

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

<<In vitro δράση ημισυνθετικών ενώσεων της σκλαρεόλης στον καρκίνο του μαστού>>

<<In vitro activity of semisynthetic compounds of sclareol in breast cancer>>

Καραγιαννάκη Ιωάννα του Αριστοτέλη

Επιβλέπων: ΚΩΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΑΣ, καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Συνεπιβλέπουσα : ΨΑΡΑ ANNA-MARIA, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου

ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής - Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Λάρισα, 2025

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	7
1.1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ	7
1.1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	9
1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	10
1.2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	11
1.2.2 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	12
1.2.3ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	17
1.2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	19
1.2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	22
1.2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	26
1.2.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	29
1.3. ΣΚΛΑΡΕΟΛΗ	34
2.ΣΚΟΠΟΣ.....	36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	37
3.1.1 ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΑΣΤΟΥ MCF-7	37
3.1.2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΜΑΣΤΟΥ MDA-MB231	38
3.1.3 ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΙΣ	38
3.1.4 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	42
3.1.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	43
3.1.6 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	43
3.1.7 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ	44
3.1.8 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER & ΜΕΤΡΗΣΗΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	45
3.1.9 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	47
3.1.10 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	47
3.1.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB.....	48

3.1.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WoundHealingassay).....	51
3.1.13 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (Clonogenic Assay).....	52
3.1.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB	54
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUNDHEALING ASSAY).....	63
4.3 Αποτελέσματα μεθόδου αναστολής κλώνων (ClonogenicAssay).....	65
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε στο εργαστήριο φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Μάρτιο έως τον Σεπτέμβριο του 2025 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή φαρμακολογίας και Διευθυντή του εργαστηρίου φαρμακολογίας κ. Κωνσταντίνο Δήμα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω απεριόριστα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστούμε και αποτέλεσε μεγάλη μου τιμή. Ακόμη, νιώθω αμέριστη ευγνωμοσύνη για τις γνώσεις που μου μετέδωσε, την βοήθεια που μου παρείχε μαθαίνοντας μου να ανταπεξέρχομαι στο εργαστηριακό χώρο και την υπομονή και την υποστήριξη κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας. Ακόμη, τόσο οι επιστημονικές του γνώσεις όσο και ο ζήλος στην επιστήμη, αποτέλεσαν για εμένα πηγή έμπνευσης ώστε να οραματιστώ το επαγγελματικό μου μέλλον.

Αδιαμφισβήτητα, η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την ανιδιοτελή στήριξη και ανεκτίμητη καθοδήγηση της υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου Ευαγγελία Παπαδογιάννη, όπου οι συμβουλές και η επιστημονική της γνώση και εμπειρία με βοήθησαν να αντιμετωπίσω κάθε πρόκληση.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κωνσταντίνο Λαφαζάνη, Δήμητρα Αλεξοπούλου και Φανή Κουτσουγιάννη για την πολύτιμη βοήθεια τους σε κάθε πιθανή μου αμφιβολία. Φυσικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιστημονικό συνεργάτη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Ηλία Μπέγα, για τις καθοδηγητικές του συμβουλές.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Άννα- Μαρία Ψαρά και τον κ. Νικόλαο Μπαλατσό, τόσο για τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσαν κατά την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών, τις οποίες αξιοποίησα για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και αποτελούν καίριας σημασίας για την μελλοντική μου πορεία όσο και για την προσπάθεια που κατέβαλλαν για επίλυση κάθε πιθανής μου απορίας.

Ωστόσο την συγκεκριμένη εργασία, την αφιερώνω στην οικογένεια μου που με στήριζε σε όλη μου την ζωή και αποτέλεσε κινητήρια δύναμη κάθε μου προσπάθειας ανεξαρτήτου αποτελέσματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο τύπο καρκίνου στις γυναίκες παγκοσμίως και χαρακτηρίζεται από υψηλή ετερογένεια καθώς διαθέτει πολλούς μοριακούς υποτύπους, παρουσιάζοντας διαφοροποιήσεις στην επιθετική τους συμπεριφορά, που ποικίλει ανάλογα τον υπότυπο. Παρά την αξιοσημείωτη εξέλιξη στην ανακάλυψη πολυάριθμων θεραπευτικών προσεγγίσεων εξακολουθεί να σημειώνει υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που ενισχύεται από την ανθεκτικότητα στις υπάρχουσες θεραπείες και την πρωταγωνιστική ύπαρξη μεταστάσεων. Το γεγονός αυτό στάθηκε αφορμή για την ανακάλυψη πιο αποτελεσματικών φαρμάκων και θεραπευτικών επιλογών. Η σκλαρεόλη, αποτελεί μία φυσική ένωση που απομονώνεται από φυτά και έχει σημειώσει σημαντική αντικαρκινική δράση, καθώς προάγει την απόπτωση και την καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στην προκειμένη πτυχιακή, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση παραγώγων της σκλαρεόλης σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, την MCF-7 και την MDA-MB231. Για τον έλεγχο της κυτταροτοξικότητας της ουσίας στα καρκινικά κύτταρα των σειρών, εφαρμόστηκε η μέθοδος κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB. Για να αξιολογηθεί η αντιμεταναστευτική επίδραση των ουσιών στα καρκινικά κύτταρα και η δυνατότητα επούλωσης πληγών, εφαρμόστηκε η μέθοδος ελέγχου επούλωσης πληγών (Wound Healing assay), ενώ ελέγχθηκε η δυνατότητα κλωνογένεσης από ένα μεμονωμένο κύτταρο με εφαρμογή της μεθόδου αναστολής κλώνων (clonogenic assay). Για την συγκεκριμένη εργασία οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν προς μελέτη ήταν έξι (TNT396,TNT403,TNT404,TNT397,TNT405,TNT406) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σύμφωνα με τις πειραματικές διαδικασίες, η TNT405 φανέρωσε βέλτιστη αντικαρκινική δράση και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές και σημαντική αναστολή σχηματισμού κλώνων. Ωστόσο, στην μέθοδο wound healing σε διάστημα 24 ωρών, οι πληγές ήταν σχεδόν ίδιες με αυτές των κυττάρων ελέγχου. Έτσι, θεωρείται αναγκαία η εκτενέστερη μελέτη της για το μηχανισμό δράσης της καθώς και *in vivo* πειράματα, για να εξακριβωθεί η αποτελεσματικότητα της ως πιθανή μελλοντική θεραπευτική πρόταση

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide and is characterized by high heterogeneity, as it has many molecular subtypes, exhibiting varying degrees of aggressiveness depending on the subtype. Despite significant advances in the discovery of numerous therapeutic approaches, it continues to have high mortality rates, which are exacerbated by resistance to existing treatments and the predominant presence of metastases. This fact has prompted the search for more effective drugs and therapeutic options. Sclareol is a natural compound isolated from plants and has demonstrated significant anticancer activity, as it promotes apoptosis and suppresses cell proliferation. In the present thesis, the anticancer activity of sclareol derivatives was studied in two human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB231. To assess the cytotoxic effect of the compound on the cancer cells of these lines, the SRB cytotoxicity assay was applied. To evaluate the antimigratory effect of the compounds on the cancer cells and their wound healing capability, the Wound Healing assay was performed, while the clonogenic potential from a single cell was assessed using the clonogenic inhibition assay. For this work, six compounds (TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405, TNT406) were used in various concentrations. According to the experimental procedures, TNT405 showed optimal anticancer activity in both cancer cell lines and significant inhibition of colony formation. However, in the wound healing assay over 24 hours, the wounds were almost the same as those of the control cells. Therefore, further study into its mechanism of action and in vivo experiments are deemed necessary to verify its efficacy as a potential future therapeutic option

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο και ασυνήθιστα υψηλό πολλαπλασιασμό κυττάρων σε έναν ιστό ή όργανο του σώματος. Σύμφωνα με έναν νεότερο, εξελικτικό και βιολογικά ενισχυμένο ορισμό, ο καρκίνος είναι μία νόσος ανεξέλεγκτης πολλαπλασιαστικής ανάπτυξης από μετασχηματισμένα κύτταρα, υπό την επίδραση της φυσικής επιλογής, δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν μεταλλάξεις και χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν, να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να εξελίσσονται εν αντιθέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Brown et al., 2023). Πρόκειται για φυσιολογικά κύτταρα που υπόκεινται σε γονιδιακές και επιγενετικές τροποποιήσεις και μετατρέπονται σε καρκινικά. Συνήθως σε αλλαγές υπόκεινται ογκογονίδια (π.χ. RAS, MYC) που ενεργοποιούνται υπερβολικά, ογκοκατασταλτικά που απενεργοποιούνται και επιδιορθωτικά γονίδια (π.χ. BRCA1/2) που χάνουν τη λειτουργία τους. Έτσι τα κύτταρα χάνουν την φυσιολογική τους λειτουργία και μετατρέπονται σε κακοήθη, δηλαδή διαιρούνται, επεκτείνονται και τελικά εισβάλλουν σε άλλους ιστούς. Προάγουν συνεπώς την ογκογένεση. Σε κάθε όγκο υπάρχουν πολλά διαφορετικά υποείδη καρκινικών κυττάρων με διαφορετικά χαρακτηριστικά και ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ τους, γεγονός που εξηγεί ότι η καρκινική ανάπτυξη βρίσκεται κάτω από την επιρροή της φυσικής επιλογής (Thomas et al., 2003).

1.1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ

Η καρκινογένεση είναι μία πολυσταδιακή βιολογική διαδικασία, κατά την οποία φυσιολογικά κύτταρα υπόκεινται σε γενετικές βλάβες και μετατρέπονται σε κακοήθη. Ως πρώτο στάδιο, γνωστό ως έναρξη (initiation), παρουσιάζεται μία μη αναστρέψιμη γενετική μεταβολή σε ένα φυσιολογικό κύτταρο. Αυτή η μεταβολή, αποτελεί μία μετάλλαξη, η οποία αιτιάζεται από την έκθεση του κυττάρου σε μεταλλαξιόνους παράγοντες (ακτινοβολίες-χ, γ, κοσμική, υπεριώδης, καρκινογόνες ουσίες, ιοί καθώς και ενδογενή λάθη στην αντιγραφή του DNA). Οι μεταλλάξεις αυτές, μετατρέπουν τα πρωτοογκογονίδια σε ογκογονίδια, όπου ενεργοποιούνται και προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών, χάνοντας την ικανότητα τους να ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ως δεύτερο στάδιο, που επάγει την εξέλιξη της νόσου παρουσιάζεται η προαγωγή (Promotion). Σε αυτήν, τα κύτταρα που έχουν μεταλλαχθεί πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ως απάντηση σε εξωτερικά σήματα, χωρίς ωστόσο να τροποποιηθεί η δομή του DNA. Παράγονται καλοήθης προνεοπλασματικές εστίες δηλαδή περιοχές αυξημένης κυτταρικής διαίρεσης. Σε αυτήν την φάση, τα κύτταρα που έχουν υποστεί μεταλλάξεις αποκτούν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα, ενεργοποιώντας μονοπάτια επιβίωσης και αποκτώντας ανθεκτικότητα στην απόπτωση. Είναι δυνητικά αναστρέψιμο στάδιο και καθορίζεται από αλλαγές στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Το τρίτο στάδιο, που εκδηλώθηκε για την επαγωγή της καρκινογένεσης, γνωστό ως εξέλιξη ή πρόοδος (Progression), χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια με επιπλέον μη αντιστρεπτές μεταλλάξεις στα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι, τα τελευταία γίνονται όλο και πιο επιθετικά και αποκτούν κακοήθη χαρακτηριστικά (μεταστατική ικανότητα, αντίσταση στην απόπτωση, αποφυγή κυτταρικού κύκλου). Ως τελευταίο στάδιο, που αναγνωρίστηκε από πολλά σύγχρονα μοντέλα, αποτελεί η μεταστατική εξάπλωση (Metastasis). Σε αυτό, τα κακοήθη κύτταρα διασπείρονται σε άλλους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου (Weston & Harris, 2003).

Κύριες πηγές της καρκινογένεσης, αποτελούν γενετικές αλλαγές σε φυσιολογικά κύτταρα, επιγενετικές τροποποιήσεις και σηματοδοτικές οδοί που δυσλειτουργούν στον καρκίνο. Οι γενετικές αλλαγές αποτελούν τον πυρήνα της καρκινογένεσης. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν φυσιολογικά γονίδια τα οποία όταν υποστούν γενετικές αλλαγές επάγουν την δημιουργία καρκίνου. Έτσι λοιπόν έχουμε τις 3 βασικές κατηγορίες κυττάρων: τα ογκογονίδια που ονομάζονται πρωτοογκογονίδια(RAS,MYC,HER2/neu), ρυθμιστές κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης των κυττάρων, που όταν υποστούν μεταλλάξεις(σημειακές μεταλλάξεις, ενίσχυση γονιδίων, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις) μετατρέπονται σε ογκογονίδια. Έτσι, αποδιοργανώνεται η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης και ο οργανισμός οδηγείται σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με άμεση συνέπεια την καρκινογένεση. Μία ακόμη πολύ σημαντική κατηγορία κυττάρων για την επαγωγή του καρκίνου αποτελούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια(TP53,RB1,BRCA1/2).Αυτά, καταστέλλουν την ανάπτυξη όγκων ρυθμίζοντας τη δράση των πρωτοογκογονιδίων που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η απενεργοποίησή τους με γονιδιακή μετάλλαξη ή χρωμοσωμική ανωμαλία έχει ως συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της καταστολής αυτών(Kontomanolis et al., 2020).Τέλος, η ύπαρξη γονιδίων επιδιόρθωσης του DNAαποτελεί αναπόσπαστη σημασία στην καρκινογένεση, καθώς αφορά γονίδια που συμμετέχουν σε μηχανισμούς διόρθωσης των βλαβών DNA. Συνεπώς, αν υπάρξει μετάλλαξη σε αυτά, το DNA γίνεται πιο επιρρεπές σε επιπλέον μεταλλάξεις και χάνει τον προστατευτικό και αμυντικό του ρόλο(Yokozaki&Tahara et al., 2000).

Οι επιγενετικές αλλαγές που επάγουν τον σχηματισμό καρκίνου αφορούν τροποποιήσεις στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης χωρίς να τροποποιούν την αλληλουχία του DNA, επηρεάζοντας την λειτουργία σημαντικών γονιδίων για την προώθηση της καρκινογένεσης.

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που επιδρούν στον σχηματισμό καρκίνου είναι η μεθυλίωση του DNA,η ακετυλίωση ιστονών καθώς και η δράση τωνmicroRNA και lncRNA.Ο επιγενετικός μηχανισμός της μεθυλίωσης συμβάλλει στην καρκινογένεση με τους εξής τρόπους: Είτε παρατηρείται σε καρκινικά κύτταρα τοπική υπερμεθυλίωση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή τους, είτε παρουσιάζεται απώλεια μεθυλίωσης προκαλώντας γενετική αστάθεια, γεγονός που επιδρά στη γονιδιακή έκφραση. Ακόμη, η τροποποίηση των ιστονών επιδρά στην δομή της χρωματίνης και συνεπώς την προσβασιμότητα των γονιδίων στους μηχανισμούς μεταγραφής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ενισχύοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση. Τέλος, τα microRNA και τα lncRNA ρυθμίζουν επίσης την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση μέσω επιγενετικών ή μετα-μεταγραφικών μηχανισμών(MoscaL et al., 2021).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι αναστρέψιμες σε αντίθεση με τις γενετικές αλλαγές και διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην πορεία εξέλιξης όλων των σταδίων της καρκινογένεσης(Zhang et al.,2024).

Τέλος, υπάρχουν πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια(Li et al., 2024) που επάγουν τον καρκίνο και περιλαμβάνουν πολλαπλά βασικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την μετανάστευση των κυττάρων. Μερικά από αυτά είναι τα εξής : Μονοπάτι Wnt/β-catenin, μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR, Μονοπάτι KRAS/MAPK (Ras-Raf-MEK-ERK).

1.1.2 ΟΡΟΣΗΜΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ως ορόσημα του καρκίνου (hallmarks of cancer), σύμφωνα με τους Weinberg & Hanahan(2000) χαρακτηρίστηκαν τα βασικά βιολογικά χαρακτηριστικά όπου είναι υπεύθυνα για την βιωσιμότητα και δράση των καρκινικών κυττάρων και περιλαμβάνουν τις κύριες λειτουργικές ικανότητες που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα. Είναι τα εξής:

- **ΑΥΤΑΡΚΕΙΑ ΣΕ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΗΜΑΤΑ**: Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν αυτάρκεια στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους ενεργοποιώντας μονοπάτια κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παράγοντας αυξητικά σήματα. Είναι ανεπηρέαστα από εξωτερικούς αναπτυξιακούς παράγοντες.
- **ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙ-ΑΥΞΗΤΙΚΑ ΣΗΜΑΤΑ**: Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να προσπερνούν μηχανισμούς που αναστέλλουν την κυτταρική διαίρεση, επάγοντας την ανεξέλεγκτη παραγωγή κυττάρων.
- **ΑΠΟΦΥΓΗ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ**: Τα καρκινικά κύτταρα επιβιώνουν καθώς παρακάμπτουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.
- **ΑΠΕΡΙΟΡΙΣΤΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ/ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ**: Τα καρκινικά κύτταρα επέρχονται σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- **ΔΙΕΓΕΡΣΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ/ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ**: Τα καρκινικά κύτταρα δημιουργούν νέα αιμοφόρα αγγεία από ήδη υπάρχοντα, μέσω του παράγοντα αγγειογένεσης, VEGF, όπου αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς VEGFR1 και VEGFR2 στις κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι προάγεται η παραγωγή αιμοφόρων αγγείων που παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στον όγκο, ευνοώντας την ογκογένεση και συνεπώς την καρκινογένεση.
- **ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ**: Ενισχύει την επιθετικότητα του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα απομακρύνονται από τον αρχικό όγκο, μεταφέρονται με την κυκλοφορία του αίματος ή της λέμφου, εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς, πολλαπλασιάζονται και τελικά δημιουργούν νέους όγκους.

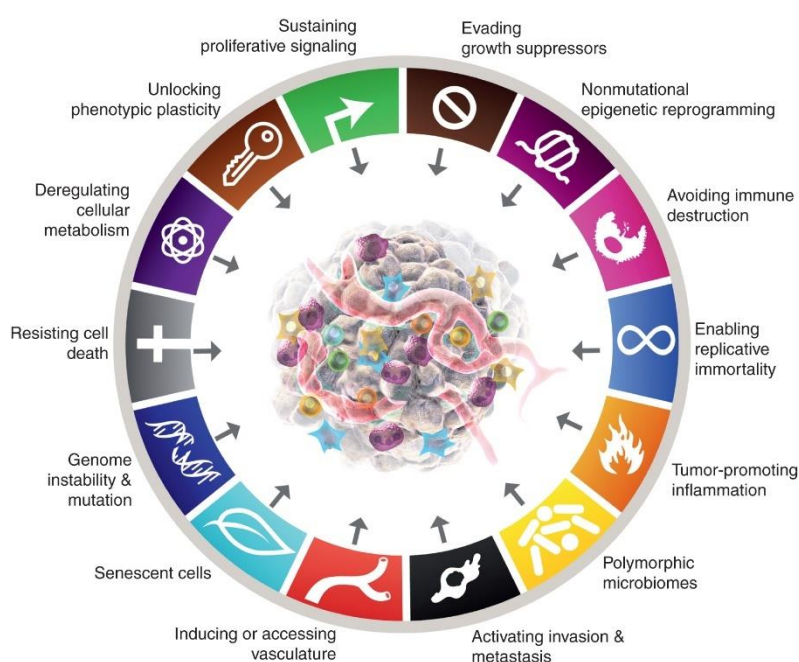
Αργότερα, οι Weinberg και Hanahan (2011) πρόσθεσαν δυο νέα γνωρίσματα των κυττάρων αυτών τα οποία ενσωματώθηκαν το 2022 (Hanahan, 2022).

- **ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ**: Τα καρκινικά κύτταρα αλλάζουν τον τρόπο που παράγουν ενέργεια ώστε να διαχειριστούν τις αυξημένες ενεργειακές τους απαιτήσεις. Αρχικά, έχουν υψηλές απαιτήσεις σε γλυκόζη, αμινοξέα, νουκλεοτίδια ώστε να παράγουν δομικά μόρια. Επίσης, παρά την παρουσία οξυγόνου προτιμούν να κάνουν αερόβια γλυκόλυση, δηλαδή να μετατρέπουν τη γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ, γνωστό ως φαινόμενο Warburg. Στο εσωτερικό των όγκων υπάρχει χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, αυτό ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1α, όπου προάγει την έκφραση γονιδίων που βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον, αυξάνουν την δημιουργία λιπαρών οξέων ώστε να δημιουργηθούν νέες κυτταρικές μεμβράνες και χρησιμοποιούν εκτός της γλυκόζης και την γλουταμίνη ως εναλλακτική πηγή ενέργειας και αζώτου μέσω της διαδικασίας της γλουταμινόλυσης.
- **ΔΙΑΦΥΓΗ ΑΠΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΡΡΙΨΗ**: Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς, που τα καθιστούν ανθεκτικά στο ανοσοποιητικό σύστημα (T-Λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα και σε άλλους ανοσολογικούς μηχανισμούς).

Ακόμη, σύμφωνα με μία νέα μελέτη ο Hanahan το 2022 ενέταξε ένα επιπλέον ορόσημο του καρκίνου κοινό ως αναδυόμενο χαρακτηριστικό: (Hanahan et al., 2022)

- 1) **Φαινοτυπική πλαστικότητα και διαταραγμένη διαφοροποίηση:** Αναφέρεται στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επωμίζονται φαινοτυπικές αλλαγές για να υποστηρίξουν φαινόμενα κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την διηθητική τους ικανότητα. Αυτό, επιτυγχάνεται μέσω αποδιαφοροποίησης των κυττάρων αυτών σε αδιαφοροποίητες μορφές, ώστε να τροποποιήσουν την πορεία διαφοροποίησης τους σε διαφορετικούς ιστούς ή να μείνουν σε μερικώς διαφοροποιημένη κατάσταση(στασιμότητα). Η πλαστικότητα των καρκινικών κυττάρων που χαρακτηρίζει την αλλαγή φαινοτύπου ενισχύει την προσαρμοστικότητα τους ώστε να υποστηρίξουν τα χαρακτηριστικά τους(πχ μετάσταση) και αναφέρεται στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να τροποποιούν τον φαινότυπο τους μέσω αποδιαφοροποίησης.

Το σύνολο των ορόσημων συνοψίζονται παρακάτω:



ΕΙΚΟΝΑ1: Τα ορόσημα του καρκίνου (HanahanD et al., 2022)

1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού, αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο που διαγιγνώσκεται στις γυναίκες παγκοσμίως και αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό. Χαρακτηρίστηκε ως η κύρια αιτία θανάτου σε γυναίκες ηλικίας 45 έως 55 ετών(Siegel et al.,2025).

Αιτιάζεται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστικού αδένα. Νέα κύτταρα μπορεί να σχηματιστούν ενώ το σώμα δεν τα χρειάζεται, ή παλιά και κατεστραμμένα κύτταρα να μην πεθάνουν όπως θα ήταν φυσιολογικό. Η συσσώρευση επιπλέον κυττάρων σχηματίζει συχνά μια μάζα ιστού που ονομάζεται όζος, νεοπλασία ή όγκος.

Οι όγκοι του μαστού μπορεί να είναι καλοήθεις(μη καρκινικοί) ή κακοήθεις (καρκινικοί). Οι καλοήθεις όγκοι συνήθως δεν είναι επιβλαβής, σπάνια εισβάλλουν στους ιστούς γύρω τους, δεν εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος, μπορούν να αφαιρεθούν και να μην εμφανιστούν ξανά. Ωστόσο, οι

κακοήθεις όγκοι μπορεί να αποτελέσουν απειλή για την ζωή, ενδέχεται να εισβάλλουν σε γειτονικά όργανα και ιστούς (θωρακικό τοίχωμα), δύνανται να εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος καθώς και μπορούν να αφαιρεθούν αλλά έχει αποδειχθεί ότι ανασχηματίζονται (Katsura et al., 2022).

1.2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

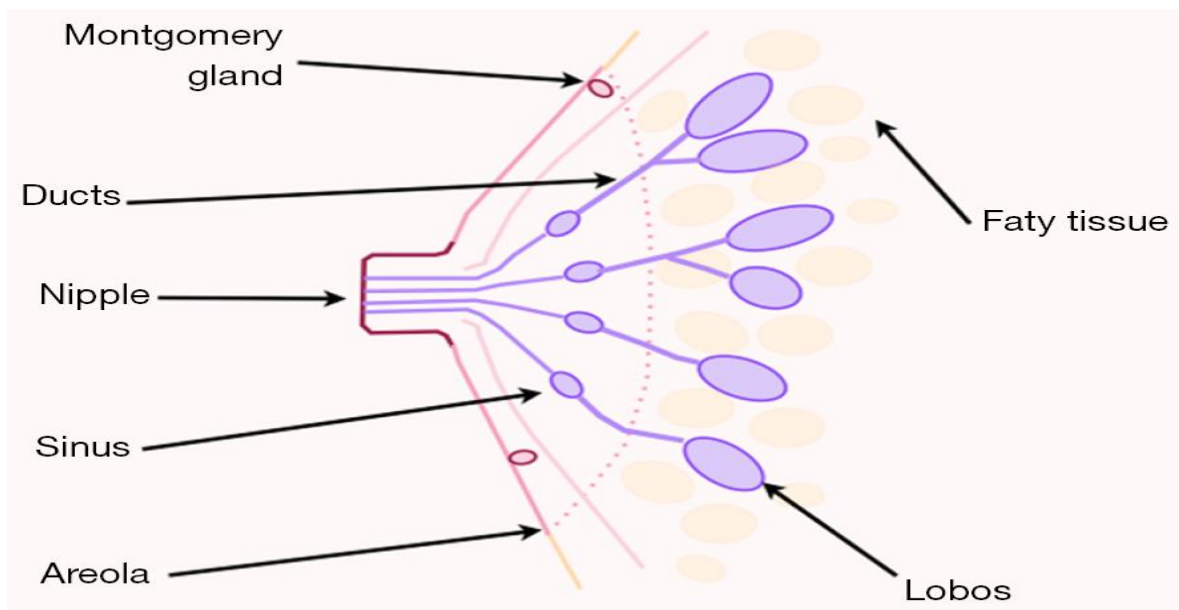
Ο μαστός είναι ένα σύστημα αδένων, που βρίσκονται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα πάνω από τον μείζονα θωρακικό μυ στον οποίο στηρίζεται με την βοήθεια του συνδετικού ιστού. Η λέξη μαστός προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «μάζος». Ονομάζεται συχνά και «μαζικός αδένας»

Βασική λειτουργία του μαστικού αδένα, είναι η παραγωγή και μεταφορά γάλακτος

ΚΥΡΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ(Zucca-Matthes et al., 2016):

- **ΛΟΒΟΙ:** Ο μαστικός αδένας διαθέτει 15-20 αυτόνομους λοβούς, οι οποίοι διατάσσονται ακτινωτά γύρω από την θηλή. Κάθε λοβός αποτελείται από μικρότερα λόβια (αδενικά στοιχεία) και κάθε λόβιο από λοβίδια ή αδενοκυψελίδες. Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή γάλακτος (γαλακτοπαραγωγοί αδένες).
- **ΓΑΛΑΚΤΟΦΟΡΟΙ ΠΟΡΟΙ:** Εδώ κατευθύνεται το γάλα με συσταλτικούς μηχανισμούς (διαμέσου του κυψελιδικού αυλού) και το μεταφέρουν από τα λόβια προς την θηλή. Σε κάθε λοβό αντιστοιχεί ένας γαλακτοφόρος πόρος και διοχετεύεται γάλα προς αυτόν. Μέσω αυτών επικοινωνούν τα λόβια με την θηλή. Ο γαλακτοφόρος πόρος διευρύνεται και σχηματίζει μία μικρή δεξαμενή γάλακτος που ονομάζεται γαλακτοφόρος κόλπος.
- **ΘΗΛΗ ΚΑΙ ΘΗΛΑΙΑ ΑΛΩΣ:** Η θηλή αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες και συνιστά το κεντρικό σημείο του μαστού, από το οποίο εκβάλλουν πόροι (10-20 πόροι ανά θηλή). Η θηλαία άλως βρίσκεται περιφερειακά από την θηλή, παρουσιάζοντας υψηλή συγκέντρωση μελανίνης και διαθέτει αδένες Montgomery (σμηγματογόνοι αδένες) που διεγείρονται και λιπαίνουν την περιοχή κατά τον θηλασμό.
- **ΣΥΝΔΕΣΜΟΙ ΤΟΥ COOPER :** Αποτελεί ένα ινώδες δίκτυο, που συγκροτεί τους λοβούς του μαστού. Ξεκινούν από το δέρμα και φτάνουν στην βαθύτερη περιτονία του θώρακα, καθορίζοντας έτσι το σχήμα του μαστού.
- **ΣΤΡΩΜΑΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ:** αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό, λιπώδη ιστό, αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία.
- **ΛΕΜΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ:** Ο μαστός εκτείνεται από την μασχαλιαία απόφυση προς την μασχάλη. Διαθέτει μασχαλιαίους, παραστέρνιους και υπερκλείδιους λεμφαδένες.

Παρακάτω (Εικόνα 2), παρατίθεται σχηματική απεικόνιση της δομής του μαστού.



ΕΙΚΟΝΑ 2:Σχηματική απεικόνιση της ανατομίας του μαστού (Zucca-Matthes et al., 2016)

Γενικά το μέγεθος και το σχήμα του μαστού διαφέρει από γυναίκα σε γυναίκα. Η δομή του εξαρτάται από την ηλικία, την κληρονομικότητα, την ελαστικότητα δέρματος, το συνολικό σωματικό βάρος και από την επίδραση ορμονών(οιστρογόνα και προγεστερόνη)(Eriksson et al.,2012).

Αδιαμφισβήτητα, η μορφολογία ενός υγιούς μαστού είναι ευδιάκριτα (ανάλογα με την πυκνότητα του μαστού) διαφοροποιημένη από την αντίστοιχη μαστού με καρκίνο. Αυτό συμβαίνει, λόγω της ανάπτυξης και εξάπλωσης των καρκινικών κυττάρων επηρεάζοντας την δομή και τα χαρακτηριστικά του μαστού. Η διάκριση ενός υγιούς έναντι ενός καρκινικού μαστού, έγκειται στην ύπαρξη ορισμένων διακριτών μορφολογικών στοιχείων που παρατηρούνται παρακάτω(Duncan et al., 2022)

Ένας υγιής μαστός, χαρακτηρίζεται από ομαλή αρχιτεκτονική με καλά οργανωμένα τα δομικά της στοιχεία. Τα μαστικά κύτταρα διαθέτουν ομοιογενείς πυρήνες με φυσιολογικό μέγεθος και φυσιολογική έκφραση μορίων μεσεγχυματικής και επιθηλιακής φύσης(κερατίνες 8,18,19 και επιθηλιακά μεμβρανικά αντιγόνα) με ελάχιστη μορφολογική ετερογένεια. Εν αντιθέσει, τα καρκινικά μαστικά κύτταρα παρουσιάζουν αυξημένη μορφολογική ετερογένεια πυρήνων (δυσανάλογα μεγαλύτεροι, ακανόνιστοι), συνύπαρξη κυτταρικής μετάπτωσης επιθηλιομεσεγχυματικού τύπου(EMT- συνύπαρξη επιθηλιακών και μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών) και αυξημένη κυτταρική πύκνωση (Denisov et al., 2017).

1.2.2 ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Υπάρχουν πολυάριθμοι τύποι καρκίνου του μαστού, τους οποίους κατατάσσουμε με 2 γνώμονες: την ιστολογική τους προέλευση και τα μοριακά τους χαρακτηριστικά. Και οι δύο προαναφερθείσες προσεγγίσεις διαθέτουν καίρια σημασία στην σύγχρονη πρόγνωση, διάγνωση και στις θεραπευτικές προοπτικές.

Με βάση την ιστολογική προσέγγιση, που βασίζεται στην μικροσκοπική ανάλυση των κυττάρων και των ιστών, ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας πρότεινε την κατάταξη σε 2 βασικές κατηγορίες : **in situ καρκίνωμα** και **διηθητικό καρκίνωμα**. Η διαφορά έγκειται στον βαθμό διήθησης των καρκινικών κυττάρων και την μεταστατική τους ιδιότητα μέσα στον μαστό. Συγκεκριμένα, στην πρώτη

περίπτωση, τα καρκινικά κύτταρα περιορίζονται εντός των γαλακτοφόρων πόρων ή λοβίων του μαστού με καμία μεταστατική ικανότητα. Στην δεύτερη περίπτωση, τα καρκινικά κύτταρα έχουν διασπάσει την βασική μεμβράνη που οριοθετεί τους γαλακτοφόρους πόρους ή λοβία και έχουν εισχωρήσει σε γειτονικούς ιστούς, επιτρέποντας την μεταστατική ιδιότητα σε γειτονικά όργανα μέσω του λεμφικού συστήματος(Liu et al., 2020). Έτσι, παρατίθενται παρακάτω οι εξής:

- **Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα ή διηθητικό καρκίνωμα του πόρου (Invasive ductal carcinoma, IDC).** Σύμφωνα με τον Gallas(2025) αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 80%.Αναφέρεται στον καρκίνο, που ξεκινά από το επιθήλιο των γαλακτοφόρων πόρων (αγωγοί που μεταφέρουν το γάλα από τους λοβούς παραγωγής γάλακτος στην θηλή) και διαπερνά το τοίχωμα αυτών. Αναπτύσσεται στον λιπώδη ιστό του μαστού και διαθέτει ισχυρή μεταστατική ιδιότητα και με την πάροδο του χρόνου μπορεί να εξαπλωθεί στους λεμφαδένες. Παρόλο που το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μπορεί να προσβάλλει γυναίκες κάθε ηλικίας, πιο συχνά απαντάται σε μεγαλύτερες γυναίκες. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία για τον Καρκίνο, περίπου τα δύο τρίτα των γυναικών που προσβάλλονται από καρκίνο στο μαστό άνω των 55 ετών διαγιγνώσκονται με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη μορφή καρκίνου στο μαστό, μπορεί να εμφανιστεί και σε άνδρες.
- **Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Invasive lobular carcinoma, ILC),**αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου του μαστού, μετά το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα με ποσοστό εμφάνισης 10%.Αναφέρεται στον καρκίνο που ξεκινά από τα γαλακτοπαραγωγά λοβία του μαστού (σημείο παραγωγής γάλακτος και διάχυσης του μέσω των γαλακτοφόρων πόρων στις θηλές)(McCartReed et al., 2021).Το λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα συμπτώματα και ευρήματα και έχει αντικαταστήσει ολόκληρο τον μαστό με μια αδιευκρίνιστη μάζα ή διάχυτη σκληρία στον ιστό του μαστού χωρίς να σχηματίζει τον χαρακτηριστικό συμπαγή όγκο που συνήθως ψηλαφάται σε άλλους τύπους καρκίνου. Είναι συχνά πολυεστιακό (πολλές εστίες στον ίδιο μαστό), πολυκεντρικό(σε πολλαπλά σημεία του μαστού) και αμφοτερόπλευρο (αφορά και τους δύο μαστούς)(McCartReed et al., 2021).

ΕΙΔΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΔΙΗΘΗΤΙΚΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

- 1) **Σωληνώδες καρκίνωμα(tubular),** χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυττάρων που μοιάζουν με σωλήνες στο μικροσκόπιο. Αποτελεί έναν σχετικά σπάνιο τύπο καρκίνου, η συχνότητα του ανέρχεται στο 1,5% των περιπτώσεων. Παρόλο που είναι διηθητικός τύπος καρκίνου, δεν επεκτείνεται εκτός μαστού και για αυτό είναι ο λιγότερο επιθετικός συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους διηθητικού καρκινώματος (Holland et al., 2001).
- 2) **Μυελοειδές καρκίνωμα (medullary breast carcinoma),** αποτελεί έναν σχετικά σπάνιο τύπο καρκίνου μαστού που αντιστοιχεί στο 3-5% του συνόλου των νεοπλασμάτων μαστού. Απαντάται συχνότερα σε γυναίκες σχετικά μικρής ηλικίας 40-50% , που εμφανίζουν μετάλλαξη του γονιδίου BRCA-1. Συνιστά έναν σπάνιο υπότυπο του διηθητικού καρκίνου του πόρου(καρκίνος που ξεκινά στον αγωγό του γάλακτος και εξαπλώνεται πέρα από αυτό). Ονομάζεται «μυελοειδές » καρκίνωμα επειδή ο όγκος είναι μια μαλακή, σαρκώδης μάζα που μοιάζει με τον μυελό των οστών. Τα κύτταρα του μυελοειδούς καρκίνου είναι συνήθως υψηλής ποιότητας στην εμφάνισή τους και χαμηλής ποιότητας στη συμπεριφορά τους. Με άλλα λόγια, μοιάζουν με επιθετικά, πολύ ανώμαλα καρκινικά κύτταρα, αλλά δεν δρουν σαν αυτά. Ο μυελοειδές καρκίνος δεν αναπτύσσεται γρήγορα και συνήθως δεν εξαπλώνεται έξω από το στήθος στους λεμφαδένες. Για

αυτόν τον λόγο, είναι συνήθως πιο εύκολο να αντιμετωπιστεί από άλλους τύπους καρκίνου του μαστού (Malyuchik&Kiyamova, 2008).

- 3) Βλεννώδεις(mucinous) ή κολλοειδείς(colloid) καρκίνωμα**, αποτελεί έναν σπάνιο τύπο καρκίνου που συνιστά το 2-4% του μαστικού καρκινώματος και εμφανίζεται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας (60-70 ετών). Χαρακτηρίζεται από την παραγωγή βλέννης από τα καρκινικά κύτταρα. Συνιστά υπότυπο του διηθητικού καρκινώματος του μαστού και είναι καρκίνος πολύ καλής πρόγνωσης, που αργεί πολύ να δώσει μεταστάσεις στους λεμφαδένες ή σε άλλα όργανα.
Διακρίνεται σε 2 υποτύπους:

- Γνήσιος Βλεννώδης καρκίνος του μαστού, όπου ο καρκινικός ιστός πληρείται με εξωκυττάρια βλέννη σε ποσοστό >90%.
- Μικτού τύπου βλεννώδης καρκίνος του μαστού όπου ο βλεννώδης καρκίνος συνυπάρχει με *in situ* ή με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού που δεν περιέχει βλέννη, το οποίο μπορεί να είναι είτε λοβιακό είτε πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου(Dumitru et al., 2015).

- 4) Νόσος Paget της θηλής του μαστού**, αποτελεί μία σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού κατά την οποία καρκινικά κύτταρα συγκεντρώνονται μέσα ή γύρω από τη θηλή. Ο καρκίνος συνήθως προσβάλλει πρώτα τους πόρους της θηλής (μικρούς σωλήνες που μεταφέρουν το γάλα), στη συνέχεια εξαπλώνεται στην επιφάνεια της θηλής και στην θηλή (τον σκούρο κύκλο του δέρματος γύρω από τη θηλή). Η θηλής συχνά γίνονται φολιδωτές, κόκκινες και ερεθισμένες. Η διάγνωση της νόσου, διαθέτει καίρια σημασία δεδομένου ότι περισσότερο από το 97% των ατόμων με νόσο του Paget έχουν επίσης καρκίνο, είτε DCIS είτε διηθητικό καρκίνο, κάπου αλλού στο μαστό (Hudson-Phillips et al., 2023).

5) Θηλώδες καρκίνωμα (Papillarycarcinoma), αποτελεί ιδιαίτερα σπάνιο υπότυπο διηθητικού καρκινώματος του μαστού που συναντάται σε λιγότερο από 1% των περιπτώσεων. Χαρακτηρίζεται ιστολογικά από την παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων που αναπτύσσονται με τη μορφή προεξοχών που μοιάζουν με "θηλές" μέσα σε κυστικούς χώρους ή δομές. Μπορεί να εμφανίζεται είτε σε μορφή «ενθυλακωμένου» θηλώδους καρκινώματος, όπου οι θηλές αναπτύσσονται μέσα σε κυστικούς χώρους που μοιάζουν με κύστες, είτε ως πιο διηθητική μορφή. Πρωταγωνιστεί σε γυναίκες που βρίσκονται μετά την εμμηνόπαυση. Διακρίνεται από την ευκολία στην διάγνωση καθώς και από την μειωμένη επιθετικότητα του συγκριτικά με άλλους τύπους καρκίνου(Gogoi et al.,2023).

- 6) Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (inflammatory breast cancer)**, αποτελεί μία σπάνια και άκρως επιθετική μορφή καρκίνου του μαστού κατά την οποία καρκινικά κύτταρα διηθούν τον περιβάλλοντα ιστό και τα λεμφαγγεία, προκαλώντας απόφραξη αυτών. Κλινικά παρουσιάζεται σαν εκτεταμένη φλεγμονή στο μαστό, δημιουργώντας οίδημα, πρήξιμο και πάχυνση του δέρματος με την χαρακτηριστική όψη (φλοιού πορτοκαλιού). Οι δερματικές αλλοιώσεις που προκαλούνται θεωρούνται ιδιαίτερα παραπλανητικές, καθώς μοιάζουν με τις συνηθισμένες φλεγμονές ή λοιμώξεις που προκαλούν μαστίτιδα. Αντιπροσωπεύει μόλις το 1-5% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού, προσβάλλει γυναίκες νεότερης ηλικίας, ακόμη και κάτω των 50 ετών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και σε άνδρες, αν και αυτό είναι εξαιρετικά σπάνιο. Η ταχύτητα εξέλιξης του και η επιθετική φύση του καθιστούν την έγκαιρη διάγνωση ζωτικής σημασίας(Dushkin&Cristofanill et al.,2011).

Οι δύο κατηγορίες μη διηθητικού καρκινώματος παρατίθενται παρακάτω:

Το πορογενές καρκίνωμα in situ, γνωστό και ως **ductal carcinoma in situ(DCIS)**, σύμφωνα με τους Bychkovsky(2024), συνιστά μη διηθητική μορφή καρκίνου και χαρακτηρίζεται από την παρουσία καρκινικών κυττάρων, που περιορίζονται εντός των γαλακτοφόρων πόρων(προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα) μη διαθέτοντας την ικανότητα διήθησης και μετανάστευσης σε γειτονικούς ιστούς. Χαρακτηρίζεται από ιστολογικές κατηγοριοποιήσεις επιθετικότητας, βασιζόμενη σε μορφολογικά και κυτταροπυρηνικά χαρακτηριστικά(βαθμός διαφοροποίησης κυττάρων, βαθμός μιτωτικών διαιρέσεων και μεγέθους πυρήνων). Αποτελεί μία προκαρκινική κατάσταση, δηλαδή μία μορφή καρκίνου σε πολύ πρώιμο στάδιο ή οποία δεν είναι απειλητική αν διαγνωστεί έγκαιρα.

Το λοβιακό καρκίνωμα in situ, γνωστό και ως **lobular carcinoma in situ (LCIS)**, προκαλεί αλλοιώσεις στα λοβία του μαστού (γαλακτοπαραγωγός περιοχή). Συνιστά μια προκαρκινική κατάσταση ,δεν θεωρείται τύπος καρκίνου του μαστού, αλλά συγκαταλέγεται στους παράγοντες κινδύνου, εφόσον εντοπιστεί σε βιοψία. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας είναι υψηλός, περίπου 30-40%(Wen&Brogi, 2017).

Σύμφωνα με το ερευνητικό άρθρο των Carvalho et al. (2025) ο καρκίνος του μαστού με βάση τα μοριακά του χαρακτηριστικά κατατάσσεται σε 4 μοριακούς υποτύπους, που έχουν προκύψει με γνώμονα την γονιδιακή έκφραση και την έκφραση βασικών βιοδεικτών (ορμονικοί υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης και υποδοχείς HER2). Συνεπώς οι βασικές κατηγορίες μοριακών υποομάδων μαστικού καρκινώματος είναι οι εξής:

- 1) **Αυλικός τύπος A/Luminal A**
- 2) **Αυλικός τύπος B /Luminal B**
- 3) **Με υπερέκφραση HER2-(HER2-positive)**
- 4) **Τριπλά αρνητικός (Triple-negative)**

Οι μοριακοί υπότυποι Luminal A και Luminal B συνιστούν δύο σημαντικές κατηγορίες καρκίνου του μαστού που βασίζονται στην έκφραση συγκεκριμένων υποδοχέων και βιοδεικτών κυτταρικής διαίρεσης. Αποτελούν τους πιο ετερογενείς υπότυπους.

Οι αυλικοί τύπου A είναι οι συχνότεροι τύποι καρκίνου μαστού (45%) και χαρακτηρίζονται από έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER+) και προγεστερόνης (PR+), καθώς και από υψηλή έκφραση γονιδίων όπως τα LIV1 και CCND1, τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση της οιστρογονικής οδού. Δεν εκφράζουν τον υποδοχέα HER2 (HER2-), και η μετάλλαξη του p53 εμφανίζεται σε ποσοστό 20% συνήθως συνήθως σε όγκους χαμηλής κακοήθειας (grade 1). Αυτοί οι όγκοι χαρακτηρίζονται από χαμηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67) και, ιστολογικά, αντιστοιχούν σε σωληνώδη, ηθμοειδή, λοβιακά, και χαμηλής κακοήθειας πορογενή (NOS) καρκινώματα. Ο υπότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από χαμηλό βαθμό κακοήθειας καθώς τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν υψηλή διαφοροποίηση και μοιάζουν περισσότερο με τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού (Gao et al., 2018).

Οι όγκοι αυλικοί τύπου B αν και μοιράζονται κοινά γονίδια με τους A διαφέρουν σημαντικά από αυτούς και φέρουν μεγαλύτερο αριθμό μεταλλάξεων. Ιστολογικά, τα πορογενή (NOS, Not Otherwise Specified) και τα μικροθηλώδη καρκινώματα ανήκουν στους τύπου B. Είναι νεοπλάσματα υψηλότερου βαθμού κακοήθειας (τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης), με υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki67), χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν έντονη επιθετική συμπεριφορά. Οι όγκοι αυτοί αντιπροσωπεύουν το 10-20% του διηθητικού καρκίνου του μαστού. Παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά έκφρασης των οιστρογονικών υποδοχέων (ER), αν και κατά κανόνα είναι ER-θετικοί (ER+). Επιπλέον, μπορεί να παρουσιάζουν μεταβλητή έκφραση του υποδοχέα HER2 (HER2+/HER2-), ενώ η έκφραση του προγεστερονικού υποδοχέα (PR) συχνά είναι μειωμένη ή και αρνητική (PR +/-). Εξαιτίας του

υψηλού βαθμού υποτροπής που εμφανίζουν καθίσταται δυσκολότερη η πρόγνωση της (Ades et al., 2014).

Συμπερασματικά, παρατηρούνται καίριες διαφορές των 2 τύπων στον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην έκφραση του υποδοχέα HER2, διαφορές αναμφίβολης σημασίας στις θεραπευτικές προσεγγίσεις. Χαρακτηρίζονται ως ορμονοευαίσθητοι και καταλαμβάνουν περίπου το 60% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

Η πρωτεΐνη **HER2** (Human Epidermal growth factor Receptor 2) αποτελεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Κωδικοποιείται από το γονίδιο HER2 και ανήκει στην υπερικογενεία των υποδοχέων επιδερμικών αυξητικών παραγόντων(EGFR). Προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και υπερέκφραση αυτής συνδέεται με την καρκινογένεση στον μαστό. Στην υπερέκφραση αυτής της πρωτεΐνης, στηρίζεται ο HER2 υπερενισχυμένος καρκίνος του μαστού. Αυτός ο τύπος καρκίνου, εμφανίζεται στο 15-20% των περιπτώσεων μαστικού καρκινώματος και βασίζεται στην υπερέκφραση ή πολλαπλή αντιγραφή του γονιδίου HER2 (εναλλακτική ονομασία : CerbB2) το οποίο επάγει την έκφραση του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης, ενεργοποιώντας μονοπάτι ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτη διήθηση, γρήγορη αύξηση και ακραία επιθετική συμπεριφορά. Διαθέτει υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki67), γεγονός που ευθύνεται για τον υψηλό βαθμό κακοήθειας του. Σε αυτήν την περίπτωση δεν εκφράζονται προγεστερονικοί(PR-) και οιστρογονικοί(ER-) υποδοχείς(Garutti et al., 2022).

Ο βασικός τύπος καρκίνου (Basal-like breast cancer, BLBC) γνωστός και ως τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple Negative Breast Cancer – TNBC), χαρακτηρίζεται από επιθετική κλινική συμπεριφορά. Εμφανίζεται σε περίπου 15-20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού, αποτελώντας τον πιο συχνό υποτύπο σε γυναίκες κάτω των 40 ετών. Ξεχωρίζει από τον ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο υποτροπής, μεταστάσεων και ετερογένειας. Χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης των βασικών ορμονικών υποδοχέων, των οιστρογονικών (ER-), των προγεστερονικών(PR-) καθώς και του υποδοχέα HER2(HER2-).Επίσης στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρείται αυξημένη έκφραση του PD-L1(ανοσοδιαφυγή του όγκου.).Το 20% των τριπλά αρνητικών καρκίνων σχετίζονται με κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1/2. Ενώ το 70% των καρκίνων μαστού με μετάλλαξη BRCA1/2, είναι τριπλά αρνητικοί(Dogra et al., 2025).

Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικοί βιοδείκτες που υπάγονται στην παθολογική εξέταση συμβάλλουν στην ακριβέστερη διάγνωση κατά του καρκίνου του μαστού και ανιχνεύονται με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας (IHC), όπου παρατίθενται παρακάτω:

Οι κυτταροκερατίνες, αποτελούν δομικές πρωτεΐνες των επιθηλιακών κυττάρων, συνιστώντας διαγνωστικοί δείκτες του καρκίνου του μαστού, μαρτυρώντας τον επιθηλιακό χαρακτήρα του όγκου. Αναφορικά, το γεγονός αυτό συμβάλλει στην ταυτοποίηση και διάκριση των καρκινωμάτων από άλλους τύπους όγκων (σαρκώματα, μεσεγχυματικά νεοπλασμάτα).

Η πρωτεΐνη EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), αποτελεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης που εντοπίζεται στην επιφάνεια των κυττάρων και ενεργοποιείται από κάποιους αυξητικούς παράγοντες(EGF και TGF-α). Με την ενεργοποίησή του, προωθείται ένας σηματοδοτικός καταρράκτης μονοπατιών (PI3K, Ras-Raf-MAPK, JNK και PLCγ) προάγουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την επιβίωση των κυττάρων, την αγγειογένεση και τη διήθηση όγκου(Rimawi MF et al., 2010).

Η Π-καδερίνη αποτελεί μία πρωτεΐνη, υπεύθυνη για την κυτταρική προσκόλληση και την διατήρηση της δομής του επιθηλιακού ιστού. Φαίνεται ότι, επηρεάζει την μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων επιδρώντας στην διακυτταρική συγκόλληση και ευρύτερα στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μέσα στον όγκο (SridharS et al., 2019)

Έρευνες και αναλύσεις σε πάσχοντες από τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, απέδειξαν την έκφραση βασικών τύπων κυτταροκερατινών (CK5/6, CK14, CK17), καθώς και της πρωτεΐνης EGFR και της Π-καδερίνης. Τα παραπάνω, συνιστούν βασικοί βιοδείκτες για την διάγνωση της νόσου.

1.2.3 ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Υπάρχουν πολυάριθμα συστήματα κατηγοριοποίησης των σταδίων του καρκίνου του μαστού, αλλά το κυριότερο είναι το σύστημα TNM (Cserni et al., 2018). Αναφορικά, αναπτύχθηκε από τον Γάλλο Pierre Denoix μεταξύ 1943-1952, συνεχίστηκε από τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (Union Internationale Contrele Cancer, UICC) το 1950 και πλέον έχει καθιερωθεί σε πολλές χώρες.

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού πραγματοποιείται κυρίως με βάση το διεθνώς αποδεκτό σύστημα **TNM (Tumor-Node-Metastasis)**, όπως έχει καθοριστεί από το **American Joint Committee on Cancer (AJCC)**. Το σύστημα αυτό αξιολογεί το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T), την εμπλοκή των λεμφαδένων (N) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). (Teichgraeber et al., 2021):

T (Tumor) : Αναφέρεται στο μέγεθος και την εξάπλωση του όγκου. Για τον ακριβή προσδιορισμό της παραμέτρου, την θέτουμε σε υποκατηγορίες, όπου:

- T1 : όγκος μικρότερος από 2 εκ.
- T2 : όγκος μεταξύ 2 και 5 εκ.
- T3 : μεγαλύτερος από 5 εκ.
- T4 : όταν ο όγκος διηθεί το δέρμα ή τους μυς.

Αύξηση του αριθμού σημαίνει αύξηση του μεγέθους του όγκου.

N (Node) : Περιγράφει την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να προσβάλλουν τους σύστοιχους μασχαλιαίους αδένες του μαστού. Αποτελεί δείκτη απεικόνισης της κατάστασης των λεμφαδένων.

Για τον ακριβή προσδιορισμό της, διακλαδίζεται η παράμετρος σε επιμέρους, όπου:

- N0 : δεν ψηλαφούνται λεμφαδένες στη μασχάλη
- N1 : ψηλαφητοί αλλά κινητοί.
- N2 : Ψηλαφητοί αλλά καθηλωμένοι.
- N3: ψηλαφητοί μασχαλιαίοι και ύποπτοι υποκλείδιοι λεμφαδένες ή ψηλαφητοί μασχαλιαίοι λεμφαδένες και από την άλλη μεριά ή ύποπτοι έστω μαστικοί λεμφαδένες.

Αύξηση του αριθμού σημαίνει αύξηση της συμμετοχής των επιχώριων λεμφαδένων.

M (Metastasis): Αφορά την μεταστατική ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένους ιστούς . Έτσι, ανάλογα με την ύπαρξη ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων, διατίθεται διαφοροποίηση σε M0: Απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (η ύπαρξη διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων δεν θεωρείται απομακρυσμένη μετάσταση)

M1 : απομακρυσμένες μεταστάσεις

Οι παραπάνω παράμετροι, χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την εξέλιξη του καρκίνου και η κατάταξη του σε κάποια από αυτές είναι αναντίρρητης σημασίας τόσο στην πρόγνωση, όσο και στις θεραπευτικές προσεγγίσεις. Το στάδιο της νόσου, καθορίζει την έκβαση του ασθενούς, αντανakλώντας τον βαθμό επιθετικότητας του.

Σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης TNM, δηλαδή την κατάταξη του όγκου με γνώμονα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αυτού, των γειτονικών ιστών και της μεταστατικής του ικανότητας, κατηγοριοποιείται ο καρκίνος του μαστού σε 4 στάδια (Rosen&Sapraetal., 2025) :

- 1) **Στάδιο 0** : Τα καρκινικά κύτταρα, περιορίζονται αποκλειστικά στους γαλακτοφόρους πόρους ή λοβία, μη παρουσιάζοντας διηθητική ικανότητα σε γειτονικούς ιστούς. Σε αυτό, κατατάσσεται το πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS) και το λοβιακό καρκίνωμα in situ (LCIS) – μη διηθητικά καρκινώματα. Σε αυτό το στάδιο, περιλαμβάνονται τύποι καρκινώματος που εντοπίζονται στο σημείο προέλευσης τους και χαρακτηρίζονται από μικρή επιθετικότητα.
- 2) **Στάδιο I** : Διαχωρίζεται σε 2 υποκατηγορίες: Στάδιο IA και Στάδιο IB.

Στο στάδιο IA : Το μέγεθος του όγκου φτάνει έως 2cm(0,2mm-2mm)με μηδενική μεταστατική ικανότητα στους λεμφαδένες.

Στο στάδιο IB : Το μέγεθος του όγκου, φτάνει εξίσου στα 2cm(0,2mm-2mm) αλλά τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ελάχιστη μεταστατική ενεργότητα σε μικρό αριθμό λεμφαδένων.

Το καρκίνωμα ασθενούς, που βρίσκεται στο σημείο αυτό ονομάζεται από το σύστημα TMN ως T1N0M0.

- 3) **Στάδιο II** : Διαχωρίζεται σε 2 υποκατηγορίες : Στάδιο IIA και Στάδιο IIB

- **Στο στάδιο IIA** : Το μέγεθος του όγκου είναι είτε μέχρι 2cmκαι ο όγκος διαθέτει μεταστατική ικανότητα στους μαστικούς λεμφαδένες(T0/T1N1M0), είτε μέγεθος μεγαλύτερο του 2cm και μικρότερο των 5cm (2-5cm), μη παρουσιάζοντας μεταστατική ικανότητα(T2N0M0).
- **Στο στάδιο IIB**: Το μέγεθος του όγκου είναι είτε μεγαλύτερο του 2cm και μικρότερο των 5cm (2-5cm) προσβάλλοντας τους μαστικούς λεμφαδένες(T2N1M0), είτε το μέγεθος του όγκου είναι μεγαλύτερο των 5cm, μη προσβάλλοντας τους λεμφαδένες(T3N0M0).

- 4) **Στάδιο III**: Ο όγκος στο στάδιο αυτό, θεωρείται τοπικά προχωρημένος. Διαχωρίζεται σε 3 υποκατηγορίες: Στάδιο IIIA,IIIB,IIIC.

- **Στάδιο IIIA**: Χαρακτηρίζεται από όγκο οποιουδήποτε μεγέθους, προσβάλλει μεγαλύτερο αριθμό λεμφαδένων συγκριτικά με τα προηγούμενα στάδια (στάδιο I και II), οι οποίοι συμψύονται μεταξύ τους και με γειτονικούς ιστούς(T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0 και T3N2M0)
- **Στάδιο IIB** : Χαρακτηρίζεται εξίσου από όγκους οποιουδήποτε μεγέθους. Ο όγκος στο στάδιο αυτό, έχει προσβάλλει το θωρακικό τοίχωμα (προσβεβλημένοι θωρακικοί

λεμφαδένες), έχει εισβάλλει στο δέρμα χωρίς ωστόσο να παρουσιάζονται προχωρημένες μεταστάσεις.

- **Στάδιο IIC:** Θεωρείται ο τοπικά πιο προχωρημένος τύπος καρκίνου, πριν την μετάσταση (στάδιο IV), διότι έχει διασπαρθεί σε πολλούς λεμφαδένες και περιβάλλοντες ιστούς. Στο σημείο αυτό, ο όγκος εμφανίζεται σε οποιοδήποτε μέγεθος και παρουσιάζεται πως έχει επεκταθεί και έχει αλλοιώσει το θωρακικό τοίχωμα και το δέρμα. Κλινικά, εμφανίζονται φλεγμονές και έλκη στο μαστό. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν υψηλή μεταστατική ικανότητα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι έχουν διηθήσει πέραν από τους 10 λεμφαδένες της μασχάλης, Συγκεκριμένα, κάνουν την εμφάνιση τους στους μασχαλιαίους λεμφαδένες επιπέδου I και II, στους υποκλείδιους λεμφαδένες, στους έσω μαστικούς λεμφαδένες και στους υπερκλείδιους λεμφαδένες.

5) Στάδιο IV : Θεωρείτε το τελικό και συνάμα πιο επιθετικό στάδιο κατάταξης καρκίνου του μαστού σύμφωνα με το σύστημα κατηγοριοποίησης TNM. Θεωρείται μεταστατικό στάδιο. Περιλαμβάνει όγκους οποιουδήποτε μεγέθους, με υψηλό βαθμό διήθησης, δηλαδή διασποράς στην πλειοψηφία των λεμφαδένων και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων σε όργανα εκτός του μαστού όπως πνεύμονες, εγκέφαλο, ήπαρ.

Αναμφίβολα το σύστημα TNM για την κατάταξη του καρκίνου του μαστού ενέχει καίρια θέση, συνιστώντας ένας σαφές και μετρήσιμος γνώμονας στην πρόγνωση και στις θεραπευτικές προοπτικές αντιμετώπισης του. Αποτελεί την ραχοκοκαλιά της σταδιοποίησης του μαστικού καρκινώματος, προσφέροντας δυνατότητες ακριβής σταδιοποίησης του με χαρακτηριστική βαθμίδωση επιθετικότητας, διευκολυμένης πρόγνωσης, θεραπευτικού σχεδιασμού καθώς επίσης παρέχει στο επιστημονικό δυναμικό την ύπαρξη κοινής γλώσσας που αφορά την εξέλιξη του καρκίνου, αναντίρρητης σημασίας στην ανταλλαγή πληροφοριών και γνώσεων αναμεταξύ της επιστημονικής κοινότητας(Koh&Kim et al., 2022).

1.2.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού, βρίσκεται στην επικαιρότητα των συζητήσεων θέτοντας σε κοινό στρατόπεδο, σύσσωμη την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, μπρος την αντιμετώπιση του. Αποτελεί, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας παγκοσμίως, επηρεάζοντας εκατομμύρια γυναίκες κάθε χρόνο. Παρόλο που έχει σημειωθεί μία αξιοθαύμαστη επιστημονική πρόοδος, η οποία διαφαίνεται στην ανακάλυψη βελτιωμένων μεθόδων πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας, ο καρκίνος του μαστού εκδηλώνει καθημερινά την κακοήθεια του αποτελώντας την συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες.

Σύμφωνα με τον **Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας(World Health Organization)**, καταγράφηκαν συγκεκριμένα επιδημιολογικά δεδομένα για τα ποσοστά του καρκίνου του μαστού.

- Το **2012**, μετρήθηκαν 1.655.589 περιστατικά καρκίνου του μαστού

- Το **2018**, εμφανίστηκαν παγκοσμίως 18.078.957 περιπτώσεις καρκίνου και 9.555.027 θάνατοι οφειλόμενοι σε αυτούς. Σημειώθηκαν ωστόσο 2.069.792 περιστατικά καρκίνου του μαστού. Αποτέλεσε το 3% των περιπτώσεων καρκίνου με ποσοστό θνησιμότητας 1.5%.
- Το **2020**, το επιστημονικό δυναμικό επιστράτευσε τις δυνάμεις του ώστε να φτάσει στα εξής πορίσματα: Καταγράφηκαν 10 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως ή 1 στους 6 θανάτους που οφείλονταν σε καρκίνο. Από αυτούς, σημειώθηκαν 2.260.000 θάνατοι από τον καρκίνο του μαστού. Την ίδια χρονιά, προτάθηκε ότι καρκίνος στις γυναίκες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, αφήνει καταστροφικές επιπτώσεις στην επόμενη γενιά. Μια μελέτη του 2020 από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο υποδηλώνει ότι με περίπου 4,4 εκατομμύρια γυναίκες που πέθαναν από καρκίνο το 2020, σχεδόν 1 εκατομμύριο παιδιά έμειναν ορφανά από καρκίνο, το 25% των οποίων οφειλόταν στον καρκίνο του μαστού.
- Το **2022**, έρευνες που διεξήχθησαν παρουσίασαν 2.300.000 γυναίκες που διαγνώστηκαν με την νόσο καθώς και 670.000 θάνατοι παγκοσμίως.
- Το **2024**, αποδείχθηκε ότι καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή μορφή καρκίνου παγκοσμίως, με περίπου 2,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα κάθε χρόνο. Αντιπροσωπεύει 1 στις 8 περιπτώσεις καρκίνου και στα δύο φύλα και το ένα τέταρτο όλων των καρκίνων στις γυναίκες, με το 70% της θνησιμότητας να εμφανίζεται σε περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους.
- Το **2040**, αναμένεται ένας αριθμός περιστατικών της τάξης των 2.778.850. Τα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου του μαστού συναγωνίζονται έντονα τα αντίστοιχα στον καρκίνο του πνεύμονα.

Οι παγκόσμιες εκτιμήσεις αποκάλυψαν σημαντικές ανισότητες αναλογικά του δείκτη της ανθρώπινης ανάπτυξης (μετρά την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη μιας χώρας, αποτελώντας δείκτης μέτρησης της ευημερίας και ανάπτυξης των χωρών). Συγκεκριμένα, σε χώρες με υψηλό δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης, 1 στις 12 γυναίκες θα διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού κατά την διάρκεια της ζωής της και 1 στις 71 γυναίκες θα πεθάνει από αυτόν. Αντίθετα, σε χώρες με χαμηλό δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης ενώ μόνο 1 στις 27 γυναίκες διαγιγνώσκεται με καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της, 1 στις 48 γυναίκες θα πεθάνει από αυτόν. Ακόμη, τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης στις χώρες υψηλού εισοδήματος υπερβαίνουν το 90%, σε σύγκριση με 66% στην Ινδία και 40% στη Νότια Αφρική. Σημαντική στόχευση αποτελεί η γεφύρωση των ανισοτήτων στα αποτελέσματα του καρκίνου του μαστού με μείωση της εμφάνισης του κατά 2,5% ετησίως, η οποία σε μία περίοδο 20 ετών θα σώσει περίπου 2,5 εκ ζωές. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ξεκίνησε την Παγκόσμια Πρωτοβουλία για τον Καρκίνο του Μαστού (GBCI) το 2021 χρονολογώντας την περάτωση αυτής μέχρι το 2040.

Ωστόσο, η εμφάνιση του καρκίνου, παρουσιάζει φυλετικές διαφορές. Καταγράφηκε το 99% των περιπτώσεων σε γυναίκες και 0,5-1% σε άνδρες.

Σημαντικό τονιστεί θεωρείται η ύπαρξη διαφορών εμφάνισης καρκίνου του μαστού αναμεταξύ των χωρών. Η ανακάλυψη αυτή, στάθηκε αφορμή για ανάγκη ποσοτικής αναζήτησης των διαφορών αυτών. Έτσι λοιπόν, ερευνητικά δεδομένα έδειξαν τα εξής αποτελέσματα:

Στην **Αμερική**, εμφανίστηκαν 3.791.517 περιπτώσεις καρκίνου και 1.371.024 θάνατοι(2018). Αριθμήθηκαν 458.539 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 12,2% με ποσοστό θνησιμότητας 7,3%.

Στην **Αφρική**, εμφανίστηκαν 811.138 περιπτώσεις καρκίνου και 533.877 θάνατοι(2018) Αριθμήθηκαν 124.119 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 15,3% με ποσοστό θνησιμότητας 10,5%.

Στην **περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου**, εμφανίστηκαν 676.508 περιπτώσεις καρκίνου και 418.955 θάνατοι (2018). Αριθμήθηκαν 119.106 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 17,7% με ποσοστό θνησιμότητας 11,6%.

Στην **Ευρώπη**, εμφανίστηκαν 4.573.972 περιπτώσεις καρκίνου και 2.144.253 θάνατοι(2018). Αριθμήθηκαν 562.568 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 12,3% με ποσοστό θνησιμότητας 7,0%.

Στην **περιοχή της Νοτιοανατολικής Ασίας**, εμφανίστηκαν 2.003.789 περιπτώσεις καρκίνου και 1.336.026 θάνατοι(2018). Αριθμήθηκαν, 270.401 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 13,5% με ποσοστό θνησιμότητας 9,7%.

Στην **περιοχή του Δυτικού Ειρηνικού Ωκεανού**, εμφανίστηκαν 6.218.238 περιπτώσεις καρκίνου και 3.748.973 θάνατοι (2018). Αριθμήθηκαν, 535.059 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε ποσοστό 8,8% με ποσοστό θνησιμότητας 3,8%.

Τέλος, μία σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού, φέρεται να είναι η ηλικία, καθώς ο κίνδυνος εμφάνισης αυξάνεται με το γήρας του ατόμου. Οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, αυξάνονται με την ηλικία. Αναλυτικότερα:

- Στα **20** έτη: περίπου 0,06% (1 στις 1732 γυναίκες)
- Στα **30** έτη: περίπου 0,44% (1 στις 228 γυναίκες)
- Στα **40** έτη: περίπου 1,45% (1 στις 69 γυναίκες)
- Στα **50** έτη: περίπου 2,3% (1 στις 43 γυναίκες)
- Στα **60** έτη: περίπου 3,49% (1 στις 29 γυναίκες)
- Στα **70** έτη: περίπου 3,84% (1 στις 26 γυναίκες)

Επιπλέον, το 80% των καρκίνων διαγιγνώσκεται σε άτομα άνω των 55 ετών, και το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας και κρουσμάτων παρατηρείται στις ηλικίες 65+ και 75+ ετών.

Συνοψίζοντας, η επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού δείχνει μια σημαντική συχνότητα νόσου με αυξανόμενη επίπτωση σε σχέση με το παρελθόν, έντονη ηλικιακή εξάρτηση και γεωγραφικές διαφορές. Οι πολυάριθμες συνιστώσες, που επηρεάζουν τον βαθμό εμφάνισης και εξέλιξης της νόσου, διαθέτουν καίρια σημασία στην πρόγνωση, διάγνωση και θεραπευτικές προοπτικές.

1.2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού θεωρείται αναπόσπαστης σημασίας για την αναχαίτιση και αντιμετώπιση της νόσου. Απαιτείται να πραγματοποιηθεί έγκαιρα και με ακρίβεια από ένα σύνολο εξειδικευμένου ιατρικού δυναμικού. Η ακρίβεια της διάγνωσης επιτρέπει την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Η σωστή διάγνωση του καρκίνου του μαστού είναι θέμα ιατρικής ομάδας όπου αρχικά πρωταγωνιστούν ο μαστολόγος και ο ακτινολόγος του μαστού. Σε δεύτερο στάδιο, καθίσταται πολύτιμη η συμβολή του κυτταρολόγου ή παθολογοανατόμου, οι οποίοι θα μελετήσουν εργαστηριακά (μικροσκοπικά) τον χαρακτήρα των υπό απομόνωση καρκινικών κυττάρων ή ιστών (Heetal., 2020). Η διάγνωση, αποτελεί το πρώτο βήμα μιας σειράς εξετάσεων που οδηγούν στον προσδιορισμό του σταδίου της νόσου (σταδιοποίηση), ώστε να σχεδιαστεί το κατάλληλο θεραπευτικό πλάνο. Όσο νωρίτερα διαγνωστεί ο καρκίνος, τόσο καλύτερη είναι η πρόγνωση με μεγαλύτερες πιθανότητες επιβίωσης. Η σωστή διάγνωση απαιτεί εμπειρία και εξειδίκευση, καθώς η λανθασμένη διάγνωση μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερήσεις που επηρεάζουν αρνητικά την έκβαση της νόσου. Συνοπτικά, η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση του καρκίνου του μαστού είναι καθοριστική για την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου, τη βελτίωση της επιβίωσης, και τη διατήρηση της ποιότητας ζωής των ασθενών (He et al., 2020).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι διαγνωστικής προσέγγισης του καρκίνου του μαστού, οι οποίοι μπορούν να ληφθούν ταυτόχρονα, προκαθορίζοντας την ακρίβεια της.

Αρχικά, ένα σημαντικό και εύκολο εργαλείο για την ανίχνευση του καρκίνου του μαστού συνιστά η αυτοεξέταση (Moore et al., 1978), η οποία λαμβάνεται από την ίδια την γυναίκα. Συνιστάται να πραγματοποιείται κάθε μήνα μετά την ηλικία των 18 ετών. Ως καταλληλότερο διάστημα, υλοποίησης της διαδικασίας, προτείνεται λίγες μέρες μετά την λήξη της έμμηνου ρύσεως, ώστε οι μαστοί να είναι πιο μαλακοί και ανώδυνοι (σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας) και σε σταθερές μέρες (σε γυναίκες σε περίοδο εμμηνόπαυσης). Η εξέταση ξεκινά απέναντι από τον καθρέπτη παρατηρώντας τους μαστούς οπτικά για αλλαγή στην μορφολογία τους, το χρώμα, την υφή του δέρματός τους ή του μεγέθους τους (ο ένας μαστός ποτέ δεν είναι ίδιος με τον άλλο) τοποθετώντας τους ώμους και την πλάτη σε ευθεία θέση και τα χέρια στους γοφούς. Έπειτα, πρέπει να ανυψωθούν τα χέρια πάνω από το κεφάλι και να επαναληφθεί ο έλεγχος. Στην συνέχεια, η γυναίκα πρέπει να ξαπλώσει και να χρησιμοποιήσει το δεξί χέρι για να ψηλαφίσει τον αριστερό μαστό, και μετά το αριστερό χέρι για να ψηλαφίσει το δεξί μαστό. Με τα δάχτυλά ενωμένα και επίπεδα, συνεχίζει την ψηλάφηση με σταθερή πίεση, ακολουθώντας κυκλική πορεία ολόκληρο το μαστό από πάνω προς τα κάτω, από τη μία πλευρά στην άλλη, από την κλείδα έως και το πάνω μέρος της κοιλιάς, και από τη μασχάλη σας έως το σημείο διαχωρισμού των δύο μαστών. Τέλος, πρέπει να το ξανακάνει σε όρθια η καθιστή θέση και να ψηλαφίσει τον μαστό με επανάληψη των ίδιων κινήσεων

Αποτελεί, ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι της διάγνωσης καθώς επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση αλλαγών και ενεργοποιεί τις γυναίκες που αυτοεξετάζονται για πιο άμεση ιατρική φροντίδα. Ωστόσο, δεν υποκαθιστά πιο εξακριβωμένες ιατρικές μεθόδους καθώς και έχουν παρατηρηθεί λάθη στην λήψη του τελικού διαγνωστικού συμπεράσματος, βασιζόμενο στην ψυχολογία και αυθυποβολή των γυναικών στην νόσο.

Το πρώτο και βασικό βήμα, για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού αποτελεί η κλινική εξέταση μέσω ψηλάφησης του μαστού και των περιοχών γύρω από αυτόν (μασχάλες, λαιμός) από εξειδικευμένο γιατρό με σκοπό την ανίχνευση ύποπτων συμπτωμάτων (μαστικές μάζες- εξογκώματα στον μαστό ή στην περιοχή της μασχάλης, αλλαγές στην υφή του δέρματος όπως- ζάρες, πάχυνση-ερυθρότητα, εκροή υγρών- αιματηρή ή οροαιματηρή παθολογική έκκριση, αλλοίωση του χρώματος, αναστροφή ή αλλαγή στην κατεύθυνση της θηλής). Αυτός ο τύπος διάγνωσης, λαμβάνεται συνδυαστικά με άλλες απεικονιστικές εξετάσεις που θα αναφερθούν στην συνέχεια (μαστογραφία,

υπερηχογράφημα, MRI) ή βιοψίας, λαμβάνοντας υπόψη και το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς για κατάλληλη επιλογή. Θεωρείται αναγκαίος και απαραίτητος. Αναφορικά, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι δεν αντικαθιστά την προληπτική απεικονιστική διάγνωση, αλλά την συμπληρώνει, καθώς ορισμένοι καρκίνοι μπορεί να είναι μη ψηλαφητοί σε πρώτο στάδιο.

Απεικονιστικές Μέθοδοι διάγνωσης :

1)Μαστογραφία: Αποτελεί την βασική ακτινολογική απεικονιστική εξέταση των μαστών. Απεικονίζει ανατομικές και μορφολογικές αλλοιώσεις του μαστού, που ανιχνεύονται με χρήση μικρής δόσης ακτίνων Χ(ακίνδυνη) . Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (περίπου 75-90%) και ειδικότητα (90-95%) στην ανίχνευση αλλοιώσεων στον μαστό, ιδιαίτερα σε γυναίκες άνω των 40-50 ετών. Ο βέλτιστος χρόνος για τον προληπτικό μαστογραφικό έλεγχο είναι μεταξύ 7ης και 12ης ημέρας του εμμηνορρησιακού κύκλου. Διακρίνεται σε 3 είδη ανάλογα με την μέθοδο: I) Αναλογική Μαστογραφία II) Ψηφιακή Μαστογραφία III) Γαλακτογραφία. Οι πρώτες δύο διαφέρουν στην απεικονιστική τεχνολογία και η τρίτη εστιάζει με εξαιρετική διάυγεια στην εσωτερική δομή των γαλακτοφόρων αδένων του μαστού. Η Ψηφιακή μαστογραφία αποτελεί την συνηθέστερη, καθώς έχει περίπου 30-40% λιγότερη ακτινοβολία σε σχέση με την κλασική αναλογική. Ακόμη, διαχωρίζεται σε 2 είδη ανάλογα με τον σκοπό και τις συνθήκες διεξαγωγής της: την προληπτική που στοχεύει στον έλεγχο ασυμπτωματικών ατόμων σε τακτική βάση και την διαγνωστική, η οποία υλοποιείται στο πλαίσιο διερεύνησης συγκεκριμένων συμπτωμάτων. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε γυναίκες άνω των 50 ετών, αλλά λιγότερο αξιόπιστη σε πυκνούς μαστούς (νεαρότερες γυναίκες) (Hendersonetal., 2024).

2)Υπερηχογράφημα μαστών (US) : Σύμφωνα με τον Xue(2023) αποτελεί μία συμπληρωματική εξέταση της μαστογραφίας, που λαμβάνει χώρα μετά από αυτή. Θεωρείται μία ανώδυνη, μη επεμβατική και ασφαλή διαγνωστική εξέταση που αξιοποιεί τη χρήση ηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας. Πρόκειται για μία εξαιρετικά αξιόπιστη μέθοδο που επιτρέπει την απεικόνιση της δομής, της υφής και των επιμέρους στοιχείων του μαστικού αδένα. Η εξέταση συμβάλλει στον εντοπισμό και την αξιολόγηση παθολογικών αλλοιώσεων, όπως κύστες, συμπαγείς όγκοι και φλεγμονώδεις καταστάσεις, με υψηλή διαγνωστική ακρίβεια. Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία 80–89% και ειδικότητα 34–88%. Το υπερηχογράφημα μαστών είναι χρήσιμο σε γυναίκες όλων των ηλικιών και συνιστάται σε πολλές περιπτώσεις, ανάλογα με τις κλινικές ενδείξεις και το ιστορικό της ασθενούς:

- Σε νεαρές γυναίκες με πυκνούς μαστούς, όπου η μαστογραφία μπορεί να μην είναι διαγνωστική.
- Σε γυναίκες που εμφανίζουν συμπτώματα όπως: Πόνους στον μαστό, ψηλαφητές μάζες, έκκριση υγρού από την θηλή
- Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και του θηλασμού, καθώς το υπερηχογράφημα δεν περιλαμβάνει ακτινοβολία.
- Ως συμπληρωματική μέθοδος σε ύποπτα ευρήματα της μαστογραφίας και για τακτικό προληπτικό έλεγχο σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

Η πορεία της διαδικασίας είναι η εξής :

Η εξεταζόμενη τοποθετείται σε ύπτια θέση σε εξεταστικό κρεβάτι, με τα χέρια ανυψωμένα πάνω από το κεφάλι για καλύτερη πρόσβαση στους μαστούς. Ο ιατρός εφαρμόζει ένα διαφανές τζελ στην επιφάνεια των μαστών, το οποίο βοηθά στη μετάδοση των ηχητικών κυμάτων και χρησιμοποιεί έναν ειδικό αισθητήρα (ηχοβολέα) για να σαρώσει απαλά την περιοχή. Οι εικόνες μεταφέρονται σε οθόνη

σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την άμεση αξιολόγηση και καταγραφή των ευρημάτων. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε περίπου 10-20 λεπτά, χωρίς καμία ενόχληση για την εξεταζόμενη.

3)Μαγνητική τομογραφία μαστών(MRI): Σύμφωνα με τους Shah et al.(2009) αποτελεί μια απεικονιστική εξέταση, η οποία χρησιμοποιεί μαγνητικά πεδία και ραδιοκύματα για την δημιουργία λεπτομερών εικόνων των ιστών του μαστού. Η χρήση της ενδείκνυται νέες γυναίκες αυξημένου κινδύνου(με διαγνωσμένη γονιδιακή μετάλλαξη BRCA1 & 2 που ξεκινάνε νωρίς το screening μαστών και που λόγω ηλικίας δεν μπορούν να υποβληθούν σε μαστογραφία), σε γυναίκες με πολύ «πυκνούς» μαστούς όπου η μαστογραφία έχει περιορισμένη διαγνωστική αξία, στην περαιτέρω εκτίμηση ύποπτων μαστογραφικών ή υπερηχογραφικών ευρημάτων, στην εκτίμηση πολυεστιακότητας ενός διαγνωσμένου όγκου και σε γυναίκες με ενθέματα σιλικόνης καθώς είναι η μόνη μέθοδος για να αναδείξει πιθανή ρήξη του ενθέματος (διαφυγή σιλικόνης).

Η καλύτερη περίοδος για να υποβληθεί κανείς σε Μαγνητική Τομογραφία μαστών είναι μεταξύ της 7ης και 14ης μέρας του κύκλου. Αυτή η εξέταση, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή διότι παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν τον ασθενή σε μια μη αναγκαία χειρουργική επέμβαση. Βασικό αποτρεπτικό μειονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί το υψηλό του κόστος (οχταπλάσιο της μαστογραφίας). Η διαδικασία περιλαμβάνει την χορήγηση ενδοφλεβίως ειδικού σκιαγραφικού και την καταγραφή εικόνων πριν και μετά την χορήγηση του. Ανάλογα με την ταχύτητα που κάποιο ογκίδιο προσλαμβάνει και αποβάλλει το σκιαγραφικό απεικονίζεται μια καμπύλη γραφική παράσταση. Ο καρκίνος έχει καμπύλη τύπου 3, δηλαδή προσλαμβάνει και αποβάλλει το σκιαγραφικό πιο γρήγορα από ότι ο υγιής μαστός. Χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ευαισθησία (86,9%) και είναι πιο ακριβής στην μέτρηση του όγκου συγκριτικά με τις προαναφερθείσες τεχνικές. (Orlando et al., 2024).

7) Ψηφιακή τομοσύνθεση μαστών(DBT): Θεωρείται παρόμοια εξέταση με την ψηφιακή μαστογραφία με διαφορά ότι δεν λαμβάνει μόνο μια εικόνα αλλά πολλαπλές εικόνες σε τρισδιάστατη διαμόρφωση(3D) για την απεικόνιση του μαστού, χρησιμοποιώντας ακτίνες Χ. Πραγματοποιείται είτε μετά την ψηφιακή μαστογραφία ή παράλληλα. Σύμφωνα με τον αμερικανικό οργανισμό φαρμάκων (FDA), τομοσύνθεση συμπληρώνει την ψηφιακή μαστογραφία για καλύτερα αποτελέσματα στη διάγνωση. Συνιστά νέα μέθοδο που αυξάνει την ευαισθησία σε σύγκριση με τη συμβατική μαστογραφία (DBT: 88% ευαισθησία έναντι 79% της μαστογραφίας)

Φυσικά, έχουν αναπτυχθεί και κάποιες συμπληρωματικές απεικονιστικές τεχνικές που εφαρμόζονται σε ειδικές περιπτώσεις (όπως: σπινθηρογράφημα, PET/CT, ελαστογραφία, θερμογραφία)

Η ιστολογική εξέταση της υπό διερεύνηση παθολογίας του μαστού, αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της τεκμηρίωσης της νόσου. Μέσα από βιολογικές και κυτταρολογικές αναλύσεις, δύνανται να εξεταστούν ύποπτες κακοήθειες μικροσκοπικά και να καθοριστεί η παρουσία ή μη καρκίνου, περιλαμβάνοντας την λήψη ιστού ή καρκινικών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή, ονομάζεται βιοψία και έπεται των παραπάνω κλινικών και απεικονιστικών μεθόδων, καθώς βοηθούν στο να αξιολογηθεί αν μία ύποπτη βλάβη έχουν χαρακτηριστικά που καθιστούν αναγκαία την βιοψία. Με λίγα λόγια, αποτελεί το τελικό βήμα σε μία τριπλή αξιολόγηση για την διάγνωση καρκίνου του μαστού. Η βιοψία μαστού είναι μια διαδικασία κατά την οποία λαμβάνεται δείγμα ιστού από τον μαστό για εξέταση. Το δείγμα ιστού αποστέλλεται στο εργαστήριο, όπου γίνεται ειδική ανάλυση με σκοπό την κατηγοριοποίηση της βλάβης σε καλοήγη ή κακοήγη. (Chong et al., 2019).

Η βιοψία του καρκίνου του μαστού, διενεργείται με 2 τρόπους (Baldwin, 2010):

- **Διαδερμικά:** τοπική αναισθησία και ελάχιστη τομή, οπότε λαμβάνεται δείγμα από την αλλοίωση.
- **Χειρουργικά :** αναισθησία και μεγαλύτερη τομή, όπου εξαιρείται ολόκληρη η αλλοίωση

Η διαδερμική βιοψία, υλοποιείται χωρίς χειρουργική τομή με χρήση ειδικής βελόνας, η οποία διαμέσου μίας μικρής δερματικής τομής εισάγεται άμεσα στο σημείο της βλάβης, από το οποίο λαμβάνονται δείγματα ιστού ή κυττάρων. Διενεργείται στο ιατρείο, με χρήση τοπικής αναισθησίας. Χαρακτηρίζεται από υψηλή διαγνωστική ακρίβεια (υψηλή ευαισθησία 98%).

Η χειρουργική βιοψία, υλοποιείται με γενική αναισθησία και απαιτεί την χειρουργική αφαίρεση της ύποπτης αλλοίωσης και αποστολή της για βιοψία. Αφορά συνήθως σε μη ψηλαφητές μαστογραφικές ή υπερηχογραφικές αλλοιώσεις. Για τη διενέργειά της, προηγείται η σήμανση της βλάβης με κατάλληλο συρμάτινο οδηγό, ώστε η εκτομή να περιορίζεται αυστηρά στην αλλοίωση και όχι τους πέριξ ιστούς. Ο συρμάτινος οδηγός τοποθετείται είτε υπό μαστογραφική καθοδήγηση, σε αλλοιώσεις μαστογραφικές όπως οι μικροαποτιτανώσεις, είτε υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση σε αλλοιώσεις που είναι ορατές στον υπέρηχο ή ακόμη και σε μαγνητικό τομογράφο για τις αντίστοιχες αλλοιώσεις που δεν αναδεικνύονται σε καμία άλλα εξέταση. Τελευταία, χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές σήμανσης αντί του συρμάτινου οδηγού, όπως με χρωστικές ή ραδιοϊσότοπο. Λαμβάνει χώρα σε περιπτώσεις όπου η διαδερμική βιοψία είναι ανεπαρκής(TianH et al., 2024)

Η βιοψία του μαστού, διενεργείται με διάφορες τεχνικές που εξαρτώνται από το μέγεθος και την θέση του υποψήφιου όγκου. Ως πιο επικρατούσες, παρουσιάζονται οι εξής :

- 1) **Κυτταρολογική Βιοψία- Βιοψία με αναρρόφηση λεπτής βελόνας (Fine Needle Aspiration-FNA):** Χρήση λεπτής βελόνας που προσαρμόζεται σε μια σύριγγα και επιτρέπει την αναρρόφηση κυττάρων από την ύποπτη περιοχή του μαστού. Είναι η λιγότερο επεμβατική και πραγματοποιεί γρήγορη εκτίμηση σε ψηλαφητές μάζες (Kettritz et al.,2011).
- 2) **Βιοψία διά κόπτουσας βελόνας(Core Needle Biopsy - CNB) :** Χρήση βελόνας μεγαλύτερης διαμέτρου από την παραπάνω για την λήψη δείγματος ιστού, το οποίο εξετάζεται μικροσκοπικά για να διαγνωστεί η φύση της βλάβης (καλοήθεια ή κακοήθεια). Διενεργείται σε ψηλαφητές ή μη μάζες ύστερα από υπερηχογραφική καθοδήγηση. Η διαφορά με την FNA, έγκειται στην διάμετρο της βελόνης που χρησιμοποιείται καθώς και στο γεγονός ότι καθίσταται απαραίτητη η τοπική αναισθησία και η μικρή τομή. Μελετάτε ιστολογικό υλικό (Parker, 1994).
- 3) **Στερεοτακτική Βιοψία :** Δεν απαιτείται γενική αναισθησία. Είναι ελάχιστα επεμβατική και καθίσταται απαραίτητη για την διάγνωση μη ψηλαφητών όγκων (μικροαποτιτανώσεις, ανωμαλίες μη ανιχνεύσιμες στον υπέρηχο ή στην κλινική εξέταση). Υλοποιείται με τοπική αναισθησία, κάνοντας μικρή τομή όπου εισάγεται μικρή βελόνα σε αναρρόφηση υπό κενό.(Versaggi et al., 2025).
- 4) **Ανοιχτή χειρουργική βιοψία :** Αποτελεί την τελευταία έκβαση της βιοψίας, που υλοποιείται όταν οι υπόλοιπες βιοψίες δεν είναι διαγνωστικά επαρκείς. Απαιτείται χειρουργική αφαίρεση ολόκληρης της ύποπτης κακοήθειας.

Τέλος, για την περάτωση της διαγνωστικής διαδικασίας, λαμβάνονται υπόψιν 2 πολύ σημαντικοί παράμετροι: Ο **μοριακός χαρακτηρισμός του όγκου** και ο **γενετικός έλεγχος**. Ο μοριακός χαρακτηρισμός του όγκου, ορίζεται από την έκφραση σημαντικών δεικτών και υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα όπως υποδοχείς οιστρογόνων (ER), προγεστερόνης (PR) και πρωτεΐνης HER2. Έτσι ανάλογα της παρουσίας ή απουσίας αυτών διαμορφώνεται ο τύπος του όγκου και συνεπώς μπορεί να σχεδιαστεί ένα εξατομικευμένο για τον εκάστοτε όγκο

θεραπευτικό πλάνο. Με βάση τον μοριακό χαρακτήρα, διατίθενται 3 κατηγορίες όγκων κατά της οποίες κατέχουμε διαφορετικό θεραπευτικό τρόπο. Έχουμε όγκους, που είναι θετικοί σε οιστρογονικούς ή προγεστερονικούς υποδοχείς (ER/ PR) – ορμονοεξαρτώμενοι όγκοι, αντιμετωπίζονται με ορμονοθεραπεία, τον HER2 καρκίνο που αντιμετωπίζεται με αντι-HER2 φάρμακα και τον τριπλό αρνητικό με ιδιαίτερα δύσκολη θεραπευτική αντιμετώπιση. Ο γενετικός έλεγχος, βασίζεται στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε γονίδια υψηλού κινδύνου (BRCA1 και BRCA2), αποτελώντας γονίδια που σχετίζονται με αυξημένη προδιάθεση για την ανάπτυξη του μαστικού καρκινώματος (Honrado et al., 2005).

Εύλογο συμπέρασμα, μπορεί να αποτελέσει το γεγονός ότι τόσο ο μοριακός χαρακτηρισμός όσο και η αναζήτηση του γενετικού προφίλ στον πάσχοντα αποτελούν κρίσιμα κομμάτια αναπόσπαστου επιστημονικού ενδιαφέροντος προς τον αγώνα πλήρους ίασης του καρκίνου του μαστού, προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο για την δημιουργία στοχευμένης και εξατομικευμένης θεραπείας.

1.2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Παράγοντας κινδύνου είναι οτιδήποτε θα μπορούσε να επηρεάσει τις πιθανότητες ανάπτυξης μιας ασθένειας όπως ο καρκίνος. Οι διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν και διαφορετικούς παράγοντες κινδύνου. Παρόλο που επηρεάζουν την καρκινογένεση, δεν συνδέονται άμεσα με την εμφάνιση της και δεν οδηγούν υποχρεωτικά στην εκδήλωση της νόσου. Ως υποστήριξη του παραπάνω ισχυρισμού, παρουσιάζεται το γεγονός ότι οι περισσότερες γυναίκες που έχουν έναν ή και περισσότερους κινδύνους ανάπτυξης καρκίνου μαστού τελικά δε νοσούν, ενώ άλλες που δεν έχουν προφανείς λόγους, εκδηλώνουν τη νόσο. Ακόμη λοιπόν και εάν μία γυναίκα έχει παράγοντες κινδύνου για να αναπτύξει καρκίνο του μαστού είναι δύσκολο να πούμε με βεβαιότητα εάν και πόσο αυτοί οι παράγοντες θα συντελέσουν στην εμφάνιση της νόσου. Ωστόσο, η γνώση των παραμέτρων αυτών θεωρείται αναπόσπαστης σημασίας, καθώς ενεργοποιεί την ευσυνειδησία των γυναικών για τακτικούς προληπτικούς ελέγχους, ενθαρρύνει την ευαισθητοποίηση των γυναικών για προφύλαξη της ατομικής τους υγείας και συνεχή ενημέρωση και επιτρέπει την εκτίμηση του ατομικού κινδύνου και συνεπώς την λήψη εξατομικευμένης θεραπείας και ιατρικής παρακολούθησης (Li et al., 2025).

Ως προκαθορισμένοι εκ γενετής παράγοντες κινδύνου του μαστού, θεωρούνται οι εξής:

- 1) **Φύλο:** το γυναικείο φύλο από μόνο του αποτελεί παράγοντα κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου μαστού, δεδομένου ότι οι γυναίκες έχουν 100 φορές περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν τη νόσο συγκριτικά με τους άντρες (KashyapD et al., 2022).
- 2) **Ηλικία:** Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται με την ηλικία, με τους περισσότερους καρκίνους να εκδηλώνονται στις γυναίκες μετά την ηλικία των 50 που έχουν ήδη μπει στο στάδιο της εμμηνόπαυσης. Σύμφωνα με στοιχεία του NHS (Εθνικό Σύστημα Υγείας της Αγγλίας), 8 στις 10 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού συμβαίνουν σε γυναίκες άνω των 50 ετών (Sun YS et al., 2017).
- 3) **Κληρονομικότητα-γενετικές μεταλλάξεις:** Θεωρείται ότι το 5-10% των καρκίνων του μαστού οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2, που αυξάνουν μέχρι και κατά 80%

τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η μετάλλαξη στο γονίδιο BRCA2, εμφανίζει μικρότερο ποσοστό κινδύνου ανάπτυξης της νόσου, περίπου στο 45%. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά, φέρεται να επηρεάζουν την ανάπτυξη καρκίνου και στους δύο μαστούς ιδιαίτερα σε γυναίκες. Αναφορικά, έχει αποδειχθεί πως γυναίκες με κληρονομούμενες μεταλλάξεις, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης άλλων καρκίνων (συνήθως καρκίνο των ωοθηκών) (Sun YS et al., 2017)

- 4) **Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού:** Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού εμφανίζεται αυξημένος σε γυναίκες με συγγενείς πρώτου και δεύτερου βαθμού είχαν νοσήσει και ιδιαίτερα σε μικρή ηλικία. Αν μία γυναίκα έχει έναν κοντινό συγγενή(πρώτου βαθμού) που έχει νοσήσει τότε παρατηρήθηκε πως διπλασιάζεται η πιθανότητα εμφάνισης μαστικού καρκινώματος και αν έχει δύο συγγενείς τότε πενταπλασιάζεται η πιθανότητα. Ωστόσο, έχει φανεί πως πάνω από το 85% των γυναικών που νοσούν από καρκίνο του μαστού δεν έχουν κανένα «βεβαρημένο» οικογενειακό ιστορικό(Sun YS et al., 2017).
- 5) **Προσωπικό ιστορικό καρκίνου μαστού:** Έχει σημειωθεί σε πολλαπλές περιπτώσεις πως μία γυναίκα που έχει νοσήσει με καρκίνο του μαστού στο παρελθόν, έχει αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης μιας νέας μορφής καρκίνου στον άλλο μαστό ή σε άλλο μέρος στον ίδιο μαστό(3-4 φορές στην διάρκεια της ζωής τους).
- 6) **Φύλο και εθνότητα:** Οι λευκές γυναίκες παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, αλλά οι αφροαμερικανίδες υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας από την νόσο καθώς και την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε ηλικία κάτω των 45 ετών (KashyapD et al., 2022).
- 7) **Πυκνότητα μαστών:** Οι μαστοί συνίστανται από λιπώδη, ινώδη και αδενικό ιστό. Εάν μία γυναίκα διαγνωστεί στη μαστογραφία με «πυκνούς μαστούς» σημαίνει πως έχει περισσότερα ινώδη και αδενικά στοιχεία στο μαστό της και λιγότερο λίπος. Οι γυναίκες με πυκνούς μαστούς έχουν 1,2 με 2 φορές περισσότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου μαστού συγκριτικά με τις γυναίκες με λιγότερο πυκνούς μαστούς. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την πυκνότητα του μαστού είναι η ηλικία, η ηλικία της εμμηνόπαυσης, η ορμονική υποκατάσταση, η εγκυμοσύνη και τα γονίδια(KashyapD et al., 2022).

Ως επίκτητοι ή περιβαλλοντικά και συμπεριφορικά τροποποιήσιμοι παράγοντες, που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης μαστικού καρκινώματος, παρουσιάζονται οι παρακάτω:

1) Ορμονικοί παράγοντες: Η λήψη ορμονικής θεραπείας μετά την εμμηνόπαυση, περιλαμβάνει την λήψη ορμονών (οιστρογόνων και προγεστερόνης συνδυαστικά), που φέρεται να έχει ανακουφήσει την γυναίκα από τα έντονα συμπτώματα της εμμηνόπαυσης(Hulka et al., 2001).Ωστόσο, έρευνες έχουν δείξει ότι η ακολούθηση ορμονοθεραπείας, έχει αυξήσει σημαντικά τα επίπεδα κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού ενώ έχει αύξηση ταυτόχρονα τα επίπεδα θνητότητας από την ασθένεια. Ακόμη, η λήψη αντισυλληπτικών χαπιών δια του στόματος, φαίνεται να έχει αυξήσει εξίσου τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, ο κίνδυνος φαίνεται να υποχωρεί όταν διακόπτεται η λήψη των αντισυλληπτικών χαπιών και να επανέρχεται στα ποσοστά που ισχύουν για τις γυναίκες που δεν έχουν λάβει ποτέ αντισυλληπτικά, 10 χρόνια μετά τη διακοπή τους. Η χορήγηση ορμονών θεωρείται υποψήφιος παράγοντας αύξησης της πιθανότητας παθογένειας, καθώς οι ορμόνες διεγείρουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μαστικών κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις αυτών με επακόλουθη επαγωγή της καρκινογένεσης(Sun et al., 2017).

2)Θηλασμός: Μελέτες έχουν δείξει ότι ο θηλασμός μειώνει σημαντικά τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, απέδειξαν ότι για κάθε 12 μήνες θηλασμού ο κίνδυνος μειώνεται κατά 4-4,5% σε σύγκριση με γυναίκες που δεν θήλασαν και η μείωση είναι αθροιστική και

ανάλογη τόσο της διάρκειας του θηλασμού όσο και του αριθμού των παιδιών που θήλασαν. Η προστασία αποδίδεται σε ορμονικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την διάρκεια του θηλασμού (καθυστέρηση της επανόδου της εμμηνόρροιας, η μείωση της συνολικής έκθεσης στα οιστρογόνα, και ο κυτταρικό θάνατος μαστικών κυττάρων), που δρουν επικουρικά στην απομάκρυνση κατεστραμμένων κυττάρων και μειώνουν την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης σε αυτά. Ακόμη, μία πρόσφατη μελέτη του Qiu(2023) συσχετίζει τον θηλασμό με τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου, αποδεικνύοντας πως θηλασμός συνδέεται με μία συνολική μείωση υποτροπής κατά 30% του καρκίνου του μαστού μεταξύ των γυναικών που είχαν διαγνωστεί με καρκίνο μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς. Τέλος, ο αμυντικός του ρόλος στην νόσο διαφαίνεται τόσο από τα αποτελέσματα μιας τελευταίας έρευνας, όπου σύμφωνα με την οποία ο θηλασμός φάνηκε να βελτίωσε τα αποτελέσματα των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο μαστού με θετικούς οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς, χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki67), και δείκτη Her2 αρνητικό. Έτσι λοιπόν, ο θηλασμός θεωρείται ένα ακροσήμαντο όπλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού μέσα από κυτταρικές και ορμονικές τροποποιήσεις που επιδρούν πλεονεκτικά έναντι της καρκινογένεσης.

3) Κατανάλωση Αλκοόλ: Η κατανάλωση αλκοόλης αυξάνει την συγκέντρωση ορμονών (ιδιαίτερα οιστρογόνων) που σχετίζονται με τον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει το ποσοστό μεταλλαξιγένεσης, σημαντικής πηγής καρκινογένεσης. Αυτό, αιτιάζεται σε μεγάλο βαθμό στην ύπαρξη ακεταλδεύδης από τον μεταβολισμό της αλκοόλης στο ήπαρ(μέσω του ενζύμου ADH).Η ουσία αυτή εμφανίζει αυξημένη τοξικότητα, προκαλώντας οξειδωτικό στρες και γενετικές βλάβες στα φυσιολογικά κύτταρα, διαταράσσοντας έτσι τον φυσιολογικό αριθμό κυτταρικής διαίρεσης στον οργανισμό, ευνοώντας την καρκινογένεση. Αναφορικά, έχει αποδειχθεί πως σε άτομα με γονιδιακές παραλλαγές επηρεάζεται η λειτουργία του ενζύμου ADH, οδηγώντας σε υπεραύξηση ακεταλδεύδης, γεγονός που επάγει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε μεγαλύτερο βαθμό. Με γνώμονα κλινικά περιστατικά, ο κίνδυνος αυξάνεται με την ποσότητα και την διάρκεια κατανάλωσης αλκοόλ (García-Sancha et al., 2025).

4) Παχυσαρκία/ αυξημένο σωματικό βάρος (ειδικά μετά την εμμηνόπαυση): Το πόσο παχύσαρκο είναι ένα άτομο, το μετράμε με τον δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index – BMI= βάρος του ατόμου σε κιλά/το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα). Ο λιπώδης ιστός στα παχύσαρκα άτομα, παράγει υψηλά ποσοστά οιστρογόνων (διεγείρουν την εμφάνιση ορμονοεξαρτώμενων μορφών καρκίνου). Ακόμη, η παχυσαρκία αποτελεί αιτία εμφάνισης οξειδωτικού στρες ευνοώντας έτσι την μεταλλαξιγένεση. Φυσικά, η αντίσταση στην ινσουλίνη και οι μεταβολικές διαταραχές που το συνοδεύουν, ιδιαίτερα μετά την εμμηνόπαυση, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Ακόμη, οι ερευνητές θεωρούν πως τα λιπώδη κύτταρα σε διαφορετικές περιοχές του σώματος εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά και ίσως αυτό να εξηγεί τη διαφοροποίηση του κινδύνου ανάλογα με την κατανομή του λίπους. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση λίπους στην περιοχή της μέσης επιδρά περισσότερο στην ανάπτυξη του καρκίνου συγκριτικά με το λίπος στους γλουτούς και στους μοιρούς. Έτσι η φυσική δραστηριότητα, που δύναται να καταπολέμηση την παχυσαρκία θεωρείται παράγοντας καίριας σημασίας για την καρκινογενετική καταστολή(Eichholzer et al.,2013).

Αναφορικά, υπάρχουν και κάποιοι ασαφείς και αρκετά αμφιλεγόμενοι παράγοντες, που δίνουν ακόμη ερωτηματικά στην επίδραση τους στον καρκίνο του μαστού. Μερικοί εξ αυτών είναι η διατροφή και πρόσληψη θρεπτικών, η περιβαλλοντική ρύπανση, το κάπνισμα και η βραδινή εργασία (García-Sancha et al., 2025).

1.2.7 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Αναπόσπαστο όπλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, όσο πιο έγκαιρα διαγνωστεί, αποτελεί η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων που θα στοχεύουν εξειδικευμένα στον τύπο μαστικού καρκίνου της πάσχουσας. Αποτελεί κρίσιμη διαδικασία, που στοχεύει στην αφαίρεση ή καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και στην μείωση της πιθανότητας υποτροπής ή μετάστασης της νόσου. Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού πρέπει και μπορεί να είναι εξατομικευμένη και βασίζεται σε διάφορους παράγοντες (τύπος καρκίνου, βαθμός ιστολογικής κακοήθειας, παρουσία ορμονικών υποδοχέων, παρουσία HER2 πρωτεΐνης, στάδιο, γενική κατάσταση υγείας της γυναίκας). Χρησιμοποιούνται σήμερα πέντε θεραπευτικές μέθοδοι, που έχουν περάσει την δοκιμασία του χρόνου και έχουν αποδειχθεί ευεργετικές και αρκετά αποτελεσματικές στις περισσότερες περιπτώσεις. Οι θεραπευτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι οι εξής :η χειρουργική, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία και η στοχευμένη γονιδιακή θεραπεία και η ανοσοθεραπεία (NCI).

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ : Θεωρείται η πιο εγκαθιδρυμένη, αρχαιότερη μορφή στοχεύοντας τοπικά στον όγκο. Περιλαμβάνει 2 βασικούς τύπους επεμβάσεων : τη μαστεκτομή και την ογκεκτομή. Επιλέγεται όταν ο όγκος εμφανίζεται μόνο στο στήθος, χωρίς να παρουσιάζονται μεταστάσεις. Αποτελεί τοπική θεραπεία και χαρακτηρίζεται από την αφαίρεση του όγκου τοπικά. Η διάκριση στις παραπάνω κατηγορίες γίνεται με γνώμονα το μέγεθος του όγκου. Συγκεκριμένα, αν ο όγκος είναι μικρότερος από 3cm αναφερόμαστε σε ογκεκτομή ενώ αν ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 3cm είτε αν υπάρχουν περισσότερες καρκινικές εστίες τότε καταλήγουμε σε μαστεκτομή. Η τελευταία αναφέρεται σε αφαίρεση ολόκληρου του μαστού ή του μεγαλύτερου μέρους του. Χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες : θεραπευτική, προληπτική και παρηγορητική μαστεκτομή. Ανάλογα με τον αριθμό των μαστών που αφαιρούνται διατίθενται 2 κατηγορίες: ολική και διπλή(Yi et al., 2025).

Η θεραπευτική μαστεκτομή, εφαρμόζεται όταν ο όγκος χαρακτηρίζεται από μεγάλη έκταση και όταν υπάρχουν πολυάριθμοι όγκοι σε διαφορετικά μέρη του μαστού καθώς διατήρηση του μαστού σε τοπικά μέρη που εδράζονται δεν μπορεί να υλοποιηθεί. Εφαρμόζεται με καθαρισμό των λεμφαδένων της μασχάλης για μεταστατικό έλεγχο. Χωρίζεται σε 2 κατηγορίες: την ολική και την μερική μαστεκτομή. Κατά την ολική, αφαιρείται ολόκληρος ο μαστός ενώ κατά την μερική αφαιρείται ένα μέρος του μαστού και μέρος υγιούς ιστού. Η ολική μαστεκτομή διαθέτει 2 κατηγορίες: την απλή μαστεκτομή και την ριζική/τροποποιημένη μαστεκτομή. Στην πρώτη, πραγματοποιείται αφαίρεση του μαστού χωρίς αφαίρεση λεμφαδένων μασχάλης ενώ στην δεύτερη λαμβάνει χώρα και ο καθαρισμός των μασχαλιαίων λεμφαδένων που αποτελεί το πρώτο σημείο μετάστασης. Η μερική, διακρίνεται σε 2 κατηγορίες : την ευρεία αφαίρεση του όγκου και την τεταρτεκτομή. Στην πρώτη αφαιρείται ο όγκος μαζί με ένα τμήμα υγιούς ιστού ενώ στη δεύτερη αφαιρείται το ¼ του όγκου. Η κατηγορία αυτή, λέγεται αλλιώς και ογκεκτομή (Storm-DickersonT et al., 2019).

Η προληπτική/προφυλακτική μαστεκτομή λέγεται επίσης και υποδόρια δηλαδή αφαιρείται ο μαστός κάτω από το δέρμα. Πραγματοποιείται πριν παρουσιαστεί καρκίνος, ώστε να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης του ιδιαίτερα σε γυναίκες με αυξημένη προδιάθεση (παρουσίαση γενετικών μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1/BRCA2, οικογενειακό ιστορικό για την εμφάνιση της νόσου, διαγνωσμένος καρκίνος στο ένα στήθος – αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή) (Hartmann et al., 2001). Η παρηγορητική μαστεκτομή, υλοποιείται σε γυναίκες που πάσχουν από προχωρημένο στάδιο καρκίνου,

παρουσιάζοντας έντονες μεταστάσεις και στοχεύει είτε στην αφαίρεση του όγκου ώστε να μην δημιουργηθεί ανοιχτή πληγή (εξέλκωση) είτε στην μείωση του όγκου η εμφάνιση του οποίου καταστέλλει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπευτικής προσέγγισης σε απομακρυσμένες μεταστάσεις (Yi et al., 2025).

ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ: Αποτελεί μία προσπάθεια καταστροφής καρκινικών κυττάρων ή πιθανών υπολειμμάτων καρκινικών κυττάρων, με χρήση υψηλής ιονίζουσας ακτινοβολίας (ακτίνες Χ). Η δράση της, υπάγεται στην δημιουργία βλαβών στο DNA των καρκινικών κυττάρων μέσω ιονισμού (μέσω της δημιουργίας ελευθέρων ριζών υδροξυλίου). Οι ρίζες αυτές, προκαλούν κυτταρικό θάνατο (απόπτωση) ή αδυναμία περαιτέρω κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αξιοποιείται, όταν γίνεται μερική μαστεκτομή ή ογκεκτομή και ακτινοβολείται ο μαστός που απομένει. Στις περιπτώσεις που ο όγκος είναι ανεγχείρητος, 3^{ου} σταδίου, πολύ μεγάλου μεγέθους, κολλημένος στο θωρακικό τοίχωμα, στο δέρμα ή φλεγμονώδη και αποσκοπεί στη σμίκρυνση του όγκου (υποσταδιοποίηση) για την δυνατότητα να αφαιρεθεί αργότερα χειρουργικά. Εφαρμόζεται για τον έλεγχο του πόνου όταν υπάρχουν μεταστάσεις στα οστά. Σε μεταστατικές εστίες του δέρματος, του μεσοθωρακίου, των λεμφαδένων του λαιμού, ή των μασχαλών και τέλος μετά τη μαστεκτομή σε τοπικά προχωρημένη νόσο και με εκτεταμένη λεμφαδενική διασπορά στη μασχάλη. Ο σκοπός της ακτινοθεραπείας είναι η χορήγηση της βέλτιστης δόσης ακτινοβολίας στον όγκο-στόχο, με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της δόσης στους γύρω υγιείς φυσιολογικούς ιστούς. (Henríquez-Hernández, 2011). Παρόλη την καινοτομία της μεθόδου έχει αποδειχθεί σύμφωνα με διεθνή μελέτη που δημοσιεύθηκε στο New England Journal of Medicine ότι η ακτινοθεραπεία στην οποία υποβάλλονται οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού αυξάνει τον κίνδυνο εμφράγματος ή καρδιοπάθειας και ότι ο κίνδυνος προκύπτει πέντε έτη περίπου μετά την έκθεση στην ακτινοβολία και διαρκεί για είκοσι έτη τουλάχιστον, ενώ αυξάνεται ανάλογα με την δοσολογία της ακτινοβολίας που δέχεται η καρδιά. Ακόμη, η έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία επάγει πολυάριθμα προβλήματα. Ο κάθε άνθρωπος, διαθέτει εξιδανικευμένο όριο υπέρβασης μέγιστης δόσης στην ακτινοβολία αυτή, οπότε δεν μπορεί να μετρηθεί το ποσό της ιονίζουσας ακτινοβολίας που θα διαθέσει μεν βέλτιστα αποτελέσματα δε δεν θα προκαλέσει βλάβες σε γειτονικούς υγιείς ιστούς του ανθρώπου. Ακόμη, οι ιονίζουσες ακτίνες που χρησιμοποιούνται δεν είναι δυνατόν να ελεγχθούν 100%, ώστε η δράση τους να περιορισθεί μόνο στον κακοήγη όγκο. Ακτινοβολούνται λοιπόν και υγιείς ιστοί που βρίσκονται κοντά στην περιοχή του στόχου. Όταν ο όγκος βρίσκεται στο μαστό, οι ακτίνες μπορεί να βλάψουν τους πνεύμονες, το δέρμα τον οισοφάγο ή την καρδιά. Ωστόσο, οι επιστήμονες ανακάλυψαν το πρόβλημα μέσω της επαναστατικής τεχνολογικής εξέλιξης μηχανημάτων για περιορισμό της ακτινοβολίας τοπικά (Thomsen et al., 2021).

Ανάλογα την κατηγορία του καρκίνου προτείνονται διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Όσο αφορά την αντιμετώπιση του τριπλά αρνητικού καρκίνου (Triple-Negative Breast Cancer, TNBC), βασική αντιμετώπιση συνιστά η χρήση χημειοθεραπείας με συνδυασμό φαρμάκων όπως ανθρακυκλίνες, ταξάνες κυκλοφοφωσφαμίδη και πλατινούχων φαρμάκων (σισπλατίνη, καρβοπλατίνη). Ακόμη στην περίπτωση αυτών, που υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη PD-L1 πραγματοποιείται ανοσοθεραπεία (pembrolizumab) συνδυαστικά με sacituzumabgovitican, ένα αντίσωμα-φαρμακοσυνδεδεμένο φάρμακο. Ακόμη, προτάθηκε η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένα με anti-HER2 είτε αντιμετώπιση με PARP αναστολείς (olaparib, talazoparib) σε ασθενείς με μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 ή BRCA2. Φυσικά δεν υπάρχουν πάντα βιολογικοί

δείκτες που να επιτρέπουν την στοχευμένη θεραπεία πέρα των PARP αναστολέων και ή τους PD-L1 θετικούς όγκους (Al-Mahmood S et al., 2018).

Σχετικά με θεραπευτικές προτάσεις για τους Luminal A και Luminal B, θεωρούνται ορμονοευαίσθητοι και συνεπώς συστήνεται η ορμονοθεραπεία όπως αναλύεται παρακάτω. Στον δεύτερο, στάθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική η προσθήκη CDK4/6 αναστολέων, οι οποίες μπλοκάρουν το υπερενεργό μονοπάτι κυτταρικού πολλαπλασιασμού που χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο μοριακό υπότυπο. Ακόμη, απεδείχθει ο ιδιαίτερα αποτελεσματικός συνδυασμός ορμονοθεραπείας με προσθήκη φαρμάκων (Palbociclib/Ribociclib) (Rugo HS et al., 2025).

Τέλος, για την πλήρη ίαση του HER2+ υπερενισχυμένου καρκίνου του μαστού, ανεξάρτητα αν είναι ορμονοεξαρτώμενος ή όχι χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση του HER2+, κυρίαρχη θέση στον ρόλο αυτό διαδραματίζει η χρήση αντι-HER2 φαρμάκων όπως trastuzumab, pertuzumab, T-DM1, T-DXd συνδυαστικά με χημειοθεραπεία για βέλτιστα αποτελέσματα ή με ορμονοθεραπεία αν είναι ορμονοευαίσθητος (καθορίζεται από την παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων ή προγεστερόνης) (Palbociclib/Ribociclib) (Rugo HS et al., 2025).

Παρακάτω αναλύονται διεξοδικά οι κύριες μέθοδοι θεραπευτικών προσεγγίσεων:

ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ: Χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του καρκίνου με εξειδικευμένα φάρμακα (κυταροτοξικά) που στοχεύουν στην εξουδετέρωση των κυττάρων ενός κακοήθους όγκου, αλλά και των καρκινικών κυττάρων που έχουν ξεφύγει ή που μπορεί να έχουν ξεφύγει από τον όγκο και κυκλοφορούν στο αίμα ή βρίσκονται εγκατεστημένα σε άλλους ιστούς. Τα φάρμακα αυτά, καταστρέφουν τα κύτταρα με διάφορους μηχανισμούς που διαφέρουν από φάρμακο σε φάρμακο. Επηρεάζει τα κύτταρα που διαιρούνται με ταχείς ρυθμούς (κύτταρα αιμοποιητικού, κύτταρα πεπτικού) και όσο πιο έντονος είναι αυτός ο ρυθμός τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα προσβολής από τα φάρμακα αυτής της θεραπείας. Επειδή η θεραπεία αυτή χαρακτηρίζεται από κυτταρική αδιακρισία, η αποτυχία της αποδίδεται στο χαρακτηριστικό αυτό δηλαδή στην προσβολή και καταστροφή και των υγιών/φυσιολογικών κυττάρων. Χορηγείται ενδοφλεβίως αλλά υπάρχουν και κάποια χημειοθεραπευτικά φάρμακα σε μορφή χαπιού για χορήγηση από το στόμα. Τα περισσότερα ενδοφλέβια χημειοθεραπευτικά φάρμακα βλάπτουν τις μικρές φλέβες των χεριών. Σε ασθενής που δεν διαθέτουν καλές φλέβες, τοποθετείται μία ειδική συσκευή (portcath ή κώδωνας ενδοφλέβιας έγχυσης). Ανάλογα με τον τύπο καρκίνου και το στάδιο, χορηγείται ο ασθενής σε ένα σύνολο φαρμάκων που συνιστά το θεραπευτικό σχήμα, κατά το οποίο Όσο πιο επιθετικός μοιάζει ο καρκίνος, τόσο βαρύτερο είναι. Δρουν είτε κυταροτοξικά, καταστέλλοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα αλλά και ορισμένα φυσιολογικά (παρενέργειες), εμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση ή την σύνθεση DNA ή RNA, προκαλούν βλάβες στο DNA ή αναστέλλουν συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου οδηγώντας σε απόπτωση και τελικά στην μείωση του όγκου (Amjad et al., 2023).

ΟΡΜΟΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ : Τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν ορμονικούς υποδοχείς (οιστρογονικούς και προγεστερονικούς), στους οποίους συνδέονται οι αντίστοιχες για αυτούς ορμόνες που παράγονται από την θηλυκή αναπαραγωγική περιοχή (ωοθήκες), επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και θρέφοντας συνεπώς τον καρκίνο του μαστού. Ο τύπος καρκίνου στην περίπτωση αυτή, λέγεται ορμονοευαίσθητος. Εκμεταλλευόμενη, λοιπόν την ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων να είναι ορμονοευαίσθητα, η επιστημονική κοινότητα ανέπτυξε θεραπευτικές προοπτικές δημιουργώντας

την ορμονοθεραπεία. Η θεραπεία αυτή, συνίσταται στο μπλοκάρισμα ή στην μείωση της δράσης αυτών των ορμονών στα καρκινικά κύτταρα με σκοπό να περιοριστεί η ανάπτυξη τους, επιτυγχάνεται με την χρήση μίας ομάδας φαρμάκων και χορηγείται στη μεταστατική νόσο, ως εισαγωγική (induction) και προεγχειρητική (neo-adjuvant) θεραπεία, ως συμπληρωματική (adjuvant) αγωγή και τέλος ως προφύλαξη (prevention) από ανάπτυξη καρκίνου μαστού σε ορμονοευαίσθητο καρκίνο. Η ορμονοθεραπεία είναι μια μορφή αντινεοπλασματικής θεραπείας που χορηγείται με επιτυχία στα ορμονοευαίσθητα κακοήγη νεοπλάσματα. Στην μεταστατική νόσο, όπου ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στον οργανισμό η ορμονοθεραπεία ελέγχει την νόσο, επιβραδύνοντας την εξέλιξη της. Η εισαγωγική και προεγχειρητική θεραπεία στοχεύει στην μείωση του όγκου πριν την χειρουργική επέμβαση, ώστε η τελευταία να υλοποιηθεί πιο αποτελεσματικά. Σαν συμπληρωματική αγωγή, συστήνεται η ορμονοθεραπεία μετά την χειρουργική αφαίρεση του όγκου ώστε να μειωθεί η πιθανότητα υποτροπής του μαστικού καρκινώματος. Ακόμη, χρησιμοποιείται και ως μέθοδος προφύλαξης σε γυναίκες που εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού. Αυτό το είδος θεραπείας, αποτελεί ένα ευέλικτο όπλο που διέπεται από την αφαίρεση ή καταστολή της παραγωγής ορμονών με πολυάριθμες προσεγγίσεις. Αρχικά, προτείνεται η χειρουργική αφαίρεση των ωθηκών με ωθηκεκτομή ώστε να μειώσει την έκκριση των ορμονών, εμποδίζοντας την σύνδεση στους υποδοχείς των μαστικών κυττάρων. Σήμερα, προτείνεται η φαρμακευτική καταστολή της λειτουργίας των ωθηκών ή της λειτουργίας των ορμονών με φαρμακευτικά παράγωγα καθώς θεωρείται λιγότερο ανώδυνη και επεμβατική διαδικασία καταστολής της ογκογένεσης (Lambertini, 2022). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται τα εξής:

Αντι-οιστρογόνα: Σε αυτήν την θεραπεία (Patel&Jacobs, 2025) δεν σταματά η παραγωγή των οιστρογόνων αλλά εμποδίζεται η επίδραση τους στα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, καταλαμβάνουν τους οιστρογονικούς υποδοχείς των μαστικών κυττάρων, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση τους με την ορμόνη αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την δράση των καρκινικών κυττάρων. Το πρώτο φάρμακο, που χρησιμοποιείται από το 1970 μέχρι και σήμερα είναι η **Ταμοξιφαίνη**, ανήκει στην κατηγορία των εκλεκτικών τροποποιητών οιστρογονικών υποδοχέων (SERM). Χορηγείται είτε μετά από χειρουργείο, είτε για πρόληψη υποτροπής. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά χρησιμοποιείται και σε μετεμμηνοπαυσιακές. Έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον κίνδυνο επανεμφάνισης της νόσου κατά 50/100 και αυξάνει τα ποσοστά θνησιμότητας. Πολύ σημαντική ουσία, που χρησιμοποιείται στην ορμονοθεραπεία συνιστά η **Ραλοξιφαίνη** που αποτελεί επίσης SERM και χρησιμοποιείται τόσο για πρόληψη όσο και για θεραπεία της νόσου (Sporn, 2004). Ακόμη, σημαντική αλλά λιγότερο σημαντική ουσία αποτελεί η **Τορεμιφένη** οποία αποτελεί εξίσου SERM (Vogel, 2013). Μία αντι-οιστρογονική ουσία, με διαφορετικό μηχανισμό δράσης αποτελεί η **φουλβεστράνη** οποία συνιστά έναν εκλεκτικό καταστολέα οιστρογονικού υποδοχέα (SERD) που προωθεί την αποδόμηση των υποδοχέων και χρησιμοποιείται σε προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού (Carlson, 2005).

Μια ιδιαίτερα σημαντική ανακάλυψη φαρμακευτικού σκευάσματος, που φαίνεται ότι θα αντικαταστήσει την ταμοξιφαίνη ή θα αποτελέσει την θεραπευτική της συνέχεια αποτελούν οι αναστολείς της αρωματάσης. Η αρωματάση αποτελεί ένα ένζυμο απαραίτητο για την παραγωγή των οιστρογόνων τόσο στις ωθήκες όσο και σε άλλους ιστούς του σώματος (επινεφρίδια, λιπώδης ιστός) παρουσιάζοντας ως καίριο ρόλο την αναστολή της παραγωγής των οιστρογόνων που παράγονται από ανδρογόνα κατά την εμμηνόπαυση. Οι αναστολείς της αρωματάσης είναι η αναστραζόλη, λετροζόλη και εξαμεστάνη και χορηγούνται συνήθως σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (Miller, 2003).

Οι ορμονοθεραπείες είναι μακροχρόνιες θεραπείες. Μπορεί να διαρκέσουν από 5 έως 10 χρόνια. Συνήθως όμως γίνονται καλά ανεκτές και δεν δημιουργούν προβλήματα. Οι παρενέργειες είναι ελάχιστες και μικρές ενώ το όφελος πολύ μεγάλο. Στις ασθενείς με ορμονοευαίσθητο όγκο, η ορμονοθεραπεία είναι πιο αποτελεσματική από τη χημειοθεραπεία.

ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ: Η συγκεκριμένη μορφή καταπολέμησης του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιεί την φυσική ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να προστατεύει τον οργανισμό από λοιμώξεις και ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Κοινή και απαραίτητη γνώση θεωρείται ότι τα Τ κύτταρα είναι ένας τύπος λεμφοκυττάρων που βοηθούν στην ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος σε μια ασθένεια. Υπάρχουν κάποια σημεία ελέγχου τα οποία περιορίζουν αυτή την ανταπόκριση και τα οποία “εκμεταλλεύεται” το καρκινικό κύτταρο για να “κρυφτεί” από το Τ κύτταρο. Οι αναστολές των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού αυξάνουν την πιθανότητα τα Τ κύτταρα να επιτεθούν και να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα. Ο πιο κοινός αναστολέας είναι ο pembrolizumab που έχει εγκριθεί από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA). Προτείνεται στον τριπλά αρνητικό καρκίνο, γιατί αυτός ο τύπος παρουσιάζει υψηλή μεταλλαξιγένεση, ώστε τα καρκινικά κύτταρα να παράγουν αντιγόνα, που είναι αναγνωρίσιμα στο ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτή η αναγνώριση, ενισχύει την δράση του ανοσοποιητικού συστήματος (των Τ λεμφοκυττάρων). Κοινός τόπος αποτελεί πως στον τριπλά αρνητικό καρκίνο, εκφράζονται υψηλά επίπεδα των πρωτεϊνών PD-L1, που προστατεύουν τον όγκο από το ανοσοποιητικό σύστημα. Έτσι λοιπόν, στον συγκεκριμένο τύπο θεραπείας παράγονται αναστολές των παραπάνω βιοδεικτών, ενισχύοντας εξίσου την δράση του ανοσοποιητικού συστήματος στην καταπολέμηση του όγκου (Debien, 2023).

Τελευταία, προτείνονται στοχευμένες ανοσοποιημένες θεραπείες, οι οποίες στοχεύουν σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων. Για αυτό λοιπόν, οι ερευνητές έχουν σχεδιάσει αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένα ένα συγκεκριμένο αντιγόνο, όπως ένα που βρίσκεται σε συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα. Αυτά είναι γνωστά ως μονοκλωνικά αντισώματα. Ορισμένα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, που ονομάζονται πρωτεΐνες στόχοι, και στη συνέχεια συνδέονται με αυτές τις πρωτεΐνες στόχους. Όταν το μονοκλωνικό αντίσωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη στόχο, αποκλείει τη λειτουργία της πρωτεΐνης στόχου και σκοτώνει το καρκινικό κύτταρο. Υπάρχουν πολυάριθμα μονοκλωνικά αντισώματα, που θεωρούνται ισχυροί αγωνιστές στην καταπολέμηση του μαστικού καρκινώματος. Τα κύρια μεταξύ αυτών θεωρούνται τα εξής: Enhertu, Herceptin, Kadcyla, TROPIS, Trodelvy. Τα τέσσερα πρώτα δύνανται να καταπολεμήσουν τον θετικό HER2 καρκίνο ενώ το τελευταίο στέκεται ενάντια στον τριπλά αρνητικό (TNBC). (Behl, 2023).

ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ: Αποτελεί μέσο καταπολέμησης του καρκίνου του μαστού σε μοριακό επίπεδο. Διέπεται από γενετικές αλλαγές σε γονίδια υπεύθυνα για την καρκινογένεση, επιδιώκοντας στην διόρθωση ή καταστροφή των καρκινικών κυττάρων σε μοριακό επίπεδο. Η θεραπεία αυτή χαρακτηρίζεται από την αναγνώριση γονιδιακών αλλαγών (ογκογονίδιο) στον όγκο και την καταστροφή αυτών, ώστε να περιοριστεί η ογκογένεση. Ένα παράδειγμα εφαρμογής της συγκεκριμένης θεραπείας αποτελεί η χρήση φαρμάκων για την αντιμετώπιση του ογκογονιδίου HER2 (εμφάνιση σε 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού). Κοινή γνώση αποτελεί το γεγονός ότι η ύπαρξή του σε έναν όγκο, αποτελεί αυξητικό παράγοντα πολλαπλασιασμού των κυττάρων του, καθώς και παράγοντα αυξημένης μεταστατικής ικανότητας. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιείται το φάρμακο Trastuzumab – Herceptin, δεσμεύεται ειδικά στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα HER2, αποτρέποντας έτσι τον σχηματισμό διμερών (διμερισμό) του υποδοχέα (απαραίτητος για την ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν την καρκινογένεση).

Έτσι, αναστέλλεται το σηματοδοτικό μονοπάτι. Ακόμη, το φάρμακο αυτό αναγνωρίζει και καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα που περιέχουν το ογκογονίδιο HER2 και συνάμα μειώνει την μεταστατική ικανότητα ορισμένων καρκινικών κυττάρων (Mann&Kullberg, 2016).

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού αποτελεί φάρο δύναμης και ελπίδας για τις γυναίκες που πάσχουν ώστε να αντιμετωπίσουν με σθένος και αποφασιστικότητα την δύσκολη μάχη μετατρέποντας την σε μία ιστορία και μνήμη ενός έντονου αγώνα επιβίωσης. Η θεραπεία αποτελεί έναν δυναμικό αγώνα υποστηριζόμενη από ένα υψηλό επιστημονικό δυναμικό και θα μπορούσε να ειπωθεί ότι μετατρέπεται σε ένα επιστημονικό επίτευγμα.

1.3. ΣΚΛΑΡΕΟΛΗ

Η σκλαρεόλη, είναι μια φυσική ένωση που ανήκει στην κατηγορία των διτερπενίων και απαντάται κυρίως στο αιθέριο έλαιο του φυτού φασκόμηλου (*Salvia sclarea* L.). Χημικά αποτελεί μια διτερπενική αλκοόλη, παρουσιάζοντας ποικίλες βιολογικές λειτουργίες μεταξύ των οποίων αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντιυπερτασική, και σημαντικότερα, αντικαρκινική δράση.

Αντιμικροβιακή δράση: Η σκλαρεόλη, αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη ευρέος φάσματος μικροοργανισμών κυρίως βακτηρίων και μυκήτων (Gram-θετικά βακτήρια όπως *Staphylococcus aureus*, Gram-αρνητικά βακτήρια, και παθογόνους μύκητες όπως *Candida* spp). Φέρεται να εισέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης τους λόγω της λιπόφιλης φύσης της και να προκαλεί ιοντικές ανισορροπίες απόρροια των οποίων αποτελεί η καταστροφή βασικών μικροβιακών λειτουργιών και θάνατος αυτών (daSilva et al., 2016).

Αντιφλεγμονώδη δράση: Η σκλαρεόλη, ανήκει στα διτερπένια λαβδανίου και διαθέτει υψηλή αντιφλεγμονώδη ισχύ. Σύμφωνα με τους Zhong et al. (2015), αναστέλλει την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων και κυτταροκινών (ιντερλευκίνη-1β (IL-1β)) που εμπλέκονται στην φλεγμονώδη απόκριση. Έτσι, προήγαγε την προστασία του χόνδρου, ανέστειλε τη φλεγμονή και την καταστροφή των αρθρώσεων και καθυστέρησε την εξέλιξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ακόμη, οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της σχετίζονται με την καταστολή της ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK (ERK, p38) και NF-κΒ, τα οποία αποτελούν κύριους ρυθμιστές της φλεγμονής.

Αντικαρκινική δράση: Η σκλαρεόλη, αποτελεί μία ουσία που μπλοκάρει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ποικίλους τρόπους όπως απόπτωση ή παρέμβαση στον κυτταρικό τύπο σε πολυάριθμους κυτταρικούς τύπους. Αρχικά, σε ποικίλους καρκινικούς τύπους όπως η λευχαιμία, ο καρκίνος του μαστού (MCF-7), ο καρκίνος του παχέος εντέρου (HCT116) και το οστεοσάρκωμα (MG63), η ουσία σταματά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κάνοντας τα κύτταρα να σταματούν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και παράλληλα προκαλεί απόπτωση (Dimas et al., 1999; Dimas et al., 2007; Mo, Yang&Zhang, 2016). Ακόμη, σύμφωνα με τους Dimas et al. (2006), απεδείχθη ότι η συνδυαστική θεραπευτική προσέγγιση σκλαρεόλης με σισπλατίνη, δοξορουβικίνη και ετοποσίδη προσέδωσε αυξημένη ευαισθησία και βέλτιστα αποτελέσματα.

Επίσης, η σκλαρεόλη φάνηκε να μειώνει τον πολλαπλασιασμό των H1688, να διακόπτει τη φάση G1 και να τα οδηγεί στην απόπτωση (Chen et al., 2020). Δείχθηκε ότι μειώνει τον όγκο σε καρκίνο του μαστού καθώς μείωσε την IL-4 και αύξησε το IFN-γ και περιορίζοντας παράλληλα τον αριθμό Τ κυττάρων στον όγκο (Noori et al., 2010).

Οι Stojkovic et al. (2023) συνέθεσαν υβριδικά μόρια σκλαρεόλης με σκοπό την βελτίωση των δράσεών της. Τα νεοσυντιθέμενα υβρίδια αποτελούνται από σκλαρεόλη και 1,2,4-τριαζολο[1,5- α]πυριμιδίνης

όπου εμφάνισαν ισχυρότερη δράση από την σκλαρεόλη. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν για τη δράση τους έναντι δύο κυτταρικών σειρών γλοιοβλαστώματος, U87 και πολυανθεκτικά U87-TxR όπου μείωσαν σημαντικά την ανάπτυξή τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν, επιπλέον, την πρόκληση απόπτωσης, εμπλοκή στον κυτταρικό κύκλο, αλλαγές στο δυναμικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών καθώς και πρόκληση οξειδωτικού stress. Οι ίδιοι επιστήμονες (Stefanovic et al., 2024) συνέθεσαν 2 υβριδικά μόρια σκλαρεόλης και δοξορουβικίνης (CON1, CON2) τα οποία ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των U87 και αυξάνουν την έκφραση της ιστόνης p53. Ένα πράγμα που προκαλεί βλάβη στο DNA. Τέλος, σε κύτταρα ASC προκάλεσαν πρόωμη και όψιμη απόπτωση.

2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας πτυχιακής αποτελεί η *invitro* διερεύνηση της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης των ημισυνθετικών παραγώγων της σκλαρεόλης στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο. Η εργασία στοχεύει στην διαλογή και επιλογή της ουσίας που παρουσιάζει την καλύτερη *invitro* αντικαρκινική δράση ανάμεσα σε 6 ουσίες σε 2 καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231. Η πρώτη κυτταρική σειρά, βρίσκεται στον ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού ενώ η δεύτερη στον υπότυπο του τριπλά αρνητικού καρκίνου όπως αναφέρεται και παρακάτω.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

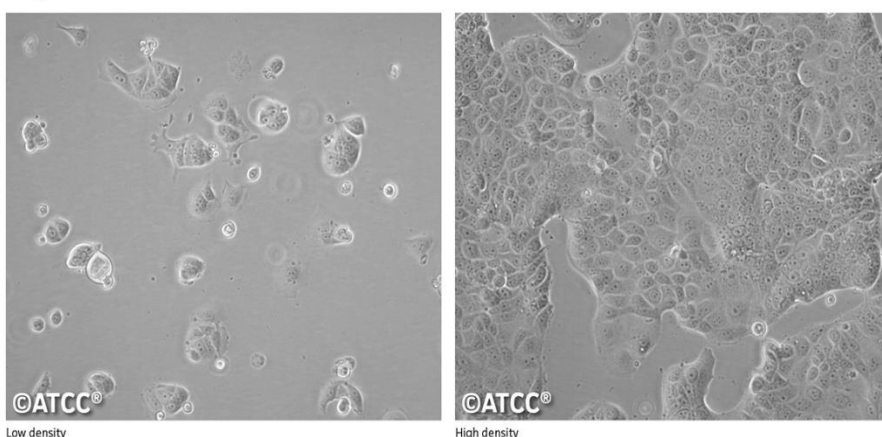
3.1.1 ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΜΑΣΤΟΥ MCF-7

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο ευρέως διαδεδομένες και εγκαθιδρυμένες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού η MCF-7 και η MDA-MB-231. Η μελέτη πάνω σε αυτές βασίστηκε στο γεγονός ότι αντιπροσωπεύουν διαφορετικούς υποτύπους καρκίνου του μαστού, καθώς η MDA-MB-231 αποτελεί υπότυπο του τριπλά αρνητικού καρκίνου ενώ η MCF-7 χαρακτηρίζει τον ορμονοευαίσθητο τύπο καρκίνου ER⁺. Στην εργαστηριακή μελέτη, εμφανίζουν καίρια πλεονεκτήματα όπως μεγάλη ευκολία στην χρήση και σταθερή συμπεριφορά (κυτταρική ανάπτυξη) με εφαρμογή σταθερών συνθηκών ανάπτυξης.

Η καρκινική σειρά MCF-7 (Michigan Cancer Foundation), χαρακτηρίζεται από επιθηλιακά κύτταρα και απομονώθηκε πρώτη φορά το 1970 από μία 69χρονη πάσχουσα γυναίκα με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα μαστού. Τα κύτταρα αυτά, παρουσιάζουν έντονο ενδιαφέρον για *in vitro* μελέτη, καθώς διαθέτουν σημαντικά χαρακτηριστικά, όπως υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης και γλυκοκορτικοειδών καθώς και χαρακτηριστικά παρόμοια με το επιθήλιο του μαστού και εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ER-α) κάτι που επιτρέπει την παραπάνω ομοιότητα καθώς παρουσιάζουν την δράση των οιστρογόνων μέσω των υποδοχέων στο κυτταρόπλασμα. Αποτελούν την πρώτη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού που αποκρίνεται σε ορμόνες. Ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας και την παραλλαγή της σειράς, ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων αυτής της σειράς κυμαίνεται από 30-40 ώρες. Κατά την εκπόνηση της πτυχιακής, εφαρμόσαμε τέτοιες συνθήκες που επέτρεπαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων περίπου σε 24 ώρες (Camarillo et al., 2014).

Culture Collections. (n.d.) *Cell Line Profile: MCF7*. ECACC. Available at: <https://www.culturecollections.org.uk/products/cell-cultures/ecacc-cell-line-profiles/mcf7/>

ATCC Number: CRL-3435
Designation: MCF-7 Tam1

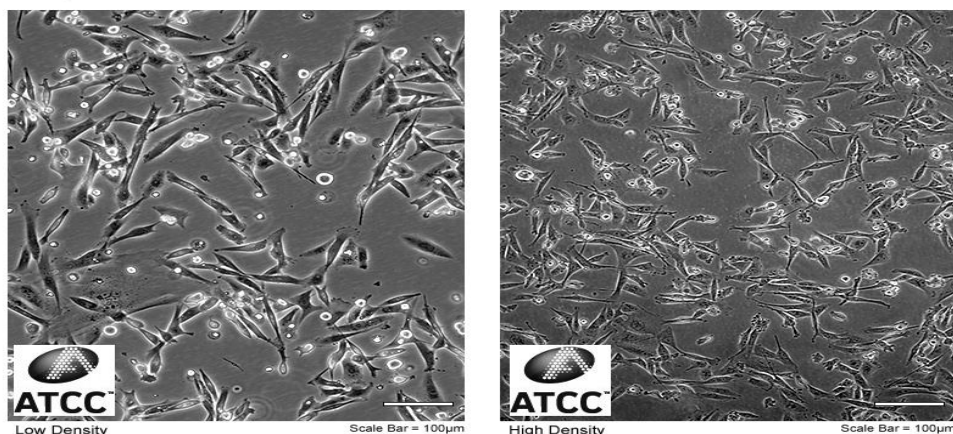


ΕΙΚΟΝΑ3 : Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής σειράς MCF-7 (ATCC.org)

3.1.2 ΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΜΑΣΤΟΥ MDA-MB231

Η κυτταρική σειρά MDA-MB-231, προέρχεται από καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού ασθενούς και απομονώθηκε πρώτη φορά από 51χρονη καυκάσια γυναίκα με μεταστατικό αδеноκαρκίνωμα του μαστού. Αποτελεί κεντρικό αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος και ως μοντέλο για την μελέτη καρκίνου του μαστού τελικού σταδίου, λόγω της ακραίας επιθετικότητας, υψηλής διηθητικότητας και μεταστάσεων που παρουσιάζει. Απαντάται σε περιπτώσεις τριπλά αρνητικού καρκίνου (δεν εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνου ER, προγεστερόνης-PR και HER2). Η υψηλή επιθετικότητα της, φανερώνεται στο ότι τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται αρκετά γρήγορα με τον χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων της κυτταρικής σειράς να κυμαίνεται στις 20-30h, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (ChavezKJ et al., 2010).

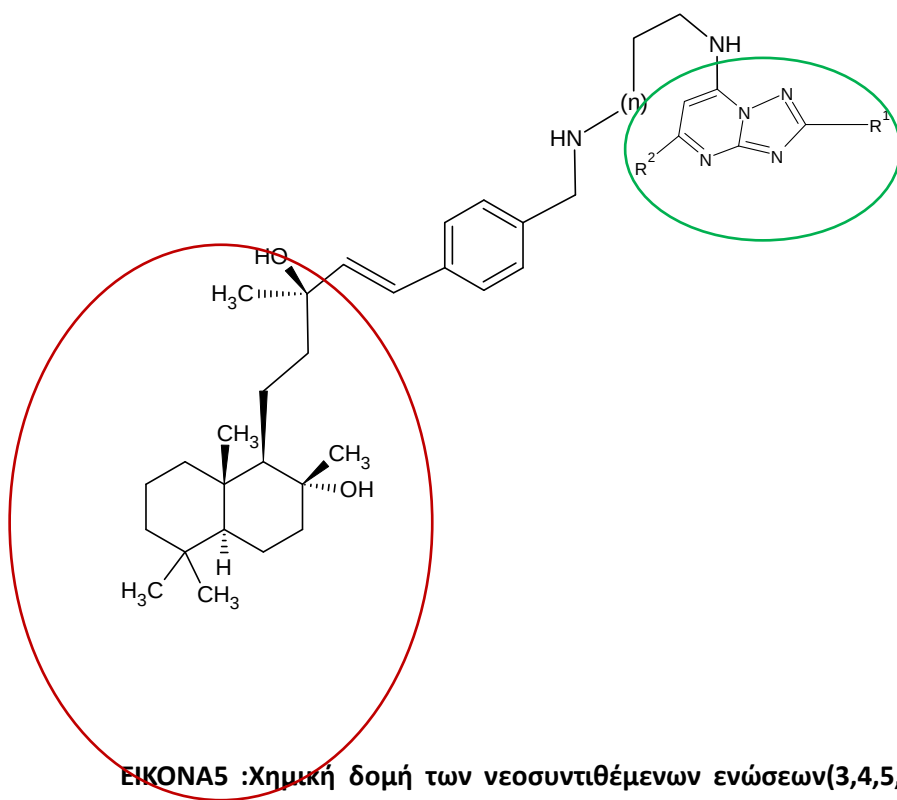
ATCC Number: **HTB-26™**
Designation: **MDA-MB-231**



ΕΙΚΟΝΑ4 :Σχηματική απεικόνιση της κυτταρικής σειράς MDA-MB 231 (ATCC.org)

3.1.3 ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΩΣΕΙΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια συνεργασίας του Τμήματος Ιατρικής – Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το Πανεπιστήμιο του Βελιγραδίου (University of Belgrade – Faculty of Chemistry, and Institute for Biological Research “Siniša Stanković” – National Institute of the Republic of Serbia). Οι ενώσεις που μελετήθηκαν για την αντικαρκινική τους δράση αποτελούν ημισυνθετικές ενώσεις (υβριδικά μόρια), με βάση την φυσικά απαντώμενη σκλαρεόλη και την ένωση της 1,2,4-τριαζόλο [1,5-α]πυριμιδίνης, που συνδέονται είτε με δεσμό 4-βενζυλπιπεραζίνης είτε με δεσμό 4-βενζυλδιαμίνης (ομοιοπολική σύνδεση) και εφαρμόστηκαν σε κύτταρα της καρκινικής σειράς του γλοιοβλαστώματος U87 με σκοπό την μέγιστη αντικαρκινική δράση, την ισχυρή κυτταροτοξική επίδραση έναντι καρκίνου και την βελτίωση του φαρμακοκινητικού προφίλ των μορίων. Η 1,2,4-τριαζόλο [1,5-α]πυριμιδίνη συνίσταται από πυριμιδίνη και ετεροκυκλικούς πυρήνες τριαζόλης



ΕΙΚΟΝΑ5 :Χημική δομή των νεοσυντιθέμενων ενώσεων(3,4,5,6). Σε **κόκκινο** κύκλο η δομή της σκλαρεόλης και με **κίτρινο** της 1,2,4-τριαζολο [1,5-α]πυριμιδίνης. *n*: αριθμός ανθράκων

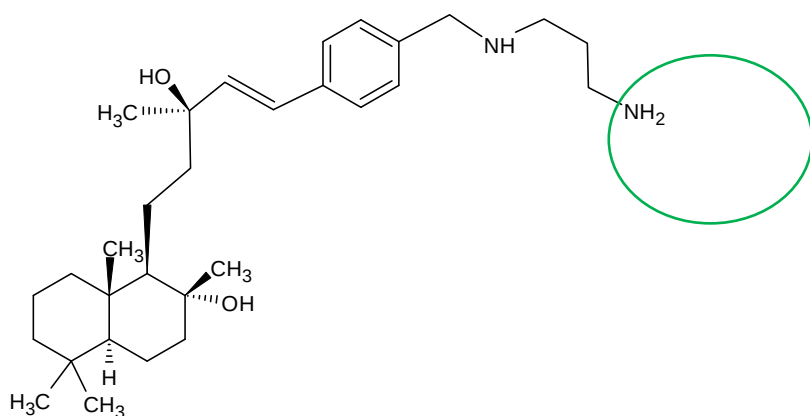
TNT396, TNT403, TNT404 : $n = 1$ TNT397, TNT405, TNT406: $n = 4$

Από προηγούμενα πειράματα που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο σε διάφορες καρκινικές σειρές, αποφασίστηκαν οι έξι παραπάνω ενώσεις ως πιο ισχυρές ώστε να τις μελετήσουμε εκτενέστερα στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, MCF-7 και MDA-MB231.

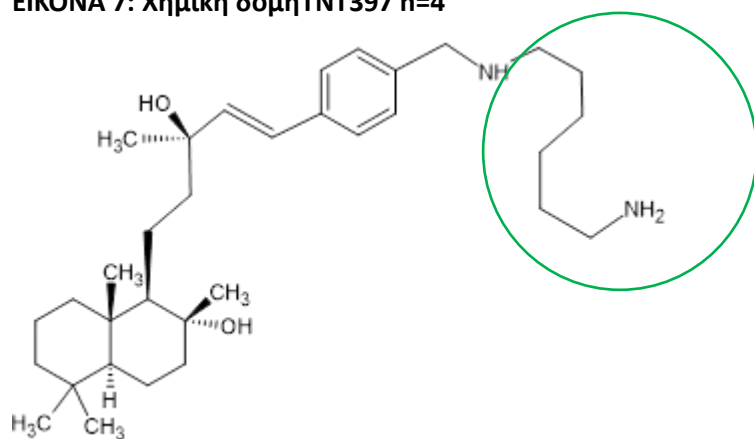
Για τις ενώσεις στις οποίες καταλήξαμε να μελετήσουμε οι Stojković *et al.* (2023), τις μελέτησαν *in vitro* σε δύο κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, στην U87 και U87-TxR (κύτταρα που παρουσίασαν δράση P-gr). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις είναι πιο δραστικές συγκριτικά με τη σκλαρεόλη και ότι δρουν ως αναστολείς της P-gr. Σύμφωνα με την έρευνα, το TNT396, TNT397, TNT403, TNT404, TNT406 και TNT405 δείχνουν ακόμη σημαντική πιθανότητα να αυξάνουν τη συσσώρευση της δοξορουβικίνης, ενισχύοντας την κυτταροτοξική δράση της χημειοθεραπείας (χημειοαισθητοποιητές) και καλή ρύθμιση της P-gr. Ακόμη, τα TNT403, TNT404, TNT405, TNT406 είναι πιο ισχυρά έναντι τόσο των ευαίσθητων (U87) όσο και των πολυφαρμακοανθεκτικών (U87-TxR) κυττάρων από τα TNT396 και TNT397. Οι TNT396 και TNT397 είναι παράγωγα του φυσικού προϊόντος σκλαρεόλη (sclareol) με διαφορές στη δομή της αμίνης που συνδέεται μέσω ενός αλκυλικού συνδέσμου στην αλδεΐδη 10. Οι υπόλοιπες (TNT403, TNT404, TNT405, TNT406) αποτελούν υβρίδια που συνδυάζουν τη φυσική ουσία σκλαρεόλη (SCL) με συνθετικές ενώσεις 1,2,4-τριαζολο[1,5-α]πυριμιδίνης (TP). Όμως, οι TNT403, TNT404 έχουν ως βάση τριαζολοπυριμιδίνες με φαινυλο ή τριφθορομεθυλοποκαταστάτες ενώ οι TNT405, TNT406 συνδυάζουν υποκαταστάτες με φαινυλο και τριφθορομεθυλο στις πυριμιδίνες.

Οι χημικές δομές των ενώσεων, παρατίθενται παρακάτω και οι διαφορές στην δομή τους σημειώνονται με κύκλο:

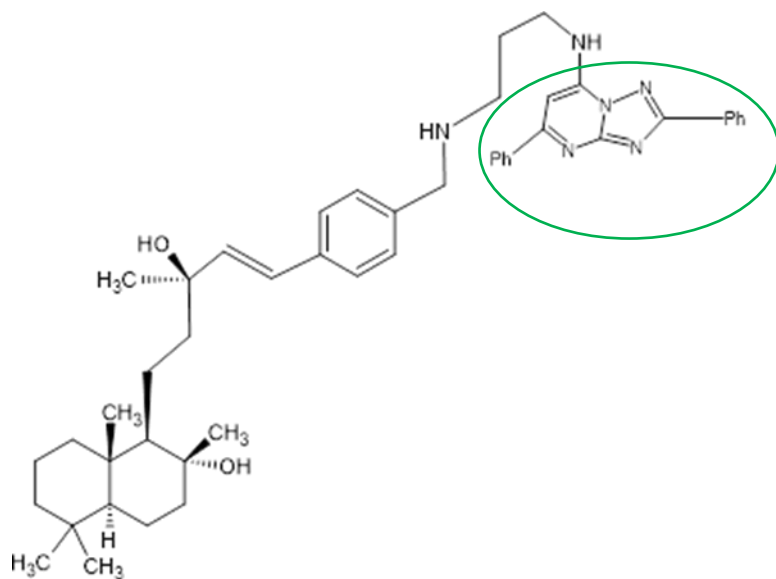
ΕΙΚΟΝΑ 6: Χημική δομή TNT396 n=1



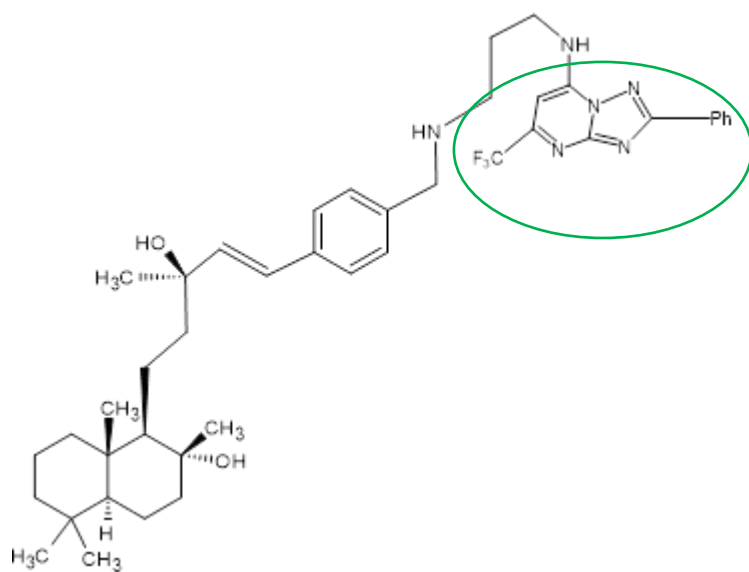
ΕΙΚΟΝΑ 7: Χημική δομή TNT397 n=4



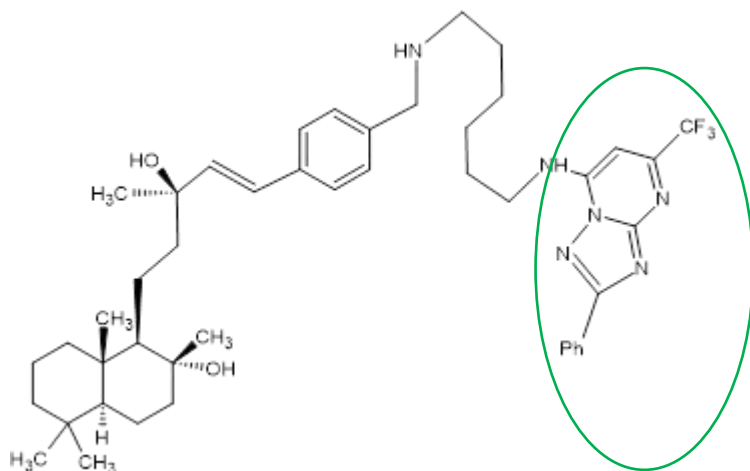
ΕΙΚΟΝΑ 8: Χημική δομή TNT403 n=1



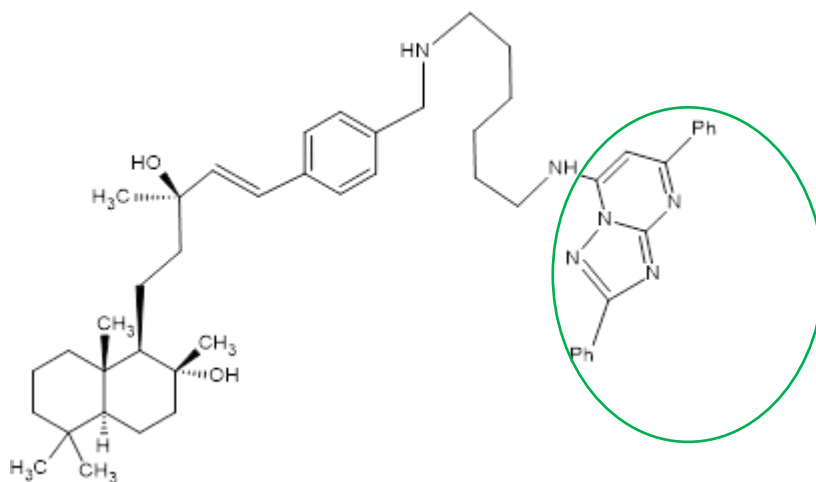
ΕΙΚΟΝΑ 9: Χημική δομή TNT404 n=1



ΕΙΚΟΝΑ 10: Χημική δομή TNT405 n=4



ΕΙΚΟΝΑ 11: Χημική δομή TNT406 n=4



3.1.4 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των MDA-MB231 και MCF7 τα εξής:

- Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (Gibco, code-2194780) [40]
- Εμβρυϊκός ορός μοσχαριού 5% (FBS: Fetal Bovine Serum) Pan Biotech
- 1% L-γλουταμίνη (Gibco, code-2165253)
- 1% Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (Gibco, code-2145465)
- Θρυψίνη (Gibco, code- 15090-046)
- DMSO (DMSO (Dimethyl Sulfoxide, code 0N013586)

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Φλάσκες T25 (25 cm² επιφάνεια)- (Thermo Scientific, code: 169389)
- Πιπέτες των 5 ml (Corning Costar® Incorporated, code 4051)
- Μικροπλακίδιο 96 θέσων (Corning Costar® Incorporated, code 4051)
- Πλακίδιο 6 θέσεων (Thermo Scientific, code: 169389)
- Φιαλίδια (Falcon)- (Corning, code: 430921)
- Φιαλίδια eppendorf του 1,5 ml- (Thermo Scientific, code: 3456)
- Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials)- (Corning, 430487)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι τα εξής:

- Διάλυμα NaCl (Demo ABEE, code: 2107757)
- Απιονισμένο H₂O (Demo ABEE, code: 2006777)
- TCA (Trichloroacetic acid)- (PanReacApplichem, Code: A1431)
- Trypan Blue (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- SRB – Sulforhodamine B (SIGMA, Code: S9012)
- Οξικό οξύ (Fluka: Code: 45731)
- Trizma Base (PanReac AppliChem, code: OM013429)

3.1.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την διεξαγωγή ενός πειράματος, είναι απαραίτητη η εξασφάλιση μίας σειράς ασηπτικών συνθηκών εργαστηριακά, ώστε να μπορέσουν τα κύτταρα να μείνουν ζωντανά και να αναπτυχθούν χωρίς καμία επιμόλυνση. Έτσι λοιπόν, ακολουθείται από τον ερευνητή ένα συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο σχετικά με τις συνθήκες διατήρησης κυτταροκαλλιιεργειών. Συνεπώς, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικό κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, με 5% διοξείδιο του άνθρακα και 95% υγρασία, μιας και οι συνθήκες αυτές προσομοιώνουν το φυσικό περιβάλλον μέσα στο ανθρώπινο σώμα, ευνοώντας την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Έπειτα η πορεία του πειράματος, λαμβάνει χώρα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες για να διασφαλιστεί η απομάκρυνση των μικροβίων και άλλων ρύπων από τον χώρο εργασίας. Ακόμη, όλα τα απαραίτητα υλικά, φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4°C αφενός για να διατηρηθούν και να αποτραπεί η αποσύνθεση των συστατικών τους αφετέρου για να περιοριστεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλά πριν από κάθε πείραμα θερμαίνονται στο υδατόλουτρο στους 37°C. Ο εκάστοτε ερευνητής, καλείται να είναι ιδιαίτερα προσεκτικός στην αυστηρή διατήρηση ασηπτικών συνθηκών, αποστειρώνοντας όλο τον εργαστηριακό εξοπλισμό πριν την χρήση, δουλεύοντας εντός του θαλάμου.

3.1.6 ΑΝΑΝΕΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιείται RPMI στο οποίο προστέθηκαν και κάποια άλλα στοιχεία. Η Πενικιλίνη και Στρεπτομυκίνη προστίθενται στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας με σκοπό να προληφθεί τυχόν μόλυνση των κυτταροκαλλιιεργειών από μύκητες ή βακτήρια. Η L- γλουταμίνη, εντάσσεται στα απαραίτητα αμινοξέα και χρησιμοποιείται ως εναλλακτική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα για να

εξασφαλιστεί ένα φυσιολογικό περιβάλλον στα κύτταρα και να επιτραπεί η ανάπτυξη τους. Το FBS (θρεπτικό υλικό βοδινού) περιέχει ένα σύνολο αυξητικών παραγόντων, ώστε να βοηθήσει στην ανάπτυξη της *in vitro* κυτταροκαλλιέργειας, συμβάλλοντας στην φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη, και προάγοντας έτσι την κυτταρική προσκόλληση και συσσωμάτωση. Η θρυψίνη χρησιμοποιείται κατά την θρυψινοποίηση και είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, που οδηγεί στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε κύτταρα που είναι προσκολλημένα στη φλάσκα, ώστε να αποκολληθούν από αυτή καταλύοντας την υδρολυτικό σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών σε κατάλοιπα Lys και Arg.

Κατά την διάρκεια που τα κύτταρα βρίσκονται στην φλάσκα, δέχονται τα θρεπτικά που προσθέσαμε και τα μεταβολίζουν, αποδεικνύοντας έτσι την κυτταρική βιωσιμότητα. Τα απόβλητα που προκύπτουν με τις κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες, απομακρύνονται με τακτικές αλλαγές του θρεπτικού μέσου κάνοντας απόχυση του περιεχομένου της φλάσκας και προσθέτοντας φρέσκο RPMI με 5% συμπλήρωμα. Να τονίσουμε ότι η ποσότητα του θρεπτικού που προστίθεται εξαρτάται από το μέγεθος της φλάσκας, συγκεκριμένα στις T75 (με 75 cm² επιφάνεια) βάζουμε 14 ml, ενώ στις T25 (με 25 cm² επιφάνεια) βάζουμε 6 ml. Η διαδικασία αυτή, επαναλαμβάνεται ανά 2-3 μέρες ανάλογα με την ταχύτητα με την οποία τα κύτταρα μεταβολίζουν τα θρεπτικά (ανάλογο κυτταρικού τύπου) και θεωρείται αναπόσπαστη, καθώς αν συσσωρευτούν (τα απόβλητα) γίνονται τοξικά για τα κύτταρα, επηρεάζοντας αρνητικά την επιβίωση και την κυτταρική ανάπτυξη. Μέσω αυτής της διαδικασίας, λοιπόν εξασφαλίζεται ένα υγιές περιβάλλον για την κυτταροκαλλιέργεια. Ο ερευνητής, μπορεί να παρατηρήσει οπτικά τον ρυθμό μεταβολισμού των κυττάρων στην φλάσκα και τα παραπροϊόντα αυτού, μέσω αλλαγής χρώματος του θρεπτικού στο εσωτερικό της φλάσκας (από κόκκινο χρώμα χαρακτηριστικό του θρεπτικού μέσου, γίνεται κίτρινο).

3.1.7 ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Ανακαλλιέργεια (passaging), αποτελεί την διαδικασία όπου τα κύτταρα που έχουν πολλαπλασιαστεί σε μία φλάσκα και η πυκνότητα της κυτταροκαλλιέργειας φτάσει περίπου στο 80%, μεταφερθούν σε μία άλλη φλάσκα με νέο θρεπτικό υλικό, ώστε να διατηρηθεί η καλλιέργεια για μακροχρόνια μελέτη, να αποφευχθεί η υπερπλήρωση και η εξάντληση των θρεπτικών. Για να υλοποιηθεί, ωστόσο η μεταφορά των κυττάρων απαραίτητο θεωρείται να προηγηθεί η θρυψινοποίηση (με την βοήθεια της θρυψίνης, πραγματοποιείται αποκόλληση κυττάρων). Η συχνότητα δημιουργίας ανακαλλιέργειας, εξαρτάται από ρυθμό πολλαπλασιασμού της κάθε κυτταρικής σειράς, αλλά συνήθως γίνεται κάθε 3-4 μέρες για να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας.

Τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής :

- 1) Μικροσκοπική παρατήρηση της φλάσκας, ώστε να επιβεβαιωθεί η πυκνότητα των κυττάρων στο 70-80/100 της επιφάνειας της φλάσκας. Αποφεύγεται, η υπερκάλυψη της φλάσκας για τον κίνδυνο δημιουργίας κυτταρικών συσσωματωμάτων και συνεπώς αλλοίωσης της κυτταρικής συμπεριφοράς.
- 2) Απόχυση του θρεπτικού υλικού της παλιάς φλάσκας.
- 3) Ξέπλυμα των κυττάρων με 0,9% NaCl για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού FBS (απενεργοποιούν την θρυψίνη)
- 4) Προσθήκη 2ml θρυψίνης 1X στη φλάσκα T75, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. (Η ποσότητα της θρυψίνης που προστίθεται, εξαρτάται από το μέγεθος της φλάσκας, καθώς σκοπεύει να καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας. Η προσθήκη περίσσειας του υδρολυτικού ενζύμου προκαλεί γήρανση και αλλοίωση των κυττάρων).

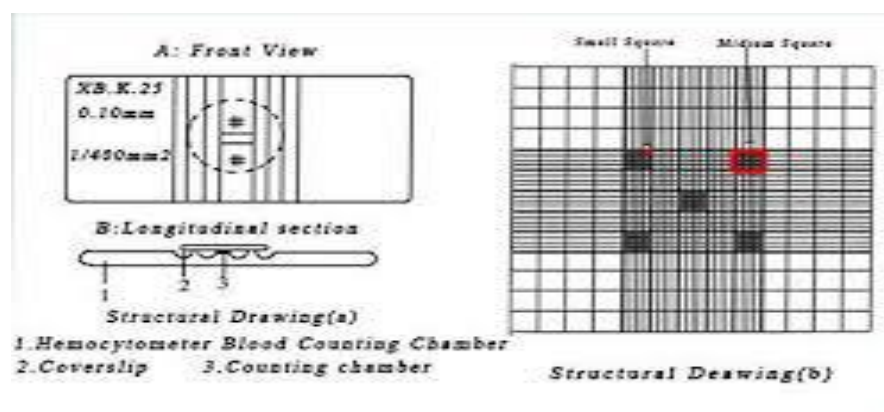
Για να δράσει σωστά η θρυψίνη και να έχουμε επιτυχή αποκόλληση όλων των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας, πρέπει να τοποθετηθεί αρχικά σε κλίβανο στους 37°C. Ο χρόνος

παραμονής των κυττάρων, εξαρτάται από την κυτταρική σειρά. Στις καρκινικές σειρές MDA-MB231 και MCF7, δεν απαιτείται παραπάνω από 2min για την επιτυχή αποκόλληση των κυττάρων. Συχνά, ως ερευνητές υποβοηθούμε την διαδικασία με έναν ήπιο χτύπημα στον πάτο της φλάσκας, ώστε να ξεκολλήσουν τυχόν κυτταρικά υπολείμματα. Μόλις επιτευχθεί η διαδικασίας αποκόλλησης των κυττάρων, η φλάσκα μεταφέρεται στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ώστε κάτω από ασηπτικές συνθήκες να τοποθετηθούν 4ml RPMI (για να απενεργοποιηθεί η δράση της θρυψίνης) και με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας γίνεται ανάδευση 3 φορές στην επιφάνεια της φλάσκας για να απενεργοποιηθεί όλη η θρυψίνη στο εσωτερικό της.

Τέλος, γίνεται συλλογή του κυτταρικού αιωρήματος σε ένα φιαλίδιο και τοποθετείται στην φλάσκα η απαιτούμενη ποσότητα για την αραίωση που θα κάνουμε. Η αραίωση είναι αναλογική της ταχύτητας πολλαπλασιασμού των κυττάρων και προστίθεται έτσι στην φλάσκα 14ml θρεπτικό μέσο RPMI (5%) συμπλήρωμα, προτού τοποθετηθεί η φλάσκα στον κλίβανο για συνέχιση της καλλιέργειας.

3.1.8 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER & ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την πορεία του πειράματος, καθίσταται απαραίτητη η καταμέτρηση των κυττάρων και ο έλεγχος της βιωσιμότητας αυτών. Έτσι, θεωρείται απαραίτητη η χρήση ενός εργαλείου, που η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων σε συγκεκριμένο όγκο υγρού, ιδιότητα που εξυπηρετείται από το αιμοκυτταρόμετρο πλακίδιο Neubauer. Το τελευταίο, αποτελεί μία ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος πλάκα (γυάλινη) με την δική της καλυπτρίδα, που φέρει χαραγές και περιοχές συγκεκριμένου όγκου όπου τοποθετείται το δείγμα. Στο κέντρο διαθέτει την περιοχή καταμέτρησης, που χωρίζεται σε 2 θαλάμους μέτρησης και σε κάθε θάλαμο υπάρχουν 9 τετράγωνα μήκους 1mm.



ΕΙΚΟΝΑ 12: Απεικόνιση του πλακιδίου Neubauer/ πλέγματος μέτρησης θαλάμου Neubauer (CNWTC)

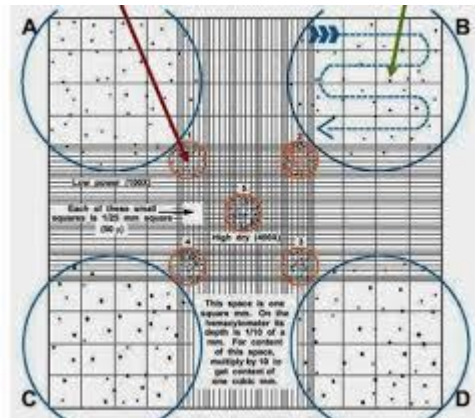
Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

Συλλογή των κυττάρων σε ένα falcon, στα οποία προηγήθηκε θρυψινοποίηση και αναστολή της θρυψίνης με προσθήκη RPMI

Καλή ανάδευση των κυττάρων στο falcon, και μεταφορά με μία μικροπιπέτα (10-100μl) 90 μl σε ένα Eppendorf (μεγέθους 1,5ml).

Σε αυτό το Eppendorf, προστίθεται 10μl της χρωστικής Trypan Blue (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Η χρωστική αυτή, σημαίνει με μπλε χρώμα την κυτταρική μεμβράνη των νεκρών κυττάρων, επιτρέποντας την διάκριση (μικροσκοπικά) των ζωντανών(λευκό χρώμα) με των νεκρών κυττάρων και συνεπώς τον έλεγχο βιωσιμότητας της συγκεκριμένης κυτταρικής καλλιέργειας.

Ο ερευνητής προετοιμάζει το αιματοκυτταρόμετρο και πραγματοποιεί μία ήπια ανάδευση (vortex) του φιαλιδίου ώστε να κατανεμηθούν ομοιόμορφα τα κύτταρα. Από το φιαλίδιο (90μl κύτταρα + 10μl χρωστικής), προστίθεται 20μl κυτταρικού εναιωρήματος με προσοχή στην πλάκα μέσα από μια μικρή εσοχή που δημιουργείται μεταξύ της καλυπτρίδας και της πλάκας.



ΕΙΚΟΝΑ 13: Σχηματική απεικόνιση των θαλάμων, σε κάθε τεταρτημόριο κατά την διαδικασία μέτρησης κυττάρων(Vembadi et al., 2019)

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα 13, οι περιοχές στις οποίες μετράμε τα κύτταρα εδράζονται στα 4 τεταρτημόρια γύρω από τον έντονο σταυρό που απεικονίζεται. Η κάθε περιοχή αποτελείται από 16 τετράγωνα στα οποία μετράμε τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των ορίων της κάθε μίας εκ των τεσσάρων περιοχών.

Μικροσκοπικά το δείγμα, παρατηρείται σε μεγέθυνση συνήθως x400 και μετράται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο.

Έτσι, ο αριθμός των κυττάρων προσδιορίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση :

$$\text{ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ/ml} = \frac{\text{Αριθμός κυττάρων που μετρήθηκαν} \times \text{παράγοντας αραιώσης} \times 10^4}{\text{Αριθμός τετραγώνων που μετρήθηκαν}}$$

Όπου: Ο παράγοντας 10^4 , αποτελεί τον όγκο που αντιστοιχεί σε κάθε τετράγωνο της πλάκας (τετράγωνο έχει μέγεθος $1 \times 1\text{mm}$ και βάθος $0,1\text{mm}$)

Ο παράγοντας αραιώσης είναι η αναλογία του τελικού όγκου δείγματος προς τον αρχικό όγκο πριν την αραιώση

Με την εξίσωση αυτή, μπορούμε να βρούμε τον αριθμό των κυττάρων που αντιστοιχούν σε 1ml του αρχικού δείγματος.

3.1.9 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαδικασία κατάψυξης κυττάρων (κρυοσυντήρηση), αποτελεί μία μέθοδο διατήρησης των κυττάρων σε υγρό άζωτο (στους -196°C), επιτρέποντας την φύλαξη τους για μεγάλο χρονικό διάστημα, διατηρώντας τα ζωντανά. Η κατάψυξη των κυττάρων, υλοποιείται μέσα από δύο διαδικασίες (υαλοποίηση και αργή κατάψυξη). Η πιο συνηθισμένη, αποτελεί η δεύτερη κατά την οποία η θερμοκρασία μειώνεται ελεγχόμενα, τοποθετώντας εκ των προτέρων ένα κρυοπροστατευτικό παράγοντα DMSO (dimethylsulfoxide) ή γλυκερόλη. Αυτοί, λειτουργούν σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με το μόριο νερού στο εσωτερικό του κυττάρου, απομακρύνοντας το στο εξωτερικό και μειώνοντας τον κίνδυνο κρυσταλλοποίησης. Παρά την αναπόσπαστη σημασία τους στην διαδικασία, οι παράγοντες αυτοί πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και με περιορισμένο χρόνο έκθεσης για να αποφευχθούν διαταραχές στην κυτταρική λειτουργία και πρόκληση ωσμωτικού σοκ. Για αυτόν τον λόγο, καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις αυτών είναι τοξικές(99,8% καθαρής συγκεντρώσης) αναμειγνύονται μαζί με FBS, ώστε να έχουμε την επιθυμητή περιεκτικότητα 90% FBS και 10% DMSO.

Πριν την έναρξη της διαδικασίας, προηγείται η συλλογή των κυττάρων, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, και ακολουθεί μία διαδοχή σταδίων.

--Φυγοκέντρηση του falcon με το κυτταρικό εναιώρημα για 10 λεπτά στις 1200rpm στροφές.

--Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του ιζήματος.

--Προσθήκη του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (προστίθεται 1ml για κάθε 4×10^6 κύτταρα, σταδιακά)

Τέλος, γίνεται προσθήκη 1ml από το μείγμα με τα κύτταρα αφού γίνει καλή ανάδευση σε φιαλίδιο κατάψυξης (cryovial) και μεταφορά αυτών σε ειδικό δοχείο ισοπροπανόλης για σταδιακή ψύξη και αποθηκεύονται στους -80°C . Για μακροχρόνια αποθήκευση, μεταφέρονται στην συνέχεια σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -196°C .

3.1.10 ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αφορά την διαδικασία, στην οποία τα κύτταρα που έχουν καταψυχθεί μακροχρόνια σε χαμηλές θερμοκρασίες(-80°C), αποψύχονται, επανέρχονται σε θερμοκρασία δωματίου (37°C) και βρίσκονται σε ζωντανή κατάσταση. Η διαδικασία της απόψυξης, πρέπει να υλοποιηθεί γρήγορα και σωστά, για να διατηρηθεί η βιωσιμότητα και να αποφευχθούν κυτταρικές αλλοιώσεις.

Έτσι, λαμβάνουν χώρα τα εξής βήματα:

--) Αφού βγούν από το υγρό άζωτο, τοποθετηθούν σε υδατόλουτρο στους 37°C μεταφέρεται το περιεχόμενο σε σωληνάριο(falcon) εντός του κλίβανου .

--) Έπειτα, προστίθενται 5ml RPMI σταδιακά και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του σωληναρίου για 5λεπτά στις 900rpm στροφές.

--) Όταν ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα επαναιωρείται.

--) Τέλος, προστίθενται 5 ml RPMI ,με πιπέτα μεταφέρεται σε φλάσκα T75 ,συμπληρώνεται RPMI μέχρι τα 14 ml και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο.

3.1.11 ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

Η μέθοδος κυτταροτοξικότητας, με χρήση της χρωστικής Sulforhodamine B ή SRB αποτελεί μία χρωματομετρική διαδικασία που αξιοποιείται για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Η SRB αποτελεί μία ανιονική, φούξια χρωστική αμινοξανθίνης που χαρακτηρίζεται δομικά από την παρουσία ενός βασικού δακτυλίου συζευγμένο με ομάδες σουλφονικών οξέων μέσα από τις οποίες αφενός γίνεται υδατοδιαλυτή και αφετέρου αποκτά αρνητικό φορτίο. Συνδέεται σε βασικές ομάδες κυτταρικών πρωτεϊνών σε σταθεροποιημένα κύτταρα, από το τριχλωρικό οξύ (TCA) κάτω από ήπιες συνθήκες. Ακόμη, όσο μεγαλύτερο είναι το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των κυττάρων ή ο αριθμός αυτών, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα χρωστικής δεσμεύεται και σε επόμενη φάση απομακρύνεται από τα κύτταρα (Vichai&Kirtikara,2006).

Κατά την 1^η ημέρα, ελέγχουμε τα κύτταρα και ανανεώνουμε το θρεπτικό υλικό της φλάσκας σύμφωνα με την ενότητα 3.1.6

Κατά την 2^η ημέρα, κάνουμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων της φλάσκας στην οποία δουλεύουμε και στρώνουμε σε πολυπηγαδάκια των 96 θέσεων .

Για το στρώσιμο κυττάρων, ακολουθούμε ορισμένα βήματα :

-) Ξεκόλλυμα κυττάρων από την φλάσκα, με την διαδικασία της θρυψινοποίησης (3.1.7)
-)Συλλογή κυττάρων σε falcon(για πείραμα), τοποθετώντας τα υπόλοιπα κύτταρα σε φλάσκα για τον σχηματισμό μίας επόμενης κυτταρικής καλλιέργειας (ανακαλλιέργεια) και εφαρμογή ήπιας ανάδευσης του πρώτου με χρήση vortex, πριν την μέτρηση των κυττάρων (3.1.8)
-)Μέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου (3.1.8) και υπολογισμός της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων που πρέπει να απομονωθεί από το falcon, ώστε να έχουμε την ιδανική ποσότητα κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι (εξατομικευμένο για κάθε πειραματικό πρωτόκολλο).Για τον υπολογισμό, της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι και του συνολικού αριθμού κυττάρων πρέπει να ληφθούν υπόψη τα εξής
-) Ο αριθμός των συγκεντρώσεων των ουσιών, που θα εφαρμόσουμε στην καρκινική σειρά
-)Ο αριθμός των επαναλήψεων για κάθε συγκέντρωση(θεωρούμε 3 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση φαρμάκου για μία καρκινική κυτταρική σειρά αρκετές για εξακρίβωση αποτελεσμάτων)
-) Ύπαρξη κυττάρων ελέγχου(Control), στα οποία δεν προσθέσαμε κάποια ουσία. Η ύπαρξη αυτών είναι απαραίτητη για να συγκρίνουμε την ανάπτυξη των κυττάρων σε αυτές τις θέσεις έναντι των θέσεων εφαρμογής φαρμάκου.
-) Ύπαρξη κυττάρων ελέγχου στιγμής μηδέν(Tzero), στα οποία δεν προσθέσαμε κάποιο φαρμακευτικό παρασκεύασμα και μονιμοποιούνται την ημέρα που προσθέτουμε τις ουσίες, ώστε να ελέγξουμε τα επίπεδα βιωσιμότητας και την αρχική κατάσταση των κυττάρων πριν από προσθήκη φαρμακευτικής ουσίας αποτελώντας ουσιαστικά, βάση σύγκρισης για την αξιολόγηση της φαρμακευτικής επίδρασης από την ημέρα έκθεσης των κυττάρων σε αυτά έως την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.
-) Γνωρίζοντας, ότι σε κάθε μικροπλακίδιο αντιστοιχούν 100μl.

Εκτελούμε καλή ανάδευση με χρήση vortex, σκοπεύοντας σε ομοιόμορφη κυτταρική κατανομή στο falcon. Έπειτα, με χρήση κατάλληλης πιπέτας προσθέτουμε 100μlκυττάρων σε κάθε μικροπλακίδιο

στο πιάτο των 96 θέσεων και στο πιάτο με τα κύτταρα Tzero(έχουμε 2 πιάτα για κάθε φλάσκα) και τα τοποθετούμε στον κλίβανο για 24h επώαση.

3^η ημέρα: Προσθήκη εξεταζόμενων ουσιών

Μετά από 24h, τοποθετούνται οι ουσίες σε κάθε μικροπλακίδιο στις κατάλληλες συγκεντρώσεις που ορίσαμε ενώ παράλληλα μονιμοποιούνται τα κύτταρα Tzero με προσθήκη 100μl TCA. Για να δημιουργήσουμε μία διαδοχή συγκεντρώσεων, οι οποίες καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος δράσης, ώστε να μπορέσουμε να διακρίνουμε το βέλτιστο φαρμακολογικό αποτέλεσμα, μεταβήκαμε σε ένα σύνολο διαδοχικών αραιώσεων.

Αρχικά, για τις ουσίες που μελετήθηκαν(TNT396,TNT397,TNT403,TNT404,TNT405,TNT406) στις κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 και MCF-7, εφαρμόστηκαν οι συγκεντρώσεις 10/1/0,1/0,625 μM.

Με σκοπό, να δημιουργηθούν οι συγκεντρώσεις, εφαρμόσαμε διαδοχικές αραιώσεις από ένα αρχικό stock από κάθε ουσία, που η ταυτότητα της καθεμίας αναφέρθηκε στην ενότητα 3.1.3, με RPMI. Μετά τους κατάλληλους υπολογισμούς για την δημιουργία των επιθυμητών συγκεντρώσεων και τοποθέτηση της εκάστοτε ουσίας με θρεπτικό σε falcon, έπεται

-) Καλή ανάδευση των falcon με vortex

-) Προσθήκη 100μl της κάθε ουσίας με συγκεκριμένη συγκέντρωση στα αντίστοιχα μικροπλακίδια, τα οποία στοιχίσαμε με τις ουσίες

-) Στις θέσεις του πιάτου, που ορίσαμε τις θέσεις με τα κύτταρα ελέγχου και σε αυτές με τα κύτταρα Tzero, προσθέσαμε αποκλειστικά 100μl θρεπτικού μέσου.

-) Τοποθέτηση πιάτου(όχι αυτό των Tzero) στον κλίβανο και επώαση για 24h

Έπειτα, ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων Tzero με

-) προσθήκη 100μl TCA 20% ,το οποίο διατηρείται στους 4oC,σε κάθε μικροπλακίδιο με ιδιαίτερη προσοχή διότι είναι ιδιαίτερα καυστικό.

-) τοποθέτηση του πιάτου στο ψυγείο για 1h επώαση.

-) Με το πέρας του απαιτούμενου χρόνου επώασης, κάτω από την βρύση αποχύνεται το περιεχόμενο του κάθε μικροπλακιδίου με απότομες κινήσεις και γίνονται 3 πλύσεις με απιονισμένο νερό, για την πλήρη απομάκρυνση του TCA και του RPMI

-) Τέλος, αφήνεται να στεγνώσει το πιάτο για την απομάκρυνση μορίων νερού από το εσωτερικό των μικροπλακιδίων είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε για επιτάχυνση αυτής της διαδικασίας τοποθετείται το πιάτο σε μία περιοχή του κλίβανου που ασκεί πίεση αέρα στο πιάτο. Όστε, να χρωματιστεί το μικροπλακίδιο και να φωτομετρηθεί μαζί με αυτό που περιέχει τις ουσίες.

4^η ημέρα: Μικροσκοπική παρατήρηση του πιάτου, στο οποίο προστέθηκαν οι ουσίες

Στο στάδιο αυτό, παρατηρούνται κάτω από το μικροσκόπιο τα κύτταρα στα οποία προστέθηκαν οι ουσίες καθώς και τα κύτταρα ελέγχου, για να εξασφαλιστεί η σωστή πορεία του πειράματος. Φυσιολογικός κατά την παρατήρηση, θεωρείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ελέγχου σύμφωνα με την καρκινική κυτταρική σειρά και μία μερική αναστολή αυτού σε μικροπλακίδια που προστίθενται ουσίες. Η παρατήρηση αυτή, λαμβάνεται συγκριτικά. Εν συνεχεία, το πιάτο τοποθετείται στον κλίβανο για επώαση επιπλέον 24h.

5^η ημέρα : Διακοπή του πειράματος με μονιμοποίηση κυττάρων

Η διαδικασία αυτή, προαναφέρθηκε για τα κύτταρα ελέγχου στιγμής μηδέν(Tzero) και είναι ακριβώς η ίδια. Συνοπτικά, τοποθετούνται 100μl TCA20%σε κάθε θέση και μεταφέρεται το πιάτο στο ψυγείο για 1ηεπώαση. Μετά την 1h, αποχύνεται με έντονες κινήσεις το περιεχόμενο και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με απιονισμένο ύδωρ και το πιάτο αφήνεται να στεγνώσει.

Επόμενο και θεμελιώδες για το πείραμα βήμα, αποτελεί: Η χρώση κυττάρων με Σουλφοροδαμίνη Β (Sulforhodamine B,SRB).

Εφόσον, έχουμε βεβαιωθεί ότι τα μικροπλακίδια των πιάτων έχουν στεγνώσει καλά τοποθετείται η χρωστική: Αρχικά, προστίθενται σε κάθε θέση 50μl 0,4% w/v SRB διαλυμένη σε 1% οξικό οξύ.

Το πιάτο, αφήνεται για επώαση περίπου 10min, ώστε να απορροφηθεί η χρωστική από πρωτεΐνες των κυττάρων, σε θερμοκρασία δωματίου.

Εν συνεχεία, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με οξικό οξύ 1%, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η χρωστική που δεν απορροφήθηκε.

Μετά τις πλύσεις, το πιάτο αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Όταν το πιάτο στεγνώσει πλήρως, είναι έτοιμο για εφαρμογή του τελευταίου βήματος όπου αποτελεί η προσθήκη Trizma-base 10mM. Συγκεκριμένα, αφορά ένα αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα όπου αποδεσμεύει την χρωστική από τις πρωτεΐνες και διαλυτοποιεί την δεσμευμένη χρωστική στα σταθεροποιημένα κύτταρα, ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία της φωτομέτρησης μετέπειτα. Τοποθετούνται 150μl Trizma-Base σε συγκέντρωση 10mM σε κάθε πλακίδιο και το πιάτο μεταφέρεται στον κλίβανο για 10min επώαση.

Όταν ολοκληρωθεί η επώαση, το πιάτο τοποθετείται στην μικρή μπαλαρίνα για ήπια ανάδευση για 3-4minκαι μετράται η οπτική απορρόφηση στα 540nm σε φωτόμετρο microplate reader Biotek microelisa (Biotek, El-311).

Τα αποτελέσματα των απορροφήσεων, που λάβαμε από τις μετρήσεις μεταφέρονται πρόγραμμα EXCEL όπου υπολογίζονται οι εξής παράμετροι για κάθε ουσία:

TGI (Total Growth Inhibition): ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας (φαρμάκου ή χημικής ένωσης) που προκαλεί πλήρη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Φανερώνει την συνολική αναστολή ανάπτυξη. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση αυτή, αξιοποιείται η εξής εξίσωση:

$$100 \times (T - T_0)/T_0 = -50$$

GI50 (Growth Inhibition of 50%): ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας (φαρμάκου ή χημικής ένωσης) που προκαλεί αναστολή της αύξησης των κυττάρων κατά 50% σε σχέση με την αύξηση χωρίς θεραπεία. Φανερώνει την μερική αναστολή και για τον προσδιορισμό της παρατηρείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Ο τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό είναι ο εξής:

$$100 \times (T - T_0)/(T_c - T_0) = 50$$

LC50 (Lethal Concentration of 50%):ορίζεται ως η συγκέντρωση της ουσίας (φαρμάκου ή χημικής ένωσης) που προκαλεί θάνατο στο 50% των κυττάρων. Αντικατοπτρίζει την κυτταρική θνησιμότητα. Ο τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό είναι ο εξής:

$$100 \times (T - T_0)/T_0 = -50$$

Όπου: Tc = η οπτική πυκνότητα μιας θέσης δείγματος ελέγχου control μετά από 48 ώρες

T= η οπτική πυκνότητα μιας θέσης έπειτα από χορήγηση της υπό μελέτης ουσίας

T0= η οπτική πυκνότητα μιας θέσης τη στιγμή προσθήκης της υπό μελέτης ουσίας

3.1.12 ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (Wound Healing assay)

Η δοκιμασία επούλωσης τραυμάτων ή διαδικασία γρατζουνίσματος *invitro* αποτελεί μία απλή, οικονομική, αποδοτική μέθοδο με δυνατότητα οπτικοποίησης σε πραγματικό χρόνο, παρέχοντας ποσοτικά δεδομένα για την κυτταρική μετανάστευση. Αποτελεί τεχνική που μιμείται την διαδικασία επούλωσης πληγών στον ζωντανό οργανισμό. Γνωστό θεωρείται, πως η κυτταρική μετανάστευση προς σχηματισμό όγκου αποτελεί σημαντική συντεταγμένη στην καρκινογένεση. Έτσι δημιουργείται μία χαραγή στο κέντρο κάθε μικροπλακιδίου και με στιγμιότυπα σε τακτά χρονικά διαστήματα παρατηρούμε τον βαθμό επούλωσης της πληγής με την προσθήκη των αντίστοιχων ουσιών, μέσω του ρυθμού κυτταρικής μετανάστευσης. Αυτό, αντανακλά την μεταστατικότητα και τον βαθμό διήθησης των καρκινικών κυττάρων, συναρτήσει της επίδρασης που έχουν οι προστιθέμενες ουσίες στην άρση της καρκινογένεσης (Abcam, n.d.; Rodriguez, Wu&Guan, 2005).

Κατά την εκπόνηση της πτυχιακής, πραγματοποιήσαμε την μέθοδο ελέγχου επούλωσης πληγών στις κυτταρική σειρά MDA-MB231 με την ουσία TNT405 στις συγκεντρώσεις 1μM, 0,5μM, 0,1μM. Η TNT405, επιλέχθηκε καθώς σύμφωνα με τις παραπάνω παραμέτρους (GI50= 0,3μM, TGI=1,2μM, LC50= 1,9μM) που προέκυψαν από το πείραμα κυτταροτοξικότητας SRB, θεωρήθηκε η πιο δραστική υπό μελέτη ουσία και η κυτταρική σειρά MB231 η πιο ευαίσθητη.

Έτσι, τα στάδια της διαδικασίας περιγράφονται παρακάτω :

-)Ανανέωση θρεπτικού υλικού

-) Την επόμενη μέρα, γίνεται ανακαλλιέργεια και συλλογή κυττάρων (ενότητα 3.1.7), ώστε ο αριθμός των κυττάρων της καρκινικής σειράς MDA-MB231 σε κάθε θέση να ανέλθει στα 30.000 κύτταρα ανά θέση.

-)Σε κάθε θέση, προστέθηκαν 100μlκυττάρων(που διαθέτουν περίπου 30.000 κύτταρα) και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για 24h

-) Με το πέρας των 24h, ετοιμάστηκαν οι παραπάνω αραιώσεις της υπό μελέτη ουσίας και πραγματοποιήθηκαν οι πληγές στα μικροπλακίδια ως εξής: Με ένα tip κάνω χαραγές στο πιάτο κάθε μικροπλακιδίου και με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας (100-1000μl), την οποία την βάζω σε μέτρηση των 150μlαπομακρύνω όλο το υπερκείμενο, τοποθετώντας προσεκτικά τοτίρσο σημείο που έκανα την πληγή, διότι σε εκείνο το σημείο ξεκόλλησαν τα κύτταρα. Προτείνεται, η διαδικασία να πραγματοποιείται διαδοχικά ανά συγκέντρωση, δηλαδή να μαζεύονται τα υπερκείμενα από κάθε μικροπλακίδιο μετά από την δημιουργία πληγών που θα γίνει μαζικά. Έπειτα, με την απομάκρυνση του υπερκείμενου , πραγματοποιούνται πλύσεις προσθέτοντας 100μlαπό 0,9% NaCl σε κάθε μικροπλακίδιο με μεγάλη προσοχή και καθόλου απότομες κινήσεις ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κύτταρα τα οποία ξεκόλλησαν από τη δημιουργία της πληγής. Τέλος, με ιδιαίτερη προσοχή προστίθεται στη κάθε θέση 200μl από την σωστή συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας ενώ στα κύτταρα μάρτυρες προστίθεται 200μl RPMI.

Όταν ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία, το μικροπλακίδιο τοποθετείται στο ανάστροφο μικροσκόπιο και γίνεται λήψη στιγμιότυπων (μέσω της κάμερας AxionCam ERc5s της εταιρίας Zeiss) από κάθε θέση με ιδιαίτερη προσοχή , ώστε να κεντράρεται η πληγή που εφαρμόσαμε και να

φαίνονται δίπλα από αυτήν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή, εφαρμόζεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στην συγκεκριμένη εργασία, λήφθηκαν φωτογραφίες την χρονική στιγμή 0h, 24h, 48h.

Θεωρείται επιτακτική ανάγκη, η επίδειξη της δέουσας προσοχής από μέρους του ερευνητή, ώστε να λάβει φωτογραφίες στο ίδιο σημείο στα παραπάνω χρονικά διαστήματα και να συζητηθεί έτσι η ικανότητα της ουσίας να κλείσει την πληγή που δημιουργήθηκε για κάθε συγκέντρωση, λαμβάνοντας συμπεράσματα για την αντικαρκινική της ικανότητα με γνώμονα την μετανάστευση των κυττάρων και κλείσιμο της πληγής. Φυσικά τα συμπεράσματα, λαμβάνονται συγκριτικά με φωτογραφίες στο ίδιο μικροπλακίδιο στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αφετέρου σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου τα οποία δεν εμποτίστηκαν με την υπό μελέτη ένωση παρά μόνο με θρεπτικό μέσο.

Οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν σε PowerPoint, μετρήθηκε το εμβαδόν κάθε πληγής και με τη χρήση Excel η μετατροπή αυτών σε ποσοστό ανοιχτής πληγής ή ποσοστό μετανάστευσης κυττάρων.

3.1.13 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΛΩΝΩΝ (Clonogenic Assay)

Η μέθοδος αναστολής δημιουργίας κλώνων ή δοκιμασία σχηματισμού αποικίας, αποτελεί μία *in vitro* δοκιμασία που αξιολογεί την ικανότητα μεμονωμένων κυττάρων όταν επιδίδονται σε διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις να δημιουργήσουν αποικίες(κλώνους) κυττάρων. Δηλαδή, εξετάζεται η δυνατότητα αποικιογένεσης ως δείκτης κυτταρικής λειτουργικότητας και βιωσιμότητας με την προσθήκη της εξεταζόμενης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσίας. Παρατηρούνται οι διαφορές στον αριθμό των σχηματιζόμενων αποικιών, μεταξύ των μικροπλακιδίων που εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ουσίας και συμπεραίνεται η πιο αποτελεσματική εξ αυτών συγκέντρωση. Ο σχηματισμός κλώνων ερμηνεύεται ως ένα χαρακτηριστικό που έχουν τα καρκινικά κύτταρα για την έναρξη σχηματισμού του όγκου. Συνεπώς, εξετάστηκε η επίδραση της προστιθέμενης κυτταροτοξικής ουσίας στην εμφάνιση των αποικιών και κατ'επέκταση των όγκων. Σύμφωνα με τα πειράματα ελέγχου κυτταροτοξικότητας SRB που εφαρμόσαμε πρώτα, βρέθηκε ότι η αποτελεσματικότερη ουσία είναι η TNT405. Ειδικότερα, αξιολογήθηκε η ικανότητα αναστολής δημιουργίας αποικιών στην καρκινική σειρά του μαστού MDA-MB231 στις συγκεντρώσεις 0,1μM/0,01μM/0,001μM συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου χωρίς την ουσία (Franken et al., 2006).

Για την έναρξη της διαδικασίας, εφαρμόζουμε στα καρκινικά κύτταρα της φλάσκας θρυψινοποίηση όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 3.1.7 και υπολογισμό του αριθμού κυττάρων που απαιτούνται για το πείραμα. Ακόμη, σε 3 falcon προσθέσαμε την υπό μελέτη ουσία σε αναλογία με το θρεπτικό τέτοια, ώστε να προετοιμάσουμε για το πείραμα μας τις παραπάνω συγκεντρώσεις. Κατά την εκπόνηση του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήσαμε την καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB231 και υπολογίσαμε περίπου 400 κύτταρα ανά πηγάδι. Έπειτα κινηθήκαμε ως εξής :

Σε μικροπλακίδια των 6 θέσεων, προσθέσαμε με την χρήση κατάλληλης πιπέτας (100-1000μl), 1ml ανά θέση και το τοποθετούμε για επώαση 24h.

Με το πέρας των 24h, προσθέσαμε 1ml σε κάθε θέση από κάθε συγκέντρωση μίας εκ των τριών συγκεντρώσεων της υπό μελέτης ουσίας και 1ml RPMI 10% στα κύτταρα ελέγχου. Προηγήθηκε η προετοιμασία των αραιώσεων με την ολοκλήρωση της επώασης.

Στην συνέχεια, τοποθετήσαμε το μικροπλακίδιο για επώαση 14 ημερών . Την πρώτη εβδομάδα επώασης, ανανεώνουμε το περιεχόμενο των θέσεων . Όταν περάσουν οι 14 ημέρες, εξετάζουμε τα αποτελέσματα μέσω της οπτικοποίησης κλώνων. Για να επιτευχθεί αυτό, προσθέσαμε 500μl TCA 20%, για να μονιμοποιήσουμε τα κύτταρα στον πάτο των θέσεων. Τοποθετούμε στο ψυγείο στους -4°C τα πιάτα για 1h. Μετά από μία ώρα, αφαιρούμε το περιεχόμενο των πιάτων με έντονες κινήσεις και

κάνουμε 2-3 πλύσεις με απιονισμένο νερό, για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του TCA. Έπειτα, αφήνουμε το πιάτο να στεγνώσει και αφού απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία από τα πιάτα, προσθέτουμε 250μl της χρωστικής SRB και αφήνουμε περίπου 10min, ώστε να διεισδύσει η χρωστική πλήρως στις πρωτεΐνες. Μετά το πέρας της ώρας, αφαιρούμε με έντονες κινήσεις την χρωστική και εφαρμόσουμε οξικό οξύ 1%, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η χρωστική. Έπειτα, αφού έχουν στεγνώσει τα 6 plates προσθέτουμε 1ml Trizma-Base 10M ανά θέση και τοποθετούνται στο κλίβανο για 10 λεπτά κατόπιν από κάθε well λαμβάνονται 150μl και τοποθετούνται σε well από 96well και φωτομετρείται το πιάτο, μετρώντας την οπτική πυκνότητα στα 540nm. Τέλος, εφαρμόζουμε σκανάρισμα των πηγαδιών και λήψη φωτογραφιών με το μικροσκόπιο, καθώς οι αποικίες είναι εμφανείς μετά τη χρώση με την SRB.

3.1.14 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας έγινε με τη βοήθεια του Student's t-test του προγράμματος Microsoft Excel. Μέσω του T-test υπολογίσαμε τη στατιστική σημαντικότητα γνωστή ως p-value για κάθε πειραματική διαδικασία. Η στατιστική σύγκριση έγινε για κάθε συγκέντρωση και υπό μελέτη ουσία συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου. Ένα αποτέλεσμα κρίθηκε στατιστικά σημαντικό εφόσον το p-value ήταν μικρότερο του 0,05.

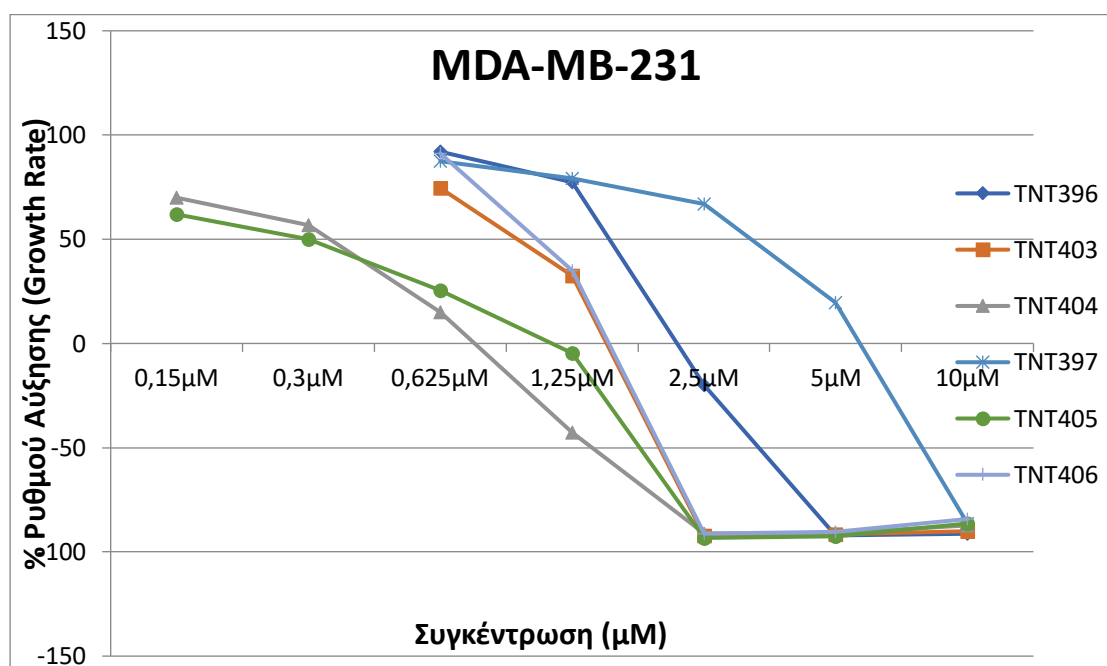
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΧΡΩΣΗ SRB

Όπως προαναφέρθηκε, η μέθοδος ελέγχου κυτταροτοξικότητας με χρώση εξετάζει το ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας υπό την επίδραση των υπό μελέτη ουσιών και την κυτταροτοξικότητα αυτών *in vitro*, με χρήση της χρωστικής SRB (Sulforhodamine B) η οποία δεσμεύεται στις κυτταρικές πρωτεΐνες των ζωντανών κυττάρων. Η μέθοδος αυτή αξιοποιήθηκε πρώτα ώστε να φανερώσει την αποτελεσματικότερη ουσία που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω έρευνα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση των ουσιών TNT396, TNT397, TNT403, TNT404, TNT405 και TNT406 στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού MCF-7 και MDA-MB231 στις συγκεντρώσεις 10/5/2,5/1,25/0,6 μM . Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, υπολογίστηκε ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων και με βάση αυτόν υπολογίστηκαν οι παράγοντες GI50, TGI και LC50 (ενότητα 3.1.1). Με την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα που αντιπροσωπεύουν τις μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για κάθε καρκινική κυτταρική σειρά.

MDA-MB231

Στο γράφημα που ακολουθεί, φανερώνεται ο ρυθμός κυτταρικής ανάπτυξης υπό την επίδραση των έξι υπό μελέτη ουσιών στις συγκεντρώσεις που προαναφέραμε. Προέκυψε από τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



ΓΡΑΦΗΜΑ 1: Ρυθμός αύξησης των κυττάρων MDA-MB231 υπό την επίδραση των 6 υπό μελέτη ουσιών

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στην μέγιστη συγκέντρωση 10 μM , υπάρχει αρκετά μεγάλη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και για τις 6 ουσίες που ανέρχεται περίπου στο 87% (TNT396: -91,3%, TNT403: -90%, TNT404: -87,4%, TNT397: -86,45%, TNT405: -86,31%, TNT406: -84,14%). Η αρνητική τιμή δηλώνει ότι οι υπό μελέτη ουσίες έχουν υψηλή κυτταροτοξική δράση.

Στην συγκέντρωση 5μM, ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σχεδόν στα ίδια επίπεδα με τις περισσότερες ουσίες (TNT396: -92,09%, TNT403: -91,49%, TNT404: -91,02%, TNT405: -92,38%, TNT406: -90,46%). Όσοι υπό την επίδραση της ουσίας TNT397, παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης σε ποσοστό 19,68.

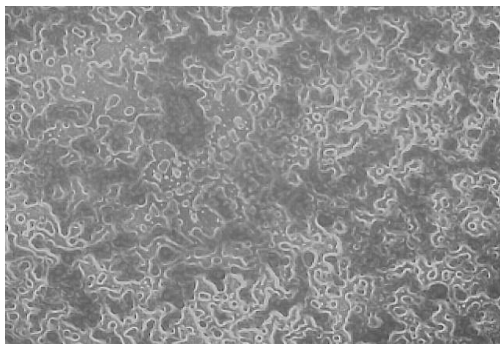
Σε επόμενη συγκέντρωση 2,5μM, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων MDA-MB231 παρέμεινε σχεδόν ίδιος υπό την επίδραση των ουσιών (TNT403: -92,3%, TNT404: -91,15%, TNT405: -93,31%, TNT406: -91,23%). Όμως παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων υπό την προσθήκη της TNT396 αυξήθηκε σε ποσοστό -20,03% και με την επίδραση της TNT397 σε ποσοστό 66,9%.

Στην συγκέντρωση 1,25μM, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων αυξήθηκε υπό την προσθήκη όλων των υπό μελέτη ουσιών με τα ποσοστά να ανέρχονται στα εξής: TNT396: 77,29%, TNT403: 32,43%, TNT404: -42,63%, TNT397: 79,09%, TNT405: -4,56%, TNT406: 35,03%.

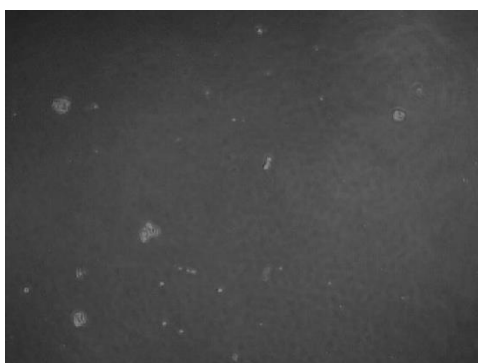
Έπειτα, με την προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών στην συγκέντρωση 0,625μM στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB231, παρατηρείται μία γενική αύξηση του ρυθμού κυτταρικής ανάπτυξης : TNT396: 92,03%, TNT403: 74,57%, TNT397: 87,43%, TNT406: 91,19%, υποδηλώνοντας ότι οι ουσίες στη συγκέντρωση αυτή δεν έχουν απολύτως καμία δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων. Όσοι, οι ουσίες TNT404 και TNT405 με τις τιμές τους να είναι αξιοσημείωτα χαμηλές, 15,12% και 25,41% αντίστοιχα, αξιολογήθηκαν στις συγκεντρώσεις 0,3μM και 0,15μM. Τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση 0,3μM είναι για την TNT404: 56,73% και για την TNT405: 50,03%, δηλαδή στη συγκεκριμένη συγκέντρωση επιτυγχάνουν 50% αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων. Τέλος, όσον αφορά την 0,15μM συγκέντρωση εδώ παρατηρείται για την TNT404 μια αύξηση του 20% (69,95%) ενώ για την TNT405 μόνο ένα 10% (61,94%).

Στην εικόνα 18 παρουσιάζονται δειγματοληπτικά φωτογραφίες τραβηγμένες από το ανάστροφο μικροσκόπιο κατόπιν χρωματισμού με SRB των κυττάρων ελέγχου MDA-MB231 καθώς και των κυττάρων που εκτέθηκαν στις υπό μελέτη ουσίες TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405 και TNT406 στις συγκεντρώσεις 10μM και 1,25μM.

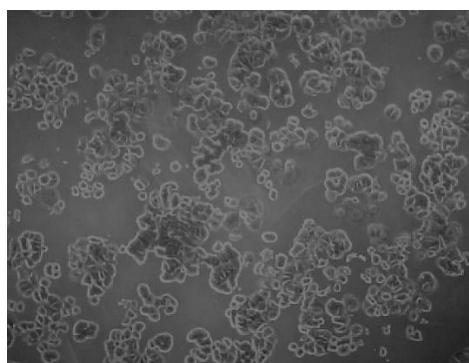
CONTROL MDA-MB231



TNT396 10Mμ



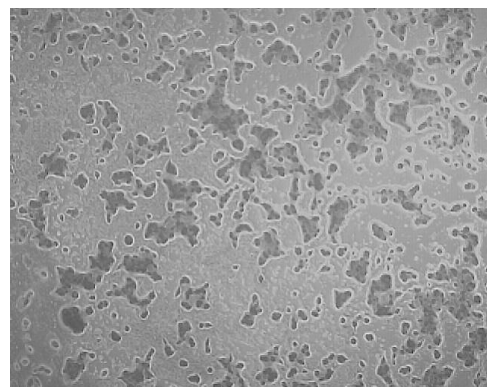
TNT396 1,25 μM



TNT403 10μM



TNT403 1,25μM



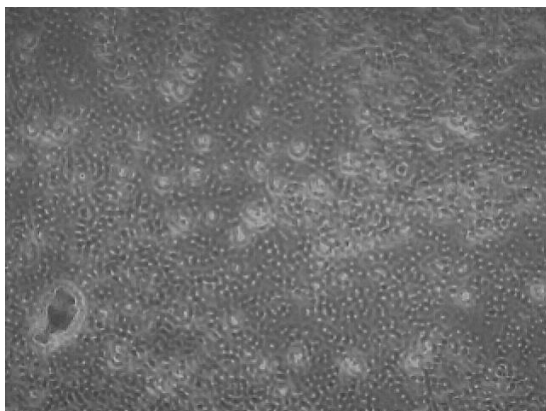
TNT404 10μM



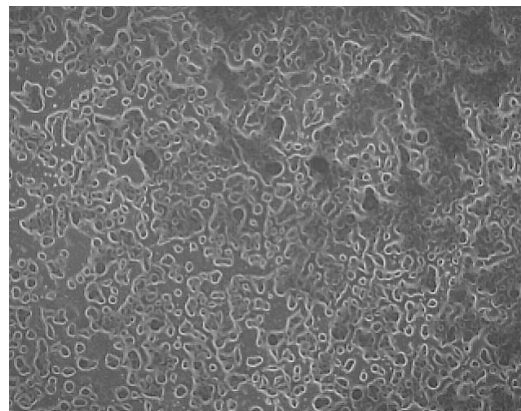
TNT404 1,25μM



TNT397 10 μ M



TNT397 1,25 μ M



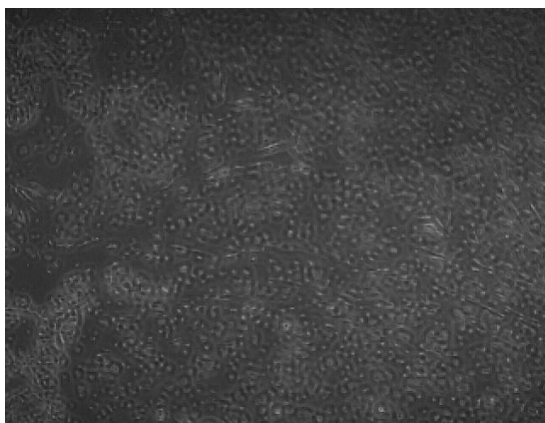
TNT405 10 μ M



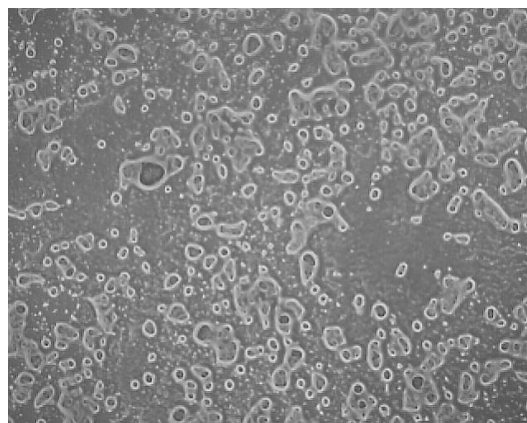
TNT405 1,25 μ M



TNT406 10 μ M



TNT406 1,25 μ M



ΕΙΚΟΝΑ 14: Φωτογραφίες κυττάρων ελέγχου MDA-MB231 και κυττάρων που εκτέθηκαν σε 10 μ M και 1,25 μ M των TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405, TNT406.

Από τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων, υπολογίστηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50, οι μέσες τιμές των οποίων που προκύπτουν από τρία ανεξάρτητα πειράματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας απεικόνισης των τιμών GI50, TGI, LC50 και TI των MDA-MB231 υπό την επίδραση TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405, TNT406.

MDA-MB231	TNT396	TNT403	TNT404	TNT397	TNT405	TNT406
GI50 (μM)	1,6	1	0,4	3,4	0,3	1,1
TGI (μM)	4,5	1,6	0,8	5,9	1,2	1,8
LC50 (μM)	6,6	6,6	1,4	8,3	1,9	2,5
TI	4,2	2,1	4,0	2,4	6,0	2,2

Σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 1, δημιουργούνται κάποια σχόλια για κάθε υπό μελέτη ουσία, με γνώμονα τις τρεις παραμέτρους μεμονωμένα. Συγκεκριμένα:

Όσο αφορά την παράμετρο GI50, παρατηρείται ότι η ουσία με την χαμηλότερη τιμή της συγκεκριμένης παραμέτρου είναι η TNT405 όπου η συγκέντρωση της που προκαλεί αναστολή στο 50% ορίζεται ως 0,3μM. Έπειτα, ακολουθούν οι TNT404, TNT403 και TNT406 με συγκεντρώσεις 0,4μM, 1μM, 1,1μM αντίστοιχα και οι μητρικές ενώσεις TNT396 και TNT397 με συγκεντρώσεις 1,6μM και 3,4μM αντίστοιχα. Ακόμη, παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα ($p < 0,05$) μεταξύ των μητρικών και των υβριδικών ενώσεων, πιο συγκεκριμένα, μεταξύ της TNT396 και TNT403/TNT404 μεταξύ της TNT397 και TNT405/TNT406. Έτσι λοιπόν, επιβεβαιώνεται ότι τα υβριδικά μόρια είναι πιο αποτελεσματικά στην αναστολή της ανάπτυξης των MDA-MB231 από τις αντίστοιχες μητρικές ενώσεις.

Κατόπιν, τη χαμηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ολική αναστολή της ανάπτυξης (TGI) των MDA-MB-231 την έχει η TNT404 (0,8μM). Έπειτα ακολουθούν οι TNT405, TNT406 και TNT403 με αντίστοιχες τιμές 1,2μM, 1,8μM, 1,6μM και στην συνέχεια ακολουθούν οι μητρικές ενώσεις TNT396 και TNT397 με τιμές 4,5μM και 5,9μM αντίστοιχα. Ομοίως, μεταξύ των μητρικών και υβριδικών ενώσεων παρουσιάζονται στατιστικές διαφορές ($p < 0,05$) με μικρή διαφορά ότι μεταξύ της μητρικής TNT396 και της υβριδικής TNT403, η στατιστική απόκλιση σημειώθηκε ελαφρώς μεγαλύτερη από 0,05 ($p = 0,06$).

Αναφορικά η LC50 μίας ουσίας, είναι η συγκέντρωση εκείνης που προκαλεί θάνατο στο 50 % του κυτταρικού πληθυσμού και σύμφωνα με τον πίνακα η χαμηλότερη τιμή της παραμέτρου σημειώθηκε στην TNT404 με τιμή 1,4μM. Έπειτα, ακολουθούν οι TNT405, TNT403, TNT406 με τιμές 1,9μM, 6,6μM, 2,5μM αντίστοιχα και τέλος οι μητρικές ενώσεις TNT396 και TNT397 με τιμές 6,6μM και 8,3μM αντίστοιχα. Και εδώ μεταξύ των μητρικών και των υβριδικών η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$).

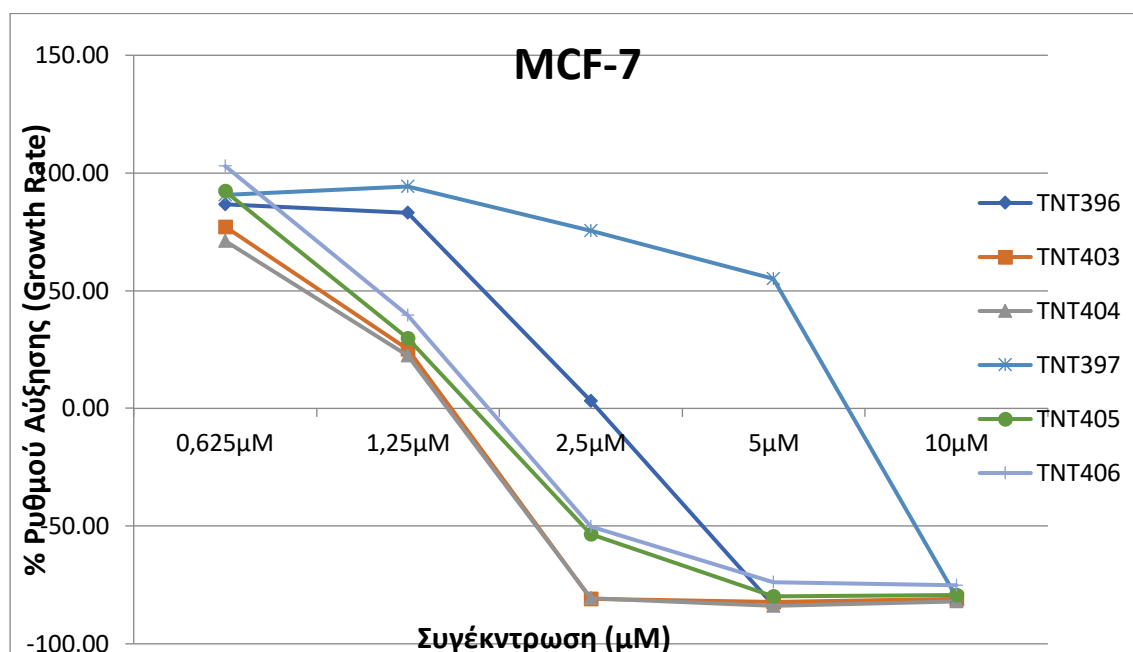
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η TNT405 έχει τον υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη, ακολουθούν οι TNT396 και TNT404 με 4,2 και 4, αντίστοιχα και τέλος οι TNT397, TNT406 και TNT403 (2,4, 2,2 και 2,1).

Συμπερασματικά, διαπιστώνεται η ουσία TNT405 ήταν η πιο δραστική έναντι στον πολλαπλασιασμό των MDA-MB231 όπως προκύπτει από την εξαιρετικά χαμηλή τιμή της GI50. Ωστόσο, όλες οι τιμές των υπολοίπων ουσιών είναι αρκετά κοντά.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των έξι υπό μελέτη ουσιών στην ανάπτυξη των κυττάρων MCF-7.

MCF-7

Παρακάτω παρατίθεται ένα γράφημα απεικόνισης του ρυθμού ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων της κυτταρικής σειράς MCF-7 του μαστού, υπό την επίδραση έξι ουσιών όπως και στην προηγούμενη κυτταρική σειρά που εφαρμόστηκαν στις συγκεντρώσεις 10/5/2,5/1,25/0,625μM. Το γράφημα προέκυψε εξίσου από τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από την διεξαγωγή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.



ΓΡΑΦΗΜΑ 2: Ρυθμός αύξησης των κυττάρων MCF-7 υπό την επίδραση των 6 υπό μελέτη ουσιών

Από το γράφημα παρατηρείται στην υψηλότερη συγκέντρωση των 10μM αρκετά μεγάλη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και για τις 6 υπό μελέτη ουσίες με μέσο όρο μείωσης να κυμαίνεται στο 79,84% (TNT396: -81,46%, TNT403: -80,85%, TNT404: -82,1%, TNT397: -80,19%, TNT405: -79,33%, TNT406: -75,13%). Οι αρνητικές τιμές υποδεικνύουν την υψηλή κυτταροτοξικότητα των ουσιών στην μέγιστη συγκέντρωση.

Έπειτα, όταν υποδιπλασιάστηκε η συγκέντρωση (5μM) παρατηρήθηκε σχεδόν παρόμοιος ρυθμός μείωσης κυτταρικής αύξησης στις υπό μελέτη ουσίες (TNT396: -83,61%, TNT403: -82,22%, TNT404: -83,86%, TNT405: -79,83%, TNT406: -73,81%). Ωστόσο, στην ουσία TNT397 στην συγκεκριμένη συγκέντρωση παρατηρήθηκε ότι καταστέλλει την ανάπτυξη σχεδόν το 50% των κυττάρων (55,2%).

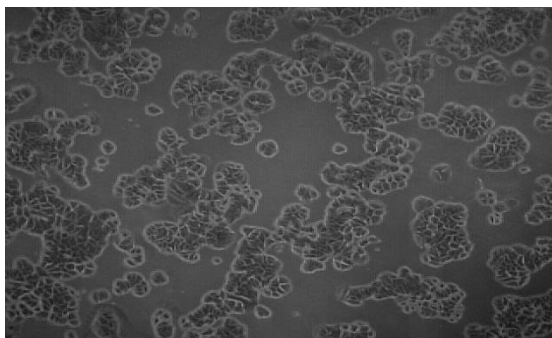
Στην συνέχεια, με εφαρμογή συγκέντρωσης 2,5μM των υπό μελέτη ουσιών στα καρκινικά κύτταρα MCF7, σημειώθηκαν τα εξής ποσοστά ρυθμού αύξησης των κυττάρων : Οι ενώσεις TNT403, TNT404, TNT405, TNT406 εμφάνισαν αρνητικό ποσοστό με τις τιμές να ανέρχονται στα -80,87%, -80,61%, -53,55%, -50,29% αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει τον υψηλό βαθμό κυτταροτοξικότητας των ουσιών. Όμως, οι μητρικές ουσίες TNT396, TNT397 εμφάνισαν ποσοστά που προσεγγίζουν τα 3,02% και 75,6% αντίστοιχα.

Ακόμη, στην συγκέντρωση 1,25μM τα ποσοστά στον ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης αυξήθηκαν λαμβάνοντας τις παρακάτω τιμές : TNT396: 83,08%, TNT403: 25,18%, TNT404: 22,39%, TNT397: 94,25%, TNT405: 29,7%, TNT406: 39,59%. Διαπιστώνεται ότι οι μητρικές ουσίες χάνουν την δράση τους.

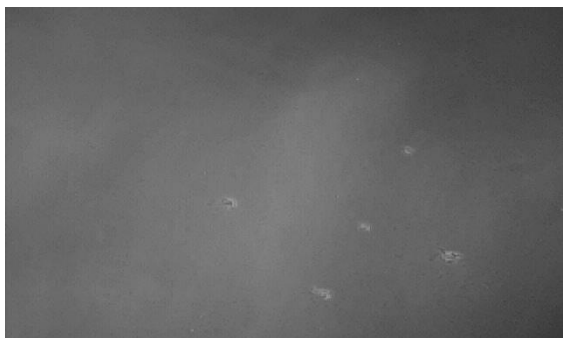
Τέλος, στην συγκέντρωση 0,625μM, τα ποσοστά του ρυθμού κυτταρικής αύξησης σημείωσαν μέγιστες τιμές που προσεγγίζουν το 100%, δηλαδή δεν υπάρχει κάποια δράση των ουσιών καθώς τα

κύτταρα πολλαπλασιάζονται κανονικά. Πιο συγκεκριμένα, TNT396: 86,68%, TNT403: 77,19%, TNT404: 71,15%, TNT397: 90,56%, TNT405: 92,22%, TNT406: 102,93%. Παρακάτω στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται δειγματοληπτικά φωτογραφίες τραβηγμένες από το ανάστροφο μικροσκόπιο κατόπιν χρωματισμού με SRB των κυττάρων ελέγχου καθώς και κύτταρα που εκτέθηκαν στις υπό μελέτη ουσίες TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405 και TNT406 στις συγκεντρώσεις 10 μ M και 1,25 μ M, αντίστοιχα.

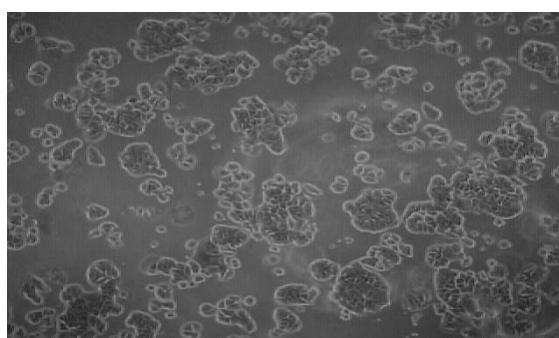
CONTROL MCF-7



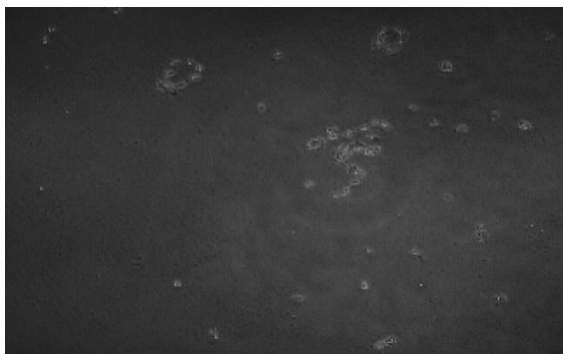
TNT396 10 μ M



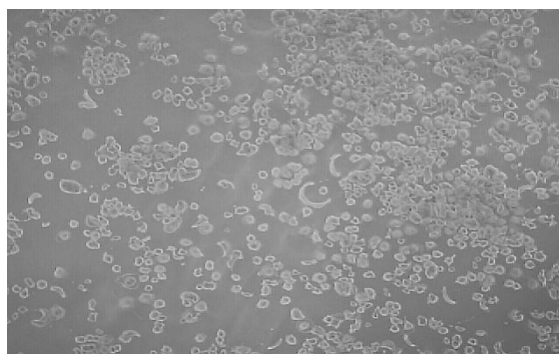
TNT396 1,25 μ M



TNT403 10 μ M



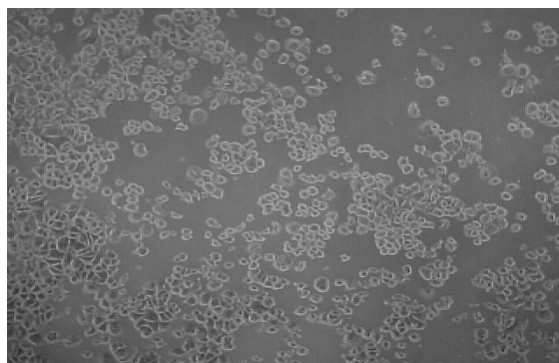
TNT403 1,25 μ M



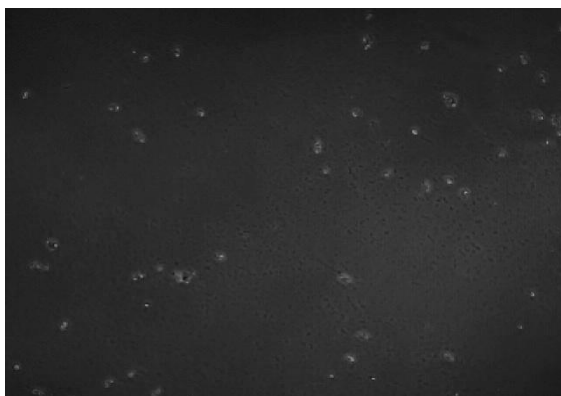
TNT404 10 μ M



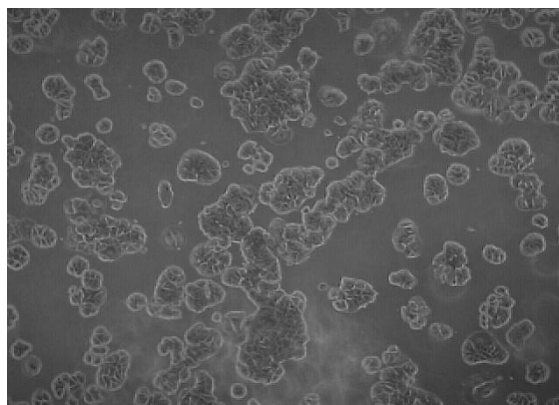
TNT404 1,25 μ M



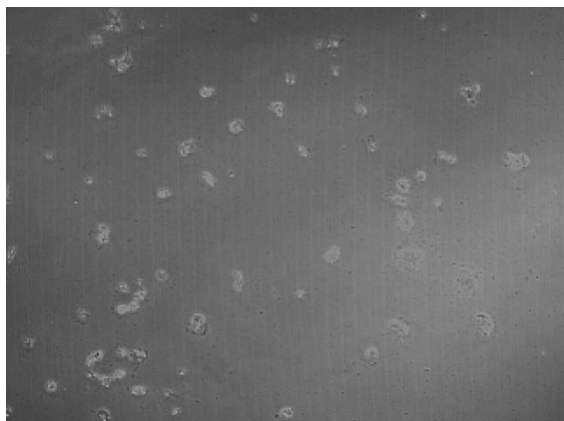
TNT397 10 μ M



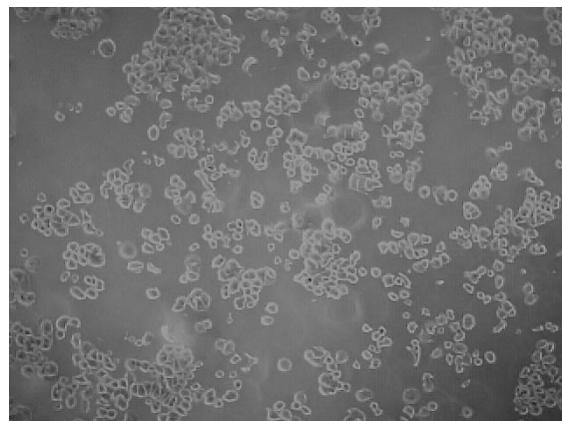
TNT397 1,25 μ M



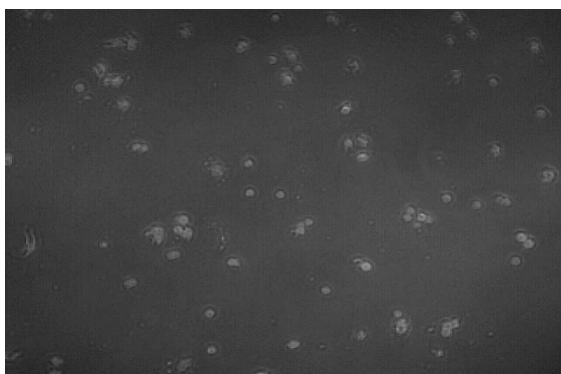
TNT 405 10 μ M



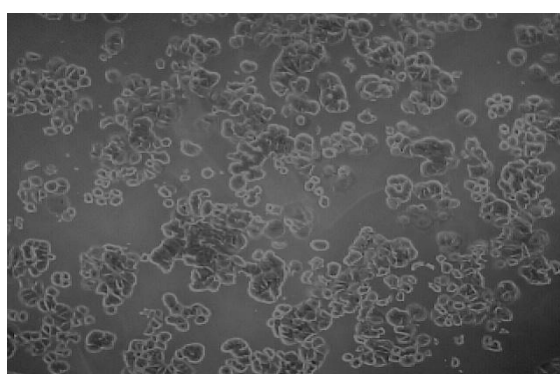
TNT 405 1,25 μ M



TNT406 10 μ M



TNT406 1,25 μ M



ΕΙΚΟΝΑ 15 Λήψη φωτογραφιών κυττάρων ελέγχου MCF-7 και κυττάρων που εκτέθηκαν σε 10 μ M και 1,25 μ M TNT396, TNT403, TNT404, TNT397, TNT405, TNT406.

Στην συνέχεια, με βάση το παραπάνω διάγραμμα υπολογίστηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50, με βάση τους οποίους θα συμπεράνουμε την ουσία με την κατάλληλη κυτταροτοξική δράση για τα κύτταρα MCF-7 ώστε να προχωρήσουμε στα επόμενα πειράματα. Οι τιμές των δεικτών αυτών απεικονίζονται στο παρακάτω πίνακα.

MCF-7	TNT396	TNT403	TNT404	TNT397	TNT405	TNT406
GI50 (μ M)	1,8	1	0,9	5,6	1	1,1
TGI (μ M)	2,6	1,5	1,5	7	1,7	1,8
LC50 (μ M)	4	2,1	2,1	8,9	2,4	2,5
TI	2,3	2,2	2,4	1,6	2,3	2,2

Πίνακας 2 Τιμές GI50, TGI και LC50 από τις έξι υπό μελέτη ουσίες μετά τη χορήγηση σε καρκινικά κύτταρα MCF-7

Όσο αφορά την παράμετρο GI50, η οποία αποκαλύπτει την συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται για να καταστείλει κατά 50% την κυτταρική αύξηση, η μικρότερη τιμή είναι της TNT404 με την τιμή να ανέρχεται στα 0,9 μ M. Έπειτα, ακολουθούν οι ουσίες TNT403, TNT405, TNT406 με αντίστοιχες τιμές 1 μ M, 1 μ M, 1,1 μ M, ενώ οι μητρικές ενώσεις TNT396 και TNT397 έχουν αντίστοιχα τις τιμές 1,8 μ M και 5,6 μ M.

Στην συνέχεια, όσο αφορά την παράμετρο TGI, την χαμηλότερη τιμή την διαθέτουν οι TNT403 και TNT404 (1,5 μ M) και ακολουθούν οι TNT405, TNT406 με τιμές 1,7 μ M, 1,8 μ M, αντίστοιχα. Η μητρική ένωση TNT397 εμφανίζει σχεδόν τριπλάσια τιμή TGI από την TNT396, με τιμές 7 μ M και 2,6 μ M, αντίστοιχα.

Όσον αφορά την παράμετρο LC50, την χαμηλότερη τιμή παρουσιάζουν οι TNT403 και η TNT404 με τιμή 2,1 μ M, ενώ ακολουθούν οι TNT405 (2,4 μ M) και η TNT406 (2,5 μ M), ενώ η μητρική ένωση TNT397 έχει σχεδόν διπλάσια τιμή LC50 από την TNT396 με τιμές 8,9 μ M και 4 μ M, αντίστοιχα.

Και στις τρεις παραμέτρους παρουσιάζεται στατιστική απόκλιση μεταξύ μητρικών και υβριδικών ενώσεων με ($p < 0,05$) ενώ δεν παρουσιάζεται η ίδια στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των υβριδικών ενώσεων (TNT403-TNT404, TNT405-TNT406).

Τέλος, τον υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη τον έχει η TNT404 με 2,4 κατόπιν οι TNT405 και TNT396 με 2,3, στη συνέχεια οι TNT403, TNT406 (2,3) και τέλος τον χαμηλότερο η TNT397, 1,6.

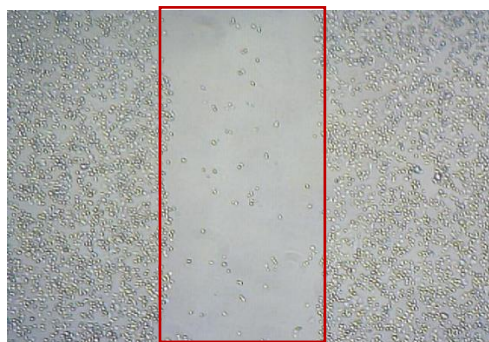
Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα και των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η καλύτερη ουσία είναι η TNT405, ώστε να μελετηθεί περεταίρω, λόγω της χαμηλότερης τιμής GI50 που έχει στα κύτταρα MDA-MB-231, 0,3 μ M και έχει τον υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη με 6.. Ακόμη, όλες οι ουσίες έδειξαν εκλεκτικότητα στα κύτταρα MDA-MB-231

και διέθεταν τους υψηλότερους θεραπευτικούς δείκτες. Για αυτούς τους λόγους καθώς και ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα αντιπροσωπεύουν το τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού, έναν τύπο καρκίνο με κακή πρόγνωση και πρόκληση για τους ογκολόγους, αποφασίστηκε ότι τα επόμενα πειράματα θα διεξαχθούν σε αυτά.

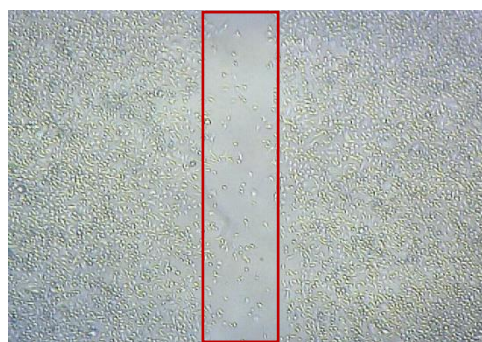
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΩΝ (WOUND HEALING ASSAY)

Η μέθοδος επούλωσης πληγών, αντανακλά την μετακίνηση και την μετανάστευση των κυττάρων με σκοπό να κλείσουν την πληγή υπό την επίδραση της υπό μελέτη ουσίας TNT405. Εφαρμόστηκαν οι συγκεντρώσεις 1/0,5/0,1 μM στη καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB231. Για την εξαγωγή του συμπεράσματος, ελήφθησαν φωτογραφικά στιγμιότυπα μέσω του μικροσκοπίου στο σημείο της πληγής σε χρονικά διαστήματα 0, 24 και 48 ώρες από την στιγμή χάραξης της πληγής. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 16) παρατίθενται ενδεικτικά φωτογραφίες από το ανάστροφο μικροσκόπιο.

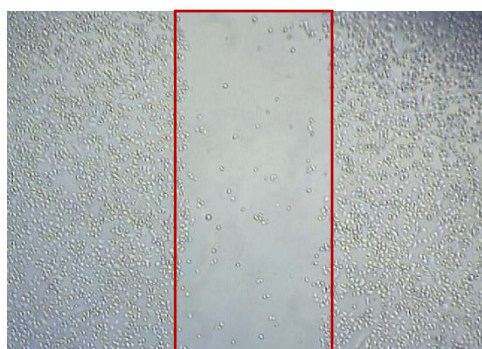
CONTROL 0H



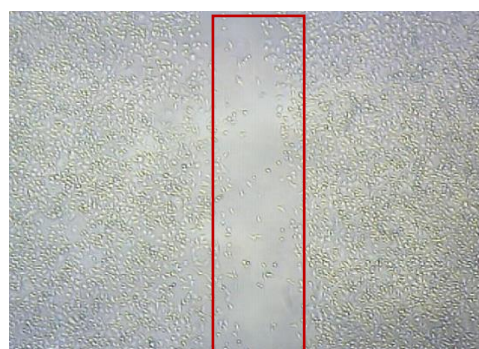
CONTROL 24H



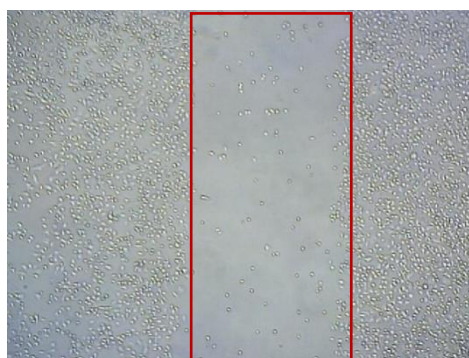
1 μM 0H



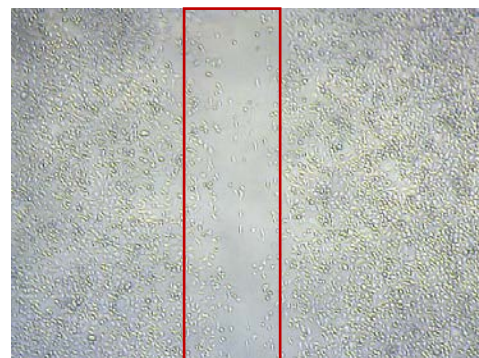
1 μM 24H

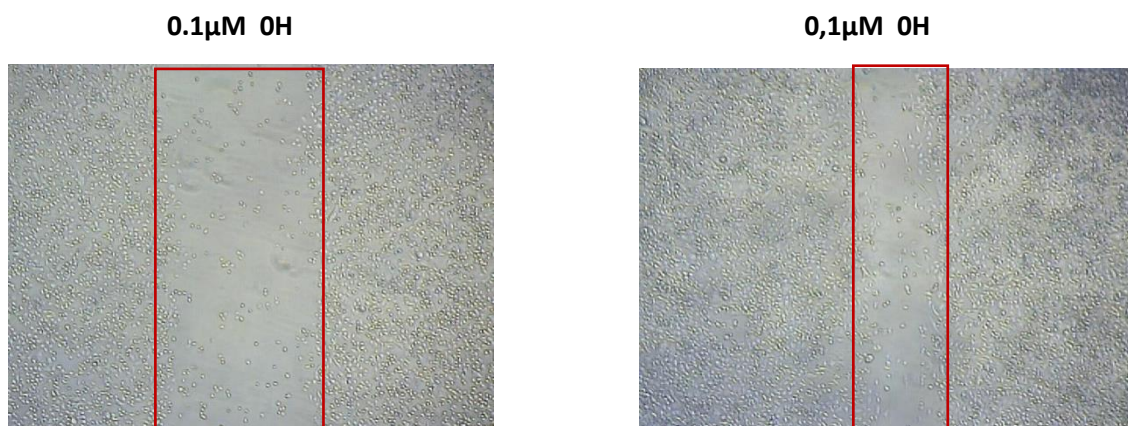


0,5 μM 0H



0,5 μM 24H

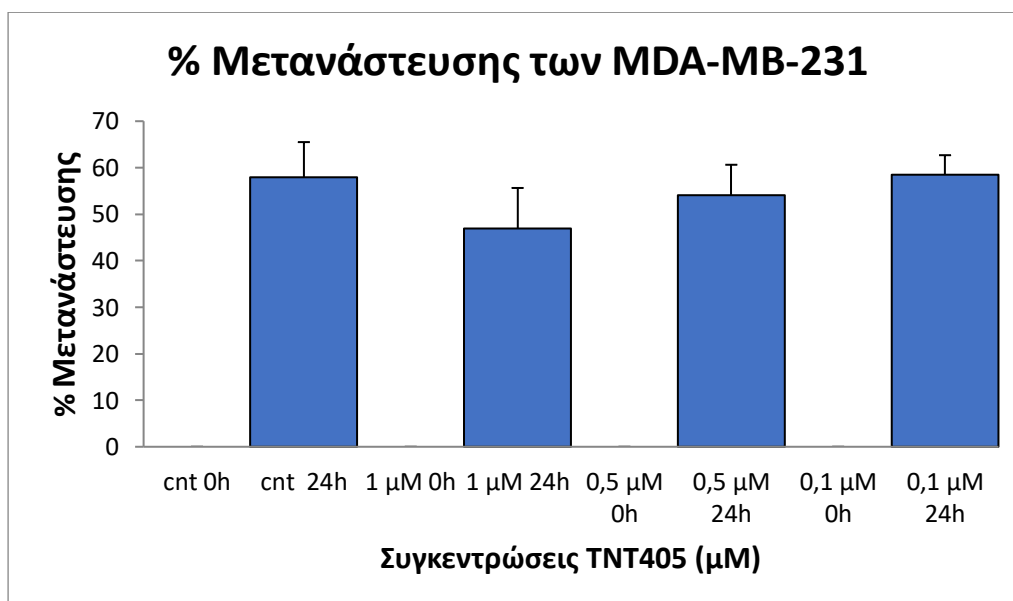




ΕΙΚΟΝΑ 16 : Μετανάστευση των κυττάρων MDA-MB231 με την προσθήκη της TNT405 σε συγκεντρώσεις 1/0,5/0,1μM σε διάστημα 0, 24 ωρών από την χάραξη της πληγής

Για να υπολογιστεί το ποσοστό κυτταρικής μετανάστευσης τόσο αυτών στα οποία προστέθηκε η υπό μελέτη ουσία TNT405, όσο και σε αυτά όπου δεν προστέθηκε (κύτταρα ελέγχου ή control), υπολογίστηκε το εμβαδόν του περιγράμματος που σκιαγραφήθηκε παραπάνω. Έτσι, μελετήθηκε το κατά πόσο τα κύτταρα μετανάστευσαν, μετακινήθηκαν για να καλύψουν την πληγή συγκριτικά με τη στιγμή 0 όπου η μετανάστευση ήταν μηδενική.

Το παρακάτω γράφημα 3, που παρατίθεται αποτελεί αποτέλεσμα τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και απεικονίζει τις μέσες τιμές αυτών, στην καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού MDA-MB231.



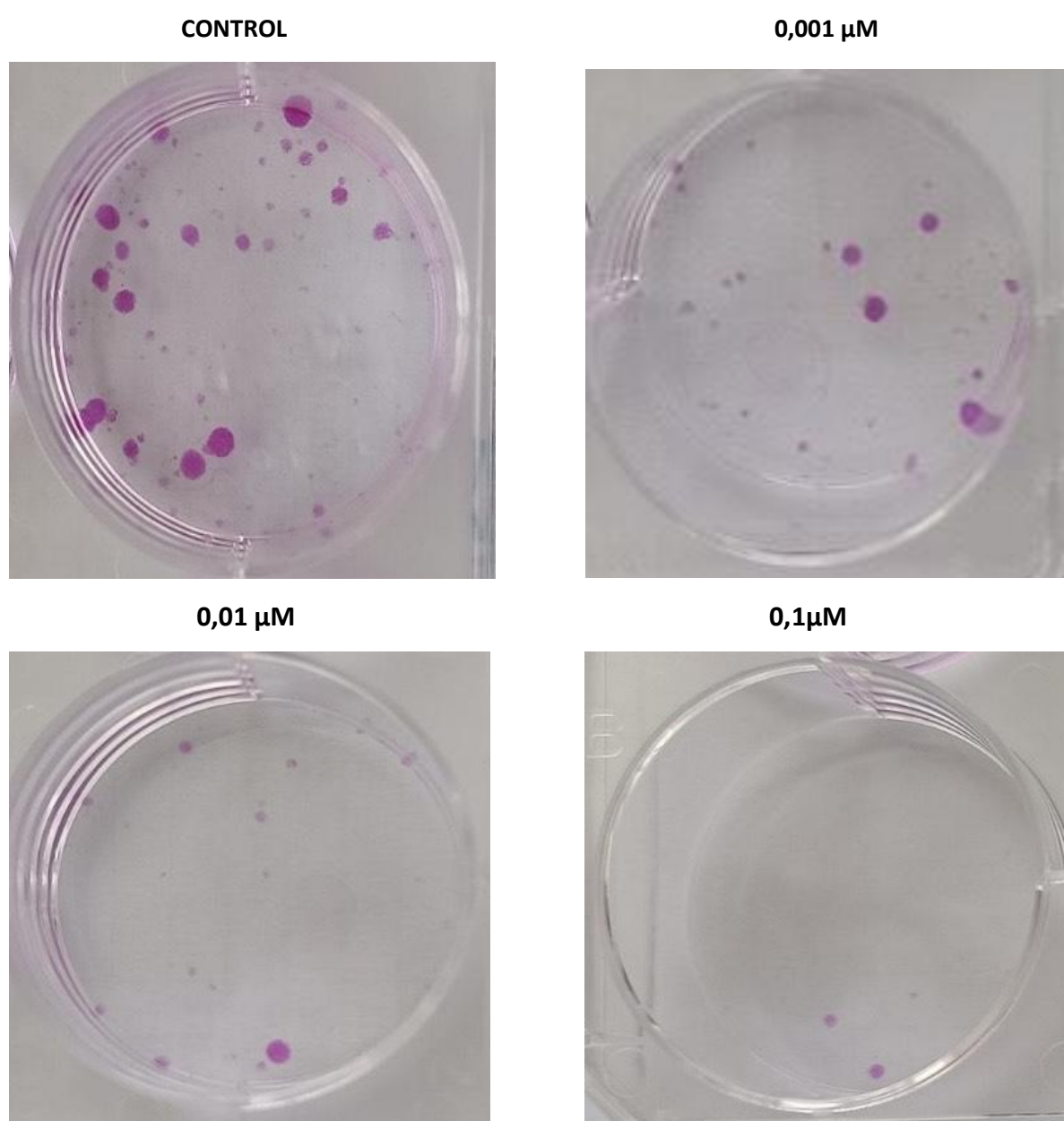
ΓΡΑΦΗΜΑ 3: Ποσοστό μετανάστευσης των MDA-MB231 μετά από επώαση με TNT405

Σύμφωνα με τις παραπάνω φωτογραφίες και το παραπάνω γράφημα, παρατηρείται ότι η μετανάστευση των κυττάρων ελέγχου στις 24H, φτάνει στο 57,93%. Με την προσθήκη της TNT405 σε συγκέντρωση 1μM, όπως είναι εμφανές από το γράφημα παρατηρήθηκε μερική μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου το ποσοστό της οποίας ανέρχεται στα 46,95% μετά από 24ώρες. Στην συγκέντρωση 0,5μM, το ποσοστό φτάνει στο 54,09% μετά από 24H, ενώ στην συγκέντρωση 0,1μM το ποσοστό κυτταρικής μετανάστευσης προσέγγισε το αντίστοιχο των κυττάρων ελέγχου εντός 24 ωρών και φτάνει στο 58,5%. Τέλος, κατά την λήξη του πειράματος (48

ώρες) σε όλες τις συγκεντρώσεις παρουσιάστηκε πλήρης μετανάστευση των κυττάρων όπως και στα κύτταρα ελέγχου.

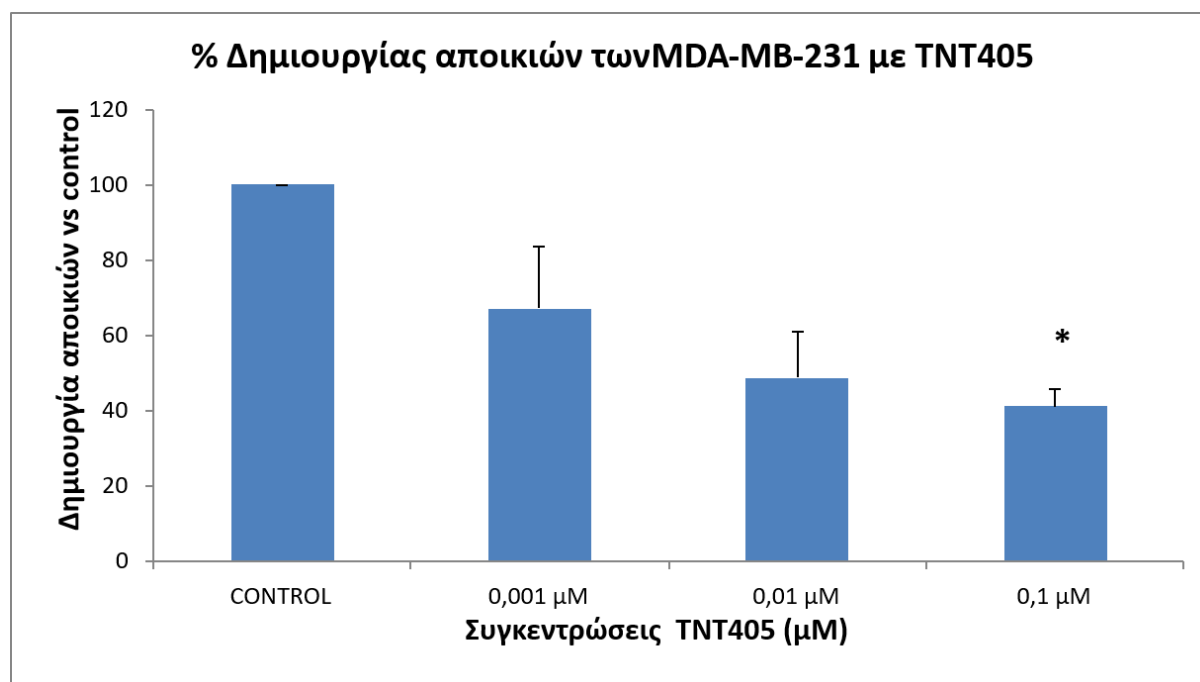
4.3 Αποτελέσματα μεθόδου αναστολής κλώνων (Clonogenic Assay)

Η συγκεκριμένη πειραματική μέθοδος, εφαρμόζεται ώστε να φανερώσει την ικανότητα που έχει μία ουσία να καταστείλει την δημιουργία αποικιών που προσομοιάζονται με τους όγκους. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της διαδικασίας, εκδηλώνουν την αναπαραγωγική ικανότητα και την επιβίωση των κυττάρων, μέσω της δημιουργίας κλώνων υπό την επίδραση της υπό μελέτη ένωσης. Στο πείραμα μας, υλοποιήθηκε χρήση της TNT405 στις συγκεντρώσεις 0,1/0,01/0,001 μ M και τα αποτελέσματα της προσθήκης τους συγκρίθηκαν με τα κύτταρα ελέγχου στα οποία δεν προστέθηκε η ουσία. Τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν στην εικόνα και στο γράφημα, το οποίο παρατίθεται παρακάτω. Να επισημάνουμε ότι τα πειράματα επαναλήφθηκαν 2 φορές και τα αποτελέσματα συνιστούν τον μέσο όρο από τα δύο πειράματα.



ΕΙΚΟΝΑ 17 : Δημιουργία κλώνων των MDA-MB231 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων TNT405

Παρατηρώντας την εικόνα 17, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι η εντονότερη δημιουργία κλώνων φανερώνεται στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0,001μM), χωρίς ωστόσο πλήρης ταύτιση (αριθμητικές και δομικές διαφορές) με τους κλώνους που δημιουργούν τα κύτταρα ελέγχου στα οποία δεν προστέθηκε η ουσία. Στις επόμενες συγκεντρώσεις (0,01μM και 0,1μM) ο αριθμός των κλώνων μειώνεται ενώ στην υψηλότερη παρατηρείται απειροελάχιστη δημιουργία αποικιών, γεγονός που φανερώνει την μέγιστη δράση της TNT405 στην συγκέντρωση αυτή. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με το πέρασ του πειράματος.



ΓΡΑΦΗΜΑ 4: Σχηματισμός κλώνων των MDA-MB231 έπειτα από χορήγηση με TNT405 σε σχέση με το Control (*p<0,05 vs control)

Με την ολοκλήρωση του πειράματος έλαβε χώρα η χρώση με SRB και η φωτομέτρηση σε κάθε πηγάδι διαφορετικής συγκέντρωσης της υπό μελέτης ουσίας, και πραγματοποιήθηκε η ποσοτική απεικόνιση της δημιουργίας κλώνων σε κάθε μία από αυτήν συγκριτικά με τον κυτταρικό πληθυσμό ελέγχου. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, τα κύτταρα ελέγχου παρουσίασαν 100% ικανότητα κλωνογένεσης. Στη χαμηλότερη συγκέντρωση 0,001μM, η δημιουργία κλώνων προσέγγισε το 67,09%, στην συγκέντρωση 0,01μM το ποσοστό έφτασε στο 48,65% ενώ στην υψηλότερη, 0,1μM, το ποσοστό δημιουργίας κλώνων σημειώθηκε με 40,99%. Τα όχι και τόσο υψηλά ποσοστά κλωνογένεσης που σημειώθηκαν και στις 3 συγκεντρώσεις, υποδεικνύουν την ισχυρή κατασταλτική δράση της TNT405 για σχηματισμό κλώνων στα κύτταρα MDA-MB231. Τέλος, να τονιστεί ότι με την εφαρμογή της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας σημειώθηκε στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (p<0,05).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου στις γυναίκες και ορίζεται ως μία πολυπαραγοντική νόσος που διαθέτει πολυάριθμες μορφές, στάδια και απαιτεί έγκαιρη, έγκυρη διάγνωση και εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Σύμφωνα με ευρωπαϊκά επιδημιολογικά δεδομένα τα τελευταία χρόνια η θνησιμότητα από τον καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί κατά 30%. Η

επιστράτευση των επιστημονικών δυνάμεων έχει σημειώσει καίρια πρόοδο με την πάροδο των ετών, διανοίγοντας νέα θεραπευτικά παράθυρα και πιο αποτελεσματικές μεθόδους πρόωρης ανίχνευσης και διάγνωσης αποβλέποντας δυναμικά προς την πλήρη ίαση του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, συνεχίζει να αποτελεί πρωταγωνιστικό παράγοντα παθογένειας κυρίως ανάμεσα στον γυναικείο πληθυσμό και η κινητοποίηση των ερευνητών απέναντι στο πρόβλημα θεωρείται απαραίτητη. Για αυτό λοιπόν, στην παρούσα πτυχιακή εργασία ασχοληθήκαμε με την έρευνα *in vitro* της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης ημισυνθετικών παραγώγων σκλαρεόλης σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού.

Σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα του εργαστηρίου σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και με γνώμονα τις τιμές του GI50 που υπολογίστηκαν, προτάθηκαν έξι προς μελέτη ουσίες, ως οι πιο δραστικές για την αντιπολλαπλασιαστική τους ιδιότητα προς μελέτη *in vitro* στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού, MCF-7 και MDA-MB231. Συγκεκριμένα οι ουσίες είναι οι εξής: η μητρική ουσία TNT396 και οι αντίστοιχες υβριδικές της TNT403 και TNT404 καθώς και η μητρική TNT397 και οι αντίστοιχες υβριδικές της TNT405 και TNT406.

Ως πρώτο βήμα για έλεγχο της κυτταροτοξικής επίδρασης των έξι υπό μελέτη ουσιών εφαρμόστηκε η μέθοδος SRB από όπου με την ολοκλήρωση της λήφθηκαν δεδομένα για τον ρυθμό αύξησης των δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών, καθώς υπολογίστηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50. Σύμφωνα με τις τιμές που λάβαμε, στην κυτταρική σειρά MCF-7 στην συγκέντρωση 1,25μM η TNT405 παρουσίασε ρυθμό αύξησης 29,7% και GI50= 1μM ενώ η TNT 404 εμφάνισε αντίστοιχο ρυθμό αύξησης 22,39% και GI50= 0,9μM. Στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB231, στην συγκέντρωση 0,625μM η TNT405 παρουσίασε ρυθμό αύξησης ίσο με 25,41% και GI50= 0,3μM ενώ η TNT404 εμφάνισε 15,12% και GI50= 0,4μM. Όπως φαίνεται η διαφορά και στις δύο συνιστώσες μεταξύ των δύο υβριδικών ουσιών είναι εξαιρετικά μικρές, ωστόσο λόγω του GI50 της TNT405 στα MDA-MB-231 η συγκεκριμένη ουσία επιλέχθηκε για την διενέργεια των επόμενων πειραμάτων. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι και οι έξι ουσίες έδειξαν εκλεκτικότητα για τα επιθετικά κύτταρα MDA-MB231, συνεπώς επιλέχθηκαν για τη μελέτη της ουσίας στις επόμενες πειραματικές μεθόδους.

Η TNT405 αξιολογήθηκε για την ικανότητά της να αναστέλλει τη δημιουργία κλώνων και την αντιμεταναστευτική της ιδιότητα. Από τη μέθοδο αναστολής των κλώνων παρατηρήθηκε η δόσοεξαρτώμενη δράση της TNT405, καθώς όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωσή της τόσο μεγαλύτερη και η αναστολή δημιουργίας των αποικιών. Εκτός από δόσοεξαρτώμενη εμφανίζεται και χρονοεξαρτώμενη δράση της TNT405, καθώς παρατηρείται ισχυρή καταστολή σχηματισμού κλώνων με την πάροδο του χρόνου. Όπως απεικονίζεται και στις εικόνες εκτός από τον αξιοσημείωτο μειωμένο αριθμό των αποικιών παρατηρείται και στις τρεις συγκεντρώσεις ότι το μέγεθος των περισσότερων αποικιών είναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με αυτές των controls. Αυτό, υποδηλώνει ότι ακόμα και σε συγκεντρώσεις 300 φορές κάτω από το GI50 (0,3μM) η TNT405 ασκεί κυτταροστατική δράση έναντι των κυττάρων. Ενδεχομένως η δράση αυτή να οφείλεται σε μηχανισμούς όπως η αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή απόπτωσης, ή η πρόκληση οξειδωτικού και γονιδιακού στρες, οι οποίοι εκδηλώνονται με καθυστέρηση και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε βάθος χρόνου.

Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά την ικανότητά της να αναστέλλει την μετακίνηση των κυττάρων παρόλο που δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις κοντά στη GI50 και TGI (1μM, 0,5μM και 0,1μM) δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά με τα κύτταρα ελέγχου. Οι πρώτες δύο συγκεντρώσεις υπερβαίνουν την τιμή της GI50 όπου είναι πιθανό ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός να αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό. Συνεπώς, το κλείσιμο της "πληγής" ενδέχεται να οφείλεται κυρίως σε μετακίνηση των ήδη υπάρχοντων κυττάρων προς το κενό διάστημα, και όχι σε ενεργό πολλαπλασιασμό. Υποδεικνύεται ότι η ένωση δεν επηρεάζει τη μετανάστευση. Ένας ακόμη λόγος πιθανός να είναι ο αριθμός των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή να ήταν μεγάλος με αποτέλεσμα γρήγορα να έκλεισαν οι πληγές. Είναι σαφές ότι χρειάζονται και άλλα πειράματα με τροποποιημένες συνθήκες για την διαλεύκανση της δράσης της.

Οι Stojkovic et al. (2023), εξέτασαν την αντικαρκινική δράση 24 υβριδικών ενώσεων στην κυτταρική σειρά U87 γλοιοβλαστώματος, στην πολλαπλά ανθεκτική παραλλαγή της U87-TxR, μελετώντας ωστόσο την κυτταρική βιωσιμότητα με την τεχνική MTT με υπολογισμό της IC50. Στην συγκεκριμένη πτυχιακή μετρήθηκε η GI50 (μM) κάθε ουσίας με την μέθοδο SRB. Στα πειράματα που διεξήχθησαν οι μητρικές ενώσεις TNT396 και TNT397, παρουσίασαν χαμηλές τιμές IC50 και στις 2 κυτταρικές σειρές (για TNT396, στην κυτταρική σειρά U87: 3,1,μM, στην U87-TxR : 2,7μM, ενώ στην TNT397, για την σειρά U87: 6,3 μM, στην U87-TxR : 5 μM). τα πειράματά μας, στην κυτταρική σειρά MCF-7 και MDA-MB231, για TNT396 η GI50 είναι 1,8 μM και 1,6 μM αντίστοιχα ενώ για την TNT397 είναι 5,6 μM και 3,4 μM αντίστοιχα. Η προς μελέτη ουσία TNT405, εμφανίζει IC50 και για τις δύο γλοιοβλαστικές σειρές 1,2 μM και στις καρκινικές σειρές του μαστού MCF-7 και MDA-MB231 εμφανίζει αντίστοιχα 1 μM και 0,3 μM. Για τις υπόλοιπες ουσίες οι τιμές των IC50 κυμαίνονται στις ίδιες με τις GI50. Στην ίδια μελέτη, οι ερευνητές συνέχισαν με δύο ουσίες την TNT397 (11c) και η 12I [προέρχεται από την TNT397 φέρει πυρήνα TP όπου στον C5 έχει μεθυλομάδα (-CH3)] οι οποίες αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να επεμβαίνουν στον κυτταρικό κύκλο, να προκαλούν απόπτωση ή νέκρωση, καθώς και την οξειδωτική τους δράση και στις 2 κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο καινούρια παράγωγα προκάλεσαν πρόωμη απόπτωση, οδήγησαν τα κύτταρα στις φάσεις S/G2/M, κατόπιν την αύξησή τους στη φάση subG0 και τέλος αύξησαν τα ROS/RNS με συνέπεια την αύξηση του οξειδωτικού stress. Τα συμπεράσματά μας, βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Stojkovic et al. (2023). Όλα αυτά πιθανόν να εξηγούν τη δράση της ουσίας μας σε αυτή τη διπλωματική εργασία και ειδικά στο clonogenic assay όπου σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζει την μακροχρόνια επιβίωση των MDA-MB-231 κυττάρων .

Σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει δείχθει ότι η φυσική σκλαρεόλη εμφανίζει τιμές GI50 από 15 έως 50 μM ανάλογα με την καρκινική σειρά που εφαρμόζεται (Mahaira et al., 2011). Είναι σημαντικό να τονισθεί ότι στην παρούσα εργασία και υπό τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν όλα τα παράγωγα της σκλαρεόλης έδειξαν πολύ ισχυρότερη δράση. καθώς και ότι οι θυγατρικές ενώσεις (TNT403, TNT404, TNT405, TNT406) είναι δραστικότερες έναντι των μητρικών (TNT396, TNT397) κάτι το οποίο έρχεται σε πλήρη συμφωνία με την βιβλιογραφία (Stojkovic et al., 2023). Ακόμη, όλα τα παράγωγα που ελέχθηκαν είναι δραστικότερα και πιο ασφαλή στα MDA-MB-231 κύτταρα τα οποία είναι άκρως επιθετικά σε σχέση με τα ορμονοευαίσθητα MCF-7.

Συγκρίνοντας, τις δομικές διαφορές των υβριδικών ενώσεων TNT403, TNT404, TNT405, TNT406, σύμφωνα με το άρθρο μπορούν να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την βιολογική δράση αυτών. Γνωρίζουμε ότι οι ουσίες αυτές είναι αποτέλεσμα συνδυασμού φυσικής σκλαρεόλης με πυρήνα 1,2,4-τριαζολο[1,5-a]πυριμιδίνης (TP) και ενώνονται μέσω αλυσιδωτών αμινικών γεφυρών (linkers) (σύνδεσμο 4-βενζυλοπιπεραζίνης ή με σύνδεσμο 4-βενζυλοδιαμίνης). Η TNT403, διαθέτει υποκαταστάτη μια φαίνυλο ομάδα (-Ph) στον C5 του πυρήνα TP ενώ η TNT404 στην ίδια θέση διαθέτει ένα τριφθορομέθυλο (-CF₃), αυτή η αλλαγή φαίνεται ότι την κάνει πιο δραστική και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ακριβώς οι ίδιοι υποκαταστάτες υπάρχουν στις TNT405 (-CF₃) και TNT406 (-Ph), με τη διαφορά εδώ ότι οι δύο ουσίες προέρχονται από την TNT397 και για αυτό διαθέτουν 3 άνθρακες παραπάνω στον linker. Και εδώ η TNT405 είναι πιο δραστική και στις δύο κυτταρικές σειρές πιθανόν λόγω των τριών φθορίων. Είναι σαφές ότι η προσθήκη του πυρήνα TP στις μητρικές έχει κάνει πιο δραστικές τα παράγωγα. Παρ όλα αυτά οι διαφορές μεταξύ των θυγατρικών ουσιών ως προς τη δράση τους είναι σημαντικά μικρές.

Συνοψίζοντας, για πρώτη φορά αυτές οι νέες ημισυνθετικές ουσίες σκλαρεόλης ελέγχθηκαν για την αντιπολλαπλασιαστική δράση τους σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού. Από τα αποτελέσματα εξήχθη το συμπέρασμα ότι η δραστικότερη ουσία ήταν η TNT405, όμως πρέπει να ελεγχθεί η επίδρασή τους στον κυτταρικό κύκλο, η δράση τους στη μετανάστευση και την κλωνογένεση και πως η δομή επηρεάζει τη δράση τους. Τέλος, κρίνεται αναγκαία η έρευνα της *in vivo* σε ζωικά πρότυπα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (human-to-mouse-breast cancer xenografts) για την αξιολόγηση

της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της ως πιθανή νέα θεραπευτική προσέγγιση για τον καρκίνο του μαστού κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, 32(25), 2794–2803. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870>

Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O. B., & Minko, T. (2018). Metastatic and triple-negative breast cancer: Challenges and treatment options. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(5), 1483–1507. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>

Amjad, M. T., Chidharla, A., & Kasi, A. (2025). Cancer chemotherapy. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>

Baldwin, P. (2010). Breast biopsy targeting techniques. *Radiologic Technology*, 82(1), 59M–79M. PMID: 20826601

Behl, A., Wani, Z. A., Das, N. N., Parmar, V. S., Len, C., Malhotra, S., & Chhillar, A. K. (2023). Monoclonal antibodies in breast cancer: A critical appraisal. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 183, 103915. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.103915>

Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the definition of cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142–1147. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>

Bychkovsky, B. L., Myers, S., Warren, L. E. G., De Placido, P., & Parsons, H. A. (2024). Ductal carcinoma in situ. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 38(4), 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2024.05.014>

Carlson, R. W. (2005). The history and mechanism of action of fulvestrant. *Clinical Breast Cancer*, 6(Suppl. 1), S5–S8. <https://doi.org/10.3816/cbc.2005.s.008>

Carvalho, E., Canberk, S., Schmitt, F., & Vale, N. (2025). Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: Precision medicine approaches for targeted therapies. *Cancers*, 17(7), 1102. <https://doi.org/10.3390/cancers17071102>

Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>

Chen, H. L., Gong, J. Y., Lin, S. C., Li, S., Chiang, Y. C., Hung, J. H., Yen, C. C., & Lin, C. C. (2020). Effects of sclareol against small cell lung carcinoma and the related mechanism: In vitro and in vivo studies. *Anticancer Research*, 40(9), 4947–4960. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14498>

Debien, V., De Caluwé, A., Wang, X., et al. (2023). Immunotherapy in breast cancer: An overview of current strategies and perspectives. *npj Breast Cancer*, 9, 7. <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00508-3>

- Denisov, E. V., Skryabin, N. A., Gerashchenko, T. S., Tashireva, L. A., Wilhelm, J., Buldakov, M. A., Sleptcov, A. A., Lebedev, I. N., Vtorushin, S. V., Zavyalova, M. V., Cherdyntseva, N. V., & Perelmuter, V. M. (2017). Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness. *Oncotarget*, 8(37), 61163–61180. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18022>
- Dimas, K., Hatziantoniou, S., Tseleni, S., Khan, H., Georgopoulos, A., Alevizopoulos, K., Wyche, J. H., Pantazis, P., & Demetzos, C. (2007). Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice. *Apoptosis*, 12(4), 685–694. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0026-8>
- Dimas, K., Kokkinopoulos, D., Demetzos, C., Vaos, B., Marselos, M., Malamas, M., & Tzavaras, T. (1999). The effect of sclareol on growth and cell cycle progression of human leukemic cell lines. *Leukemia Research*, 23(3), 217–234. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(98\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(98)00134-9)
- Dimas, K., Papadaki, M., Tsimplouli, C., Hatziantoniou, S., Alevizopoulos, K., Pantazis, P., & Demetzos, C. (2006). Labd-14-ene-8,13-diol (sclareol) induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells and enhances the activity of anticancer drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(3), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.01.003>
- Dogra, A. K., Prakash, A., Gupta, S., & Gupta, M. (2025). Prognostic significance and molecular classification of triple negative breast cancer: A systematic review. *European Journal of Breast Health*, 21(2), 101–114. <https://doi.org/10.4274/ejbh.galenos.2025.2024-10-2>
- Dumitru, A., Procop, A., Iliesiu, A., Tampa, M., Mitache, L., Costache, M., Sajin, M., Lazaroio, A., & Cirstoiu, M. (2015). Mucinous breast cancer: A review study of 5-year experience from a hospital-based series of cases. *Maedica*, 10(1), 14–18. PMID: 26225144; PMCID: PMC4496759
- Duncan, A. M., Al Youha, S., Joukhar, N., Konder, R., Stecco, C., & Wheelock, M. E. (2022). Anatomy of the breast fascial system: A systematic review of the literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 149(1), 28–40. <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000008671>
- Jardim, D. L. F., Marchesi, M. S. P., de Melo Gagliato, D., & Diz, M. (2014). Androgen receptor expression, function, and its role in breast cancer treatment: A review. *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3036-9>
- Kumar, A., & Aggarwal, R. (2016). Chemotherapy in advanced breast cancer: Current status and future strategies. *Asian Journal of Oncology*, 2(3), 187–192. <https://doi.org/10.4103/2454-6798.197607>
- Lee, A., & Lim, W. (2022). Pharmacotherapy for breast cancer. *Clinical Therapeutics*, 44(1), 22–39. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.11.014>
- Li, Z., & Kang, Y. (2016). Molecular signatures of metastasis in breast cancer: Moving beyond traditional clonal evolution models. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(21), 4283–4296. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2306-9>
- Liu, Y. R., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2016). Differentiation of triple-negative breast cancer molecular subtypes: Implications for prognosis and therapeutic strategies. *Annals of Oncology*, 27(4), 751–760. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv617>
- Lorusso, V., Silvestris, N., Giotta, F., & Pezzella, G. (2003). Weekly cisplatin and vinorelbine chemotherapy in metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines and taxanes. *Annals of Oncology*, 14(5), 704–710. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg181>

- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *American Family Physician*, 81(11), 1339–1346. PMID: 20540485
- Mo, J. W., Yang, R. Z., & Zhang, D. F. (2016). Modulation of anoikis resistance in MG63 osteosarcoma cells by sclareol via inhibiting Ezrin/Fak expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 9(7), 6795–6803.
- Noori, S., Hassan, Z. M., Mohammadi, M., Habibi, Z., Sohrabi, N., & Bayanolhagh, S. (2010). Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. *Cellular Immunology*, 263(2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.02.009>
- Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., & Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast cancer: Conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 9(Suppl. 2), 17–34. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29420>
- Ohnstad, H. O., Borgen, E., Falk, R. S., Lien, T. G., Aaserud, M., Sveli, M. A. T., Kyte, J. A., Kristensen, V. N., Geitvik, G., Schlichting, E., Kåresen, R., Sauer, T., Engebraaten, O., & Naume, B. (2017). Prognostic value of PAM50 and risk of recurrence score in patients with early-stage breast cancer with long-term follow-up. *Breast Cancer Research*, 19, 120. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0907-5>
- Pardal, R., Clarke, M. F., & Morrison, S. J. (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(12), 895–902. <https://doi.org/10.1038/nrc1232>
- Parise, C. A., & Caggiano, V. (2014). Breast cancer survival defined by the ER/PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2014, 469251. <https://doi.org/10.1155/2014/469251>
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 121(10), 3786–3788. <https://doi.org/10.1172/JCI60534>
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, 5(1), 5–23. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, 24(Suppl. 2), S26–S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
- Puleo, F. J., Kehdy, F. J., & Killeen, S. D. (2025). Anatomy, abdomen and pelvis: Breast. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430922/>
- Ridolfi, R. L., Rosen, P. P., Port, A., Kinne, D., & Mike, V. (1977). Medullary carcinoma of the breast: A clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*, 40(4), 1365–1385. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197710\)40:4<1365::AID-CNCR2820400404>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197710)40:4<1365::AID-CNCR2820400404>3.0.CO;2-U)
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(14), 8418–8423.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>

Speirs, V. (2002). Oestrogen receptor beta in breast cancer: Good, bad, or still too early to tell? *Journal of Pathology*, 197(2), 143–147. <https://doi.org/10.1002/path.1119>

Tang, Y., Wang, Y., Kiani, M. F., & Wang, B. (2016). Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 16(5), 335–343.
<https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.05.012>

Tsang, J. Y. S., Tse, G. M., & Tan, P. H. (2019). Special types of breast cancer: Specimen requirements, ancillary studies and molecular diagnosis. *Pathology*, 51(2), 226–242.
<https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.11.006>

Tung, N. M. (2015). Management of triple-negative breast cancer: Breast cancer biology dictates treatment. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 29(9), 741–744. PMID: 26384744

Vagia, E., Mahalingam, D., & Cristofanilli, M. (2020). The landscape of targeted therapies in TNBC. *Cancers*, 12(4), 916. <https://doi.org/10.3390/cancers12040916>

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: A review. *JAMA*, 321(3), 288–300.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nature Reviews Cancer*, 5(8), 591–602. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>

Wong, H., Lau, S., Yau, T., Cheung, P., & Wong, W. (2019). Management of hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: Current treatment options and future perspectives. *Frontiers in Oncology*, 9, 613. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00613>

Yeo, S. K., & Guan, J. L. (2017). Breast cancer: Multiple subtypes within a tumor? *Trends in Cancer*, 3(11), 753–760. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.09.001>

Zhang, J., Zhou, Y., Huang, T., Wu, F., Pan, Y., Dong, Y., Wang, Y., & Wang, Z. (2013). The association between metabolic abnormality and endometrial cancer: A large case–control study in China. *Gynecologic Oncology*, 131(2), 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.019>