(8): 899-906.
53. Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O. High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin Cancer Res* 1997; 3(9): 1623-1628.
54. Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA et al. Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(7): 2289-2298.
55. Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K et al. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol* 2002; 197(3): 307-313.
56. Slaton JW, Inoue K, Perrotte P et al. Expression levels of genes that regulate metastasis and angiogenesis correlate with advanced pathological stage of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001; 158(2): 735-743.
57. Zhang Y, Wu XH, Cao GH, Li S. [Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in renal cell carcinoma]. *Ai Zheng* 2004; 23(3): 326-329.

Συσχέτιση της μαστογραφικής απεικόνισης, της έκφρασης των υποδοχέων EGFR, HER-2, HER-3, HER-4 και της έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού

Φ.Α. Μπάδρα¹, Μ.Β. Καραμούζης², Ε. Λυκάκη-Καρατζά¹, Π. Ραβαζούλα³, Ε. Τζωρακοελευθεράκης⁴, Γ. Οικονόμου⁵, Δ. Κούκουρας⁴, Α.Γ. Παπαβασιλείου⁶, Χ.Π. Καλόφωνος⁵

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προληπτική μαστογραφία στα πλαίσια προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου έχει αυξήσει τον αριθμό των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού που διαγιγνώσκονται σε ασυμπτωματικές γυναίκες. Οι μικρο-αποτιτανώσεις με κακοήθεις χαρακτήρες αποτελούν ένα από τα πιο πρώιμα μαστογραφικά ευρήματα των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε μορφολογικά η έκφραση συγκεκριμένων μοριακών δεικτών σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού και η πιθανή συσχέτισή της με τις μαστογραφικά εντοπιζόμενες κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις. Μελετήθηκαν συνολικά τριακόσιοι πενήντα ασθενείς με μη-ψηλαφητές ύποπτες βλάβες μαστού οι οποίες εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια προληπτικής μαστογραφίας τα έτη 1994 έως 2004. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε κατευθυνόμενη από μαστογραφία βιοψία με λεπτή βελόνα. Η ιστολογική εξέταση ανέδειξε 95 (27.2%) καρκινώματα [50 (52.3%) πορογενή διηθητικά, 35 (37.3%) πορογενή *in situ* και 10 (10.4%) λοβιακά διηθητικά]. Ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιήθηκε σε τομές παραφίνης σε 75 από τα 95 καρκινώματα χρησιμοποιώντας μία ποικιλία μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στις εξής πρωτεΐνες: ER, PR, p53, Bcl-2, Bax, FasL, DFF, HER-1, HER-2, HER-3 και HER-4. Οι κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις ήσαν το κύριο μαστογραφικό εύρημα σε 60 από τους 75 (80%) ασθενείς. Οι σχετιζόμενες με την απόπτωση πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη περιελάμβαναν τις p53, Bax, FasL, Bcl-2 και DFF. Η έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και p53 δε βρέθηκε να σχετίζεται με την έκφραση καμία άλλης σχετιζόμενης με την απόπτωση πρωτεΐνης. Αντίθετα, η ανοσοθετικότητα για την πρωτεΐνη Bax βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την έκφραση της DFF ($P=0.006$), ενώ παρόμοια αποτελέσματα

¹Ακτινολογικό Τμήμα Π.Π.Γ.Ν.Π. ²Α' Παθολογική Ογκολογική Κλινική Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας», ³Παθολογοανατομικό Τμήμα Π.Π.Γ.Ν.Π., ⁴Χειρουργική Κλινική Π.Π.Γ.Ν.Π., ⁵Ογκολογικό Τμήμα Π.Π.Γ.Ν.Π., ⁶Εργαστήριο Βιοχημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πάτρας,

Διεύθυνση επικοινωνίας. Μιχάλης Β. Καραμούζης MD, PhD, Α' Παθολογική Ογκολογική Κλινική. Α.Ο.Ν.Α. «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ», Τηλ: 6944290909. Fax: 2106409381. E-mail: karam@otenet.gr

διαπιστώθηκαν για τις πρωτεΐνες Fas και DFF ($P < 0.001$). Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν επίσης μεταξύ των κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων και της έκφρασης των πρωτεϊνών Bax ($P = 0.03$), Fas ($P = 0.03$) και DNA fragmentation factor ($P = 0.03$), ενώ καμία στατιστικά συσχέτιση δε βρέθηκε με την έκφραση των πρωτεϊνών Bcl-2 και p53 ($P > 0.05$). Η έκφραση της οικογένειας των πρωτεϊνών του EGFR ανιχνεύθηκε σε 78.7% των περιστατικών για τον HER-1, 45% για τον HER-2, 32% για τον HER-3 και 74.7% για τον HER-4. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν μεταξύ της έκφρασης όλων αυτών των πρωτεϊνών μεταξύ τους. Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν επίσης μεταξύ κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων και της ύπαρξης ανοσοθετικότητας για τις πρωτεΐνες HER-1 ($P = 0.001$), HER-2 ($P = 0.015$) και HER-4 ($P = 0.034$), αλλά όχι για τον HER-3 ($P > 0.05$). Στη συνέχεια ακολούθησε αξιολόγηση της συνδυασμένης έκφρασης όλων των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR. Η πιο έντονη συνδυασμένη έκφραση αυτών των πρωτεϊνών ήσαν HER-1/HER-2/HER-4 και HER-1/HER-4 σε 16 (21.4%) περιστατικά, ακολουθούμενη από HER-1/HER-2/HER-3/HER-4 σε 14 (18.6%) καρκινώματα. Δεκαπέντε (20%) καρκινώματα ήσαν αρνητικά για όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας του EGFR, ενώ άλλοι συνδυασμοί έκφρασης που ανιχνεύθηκαν ήταν HER-1/HER-2 και HER-1/HER-3/HER-4 σε 2 (2.7%) και 10 (13.3%) περιστατικά, αντίστοιχα. Η συνδυασμένη πρωτεϊνική έκφραση HER-1/HER-4 και HER-1/HER-2/HER-4 βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με ER(+) ($P = 0.002$ και $P = 0.001$, αντίστοιχα) και PR(+) ($P = 0.019$ και $P = 0.004$, αντίστοιχα), αλλά δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων. Η συνδυασμένη αρνητική έκφραση όλων των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με ER(+) ($P = 0.006$) και με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων ($P = 0.03$). Οι κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις που διαπιστώνονται κατά τη διάρκεια προληπτικής μαστογραφίας αποτελούν μία διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική πρόκληση. Τα ευρήματα της μελέτης μας ενδυναμώνουν την ήδη διατυπωθείσα ιδέα ότι η εξέλιξη του καρκινώματος του μαστού συμβαίνει αργά στην προκλινική φάση της φυσικής ιστορίας του και οφείλεται κυρίως σε διαταραχή της ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και των μονοπατιών που καθορίζουν την απόπτωση, η οποία μπορεί να αντανakλά στη μαστογραφική απεικόνιση. Επιπλέον, φαίνεται ότι η έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR ανιχνεύεται από την προκλινική φάση των καρκινωμάτων του μαστού και σχετίζεται πολύ σημαντικά (με εξαίρεση τον HER-3) με τη μαστογραφική εμφάνιση μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες. Τα μοντέλα συνδυασμένης έκφρασης των τεσσάρων μελών της οικογένειας του EGFR συνδυαζόμενα με το μοντέλο έκφρασης άλλων σημαντικών μοριακών παραγόντων και σε συνάρτηση με τη μαστογραφική απεικόνιση μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της φυσικής ιστορίας των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων του μαστού.

Λέξεις ευρετηρίου: Μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού, Μαστογραφία, Μικρο-αποτιτανώσεις, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, απόπτωση. **Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):273-289.**

Εισαγωγή

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί ένα σύνηθες νόσημα μεταξύ των Ελληνίδων, όπως και διεθνώς, και αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου από κακοήθειες¹. Τη τελευταία δεκαετία τα προγράμματα πληθυσμιακού ελέγχου έχουν εντατικοποιηθεί στην Ελλάδα με βάση τα αποτελέσματα τυχαίοποιημένων κλινικών μελετών, οι οποίες ανέδειξαν τη σημαντική συμβολή της μαστογραφίας στη μείωση της θνητότητας από καρκίνο του μαστού², αν και αυτή αμφισβητήθηκε πρόσφατα μετά από μία εκτεταμένη μετανάλυση³⁻⁵. Ο κύριος στόχος αυτών των προγραμμάτων είναι

η διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε πιο πρώιμο και καλύτερα θεραπεύσιμο στάδιο της φυσικής ιστορίας του⁶. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι με την εφαρμογή των προγραμμάτων πληθυσμιακού ελέγχου η συχνότητα των πορογενών *in situ* καρκινωμάτων (DCIS) σε ασυμπτωματικές γυναίκες έχει αυξηθεί σε 20-25% όλων των καρκινωμάτων που διαγιγνώσκονται με τη χρήση προληπτικής μαστογραφίας⁷. Έχει υπολογισθεί ότι η μαστογραφική διάγνωση των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων του μαστού αντιστοιχεί μόλις στο 1/5 του "συνολικού χρόνου ζωής" των καρκινωμάτων του μαστού⁸.

Τα μη-ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού συνιστούν μία ετερογενή ομάδα αλλοιώσεων του μαστού με ποικίλα ευρήματα και διαφορετική πρόγνωση. Η πλειοψηφία τους χαρακτηρίζεται από μικρό μέγεθος, ενώ είναι λιγότερο συχνές οι λεμφαδενικές και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι οι μικρο-αποτιτανώσεις αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο πρώιμα μαστογραφικά ευρήματα που σχετίζονται με *in situ* και διηθητικά καρκινώματα του μαστού σε ασυμπτωματικές γυναίκες. Οι μικρο-αποτιτανώσεις αποτελούν την κύρια ένδειξη περίπου στο 50% των βιοψιών του μαστού οι οποίες πραγματοποιούνται για μη-ψηλαφητές μαστογραφικές αλλοιώσεις. Θα πρέπει, πάντως, να τονισθεί ότι η διαπίστωση μίας μη-ψηλαφητής βλάβης του μαστού δεν συνιστά πάντοτε ένδειξη κακοήθειας. Οι περισσότερες από τις μικρο-αποτιτανώσεις που ανευρίσκονται στη μαστογραφία είναι καλοήθειες. Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να καθιερώσουν συγκεκριμένα κριτήρια για την όσο το δυνατό καλύτερη διάκριση καλοήθων και κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων⁹⁻¹¹.

Πολλοί προγνωστικοί παράγοντες έχουν προταθεί για τα μη-ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού¹². Σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια αναφορικά με την κατανόηση τη μοριακής καρκινογένεσης στο μαστό, παρέχοντας ταυτόχρονα νέους βιολογικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να αξιολογηθούν με μορφολογικές μεθόδους, όπως είναι η ανοσοϊστοχημεία, σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού¹³. Για παράδειγμα, η ύπαρξη αρνητικών οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών HER-2 και EGFR και η απορύθμιση της απόπτωσης φαίνεται να αποτελούν πιθανούς δείκτες επιθετικότητας αυτών των καρκινωμάτων του μαστού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ της μαστογραφικής απεικόνισης και σημαντικών βιολογικών δεικτών σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού, καθώς επίσης και προσδιορισμός της πιθανής κλινικής σημασίας αυτής της συσχέτισης.

Υλικό & Μέθοδος

Η παρούσα αναδρομική μελέτη περιλαμβάνει 350 περιστατικά ασθενών με ύποπτες μη-ψηλαφητές βλάβες μαστού που εξετάστηκαν και υποβλήθηκαν σε προληπτικό μαστογραφικό έλεγχο κατά τα έτη 1994 έως 2004. Όλες οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε καθοδηγούμενη από μαστογρα-

φία εντοπισμένη βιοψία μαστού με λεπτή βελόνα. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 55 έτη (εύρος, 36-76 έτη). Καμία από τις ασθενείς δεν είχε προηγούμενο μαστογραφικό έλεγχο ή/και κλινικά σημεία και συμπτώματα από το μαστό.

Η ιστολογική εξέταση των δειγμάτων ανέδειξε 95 καρκινώματα (27.2%). Οι ιστολογικοί υπότυποι ήταν οι εξής: 50 πορογενή διηθητικά (52.3%), 35 πορογενή *in situ* (37.3%) και 10 λοβιακά διηθητικά καρκινώματα (10.4%).

Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 75 από τα 95 καρκινώματα στα οποία υπήρχε αρκετός διαθέσιμος ιστός. Στα δείγματα αυτών των ασθενών ελέγχθηκε η παρουσία (έκφραση) ή μη των πρωτεϊνών p53, Bcl-2, Bax, DFF, FasL, EGFR, HER-2, HER-3 και HER-4. Όλα τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και εγκλειστεί σε παραφίνη. Από κάθε περιστατικό που μελετήθηκε, χρησιμοποιήθηκαν ένας ή περισσότεροι αντιπροσωπευτικοί κύβοι παραφίνης, από τους οποίους ελήφθησαν συνεχόμενες τομές πάχους 4μm, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες που είχαν προηγουμένως επικαλυφθεί με λεπτό στρώμα πολύ-L-λυσίνης (M.B: 150.000, SIGMA), ώστε να μην αποκολληθούν. Τα αντισώματα και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αναφέρονται στον παρακάτω Πίνακα 1. Για τον καλύτερο έλεγχο της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν και αντίστοιχες τομές που επώαστηκαν με τη συνήθη μέθοδο, χωρίς την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος (negative control).

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης/υπεροξειδάσης και χρησιμοποιήθηκε το *Kit Biogenex* (1:80). Η εφαρμογή της μεθόδου έγινε σε πρόσφατα προετοιμασμένες τομές, ώστε να αποφευχθεί το φαινόμενο της απώλειας αντιγονικότητας στην ανοσοϊστοχημική χρώση. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι σχετίζεται με το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από την προετοιμασία των τομών μέχρι τη χρώση τους.

Η αραίωση που τελικά χρησιμοποιήθηκε για το πρωτογενές αντίσωμα καθορίστηκε μετά από δοκιμαστικές χρώσεις στις οποίες εκτιμήθηκαν τα ποιοτικά αποτελέσματα ποικίλων αραιώσεων. Οι αραιώσεις, οι χρόνοι επώασης, η θερμοκρασία επώασης και οι μέθοδοι αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων επιλέχθηκαν έτσι ώστε να υπάρχει η βέλτιστη ένταση χρώσης με το μικρότερο δυνατό βαθμό μη-ειδικής χρώσης του υποστρώματος (background).

Με τη χρήση φωτονικού μικροσκοπίου μελε-

Πίνακας 1.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Αραίωση	Επώαση (Θερμ Δωμ)	Antigen Retrieval Method	Buffer
P53	Dako p53 (DO-7)	1:50	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
Bax	Dako (A3533)	1:100	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
Fas	Dako (M3554)	1:10	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
DFF	Novocasta (NCL-DFFp)	1:100	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
Bcl-2	Dako (MO887)	1:60	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
EGFR	Santa Cruz (sc-03)	1:50	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
c-erbB-2	Biogenex (CB11)	1:100	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
c-erbB-3	Santa Cruz (sc-285)	1:200	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό
c-erbB-4	Santa Cruz (sc-283)	1:200	Overnight	Φούρνος	Κιτρικό

Πίνακας 2. Μαστογραφική απεικόνιση των ιστολογικά τεκμηριωμένων μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού

Ιστολογία/ Μαστογραφία	Πορογενές Διηθητικό Καρκίνωμα	In situ Πορογενές Καρκίνωμα	Διηθητικό Λοβιακό Καρκίνωμα	Σύνολο
Μικρο-αποτιτανώσεις Σκίαση, Μάζα ή Διαταραχή αρχιτεκτονικής	21	19	2	42
Σκίαση, Μάζα ή Διαταραχή αρχιτεκτονικής και Μικρο-αποτιτανώσεις	13	2	4	19
Σύνολο	16	14	4	34
Σύνολο	50	35	10	95

τήθηκαν οι τομές ως προς την ύπαρξη μεμβρανικής χρώσης για τις πρωτεΐνες EGFR, HER-2, κυτταροπλασματικής χρώσης για τις πρωτεΐνες Bax, FasL, Bcl-2, HER-3, HER-4 και πυρηνικής χρώσης για τις πρωτεΐνες p53, DFF. Η ύπαρξη θετικότητας τουλάχιστο 10% των κυττάρων εκάστοτε παρασκευάσματος ήταν το όριο (cut-off point value) για να θεωρηθεί κάθε δείγμα θετικό ως προς κάποια από τις υπό μελέτη πρωτεΐνες^{14,15}.

Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μορφολογικής μελέτης και της αξιολόγησης των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων και συσχέτιση με τα μαστογραφικά ευρήματα.

Οι στατιστικοί έλεγχοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των διαφορών που παρατηρήθηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων παραμέτρων ήταν χ^2 -test (Chi-square test με ή χωρίς το διορθωτικό παράγοντα κατά Yates). Κατά τη στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων οι διαφορές και συσχετίσεις που προκύπτουν θεωρούνται στατιστικά σημαντικές αν και μόνο αν αντιστοιχούν σε πιθανότητα $p < 0.05$ (επίπεδο σημαντικότητας) (όπως αυτή προκύπτει από τον αντίστοιχο κάθε φορά στατιστικό έλεγχο), διαφορετικά θεωρούνται μη στατιστικά σημαντικές (NS- $p > 0,05$).

Αποτελέσματα

Οι μικρο-αποτιτανώσεις με κακοήθεις χαρακτηριστές ήταν το κύριο μαστογραφικό εύρημα σε 76 από τους 95 (80%) των ασθενών με μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2. Επίσης από τα 75 καρκινώματα στα οποία έγινε ανοσοϊστοχημικός έλεγχος στα 60 οι κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις ήταν το κύριο μαστογραφικό εύρημα.

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με την απόπτωση

Η έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση ελέγχθηκε σε 75 μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού. Ειδικότερα, πυρηνική θετικότητα όσον αφορά στην ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 διαπιστώθηκε σε 22 περιπτώσεις (29.3%).

Κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη Bax ανιχνεύθηκε σε 56 μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού (74.7%) (Εικόνα 1α).

Θετικότητα για την πρωτεΐνη Fas ανιχνεύθηκε σε 47 περιστατικά (62.7%) με μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού (Εικόνα 1β).

Θετικότητα για την πρωτεΐνη DFF (DNA Frag-

mentation Factor) ανιχνεύθηκε σε 57 (76%) μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού (Εικόνα 1γ).

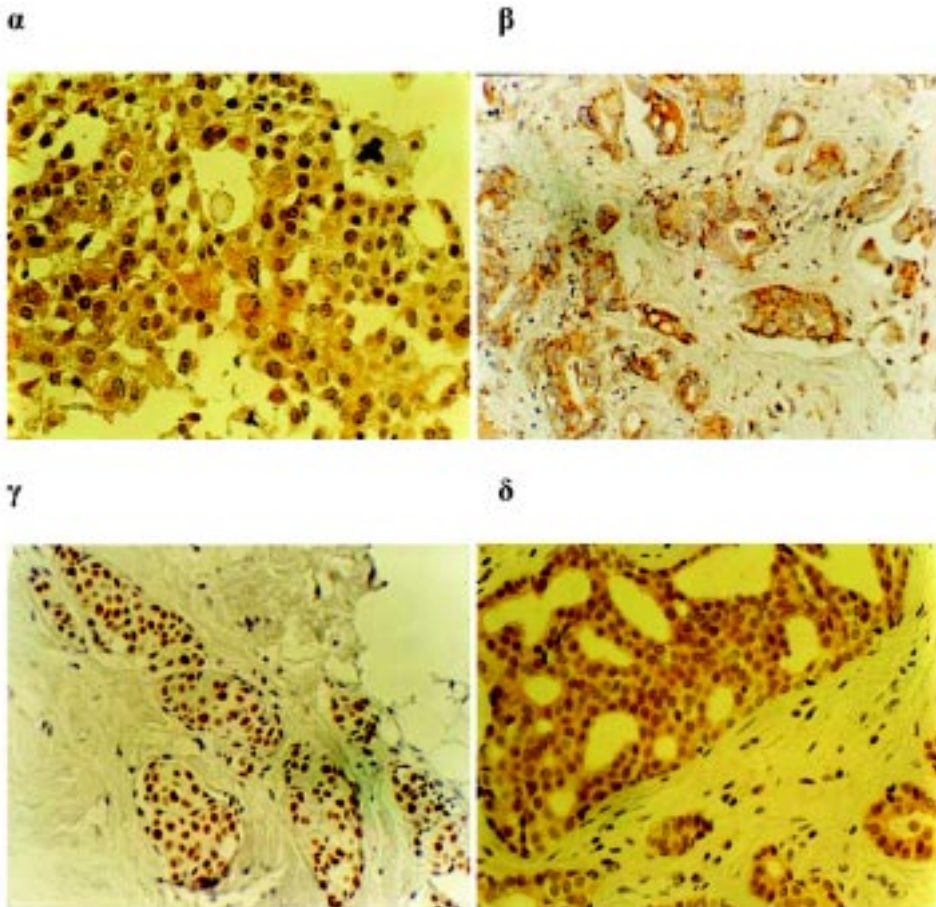
Τέλος, μόλις 21 δείγματα (28%) ασθενών με μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού ήταν θετικά για την πρωτεΐνη Bcl-2 (Εικόνα 1δ).

Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των συσχετίσεων της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών μεταξύ τους, καθώς και με άλλες σημαντικές παραμέτρους, όπως ιστολογικός τύπος και παρουσία μικρο-αποπιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες στη μαστογραφία, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον Πίνακα 3.

Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν μεταξύ ορισμένων μελών αυτής της οικογένειας των πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του p53 και του Bcl-2 δε βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$) με καμία από τις πρωτεΐνες σχετιζόμε-

νες με την απόπτωση που μελετήθηκαν. Η έκφραση της πρωτεΐνης Bax βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά μόνο με την έκφραση της πρωτεΐνης DFF ($P = 0.006$), ενώ ανάλογη σχέση βρέθηκε μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και DFF ($P < 0.001$) στα μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού που μελετήθηκαν.

Ακολούθησε συσχέτιση της έκφρασης όλων των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας με άλλες σημαντικές παραμέτρους. Ειδικότερα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης DFF φαίνεται να σχετίζεται οριακά, αλλά μη στατιστικά σημαντικά ($P = 0.068$) με την παρουσία πορογενούς καρκινώματος. Επιπλέον, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53 βρέθηκε να σχετίζεται με την ύπαρξη αρνητικών υποδοχέων προγεστερόνης ($P = 0.009$). Αντίστοιχα, η έκφραση όλων των υπολοίπων πρωτεϊ-



Εικόνα 1. (α) Κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη Bax σε ένα μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, (β) Κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη Fas σε ένα μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, (γ) Πυρηνική θετικότητα για την πρωτεΐνη DFF σε ένα μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, και (δ) Κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη Bcl-2 σε ένα μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού

Πίνακας 3. Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση μεταξύ τους και σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο, την ύπαρξη θετικών ή μη ορμονικών υποδοχέων και την ύπαρξη στη μαστογραφία μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες

Μεταβλητή	N	P53		Bcl-2		Bax		Fas		DFF	
		Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value
Ιστολογία	67	20	0.776	17	0.143	50	0.982	45	0.02	53	0.068
Πορογενές Λοβιακό Πορογενές Ca	8	2		4		6		2		4	
In situ	28	6	0.202	6	0.530	21	0.953	19	0.918	21	0.484
Διηθητικό MMC	39	14		11		29		26		32	
Ναι	60	18	0.50	17	0.898	44	0.03	39	0.03	47	0.03
Όχι	15			4		12		8		10	
ER											
Θετικοί	52	12	0.074	19	0.013	43	0.016	37	0.022	45	0.001
Αρνητικοί	23	10		2		13		10		12	
PR											
Θετικοί	38	6		15	0.025	32	0.05	29	0.013	33	0.026
Αρνητικοί	37	16	0.009	6		24		18		24	
P53											
Θετικό	22			5	0.512	15	0.405	12	0.349	14	0.106
Αρνητικό	53			16		41		35		43	
Bcl-2											
Θετικό	21	5	0.512			17	0.435	14	0.655	17	0.531
Αρνητικό	54	17				39		33		40	
Bax											
Θετικό	56	15	0.405	17	0.435			38	0.111	47	0.006
Αρνητικό	19	7		4				9		10	
Fas											
Θετικό	47	12	0.349	14	0.655	38	0.111			42	<0.001
Αρνητικό	28	10		7		18				15	
DFF											
Θετικό	57	14	0.106	17	0.531	47	0.006	42	<0.001		
Αρνητικό	18	8		4		9		5			

* Ακρωνύμια: ER: Υποδοχείς Οιστρογόνων, PR: Υποδοχείς προγεστερόνης, MMC: Μικρο-αποτιτανώσεις με κακοήθεις χαρακτήρες στη μαστογραφία, DFF: DNA Fragmentation Factor

ων που σχετίζονται με την απόπτωση βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ύπαρξη θετικών οιστρογονικών υποδοχέων [Bcl-2 ($P=0.013$), Bax ($P=0.016$), Fas ($P=0.022$) και DFF ($P=0.001$)]. Ανάλογα ήσαν τα αποτελέσματα και όσον αφορά στην παρουσία θετικών υποδοχέων προγεστερόνης [Bcl-2 ($P=0.025$), Bax ($P=0.05$), Fas ($P=0.013$) και DFF ($P=0.026$)].

Ιδιαίτερη σημαντική ήταν επίσης η μελέτη της παρουσίας κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων σαν κύριο μαστογραφικό εύρημα και της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών της απόπτωσης σε όλα τα μη-ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με τις πρωτεΐνες Bax ($P=0.03$), Fas ($P=0.03$) και DFF

($P=0.03$), ενώ δε παρατηρήθηκε ανάλογη στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της παρουσίας μαστογραφικών μικρο-αποτιτανώσεων και της έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 ($P>0.05$) και της πρωτεΐνης p53 ($P>0.05$).

Η συσχέτιση της έκφρασης των μελών της οικογένειας του EGFR με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση ανέδειξε τα αποτελέσματα που φαίνονται στον Πίνακα 4. Ειδικότερα, φαίνεται ότι η έκφραση των πρωτεϊνών της απόπτωσης που αξιολογήθηκαν σε αυτή τη μελέτη δε σχετίζεται με την έκφραση του EGFR ($P>0.05$). Αντίθετα, η ύπαρξη μεμβρανικής θετικότητας για τον HER-2 βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την έκφραση των πρωτεϊνών Bax

Πίνακας 4. Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR σε σχέση με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση

Μεταβλητή	N	HER-1		HER-2		HER-3		HER-4	
		Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value
p53									
Θετικό	22	18	0.668	12	0.074	11	0.031	15	0.405
Αρνητικό	53	41		41		22		13	
Bax									
Θετικό	56	46	0.207	28	0.03	20	0.236	44	0.182
Αρνητικό	19	13		6		4		12	
Fas									
Θετικό	47	38	0.550	24	0.027	17	0.316	36	0.619
Αρνητικό	28	21		10		7		20	
DFF									
Θετικό	57	47	0.154	28	0.075	18	0.889	46	0.032
Αρνητικό	18	12		6		6		10	
Bcl-2									
Θετικό	21	18	0.353	11	0.282	10	0.071	16	0.850
Αρνητικό	54	41		23		14		40	

($P=0.03$) και Fas ($P=0.027$), οριακά αλλά μη στατιστικά σημαντικά με την έκφραση των πρωτεϊνών p53 ($P=0.074$) και DFF ($P=0.075$), ενώ δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ($P>0.05$). Όσον αφορά στην έκφραση του HER-3, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση των πρωτεϊνών της απόπτωσης Bax, Fas και DFF ($P>0.05$), ενώ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης p53 ($P=0.031$) και μία οριακή αλλά μη στατιστικά σημαντική σχέση με την έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 ($P=0.071$). Τέλος, η έκφραση του HER-4 βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά μόνο με την έκφραση της πρωτεΐνης DFF ($P=0.032$), ενώ δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την έκφραση των υπόλοιπων υπό μελέτη πρωτεϊνών της απόπτωσης ($P>0.05$).

Οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας ελέγχθηκε σε 75 μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού. Θετικότητα όσον αφορά στον EGFR (HER-1) διαπιστώθηκε σε 59 περιπτώσεις (78.7%). Η έκφρασή του ήταν κυρίως μεμβρανική (Εικόνα 2α).

Μεμβρανική θετικότητα για τον υποδοχέα HER-2 ανιχνεύθηκε σε 34 περιπτώσεις (45%) (Εικόνα 2β). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ποσοστό αυτό αναφέρεται στην ύπαρξη θετικότητας ή μη για

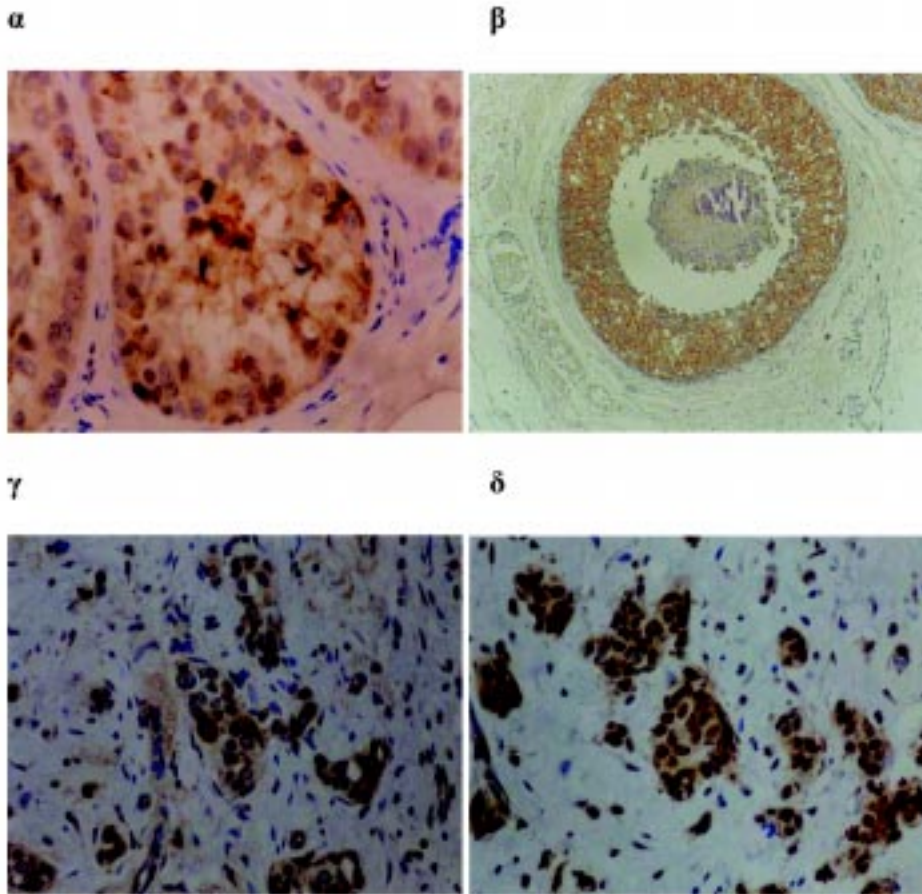
τον συγκεκριμένο υποδοχέα σε ποσοστό $>10\%$ των κυττάρων και όχι στην ύπαρξη θετικότητας 2 ή 3+ με ημιποσοτικό προσδιορισμό της χρώσης του.

Κυτταροπλασματική, κυρίως, θετικότητα βρέθηκε για τα άλλα δύο μέλη αυτής της οικογένειας, τον HER-3 - 24 (32%) και τον HER-4 - 56 (74.7%) (Εικόνα 2γ και 2δ).

Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν μεταξύ όλων των μελών αυτής της οικογένειας των πρωτεϊνών (Πίνακας 5). Ειδικότερα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR στα μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού που μελετήθηκαν βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με τη διαπίστωση πρωτεϊνικής έκφρασης για τους υποδοχείς HER-2 ($P<0.001$) και HER-4 ($P<0.001$), ενώ αρνητική συσχέτιση βρέθηκε με την έκφραση του υποδοχέα HER-3 ($P=0.002$).

Θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ της έκφρασης του HER-2 και HER-4 ($P<0.001$). Αντίθετα, αρνητική στατιστικά σημαντική σχέση υπήρξε μεταξύ της πρωτεϊνικής έκφραση των HER-2 και HER-4 με την ύπαρξη ανοσοϊστοχημικής θετικής χρώσης για τον HER-3 ($P<0.001$ και $P=0.004$, αντίστοιχα).

Ακολούθησε συσχέτιση της έκφρασης όλων των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας με άλλες σημαντικές παραμέτρους. Ειδικότερα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης κάθε μίας από αυτές τις πρωτεΐνες με τον ιστολογικό τύπο και την ύπαρξη θετικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.



Εικόνα 2. (α) Μεμβρανική θετικότητα για την πρωτεΐνη HER-1 σε ένα μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, (β) Μεμβρανική θετικότητα για την πρωτεΐνη HER-2 σε ένα πορογενές in situ comedo μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, (γ) Κυτταροπλασματική χρώση για την πρωτεΐνη HER-3 σε ένα πορογενές διθητικό μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού, και (δ) Κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική θετική χρώση για την πρωτεΐνη HER-4 σε ένα πορογενές in situ μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε επίσης στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR και της ύπαρξης στη μαστογραφία μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες σα κύριο ακτινολογικό εύρημα. Ειδικότερα, οι κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις ήταν η βασική μαστογραφική απεικόνιση σε 52 από τις 59 περιπτώσεις (88.1%) μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων με ανοσοϊστοχημική θετικότητα για τον EGFR ($P=0.015$). Ανάλογα θετικές στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις διαπιστώθηκαν και όσον αφορά στις πρωτεΐνες HER-2 και HER-4. Ειδικότερα, κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις παρατηρήθηκαν σε 30 από τα 34 (88%) μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού με ανοσοϊστοχημική θετικότητα για την πρωτεΐνη HER-2 ($P=0.015$). Αντίστοιχα, 48 από τα 56 (85.7%) περιστατικά με πρωτεϊνική

υπερέκφραση του HER-4 ($P=0.034$) εμφάνισαν σαν κύρια μαστογραφική απεικόνιση της κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις. Αντίθετα, η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση όσον αφορά στην πρωτεΐνη HER-3, πιθανά λόγω του μικρού αριθμού περιστατικών που εμφάνισαν ανοσοϊστοχημική χρώση για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Ειδικότερα, κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις παρατηρήθηκαν σε 22 από τα 24 (91%) μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού με ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη HER-3 ($P>0.05$).

Σε μία προσπάθεια να διευκρινισθεί καλύτερα ο ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR στη φυσική ιστορία των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της συνδυασμένης έκφρασής τους στα 75 περιστατικά που μελετήθηκαν (Πίνακας 6). Ιδιαίτερα ενδια-

Πίνακας 5. Συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR μεταξύ τους και σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο, την ύπαρξη θετικών ή μη ορμονικών υποδοχέων και την ύπαρξη στη μαστογραφία μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες

Μεταβλητή	N	HER-1		HER-2		HER-3		HER-4	
		Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value	Positive	P-value
Ιστολογία									
Πορογενές	67	54	0.238	31	0.143	21	0.724	52	0.09
Λοβιακό	8	5		3		3		4	
Πορογενές Ca									
In situ	28	22	0.722	13	0.953	8	0.679	20	0.304
Διηθητικό	39	32		21		13		32	
MMC									
Ναι	60	52	0.001	30	0.015	22	0.083	48	0.034
Όχι	15	7		4		2		8	
ER									
Θετικοί	52	44	0.059	26	0.011	15	0.379	43	0.016
Αρνητικοί	23	15		8		9		13	
PR									
Θετικοί	38	32	0.235	19	0.174	11	0.566	32	0.054
Αρνητικοί	37	27		15		13		24	
HER-1									
Θετικό	59			33	<0.001	24	0.002	54	<0.001
Αρνητικό	16			1		0		2	
HER-2									
Θετικό	34	33	<0.001			15	<0.001	31	<0.001
Αρνητικό	41	4				0		5	
HER-3									
Θετικό	24	24	0.002	15	<0.001			23	0.004
Αρνητικό	51	35		19				33	
HER-4									
Θετικό	56	54	<0.001	31	<0.001	23	0.004		
Αρνητικό	19	5		3		1			

* **Ακρωνύμια:** ER: Υποδοχείς Οιστρογόνων, PR: Υποδοχείς προγεστερόνης, MMC: Μικρο-αποτιτανώσεις με κακοήθεις χαρακτήρες στη μαστογραφία

Πίνακας 6. Συχνότητα σχηματισμού ομο- και έτερο-διμερών μεταξύ των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR στα 75 υπό μελέτη μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού

Έκφραση υποδοχέα	No.	%
EGFR/HER-2	2	2.7
EGFR/HER-4	16	21.4
HER-2/HER-4	1	1.3
EGFR/HER-2/HER-3	1	1.3
EGFR/HER-2/HER-4	16	21.4
EGFR/HER-3/HER-4	10	13.3
Όλα θετικά	14	18.6
Όλα αρνητικά	15	20
Σύνολο	75	100

φέρουσα παρατήρηση είναι ότι με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης μας οι συχνότεροι συνδυασμοί έκφρασης που παρατηρήθηκαν ήταν HER-1/HER-2/HER-4 και HER-1/HER-4 σε 16 (21.4%)

περιπτώσεις αντίστοιχα, και ακολούθησε ο συνδυασμός HER-1/HER-2/HER-3/HER-4 σε 14 (18.6%) μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού. Δέκα πέντε (20%) καρκινώματα ήταν αρνητικά για όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας του EGFR, ενώ άλλοι συνδυασμοί έκφρασης που ανιχνεύθηκαν ήταν HER-1/HER-2 και HER-1/HER-3/HER-4 σε 2 (2.7%) και 10 (13.3%) περιστατικά, αντίστοιχα.

Η συνδυασμένη πρωτεϊνική έκφραση HER-1/HER-2/HER-4 βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με θετικούς οιστρογονικούς ($P=0.002$) και προγεστερονικούς υποδοχείς ($P=0.019$), καθώς και με τη διάγνωση πορογενούς καρκινώματος ($P=0.029$), ενώ δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση με την παρουσία στη μαστογραφία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων και την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διαδικασία της απόπτωσης (Πίνακας 7). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η συνδυασμένη έκ-

Πίνακας 7. Συσχέτιση μεταξύ της συνδυασμένης έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR και όλων των άλλων παραμέτρων της μελέτης

Παράμετρος/ P-value	EGFR/ HER-2	EGFR/ HER-4	EGFR/ HER-2/ HER-4	EGFR HER-3/ /HER-4	Όλα θετικά	Όλα αρνητικά
ER	0.801	0.001	0.002	0.734	0.607	0.006
PR	0.291	0.004	0.019	0.345	0.743	0.133
Microcalcifications	0.797	0.831	0.467	0.987	0.104	0.03
Histology (Ductal vs Lobular)	0.340	0.620	0.029	0.645	0.657	0.190
p53	0.039	0.1	0.162	0.234	0.074	0.8
Bax	0.987	0.148	0.376	0.456	0.293	0.034
Fas	0.6	0.015	0.392	0.578	0.411	0.403
DFF	0.962	0.577	0.066	0.467	0.76	0.105
Bcl-2	0.314	0.519	0.218	0.342	0.047	0.440

φραση HER-1/HER-2/HER-3/HER-4, HER-1/HER-3/HER-4, HER-1/HER-2 και HER-1/HER-4 δε βρέθηκε να σχετίζονται στατιστικά σημαντικά με τη θετικότητα των ορμονικών υποδοχέων, τον ιστολογικό τύπο και τη μαστογραφική απεικόνιση των μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες, ενώ τα περιστατικά που ήταν αρνητικά για όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας του EGFR σχετίζονταν στατιστικά σημαντικά με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς ($P=0.006$) και παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων ως κύριο μαστογραφικό εύρημα ($P=0.03$) (Πίνακας 7). Τα ίδια περιστατικά εμφάνισαν επίσης στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την πρωτεϊνική έκφραση του Bax ($P=0.034$). Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, έστω και οριακές, παρατηρήθηκαν επίσης μεταξύ των περιστατικών με συνδυασμένη έκφραση EGFR/HER-2 και p53 ($P=0.039$), EGFR/HER-4 και Fas ($P=0.015$), καθώς επίσης και του μοντέλου έκφρασης EGFR/HER-2/HER-3/HER-4 και Bcl-2 ($P=0.047$).

Συζήτηση - Συμπεράσματα

Αρκετές μελέτες, έως τώρα, έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τα ακτινολογικά και τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των μικρο-αποτιτανώσεων με κακοήθεις χαρακτήρες αναφορικά με την εμφάνιση, την κατανομή και το μέγεθός τους^{10,16}. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσουμε και να εξηγήσουμε τη σχέση μεταξύ των μαστογραφικά εντοπιζόμενων κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων και της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης επιλεγμένων σημαντικών βιολογικών δεικτών σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού που διαγιγνώσκονται στα πλαίσια προληπτικής μαστογρα-

φίας.

Οι κακοήθεις μικρο-αποτιτανώσεις που διαπιστώνονται κατά τη διάρκεια της προληπτικής μαστογραφίας αποτελούν το κύριο ακτινολογικό εύρημα και συνιστούν μέγιστη διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική πρόκληση. Γενικά οι μικρο-αποτιτανώσεις θεωρούνται ένα ακτινολογικό εύρημα που σχετίζεται με κακή πρόγνωση στις περιπτώσεις διηθητικών καρκινωμάτων μαστού, ενώ αντίθετα φαίνεται να συνιστούν ευνοϊκό παράγοντα σε περιπτώσεις μη διηθητικών μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού¹⁷.

Πρόσφατες μελέτες δεν κατάφεραν να αναδείξουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στα ιστολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ των συμπτωματικών και των μαστογραφικά εντοπιζόμενων μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων του μαστού¹⁸. Επιπλέον, αρκετοί ερευνητές πλέον φαίνεται να καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα καλά προγνωστικά χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων του μαστού που διαπιστώνονται με τη χρήση της προληπτικής μαστογραφίας σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την επίδραση βιολογικών παραγόντων¹⁹. Πάντως, υπάρχουν και στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα καρκινώματα αυτά, αν και συχνά διηθητικά, συνήθως είναι μικρά και ακόμη δεν έχουν υποστεί τις γενετικές αλλαγές που καθορίζουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά που είναι τυπικά κακής πρόγνωσης²⁰. Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι τα ιστολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά αυτών των νεοπλασμάτων αντιστοιχούν σε χαμηλότερο βαθμό κακοήθειας^{21,22}.

Η καρκινογένεση του μαστού αποτελεί μία πολυσταδιακή διαδικασία που χαρακτηρίζεται από μία σειρά ενδιάμεσων υπερπλαστικών (με ή χωρίς ατυπία) και προδιηθητικών σταδίων²². Σύμφωνα με μία πρόσφατη υπόθεση, η εξέλιξη του

νεοπλάσματος συμβαίνει αργά σε αυτό το προκλινικό στάδιο της φυσικής ιστορίας του, με ένα ποσοστό μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων του μαστού να υφίσταται αποδιαφοροποίηση με αύξηση του μεγέθους και άρα μεγαλύτερο διηθητικό και μεταστατικό δυναμικό²⁴. Στην παρούσα μελέτη, το ποσοστό των DCIS (πορογενή *in situ* καρκινώματα) ήταν 37.3% μεταξύ όλων των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού, το οποίο είναι σε αντιστοιχία με άλλες δημοσιευμένες σειρές²⁵, ενώ πορογενές διηθητικό καρκίνωμα διαπιστώθηκε σε 52.3% των περιστατικών. Επομένως, είναι απόλυτα κατανοητή η μεγάλη ανάγκη ταυτοποίησης νέων αξιόπιστων και εύκολα αναπαραγωγίμων δεικτών που να σχετίζονται με την πρόοδο και την επιθετικότητα της νόσου σε σχέση με τις υπάρχουσες απεικονιστικές μεθόδους.

Η απόπτωση ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο σύστημα αναστολέων και επαγωγέων οι οποίοι συνεργάζονται μεταξύ τους²⁶. Τα ερεθίσματα και τα μόρια που επάγουν την απόπτωση είναι πολλά²⁷, ενώ υπάρχει επίσης και ένας ικανός αριθμός αναστολέων της απόπτωσης, με κυριότερο εκπρόσωπο τις Bcl-2 σχετιζόμενες πρωτεΐνες²⁸. Η πρωτεΐνη Bcl-2 εκφράζεται συχνά σε καρκινώματα του μαστού και σχετίζεται με ευνοϊκούς προγνωστικούς παράγοντες²⁹. Έχει επίσης προταθεί ότι η πρωτεΐνη Bcl-2 δρα σε τροποποιητής της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία και/ή ορμονοθεραπεία^{30,31}. Η σταδιακή μείωση της έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης σε προκαρκινικές και καρκινικές βλάβες του μαστού έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση της επιθετικότητας του νεοπλάσματος³². Για αυτό το λόγο, ο συνδυασμός της χαμηλής έκφρασης της πρωτεΐνης Bcl-2 (28%), το σχετικά χαμηλό ποσοστό θετικών υποδοχέων προγεστερόνης (50.7%), καθώς και η απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 και την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων έχουν ιδιαίτερη προγνωστική αξία, ειδικά εάν συνδυασθούν και με την έκφραση των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR.

Η πρωτεΐνη Bax εκφράζεται φυσιολογικά σε αρκετούς ιστούς, όπως ο μαστός και ο προστάτης³³. Η χρήση της έκφρασης της πρωτεΐνης Bax ως προγνωστικού ή/και προβλεπτικού στη θεραπεία παράγοντα δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση και χαμηλά ποσοστά ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού³⁴. Στη μελέτη μας διαπιστώθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bax σε 74.7% των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού,

που είναι σε αντιστοιχία με προηγούμενα δημοσιευμένες μελέτες³⁵. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα παρατήρηση στη μελέτη μας αποτέλεσε η διαπίστωση της ύπαρξης στατιστικά σημαντικής σχέσης μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης Bax και της ύπαρξης θετικών υποδοχέων οιστρογόνων ($P=0.016$) και προγεστερόνης ($P=0.05$), ενώ στατιστικά σημαντική σχέση βρέθηκε και με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων στη μαστογραφία ($P=0.03$).

Η πρωτεΐνη Fas και παρόμοιες πρωτεΐνες της οικογένειας του TNF μπορούν να παρακάμψουν το βασικό σημείο ελέγχου του Bcl-2 που ελέγχει την κυτταρική επιβίωση³⁶. Στη μελέτη μας, θετικότητα για την πρωτεΐνη FasL παρατηρήθηκε σε 62.7% των περιστατικών, σε αντιστοιχία με προηγούμενες μελέτες³⁷. Η έκφραση της FasL βρέθηκε μάλιστα να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ύπαρξη θετικών οιστρογονικών ($P=0.022$) και προγεστερονικών υποδοχέων ($P=0.013$) και με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων στη μαστογραφική απεικόνιση ($P=0.03$). Έχει παρατηρηθεί ότι οι καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού εμφανίζουν διαφορετικό ποσοστό έκφρασης της πρωτεΐνης FasL και του υποδοχέα της³⁸. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι ασθενείς που έχουν Fas (+) καρκινώματα του μαστού εμφανίζουν μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου, αν και δεν έχει περιγραφεί, έως τώρα, ανάλογη συσχέτιση με την έκφραση του FasL³⁷.

Στα καρκινώματα του μαστού η συχνότητα μεταλλάξεων του p53 παρατηρείται σε ποσοστό 35-50% των περιπτώσεων³⁹. Αξίζει να τονισθεί ότι η μη-μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 έχει πολύ μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και δεν είναι συνήθως ανιχνεύσιμη, αν και μπορεί να ανιχνευθεί στα πλαίσια αδρανισμού του σαν σύμπλοκο mdm2/p53⁴⁰. Οι γενετικές αλλοιώσεις της πρωτεΐνης έχουν σαν αποτέλεσμα αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της, πυρηνική συσσώρευση και επομένως εύκολη ανίχνευση με τη χρήση μορφολογικών μεθόδων. Στα περιστατικά της μελέτης μας η έκφραση της πρωτεΐνης p53 ανιχνεύθηκε σε ποσοστό περίπου 29%, το οποίο είναι σε αντιστοιχία με παρόμοιες μελέτες⁴¹. Αρκετές ερευνητικές εργασίες έχουν συσχετίσει την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης p53 με αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς και με μεγαλύτερου μεγέθους όγκους μαστού⁴². Στη μελέτη μας παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική σχέση με αρνητικούς υποδοχείς προγεστερόνης ($P=0.009$), ενώ καμία στατιστικά σημαντική σχέση δε παρατηρήθηκε σε σχέση με τους υποδοχείς

οιστρογόνων, τον ιστολογικό τύπο και την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων στη μαστογραφία.

Η καταστροφή του νουκλεοσώματος του DNA αποτελεί χαρακτηριστικό μορφολογικό γεγονός των τελικών σταδίων της απόπτωσης και οφείλεται στην ενεργοποίηση των κασπασών⁴³. Μία τέτοια νουκλεάση είναι η DFF (DNA Fragmentation Factor), η οποία αποτελείται από δύο υπομονάδες που δρουν σαν επιτηρητές η μία στην άλλη. Η δράση της επάγεται μετά από ενεργοποίηση από την κασπάση-3^{44,45}. Πυρηνική θετικότητα για την πρωτεΐνη DFF ανιχνεύθηκε σε 76% των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού. Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ύπαρξη θετικών οιστρογονικών ($P=0.001$) και προγεστερονικών υποδοχέων ($P=0.026$), καθώς επίσης και με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων σαν κύριο μαστογραφικό εύρημα ($P=0.03$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα στατιστικά σημαντική σχέση με τις πρωτεΐνες Bax ($P=0.006$) και FasL ($P=0.001$). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρόμοια σχέση μεταξύ των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και της πρωτεΐνης DFF έχει ήδη περιγραφεί⁴⁶.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα αρκετά έμμεσα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν. Ειδικότερα, φαίνεται ότι στην προκλινική φάση των καρκινωμάτων του μαστού η θετικότητα για τους ορμονικούς υποδοχείς σχετίζεται με την επαγωγή της απόπτωσης σα μηχανισμό άμυνας στον κακοήγη μετασχηματισμό που αυτά έχουν υποστεί. Μάλιστα φαίνεται ότι η ενεργοποίηση αυτή σχετίζεται άμεσα με την ενεργοποίηση και των δύο μονοπατιών της απόπτωσης. Η έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 συνδυάζεται με αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης Bax, ευνοώντας την επαγωγή του αντίστοιχου μονοπατιού της απόπτωσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης FasL, η οποία οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω "υποδοχέων θανάτου". Πιθανά η συνδυασμένη ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται με την απόπτωση αντανakλά ενδοκυττάριους μηχανισμούς άμυνας για αποφυγή του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η οικογένεια των υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης του EGFR και των προσδεμάτων τους παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού⁴⁷. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής υφίστανται φωσφορυλίωση αφού πρώτα συνδεθεί το ειδικό πρόσδεμα και σχηματί-

σουν όμο- και/ή έτερο-διμερή. Ο σχηματισμός διμερών και η αυτοφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση υποκείμενων μονοπατιών μεταγωγής σήματος τα οποία συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μεταστατική διασπορά⁴⁸.

Στην παρούσα μελέτη, ανίχνευση ανοσοθετικότητας για την πρωτεΐνη HER-1 παρατηρήθηκε σε 78.5% των περιστατικών, εύρημα σύμφωνο με προηγούμενες αναφορές που περιγράφουν ποσοστά 14-70%⁴⁹. Αντίστοιχα, ανίχνευση ανοσοθετικότητας για την πρωτεΐνη HER-2 διαπιστώθηκε σε 45% των περιστατικών, σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές με ποσοστά 9-45%¹⁴. Αντίστοιχα, η έκφραση των HER-3 και HER-4 ήταν 32% και 74.7%, ευρήματα τα οποία είναι επίσης συμβατά με προηγούμενες αναφορές, στις οποίες περιγράφεται υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-3 σε περίπου 20% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού και περίπου στο 1/3 των DCIS και υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-4 σε 58-82% των καρκινωμάτων μαστού⁵⁰⁻⁵².

Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας του EGFR. Η έκφραση του EGFR στα μη-ψηλαφητά καρκινώματα της μελέτης μας βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την έκφραση του HER-2 ($P<0.001$) και HER-4 ($P<0.001$), ενώ μία αρνητική συσχέτιση διαπιστώθηκε σε σχέση με την έκφραση του HER-3 ($P=0.002$). Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις βρέθηκαν επίσης μεταξύ της έκφρασης των HER-2 και HER-4 ($P<0.001$), ενώ αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των HER-2, HER-4 σε σχέση με την έκφραση του HER-3 ($P<0.001$ και $P=0.004$, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματά μας φαίνεται να διαφοροποιούν τα μη-ψηλαφητά από τα ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού όσον αφορά στο μοντέλο έκφρασης των μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών του EGFR¹⁵.

Το βασικό χαρακτηριστικό της οικογένειας των EGFR πρωτεϊνών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν όμο- και έτερο-διμερή. Σε μία προσπάθεια να διευκρινισθεί καλύτερα ο ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR στη φυσική ιστορία των μη-ψηλαφητών καρκινωμάτων μαστού έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της συνδυασμένης έκφρασής τους. Οι συχνότεροι συνδυασμοί έκφρασης που παρατηρήθηκαν ήταν HER-1/HER-2/HER-4 και HER-1/HER-4 σε 16 (21.4%) περιπτώσεις αντίστοιχα, και ακολούθησε ο συνδυασμός HER-1/HER-2/HER-3/HER-4 σε 14 (18.6%) μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού. Η παρούσα

μελέτη αποτελεί ουσιαστικά τη πρώτη αναφορά μελέτης της συνδυασμένης έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών σε μη-ψηλαφητά καρκινώματα του μαστού και θα πρέπει να αξιολογηθεί συγκριτικά με τα ήδη δημοσιευμένα στοιχεία που αφορούν στα ψηλαφητά καρκινώματα μαστού¹⁵.

Παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων σαν κύριο μαστογραφικό εύρημα παρατηρήθηκαν σε 88.1% HER-1 ($P=0.001$), 88% HER-2 ($P=0.015$), 91.7% HER-3 ($P>0.05$) και 85.7% HER-4 ($P=0.034$) θετικών περιστατικών. Αξιοσημείωτο ήταν ότι η συνδυασμένη έκφραση των πρωτεϊνών αυτών δε βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την παρουσία κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων, εκτός από τη συνδυασμένη αρνητική ανοσοϊστοχημική χρώση όλων των πρωτεϊνών της οικογένειας του EGFR ($P=0.03$).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του HER-2 σχετίζεται με κακούς προγνωστικούς παράγοντες σε προκαρκινικές βλάβες, σε μη διηθητικά και διηθητικά καρκινώματα μαστού¹⁴. Αυτά τα προκλινικά δεδομένα στη συνέχεια ενισχύθηκαν από την κλινική επιτυχία του trastuzumab, το οποίο είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον HER-2 και το οποίο βελτίωσε την επιβίωση των ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα μαστού, ενώ είναι υπό εξέλιξη κλινικές μελέτες αξιολόγησής του σαν συμπληρωματική του χειρουργείου θεραπεία σε ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού⁵³. Η υπερέκφραση του HER-2 έχει φανεί ότι πρόκειται για πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του μαστού, σε αντίθεση με την υπερέκφραση του HER-1 ο οποίος φαίνεται να εμπλέκεται σε πιο όψιμα στάδια⁵⁴.

Στις περισσότερες μελέτες η έκφραση του HER-1 έχει βρεθεί να σχετίζεται αρνητικά με την ύπαρξη θετικών οιστρογονικών υποδοχέων και φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει ένα δείκτη κακής πρόγνωσης⁵⁴. Επιπλέον, ολόενα και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι τόσο ο HER-1 όσο και ο HER-2 συνιστούν προβλεπτικούς δείκτες κακής ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία με ταμοξιφαίνη, και ότι η διασταυρούμενη συνομιλία (cross-talk) μεταξύ των μοριακών μονοπατιών των ορμονικών υποδοχέων και των αυξητικών παραγόντων έχουν σα τελικό αποτέλεσμα ανάπτυξη αντίστασης στα καρκινώματα μαστού με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς⁵⁵. Στη παρούσα μελέτη η ύπαρξη θετικών οιστρογονικών υποδοχέων βρέθηκε να σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την έκφραση του HER-2 ($P=0.011$) και του HER-4 ($P=0.016$), καθώς και με τη συνδυασμένη έκφραση HER-1/HER-2/HER-4 ($P=0.002$) και HER-1/HER-

4 ($P=0.001$), ενώ δεν υπήρχε καμία συσχέτιση με την έκφραση των HER-1, HER-3, καθώς και με τα υπόλοιπα μοντέλα συνδυασμένης έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών. Αντίστοιχα, δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης θετικών υποδοχέων προγεστερόνης και αυξημένης μεμονωμένης έκφρασης των μελών της οικογένειας του EGFR, ενώ στατιστικά σημαντική σχέση παρατηρήθηκε σε σχέση με τη συνδυασμένη έκφραση HER-1/HER-2/HER-4 ($P=0.019$).

Πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τα άλλα δύο μέλη αυτής της οικογένειας των πρωτεϊνών, τον HER-3 και τον HER-4, όσον αφορά στην έκφρασή τους και την προγνωστική τους σημασία^{56,57}. Σε μοντέλα καρκίνου του μαστού, η ενεργοποίηση του HER-4 φαίνεται να σχετίζεται με ενδοκυττάρια μηνύματα που επάγουν τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Πάντως, τα πολλαπλά επίπεδα πολυπλοκότητας της δράσης του HER-4 καθιστούν το ρόλο του στη καρκινογένεση του μαστού ένα μεγάλο ερωτηματικό. Αξιοσημείωτη παρατήρηση της μελέτης μας ήταν ότι κυτταροπλασματική θετικότητα για την πρωτεΐνη HER-4 διαπιστώθηκε σε διηθητικά και *in situ* μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες^{15,56}. Η πρωτεΐνη HER-3 ενεργοποιείται από το ίδιο πρόσδεμα που ενεργοποιεί τον υποδοχέα HER-4 και αποτελεί ετεροδιμερίζομενο μόριο κυρίως του HER-2, δημιουργώντας το πιο μιτογόνο διμερές μεταξύ όλων των διμερών των μελών της οικογένειας του EGFR⁵⁷.

Συνολικά, τα αποτελέσματα που αφορούν στα μέλη της οικογένειας του EGFR μπορεί να αποδοθούν σε ένα πιθανό σενάριο ότι η ύπαρξη HER (+), σε συνδυασμό με HER-3 (-) και με τις άλλες συσχετίσεις με τους ορμονικούς υποδοχείς και τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την απόπτωση, συνιστούν μία κρίσιμη “μοριακή ισορροπία” στο προκλινικό στάδιο της καρκινογένεσης του μαστού, η οποία μπορεί να αντικατοπτρίζεται στη μαστογραφική απεικόνιση.

Τα μη-ψηλαφητά καρκινώματα μαστού αποτελούν ουσιαστικά το προκλινικό στάδιο της νόσου και ταυτόχρονα μία ετερογενή ιστολογική ομάδα. Εντούτοις, φαίνεται ότι η μαστογραφική απεικόνιση των κακοήθων μικρο-αποτιτανώσεων αποτελεί ένα συχνό και ταυτόχρονα συχνό εύρημα. Οι προσπάθειες συσχέτισής τους με κλινικούς και ιστολογικούς δείκτες δεν έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Αντίθετα, η σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών της μοριακής καρκινογένεσης στο μαστό προσφέρει την ευκαιρία ταυτοποίησης συγκεκριμένων μοριακών αλλαγών που μπορεί να

χαρακτηρίζουν αυτή την ομάδα των καρκινωμάτων και την πιθανή συσχέτισή τους με τη μαστογραφική απεικόνιση.

Είναι πιθανό στο μέλλον η μελέτη της συνδυασμένης έκφρασης σημαντικών μορίων της καρ-

κινογένεσης του μαστού σε συνδυασμό με τη μαστογραφική απεικόνιση να δίνουν περισσότερες και πρωϊμότερες κλινικές πληροφορίες, οι οποίες θα καθορίζουν το θεραπευτικό πλάνο των ασθενών με μη-ψηλαφητό καρκίνωμα μαστού.

ABSTRACT

F.A. BADRA, M.V. KARAMOUZIS, E. LIKAKI-KARATZA, P. RAVAZOULA, E. TZORAKOLEFTHERAKIS, G. ICONOMOU, D. KOUKOURAS, A.G. PAPAVALASSILIOU, H.P. KALOFONOS: **Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications, epidermal growth factor receptor (egfr) family and apoptosis related proteins expression**

Screening mammography has greatly increased the number of non-palpable breast carcinomas diagnosed in asymptomatic women. Malignant-appearing microcalcifications represent one of the earliest mammographic findings of non-palpable breast carcinomas. In the present study, we have evaluated the expression of selected molecular markers in non-palpable breast carcinomas and its possible association with mammographically detected malignant-appearing microcalcifications. Three hundred fifty patients with non-palpable suspicious breast lesions that were detected during screening mammography between 1994 and 2004 were studied. All patients underwent msmmographically-guided needle localization breast excision biopsy. Histological examination revealed 95 (27.2%) carcinomas [50 (52.3%) ductal invasive, 35 (37.3%) ductal *in situ* and 10 (10.4%) lobular invasive]. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded sections in 75 out of 95 carcinomas by using a panel of monoclonal and polyclonal antibodies for ER, PR, p53, Bcl-2, Bax, FasL, DFF, HER-1, HER-2, HER-3 and HER-4. Malignant-appearing microcalcifications were the major mammographic finding in 60 out of 75 (80%) patients. Apoptosis-related proteins that were studied consisted of p53, Bax, FasL, Bcl-2 and DFF. Bcl-2 and p53 protein expression was not associated with any of the others proteins. Instead, Bax immunopositivity was found to be statistically significant correlated with DFF expression ($P=0.006$), while similar results were detected regarding Fas and DFF expression ($P<0.001$). Statistical significant associations were also found between malignant-appearing microcalcifications and Bax ($P=0.03$), Fas ($P=0.03$) and DNA fragmentation factor positivity ($P=0.03$) while no statistical correlation was found with Bcl-2 and p53 positivity ($P>0.05$). EGFR family proteins immunopositivity was detected in 78.7% cases for HER-1, 45% for HER-2, 32% for HER-3 and 74.7% for HER-4. Statistically significant associations were found between all EGFR proteins' expression. Statistical significant associations were also found between malignant-appearing microcalcifications and HER-1 ($P=0.001$), HER-2 ($P=0.015$) and HER-4 positivity ($P=0.034$), but not with HER-3 ($P>0.05$). We then evaluated the co-expression of all EGFR proteins. The most prominent HER-protein co-expression was HER-1/HER-2/HER-4 in 21.4% cases, followed by HER-2/HER-4 and HER-1/HER-2/HER-3/HER-4 in 21.4% and 18.6% carcinomas, respectively. Fifteen (20%) cases displayed no immunoreactivity for all EGFR proteins, while HER-1/HER-3/HER-4 and HER-1/HER-2 co-expression was found in 13.3% and 2.7% cases, respectively. HER-1/HER-4 and HER-1/HER-2/HER-4 protein co-expression was found to be statistically correlated with ER ($P=0.002$ and $P=0.001$, respectively) and PR(+) ($P=0.019$ and $P=0.004$, respectively), but no association was found with malignant-appearing microcalcifications. The combined negative immunoreactivity of all EGFR proteins was associated with ER(+) ($P=0.006$) and malignant-appearing microcalcifications ($P=0.03$). Malignant-appearing microcalcifications detected during screening-mammography represent a diagnostic, prognostic and therapeutic challenge. The findings of our study consolidate the already adopted idea that tumor progression occurs late in the preclinical phase of the disease due to a failure of equilibrium between proliferation controlling mechanisms and programmed

cell death pathways which can be reflected upon mammographic appearance. EGFR family proteins' expression is present since the preclinical phase of breast carcinomas and is strongly correlated (except HER-3) with the mammographic finding of malignant-appearing microcalcifications. The co-expression pattern of the four EGFR family members combined with the expression profile of other molecular prognostic factors and the mammographic appearance might predict the natural history of non-palpable breast carcinomas. **Key words:** Non-palpable breast carcinomas, mammography, microcalcifications, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, apoptosis. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):273-289, 2005.**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 16: 481-488, 2004.
- Shen S. Screening for breast cancer with mammography. *Lancet.* 358: 2165, 2001.
- Gotzsche PC, Olsen O. Is screening for breast cancer with mammography justifiable? *Lancet.* 355:129-134, 2000.
- Miettinen OS, Henschke CI, Pasmantier MW, et al. Mammographic screening: no reliable supporting evidence? *Lancet.* 359:404-406, 2002.
- Olsen O, Gotzsche PC. Cochrane review of screening for breast cancer with mammography. *Lancet.* 358:1340-1342, 2001.
- Primic-Zakelj M. Screening mammography for early detection of breast cancer. *Ann Oncol.* 10 (suppl):121-127, 1999.
- Zaugg K, Bodis S. Is there a role for molecular prognostic factors in the clinical management of ductal carcinoma in situ (DCIS) of the breast? *Radiotherapy & Oncology.* 55:95-99, 2000.
- Idvall I, Andersson C, Fallenius G, et al. Histopathological and cell biological factors of ductal carcinoma in situ before and after the introduction of mammographic screening. *Acta Oncol.* 40:653-659, 2001.
- Dinkel H-P, Gassel AM, Tschammler A. Is the appearance of microcalcifications on mammography useful in predicting histological grade of malignancy in ductal carcinoma in situ? *Br J Radiol.* 73:938-944, 2000.
- Johnson JM, Dalton RR, Landercasper J, et al. Image-guided or needle-localized open biopsy of mammographic malignant-appearing microcalcifications? *J Am Coll Surg.* 187:604-609, 1998.
- Mesurolle B, Ariche-Cohen M, Mignon F, et al. Clustering of breast microcalcifications on digital mammography: which parameters? *Clin Radiol.* 57:75, 2002.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 415:530-536, 2002.
- Mollino A, Pavarana M, Micciolo R, et al. Comparative study of clinical, pathological and biological characteristics of symptomatic versus asymptomatic breast cancers. *Ann Oncol.* 11:581-586, 2000.
- Karamouzis MV, Likaki-Karatza E, Badra FA, et al. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and molecular prognostic factors, *Int J Cancer.* 102:86-90, 2002.
- Abd El-Rahim DM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer.* 91:1532-1542, 2004.
- Hermann G, Keller RJ, Drossman S, Caravella BA, Tartter P, Panetta RA, et al. Mammographic pattern of microcalcifications in the preoperative diagnosis of comedo ductal carcinoma in situ: histopathologic correlation. *Can Assoc Radiol J.* 50:235-240, 1999.
- Ferranti C, Coopmans de Yoldi G, Biganzoli E, Bergonzi S, Mariani L, Scaperrotta G, et al. Relationships between age, mammographic features and pathological tumour characteristics in non-palpable breast cancer. *Br J Radiol.* 73:698-705, 2000.
- Walker RA, Dearing SJ, Brown LA. Comparison of pathological and biological features of symptomatic and mammographically detected ductal carcinoma in situ of the breast. *Hun Pathol.* 30:943-948, 1999.
- Alexander FE, Anderson TJ, Hubbard AL. Screening status in relation to biological and chronological characteristics of breast cancers: A cross sectional survey. *J Med Screen.* 4:152-157, 1997.
- Moezzi M, Melamed J, Vamvakas E, Inghirami G, Mitnick J, Quish A, et al. Morphological and biological characteristics of mammogram-detected invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 27:944-948, 1996.
- Rajakariar R, Walker RA. Pathological and biological features of mammographically detected invasive breast carcinomas. *Br J Cancer.* 71:150-154, 1995.

22. Tweedie E, Tonkin K, Kerkvliet N, Doig GS, Sparrow RK, O'Malley FP. Biologic characteristics of breast cancer detected by mammography and by palpation in a screening program: A pilot study. *Clin Invest Med.* 20:300-307, 1997.
23. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol.* 187:272-278, 1999.
24. Heimann R, Hellman S. Aging, progression, and phenotype in breast cancer. *J Clin Oncol.* 16:2686-2692, 1998.
25. Ernster VL, Ballard-Barbash R, Barlow WE, et al. Detection of ductal carcinoma in situ in women undergoing screening mammography. *J Natl Cancer Inst.* 94:1546-1554, 2002.
26. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 17:2941-2953, 1999.
27. de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP. Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat.* 66:201-208, 2001.
28. Yang QF, Sakurai T, Yoshimura G, Shan L, Suzuma T, Tamaki T, et al. Expression of bcl-2 but not bax or p53 correlates with in vitro resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 61:211-216, 2000.
29. Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, Guazzi A, Camisa R, Bella MA, et al. Bcl-2 expression of fine-needle aspirates from primary breast carcinoma: correlation with other biologic factors. *Cancer.* 87:224-230, 1999.
30. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Wilsher P, McClelland RA, Hoyle HB, et al. Immunocytochemical localization of bcl-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *Int J Cancer.* 59:619-628, 1994.
31. Liang Y, Nulander KD, Yan C, Schor NF. Role of caspase 3-dependent Bcl-2 cleavage in potentiation of apoptosis by Bcl-2. *Mol Pharmacol.* 61:142-149, 2002.
32. Mustonen M, Raunio H, Paako P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in premalignant and malignant breast lesions. *Histopathology.* 31:347-354, 1997.
33. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol.* 145:1323-1336, 1994.
34. Sirvent JJ, Aguilar MC, Olona M, et al. Prognostic value of apoptosis in breast cancer (pT1-pT2). A TUNEL, p53, bcl-2, bag-1 and Bax immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 19:759-770, 2004.
35. Rehman S, Crow J, Revell PA. Bax protein expression in DCIS of the breast in relation to invasive ductal carcinoma and other molecular markers. *Pathology Oncology Research.* 6:256-263, 2000.
36. Ben-Hur H, Mordechay E, Halperin R, et al. Apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2 and p53) in different types of human breast tumors. *Oncology Reports.* 9:977-980, 2002.
37. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, et al. Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6:457-463, 1999.
38. Mullauer L, Mosberger I, Grusch M, et al. Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer. *J Pathol.* 191: 468-470, 2000.
39. Kilinc N, Yaldiz M. p53, c-erbB-2 expression and steroid hormone receptors in breast carcinoma: correlations with histopathological parameters. *Eur J Gynecol Oncol.* 5:606-610, 2004
40. Bankfalvi A, Tory K, Kemper M, et al. Clinical relevance of immunohistochemical expression of p53-targeted gene products mdm-2, p21 and bcl-2 in breast carcinoma. *Pathol Res Pract.* 196:489-501, 2000.
41. Yokota T, Imamura M, Teshima S, et al. C-erbB-2 p53 protein expression and steroid hormone receptors in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 19:4007-4010, 1999.
42. Bhargava V, Thor A, Deng G, et al. The association of p53 immunopositivity with tumor proliferation and other prognostic indicators in breast cancer. *Mod Pathol.* 7:361-364, 1994.
43. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391:96-99, 1998.
44. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature.* 412:95-99, 2001.
45. Zhou P, Lugovsky AA, McCarty JS, et al. Solution structure of DFF40 and DFF45 N-terminal domain complex and mutual chaperone activity of DFF40 and DFF45. *Proc Natl Acad Sci.* 98:6051-6055, 2001.
46. Parton M, Krajewski S, Smith I, et al. Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 8:2100-2108, 2002.
47. Atalay G, Cardoso F, Awada A, et al. Novel therapeutic strategies targeting the epidermal

- growth factor receptor (EGFR) family and its downstream effectors in breast cancer. *Ann Oncol.* 14:1346-1363, 2003.
48. Karamouzis MV, Papavassiliou AG.: Retinoid receptors cross talk in respiratory epithelium cancer chemoprevention, *Trends Mol Med.* 11:10-16, 2005.
49. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, et al. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol.* 200:290-297, 2003.
50. Srinivasan R, Gillett CE, Barnes DM, et al. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res.* 60:1483-1487, 2000.
51. Bieche I, Onody P, Tozlu S, et al. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer.* 106:758-765, 2003.
52. Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol.* 56:300-304, 2003.
53. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344:783-792, 2001.
54. Yarden Y. Untangling the ErbB signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:127-137, 2001.
55. Schiff R. Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res.* 10:331s-336s, 2004.
56. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol.* 196:17-25, 2002.
57. Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA, et al. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res.* 7:171-177, 2001.

Η διαγνωστική προσέγγιση των αλλοιώσεων της στοματο-γναθο-προσωπικής περιοχής με την κυτταρολογία υγρής φάσης (Thinprep)

P.M. Βαλερή¹, Α. Παντίδου¹, Κ. Βαχτσεβάνος², Ε. Ασλανίδου¹, Χ. Δεστούνη¹, Κ. Αντωνιάδης²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος της Κυτταρολογίας στη διερεύνηση των αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής είναι σημαντικός. Ιδιαίτερα, η νέα τεχνική της Κυτταρολογίας Υγρής Φάσης (ThinPrep: αυτοματοποιημένη μέθοδος επεξεργασίας και επίστρωσης σε λεπτή μονοεπίπεδη στιβάδα) συμβάλλει στην επίλυση αρκετών διαφοροδιαγνωστικών προβλημάτων της καθημερινής κλινικής πράξης. Στόχος της μελέτης μας είναι η συγκριτική αξιολόγηση της τεχνικής αυτής σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο. Αξιολογήθηκαν συνολικά 65 περιπτώσεις καλοήθων και κακοήθων αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής. Σε 41 από αυτές, η λήψη του υλικού έγινε με ψήκτρα, ενώ στις υπόλοιπες 24, πραγματοποιήθηκε παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA). Ακολούθησε επεξεργασία του υλικού με τη συμβατική μέθοδο και με την τεχνική ThinPrep, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόστηκε ανοσοκυτταροχημεία. Συγκρίνονται τα αποτελέσματα της συμβατικής μεθόδου σε σχέση μ' αυτό της Υγρής Φάσης και αναλύονται τα πλεονεκτήματα της τεχνικής ThinPrep καθώς και η συμβολή της στη διάγνωση των αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής. **Λέξεις-κλειδιά:** Κυτταρολογία Υγρής Φάσης, FNA, στοματογναθοπροσωπική περιοχή, σιελογόνοι αδένες. **Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):290-295.**

Εισαγωγή – Σκοπός

Η διαγνωστική προσέγγιση των αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής δημιουργεί συχνά διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα στην καθημερινή κλινική πράξη. Η Κυτταρολογία [αποφολιδωτική – παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA)], ιδιαίτερα με τη νέα τεχνική της Κυτταρο-

λογίας Υγρής Φάσης, συμβάλλει σημαντικά στην επίλυση των προβλημάτων αυτών, διότι η τεχνική αυτή παρέχει βασικά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής μεθόδου.¹⁻⁴

Στόχος της μελέτης μας είναι η αξιολόγηση της Κυτταρολογίας Υγρής Φάσης (ThinPrep) στη διερεύνηση των αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο.

Υλικό – Μέθοδος

Αξιολογήθηκαν συνολικά 65 περιπτώσεις κα-

¹Κυτταρολογικό Εργαστήριο, ²Γναθοχειρουργική Κλινική, «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη. Υπεύθυνος αλληλογραφίας: Βαλερή Ροζαλία-Μαρία. Γραβιάς 15, 54645, Θεσσαλονίκη, Τηλ. 2310889249. e-mail: rosasaliavaleri@hotmail.com

λοήθων και κακοήθων αλλοιώσεων της στοματο-γναθο-προσωπικής περιοχής οι οποίες αφορούσαν : 10 τα χείλη, 6 τη γλώσσα, 22 τις παρειές, 5 τα ούλα, 2 τις γνάθους, 2 το έδαφος της στοματικής κοιλότητας, 1 το πτερύγιο του ωτός, 12 τις παρωτίδες και 5 τους λεμφαδένες της περιοχής.

Σε 41 από αυτές η λήψη του υλικού έγινε με ψήκτρα (1^η ομάδα), όταν οι βλάβες ήταν επιφανειακές, κυρίως λευκοπλακίες ή ελκωτικές περιοχές, που εντοπιζόταν στη στοματική κοιλότητα συνήθως (10 στα χείλη, 5 στη γλώσσα, 20 στις παρειές και 5 στα ούλα), καθώς και στο πτερύγιο του ωτός (1 περίπτωση). Στις περιπτώσεις που το δείγμα δεν ήταν επαρκές εφαρμόστηκε και αποφολίδωση με νυστέρι.

Σε 19 ασθενείς πραγματοποιήθηκε παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA) διαμέτρου 21^ο gauge προσαρμοσμένη σε σύριγγα των 10 mL (2^η ομάδα). Οι αλλοιώσεις αφορούσαν ψηλαφητές υποβλεννογόνιες ή υποδόριες διογκώσεις, σαφώς ή ασαφώς περιγεγραμμένες, από τις οποίες οι 12 εντοπιζόνταν στις παρωτίδες και οι 7 στη στοματική κοιλότητα (2 στις παρειές, 2 στις γνάθους, 1 στο έδαφος της στοματικής κοιλότητας και 1 στη γλώσσα).

Στις υπόλοιπες 5 περιπτώσεις που αφορούσαν διογκωμένους λεμφαδένες (3 τραχηλικούς, 1 υπογνάθιο και 1 οπισθοωτιαίο), πραγματοποιήθηκε παρακέντηση με βελόνη ινσουλίνης διαμέτρου 23^ο gauge προσαρμοσμένη σε σύριγγα των 10 mL (3^η ομάδα). Η χρήση λεπτότερης βελόνης στους λεμφαδένες αποσκοπεί σε μια λιγότερο αιμορραγική παρακέντηση αφού η αναρρόφηση με βελόνη μεγαλύτερης διαμέτρου προκαλεί συνήθως πρόσμιξη του υλικού με περιφερικό αίμα δυσχεραίνοντας έτσι τη διάγνωση.

Η λήψη του υλικού, με ψήκτρα ή με βελόνη, πραγματοποιήθηκε δύο φορές, ώστε η επεξεργασία του υλικού να γίνει τόσο με τη συμβατική μέθοδο (επίστρωση σε αντικειμενοφόρους πλάκες και άμεση μονιμοποίηση με cytospray) όσο και με την τεχνική Thin Prep. Κατά την τεχνική αυτή το κυτταρολογικό υλικό τοποθετείται απευθείας και μονιμοποιείται σε φιαλίδιο που περιέχει ειδικό διάλυμα με βάση τη μεθανόλη. Στη συνέχεια το φιαλίδιο τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα όπου αντιπροσωπευτικό δείγμα κυτταρικού πληθυσμού, μέσω ενός ειδικού φίλτρου μιας χρήσης επιστρώνεται αυτόματα σε λεπτή μονοεπίπεδη στιβάδα σε συγκεκριμένη κυκλοτερή περιοχή και ακολουθεί η συνήθης χρώση.

Στις περιπτώσεις που παρουσιάστηκαν διαγνωστικά προβλήματα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτ-

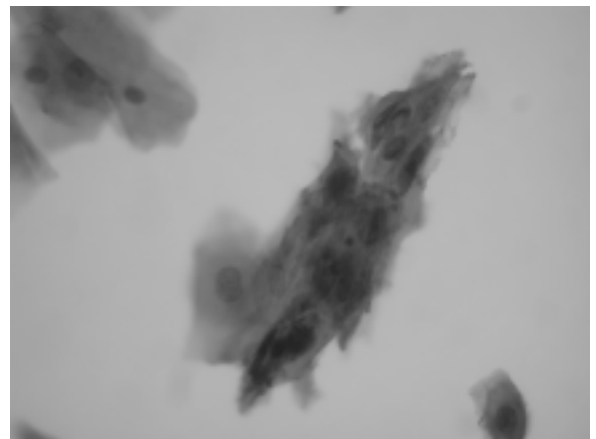
ταροχημική ανίχνευση ειδικών δεικτών τόσο σε συμβατικά όσο και σε επιχρίσματα ThinPrep από το εναπομείναν υλικό του δείγματος στο φιαλίδιο. Οι ανοσοκυτταροχημικοί δείκτες που ανιχνεύθηκαν ήταν κατά κύριο λόγο το Επιθηλιακό Μembranικό Αντιγόνο (EMA), το Καρκινοεμβρυικό Αντιγόνο (CEA), το Κοινό Λευκοκυτταρικό Αντιγόνο (LCA) και η Βιμεντίνη (Vim). Ανάλογα με την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν και άλλα πιο εξειδικευμένα αντισώματα.

Στη συνέχεια έγινε συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων, συμβατικής και τεχνικής ThinPrep, λαμβάνοντας υπ' όψη: την ποιότητα των επιχρισμάτων, την κυτταροβρίθεια, το συνοδό υπόστρωμα, τις αιμορραγικές και νεκρωτικές προσμίξεις, την κυτταρική αρχιτεκτονική, την μονοεπίπεδη επίστρωση καθώς και την κυτταρομορφολογική ευκρίνεια (πρωτοπλασματικές /πυρηνικές λεπτομέρειες).

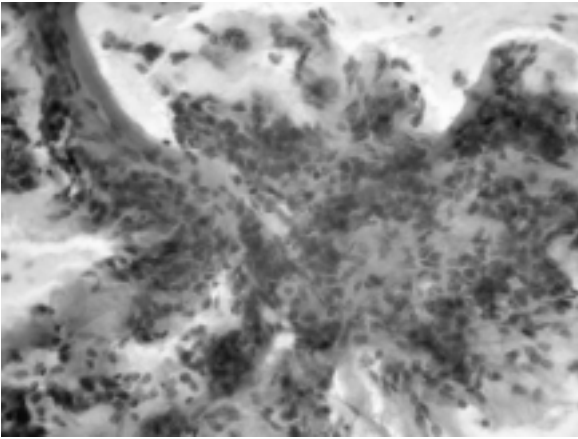
Αποτελέσματα

Η κυτταρολογική εξέταση του υλικού με ψήκτρα (41 περιπτώσεις) έδειξε: 24 περιπτώσεις αρνητικές για κακοήθεια, 9 με κυτταρική ατυπία, 3 ύποπτες για κακοήθεια και 5 θετικές περιπτώσεις (καρκινώματα πλακώδους τύπου) (Εικόνα 1).

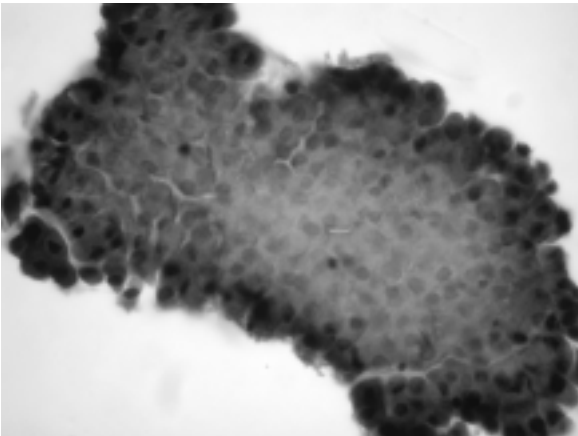
Η κυτταρολογική εξέταση του υλικού με FNA (19 περιπτώσεις) έδειξε ότι: από τις 12 παρακέντησεις παρωτίδας οι 6 ήταν μικτοί όγκοι (Εικόνα 2), 3 όγκοι Warthin (Εικόνα 3), 1 πορογενές καρκίνωμα (Εικόνα 4), 1 καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης και 1 λέμφωμα. Από τις 7 υπόλοιπες περιπτώσεις, οι 4 ήταν αρνητικές για κακοήθεια



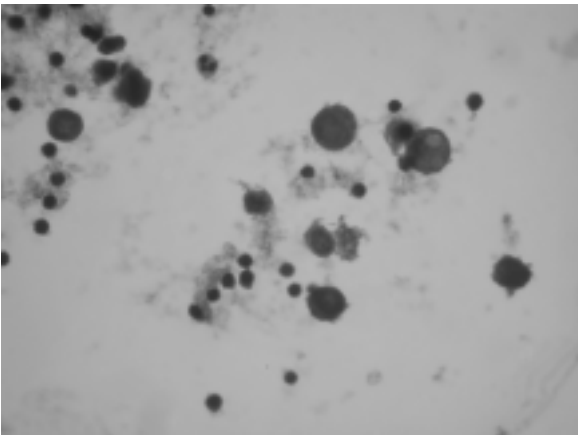
Εικόνα 1. Πλακώδες καρκίνωμα μετά από λήψη με ψήκτρα (τεχνική επεξεργασίας Thin Prep, χρώση Παπανικολάου x400)



Εικόνα 2. Μικτός όγκος παρωτίδας (FNA, επίχρισμα συμβατικής μεθόδου, χρώση Παπανικολάου x400)



Εικόνα 3. Όγκος Warthin (FNA, τεχνική επεξεργασίας Thin Prep, χρώση Παπανικολάου x400)



Εικόνα 4. Πορογενές καρκίνωμα παρωτίδας (FNA, τεχνική Thin Prep, χρώση Παπανικολάου x400)

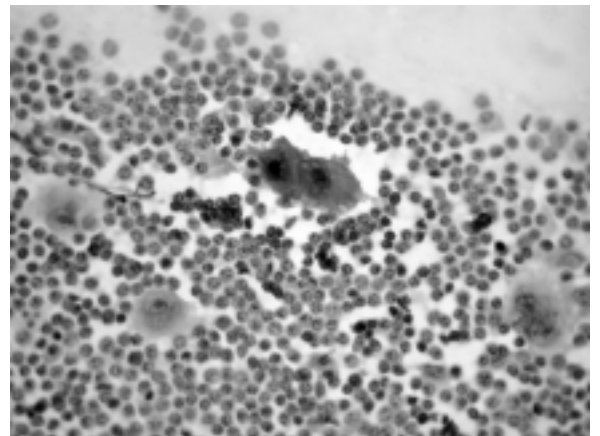
με έντονη φλεγμονή, 2 ήταν καρκινώματα απο πλακώδες επιθήλιο και 1 κακόηθες νεόπλασμα μεσεγγυματογενούς προέλευσης.

Από τις 5 παρακεντήσεις λεμφαδένων βρέθηκαν 1 κοκκιωματώδης φλεγμονή, πιθανώς σαρκοειδωση, 3 μεταστατικά καρκινώματα πλακώδους τύπου και 1 λέμφωμα Hodgkin (Εικόνα 5).

Συσχέτιση με τις αντίστοιχες ιστολογικές διαγνώσεις ήταν εφικτή σε όλες τις ύποπτες και κακοήθεις περιπτώσεις και στο 1/3 των καλοήθων περιπτώσεων (συμφωνία σε ποσοστό 95% στις περιπτώσεις που υπήρχε σύγχρονη διάγνωση).

Η σύγκριση της κυτταρολογικής εικόνας της συμβατικής μεθόδου με την Κυτταρολογία Υγρής Φάσης (ThinPrep) έδειξε ορισμένες διαφορές. Παρ' όλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις, οι διαγνώσεις του ThinPrep συμφωνούσαν με τα συμβατικά επίχρισματα.

Οι κυτταρομορφολογικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στις επιμέρους παθήσεις ήταν οι εξής: Όσον αφορά τους μικτούς όγκους, τα επιθηλιακά και τα μεσεγγυματογενή στοιχεία ήταν παρόντα συγχρόνως στο ThinPrep μόνο σε κυτταροβριθή επίχρισματα. Το μυξοειδές υπόστρωμα ήταν μειωμένο και εμφανιζόταν υπο μορφή μικρών σταγόνων. Επίσης τα επιθηλιακά κύτταρα σχημάτιζαν μικρές αθροίσεις χωρίς ιδιαίτερο σχήμα. Έτσι, η διάγνωση ήταν πιο εύκολη με τη συμβατική μέθοδο στις περισσότερες περιπτώσεις (4 απο 6) λόγω ύπαρξης επαρκούς μυξωματώδους στοιχείου. Στον όγκο του Warthin είχαμε μικρές αθροίσεις ογκοκυττάρων, οι οποίες ήταν πιο εμφανείς στο ThinPrep, ενώ τα λεμφοκύτταρα ήταν ελαττωμένα σε αριθμό, αλλά η υπεροχή τους γινόταν πιο



Εικόνα 5. Νόσος Hodgkin σε FNA λεμφαδένα (συμβατική μέθοδος, χρώση Παπανικολάου x400)

εύκολα αντιληπτή. Στη μια περίπτωση με κυστική εκφύλιση το ThinPrep υπερείχε με παρουσία λίγων ογκοκυττάρων σε αντίθεση με τα ακυτταρικά συμβατικά επιχρίσματα. Στις πρωτοπαθείς κακοήθεις νεοπλασίες δεν παρατηρήσαμε αξιόλογες διαφορές παρά μόνο ελάττωση της νέκρωσης στο υπόστρωμα (tumor diathesis). Στο λέμφωμα παρωτίδας, τα λεμφοειδή κύτταρα στο ThinPrep παρουσίαζαν μεμονωμένη διάταξη ή ολιγοκυτταρικές αθροίσεις προσομοιάζοντας με ένα μικροκυτταρικό καρκίνωμα (απαραίτητη η εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας). Στο λέμφωμα Hodgkin του λεμφαδένου, τα κύτταρα Reed-Sternberg και τα Hodgkin κύτταρα ήταν πιο εύκολα αναγνωρίσιμα στην μονοεπίπεδη επίστρωση.

Ανοσοκυτταροχημική μελέτη πραγματοποιήθηκε τόσο σε συμβατικά, όσο και σε επιχρίσματα ThinPrep στις 3 περιπτώσεις των κακοήθων όγκων της παρωτίδας, στο κακοήθες νεόπλασμα μεσεγχοματογενούς προέλευσης της στοματικής κοιλότητας καθώς και στο λέμφωμα Hodgkin: το πορογενές καρκίνωμα ήταν θετικό στο CEA, Κερατίνες AE I-II και Breast-2 αντιγόνο ενώ το λέμφωμα Β-κυτταρικής αρχής στο LCA και Pan-B δείκτη. Το καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης ήταν αρνητικό σ' όλους τους δείκτες. Το μεσεγχοματογενές νεόπλασμα ήταν θετικό στη Vim και το λέμφωμα Hodgkin παρουσίασε θετικότητα στο EMA, CD 30 και CD 15.

Τα ανεπαρκή επιχρίσματα για τη συμβατική μέθοδο ήταν 8,53% ενώ για το ThinPrep 3,5%. Η διαγνωστική ακρίβεια για τη συμβατική μέθοδο ανερχόταν σ' ένα ποσοστό 91% ενώ για το ThinPrep στο 95%.

Απο τη συγκριτική αξιολόγηση των συμβατικών και ThinPrep επιχρισμάτων διαφαίνεται, ότι το ThinPrep παρέχει καλύτερης ποιότητας επιχρίσματα, χωρίς περίσσεια αιμορραγικών και νεκρωτικών προσμίξεων, γεγονός σημαντικό σε μια περιοχή ιδιαίτερα αιμορραγική όπως η κεφαλή και ο τράχηλος. Διατηρεί όμως τη νεκρωτική διάθεση (tumor diathesis), χαρακτηριστικό κυρίως των καρκινωμάτων απο πλακώδες επιθήλιο.

Ως προς την αρχιτεκτονική, τα κύτταρα δημιουργούν μικρότερες ομάδες και διατάσσονται περισσότερο μεμονωμένα. Επίσης κάνει πιο γρήγορο και απλό το screening αφού συγκεντρώνει τα κύτταρα σε συγκεκριμένη, μικρής διαμέτρου, περιοχή του πλακιδίου. Η χρήση ανοσοκυτταροχημείας είναι πιο εύκολη με την τεχνική ThinPrep διότι παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας αρχειακού υλικού απο τη λήψη.

Συζήτηση

Η διερεύνηση των νεοπλασματικών και μη παθήσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής αποτελεί πρόκληση στην καθημερινή διαγνωστική πρακτική μια και διάφορες νεοπλασματικές και μη παθήσεις, καλοήθεις ή κακοήθεις, εντοπίζονται στην περιοχή αυτή. Το ιστορικό και η κλινική εξέταση παίζουν σημαντικό μεν αλλά όχι καθοριστικό ρόλο στη διαγνωστική προσέγγιση τους.⁵

Η αποφολιδωτική Κυτταρολογία και η παρακέντηση με λεπτή βελόνη (FNA) έχουν γίνει ευρέως αποδεκτές μέθοδοι απο τους κλινικούς γιατρούς, για τις περισσότερες αλλοιώσεις της περιοχής, οι οποίες είναι εύκολα προσπελάσιμες.^{6,7} Αποτελούν γρήγορες, εύκολες και σχετικά αναιμακτες διαγνωστικές εξετάσεις, που μπορούν να πραγματοποιηθούν στο εξωτερικό ιατρείο χωρίς να απαιτείται γενική αναισθησία σε αντίθεση με τη χειρουργική βιοψία, η οποία συχνά απαιτεί γενική αναισθησία, χρόνο και μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές (συρίγγιο, εμφύτευση καρκινικών κυττάρων, τραυματισμό νεύρου).⁸

Οι κυτταρολογικές εξετάσεις είναι ελάχιστα επώδυνες, επαναλήψιμες, με άμεσα αποτελέσματα και με ευαισθησία περίπου 95% (77%-97%), ενώ η ειδικότητα τους κυμαίνεται συνήθως στο 95%-98% (91%-100%).^{9,10}

Στη στοματογναθοπροσωπική περιοχή παρατηρείται ποσοστό (0-20%) ψευδώς αρνητικών κυτταρολογικών αποτελεσμάτων,⁹ για το οποίο συχνά ενοχοποιούνται λάθη κατά τη συλλογή και επεξεργασία των δειγμάτων,^{11,12} αδυναμία αξιολόγησης όλου του υλικού της παρακέντησης, καθώς και δυσκολία μικροσκοπησης λόγω των φλεγμονωδών και αιμορραγικών προσμίξεων, συχνών στην περιοχή κεφαλής και τραχήλου.

Η νέα μέθοδος της Κυτταρολογίας Υγρής Φάσης ThinPrep ελαχιστοποιεί κατά πολύ τα προβλήματα αυτά, βελτιώνοντας την ποιότητα του δείγματος. Με την τεχνική αυτή αποφεύγονται προβλήματα ελλειπούς μονιμοποίησης (εκφύλιση), καθώς και επικάλυψης των κυττάρων από αίμα και φλεγμονώδη κύτταρα, γεγονός που καθιστά ευχερέστερη την αξιολόγηση ακόμη και των ελάχιστων διαγνωστικών κυττάρων.¹⁻⁴

Με τη νέα αυτή τεχνική παρουσιάζονται όμως κυτταρομορφολογικές διαφορές σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο, γι' αυτό απαιτείται εμπειρία προς αποφυγή διαγνωστικού λάθους.^{3,4}

Ανάλογες με τις δικές μας παρατηρήσεις παρουσίασαν και οι Michael και Hunter, για τους μικτούς όγκους, όπως ότι, αποτελούνται απο μι-

κρότερες ομάδες και λιγότερο μυξωματώδες στοιχείο σε μορφή μικρών σταγονιδίων στο ThinPrep. Η ανάλυση του υλικού απο όγκο Warthin έδειξε μικρές αθροίσεις επιθηλιακών κυττάρων και μικρότερο αριθμό λεμφοκυττάρων.³ Σε ότι αφορά τα κακοήγη νεοπλασμάτα όλοι οι συγγραφείς αναφέρουν ότι με την Κυτταρολογία Υγρής Φάσης παρατηρείται λιγότερη νέκρωση.¹⁻⁴ Όσον αφορά τα λεμφώματα οι παρατηρήσεις μας ήταν ανάλογες των Ford και συν.² και Michael και Hunter³ ως προς την παρουσία αθροίσεων λεμφοειδών κυττάρων με τη νέα τεχνική.

Σχεδόν όλοι οι ερευνητές θεωρούν ότι το ThinPrep προσφέρει καλύτερη ποιότητα επιχρίσματος όσον αφορά το καθαρότερο υπόστρωμα, την αρχιτεκτονική και τις κυτταρικές λεπτομέρειες αλλά δεν πλεονεκτεί στη διαγνωστική ακρίβεια σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο,^{2,4,13,14} σε αντίθεση με τη δική μας μελέτη όπου είχαμε μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια με τη μονοεπίπεδη επίστρωση.

Στην εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας παρατηρήσαμε καλύτερη ποιότητα χρώσης με το ThinPrep ίσως λόγω του καθαρού υποστρώματος και της επίστρωσης των κυττάρων σε μονοεπίπεδη

στιβάδα.

Συμπερασματικά, η μέθοδος ThinPrep με τα πλεονεκτήματά της έναντι της συμβατικής μεθόδου φαίνεται να είναι ιδανική για τη διάγνωση των αλλοιώσεων της στοματογναθοπροσωπικής περιοχής φτάνει να υπάρχει η σχετική εμπειρία για τη σωστή εκτίμηση και αξιολόγηση των επιχρισμάτων με τη νέα τεχνική.

Συνοψίζοντας αναφέρουμε ότι η τεχνική ThinPrep υπερέρχει στα παρακάτω σημεία: α) ελαχιστοποιεί τις απώλειες κυττάρων, προκαλώντας έτσι αύξηση των επαρκών δειγμάτων, β) διατηρεί εν μέρει την κυτταρική αρχιτεκτονική και παρουσιάζει μεγαλύτερη κυτταρομορφολογική ευκρίνεια, γ) μειώνει τις βλεννώδεις και αιματηρές προσμίξεις, με αποτέλεσμα καθαρότερο υπόστρωμα, γεγονός που αποκτά ιδιαίτερη σημασία στην περιοχή αυτή, δ) ελαττώνει το χρόνο μικροσκοπήσης, δεδομένου ότι μικροσκοπείται συγκεκριμένη, διαγνωστική περιοχή και ε) παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας αρχειακού υλικού και ευχερέστερης εφαρμογής ανοσοκυτταροχημείας καθώς και άλλων τεχνικών, όπου αυτές ενδείκνυνται.

ABSTRACT

R. VALERI, A. PANTIDOU, K. VAHTSEVANOS, E. ASLANIDOU, CH. DESTOUNI, K. ANTONIADIS: **Liquid Based Cytology in diagnosis of oral, maxillary and facial region lesions**

The role of Cytology in the interpretation of oral, maxillary and facial region lesions is very important. Especially, the new method of Liquid Based Cytology (ThinPrep technique: an automated method of specimen preparation and distribution of cells in a thin, evenly dispersed layer) contributes to the resolution of several differential diagnostic problems. The aim of our study is the comparison between the new technique and the conventional method. We evaluated 65 cases of benign and malignant lesions of this region. In 41 of them, a brush was used for the enhance of the cytologic material, while in the rest 24 cases, fine needle aspiration (FNA) was performed. The cytologic material was processed using both the conventional method and the ThinPrep technique, while in certain cases immunocytochemistry was applied. We compare the cytomorphologic picture between the conventional method and the Liquid Based Cytology and analyze the advantages of the ThinPrep technique, as well as its contribution to the diagnostic approach of oral, maxillary and facial region lesions. **Key words:** Liquid Based Cytology; FNA; head and neck lesions; salivary glands. **Forum of Clinical Oncology 4 (4):290-295, 2005.**

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Valeri R.M., Hadjileontis C., Skordalaki A., et al: Salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Acta cytologica* Vol. 49, No 3, 61-64,2005.
2. Ford L., Rasgon B., Hilsinger R., et al: Comparison of ThinPrep versus conventional smear cytopreparatory techniques for FNA specimens of head and neck. *Otolaryngology- Head and Neck surgery*. Vol. 126, No 5, 554-561, 2002.

3. Michael C. and Hunter B: Interpretation of FNAs processed by the ThinPrep technique. *Diagn Cytopathology*. Vol 23, No 1, 6-13, 2000.
4. Dey P., Luthra U., George J., et al: Comparison of ThinPrep and conventional preparations on FNA cytology material. *Acta Cytologica* Vol 44, No 1, 2000.
5. Phillips DE, Jones AS: Reliability of clinical examination in the diagnosis of parotid tumors, *J R Coll Surg Edinb* 39: 100-102, 1994
6. Das DK, Gulati A, Bhatt NC, et al: Fine-needle aspiration cytology of oral and pharyngeal lesions: A study of 45 cases. *Acta Cytol* 37: 333-342, 1993.
7. Dejmek A, Lindholm K: Fine needle aspiration biopsy of cystic lesions of the head and neck, excluding the thyroid. *Acta Cytol* 34: 443-448, 1990.
8. DeMay R. *The Art and Science of Cytopathology*, ASCP Press, Chicago 1996.
9. Oyafuso MS., Filho AL., Ikeda MK: The role of FNA cytology in the diagnosis of lesions of the head and neck excluding the thyroid and salivary glands. *Tumori* 78: 134-136, 1992.
10. Schelkun PM., Grundy WG: FNAB of head and neck lesions: *J Oral Maxillofac Surg* 49: 262-267, 1991.
11. Frable MAS, Frable WJ: Fine-needle aspiration biopsy of salivary glands. *Laryngoscope* 101: 245-249, 1991.
12. MacLeod CB, Frable WJ: Fine-needle aspiration biopsy of the salivary gland: Problem cases. *Diagn Cytopathol* 9: 216-225, 1993.
13. Zhang ZH, Pan QJ, Sun YT: A comparison of ThinPrep and conventional smear. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. Feb 26(2):102-5, 2004.
14. Al-Khafaji B, Afify A: Salivary gland FNA using the ThinPrep technique. *Acta Cytologica* Vol 45, No 4, 2001.

Πότε πρέπει να «εγκαταλείπει» ο ογκολόγος;

A. Αρδαβάνης

*Ότι ανθρώπων βούληση καμπύλη δεν άλλαξε καμμιά
Παραδέχτηκα πια, όμως ακόμα ρωτά:
Ποια πρόδλεψη επαληθεύτηκε;
Πώς τη γνώση αφορμή;
Τάξη ή Χάος;*

*Η φύση ούτε τιμωρεί ούτε ανταμείβει.
Συνεπής πάντα ενίσταται.*

A.Σ.Α

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ασθενής A: «Μη μ' αφήσεις να πεθάνω γιατρέ!»

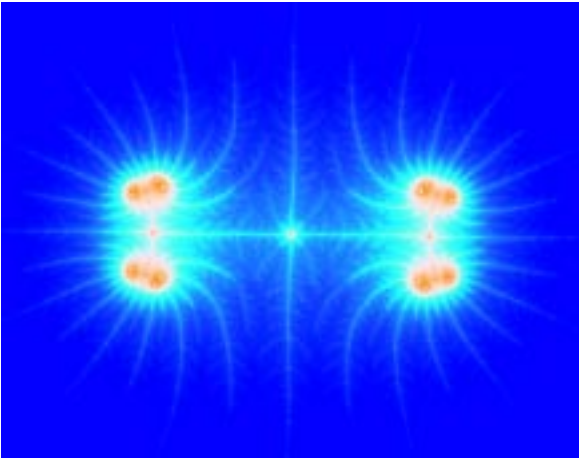
Ασθενής B: «Δε θέλω να μείνω μέσα από το παράθυρο και να βλέπω απ' έξω τον ήλιο να ανατέλλει και να δύει. Άφησέ με να φύγω...»

Δύο αντιδιαμετρικές στάσεις ασθενών με προχωρημένο καρκίνο: έκκληση όποιας βοήθειας από τη μια και άρνηση λήψης ειδικής θεραπείας ή υποστηρικτικής της ζωής φροντίδας από την άλλη. Αντιδιαμετρικές φαινομενικά καθώς, αμφότερες υποδηλώνουν την αγωνία ενώπιον της απαξίωσης και επερχόμενης ακύρωσης του σώματος και της ψυχής. Στο παρόν κείμενο επιχειρείται μια καταγραφή μικρού μέρους των διλημματικών –στο σύνολό τους- ερωτημάτων κάθε σκεπτόμενου λειτουργού υγείας απέναντι στον ασθενή με προχωρημένο καρκίνο βαριάς πρόγνωσης ή τελικού σταδίου. Τι σηματοδοτεί το «εγκαταλείπω», πότε και με ποια κριτήρια η ειδική αντικαρκινική θεραπεία θεωρείται ως εξαντλημένη από άποψη ελπίδας ύφεσης της νόσου ή παράτασης της ζωής, «πόση» φροντίδα να παρασχεθεί, οικονομικά και κοινωνικά ζητήματα, ηθική της απόσυρσης από τη στήριξη του λειτουργού και του συστήματος υγείας...

Βήμα Κλινικής Ογκολογίας 2005, 4 (4):296-301.

Τα εισαγωγικά στο ρήμα του τίτλου, πολλοί - του συγγραφέα συμπεριλαμβανομένου- θα ήθελαν να είναι εννοιολογικώς αναιρετικά. Εντούτοις δεν είναι. Είτε το αποδεχόμαστε είτε όχι, κάποια στιγμή αργά ή γρήγορα, κάθε άνθρωπος,

με υψηλό ή χαμηλό ηθικό και ψυχικό σθένος, δεν αντέχει και «τα παρατάει». Αντιστρέφοντας λοιπόν τον νοηματικό βηματισμό του τίτλου, το ερώτημα μπορεί να γίνει: εγκαταλείπει ο ογκολόγος, ο κάθε γιατρός ποτέ; Η απάντηση είναι ότι κάθε άνθρωπος κάποτε απλώς δε μπορεί, ή δε μπορεί άλλο. Άρα το διακύβευμα δεν είναι εγκαταλείπω ή όχι και πότε, αλλά μπορώ ή δε



μπορώ. Και, όπως θα επιχειρήσουμε να δείξουμε παρακάτω, κάποιοι-ίσως οι περισσότεροι απλώς δε μπορούν είτε από την αρχή είτε αργότερα, ενώ άλλοι δε θέλουν ή δεν ήθελαν ποτέ να πολεμήσουν. Και ο πόλεμος, κάθε πόλεμος, δεν κερδίζεται με απρόθυμους στρατιώτες, όσος άρτιος και μοντέρνος εξοπλισμός και αν είναι διαθέσιμος.

Είναι γνωστό ότι κακοήθη νοσήματα, όπως ορισμένες λευχαιμίες, καρκίνος όρχεως και άλλα, ταχέως θανατηφόρα προ είκοσι ή τριάντα ετών, ήδη από αρκετών ετών θεωρούνται ιάσιμα, ενώ άλλων, όπως ο προχωρημένος καρκίνος του μαστού, της ωοθήκης και άλλων, η επιβίωση έχει βελτιωθεί σημαντικά χάρη στην πρόοδο που έχει συντελεστεί στη θεραπευτική. Εξάλλου, η πρόοδος στην παρηγορητική-ανακουφιστική θεραπεία έχει επιτρέψει τη σημαντική βελτίωση της ποιότητας ζωής και ίσως, αν όχι ήδη, τουλάχιστον στο εγγύς μέλλον, την αύξηση του μήκους ζωής των ασθενών με μη ιάσιμα νεοπλάσματα. Εν συνόψει, η μετατροπή των κακοήθων νεοπλασμάτων από θανάσιμα σε χρόνια νοσήματα, άλλως η αρμονική ή άσπονδη συνύπαρξη οργανισμού-ξενιστή και νεοπλάσματος, από ονειρική στόχευση μέχρι προ ολίγων ετών, είναι ήδη ευκρινώς ορατή πραγματικότητα με τη βοήθεια της βιοτεχνολογίας και την εν γένει πρόοδο των βασικών επιστημών.

Ένα μεγάλο ζήτημα που έχει ανακύψει ήδη από αρκετών ετών είναι το πελώριο κόστος των νέων θεραπειών. Σύμφωνα με μάλλον αναμφισβήτητα δεδομένα, που επισείουν οι επαίοντες του συγκεκριμένου τομέα, το κόστος σε συνδυασμό με τη διαρκή αύξηση της επίπτωσης των κακοήθων νεοπλασμάτων, απειλεί να τινάξει στον

αέρα ασφαλιστικά μοντέλα και συστήματα υγείας. Ωστόσο, αυτή η πλευρά, για πολλούς λόγους δεν αποτελεί αντικείμενο του παρόντος άρθρου, το οποίο θα κινηθεί σε βιωματικό κυρίως πλαίσιο και διερωτήματα απότοκα προσωπικών προβληματισμών και αναζητήσεων, χωρίς καταφυγή σε στέρεα βιβλιογραφικά ερείσματα, χωρίς επιστημονικοφανή στερεότυπα.

...η αφορμή

Αφορμή για τους προβληματισμούς και τα διλήμματα που θα εκτεθούν στο κείμενο που ακολουθεί αποτέλεσαν δύο διαμετρικά αντίθετες στάσεις ασθενών με προχωρημένο καρκίνο. Φαινομενικά βέβαια αντίθετες, μια και οι δύο υποδηλώνουν με δραματική ένταση την ίδια αγωνία ενώπιον της ακύρωσης σώματος και ψυχής, τον ίδιο φόβο ενώπιον του επερχομένου αγνώστου, σκότους ή φωτός ή όποιου άλλου επέκεινα, ασχέτως θρησκευτικών πεποιθήσεων.

Τα παραδείγματα

Ασθενής Α

Γυναίκα 60 ετών, μέχρι πρότινος άριστης γενικής υγείας παρά την παραμονή μικροσκοπικής και εν συνεχεία γενικευμένης νόσου, όπως απεδείχθη εκ των υστέρων. Η ασθενής ευρίσκεται σε τελική φάση της νόσου, απολύτως κατάκοιτη, έχοντας μερική επίγνωση ή ενδεχομένως –ποιος ξέρει τι πραγματικά γνωρίζει ή διαισθάνεται ο ετοιμοθάνατος άνθρωπος;- άρνηση παραδοχής της δεινής κατάστασης της ασθένειάς της. Η διατροφή της επιτελείται αποκλειστικά μέσω παρεντερικής σίτισης, μια και το μήκος του εναπομένου εντέρου δεν ξεπερνά το ένα μέτρο. Η γυναίκα εκλιπαρεί με αδύναμη φωνή τον γιατρό της, σα να κρέμεται από τον λαιμό του και να σέρνεται πίσω του καθώς αυτός απομακρύνεται από κοντά της αποφασισμένος να εγκαταλείψει την προσπάθεια αντιστροφής της προδιαγεγραμμένης πια πορείας: «...μη μ' αφήσεις να πεθάνω γιατρέ!».

Η εν λόγω ασθενής έπασχε από νόσο θεωρητικά ιάσιμη, ανεπαρκώς ή ακαταλλήλως—σύμφωνα με τα διεθνώς ισχύοντα—θεραπευμένη σε προηγούμενες φάσεις της νόσου. Τρεις μήνες πριν, σε μεγάλη και θαυμαζομένη για το ήδη καταρρεύσαν σύστημα υγείας Ευρωπαϊκή χώρα, διακεκριμένος ογκολόγος την απέλπισε: «δύο-τρεις μήνες ζωής κατά μέσον όρο, κανένα φάρ-

μακο δεν αυξάνει την επιβίωση, εμείς εδώ δίνουμε –και αυτό με φειδώ και επιφύλαξη- μόνο αυτό το –φτηνό- φάρμακο από το στόμα, πήγαινε στην πατρίδα σου να πεθάνεις», αποφάνθηκε περίπου με το ανάλογο κύρος *ex cathedra* και η άτυχη γυναίκα ξεκίνησε αμέσως το ταξίδι για την Αχερουσία.

Αλήθεια, **ποιοι αφήνουν «λυτούς» τέτοιους «λειτουργούς», ακόμη και στην γκρίζα και παρακάμζουσα πατρίδα τους, να εκθέτουν τους μέσους όρους επιβίωσης και τα λοιπά καλούδια της βιοστατιστικής στα έντρομα αισθητήρια όργανα των ασθενών;** Και αν αυτή η τακτική είναι πολιτισμικά αποδεκτή σε λαούς όπως οι δικοί τους –καθόλου βέβαιο από την πλευρά των ασθενών θεώμενο-, ποια παιδεία τους διδάσκει να την εφαρμόζουν αδιακρίτως σε κάθε ασθενή ασχέτως προέλευσης; Χειρότερα: ποιος προσανατολίζει τους καθ' ημάς «νότιους» των ευκράτων κλιμάτων, να ζητούν γιατρεία στους «πολιτισμένους» βόρειους; Οι απαντήσεις δεν υπάρχουν ή δεν δίδονται για ευνόητους λόγους.

Ο εδώ θεράπων γνωρίζει ή υποψιάζεται σε ποια σημεία έχουν διαπραχθεί «λάθη» ή «αυθαιρεσίες» από προηγούμενους συναδέλφους του της ημεδαπής ή αλλοδαπής. Ως παγία στάση υιοθετεί και εδώ την αποφυγή κριτικής προηγούμενων πράξεων και τακτικών, πιστεύοντας ότι αφενός μεν ουδείς άσφαλτος ειδικά στον χώρο που ασκεί ο ίδιος την ιατρική, αφετέρου δε αναγνωρίζει ότι ενδεχομένως η δική του άποψη να είναι η εσφαλμένη. Επιπλέον, θεωρεί ότι η επισήμανση πιθανών σφαλμάτων, θα ρίξει λάδι στην εσωτερική φωτιά των «γιατί» και των ενοχών της ασθενούς και των οικείων, αφαιρώντας και όχι προσθέτοντας τόσο στην ποιότητα όσο και στο μήκος ζωής της ασθενούς.

Εντούτοις, δεν του διαφεύγει ότι η «συγκάλυψη» λαθών του «σιναφιού» αποθρασύνει τους ακατάλληλους, αδιάφορους ή ανεπαρκείς, δια της ατιμωρησίας, αλλά και ότι σπάνια ισχύει το αντίθετο, δηλαδή η τιμωρία να σωφρονίζει τους υπολοίπους. Αντίθετα, συχνά η τιμωρία βελτιώνει και εξελίσσει περαιτέρω τις τεχνικές «προφύλαξης» και «συγκάλυψης».

Με όλα τα παραπάνω να περιέρονται ανεξέλεγκτα το μυαλό, ο γιατρός παραμερίζει τον παραπλανητικό θόρυβο και σκύβει πάνω από την άρρωστη.

Η άρρωστη έχει κάποια γνωστά και καθορισμένα σωματικά προβλήματα ανάμεικτα με πλήθος αορίστων και ασταθών αιτιάσεων, ένα σύμπλεγμα χαρακτηριστικό πάθους ψυχής και σώ-

ματος. Ζητά βοήθεια, επικεντρώνοντας στην απομάκρυνση του τέλους, ενώ η ίδια ξέρει πως ζωή εξαρτημένη από παρεντερική διατροφή, ζωή δε λογίζεται. Και ξέρει πως χωρίς παρεντερική διατροφή η καρδιά θα σταματήσει, «...τι να σου κάνει ένα μέτρο έντερο, τι να πρωτοαπορροφήσει;».

Όμως η άρρωστη σε πείσμα όλων των προβλέψεων, σε πείσμα της στατιστικής επιζεί, ήδη τέσσερις μήνες υπό παρεντερική διατροφή. Επιζεί και σηκώνεται να πάει στην τουαλέτα και βαδίζει, λίγο στον διάδρομο μόνο, πάντως βαδίζει ανεβάζοντας το περίφημο KPS (Karnofsky-scale Performance Status) κοντά στο επίπεδο «αυτοεξυπηρέτησης» ($\geq 50\%$). Ακολουθεί τη σχετική σύσταση του γιατρού, ο οποίος την έκανε βέβαιος, και βέβαια διαψευσθείς, πως η κινητοποίησή της ήταν ανεπίστρεπτα μη πραγματοποιήσιμη.

Μπροστά στην τόση θέληση ζωής, ο γιατρός υποκύπτει συναισθηματικά. Χορηγεί ειδική θεραπεία, σχεδόν ως να επρόκειτο για ασθενή με ακέραιο πεπτικό σύστημα. και η ασθενής την ανέχεται ως απολύτως λειτουργική (έστω KPS 90%) με σαφείς ενδείξεις ανταπόκρισης της νόσου. Η ύφεση, με οριακή πεπτική αποκατάσταση, διαρκεί για έξη μήνες περίπου και στη συνέχεια η κατάσταση βαθμιαία επιδεινώνεται.

Τελικά, δεκάξη μήνες από την αρχική περί τριών μηνών ετυμηγορία του αλλοδαπού σοφού, η ασθενής καταλήγει ήσυχα, **έχοντας «κερδίσει» δεκαπέντε μήνες ζωής πάνω από τον προβλεπόμενο από τη στατιστική μέσο όρο.** Κυρίως **έχοντας ενδιάμεσα βιώσει την ελπίδα και την γλυκιά ψευδαίσθηση της νίκης πάνω στον θάνατο.**

Διλημματικά ερωτήματα

Η γυναίκα σπρωγμένη ή επικουρούμενη, εν μέρει τουλάχιστον, από δυνάμεις άγνωστες στο γιατρό -και την ιατρική εντέλει- μάχεται και μέχρι κάποιου σημείου «κρατάει».

- Με δεδομένες την ίσως ανεπαρκή προηγηθείσα θεραπεία αλλά και τη στατιστικά απίθανη ωφέλεια (αντίθετα σχεδόν βέβαιη τη θανάσιμη τοξικότητα) από ειδική θεραπεία στη φάση αυτή, δικαιούται η ασθενής άλλη ειδική θεραπεία;
- Η έκκλησή της για όποια βοήθεια εμπεριέχει και την ειδική θεραπεία (αντικαρκινικά φάρμακα);
- Ο γιατρός σε ποιο σημείο δικαιούται ή έστω υποχρεούται να άρει την παρεχόμενη υποστήριξη;

- Με ποια εργαλεία θα αναγνωρίσει έγκαιρα και έγκυρα το σημείο αυτό;
- Αποτελεί η απόσυρση της υποστήριξης σε αυτή τη φάση πράξη ευθανασίας παθητικής ή ενεργητικής;
- Ποιος αναλαμβάνει το ψυχικό φορτίο της ανάκλησης υποστήριξης;
- Ποιο σύστημα και με ποιο τίμημα αναδέχεται το πελώριο κόστος μιας ανακουφιστικής θεραπείας χωρίς ορίζοντα;
- Η ενδεχόμενη «εξοικονόμηση» πόρων από την ανάκληση της υποστήριξης θα «μεταφερθεί» σε άλλους ασθενείς με «προοπτική» ή θα διαχυθεί και θα χαθεί σε «λαίμαργους κωδικούς» υπουργείων.;
- Πώς και με ποιο τίμημα θα συμφιλιωθεί ο γιατρός με την ιδέα μιας ακόμα ήττας, που ίσως θα μπορούσε να έχει αποφευχθεί ή έστω να μετατεθεί χρονικά;

Ασθενής Β

Γυναίκα 80 ημερολογιακών ετών, σαφώς νεότερη βιολογικά (65 ετών περίπου), άγαμη με συγγενείς δευτέρου βαθμού και μια ζωή γεμάτη πίσω της. Προ δεκαπενταετίας καρκίνος γεννητικών οργάνων και προ διαιτίας δεύτερο πρωτοπαθές πεπτικού με πιθανή αιτιοπαθογενετική σχέση με την αρχική ριζική θεραπεία.

Μετά την αρχική ήπια χημειοθεραπεία για την υποτροπή της νόσου, η ασθενής ταλαιπωρημένη από την απροσδόκητη τοξικότητά της, αρνείται επανεισαγωγή θεραπείας με διαφορετικό σχήμα. Η άρνηση εμπεριέχει και κάποια διαπραγματεύση, δεν είναι κατηγορηματική, ίσως και λόγω της στενής φιλικής σχέσης της ασθενούς με τον γιατρό που τη χειρίζεται, ίσως και χάρη στην «πειθώ» του τελευταίου.

Ο γιατρός θα αποπειραθεί μια ακόμα γραμμή θεραπείας, την οποία θα διακόψει πρόωρα λόγω υποκειμενικής μάλλον παρά αντικειμενικής τοξικότητας, παρά τις σαφείς ενδείξεις δραστηκότητας της.

Ο γιατρός γνωρίζει ότι η γυναίκα έχει στο ενεργητικό της την ίαση από ένα καρκίνο και την «γερή της κρίση». Στο παθητικό της έναν δεύτερο καρκίνο εξαρχής προχωρημένο, τη δυσανεξία στη χημειοθεραπεία και την «υπέρβαση του μέσου όρου ηλικίας» του φύλου της (η στατιστική έχει τον τρόπο να δικάζει μεροληπτικά και κοινωνικο-ρατσιστικά, βλέποντας το δάσος και αδιαφορώντας για το δέντρο –ποιος όμως μπορεί να χαράξει πολιτική υγείας δίχως στατιστική και ποιος

τολμά να τα βάλει μαζί της;).

Ο γιατρός μένει μετέωρος ανάμεσα στο επιθυμητό και το πρακτέο, ενώ η ασθενής στέκει ορθή, όσο τη βαστούν τα πόδια της, με πλήρη επίγνωση της βαρύτητας της νόσου και των προοπτικών. Ίσως, οι ασθενείς διαισθάνονται και μπορούν να πραγματοποιήσουν προβλέψεις αρκετά ακριβέστερες από αυτές του παρατηρητή γιατρού, και πολύ πιο αξιόπιστες από αυτές των στατιστικολόγων. Μόνο που για ευνόητους λόγους, κανένας δε ρώτησε ποτέ έναν ασθενή σε οποιαδήποτε φάση νόσου, πόσο υπολογίζει να ζήσει. («...ό,τι βλέπει ο παρατηρητής είναι η παρατήρηση όχι το παρατηρούμενο», λέει κάπου ο ποιητής Ν. Καρούζος, στοχαζόμενος ενώ ψυχομαχεί με καρκίνο πνεύμονος).

Η ασθενής έχει επιλέξει την τροχιά της: Όταν βαρύνει θα αρνηθεί οιαδήποτε στήριξη προβαίνοντας η ίδια σε παθητική ευθανασία, ένα είδος *vidu death*. Δε θα επιτρέψει την πλήρη απαξίωση του σώματος και του προσώπου που άρεσε και αγαπήθηκε από τόσους άνδρες, που έγινε αντικείμενο ζήλιας για τόσες γυναίκες, το σώμα που έζησε τόσα πάθη και απολαύσεις. Δε θα επιτρέψει σε κανέναν να τη δει καθώς, λιώνοντας, θα βυθίζεται στην ανυπαρξία. Έχει ετοιμάσει τα πάντα, από τη διανομή των προσωπικών της αντικειμένων και της μικρής ακίνητης περιουσίας μέχρι τις λεπτομέρειες εξόφλησης των λογαριασμών κοινοχρήστων, ρεύματος, τηλεφώνου μετά θάνατον και ακόμη και τα έξοδα κηδείας, όλα με απίστευτη ψυχραιμία και μεθοδικότητα.

Ο φίλος και θεράπων γιατρός δε θα γίνει κοινωνός αυτής της απόφασής της παρά όταν θα έρθει η κατάλληλη ώρα.

Έξη μήνες μετά τη διακοπή κάθε ειδικού χειρισμού και, παρά την παρουσία σημαντικής ποσότητας στάσιμης νόσου, η γυναίκα ήταν ακόμα, όχι απλώς εν ζωή, αλλά και με ικανοποιητική λειτουργικότητα, θρυσματίζοντας αθέλητα τους πίνακες των στατιστικών που τη θεωρούν ήδη νεκρή. Εντούτοις, η γυναίκα μετά το εξάμηνο «του φωτεινού διαλείμματος» παρουσιάζει βαθμιαία έκπτωση δυνάμεων και ένα μήνα μετά, ζητά τη βοήθεια του γιατρού. Συγκεκριμένα ζητά να εισαχθεί στο νοσοκομείο για να «τελειώσει» εκεί μη επιβαρύνοντας ψυχικά την αδελφή της, στο σπίτι της οποίας φιλοξενείτο το τελευταίο εξάμηνο.

Η επιθυμία της θα πραγματοποιηθεί και ακολουθεί εισαγωγή στο νοσοκομείο, όπου διαπιστώνεται βαρεία αναιμία ταχέως επιδεινούμενη. Της προτείνεται αντιμετώπιση της αναιμίας με

μεταγγίσεις και της αφυδάτωσης με ενδοφλέβια ενυδάτωση. Η ασθενής αρνείται κάθε παρέμβαση, ακόμα και την αιμοληψία, δίνοντας μαθήματα πορείας προς το τέλος στον εμβρόντητο γιατρό:

«Άκουσε με γιατρέ μου σε παρακαλώ, όπως ξέρω πως πάντα με άκουγες και με καταλάβαινες. Ξέρω πως θέλεις να με κρατήσεις στη ζωή. Όμως ποια ζωή είναι αυτή που μπορώ πια να έχω εγώ; Έζησα όμορφα τη ζωή μου, με τους έρωτές μου, τα ταξίδια μου, σχεδόν ό,τι ήθελα το έζησα, το μόνο που δεν αξιώθηκα ήταν να έχω ένα παιδί, κι αυτό μου έλειψε είναι αλήθεια. Τώρα νιώθω πως έφτασε το τέλος. Δε θέλω να μείνω μέσα από ένα παράθυρο και να βλέπω απ' έξω τον ήλιο να ανατέλλει και να δύει. Άφησέ με να φύγω...»

Ύστερα, περιπίπτοντας βαθμιαία σε κατάσταση νάρκης από την αναιμία και την αφυδάτωση, κατέληξε ήσυχα μετά από λίγα εικοσιτετράωρα, ανάμεσα σε λιγοστούς συγγενείς.

Διλήμματα για τον γιατρό στην περίπτωση αυτή δεν υπήρξαν ουσιαστικά.

Η γυναίκα επέλεξε το τέλος της, χωρίς να μπορέσει κανένας να παραβιάσει τη θέλησή της. **Δεν ήταν άρνηση ζωής, ήταν άρνηση εξαχρείωσης και κατάπτωσης. Δεν ήταν αυτοκτονία, δεν ήταν παθητική ή ενεργητική ευθανασία, ήταν μια στέρεη πορεία που ακριβώς δε μπορεί να οριστεί.**

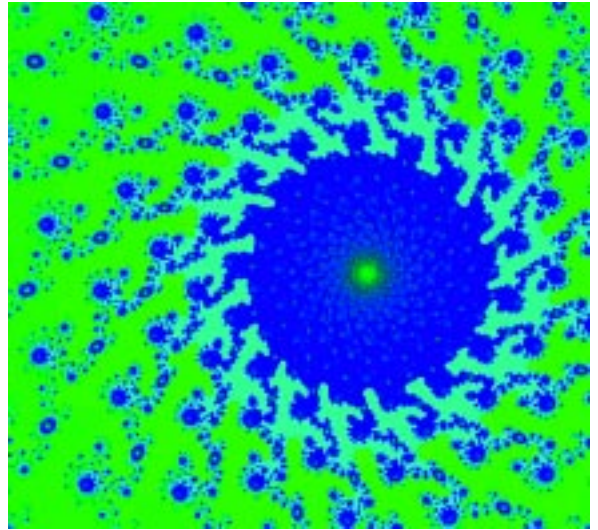
Μια βίαιη διάρρηξη των κανόνων εμπλοκής γιατρού – ασθενούς στη διαδικασία του θανάτου.

Ο γιατρός δυσκολεύτηκε ακόμα και στη συμπλήρωση των αιτίων και τρόπου θανάτου στο σχετικό πιστοποιητικό.

Επιλογικά

Συνοψίζουμε μέρος των ερωτημάτων, στο σύνολό τους διλημματικών, που ανακύπτουν από την ανασκόπηση τέτοιων περιπτώσεων, απαιτώντας που μένουν ή πρέπει να μένουν αναπάντητες:

- Πότε και με ποια κριτήρια η ειδική αντικαρκινική θεραπεία θεωρείται ως εξαντλημένη από άποψη ελπίδας ύφεσης της νόσου ή παράτασης της ζωής;
- Ποιος αναλογίζεται άραγε πόσοι χτεσινοί καταδικασμένοι ασθενείς σήμερα θεωρούνται θεραπεύσιμοι και ποιος γνωρίζει πόσοι και ποιοι σήμερα καταδικασμένοι ή θεραπεύσιμοι θα είναι αύριο ίασιμοι;
- Παροχή της ελάχιστης υποστηρικτικής φρο-



ντίδας (πχ ενυδάτωση, αναλγησία ενδεχομένως βραχύνουσα τη ζωή) ή της μέγιστης δυνατής στήριξης των ζωτικών λειτουργιών (π.χ. παρεντερική ή εντερική σίτιση, ανάταξη οξείας ανεπάρκειας ζωτικού οργάνου, εισαγωγή στη ΜΕΘ κλπ) και με ποιο στόχο;

- Ποιο μπορεί να είναι το οικονομικό και κατά συνέπεια κοινωνικό τίμημα μιας προσπάθειας «πέραν των στατιστικώς καθιερωμένων ορίων»;
- Είναι ηθικά επιτρεπτή η απόσυρση της ψυχικής στήριξης (δυστυχώς σύννηθες αν και ανθρώπινο-εκδήλωση αδυναμίας του σχετικά ανεκπαίδευτου και εν τέλει ανυποστήρικτου γιατρού ή νοσηλεύτη) ή επιβάλλεται η διατήρηση του διπόλου ασθενής-γιατρός/νοσηλεύτης μέχρι το τέλος έστω χωρίς διαφορά στην τελική έκβαση;
- Πόσο σημαντικό (...«cost-effective!»), σύμφωνα με τα σύγχρονα αξιολογικά μοντέλα) να τελειώνει κανείς ψυχικά υποστηριζόμενος ή όχι όταν το τέλος είναι ενιαία μοναχικό;

Άποψη

Η ζωή και ο άνθρωπος μπορούν να μας εκπλήσσουν όσο και η επιστημονική έρευνα να ανατρέπει αύριο τις σημερινές βεβαιότητες.

Όσο διαθέτει εφεδρείες ψυχικού σθένους ο λειτουργός υγείας δεν εγκαταλείπει αλλά μάχεται με όποια όπλα διαθέτει, εν επιγνώσει της αναπότρεπτης έκβασης, κοινής κατάληξης για όλους τους ανθρώπους.

Αν για οποιοδήποτε λόγο αισθάνεται αδυναμία, οφείλει με οποιοδήποτε τρόπο να αποσύρει-

ται ειδικά ή γενικά ή να ζητά βοήθεια, αποφεύγοντας να αυτοσχεδιάζει αυθαίρετα. Η αδυναμία δεν είναι ντροπή, η απόκρυψή της όμως είναι επικίνδυνη για τόσο για τον εξασθενημένο λειτουργό υγείας όσο και για αυτούς που προσβλέπουν σε αυτόν.

Ο συνειδητός ογκολόγος δεν εγκαταλείπει ποτέ.

Υ.Γ.

Τα παραπάνω δύο σενάρια ίσως εμπεριέχουν μικρές δόσεις φανταστικού και ψεύδους. Τόσο όσο απαιτείται για να δηλωθεί η οξύτητα των διλημάτων και να χτιστεί στέρεο το μήνυμα της αναγκαίας διαρκούς στράτευσης και αγρύπνιας του λειτουργού υγείας.

RAS *putin*: a short autobiography

S. Murray*, Μ. Μανωλούκος

Many of the mutations identified in genes participating in signaling pathways are intimately involved in carcinogenesis as witnessed by the large number of oncogenes and protooncogenes dictating cellular fate. A number of these genes are from one protein superfamily, namely the small GTP-binding protein family (G proteins). These are monomeric proteins of 20-40kDa, displaying both GDP/GTP-binding and GTPase hydrolytic activity. They are key elements in virtually all signaling pathways. To date approximately 150 small G proteins have been identified and are classified into 5 families based on similarities in their effector domains. These are the Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf and Ran families. They all have received much attention following the discovery that two subtypes of the Ras family, Ha-Ras (Harvey) and Ki-Ras (Kristen) are mutated in a variety of human cancers.

Structure and Localization

"Stature and Habitation"

Comparison of the amino acid sequences among Ras family proteins shows that there is approximately 30-55% homology between different species and a similar degree of homology between the many members of the Ras superfamily. The most homologous domains are those responsible for interaction with GDP and GTP and

for their inherent GTPase activity. They also contain consensus sequences for interaction with downstream effectors. Additional specific sequences located in the c-terminus dictate the type of post-translational lipid modifications that these proteins undergo, including farnesyl, geranyl-geranyl, palmitoyl and methyl modulation and proteolysis. These modifications are necessary for the proteins' correct biological activities, determination of their cellular localization and their effector interactions.

Ha-Ras and Ki-Ras (two members of the Ras family that have been found mutated in human cancers) are farnesylated (by farnesyltransferase) at one Cys residue followed by proteolytic removal of a small tripeptide and carboxymethylation of an exposed Cys residue. Ha-Ras has an additional Cys residue that is palmitoylated.

Most G proteins are either localized in the cytosol or associated with membranes; Ras family members are localized at the cytoplasmic face of the plasma membrane as specified by post-translational modification. In the case of Ha-Ras and Ki-Ras the farnesyl moiety is not sufficient for binding to the membrane. Ha-Ras utilizes both the farnesyl and palmitoyl moieties and Ki-Ras the farnesyl moiety and a polybasic region. Mutant forms of Ha-Ras that lack posttranslational lipid modification remain in the cytosol and lack biological activity.

Function

"Accomplices"

The functions of G proteins have only recently been elucidated:

- Ras family members regulate gene expression,

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Νοσοκομείο Metropolitan, Αθήνα. *Αλληλογραφία: Samuel Murray, PhD, Διευθυντής Τμήματος Μοριακής Βιολογίας & Γενετικής, Νοσοκομείο Metropolitan, 18547 Νέο Φάληρο, Αθήνα. Τηλ. 210 4809213, Fax. 210 4809245, e-mail: smbhsam@hotmail.com

cellular differentiation, morphology and apoptosis;

- Rho family members regulate cytoskeletal reorganization and gene expression;
- Rab and Sar1/Arf (ADP-ribosylation factors) family members regulate intracellular vesicle trafficking;
- Ran family members regulate nucleocytoplasmic transport and microtubule organization during cell cycling.

All G-proteins have two interconvertible forms, the GDP-bound inactive form and the GTP-bound active form (Figure 1). A wide variety of hormones, growth and differentiation factors and other extracellular molecules (including tumor promoting substances) cause signaling by stimulating GDP dissociation and subsequent GTP binding that leads to a conformational change of the downstream effector-binding region.

The exchange of GDP for GTP, is mediated in part by Ras exchange factors such as SOS (Son of Sevenless), which are towed to the surface by the growth factor receptor bound protein 2 adaptor protein (GRB2). Activation of Ras allows Ras to function as an adaptor, and as such it facilitates the translocation of Raf kinases to the cell surface allowing for the downstream activation of Ras effectors.

Signal inactivation results following the disassembly of the complex, which takes place when SOS is phosphorylated via downstream kinases. Ras proteins also signal through many other pathways as indicated below.

The intrinsic GTPase activity of the GTP-bound form converts the GTP-bound form back to the GDP-bound form thus inactivating the complex. This reaction however, is slow and therefore requires stimulation by a regulator termed GEP (Guanine nucleotide Exchange Proteins: SOS, Cdc25 and Ras GRF, functioning by accelerating the dissociation of bound GDP and promoting GTP binding) which accelerates the reaction under the influence of upstream signals. Many of the GEP's including SOS are specific for individual members of the Ras superfamily. GAPs (GTPase-activating proteins: p120 GAP, GAP1m, Ira1 and Ira2) function by altering the rate of GTP-hydrolysis. The Rho and Rab families also have another level of regulation through interaction of a GDI (GEP-stimulated guanine dissociation inhibitors) that helps to maintain the small G protein in the GDP-bound form.

Positive Regulation: GRB2 and SHC are adaptor proteins that bind to Ras (on specific phos-

photyrosines). This interaction mediates the recruitment of SOS to the plasma membrane where it stimulates the conversion of Ras from the GDP-bound form to the GTP-bound form.

Receptors not directly associated with the tyrosine kinases such as Src-like tyrosine kinases may activate Ras. Ras is also activated by heterotrimeric G protein-coupled receptors including α -adrenergic receptors, lysophosphatidic acid and muscarinic acetylcholine receptors.

Negative regulation: After accomplishing their downstream effects Ras proteins are converted to the GDP-bound form by GAPs; a process that is as yet not completely understood. There are suggestions that phosphorylation of SOS by the Raf/MAP kinase pathway may induce dissociation of SOS from GRB2 resulting in a switch to the GDP-bound form. GAP p120 protein acts as a negative regulator of Ras and is regulated by tyrosine phosphorylation and subsequent sequestering by activated PDGFR.

Other forms of regulation have been identified following the discovery of a small G protein dissociation stimulator termed 'Smg GDS' that is a regulator entirely distinct from GEPs, GDIs and GAPs. It has two activities one is to stimulate their GDP/GTP exchange reactions and the other is to inhibit their binding to membranes. It is anticipated that numerous other modifiers are waiting to be identified.

Downstream Ras effectors

"Adulterers"

One of the main physiological modes of action of Ras family is to directly bind and activate Raf protein kinases (including c-Raf-1, A-Raf, B-Raf). In quiescent cells Raf-1 resides in the cytosol in an inactive conformation bound to 14-3-3, a specific phosphoserine-binding protein. Upon stimulation Ras activates Raf-1 and translocates it to the plasma membrane where it associates with phosphatase 2A leading to destabilization of 14-3-3 from the complex. MAP kinase is then activated and translocates to the nucleus where it stimulates the activity of transcription factors. This is a well known signaling pathway activated through Ras signaling. Initiation of this and other signaling cascades leads to the induction of gene expression through the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade (MEK (MAP kinase kinases 1 and 2); and MAP kinases) in response to various ex-

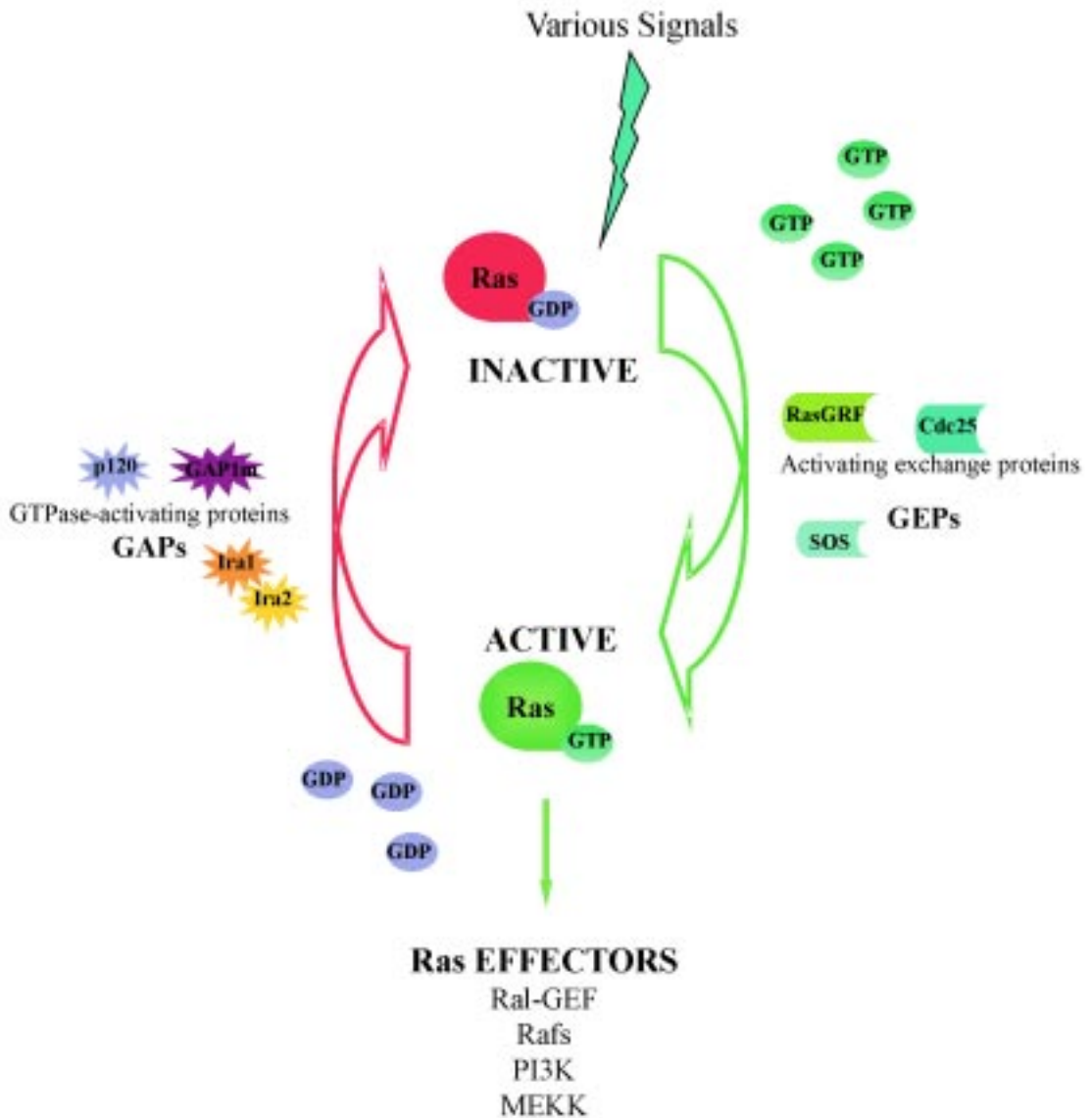


Figure 1. Ras Cycling. Ras cycles between the active GTP-bound and the inactive GDP-bound state. Mitogenic signals activate guanine GEFs such as SOS, increasing this way the rate of dissociation of GDP and stabilizing the nucleotide free form of Ras. This leads to the binding of GTP and subsequent activation. Inactivation of signaling requires destabilization of the Ras-GTP complex by GAPs.

tracellular signals.

Although MEK remains one of the most widely accepted substrates for Raf, the Raf-1 pathway collects and funnels multiple signaling pathways and as such has been identified as a hub capable of potential downstream signaling through yet other distinct pathways. Only recently some of these have been identified and include: Bad, and the regulation of apoptosis; and the retinoblastoma tumor suppressor gene (Rb) for which Raf-1 has an interaction domain specific to Raf the function

of which appears to be a Rb kinase capable of Rb inactivation.

Other major pathways in which Ras is functional include the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) pathway activated by a variety of signals including stresses, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-1 (IL-1). The PI3K/AKT pathway and the PLC/PKC/p38 pathways are also known to be activated by Ras activation (Figure 2).

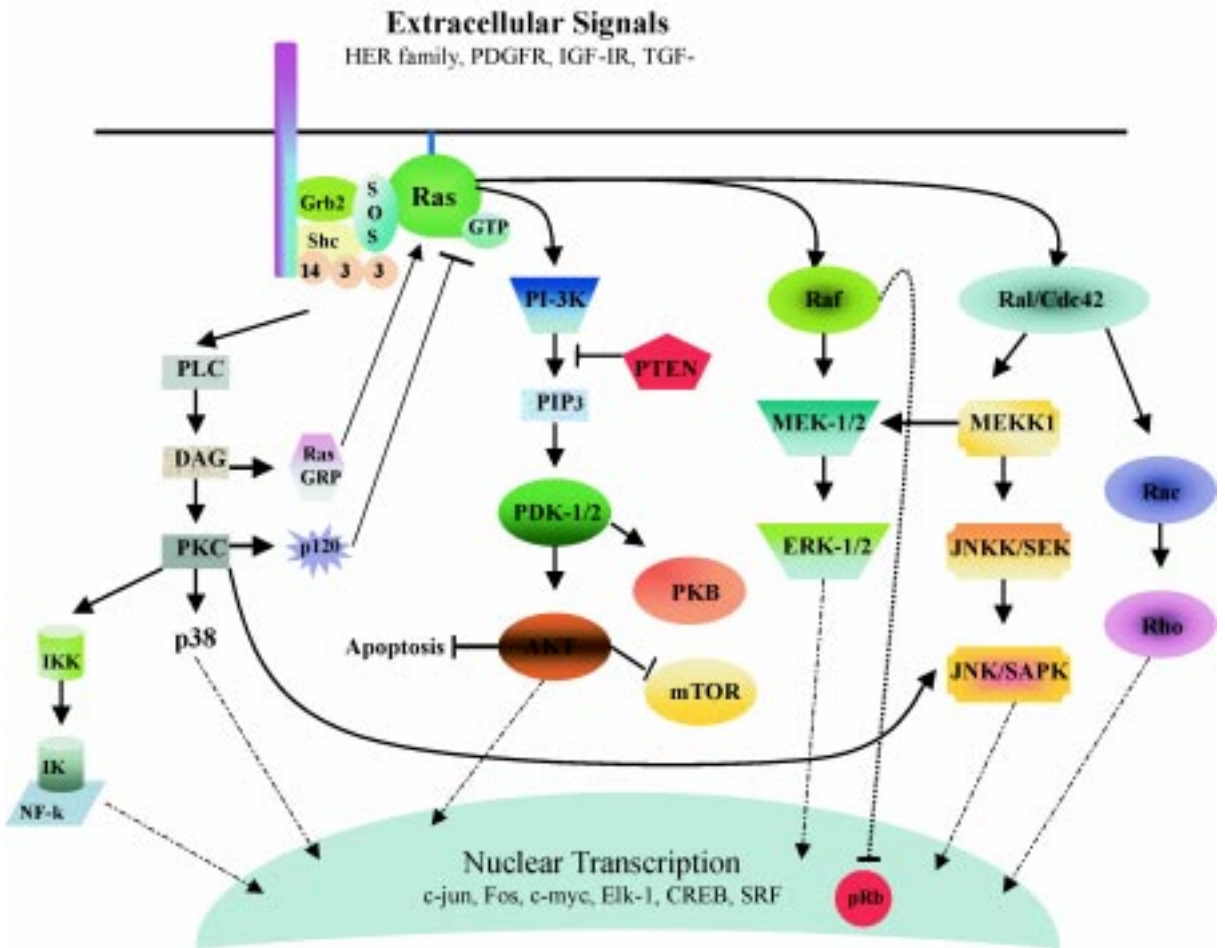


Figure 2. Adulterous Ras. A brief overview of Ras mediated signaling cascades. The most commonly known and best characterized Ras signaling pathways include the MAPK/ERK (activated by mitogens in all cells), the SAPK/JNK and the p38 pathways. The MAPK cascades consist of a MAPKKK, a MAPKK and a MAPK. MAPKKK are activated through a large variety of extracellular signals including growth factors, differentiation factors and stress. Activated MAPKKKs phosphorylate and activate one or more MAPKKs which in turn activate specific MAPKs. Activated MAPKs phosphorylate and activate various substrates in the cytoplasm and the nucleus including transcription factors that control cellular responses (apoptosis, proliferation, differentiation, etc). PI-3K = phosphoinositide 3'-kinase; PLC = phospholipase C; PKC = protein kinase C; MEK = mitogen-activated protein kinase; JNK = Jun amino-terminal kinase; SAPK = stress-activated protein kinase; ERK-extracellular signal-related kinase; BAD = pro-apoptotic protein of the Bcl-2 family; DAG = diacyl glycerol; SEK = stress-activated protein (SAP)/ERK-kinase; PDGFR = platelet derived growth factor receptor; IGF-1R = insulin-like growth factor receptor type 1.

Signaling Modifiers and Effectors

“Blackmail”

There are numerous proteins regulating, modifying and altering the outcome of Ras protein activation using different strategies. Raf-1 has two phosphorylation sites that interact with 14-3-3, one that binds and maintains an inactive conformation, and a second site that may be responsible for facilitating activation and stabilization of activated Raf-1. Src kinase family members phos-

phorylate Raf-1 at these sites, thus enhancing its activity.

Another group of proteins, the Rap1 proteins exert their effects on the pathway by antagonizing substrates through their binding to Ras proteins. They are also known to be capable of inhibiting Ha-Ras- and Ki-Ras-induced Raf-1 activation. There is however, evidence to suggest that Rap1 functions independently of Ras as well, as it appears to be one of the major substrates for protein kinase A (PKA). It is possible that by utilizing effec-

tors similar to those of Ras such as B-Raf Rap1 can produce sustained activation of the ERK pathway following specific tyrosine kinase signaling (including PDGFR, NGF and EGFR).

Another modifier of Ras signaling is KSR (kinase suppressor of Ras) that appears to facilitate signal transmission between Raf, MEK and MAP kinase, but is also sequestered to the membrane following Ras activation where it binds to and forms a stable complex with Raf proteins in doing so dampening the Ras signaling cascade.

Implications in Cancer

"Ramifications"

Dysregulation and/or attenuation of some of these proteins' expression patterns either through activation or inactivation may lead to alterations in cell cycle control, differentiation and/or apoptosis; all hallmarks of cancer. Indeed specific mutations of three well known Ras family members have been identified in a variety of cancers (it is estimated that approximately 30% of all cancers have a Ras mutation), implicating Ras in carcinogenesis. In many of these Ras positive tumors (i.e. containing mutated Ras) Ras has been associated with survival but also in response to certain chemotherapeutic agents. Some cancers such as pancreatic and colorectal have a high mutation rate approaching 90% and 50% respectively, indicating the significance of this molecule as a target for cancer therapy.

The most commonly identified mutations in Ras are located at codons 12, 13 and 61. These mutations completely abrogate the normal GTPase function of Ras. The increased half life of the Ras-GTP-mutants results in unregulated stimulation of the signal transduction pathway(s) independent of external signals.

Since these second messengers use diverse extracellular signaling pathways for cell growth, apoptosis, and differentiation any deregulated function of other components may also result in aberrant Ras functioning (even in the absence of mutations in the Ras genes themselves). This has been witnessed with the overexpression of EGFR, the loss of function of negative Ras protein regulators with type 1 neurofibromatosis-associated tumors, and mutations identified in c-Kit, c-FMS and FLT3 seen in many hematologic malignancies. Considering the plethora of signaling cas-

cases that Ras proteins are implicated in, it is easy to understand that phenotype-genotype correlations may not hold true when moving from one tumor type to other as there exist distinct tumor modifiers that contribute to the final phenotype. For these reasons and because of the multiple levels of regulation placed on Ras signaling it is important to realize that aberrant Ras protein signaling may be more common than actually thought in human tumors, and may even extend to tumors that are not generally recognized as harboring mutant Ras per se.

Due to the central role that Ras plays in many different cancers it has been the target for various therapeutic strategies, especially considering that it is one of the first downstream effectors of receptor tyrosine kinases (another superfamily that has a well recognized role in carcinogenesis). Discussion of these strategies will be covered in a subsequent edition along with a more detailed insight into the posttranslational modifications that are associated with the Ras superfamily.

SUGGESTED READING

1. Reuther GW, Der CJ. The Ras branch of small GTPases: Ras family members do not fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 157-165.
2. Downward J. Targeting RAS signaling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 11-22.
3. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 373-384.
4. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
5. Kosloff M, Selinger Z. Substrate assisted catalysis – application to G proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 161-166.
6. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: A family reunion. *Cell* 2000; 103: 227-238.
7. Cherfils J, Chardin P. GEFs: Structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 306-311.
8. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *JNCI* 2001; 93: 1062-1074.
9. Paduch M, Jelen F, Otlewski J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochimica Polonica* 2001, 48: 829-850.
10. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.

Το πρόβλημα με τη διάθεση ογκολογικών φάρμακων στην Ελλάδα

(Σκέψεις)

Γ. Αραβαντινός

Ιστορικό

Οι γιατροί, και μάλιστα κατ' εξοχήν οι Ογκολόγοι που συνήθως αντιμετωπίζουμε παθήσεις που στον κόσμο, ακόμη και σε πολλούς γιατρούς άλλων ειδικοτήτων, προκαλούν δέος, έχουν τη τάση να θέλουν να χρησιμοποιήσουν κάθε δυνατό μέσο προκειμένου να πετύχουν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα σε κάθε ασθενή. Ειδικά, λοιπόν για εμάς τους Παθολόγους-Ογκολόγους που πολλοί μας αποκαλούν και χημειοθεραπευτές, στη καθημερινή μας πάλη με τη κακοήθη νόσο είναι ιδιαίτερα δύσκολη η παραδοχή της ήττας και η επερχόμενη κατάληξη ενός ασθενούς που κατά κανόνα ήδη γνωρίζουμε «προσωπικά» πολύ καλά και έχουμε μοιραστεί μαζί του και με το περιβάλλον του ελπίδες και προσωρινές νίκες. Υπάρχει, επομένως, ο κίνδυνος ο θεράπων ιατρός να αντιδράσει συναισθηματικά και λιγότερο επιστημονικά, εφαρμόζοντας θεραπευτική αγωγή που έχει ελάχιστες ή καθόλου πιθανότητες επιτυχίας.

Στη χώρα μας παλαιότερα υπήρχε ένα μάλλον θολό τοπίο με κανόνες που κανείς δεν μας γνώριζε και κανείς δεν έλεγχε την εφαρμογή τους. Έτσι, πρακτικά, είχαμε την ελευθερία να χορηγούμε στους ασθενείς μας οποιοδήποτε φάρμακο, που θεωρούσαμε χρήσιμο, στη βάση των επιστημονικών μας γνώσεων και της συνεχούς επιστημονικής μας ενημέρωσης. Εκτός από τους Παθολόγους-Ογκολόγους, πολλοί γιατροί άλλων ειδικοτήτων, χωρίς καμμία ανάλογη ειδικέυση και εκπαίδευση, επίσης αντιμετώπιζαν Ογκολογικούς

ασθενείς, ενίοτε από πολύ καλή πρόθεση καλύπτοντας την έλλειψη ειδικού πχ στην επαρχία, άλλοτε όμως για άλλους λόγους.

Σε ότι αφορά την εισαγωγή των νέων και επομένως ακριβών φαρμάκων υπήρχε πάντα τα τελευταία χρόνια μία σημαντική γραφειοκρατική καθυστέρηση διαφορετική σε κάθε ασφαλιστικό ταμείο, ακόμα και σε φάρμακα που διεθνώς και επομένως μετά από λίγο και στη χώρα μας έπαιρναν επίσημη ένδειξη για μία συγκεκριμένη νόσο.

Παρούσα κατάσταση

Τα 2-3 τελευταία χρόνια διαμορφώθηκε μία κλιμακούμενη πίεση από τη Πολιτεία να εφαρμοστεί περιορισμός στη χορήγηση αντινεοπλασματικών φαρμάκων. Η βάση αναφοράς ήταν εάν ένα συγκεκριμένο φάρμακο έχει επίσημη «ένδειξη» για κάποια νόσο. Η ένδειξη χορηγείται από τον ΕΟΦ και αναγράφεται υποχρεωτικά και επί λέξη στη περίληψη χαρακτηριστικών του προϊόντος. Παρά τις αρχικές διαβεβαιώσεις του τότε υφυπουργού Υγείας κ.Νασιώκα ότι πρόκειται για παρεξήγηση που θα διευκρινισθεί και θα λυθεί άμεσα, ο περιορισμός εφαρμόστηκε σε διαφορετικό βαθμό σε σχέση με την αυστηρότητα του εκάστοτε ασφαλιστικού Ταμείου και την ευελιξία κάθε Νοσοκομειακού Φαρμακείου. Έτσι για παράδειγμα το ΤΕΒΕ ήταν, έως τώρα, το πιο αυστηρό Ταμείο, φθάνοντας στο σημείο να αρνείται την πληρωμή φαρμάκων εκτός εγκεκριμένων ενδείξεων ακόμα και σε περιπτώσεις ίσμιων, ακόμη, νόσων σε νεαρούς ασθενείς με το νομικά σωστό επιχείρημα ότι απλά εφαρμόζει τον νόμο. Τα υπόλοιπα Ταμεία, τουλάχιστον όσον αφορά τα Δημόσια Νοσο-

κομεία και με τη συνεργασία των Νοσοκομειακών Φαρμακείων έδειχναν έως τώρα κάποια ευελιξία, καλύπτοντας τη δαπάνη, εφ' όσον υπήρχε αιτιολογημένη Ιατρική γνωμάτευση, την οποία ενέκρινε το κάθε Ταμείο ανάλογα με τους μηχανισμούς και τις δυνατότητες που διαθέτει.

Πρόσφατα το ΙΚΑ που, όπως είναι γνωστό, ασφαλίζει το μεγαλύτερο μέρος των ασθενών, με την αρ.Πρωτ.Γ55/507/3-11-2005 εγκύκλιό του αναφέρει ότι θα καλύπτει μόνο δαπάνες για φάρμακα που χορηγούνται για τις εγκεκριμένες από τον ΕΟΦ ενδείξεις. Στις άλλες περιπτώσεις, προφανώς ακόμα και για ασθενείς ήδη υπό θεραπεία, το περιστατικό παραπέμπεται σε «Εκτατη Ειδική Επιτροπή Φαρμάκων». Είναι πολύ πρόωρο να γίνει σχόλιο για το πόσο γρήγορα και πόσο Επιστημονικά σωστά, και με βάση ποιους κανόνες θα λειτουργήσει η επιτροπή.

Επιπλέον σε προτεινόμενο από το Υπουργείο Υγείας και Πρόνοιας Νομοσχέδιο υπάρχει σαφής διάταξη, η οποία εφ' όσον δεν τροποποιηθεί, βάζει τέλος σε κάθε ευελιξία (Σχέδιο Νόμου «Μεταρρύθμιση του Συστήματος Φαρμακευτικής Περιθαλψής» Κεφάλαιο Α': Διατάξεις περί φαρμακευτικής περιθαλψής, Άρθρο 5.6: «Απαγορεύεται, με ευθύνη του θεράποντος ιατρού, η συνταγογράφηση φαρμάκων εκτός εγκεκριμένων ενδείξεων και δοσολογίας, όπως αυτά καθορίζονται στην Περίληψη Χαρακτηριστικών Προϊόντος».

Συζήτηση-Προτάσεις

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η θέσπιση σωστών κανόνων είναι προς το συμφέρον όλων. Πρώτα των ασθενών γιατί τους κατοχυρώνει ότι θα λάβουν τη κρατούσα σωστή θεραπευτική αγωγή. Δεύτερο των θεραπόντων γιατρών γιατί αντί να αυτοσχεδιάζουν και να λειτουργούν κατά περίπτωση ή ανάλογα με το Ταμείο του ασθενούς θα λειτουργούν επιστημονικά έντιμα στη βάση θεσπισμένων κανόνων. Και τρίτο είναι προς το συμφέρον της Πολιτείας και επομένως του κοινωνικού συνόλου στο βαθμό που θα εξασφαλισθεί η ορθή αντιμετώπιση των ασθενών με τη χορήγηση της επιστημονικά σωστής αγωγής, ενώ συγχρόνως θα αποφεύγεται η αδικαιολόγητη αύξηση του θεραπευτικού κόστους με την αποφυγή εφαρμογής αναποτελεσματικής αγωγής για την οποία δεν υπάρχει επιστημονική τεκμηρίωση.

Το πρόβλημα είναι ποιοί είναι οι σωστοί κανόνες:

Για να γίνει κατανοητή η ουσία του προβλήματος πρέπει να συζητηθεί εάν οι «εγκεκριμένες

από τον ΕΟΦ ενδείξεις» είναι η λύση, πράγμα που για τον μη επαίοντα ακούγεται σαφές και σωστό. Οι ενδείξεις αυτές βασίζονται, δυστυχώς, αποκλειστικά και μόνο σε αντίστοιχες αιτήσεις Φαρμακευτικών Εταιριών. Συνήθως οι εταιρίες πραγματοποιούν μεγάλες, πολυέξοδες και χρονοβόρες μελέτες και εφ' όσον το αποτέλεσμα είναι θετικό για το νέο πχ φάρμακό τους υποβάλλουν αίτηση για έγκριση σε μεγάλους διεθνείς οργανισμούς, όπως το Αμερικανικό FDA και το Ευρωπαϊκό EMEA. Τα τελευταία χρόνια και πάντοτε για την Ογκολογία μιλώντας, ο Ελληνικός ΕΟΦ μετά από αντίστοιχο αίτημα των Φαρμακευτικών Εταιριών επισημοποιεί την Ευρωπαϊκή έγκριση και στη χώρα μας. Στο σύνολό της η διαδικασία είναι ακριβή και χρονοβόρα και επομένως οι Εταιρίες συνήθως επιδιώκουν την έγκριση νέων φαρμάκων σε «μεγάλες αγορές», άρα σε συχνές νόσους, όπως ο καρκίνος του μαστού, πνεύμονα και παχέος εντέρου. Για τις άλλες νόσους συχνά υπάρχουν πελώρια κενά. Πρόβλημα υπάρχει επίσης σε όλες τις νόσους σε ειδικές περιπτώσεις ασθενών που έχουν εξαντλήσει τους εγκεκριμένους θεραπευτικούς συνδυασμούς ή παρουσιάζουν δυσανεξία σε αυτούς, αλλά έχουν ίασιμη ή σαφώς επηρεάσιμη νόσο, είναι σε καλή κατάσταση, η νόσος τους έχει δείξει στο παρελθόν σημαντική χημειοευαισθησία κλπ. Είναι προφανές ότι όλοι αυτοί οι ασθενείς, δικαιούνται φαρμακευτικής αγωγής.

Στην Ιατρική Επιστήμη και εν προκειμένω στην Ογκολογία υπάρχουν διεθνείς Κλινικές Κατευθυντήριες Οδηγίες (Clinical Guidelines) βασισμένες σε Δηλώσεις Ομοφωνίας (Consensus Statements) που προκύπτουν μετά από εκτεταμένες συζητήσεις σε συναντήσεις Ειδικών (Experts). Αυτονόητο αίτημα της Ιατρικής Ογκολογικής κοινότητας είναι οι αποφάσεις να λαμβάνονται με βάση επιστημονικά τεκμηριωμένες, συμφωνημένες και καταγεγραμμένες Κατευθυντήριες Οδηγίες (Clinical Guidelines). Μέχρι να θεσπισθούν Ελληνικές Κατευθυντήριες Οδηγίες, μπορούμε να βασισθούμε στις διεθνείς. Το Επιστημονικό σωματείο των Ογκολόγων (Εταιρία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας) διατίθεται να προσφέρει τις καλές του Υπηρεσίες προς τη Πολιτεία για τη κατάρτιση αυτών των Οδηγιών, πράγμα το οποίο έχει προτείνει ήδη εδώ και πολύ καιρό. Προοπτικά, επίσης, ο ΕΟΦ μπορεί να εκδίδει νέες ενδείξεις φαρμάκων με βάση τα επιστημονικά δεδομένα και όχι μόνο με βάση τις αιτήσεις των Φαρμακευτικών Εταιριών.

Επειδή οι ενδείξεις είναι μεταβαλλόμενες αλλά

και για να αντιμετωπισθούν καταστάσεις που δεν έχουν προβλεφθεί προτείνεται η λειτουργία ανάλογης Επιτροπής με τη συμμετοχή ειδικών, ενδεχόμενα και ομάδων ασθενών, νομικών κλπ, είτε στα πλαίσια του ΕΟΦ, είτε σε πιο αποκεντρωμένη βάση.

Στο βαθμό που συμβεί κάτι τέτοιο και σε συνδυασμό με το άρθρο 5.5 του υπό ψήφιση Σχεδίου Νόμου « Μεταρρύθμιση του Συστήματος Φαρμακευτικής Περίθαλψης» Κεφάλαιο Α': Διατάξεις περί φαρμακευτικής περίθαλψης» που ορίζει: «καθορίζονται οι παθήσεις, στις οποίες αποκλειστικό δικαίωμα συνταγογράφησης έχουν ιατροί συγκεκριμένων ειδικοτήτων» μία προσωρινή διαφωνία μπορεί να μετατραπεί σε μία θεσμοθετημένη και καθολικά αποδεκτή διαδικασία που

1) θα είναι προς το συμφέρον των ασθενών που θα έχουν πρόσβαση στις επιστημονικά τεκμηριωμένες θεραπευτικές αγωγές, ενώ θα απο-

φεύγουν τις αδόκιμες αγωγές και μάλιστα συχνά από μη ειδικούς γιατρούς,

2) θα είναι προς το καλώς νοούμενο συμφέρον των Ογκολόγων στο βαθμό που θα κινούνται στα πλαίσια δίκαιης, ξεκάθαρης και συμπαγούς επιστημονικής βάσης, χωρίς το αίσθημα ότι δεν τους δίνεται η δυνατότητα να βοηθήσουν δυνητικά δυνάμενους να ωφεληθούν ασθενείς, και

3) θα είναι προς το συμφέρον της Πολιτείας και του κοινωνικού συνόλου, που από τη μία θα φροντίζει τον ασθενή, ενώ από την άλλη θα αποφεύγει υπέρογκο και συχνά ανώφελο κόστος άστοχων θεραπευτικών χειρισμών, που μπορεί να προέλθει είτε από Ογκολόγους που ενδεχόμενα κινούνται πέραν των θεσμοθετημένων κανόνων είτε από μη ειδικούς στα πλαίσια άγνοιας ή άλλων λόγων.

Υπεύθυνη στήλης: Έλενα Λινάρδου¹, MD, PhD

Νέα μελών της ΕΟΠΕ

Προκήρυξη υποτροφιών ΕΟΠΕ 2005-2006

Η Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδος στο πλαίσιο της προσπάθειάς της για την ενίσχυση της εργαστηριακής/ βασικής και κλινικής έρευνας στην Ογκολογία προκήρυξε και φέτος τις κάτωθι υποτροφίες:

- οικονομική ενίσχυση διάρκειας 1 έτους για **3 ερευνητικά προγράμματα** που θα πραγματοποιηθούν στην Ελλάδα
- **3 υποτροφίες εξωτερικού στην Κλινική Ογκολογία** διάρκειας 1 έτους για νέους ιατρούς ή επιστήμονες, ως εξής:
 - α) 1 υποτροφία εξωτερικού Κλινικής Ογκολογίας – **ΕΟΠΕ**
 - β) 1 υποτροφία εξωτερικού Κλινικής Ογκολογίας – **ESMO «Athens Grant '98»**
 - γ) 1 υποτροφία εξωτερικού Κλινικής Ογκολογίας – **NOVARTIS «Κων/νου Τέντα»**.

Οι υποψήφιοι θα πρέπει να καταθέσουν φάκελο με τα απαραίτητα δικαιολογητικά στα γραφεία της ΕΟΠΕ (Λ. Αλεξάνδρας 105 - 4^{ος} όροφος, 11475, Αθήνα) το αργότερο μέχρι **20 Ιανουαρίου 2006**. Πληροφορίες για τους όρους της προκήρυξης και τα απαιτούμενα δικαιολογητικά παρέχονται από τα γραφεία της ΕΟΠΕ (τηλ./ fax: **210 6457971**) ή την ηλεκτρονική σελίδα: **www.hesmo.gr**.

Συγκέντρωση της Ομάδας Ελλήνων Νέων Ογκολόγων (GYMO)

Το Σάββατο 10 Δεκεμβρίου 2005, 9:00-17:00, έγινε με επιτυχία συνάντηση της Ομάδας στο Ξενοδοχείο Hilton, υπό την αιγίδα της ΕΟΠΕ. Η Συνάντηση περιελάμβανε επιμορφωτικό workshop με θέμα την «Αποτελεσματική Επικοινωνία» και στη συνέχεια ανοικτή συζήτηση μεταξύ των μελών της Ομάδας. Ήταν η πρώτη συνάντηση της Ομάδας με τόσο ευρεία συμμετοχή: συμμετείχαν συνολικά 36 μέλη της Ομάδας, με συμμετοχή, εκτός των συναδέλφων από την Αθήνα, 6 συνα-

δέλφων από τη Θεσσαλονίκη, 5 από την Κρήτη, 2 από την Πάτρα, 1 από Ιωάννινα καθώς και 2 συναδέλφων από το Λονδίνο. Κατά τη διάρκεια του workshop υπήρξε ευκαιρία για εποικοδομητική ανταλλαγή απόψεων πάνω σε θέματα αποτελεσματικής επικοινωνίας του σύγχρονου Έλληνα ογκολόγου με ασθενείς, συγγενείς και συναδέλφους καθώς και εκτενής συζήτηση για αποτελεσματικούς τρόπους και κατευθυντήριες γραμμές για την ανακοίνωση «κακών» νέων (“breaking bad news”). Μετά το τέλος του workshop υπήρξε ενημέρωση των μελών για τα τρέχοντα θέματα της Ομάδας καθώς και εκτενής ανταλλαγή απόψεων για τις μελλοντικές δραστηριότητες της Ομάδας.

Νέα από τον κόσμο

Οι σημαντικότερες πρόοδοι στην κλινική έρευνα του καρκίνου το έτος 2005

Ειδική δημοσίευση της Αμερικάνικης Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO)

“Clinical Cancer Advances 2005” είναι ο τίτλος της πρώτης ανεξάρτητης ετήσιας δημοσίευσης των σημαντικότερων νέων στη θεραπεία, διάγνωση και πρόληψη του καρκίνου, που πραγματοποιήθηκε από την ASCO και δημοσιεύθηκε στο πρώτο τεύχος του 2006 του Journal of Clinical Oncology (*JCO, 2006, January 1, Vol 24, No 1: 190-205*). Πρόκειται για μια πολύ ενδιαφέρουσα, έγκυρη και σίγουρα ιδιαίτερα χρήσιμη ανασκόπηση των τελευταίων δεδομένων στην κλινική ογκολογία, που έχει γραφτεί για όλους όσους έχουν ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Έχει γραφτεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αφορά το γενικό κοινό, τους ασθενείς με καρκίνο και τις ομάδες που τους αντιπροσωπεύουν, τους κλινικούς ογκολόγους και άλλους επαγγελματίες υγείας που ασχολούνται με τον καρκίνο, καθώς συνοψίζει τα σημαντικότερα εκείνα δεδομένα της κλινικής έρευνας που δυνητικά μπορεί να αλλάξουν την καθημερινή ογκολογική πρακτική. Περιληπτικά αναφέρουμε παρακάτω τα σημαντικότερα σημεία της δημοσίευσης, όμως σίγουρα αξίζει τον κόπο να την διαβάσει κανείς αναλυτικά.

¹Παθολόγος Ογκολόγος, Επιμελήτρια Α', Ογκολογική Κλινική Νοσοκομείου Metropolitan, Νέο Φάληρο, Αθήνα

Τα σημαντικότερα στην κλινική έρευνα

Νέα standards of care στην συμπληρωματική θεραπεία του πρώιμου καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του πνεύμονα και του κολοορθικού καρκίνου

- **Το trastuzumab (Herceptin) μειώνει στο μισό τις υποτροπές του HER2-θετικού καρκίνου του μαστού:** δύο μεγάλες κλινικές μελέτες έδειξαν για πρώτη φορά ότι η προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος trastuzumab σε standard συμπληρωματική χημειοθεραπεία, μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής κατά 52% μετά από 3 χρόνια και τον κίνδυνο θανάτου κατά το 1/3 (33%), σε ασθενείς με HER2-θετικό καρκίνο μαστού, σε σύγκριση με χημειοθεραπεία μόνο. Τα ποσοστά 3-ετούς επιβίωσης ήταν 94.3% για τις γυναίκες που έλαβαν trastuzumab σε σύγκριση με 91.7% για αυτές που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία (Romond et al. NEJM 353:1673-1684, 2005). Τα αποτελέσματα αυτά έρχεται να ενισχύσει και η ευρωπαϊκή μελέτη HERA που συγκρίνει τη χρήση trastuzumab για ένα ή δύο χρόνια και δίνει μείωση του κινδύνου υποτροπής κατά 46% μετά από 1 έτος αγωγή με trastuzumab, ενώ τα αποτελέσματα της σύγκρισης αναμένονται το 2008 (Piccart-Gebhart et al. NEJM 353: 1659-1672, 2005). Σημειώνεται ο αυξημένος κίνδυνος συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας και στις 3 μελέτες με τη χρήση του trastuzumab. Οι γυναίκες με καρκίνο μαστού και υπερέκφραση του HER2 αποτελούν περίπου το 25-30% όλων των περιπτώσεων με καρκίνο μαστού και αναμένεται ότι η ανακοίνωση των παραπάνω σημαντικών αποτελεσμάτων θα αλλάξει την ογκολογική πρακτική γι' αυτές τις γυναίκες.
- **Η συμπληρωματική χημειοθεραπεία μετά από εγχείρηση για καρκίνο του πνεύμονα αυξάνει την επιβίωση:** μία μεγάλη προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη έδωσε την απάντηση στην αντιγνωμία για τη χρησιμότητα της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας σε χειρουργήσιμο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η μελέτη έδειξε ότι η συμπληρωματική χημειοθεραπεία μείωσε τον κίνδυνο υποτροπής κατά 40% και είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά καλύτερα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης απ' ότι η χειρουργική μόνο (69% έναντι 54%). Η επιβίωση ασθενών που έλαβαν μετεγχειρητικά συνδυασμό πλατίνης – ναβελμπίνης ήταν 94 μήνες σε σύγκριση με 73 μήνες για εκείνους που δεν έλαβαν μετεγχειρητική χημειοθερα-

πεία. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την πρόσφατη ανακοίνωση των θετικών αποτελεσμάτων των μελετών της ANITA (Adjuvant Navelbine International Trialist Association) και CALGB (Cancer and Leukaemia Group B), επιβεβαιώνουν ότι η συμπληρωματική χημειοθεραπεία έχει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση των ασθενών με χειρουργήσιμο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα και καλή γενική κατάσταση (Winton et al, NEJM 352: 2589-2597, 2005; Douillard et al JCO 624, 2005; Strauss et al. JCO 621, 2004).

- **Η συνδυασμένη χημειοθεραπεία με βάση την οξαλιπλατίνη μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής μετά από χειρουργική εξαίρεση κολοορθικού καρκίνου:** Δύο μεγάλες μελέτες έδειξαν το ρόλο της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας με συνδυασμούς φλουουρακίλης, λευκοβορίνης και οξαλιπλατίνης (FOLFOX) σε ασθενείς με πρώιμο κολοορθικό καρκίνο. Η μελέτη MOSAIC έδειξε ότι η συμπληρωματική χημειοθεραπεία με την προσθήκη της οξαλιπλατίνης μείωσε τον κίνδυνο υποτροπής κατά 24% σε σύγκριση με χειρουργείο μόνο. Η δεύτερη μελέτη από την ομάδα του NSABP έδειξε ότι η συμπληρωματική χημειοθεραπεία με συνδυασμό οξαλιπλατίνης μείωσε τον κίνδυνο υποτροπής κατά 21%. (Andre et al. NEJM 350: 2343-51, 2004; DeGramont et al. JCO 23: 246, 2005; Wolmark et al. JCO 23: 246, 2005).

Περισσότερες στοχευμένες θεραπείες αποδεικνύονται αποτελεσματικές σε διάφορους όγκους

- **Το bevacizumab (Avastin) στη θεραπεία του προχωρημένου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου:** Μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο MMKP και κολοορθικό καρκίνο έδειξαν για πρώτη φορά ότι η προσθήκη στην κλασσική χημειοθεραπεία ενός αντι-αγγειογενετικού παράγοντα, του μονοκλωνικού αντισώματος κατά του VEGF, bevacizumab, αυξάνει σημαντικά την επιβίωση σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία μόνο. Η προσθήκη bevacizumab στο συνδυασμό paclitaxel-carboplatin είχε σαν αποτέλεσμα 12.5 μήνες επιβίωση ασθενών με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα έναντι 10.2 μηνών εκείνων που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία. Επίσης η προσθήκη bevacizumab σε χημειοθεραπεία αύξησε την επιβίωση κατά 17% σε ασθενείς με κολοορθικό καρκίνο. (Sandler et al. JCO

- 23: 2, 2005; Giantonio et al. ASCO GI Cancer Symposium January 2005, 169a)
- **Τα μονοκλωνικά αντισώματα Rituximab (Rituxan) και I-131 Tositumomab (Bexxar) στη θεραπεία των B-cell λεμφωμάτων:** Δύο μελέτες τον προηγούμενο χρόνο έδειξαν ότι τα παραπάνω μονοκλωνικά αντισώματα όταν προστεθούν σε χημειοθεραπεία επιμηκύνουν σημαντικά την ύφεση ασθενών με B-κυτταρικά λεμφώματα. (Pfreundschuh et al. JCO 23: 567, 2005; Kaminski et al. NEJM 352: 441-449, 2005).
 - **Το Cetuximab (Erbix) στη θεραπεία των καρκίνων κεφαλής-τραχήλου:** Δεδομένα το 2004 είχαν δείξει ότι η προσθήκη cetuximab σε κλασική χημειοθεραπεία μπορεί να αυξήσει την επιβίωση ασθενών με καρκίνο κεφαλής-τραχήλου. Μια νέα ανάλυση που συνδυάζει δεδομένα από τέσσερις μεγάλες μελέτες επιβεβαίωσε και ενίσχυσε αυτά τα αποτελέσματα δείχνοντας ότι το cetuximab μπορεί να αυξήσει την επιβίωση και όταν προστεθεί στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με υποτροπή μετά από αρχική θεραπεία. Η ανάλυση έδειξε ότι ασθενείς που έλαβαν cetuximab είχαν επιβίωση 5.9 μήνες σε σύγκριση με 3.4 μήνες αυτών που δεν το έλαβαν. Μία δεύτερη μελέτη με προσθήκη του μονοκλωνικού αντισώματος σε κλασική χημειοθεραπεία έδειξε ότι μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στη διατήρηση λάρυγγα. (Vermorken et al. JCO 23: 501, 2005; Bonner et al. JCO 23: 508, 2005)
 - **Διάφορες ενθαρρυντικές θεραπείες για καρκίνο νεφρού:** Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έδειξαν το ρόλο που μπορούν να παίξουν οι νέες στοχευμένες θεραπείες σε μεταστατικό καρκίνο νεφρού. Τέσσερις πρόσφατες μελέτες με αναστολείς αγγειογένεσης έδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, παρόλο που πρόκειται για μικρές μελέτες φάσης II, με τους παράγοντες AG-013736, Sunitinib (SU-11248; Sutent), Sorafenib (BAY-43-9006; Nexavar), Bevacizumab (Avastin) σε συνδυασμό με Erlotinib (Tarceva).
 - **Temozolomide σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία αποτελεσματική σε ασθενείς με γλοιοβλάστωμα:** Σημαντικές μελέτες έδειξαν για πρώτη φορά ότι ο συνδυασμός Temozolomide με ακτινοθεραπεία μπορεί να αυξήσει την επιβίωση ασθενών με γλοιοβλάστωμα (14.6 μήνες έναντι 12.1 μήνες για ακτινοθεραπεία μόνο, ενώ στα 2 έτη περισσότεροι από διπλάσιους ασθενείς που έλαβαν temozolomide ήταν ζωντανοί σε σχέση με αυτούς που υποβλήθηκαν μόνο σε ακτινοθεραπεία). Μία άλλη μελέτη έδειξε ότι γενετικοί δείκτες μπορεί να βοηθήσουν στην αναγνώριση των ασθενών εκείνων που θα ωφεληθούν πραγματικά από αυτές τις θεραπείες. Ασθενείς με μια συγκεκριμένη διαφοροποίηση στο γονίδιο MGMT που έλαβαν temozolomide και ακτινοθεραπεία επιβίωσαν για 21.7 μήνες έναντι 15.3 μηνών των ασθενών που έλαβαν μόνο ακτινοθεραπεία. (Stupp et al. NEJM 352: 987-996, 2005; Athanassiou et al. JCO 2005; Hegi et al. NEJM 352: 997-1003, 2005)
 - **Η ανάπτυξη του πρώτου προφυλακτικού εμβολίου εναντίον λοίμωξης με HPV:** Μελέτες που ανακοινώθηκαν τον προηγούμενο χρόνο έδειξαν ότι δύο διαφορετικά HPV εμβόλια ήταν ισχυρά αποτελεσματικά στην προφύλαξη από λοίμωξη με τον ιό HPV (Cervarix εναντίον του HPV16 και HPV18, Gardasil εναντίον 4 τύπων του HPV, 6, 11, 16, 18). Περισσότερος χρόνος παρακολούθησης είναι αναγκαίος για να αποδειχθεί η επίδραση των εμβολίων στα ποσοστά ανάπτυξης καρκίνου τραχήλου μήτρας. (Harper et al. Lancet 364: 1757-1765, 2004; Villa et al. Lancet Oncol 6: 271-278, 2005).
 - **Η συχνότητα εμφάνισης μελανώματος και άλλων καρκίνων του δέρματος αυξάνει σε νεαρούς ενήλικες κάτω των 40 ετών:** Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η συχνότητα όλων των τύπων καρκίνου δέρματος αυξάνει στους νεαρούς ενήλικες και στα παιδιά. Σύμφωνα με μια ανάλυση του NCI η συχνότητα μελανώματος σε άτομα κάτω των 20 ετών αυξήθηκε κατά 2.9% ανά έτος από το 1973 έως το 2001. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την σημασία της προφύλαξης από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία στην πρώτη παιδική και εφηβική ηλικία και επίσης τονίζουν την ανάγκη για έρευνα όσον αφορά άλλους παράγοντες εκτός της ηλιακής ακτινοβολίας που θα μπορούσαν να εξηγήσουν την αύξηση της συχνότητας αυτών των καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του πιθανού ρόλου γενετικών παραγόντων.
- Τα σημαντικότερα των πρόσφατων συνεδρίων**
- 28th Annual San Antonio Breast Cancer Conference, December, 2005
- *Περισσότερες μελέτες συμπληρωματικής θεραπείας με Herceptin®: το trastuzumab σε συνδυασμό με συμπληρωματική χημειοθεραπεία*

βελτιώνει την ελεύθερη νόσου επιβίωση ασθενών με πρώιμο HER-2 θετικό καρκίνο μαστού

Τα αποτελέσματα της πρώτης interim analysis της μελέτης BCIRG 006 ανακοινώθηκαν για ένα σύνολο 3222 ασθενών με HER2 θετικό καρκίνο μαστού. Πρόκειται για τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III, με τρία σκέλη: ACx4 –T (docetaxel)x4, AC-T plus Herceptin για 1 έτος, TC(Carboplatin) x 6 plus Herceptin για 1 έτος. Μετά διάμεση παρακολούθηση 23 μηνών η ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS) ήταν σημαντικά καλύτερη στις ασθενείς που έλαβαν οποιοδήποτε συνδυασμό με Herceptin, σε σύγκριση με χημειοθεραπεία μόνο (hazard ratio 0.49 για το AC-TH vs AC-T, $p < 0.0001$; και 0.61 για το TCH, $p = 0.0002$). Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων που έλαβαν trastuzumab. Όσον αφορά την καρδιοτοξικότητα οι ασθενείς που έλαβαν AC-TH είχαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρδιακών συμβαμάτων σε σύγκριση με το AC-T (2.62% vs 0.86%, $p = 0.0024$) και σημαντική διαφορά στη μείωση του LVEF $> 10\%$ (17.3% vs 9%), $p = 0.002$). Δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ AC-T και TCH, ενώ υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων που έλαβαν trastuzumab όσον αφορά τη μείωση του LVEF $> 10\%$ (17.3% για το AC-TH έναντι 8% για το TCH). Μία άλλη σημαντική παρατήρηση σε αυτή τη μελέτη είναι ότι περίπου 35% των ασθενών με HER2 θετική νόσο βρέθηκε ότι είχαν και ενίσχυση του γονιδίου τοποισομεράσης II, στόχου της αδριαμυκίνης, επομένως είχαν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν σε θεραπεία με αδριαμυκίνη, γεγονός που σημαίνει ότι με τη χρήση περισσότερων δεικτών θα μπορούσαμε να εξατομικεύσουμε τη θεραπεία για το όφελος περισσότερων ασθενών.

- *Η χορήγηση εξεμεστάνης μετά από ταμοξιφένη δεν αυξάνει τη συχνότητα απώλειας οστικής πυκνότητας (BMD)*

Η απώλεια οστικής πυκνότητας (bone mineral density) σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με καρκίνο μαστού που λαμβάνουν εξεμεστάνη μετά από 2 ή 3 χρόνια ταμοξιφένης είναι παρόμοια με αυτή που αναμένεται σε υγιείς γυναίκες με ίδια ηλικιακά και άλλα χαρακτηριστικά. Τα αποτελέσματα αφορούν υποανάλυση της IES μελέτης που έδειξε ότι δεν υπήρχαν διαφορές στην BMD στις γυναίκες υπό ταμοξιφένη μετά από 24 μήνες, ενώ σε εκείνες που άλλαξαν σε εξεμεστάνη η απώλεια BMD ήταν ταχεία τους πρώτους 6 μήνες όμως σταθεροποιήθηκε στους επόμενους 6

μήνες, με μια απώλεια της τάξης του 0.55% στην ΟΜΣΣ στο δεύτερο χρόνο μετά την αλλαγή σε σχέση με τον πρώτο χρόνο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντίθεση με αυτά της μελέτης ATAC που έδειξε μια απώλεια της τάξης του 2% ανά έτος, που επέμεινε για αρκετά έτη, γεγονός που υποδηλώνει ότι αναστολείς αρωματάσης με διαφορετικό μηχανισμό δράσης έχουν πιθανά διαφορετική συμπεριφορά.

Γνωρίζετε οτι...

- *...η χημειοθεραπεία μετά το χειρουργείο αυξάνει την επιβίωση ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ενδομητρίου...*

Μία τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III δημοσιεύθηκε πρόσφατα που έδειξε ότι η χορήγηση συνδυασμού δοξορουβικίνης και σισπλατίνης μετά από χειρουργική επέμβαση μειώνει στατιστικά σημαντικά τα ποσοστά υποτροπής και αυξάνει την επιβίωση ασθενών με προχωρημένο καρκίνο ενδομητρίου. Στη μελέτη τυχαιοποιήθηκαν ασθενείς με καρκίνο ενδομητρίου σταδίου III ή IV και υπολειπόμενη νόσο έως 2 εκ. μετά το χειρουργείο: 194 να λάβουν 5 μήνες χημειοθεραπεία με δοξορουβικίνη και σισπλατίνη έναντι 202 γυναικών που έλαβαν 1.5 μήνα ακτινοβολία πυέλου. Στα 5 χρόνια η προβλεπόμενη επιβίωση ήταν 55% για τις ασθενείς υπό χημειοθεραπεία έναντι 42% για τις ασθενείς υπό ακτινοβολία, ενώ τα hazard ratio για θάνατο και πρόοδο νόσου ήταν 0.68 και 0.71 αντίστοιχα, υπέρ της χημειοθεραπείας έναντι ακτινοβολίας. (*J Clin Oncol 2005; 24*)

- *...η λετροζόλη είναι αποτελεσματικότερη από την ταμοξιφένη σαν συμπληρωματική θεραπεία πρώιμου καρκίνου μαστού...*

Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία διπλά τυφλή μελέτη φάσης III σε ένα σύνολο 8010 γυναικών που τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν 5 χρόνια ενός των κάτωθι 4 σχημάτων: λετροζόλη ή ταμοξιφένη ή λετροζόλη ακολουθούμενη από ταμοξιφένη ή ταμοξιφένη ακολουθούμενη από λετροζόλη. Στα πρώτα συγκριτικά αποτελέσματα μετά από 25.8 μήνες διάμεση παρακολούθηση, η λετροζόλη σε σύγκριση με την ταμοξιφένη μείωσε τον κίνδυνο υποτροπής κατά 19% ($p = 0.003$) και τον κίνδυνο υποτροπής σε απομακρυσμένες θέσεις κατά 27% ($p = 0.001$). Η θεραπεία με ταμοξιφένη εμφάνισε περισσότερα θρομβοεμβολικά επεισόδια, ενδομητρικό καρκίνο, και κολπικές αιμορραγίες, ενώ η λετροζόλη υψηλότερα ποσοστά σκελετικών και

καρδιακών συμβαμάτων καθώς και υπερχοληστερολαιμία. (*N Engl J Med* 2005; 353: 2747-2757, 2807-2809)

- ...το NCI συνιστά ενδοπεριτοναϊκή θεραπεία για καρκίνο των ωθηκών...

Με βάση πρόσφατα δημοσιευμένα αποτελέσματα μελέτης φάσης III, το NCI τώρα συστήνει ενδοφλέβια χορήγηση πακλιταξέλης και ενδοπεριτοναϊκή οισπλατίνη και πακλιταξέλη σε ασθενείς με πλήρως εξαιρεθέντα καρκίνο ωθηκών σταδίου III. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συνδυασμός ενδοφλέβιας και ενδοπεριτοναϊκής αγωγής έδωσε 25% μείωση του κινδύνου θανάτου σε σύγκριση με την ενδοφλέβια οδό μόνο. Στη μελέτη 415 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε 135 mg/m² paclitaxel iv και 75 mg/m² cisplatin iv την ημέρα 2, είτε σε 135 mg/m² paclitaxel iv ακολουθούμενου από 100 mg/m² cisplatin ip την ημέρα 2 και 60 mg/m² paclitaxel ip την ημέρα 8, κάθε 3 εβδομάδες για 6 κύκλους. Διάμεση ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση (PFS) ήταν 18.3 μήνες για την ομάδα της iv θεραπείας έναντι 23.8 μηνών για την ομάδα της ip αγωγής (p=0.05), και η συνολική επιβίωση ήταν 49.7 και 65.6 μήνες, αντίστοιχα (p=0.03). Σημειώνεται βέβαια ότι η ομάδα της ip οδού είχε περισσότερη grade 3-4 κόπωση, πόνο, αιματολογικές, γαστρεντερικές ή νευρολογικές διαταραχές, όμως οι μετρήσεις της ποιότητας

ζωής ήταν παρόμοιες και στις δύο ομάδες. (*N Engl J Med* 2006; 354:34-43, 77-79).

- ...συχνή τηλεφωνική επικοινωνία μεταξύ ασθενών και γιατρών μπορεί να οδηγήσει σε ιατρικά λάθη...

Αναφέρεται σε πρόσφατη δημοσίευση ότι η τηλεφωνική επικοινωνία μεταξύ γιατρών και ασθενών μπορεί να οδηγήσει σε λάθη που μπορεί να στοιχίσουν από απλή δυσφορία και ταλαιπωρία έως άγχος αλλά και να θέσουν σε κίνδυνο την ασφάλεια του ασθενούς. Υπολογίζεται ότι αν και περίπου 25% των επαφών ασθενών και γιατρών γίνονται μέσω τηλεφώνου, πολύ λίγα έχουν γραφτεί για αποτελεσματική τηλεφωνική ιατρική επικοινωνία. Έτσι κάποια από τα πιο συχνά σενάρια που μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρά λάθη και επιπλοκές αφορούν την ενημέρωση ασθενών για 'ευαίσθητες' απαντήσεις εξετάσεων, ασθενείς που ζητούν ναρκωτικά, 'θεραπεία' ή οδηγίες σε σοβαρά ασθενείς που δεν θέλουν να έρθουν στα επείγοντα, τηλεφωνήματα αργά τη νύχτα, επικοινωνία με 'δύσκολους' ασθενείς, ιατρικές απορίες και αναζήτηση οδηγιών από συγγενείς ασθενών, και πολλά άλλα. Αναπτύσσονται λοιπόν στην δημοσίευση πρώτες οδηγίες για τέτοια σενάρια αλλά και γενικότερα για την αποτελεσματική επικοινωνία στην καθημερινή ιατρική πρακτική.... (*J Gen Intern Med* 2005; 20:959-963)

ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ

Υπεύθυνη στήλης: Έλενα Λινάρδου

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2006

25-28 Ιανουαρίου 2006

Cell Signaling World Signal Transduction Pathways as therapeutic targets

European Conference Center (Luxembourg)

info: marc.diederich@lbmcc.lu ;

<http://www.transduction-meeting.lu>.

26-28 Ιανουαρίου 2006

8th International Symposium on Febrile Neutropenia, Athens, Greece

Information at: Chris Bolwell Tel +1 770 751 7332 Fax

+1 770 751 7334 E-mail c.bolwell@imedex.com

www.imedex.com

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2006

2-4 Φεβρουαρίου 2006

Breast Cancer: from Gene to Cure, Amsterdam, Netherlands

Information at: Dr. Elise van Leeuwen-Stok Tel. +31 20

346 2547 Fax +31 20 346 2525

E-mail GtC06@ikca.nl

11-17 Φεβρουαρίου 2006

5th Masterclass in Clinical Oncology (ESO), St. Julians, Malta, Westin Dragonara Resort

Information at: Chatrina Melcher, Masterclass coordina-

tor European School of Oncology, ESO Bellinzona Of-

fice IOSI, Ospedale Regionale Bellinzola e Valli 6500

Bellinzona, Switzerland Tel. +41 (0)91 811 8051 Fax

+41 (0)91 811 8051 E-mail eso2@esoncology.org

www.cancerworld.org

25-26 Φεβρουαρίου 2006

6ο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Δυτικής Ελλάδος

Ίαθολόγος Ογκολόγος, Επιμελήτρια Α', Ογκολογική Κλινική Νοσοκομείου Metropolitan, Νέο Φάληρο, Αθήνα

Γραμματεία: ETS, Ελ. Βενιζέλου 154, Ν. Σμύρνη

Τηλ. 210 9880032, Fax: 210 9881303

Info: www.events.gr

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2006

1-5 Απριλίου Μαΐου 2006

97th AACR Annual Meeting

Washington Convention Center in Washington, D.C. USA

Info: <http://www.aacr.org/page5295.aspx>

6-9 Απριλίου 2006



Info: <http://www.hesmo2006.gr/1/article/greek/1/1/index.htm>

ΜΑΪΟΣ 2006

5 – 7 Μαΐου 2006

Μεταπτυχιακό Σεμινάριο Γηριατρικής Ογκολογίας

Πάτρα- Achaia Beach Hotel

Διοργάνωση: Ελληνική Εταιρεία Γηριατρικής Ογκολογίας

Info: www.events.gr

9-13 Μαΐου 2006

32ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο

Μέγαρο Μουσικής Αθηνών.

Καταληκτική ημερομηνία υποβολής περιλήψεων 13 Ιανουαρίου 2006

Info: iea@mednet.gr ; www.mednet.gr

12-14 Μαΐου 2006

2ο Πανελλήνιο Forum Ογκολογίας

Κέντρο Αρχιτεκτονικής Μεσογείου - Μεγάλο Αρσενάλι

Διοργάνωση: Ογκολογική Κλινική Νοσοκομείου Χανίων

Info: www.events.gr

ΙΟΥΝΙΟΣ 2006

2-6 Ιουνίου 2006

ASCO 2006 Annual Meeting

Atlanta, Georgia, USA

Info: <http://www.asco.org/ac/1,1003,12-002144-0018-0043665,00.asp>

15-18 Ιουνίου 2006

8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας

Kalimera Kriti Hotel, Σίσου, Αγίου Νικολάου Κρήτης

Διοργάνωση: Ελληνική Εταιρεία Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας

Info: www.events.gr

26-28 Ιουνίου 2006

Advances in the Application of Monoclonal Antibodies in Clinical Oncology. The 23rd International Conference – A Celebration

Royal Myconian Resort & Thalasso Spa Center, Μύκονος

Διοργάνωση: CANCER CONFERENCES LTD., London

Info: agamemnon@epenetos.com

ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΙΣ

Στις οδηγίες που ακολουθούν ελήφθησαν υπόψη οι πρόσφατες υποδείξεις (1997) της Διεθνούς Επιτροπής των Εκδοτών Ιατρικών Περιοδικών (International Committee of Medical Journals Editors - ICM - JE): Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

1. ΕΙΔΗ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Στο "ΒΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ" γίνονται δεκτές προς δημοσίευση εργασίες με θέματα ογκολογικού ενδιαφέροντος υπό τη μορφή:

Ανασκοπήσεων από τρεις το πολύ συγγραφείς και σε έκταση που να μη ξεπερνά τις 28 δακτυλογραφημένες σελίδες, σε διπλό διάστημα και μέχρι 100 παραπομπές.

Πρωτότυπων εργασιών βασικής ή κλινικής έρευνας που μπορούν να παρουσιαστούν ως πλήρεις ή βραχείες αναφορές.

Ενδιαφερόντων περιστατικών για σύντομη (8-10 σελίδες σε διπλό διάστημα) παρουσίαση σπάνιας νόσου ή εκδήλωσης ή ασυνήθους κλινικής πορείας και συζήτηση όσο είναι απαραίτητο για την παρουσίαση.

Πρακτικά σεμιναρίων, γραπτών συμποσίων, στρωγγυλών τραπεζιών και κλινικοπαθολογο-ανατομικών συζητήσεων, κατά την κρίση της Σύntαξης.

Ειδικά θέματα: γενικού ογκολογικού ενδιαφέροντος, εργασίες που δεν κατατάσσονται σε άλλη κατηγορία εργασιών, έκτασης μέχρι 20-25 σελίδες διπλού διαστήματος.

Γράμματα αναγνωστών, έκτασης 2-3 σελίδων διπλού διαστήματος, με κρίσεις για δημοσιεύσιμη εργασία ή γενικότερες γνώμες, σύντομες παρατηρήσεις, πρόδρομα αποτελέσματα σε συντομία κ.λ.π. Αν αφορούν κρίσεις δημοσιευμένης εργασίας, τίθενται υπόψη του συγγραφέα της εργασίας, που μπορεί να απαντήσει.

2. ΑΛΛΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- Η γλώσσα των εργασιών είναι η Ελληνική. Η Συντακτική Επιτροπή διατηρεί το δικαίωμα να αποδέχεται εργασίες στην Αγγλική γλώσσα, εφ' όσον υπάρχει αποχρών λόγος (π.χ. ξενόγλωσσοι συγγραφείς, κ.ά.).
- Η Συντακτική Επιτροπή αποδέχεται προ- ή μετά-δημοσιεύσεις κλινικών ή εργαστηριακών εργασιών υπό τη μορφή σύντομων αναφορών (short reports) ή εκτεταμένων περιλήψεων, στις οποίες θα αναφέρονται περιληπτικώς (μέχρι 8 σελίδες διπλού διαστήματος) οι βασικοί στόχοι, το υλικό, οι μέθοδοι, τα αποτελέσματα και η συζήτηση της εργασίας. Στις μετά-δημοσιεύσεις θα αναφέρεται υποχρεωτικώς στη σελίδα του τίτλου το περιοδικό που πρωτοδημοσιεύτηκε η πρωτότυπη εργασία.
- Εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί προφορικά ή έχει δημοσιευτεί σε περίληψη (π.χ. πρακτικά συνεδρίων), αυτό υποσημαίνεται στη σελίδα του τίτλου.
- Οι αναφερόμενες ουσίες πρέπει να αναγράφονται με την κοινόχρηστη ονομασία ή το χημικό όνομα.
- Η Σύntαξη του περιοδικού θεωρεί δεδομένο, ότι η εργασία είναι σε γνώση και έχει την έγκριση όλων των συγγραφέων και του διευθυντού του τμήματος από το οποίο προέρχεται.
- Οι εργασίες υποβάλλονται δακτυλογραφημένες σε διπλό διάστημα σε τρία (3) αντίτυπα και σε δισκέτα 3,51. Αποστέλλονται ταχυδρομικώς στη διεύθυνση: **προς Εταιρεία Παθολόγων Ογκολόγων Ελλάδος, (υπόψη Συντακτικής Επιτροπής), Λεωφόρος Αλεξάνδρας 105, 114 75, ΑΘΗΝΑ**, ή ηλεκτρονικώς με e-mail στην ηλεκτρονική διεύθυνση: hesmo@otenet.gr

ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το χειρόγραφο πρέπει να έχει:

1. Σελίδα τίτλου, με τον τίτλο της εργασίας, τα ονόματα των συγγρα-

φών και σε υποσημείωση το τμήμα από το οποίο προέρχεται, τη θέση ή τον ανώτερο ακαδημαϊκό τίτλο κάθε συγγραφέα και τυχόν υποσημείωση για το εάν η εργασία έχει ανακοινωθεί ή έχει δημοσιευτεί σε περίληψη αλλού ή (εφ' όσον είναι μετά-δημοσίευση) έχει πρωτοδημοσιευτεί σε άλλο περιοδικό (βλέπε παραπάνω). Να σημειώνεται ο υπεύθυνος της αλληλογραφίας και η διεύθυνσή του, τηλέφωνα, fax και e-mail (αν υπάρχουν).

2. Σελίδα περίληψης στα ελληνικά με τις λέξεις ευρετηρίου (key words).
3. Σελίδα περίληψης στα αγγλικά με τις λέξεις ευρετηρίου (key words) στα αγγλικά.
4. Το κείμενο της εργασίας με κατάλληλο χωρισμό σε διάφορα κεφάλαια.
5. Βιβλιογραφία με το σύστημα Vancouver: Ο κατάλογος δεν είναι αλφαβητικός αλλά με τη σειρά που οι παραπομπές εντοίζονται στο κείμενο. Στο κείμενο αναφέρονται με τον αριθμό του καταλόγου και όχι με το όνομα του συγγραφέα. Για άρθρα περιοδικών, τα επώνυμα των συγγραφέων (με τα αρχικά χωρίς τελείες), γράφονται μέχρι και τρία - τα επιπλέον γράφονται et al ή κ.ά. ο τίτλος του άρθρου, το περιοδικό γραμμένο με τη διεθνή μορφή σύντμησης όπως στο Index Medicus, η χρονολογία, ο αριθμός τόμου και η πρώτη και τελευταία σελίδα του άρθρου. (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. JAMA 1988, 215:101 - 103). Για μονογραφία, το όνομα, ο τίτλος, ο εκδότης ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. Saunders Co, London. 1988). Για κεφάλαιο βιβλίου, τα ονόματα, ο τίτλος του κεφαλαίου, ο τίτλος του βιβλίου, ο διευθυντής σύntαξης (editor), ο εκδότης, ο τόπος και το έτος έκδοσης (π.χ. Smith A: Intestinal bleeding. In: Practice of Surgery, H. Kim, ed, Saunders Co, London 1988). Οι βιβλιογραφικές παραπομπές θα πρέπει να μπορούν να ελεγχθούν από τον κριτή και - κυρίως - από τον αναγνώστη. Έτσι, εάν η βιβλιογραφική αναφορά εντοίζεται σε άρθρο, βιβλίο κ.λ.π. που δεν συμβουλευθήκε άμεσα ο συγγραφέας αλλά αναφέρεται αλλού, ιδιαίτερα για παλιά ή δύσεύρετα στοιχεία, τότε δεν αναγράφεται σαν ξεχωριστή αναφορά διογκώνοντας άσκοπα και τεχνητά το βιβλιογραφικό πίνακα, αλλά αποδίδεται στο στοιχείο που άμεσα μελέτησε ο συγγραφέας (π.χ. "ο Crohn το 1932 ανέφερε10" - όπου 10 είναι το άρθρο του Smith που πράγματι συμβουλευθήκε ο συγγραφέας). Ιδιαίτερη σύσταση γίνεται για τη χρησιμοποίηση και της ελληνικής βιβλιογραφίας που είναι ήδη αρκετά πλούσια.
6. Πίνακες και σχήματα σε ξεχωριστή σελίδα το καθένα, σε τρία αντίτυπα, με διαδοχική αρίθμηση και σύντομη επεξήγηση. Πίνακες δακτυλογραφημένοι σε διπλό διάστημα χωρίς διαχωριστικές γραμμές, σχήματα με σινική μελάνη.
7. Φωτογραφίες καλής ποιότητας σε στιλπνό χαρτί. Πίσω από τη φωτογραφία σημειώνεται με μαλακό μολύβι βέλος που δείχνει το πάνω μέρος και ο αύξων αριθμός και σε αυτοκόλλητο τα ονόματα των συγγραφέων της εργασίας. Σε ξεχωριστή σελίδα, γράφονται οι υπότιτλοι των φωτογραφιών, το μέγεθος των οποίων στην τελική εκτύπωση ανήκει στην κρίση του υπεύθυνου έκδοσης. Σημειώνεται ότι, κατά τη δημοσίευση φωτογραφίας ασθενούς, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην αποκαλύπτεται η ταυτότητα του ατόμου. Το ονοματεπώνυμο σε καμμία περίπτωση δεν πρέπει να αναγράφεται (π.χ. σε ακτινογραφίες, κ.λ.π.), ενώ στις δημοσιεύσιμες φωτογραφίες η απλή επικάλυψη των οφθαλμών δεν αποτελεί επαρκή διαφύλαξη της ανωνυμίας του εικονιζόμενου προσώπου.