



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

<<ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ>>

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Θέμα: “Μελέτη της μεθυλίωσης των γονιδίων BRCA1, HER2 και  
PTEN/KILLN σε ασθενείς με καρκίνο μαστού”**

Αβδουλά Ελένη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μαρία Σαμαρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα)
- Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας  
ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης  
στις

Κλινικές Εφαρμογές της Μοριακής Ιατρικής

Λάρισα, Οκτώβριος 2018



**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**FACULTY OF MEDICINE**



**MASTER PROGRAM IN**  
**“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”**

**MASTER THESIS**

**BRCA1, ERBB2, PTEN/KILLIN genes methylation study in breast cancer patients**

**By**

Avdoula Eleni

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Maria Samara, Assistant Professor of Pathology with specialty in Molecular Pathology
- George Koukoulis, Professor of Pathology
- Anastasios Germenis, Professor, Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly  
in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Clinical  
applications of Molecular Medicine

Larissa, October, 2018

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον Καθηγητή Ανοσολογίας κύριο Αναστάσιο Γερμενή που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών των Κλινικών Εφαρμογών Μοριακής Ιατρικής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κύριο Γεώργιο Κουκούλη, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, όπως και για την ερευνητική του ανατροφοδότηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Μαρία Σαμαρά, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε τον τελευταίο χρόνο, όπως και για τις προκλήσεις που μου έθεσε, ώστε να ξεπεράσω τον εαυτό μου.

Το συγκεκριμένο εγχείρημα δε θα ήταν εφικτό χωρίς τη συμβολή της οικογένειάς μου. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδερφή μου και τους υπόλοιπους συγγενείς και φίλους που στάθηκαν στο πλάι μου και στήριξαν την προσπάθειά μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, κυρίες Μαρία Παπαθανασίου και Αικατερίνη Χατζούλη, για την πολύτιμη βοήθειά τους, την καθοδήγηση που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα και την άψογη συνεργασία μας που συνέβαλλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....σελ 6	σελ 6
ABSTRACT.....σελ 8	σελ 8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ 9	σελ 9
1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία.....σελ 9	σελ 9
1.2 Ανατομία του μαστού.....σελ 10	σελ 10
1.3 Παράγοντες κινδύνου.....σελ 11	σελ 11
1.4 Κλινική εικόνα – Συμπτώματα.....σελ 15	σελ 15
1.5 Ιστολογική ταξινόμηση.....σελ 16	σελ 16
1.6 Σταδιοποίηση.....σελ 20	σελ 20
1.7 Μοριακή ταξινόμηση.....σελ 22	σελ 22
1.8 Κληρονομικός/ Οικογενής καρκίνος του μαστού .....σελ 24	σελ 24
1.9 Επιγενετική.....σελ 25	σελ 25
1.10 Μεθυλίωση του DNA και καρκίνος του μαστού .....σελ 26	σελ 26
1.10.1 Τα γονίδια BRCA1 και BRCA2.....σελ 27	σελ 27
1.10.2 Το γονίδιο ERBB2 (HER-2/neu).....σελ 28	σελ 28
1.10.3 Τα γονίδια PTEN/KILLN.....σελ 29	σελ 29
1.11 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....σελ 30	σελ 30
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....σελ 34	σελ 34
2.1 Σκοπός.....σελ 34	σελ 34
2.2 Υλικό της μελέτης .....σελ 34	σελ 34
2.3 Απομόνωση DNA από νωπό ιστό .....σελ 34	σελ 34
2.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA.....σελ 36	σελ 36
2.4.1 Φωτομέτρηση.....σελ 36	σελ 36
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων.....σελ 36	σελ 36
2.4.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.....σελ 37	σελ 37
2.4.4 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης.....σελ 37	σελ 37

<b>2.5 Τροποποίηση με δισουλφιδικό νάτριο των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA (Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA).....σελ 38</b>	<b>σελ 38</b>
<b>2.6 Καθαρισμός και αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....σελ 40</b>	<b>σελ 40</b>
<b>2.6.1 Καθαρισμός του τροποποιημένου DNA (bisulfite converted).....σελ 40</b>	<b>σελ 40</b>
<b>2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR για ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών τμημάτων.....σελ 41</b>	<b>σελ 41</b>
<b>2.7 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων των γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN, PTEN/KLLN.....σελ 43</b>	<b>σελ 43</b>
<b>2.8 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing).....σελ 45</b>	<b>σελ 45</b>
<b>2.9 αντιδράσεις πυροαλληλούχισης των προϊόντων των εξεταζόμενων γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN, KLLN.....σελ 47</b>	<b>σελ 47</b>
<b>3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ 52</b>	<b>σελ 52</b>
<b>3.1 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων των BRCA1, ERBB2, PTEN και PTEN/KLLN γονιδίων.....σελ 54</b>	<b>σελ 54</b>
<b>3.1.1 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του BRCA1 γονιδίου...σελ 54</b>	<b>σελ 54</b>
<b>3.1.2 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του ERBB2 γονιδίου....σελ 56</b>	<b>σελ 56</b>
<b>3.1.3 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του PTEN γονιδίου.....σελ 57</b>	<b>σελ 57</b>
<b>3.1.4 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του PTEN/KLLN γονιδίου.....σελ 59</b>	<b>σελ 59</b>
<b>Συζήτηση.....σελ 70</b>	<b>σελ 70</b>
<b>Βιβλιογραφία.....σελ 78</b>	<b>σελ 78</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια των γυναικών και εμφανίζει αυξημένη συχνότητα στο Δυτικό κόσμο. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ετερογενή νόσο με ποικίλα βιολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, διαφορετική έκβαση και ανταπόκριση στις εφαρμοζόμενες θεραπείες. Τα πρότυπα έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων σε συνδυασμό με την ανάλυση πλήθους γενετικών αλλαγών έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη μοριακής ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού, εκτός από την ιστολογική ταξινόμηση που βασίζεται στο σύστημα TNM. Την τελευταία δεκαετία η έρευνα έχει στραφεί στις επιγενετικές αλλαγές των γονιδίων που δε σχετίζονται με γενετικές αλλαγές αλλά μπορούν να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ή αποσιώπηση συγκεκριμένων γονιδίων συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό στην καρκινογένεση διαφόρων τύπων καρκίνου, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγεται και ο καρκίνος του μαστού. Πλήθος μελετών έχει εντοπίσει μεγάλο αριθμό μεθυλιωμένων γονιδίων, που εμπλέκονται σε κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, χωρίς ωστόσο μέχρι σήμερα να έχουμε οδηγηθεί στην εύρεση κάποιου προγνωστικού ή προβλεπτικού επιγενετικού βιοδείκτη. Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών των BRCA1, ERBB2, PTEN και KLLN γονιδίων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στα γονίδια αυτά και την πιθανή επίδρασή τους στην καρκινογένεση του μαστού. Παράλληλα, μελετώντας τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών των συγκεκριμένων γονιδίων σε παρακείμενο φυσιολογικό ιστό των ίδιων ασθενών θελήσαμε να εξετάσουμε τυχόν διαφορές και πώς αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες. Στη μελέτη συμμετείχαν 44 γυναίκες ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Τα επίπεδα της μεθυλίωσης αναλύθηκαν με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης και η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό IBM SPSS v22. Από την ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης των τεσσάρων υποκινητών, προέκυψε ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 είναι σημαντικά υψηλότερα στους καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ( $p < 0.05$ ). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου στους καρκινικούς ιστούς ήταν διπλάσια από αυτά των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών ( $p = 0.007$ ), αν και δεν κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα. Από τη σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης και των κλινικοιστολογικών παραμέτρων αναδείχθηκε ότι τα αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου στους καρκινικούς ιστούς σχετίζονται με απουσία

έκφρασης του στους ιστούς αυτούς ( $p=0.024$ ). Τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας σχετικά με τη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων που εξετάσαμε συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο υποκινητής του BRCA1 γονιδίου ήταν μεθυλιωμένος στο σύνολο των ασθενών της μελέτης μας, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μεθυλίωση αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αποσιώπησης του BRCA1 γονιδίου στον σποραδικό καρκίνο του μαστού. Επιπρόσθετα, είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου και της απουσίας έκφρασης τους στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού, γεγονός που επίσης υποδηλώνει ότι το γονίδιο HER2 αποσιωπείται με επιγενετικούς μηχανισμούς.

## ABSTRACT

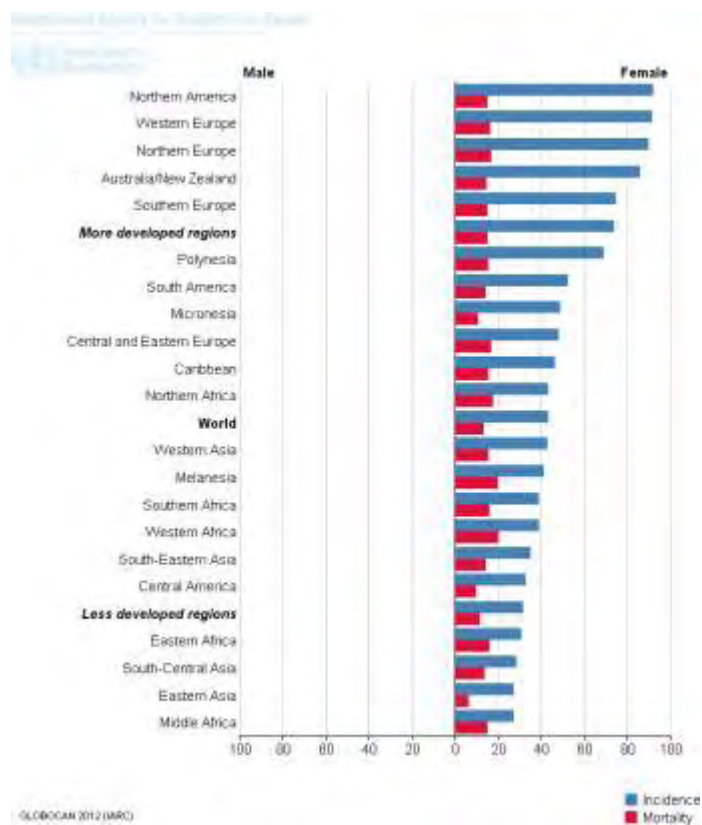
Breast cancer is the most common malignancy in women, with an increased incidence in Western Countries. It is considered a very heterogenous disease with varying biological and pathological features, patient outcome and response to therapy. Hormone receptor expression patterns, along with analyses of a large number of genetic alterations have led to the development of breast cancer's molecular staging, adding to the traditional TNM staging. In the past ten years, research has focused on gene epigenetic alterations, which are not correlated to genetic alterations but can lead to activation or silencing of specific genes, contributing to carcinogenesis in many cancer types, including breast cancer. A plethora of studies has identified a large number of methylated genes, which are implicated in crucial cell processes, though no characterization of predictive or prognostic markers exists to this day. In this study we wanted to investigate CpG island methylation levels of the BRCA1, ERBB2, PTEN and KLLN gene promoters in breast cancer patients, to elucidate the role of epigenetic changes in these genes and their potential effect in breast cancer carcinogenesis. We also studied promoter methylation levels normal adjacent tissues to investigate whether they could be used as biomarkers. Our sample consisted of 44 breast cancer patients, including 17 normal adjacent tissues. Methylation levels were determined with the method of pyrosequencing and statistical analysis was performed with IBM SPSS. Analysis of methylation levels of the four promoters showed that BRCA1 promoter methylation levels were significantly higher in tumours versus normal adjacent tissues ( $p < 0.05$ ). Additionally, methylation levels of the ERBB2 gene promoter in cancerous tissues was twice higher than those of adjacent normal tissues ( $p = 0.007$ ), although no increased methylation levels were identified. The comparison of methylation levels and clinicopathological parameters showed that methylation levels of the ERBB2 gene promoter is correlated to ERBB2 receptor expression absence in cancerous tissues ( $p = 0.024$ ). Our findings on gene promoter methylation are concurrent with the existing literature. It is noteworthy that BRCA1 promoter was methylated in all study patients, which suggests that methylation could be the main mechanism of BRCA1 gene silencing in sporadic breast cancer. It is also the first time a correlation of ERBB2 promoter methylation levels and lack of its receptor expression is reported in breast cancer patients, which also suggests that ERBB2 gene may be silenced through epigenetic mechanisms.



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του μαστού είναι η συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες και συγκαταλέγεται μεταξύ των τριών πιο κοινών καρκίνων μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του παχέος εντέρου [1]. Το 2012, περίπου 1.700.000 άνθρωποι διαγνώστηκαν με καρκίνο μαστού παγκοσμίως και περίπου μισό εκατομμύριο κατέληξαν από τη νόσο [2,3]. Τα ποσοστά της συχνότητας εμφάνισης ποικίλλουν και κυμαίνονται από 27 ανά 100.000 άτομα στη Μέση Αφρική και την Ανατολική Ασία έως 96 ανά 100.000 άτομα στη Δυτική Ευρώπη (Εικόνα 1) [2]. Στην Βόρεια Αμερική και στην Ευρωπαϊκή Ένωση η θνησιμότητα από τον καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί σημαντικά, γεγονός που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην έγκαιρη διάγνωση και στην εφαρμογή βελτιωμένων θεραπειών [4]. Στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, ο καρκίνος του μαστού συνεχίζει να αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Στη Νότια Αμερική, την Αφρική και την Ασία τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητα του καρκίνου του μαστού αυξάνονται, πιθανότατα λόγω των αλλαγών στον τρόπο ζωής και της ελλιπούς ενημέρωσης για έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της νόσου [2,3].



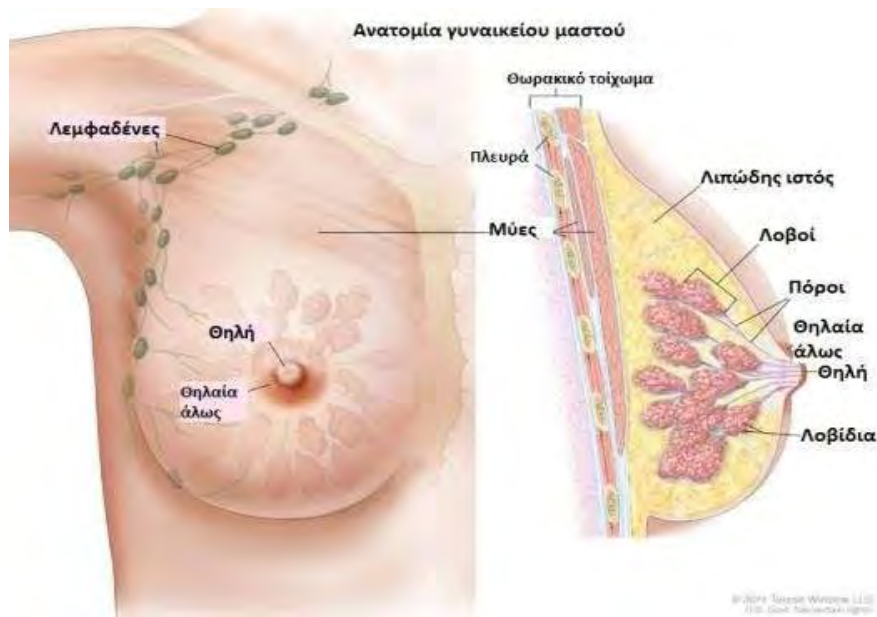
**Εικόνα 1.** Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης και θνησιμότητας του καρκίνου του μαστού παγκοσμίως (ανά 100.000 άτομα) Πηγή: Globocan statistics, 2012.

Προβλέπεται ότι το 2020 στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το ποσοστό θνησιμότητας θα είναι 13.4/100.000 άτομα [5]. Στο χρονικό διάστημα 2002-2012 το ποσοστό της θνησιμότητας μειώθηκε κατά 22% σε γυναίκες νεαρής ηλικίας (20-49 ετών). Η μεγαλύτερη μείωση της θνησιμότητας σημειώθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο και άλλες χώρες της Βορειοδυτικής Ευρώπης, σε αντίθεση με χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης. Παράλληλα εκτιμάται ότι το 2020 θα αποφευχθούν 32.500 θάνατοι από καρκίνο του μαστού στην Ευρώπη [5]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Ελλάδα παρουσιάζει ποσοστό θνησιμότητας περίπου 14/100.000 άτομα [5].

## **1.2 Ανατομία του μαστού**

Ο μαστικός αδένας είναι ένα ορμονοεξαρτώμενο όργανο, που η μορφολογία του αλλάζει ανάλογα με τις ορμονικές μεταβολές που παρατηρούνται κατά την ήβη, τις φάσεις του καταμήνιου κύκλου, την κύηση και τη γαλουχία. Ο μαστός μπορεί να έχει ημισφαιρικό, δισκοειδές ή κωνικό σχήμα [6]. Αποτελείται από τον αδενικό ιστό και ένα ινώδες στρώμα που περιέχει λιπώδη ιστό [7]. Οι εκφορητικοί πόροι του αδενικού ιστού εκβάλλουν στη θηλή που εντοπίζεται στο κέντρο της σκουρόχρωμης θηλαίας άλω [7].

Ο μαστός στον άνδρα και στη γυναίκα που δεν έχει τεκνοποιήσει βρίσκεται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα μεταξύ 2<sup>ης</sup>, 3<sup>ης</sup>, 6<sup>ης</sup> και 7<sup>ης</sup> πλευράς, εκτείνεται κατά μήκος της μεσοκλειδικής γραμμής και βρίσκεται πάνω στον μείζονα θωρακικό, τον πρόσθιο οδοντωτό και τον έξω λοξό μυ [7,8]. Επιπλέον ο μαστός υποστηρίζεται από διαφράγματα συνδετικού ιστού (τους συνδέσμους Cooper) [7]. Ο αδενικός ιστός αποτελείται από 10-12 αυτόνομους λοβούς, όπου ο καθένας έχει τον κύριο γαλακτοφόρο πόρο του, που εκβάλλει στη θηλή μέσω του γαλακτοφόρου κόλπου (Εικόνα 2) [7].



**Εικόνα 2.** Ανατομία του μαστού. Ανατύπωση από Anatomy Breast Cancer Foundation.

Η αιμάτωση του μαστού προέρχεται από διακλαίνοντες κλάδους της έσω θωρακικής αρτηρίας, από κλάδους της έξω θωρακικής και από κλάδους που εκφύονται απευθείας από τη δεύτερη έως την πέμπτη μεσοπλευρία αρτηρία. Το φλεβικό αίμα του μαστού καταλήγει στις έσω και έξω θωρακικές φλέβες.

Η νεύρωση του δέρματος του μαστού εξασφαλίζεται από κλάδους των δεύτερου έως έκτου μεσοπλεύριων νεύρων. Το ανώτερο τμήμα του μαστού δέχεται επίσης κλάδους του αυχενικού πλέγματος [7].

### 1.3 Παράγοντες κινδύνου

Δεν είναι σαφείς οι παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Σήμερα έχουν προσδιοριστεί κάποιοι παράγοντες κινδύνου, ωστόσο, αν και ένας παράγοντας κινδύνου αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, ωστόσο δεν είναι αναγκαίος ούτε αρκετός από μόνος του να προκαλέσει καρκίνο.

Στη συνέχεια παρατίθενται οι κύριοι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του μαστού.

**Το φύλο:** Οι γυναίκες παρουσιάζουν εκατό φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν τη νόσο συγκριτικά με τους άντρες [9].

**Ηλικία:** Εκτός από το φύλο, η ηλικία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του μαστού, καθώς ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνει με την πάροδο της ηλικίας. Το 2016, περίπου το 99.3% και το 71.2% όλων των θανάτων που σχετιζόταν με τον καρκίνο του μαστού στην Αμερική, είχαν καταγραφεί σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 και 60 ετών, αντίστοιχα [9, 10].

**Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού:** Γυναίκες των οποίων η μητέρα ή η αδερφή έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού είναι επιρρεπείς στη νόσο. Σε πρόσφατη μελέτη που συμπεριέλαβε 113.000 γυναίκες στο Ηνωμένο Βασίλειο έδειξε ότι οι γυναίκες που έχουν συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού διατρέχουν 1.75 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου σε σχέση με τις γυναίκες χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Επιπλέον ο κίνδυνος αυξάνεται τουλάχιστον κατά 2.5 φορές στις γυναίκες με δύο ή περισσότερους συγγενείς που νοσούν [11].

**Ατομικό ιστορικό καρκίνου του μαστού:** Γυναίκες με ιστορικό καρκίνου του μαστού στο παρελθόν έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νέου καρκίνου σε άλλη θέση ή στον άλλο μαστό [12]. Ωστόσο, τα ποσοστά εμφάνισης των δεύτερων καρκίνων έχουν μειωθεί σημαντικά, ειδικά σε ασθενείς με ER+ καρκίνο του μαστού, πιθανότατα λόγω επίδρασης της ορμονοθεραπείας ή άλλης επικουρικής θεραπείας [13].

**Κληρονομικότητα:** Περίπου 5%-10% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε κάποια γονίδια που κληρονομούνται από τους γονείς. Μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 ευθύνονται κυρίως για τις οικογενείς μορφές του καρκίνου του μαστού [14,15]. Σε σύγκριση με τις γυναίκες στον γενικό πληθυσμό που έχουν μόλις 10% ποσοστό να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού μέχρι την ηλικία των 80 ετών, ο αντίστοιχος κίνδυνος για τους φορείς μετάλλαξης στα BRCA1 και BRCA2 γονίδια εκτιμάται ότι φτάνει στο 70% [16]. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις στο PALB2, ένα γονίδιο που δρα συνεργατικά με το BRCA2, φαίνεται να αυξάνουν εξίσου με το BRCA2 τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [17]. Η μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού και της θνησιμότητας επιτυγχάνονται με προφυλακτικό χειρουργείο.

**Φυλή και εθνικότητα:** Οι γυναίκες της μαύρης φυλής είναι πιθανότερο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού πριν την ηλικία των 40 ετών συγκριτικά με τις ασιατικής καταγωγής, ενώ οι Καυκάσιες είναι πιθανότερο να εμφανίσουν τη νόσο πριν την ηλικία των 40 ετών [18]. Σε παγκόσμια κλίμακα τα ποσοστά εμφάνισης της νόσου είναι υψηλά στη Βόρεια Αμερική και στη Βορειοδυτική Ευρώπη και μικρότερα στις περισσότερες περιοχές της Αφρικής και της Ασίας [3].

**Πυκνότητα του μαστού:** Η πυκνότητα των ιστών του μαστού αποτελεί δείκτη της ποσότητας του αδενικού και συνδετικού ιστού σε σχέση με το λιπώδη ιστό. Οι γυναίκες με πυκνό μαστό, δηλαδή εκείνες που έχουν περισσότερο αδενικό και συνδετικό ιστό και λιγότερο λιπώδη, παρουσιάζουν 1.6-2.3 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [19]. Η πυκνότητα του μαστού επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες, αλλά γενικά μειώνεται με την ηλικία, την εγκυμοσύνη, την εμμηνόπαυση, καθώς και με την χρήση ορισμένων φαρμάκων [20, 21, 22].

### **Αναπαραγωγικοί Παράγοντες**

**Εγκυμοσύνη και θηλασμός:** Μια πρώτη εγκυμοσύνη μετά την ηλικία των 35 ετών, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, [23, 24, 25]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο παρατεταμένος θηλασμός (>12 μήνες) μπορεί να μειώσει ελαφρώς τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [26], λόγω μείωσης του συνολικού αριθμού των εμμηνορροϊκών κύκλων μιας γυναίκας [27].

**Εμμηνος ρύση:** Για κάθε έτος πρώιμης έναρξης της εμμήνου ρύσης, ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αυξάνεται περίπου κατά 5%, ενώ για κάθε έτος καθυστέρησης της εμμηνοπάυσης ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 3% [28, 29, 30]. Η αύξηση του κινδύνου πιστεύεται ότι οφείλεται στη μεγαλύτερη έκθεση της γυναίκας σε οιστρογόνα και προγεστερόνη και συνδέεται εντονότερα με τον ER υπότυπο [31].

**Αντισυλληπτικά χάπια:** Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η χρήση αντισυλληπτικών χαπιών συνδέεται με μια μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ιδιαίτερα σε γυναίκες που αρχίζουν να τα χρησιμοποιούν πριν την ηλικία των 20 ετών [32]. Με τη διακοπή της χρήσης, ο κίνδυνος φαίνεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου και να επανέρχεται στα φυσιολογικά ποσοστά μετά από 10 χρόνια [28].

**Ορμονική θεραπεία μετά την εμμηνόπαυση:** Η ορμονική θεραπεία με οιστρογόνα, η οποία συχνά συνδυάζεται και με προγεστερόνη, αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [33,34]. Ο κίνδυνος σχεδόν εξαλείφεται δύο χρόνια μετά τη διακοπή της θεραπείας [35].

**Λοβιακό καρκίνωμα *in situ*:** Οι γυναίκες με λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS) παρουσιάζουν 7 - 12 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού [36]. Οι γυναίκες αυτές εκτιμάται ότι έχουν 2% ετήσιο κίνδυνο να διαγνωστούν με διηθητικό καρκίνο του μαστού [37].

### **Καλοήθεις παθήσεις του μαστού**

Οι καλοήθεις παθήσεις του μαστού διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο που σχετίζονται με το καρκίνο του μαστού:

- Οι μη υπερπλαστικές αλλοιώσεις, όπως η ίνωση και οι απλές κύστες, που δε σχετίζονται με υπερανάπτυξη του ιστού του μαστικού αδένου και δε φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου [38].
- Οι υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία, όπως είναι το ινοαδένωμα, που σχετίζονται με μικρή αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού [38].
- Οι υπερπλαστικές αλλοιώσεις με ατυπία, που εμφανίζουν περίπου τετραπλάσιο κίνδυνο από το μέσο όρο, όπως η άτυπη λοβιακή υπερπλασία (ALH) και η άτυπη υπερπλασία των πόρων (ADH) [38].

**Ακτινοβολία:** Η έκθεση σε ακτινοβολία πριν την ηλικία των 30 ετών, όπως οι γυναίκες που επιβίωσαν πυρηνικού ατυχήματος, ή εκείνες που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπείες στο θώρακα για το λέμφωμα Hodgkin, αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού [39,40].

**Παχυσαρκία:** Η αύξηση του σωματικού βάρους μετά την εμμηνόπαυση αυξάνει τις πιθανότητες εκδήλωσης καρκίνου του μαστού [41]. Αυτό οφείλεται, εν μέρει, στα υψηλότερα επίπεδα οιστρογόνων, καθώς το λίπος είναι ένα περιβάλλον που διευκολύνει την ανάπτυξη τους, αλλά μπορεί και να σχετίζεται με τα υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης [42,43].

**Αλκοόλ:** Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση αλκοόλ (10 γραμμάρια αλκοόλ/ ημέρα) αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες κατά 7%-10% περίπου [44]. Οι γυναίκες που καταναλώνουν 2-3 ποτά ημερησίως έχουν 20% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν τη νόσο σε σχέση με εκείνες που δεν καταναλώνουν αλκοόλ. Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι η κατανάλωση αλκοόλ πριν την πρώτη εγκυμοσύνη επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [44,45].

**Φυσική δραστηριότητα:** Η σωματική άσκηση μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού κατά 10%-20%. Σε μία μελέτη που συμμετείχαν 73.000 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες βρέθηκε ότι ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου ήταν 14% χαμηλότερος στις γυναίκες που περπατούσαν 7 ώρες εβδομαδιαίως σε σχέση με εκείνες που περπατούσαν το μέγιστο 3 ώρες την εβδομάδα [46].

**Διατροφή:** Πλήθος μελετών έχει εξετάσει τον πιθανό ρόλο της διατροφής στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που προκύπτουν μέχρι σήμερα είναι αντικρουόμενα. Η έρευνα έχει επικεντρωθεί κυρίως στο συνδυασμό της πρόσληψης λιπαρών ουσιών και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού, ωστόσο αρκετές μετα-αναλύσεις έδειξαν την απουσία οποιασδήποτε συσχέτισης [47]. Παράλληλα, πληθαίνουν συνεχώς οι ενδείξεις ότι η μεγάλη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [48,49,50].

**Κάπνισμα:** Αν και η σχέση μεταξύ του καπνίσματος και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού παραμένει αμφισβητούμενη, έχουν εντοπιστεί μεταλλαξιγόνες ουσίες από τον καπνό του τσιγάρου στο υγρό του μαστού από γυναίκες που δεν έχουν θηλάσει [51]. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν έως σήμερα υποδεικνύουν ότι το κάπνισμα, ιδιαιτέρως σε νεαρή ηλικία, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [52,53,54,55].

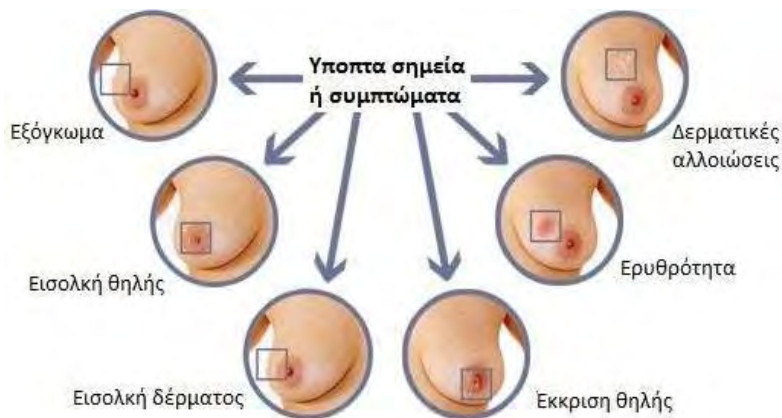
#### **1.4 Κλινική εικόνα - Συμπτώματα**

Το συνηθέστερο “σύμπτωμα” του καρκίνου του μαστού είναι η παρουσία ενός όγκου ή μιας μάζας. Μια ανώδυνη σκληρή μάζα με ανώμαλο περίγραμμα ενδέχεται να

αποτελεί νεόπλασμα. Ωστόσο, ένα νεόπλασμα μπορεί να είναι σαφώς περιγεγραμμένο και μαλακής υφής. Για το λόγο αυτό αν υπάρξει οποιαδήποτε αλλαγή οι γυναίκες θα πρέπει να επισκέπτονται εξειδικευμένο γιατρό.

Άλλα πιθανά συμπτώματα περιλαμβάνουν:

- Διόγκωση του συνόλου ή μέρους του μαστού
- Ερεθισμός ή παραμόρφωση του δέρματος
- Πόνος στο μαστό ή στη θηλή
- Εισολκή της θηλής
- Ερυθρότητα, αποφολίδωση, ή σκλήρυνση του δέρματος της θηλής ή του μαστού
- Έκκριση υγρού από τη θηλή



**Εικόνα 3.** Συμπτώματα εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Πηγή: <http://www.smyrlislaparoscopic.gr/com>.

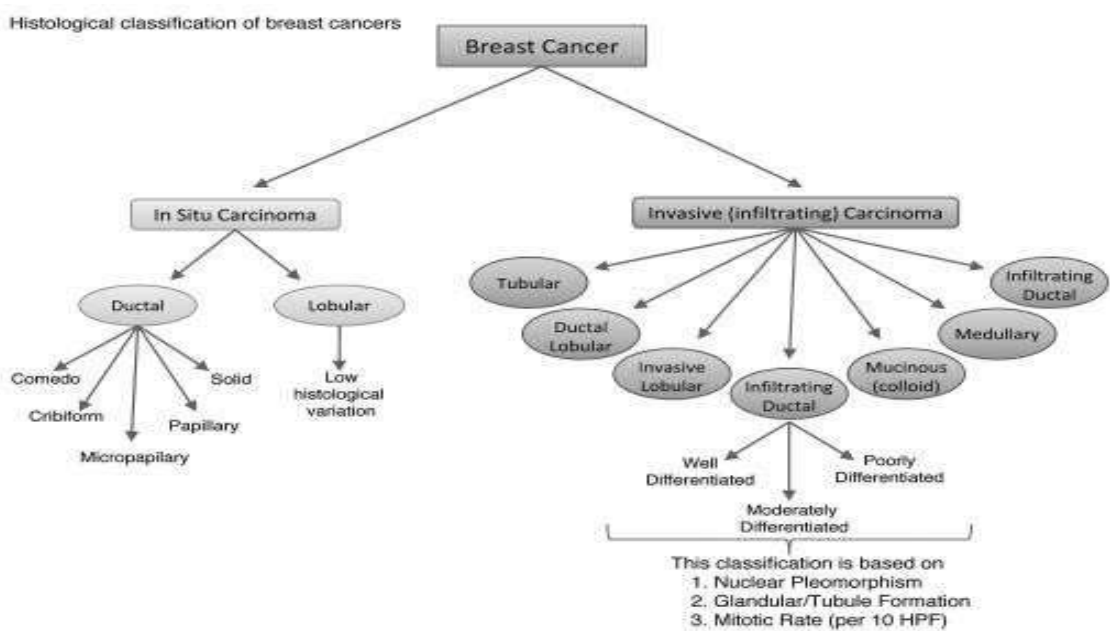
Μερικές φορές ο καρκίνος του μαστού ενδέχεται να έχει εξαπλωθεί και στους μασχάλιους λεμφαδένες κάτω από τον βραχίονα ή γύρω από την κλείδα του ώμου και να προκαλέσει εκεί οίδημα, ακόμη κι αν ο όγκος του μαστού αυξηθεί και γίνει αισθητός. Επιπλέον, οι πρησμένοι λεμφαδένες θα πρέπει να ελέγχονται από εξειδικευμένους γιατρούς [56].

### 1.5 Ιστολογική ταξινόμηση

Ο καρκίνος του μαστού θεωρείται εξαιρετικά ετερογενής νόσος, καθώς οι διάφοροι τύποι του χαρακτηρίζονται από διαφορετικά βιολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, διαφορετική κλινική εικόνα, διαφορετική ανταπόκριση στις



θεραπείες, αλλά και διαφορετική έκβαση της νόσου [57]. Με βάση το βαθμό ετερογένειας, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να ταξινομηθεί σε ξεχωριστούς ιστολογικούς τύπους [57]. Εάν τα καρκινικά κύτταρα έχουν διηθήσει τη βασική μεμβράνη και έχουν εξαπλωθεί σε γειτονικούς ιστούς, ο καρκίνος χαρακτηρίζεται ως διηθητικός, ενώ αν περιορίζονται στο επιθήλιο τότε χαρακτηρίζεται ως μη διηθητικός ή in situ [58]. Τόσο το διηθητικό όσο και το in situ καρκίνωμα διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: το πορογενές και το λοβιακό, που προέρχονται από την ίδια πορολοβιακή μονάδα του μαζικού αδένα [58]. Η ταξινόμηση έχει ιδιαίτερη αξία, καθώς προσδιορίζει και την πρόγνωση της νόσου [57].



**Εικόνα 4.** Ιστολογική ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού που χρησιμοποιείται σήμερα από τους κλινικούς ιατρούς και κατηγοριοποιεί την ετερογένεια που εντοπίζεται στον καρκίνο του μαστού με βάση τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά και τα μοτίβα ανάπτυξης. HPF: πεδίο υψηλής ισχύος [59].

#### Μη Διηθητικά νεοπλάσματα

- **Μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS):** Πρόκειται για νεοπλασματική αλλοίωση που χαρακτηρίζεται από ενδοπορική υπερπλασία επιθηλιακών κυττάρων, τα οποία εμφανίζουν κυτταρική και πυρηνική ατυπία [59]. Θεωρείται πρόιμη μορφή του καρκίνου, καθώς μπορεί να εξελιχθεί σε διηθητικό καρκίνο [60]. Το DCIS αποτελεί μια ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων που κυμαίνονται από υψηλού, έως μέτριου και χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση [60].

- **Μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS):** Πρόκειται για νεοπλασματική αλλοίωση που χαρακτηρίζεται από ενδολοβιδιακή υπερπλασία μικρών, σχετικά ομοιόμορφων, με μικρή συνοχή επιθηλιακών κυττάρων. Εντάσσεται στον κοινό όρο λοβιακή νεοπλασία, καθώς δε θεωρείται καρκίνος αλλά αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου [61], [62] [63]. Η διάγνωση γίνεται με βιοψία [58, 61]. Σε ποσοστό περίπου 70% των περιπτώσεων είναι πολυεστιακός, δηλαδή εμφανίζεται και σε άλλες θέσεις του ίδιου μαστού [64]. Τα μη φυσιολογικά κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται στα λόβια του μαστού, χαρακτηρίζονται από μικρού έως μεσαίου μεγέθους, με βαθυχρωματικούς πυρήνες που δεν εμφανίζουν πολλές μιτώσεις ή ατυπία [58].

#### Διηθητικά καρκινώματα

- **Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC):** Αποτελεί το 5%-15% των καρκινωμάτων του μαστού. [62]. Τα καρκινικά κύτταρα είναι μικρά, σχετικά ομοιόμορφα, με μικρή συνοχή και διηθούν το στρώμα του μαστού μεμονωμένα ή σε μονήρεις στίχους [62]. Έχουν τη δυνατότητα να διηθήσουν στους λεμφαδένες και σε άλλα μέρη του σώματος δίνοντας μεταστάσεις [65].
- **Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα:** Είναι ο συχνότερος τύπος, καθώς αντιστοιχεί σε ποσοστό 40%-75% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού [66]. Τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσιάζουν πολυμορφία, έχουν ευδιάκριτα πυρήνια και εμφανίζουν αυξημένες μιτώσεις [58]. Οι περιοχές νέκρωσης και αποτιτανώσεων παρατηρούνται στο 60% των περιπτώσεων [58].
- **Σωληνώδες καρκίνωμα:** Αποτελεί μόλις το 2% των διηθητικών καρκίνων του μαστού [67], εμφανίζεται συχνότερα σε μεγαλύτερες ηλικίες και παρουσιάζει μικρή πιθανότητα μετάστασης στους λεμφαδένες [58]. Μικροσκοπικά πρόκειται για μικρού μεγέθους όγκο, καλής διαφοροποίησης, που αποτελείται από ωοειδή, γωνιώδη ή επιμήκη σωλήνια [57, 64].
- **Ηθμοειδές καρκίνωμα:** Είναι ένας σπάνιος τύπος καρκίνου του μαστού, που αντιπροσωπεύει το 0.1% - 0.6% των περιπτώσεων και σχετίζεται με ευνοϊκή

πρόγνωση [68]. Η μέση ηλικία διάγνωσης κυμαίνεται μεταξύ 54-63 ετών [68, 69]. Τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν χαμηλού βαθμού ατυπία, σχηματίζουν ηθμοειδείς δομές και μοιάζουν με εκείνα που παρατηρούνται στο ηθμοειδές καρκίνωμα *in situ*, με τη διαφορά ότι διηθούν το συνδετικό ιστό του μαστού [58].

- **Βλεννώδες καρκίνωμα:** Απαντάται συχνότερα σε γυναίκες άνω των 60 ετών και ειδικά μετά την εμμηνόπαυση. Αποτελεί το 2% περίπου όλων των διηθητικών καρκίνων του μαστού, έχει καλή πρόγνωση και χαρακτηρίζεται από αθροίσεις καρκινικών κυττάρων ήπιας πυρηνικής ατυπίας που επιπλέουν σε άφθονη βλέννα [58]. Για να χαρακτηριστεί ένα καρκίνωμα βλεννώδες πρέπει να έχει τα χαρακτηριστικά του βλεννώδους σε ποσοστό 90% της έκτασής του [59].
- **Μυελοειδές καρκίνωμα:** Πρόκειται για σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού με καλή πρόγνωση που αντιπροσωπεύει το 1% - 7% των περιπτώσεων [58, 70]. Πρόκειται καλά αφοριζόμενο όγκο με αναπλαστική μορφολογία [58]. Επηρεάζει γυναίκες ηλικίας περίπου 50 ετών [58] και είναι ιδιαίτερα συχνός τύπος σε φορείς μεταλλάξεων του BRCA1 γονιδίου [71].
- **Θηλώδες καρκίνωμα:** Καταλαμβάνει μόλις 1% - 2% των διηθητικών καρκίνων του μαστού [64]. Έχει πολύ καλή πρόγνωση και επηρεάζει συχνότερα γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση [58]. Σε ποσοστό της τάξης του 70% των περιπτώσεων αναπτύσσεται σε συνδυασμό με το θηλώδες καρκίνωμα *in situ* [66].
- **Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (IBC):** Είναι μια σπάνια και επιθετική μορφή του καρκίνου του μαστού με υψηλή θνησιμότητα [72]. Αντιπροσωπεύει περίπου το 5% όλων των τύπων καρκίνου του μαστού [73,74,75]. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν αλλαγές στο δέρμα όπως ερυθρότητα, οίδημα και όψη φλοιού πορτοκαλιού, που προκαλούνται από νεοπλασματικά έμβολα στα λεμφαγγεία του δέρματος του μαστού και καταλαμβάνουν το 1/3 της επιφανείας του [76,77].
- **Νόσος Paget της θηλής:** Είναι ένα ασυνήθιστο και σχετικά σπάνιο ενδοεπιθηλιακό αδενοκαρκίνωμα, που εμφανίζεται σε λιγότερο από 5% των γυναικών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού [78,79]. Οι ασθενείς

εμφανίζονται με εκζεματικές αλλοιώσεις στη θηλή από την οποία εκκρίνεται υγρό [80]. Το δέρμα της θηλής και της θηλαίας άλωσ είναι συχνά κόκκινο και μπορεί να παρουσιάσει κνησμό [81].

## 1.6 Σταδιοποίηση

Σταδιοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένας καρκίνος κατηγοριοποιείται με βάση το μέγεθος, την παρουσία του ή όχι στους επιχώριους λεμφαδένες, αλλά και την επέκτασή του σε άλλα μέρη του σώματος εκτός από τον μαστό. Ο καρκίνος του μαστού κατηγοριοποιείται σε 4 βασικά στάδια ανάλογα με το που εντοπίζεται. Στο στάδιο I ο καρκίνος εντοπίζεται μόνο στο μαστό, έχει πολύ μικρό μέγεθος και δεν έχει διηθήσει στους λεμφαδένες. Στο στάδιο II ο καρκίνος εντοπίζεται μόνο στο μαστό, έχει αυξηθεί σε μέγεθος αλλά δεν έχει διηθήσει ακόμη τους λεμφαδένες. Στο στάδιο III έχει διηθήσει τους λεμφαδένες και στο στάδιο IV έχει κάνει μετάσταση σε άλλα όργανα. (Εικόνα 7).



**Εικόνα 5.** Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού. Πηγή: <https://fyssas.gr/stadiopoiisi-karkinou-mastou/> Μέρος από το βιβλίο «Ο μαστός και οι παθήσεις του» Εκδόσεις Λιβάνη 2006.

Κάθε στάδιο κατηγοριοποιείται σε περαιτέρω στάδια ανάλογα με το μέγεθος του όγκου. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος να καθορίσουμε το ακριβές στάδιο ενός καρκίνου είναι το σύστημα TNM, όπου:

**T:** περιγράφει το μέγεθος του όγκου του μαστού ή την εδραίωσή του σε τοπικές ανατομικές δομές.

**N:** περιγράφει εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί στους γειτονικούς λεμφαδένες

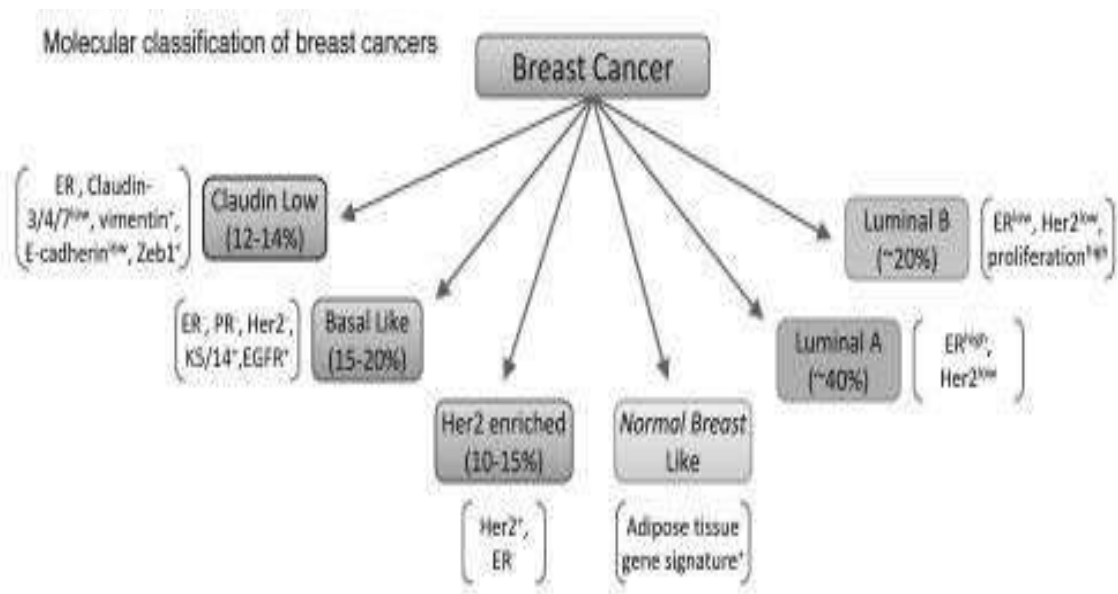
**M:** περιγράφει εάν ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση σε κάποια άλλη θέση του οργανισμού

ΣΤΑΔΙΟ 0	<i>Tis, N0, M0</i> : καρκίνος in situ που εντοπίζεται σε συγκεκριμένη θέση χωρίς διήθηση σε γύρω ιστούς ή διασπορά και περιλαμβάνει τα in situ λοβώδη καρκινώματα (LCIS), τα in situ πορογενή καρκινώματα (DCIS) και τη νόσο Paget της θηλής.
ΣΤΑΔΙΟ I	<i>T1</i> : ο όγκος είναι $\leq 2$ cm <i>N0</i> : ο όγκος δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες <i>M0</i> : ο όγκος δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένες περιοχές
ΣΤΑΔΙΟ IIA	<i>T0, N1, M0</i> : απουσία πρωτοπαθούς όγκου αλλά διακρίνεται μετάσταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες <i>T2, N0, M0</i> : ο όγκος $\geq 2$ cm και $\leq 5$ cm, χωρίς διασπορά στους λεμφαδένες <i>T1, N1, M0</i> : ο όγκος $\leq 2$ cm και έχει εξαπλωθεί στους μασχαλιαίους λεμφαδένες
ΣΤΑΔΙΟ IIB	<i>T2, N1, M0</i> : με όγκο 2-5 cm και επέκταση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες αλλά χωρίς εξάπλωση σε απομακρυσμένα σημεία <i>T3, N0, M0</i> : με όγκο $\geq 5$ cm χωρίς μεταστάσεις στους λεμφαδένες και σε απομακρυσμένες περιοχές
ΣΤΑΔΙΟ IIIA	<i>T0- T1-T2, N2, M0</i> : ο όγκος δεν υπερβαίνει τα 5 cm (ή δεν μπορεί να βρεθεί), έχει εξαπλωθεί στους μασχαλιαίους λεμφαδένες ή στους έσω μαστικούς αδένες αλλά χωρίς εξάπλωση σε απομακρυσμένες περιοχές <i>T3, N1 ή N2, M0</i> : ο όγκος είναι $\geq 5$ cm, αλλά δεν αναπτύσσεται στο θωρακικό τοίχωμα ή το δέρμα, έχει εξαπλωθεί σε μασχαλιαίους λεμφαδένες ή σε έσω μαστικούς αδένες, χωρίς μετάσταση σε απομακρυσμένες περιοχές
ΣΤΑΔΙΟ IIIB	<i>T4, οποιοδήποτε N, M0 και οποιοδήποτε T, N3, M0</i> : όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που έχει επεκταθεί στο θωρακικό τοίχωμα ή το δέρμα του μαστού. Ο καρκίνος μπορεί να έχει εξαπλωθεί στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, οι οποίοι μπορεί να συμφύονται μεταξύ τους ή με άλλους γειτονικούς ιστούς
ΣΤΑΔΙΟ IV	<i>Οποιοδήποτε Ta, οποιοδήποτε N και M1</i> : όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που μπορεί να έχει εξαπλωθεί ή όχι στους κοντινούς λεμφαδένες. Έχει εξαπλωθεί σε μακρινά όργανα (οστά, ήπαρ, εγκέφαλος, πνεύμονες) ή λεμφαδένες μακριά από το στήθος.

**Πίνακας 1.** Σύστημα TNM για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού [82].

## 1.7 Μοριακή ταξινόμηση

Η ανάγκη για ακριβέστερη εκτίμηση της ετερογένειας του καρκίνου του μαστού, αλλά και για καλύτερη πρόβλεψη και θεραπεία του όγκου οδήγησε στη μελέτη του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των συγκεκριμένων όγκων και στην αναζήτηση μοριακών βιοδεικτών. Μεταξύ πολλών ερευνητικών ομάδων, ο Perou και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας την ανάλυση μικροσυστοιχιών προέβησαν σε μοριακή ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού (Εικόνα 6) [58, 83]).



**Εικόνα 6.** Μοριακή ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού. Πηγή: Gautam K. Malhotra, Xiangshan Zhao, Hamid Band and Vimla Band, Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers, *Cancer Biology & Therapy* 10:10, 955-960, November 15, 2010

**Η υποομάδα LUMINAL A:** Έχει καλή πρόγνωση και αντιπροσωπεύει το 40%-50% των διηθητικών καρκίνων του μαστού. Πρόκειται για όγκους με θετική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), αλλά απουσία έκφρασης της HER2 πρωτεΐνης [58]. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και χαμηλό βαθμό έκφρασης γονιδίων κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67) [84].

**Η υποομάδα LUMINAL B:** Αφορά στο 20% των καρκίνων του μαστού και έχει δυσμενέστερη πρόγνωση σε σχέση με τον Luminal A [58]. Πρόκειται για όγκους με

θετική έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), αλλά σε χαμηλότερο ποσοστό συγκριτικά με την A υποομάδα [58]. Τα επίπεδα έκφρασης της Her2 πρωτεΐνης μπορεί να είναι υψηλά ή χαμηλά, ωστόσο χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 [58,85].

**Η υποομάδα HER2+:** Αντιστοιχεί στο 15% των περιπτώσεων και έχει κακή πρόγνωση [58]. Χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα έκφρασης της HER2 πρωτεΐνης και του δείκτη πολλαπλασιασμού (Ki-67) και χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ER και PR [58]. Περίπου το 50% των όγκων αυτών δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς και χαρακτηρίζονται ως HER2 ενισχυμένοι (enriched) [86,87].

**Η τριπλά αρνητική υποομάδα (BASAL-LIKE):** Αντιστοιχεί στο 15%-20% των περιπτώσεων [58]. Τα κύτταρα των όγκων αυτών δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς και την πρωτεΐνη HER2, (ER-,PR-,HER2-) [88]. Οι όγκοι της κατηγορίας αυτής χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα έκφρασης του πρωτεϊνικού δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67), αυξημένη έκφραση του EGFR υποδοχέα και των κυτοκερατινών CK5/6 και CK14, καθώς επίσης και μεταλλάξεις στα γονίδια TP53 και BRCA1 [88, 89]. Παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας [90].

**Normal-like:** Η ομάδα αυτή αντιπροσωπεύει το 5%-10% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστού [83]. Δεν εκφράζουν τους ER, PR και HER2 πρωτεϊνικούς υποδοχείς και διαφοροποιούνται από τους Basal-Like τύπους καθώς είναι αρνητικοί για την κυτοκερατίνη CK5 και τον EGFR υποδοχέα [91]. Παρουσιάζουν μέτρια πρόγνωση, κυμαίνονται μεταξύ των luminal και basal-like και συνήθως δεν ανταποκρίνονται στην επικουρική θεραπεία [91].

**Claudin-low:** Το 2007 αναγνωρίστηκε ένας νέος υπότυπος [92], που χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη δημιουργία συνδέσμων μεταξύ των κυττάρων [91]. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι Claudin-3, 4 και 7, cingulin, occludin και E-cadherin [91]. Οι όγκοι αυτοί εμφανίζουν ομοιότητες με τους basal-like, όπως για παράδειγμα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της HER2 πρωτεΐνης και του luminal συμπλέγματος γονιδίων, αλλά διαφοροποιούνται από εκείνους καθώς εμφανίζουν υπερέκφραση 40 περίπου γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση [91,93,94].

## 1.8 Κληρονομικός/ Οικογενής καρκίνος του μαστού

Το 70% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού είναι σποραδικού τύπου, εμφανίζεται δηλαδή σε γυναίκες χωρίς προηγούμενο οικογενειακό ιστορικό για την νόσο, ενώ το 30% είναι οικογενής και εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα στα μέλη μιας οικογένειας. Από το 30% του οικογενούς τύπου καρκίνου του μαστού, ποσοστό περίπου 10% είναι κληρονομικού τύπου και οφείλεται στην ύπαρξη κληρονομούμενων μεταλλάξεων συγκεκριμένων γονιδίων.

Ένα ποσοστό της τάξης 20%-40% των κληρονομούμενων περιπτώσεων προκαλούνται από μεταλλάξεις στα γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA BRCA1 και BRCA2 [95,96]. Οι γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια έχουν υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν τόσο καρκίνο του μαστού όσο και καρκίνο των ωοθηκών [97]. Επιπλέον, εντοπίστηκαν κι άλλα γονίδια που εμπλέκονται σε κληρονομικού τύπου σύνδρομα. Τα γονίδια που προδιαθέτουν για τον καρκίνο ανάλογα με τον κίνδυνο που προκαλούν για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: υψηλής, μέτριας και χαμηλής διεισδυτικότητας (Πίνακας 2) [98,99,100,101,102,103,104].

ΓΟΝΙΔΙΟ/ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΣΥΝΔΡΟΜΟ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<b>Υψηλής διεισδυτικότητας</b>		
BRCA1 (17q12-21)	Κληρονομικός καρκίνος του μαστού και σύνδρομο των ωοθηκών	Καρκίνος μαστού, καρκίνος ωοθηκών
BRCA2 (13q12-13)	Κληρονομικός καρκίνος του μαστού και σύνδρομο ωοθηκών	Καρκίνος μαστού, ωοθηκών, προστάτη και παγκρέατος
TP53 (17p13.1)	Σύνδρομο Li-Fraumeni	Καρκίνος μαστού, σαρκώματα, λευχαιμίες, όγκοι εγκεφάλου
PTEN (10q23.3)	Σύνδρομο Cowden	Καρκινώματα μαστού, θυρεοειδή και ενδομητρίου, αμαρτωματώδεις πολύποδες του γαστρεντερικού σωλήνα
STK11 (19p13.3)	Σύνδρομο Peutz-Jeghers	Καρκινώματα μαστού, ωοθηκών, αυχένα, μήτρας, όρχεων
CDH1 (16q22.1)	Οικογενές σύνδρομο διάχυτου γαστρικού καρκίνου	Γαστρικός καρκίνος, λοβιακός καρκίνος του μαστού



Ενδιάμεσης διεισδυτικότητας		
ATM (11q22.3)	Σύνδρομο Luis-Bar	
CHEK2 (22q.12.1)		Καρκινώματα μαστού, παχέος εντέρου και ωοθηκών
PALB2 (16p12.1)		Καρκινώματα μαστού θήλεος και άρρενος ατόμου,, παγκρέατος και ωοθηκών
BARD1(2q34-q35), BRIP1(17q22-q24), MRE11A(11q21), NBN(8q21), RAD50(5q31) RAD51C (17q25.1), XRCC2 (7q36.1), RAD51D (17q11), ABRAXAS (4q21.23)		Καρκίνος του μαστού και ωοθηκών
Χαμηλής διεισδυτικότητας		
MAP3K1, FGFR2, LSP1, TNRC19, H19, (Apostolou 2013, b124- 128) MSH2/3/6(2p22- 21/5q11-12/2p16), MLH1(3p21.3), PMS1/2(2q31-33, 7p22)	Σύνδρομο Lynch	Καρκινώματα ενδομητρίου, παχέος εντέρου, μαστού και ωοθηκών, καρκίνος ουροποιητικού συστήματος, σαρκώματα, γλοιοβλάστωμα, λευχαιμία

**Πίνακας 2.** Γονίδια προδιάθεσης για κληρονομικού τύπου καρκίνο του μαστού.

### 1.9 Επιγενετική

Η επιγενετική είναι η μελέτη των αλλαγών στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, χωρίς ωστόσο αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι υπεύθυνες για γονιδιακά μοτίβα έκφρασης που ρυθμίζονται αυστηρά αναλόγως τον κυτταρικό και ιστολογικό τύπο. Αλλαγές σε αυτά τα πρότυπα έκφρασης μπορεί να προκαλέσουν ασθένειες, καθώς και συγκεκριμένους τύπους καρκίνου [105]. Οι κύριοι

επιγενετικοί μηχανισμοί είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η μεταβολή της έκφρασης των miRNA μορίων. Και οι τρεις μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων και να επηρεάσουν τα πρότυπα της πρωτεϊνικής σύνθεσης [106]. Εν συντομία, οι κύριοι επιγενετικοί μηχανισμοί αναφέρονται στη συνέχεια:

- Η μεθυλίωση του DNA παρατηρείται συνήθως σε δινουκλεοτίδια CpG (νησίδια CpG), μετατρέποντας το νουκλεοτίδιο κυτοσίνης σε 5-μεθυλοκυτοσίνη μέσω της προσθήκης μιας μεθυλικής ομάδας (-CH<sub>3</sub>) [107,108]. Η s-αδενοσυλμεθειονίνη (SAM) είναι ο δότης της μεθυλομάδας [109,110].  
Οι DNA-μεθυλοτρανφεράσες (DNMTs) είναι οι κύριοι ενεργοποιητές της μεθυλίωσης και καταλύουν είτε de novo μεθυλίωση είτε αναπαραγωγή των μοτίβων μεθυλίωσης που ήδη υπάρχουν στους νεοσυντιθέμενους κλώνους DNA κατά την αντιγραφή [111]. Το μοτίβο μεθυλίωσης του DNA διατηρείται κατά την κυτταρική διαίρεση μέσω του ενζύμου DNMT1, ενώ οι μεθυλοτρανφεράσες DNMT3a και DNMT3b εμπλέκονται στη δημιουργία προτύπων μεθυλίωσης de novo [112,113].
- Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και αποτελείται από 146 ζεύγη νουκλεοτιδίων DNA που αναδιπλώνονται γύρω από έναν πυρήνα ιστονών [107]. Οι διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις στα αμινοτελικά άκρα των ιστονών, που ρυθμίζουν τη δομή της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων, διεξάγονται με ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, ουμπικουΐτυλίωση, σαμουΐλίωση, και ADP ριβοσυλίωση [107,111].
- Όπως η μεθυλίωση τροποποιεί το DNA και επηρεάζει την ικανότητά του να μεταγραφεί, με ανάλογο τρόπο τροποποιεί και τα επίπεδα έκφρασης των miRNA μορίων, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό την ικανότητά τους να ρυθμίζουν μετα-μεταγραφικά την έκφραση των πρωτεϊνών [112].

### **1.10 Μεθυλίωση του DNA και καρκίνος του μαστού**

Την τελευταία δεκαετία πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA και τη σχέση τους με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού [114]. Μερικά από τα μεθυλιωμένα γονίδια εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (RASSF1A, CDKN2A, CDKN1B, και CCND2), στην

επιδιόρθωση βλαβών του DNA (BRCA1, MLH1 και MGMT), στην αποτοξίνωση των κυττάρων (GSTP1), στην απόπτωση (HOXA5 και TMS1), στην κυτταρική προσκόλληση και ικανότητα διήθησης (TWIST, CDH1, TIMP3), καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν για υποδοχείς ορμονών (ESR1 και PGR) [115]. Η μεθυλίωση του DNA κατηγοριοποιείται σε υπομεθυλίωση και σε υπερμεθυλίωση. Η υπομεθυλίωση του DNA οδηγεί σε ενεργοποίηση των πρωτοογκογονιδίων, επανενεργοποίηση μεταθετών στοιχείων και απώλεια γονιδιακής αποτύπωσης [116], ενώ η υπερμεθυλίωση του DNA οδηγεί σε καταστολή των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των γονιδίων επιδιόρθωσης βλαβών του DNA [117].

Πρόσφατη έρευνα του Feng και συνεργατών, αποδεικνύει ότι στον καρκίνο του μαστού υπάρχει συντονισμένο μοτίβο υπερμεθυλίωσης σε μεγάλο αριθμό γονιδίων που αναφέρεται ως <<φαινότυπος μεθυλίωσης των CpG νησίδων>> [118]. Ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από ένα ξεχωριστό επιγενετικό προφίλ που σχετίζεται με χαμηλό κίνδυνο μετάστασης και επιβίωση, ενώ η απουσία του συγκεκριμένου γενετικού προφίλ σχετίζεται με υψηλό κίνδυνο μετάστασης και θάνατο [118]. Η μεθυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στις διάφορες υποομάδες του καρκίνου του μαστού και είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τους μηχανισμούς με τους οποίους συμβαίνει στα πλαίσια αποτελεσματικότερης θεραπείας [115].

### **1.10.1 Τα γονίδια BRCA1 και BRCA2**

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17q21 ενώ το BRCA2 στο χρωμόσωμα 13q12.3. Και τα δύο γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους που αποτελούνται από 1.863 και 3.418 αμινοξέα αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες BRCA1 και BRCA2 παίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη ρύθμιση της μεταγραφής, στη διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, στην ογκογένεση και στη ρύθμιση της απόπτωσης ως αποτέλεσμα βλάβης στο DNA. Συγκεκριμένα εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης θραυσμάτων και στις 2 έλικες του DNA (DSB's) μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) [119, 120]

Η επιγενετική αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως του BRCA1 αποτελεί σημαντικό γεγονός στο σποραδικό καρκίνο του μαστού [121]. Οι πρώτες αναφορές έδειξαν ότι ένας από τους κυριότερους μηχανισμούς της απώλειας

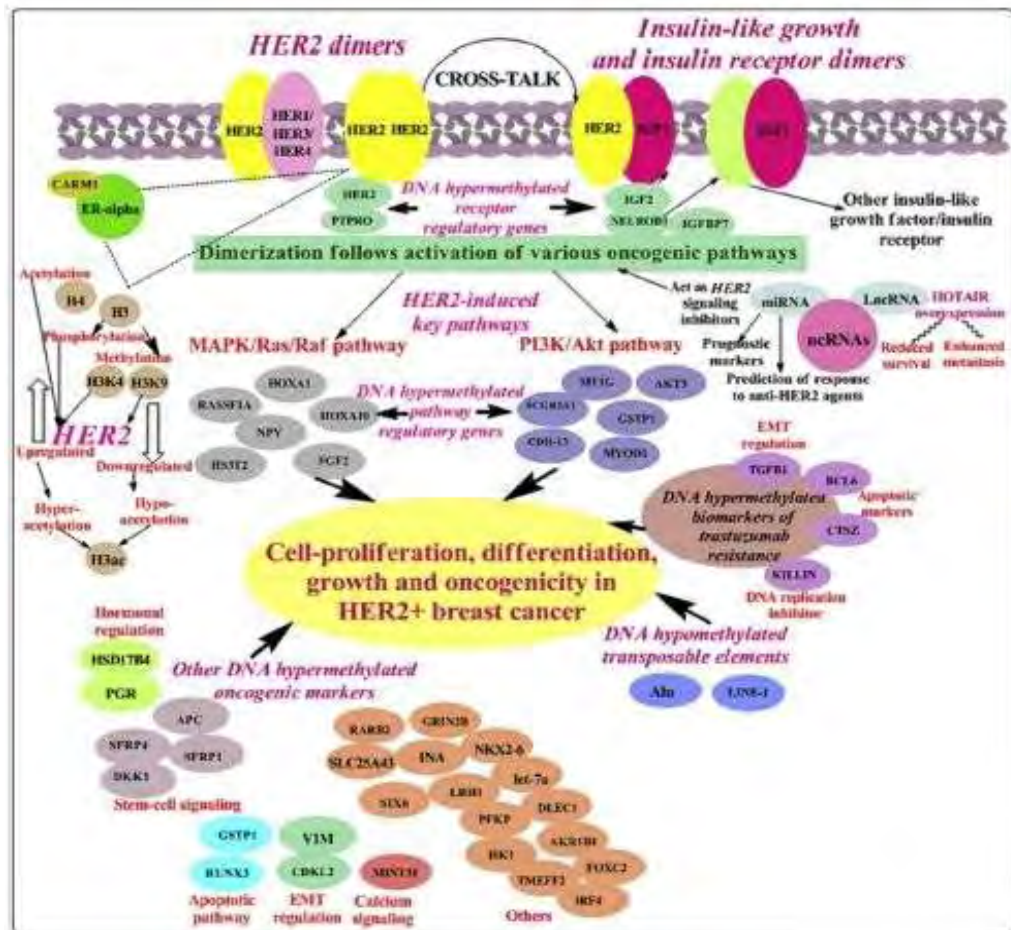
έκφρασης του BRCA1 γονιδίου ήταν η επιγενετική αποσιώπηση [121].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η απώλεια της έκφρασης του BRCA1 γονιδίου έχει συσχετιστεί με όγκους basal-like/TNBC [121]. Ο Stefansson και συνεργάτες του μελέτησαν τη μεθυλίωση του BRCA1 γονιδίου σε 111 σποραδικούς καρκίνους του μαστού, στους οποίους είχε προηγηθεί έλεγχος για ανίχνευση γενετικών μεταλλάξεων στο γονίδιο BRCA1 [122]. Η μελέτη έδειξε ότι η υπερμεθυλίωση στις CpG νησίδες του BRCA1 σχετίζεται σημαντικά με όγκους basal-like/TNBC. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη του Hsu και συνεργατών εξέτασε επίσης τη μεθυλίωση του υποκινητή του BRCA1 σε 139 ιστούς με καρκίνο του μαστού σε πρώιμο στάδιο, με τη χρήση ειδικής για μεθυλίωση PCR (Methylation-specific PCR) και τα στοιχεία τους αναδεικνύουν επίσης συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης του BRCA1 υποκινητή και των όγκων TNBC [121].

### **1.10.2 Το γονίδιο ERBB2 (HER-2/neu)**

Το πρωτοογκογονίδιο ERBB2 (HER-2/neu) (human epidermal growth factor receptor 2), είναι ένα από τα 4 μέλη της οικογένειας των υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα [123]. Ενίσχυση και υπερέκφραση του γονιδίου ERBB2/HER2 παρατηρείται σε περίπου 20-30% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και σχετίζεται με κακή πρόγνωση [124]. Έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, των ωοθηκών, των πνευμόνων και του γαστρικού καρκίνου [125].

Έχει δειχθεί επίσης, ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της μεθυλίωσης των CpG νησίδων των γονιδίων RAR-b2, RASSF1A, APC, DLEC1, GRIN2B, HOXA1, HOXA10, IGF2, MT1G, RUNX3, SCGB3A1, SFRP1, SFRP4, TMEFF2, MINT31, CDH-13, HSD17B4, PGR, MYOD1, GSTP1, SLC25A43, VIM, PTPRO και LRH-1 σε καρκίνους του μαστού που παρουσιάζουν ενίσχυση του HER2 γονιδίου [126]. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν υπερμεθυλιωμένα γονίδια που σχετίζονται με διάφορα καρκινικά μονοπάτια. Ωστόσο, μία μόνο μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Park και συνεργάτες έδειξε υπομεθυλίωση των ALU και LINE-1 μεταθετών στοιχείων σε καρκίνο μαστού με HER2 ενίσχυση [116]. Τα παραπάνω στοιχεία υποστηρίζουν τη σύνδεση αυτών των υπομεθυλιωμένων γονιδίων με τη χρωμοσωμική αστάθεια στους HER2 ενισχυμένους τύπους καρκίνου του μαστού [127].



**Εικόνα 7.** Επιγενετικοί δείκτες που εμπλέκονται στην καρκινογένεση των HER2 ενισχυμένων τύπων του καρκίνου του μαστού. Πηγή: H. Singla et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 142 (2017) 316- 327.

### 1.10.3 Τα γονίδια PTEN/KILLN

Το PTEN γονίδιο, είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 10q23.3 και μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό, τη διήθηση και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων και να προκαλέσει απόπτωση αυτών. Απώλεια ή μεταλλάξεις του PTEN γονιδίου παρατηρούνται σε διάφορους κακοήθεις όγκους [128]. Η απώλεια ετεροζυγωτίας του συγκεκριμένου γονιδίου στον καρκίνο του μαστού κυμαίνεται σε ποσοστό περίπου 30-50%, γεγονός που υποδηλώνει ότι αποτελεί κύριο μηχανισμό απώλειας της έκφρασής του στον καρκίνο του μαστού [129]. Η PTEN πρωτεΐνη, αναστέλλει τη δράση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR. Η απουσία λειτουργικής PTEN πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα, οδηγεί σε συνεχή ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K, συμπεριλαμβανομένων

των AKT και mTOR κινασών [128]. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR εμπλέκεται στην ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, καθώς και στην ανάπτυξη αντοχής σε συνήθεις θεραπείες [130, 131]. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι απώλεια του PTEN, μπορεί να θεωρηθεί ως αντιπροσωπευτικός προγνωστικός δείκτης στη θεραπεία με ταξάνες και trastuzumab σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού που παρουσιάζουν HER2 ενίσχυση [132].

Περίπου το 80% των μεταλλάξεων στο γονίδιο PTEN σχετίζεται με έναν αυτοσωμικού επικρατούς τρόπο κληρονόμησης σύνδρομο, τη νόσο Cowden, που συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νεοπλασμάτων του μαστού, του θυρεοειδούς και του ενδομητρίου [133].

Το γονίδιο KILLN, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10q23.31, κοντά στο PTEN γονίδιο. Έχει την ίδια θέση έναρξης μεταγραφής και ρυθμίζεται από τον ίδιο υποκινητή, αλλά μεταγράφεται προς τη μη νοηματική φορά. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των γονιδίων PTEN/KILLIN και του καρκίνου του μαστού [133]. Τα αποτελέσματα μιας έρευνας που συνέκρινε 156 δείγματα ιστών φυσιολογικού μαστού και 1070 δείγματα καρκινικών ιστών μαστού, έδειξαν ότι τα επίπεδα έκφρασης των mRNA μεταγράφων του KILLN γονιδίου είναι σημαντικά μικρότερα σε καρκινώματα μαστού σε σχέση με τους φυσιολογικούς ιστούς [134]. Η απώλεια έκφρασης του KILLN γονιδίου έχει βρεθεί να σχετίζεται επίσης με αυξημένο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και μεταστατικό δυναμικό [134]. Η παραγόμενη πρωτεΐνη KILLIN προσδένεται στο DNA και εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου σε συνδυασμό με την απόπτωση που επάγεται μέσω του p53/TP53 μονοπατιού. Αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και παρουσιάζει συγγένεια πρόσδεσης για δίκλινα και μονόκλινα DNA μόρια.

## 1.11 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να αντιμετωπιστεί με χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία ή τη λήψη φαρμακευτικών παραγόντων (χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία) [135]. Το είδος της θεραπείας καθορίζεται με βάση τον τύπο και τη θέση του όγκου, το βαθμό εξάπλωσης της νόσου και την κατάσταση της υγείας της ασθενούς [136].

**Χειρουργική επέμβαση:** Η χειρουργική αφαίρεση του όγκου στο μαστό, δηλαδή η λεγόμενη μαστεκτομή αποτέλεσε την αρχαιότερη μέθοδο θεραπείας του καρκίνου του

μαστού. Σήμερα υπάρχουν διάφορα είδη μαστεκτομής. Η ολική απομάκρυνση του μαστικού αδένου είναι απαραίτητη όταν υπάρχουν πολυεστιακά διηθητικά καρκινώματα, εκτεταμένα πορογενή καρκινώματα, φλεγμονώδη καρκινώματα και μεγάλα πρωτογενή καρκινώματα που δεν έχουν μειωθεί επαρκώς σε μέγεθος από τη χημειοθεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση των όζων της μασχάλης εξαρτάται από τα αποτελέσματα της βιοψίας των λεμφαδένων [137].

**Ορμονική θεραπεία:** Συνιστάται σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού που είναι θετικές σε υποδοχείς των οιστρογόνων (ER+) και προγεστερόνης (PR+). Τα φάρμακα που χορηγούνται συνήθως είναι (α) εκείνα που εμποδίζουν τα οιστρογόνα να συνδεθούν στα καρκινικά κύτταρα (Tamoxifen, Fulvestrant) αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη τους, (β) οι αναστολείς αρωματάσης (Aromatase inhibitors (AIs)), όπως Letrozol, Anastrozole, Exemestane που σταματούν την παραγωγή οιστρογόνων. Οι προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες αντιμετωπίζονται με LHRH-ένα φάρμακο που προκαλεί καταστολή της λειτουργίας των ωοθηκών και tamoxifen 20mg/d για 5 έτη [138, 139]. Για ασθενείς με αντένδειξη σε ταμοξιφένη μπορεί να χορηγηθεί LHRH ανάλογο και αναστολέας αρωματάσης [138, 139]. Στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση προτείνεται ταμοξιφένη για 5 έτη ή ταμοξιφένη για 2-3 έτη και στη συνέχεια AIs ή ταμοξιφένη για 5 χρόνια και στη συνέχεια 2-5 χρόνια AIs [139].

**Ακτινοθεραπεία:** Η ακτινοθεραπεία συνιστάται αφού γίνει συντηρητική χειρουργική επέμβαση (επικουρική θεραπεία), καθώς και σε ορισμένες περιπτώσεις μετά από ριζική μαστεκτομή, με σκοπό να καταστρέψει τα εναπομείναντα καρκινικά κύτταρα [140]. Σε ορισμένες περιπτώσεις χορηγείται προεγχειρητικά για να συρρικνώσει έναν καρκινικό όγκο. Τα κλασσικά σχήματα ακτινοβολίας στο μαστό διαρκούν 5-6 εβδομάδες [137].

**Χημειοθεραπεία:** Η χημειοθεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα τα οποία χορηγούνται ενδοφλεβίως ή από το στόμα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά την επέμβαση, ως επικουρική θεραπεία, με σκοπό να καταστραφούν όποια καρκινικά κύτταρα παρέμειναν και μπορούν να εξαπλωθούν δημιουργώντας νέους όγκους, ελαχιστοποιώντας τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου. Μερικές φορές χορηγείται πριν από την επέμβαση και καλείται εισαγωγική θεραπεία. Ο στόχος της συγκεκριμένης θεραπείας είναι η συρρίκνωση του όγκου προεγχειρητικά. Το πρόγραμμα χημειοθεραπείας αποτελείται συνήθως από ένα συγκεκριμένο αριθμό κύκλων που δίνονται για μια καθορισμένη χρονική περίοδο [141]. Η χημειοθεραπεία

συνιστάται στην πλειοψηφία των τριπλά αρνητικών όγκων (ER-,PR-,HER2), των HER2 –θετικών καρκίνων του μαστού και σε όγκους υψηλού κινδύνου HER2-αρνητικούς [139]. Είναι επίσης πολύ αποτελεσματική σε ER-αρνητικούς όγκους [142, 143].

**Στοχευμένη θεραπεία:** Στοχεύει σε συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να βλάπτει τα φυσιολογικά [144]. Μερικά από τα στοχευμένα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι: Το trastuzumab (Herceptin), πρόκειται για ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, που εγκρίνεται ως θεραπεία για τον HER2-θετικό καρκίνο του μαστού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού τόσο σε πρώιμο όσο και σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Χορηγείται μόνο του ή επικουρικά μαζί με χημειοθεραπεία.

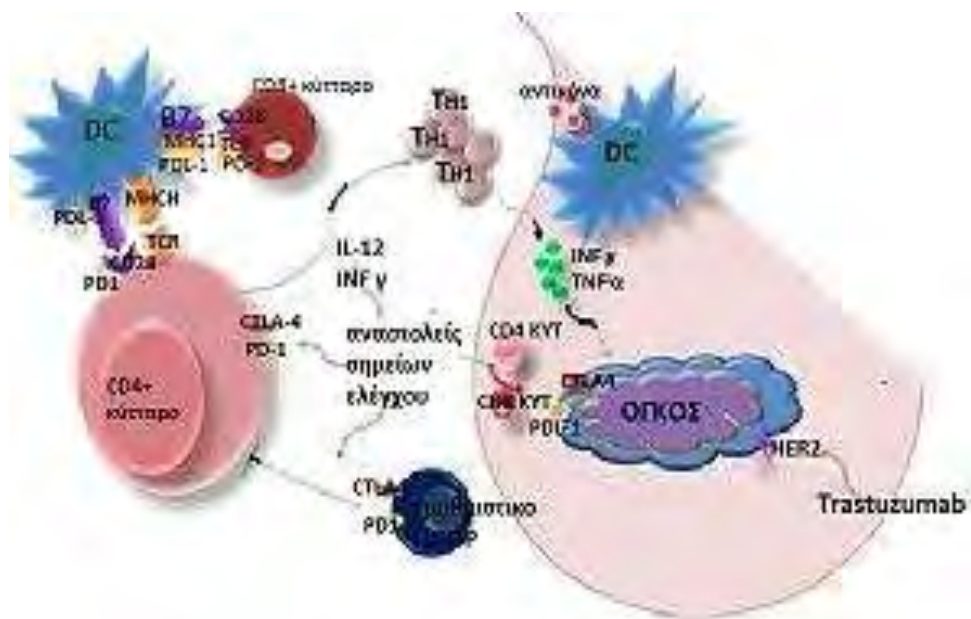
Τα Pertuzumab, Ado-trastuzumab emtansine, είναι μονοκλωνικά αντισώματα με παρόμοια δράση που χορηγούνται μαζί με το trastuzumab και τη χημειοθεραπεία. Το Lapatinib και το Neratinib είναι αναστολείς κινάσης τυροσίνης που εμποδίζουν τη δράση της πρωτεΐνης HER2 στα καρκινικά κύτταρα. Το Lapatinib χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού και εφόσον το trastuzumab δε δρα περαιτέρω, ενώ το Neratinib εγκρίνεται ως θεραπεία για HER2 θετικό καρκίνο σε πρώιμο στάδιο. Το Everolimus είναι εγκεκριμένο για γυναίκες που έχουν περάσει στην εμμηνόπαυση με προχωρημένο καρκίνο του μαστού που παρουσιάζει θετικούς υποδοχείς ορμονών και HER2 αρνητικό. Το φάρμακο αυτό μπλοκάρει την mTOR πρωτεΐνη, που συμβάλλει στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων[144].

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι επιγενετικοί δείκτες εμπλέκονται επίσης στον καθορισμό της ανταπόκρισης έναντι στοχευμένης θεραπείας για τον HER2 θετικό καρκίνο του μαστού. Η υποτροπή της νόσου, ως ανάπτυξη αντοχής έναντι του trastuzumab, παραμένει κύριο εμπόδιο στη στόχευση της θεραπείας για ασθενείς με HER2 θετικό καρκίνο [145]. Οι Palomeras και συνεργάτες του σε πειράματα in vitro διαπίστωσαν ότι υπάρχει μεταβλητό προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ των ανθεκτικών στο trastuzumab SKTR κυττάρων και των ευαίσθητων στο trastuzumab SKBR3 κυττάρων [146]. Η ανάλυση στα SKTR κύτταρα με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης τεσσάρων υπερμεθυλιωμένων γονιδίων, του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης TGFβ1, του BCL6, του ρυθμιζόμενου από το p53 αναστολέα της αντιγραφής του DNA (KILLIN) και της καθεψίνης Z (CTSΖ) έδειξε μειωμένα επίπεδα έκφρασής τους. Στα κύτταρα αυτά χορηγήθηκε παράγοντας απομεθυλίωσης



με αποτέλεσμα την επαναφορά της έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων. Τα αποκατεστημένα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων είναι ανάλογα με εκείνα των SKBR3 κυττάρων. Ως, εκ τούτου υπάρχουν ενδείξεις ότι τα συγκεκριμένα υπερμεθυλιωμένα γονίδια θα μπορούσαν να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες σε HER2 θετικούς καρκίνους του μαστού, με αντοχή στο trazustumab [146].

**Ανοσοθεραπεία:** Σε τριπλά αρνητικούς (ER-,PR-,HER2-), καθώς και σε HER2 θετικούς καρκίνους του μαστού η συνεχόμενη αύξηση των λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο (TILs), έχει συσχετιστεί όχι μόνο με καλύτερη επιβίωση, αλλά έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται και με ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία [147-150]. Ο PDL-1 υποδοχέας ή ο PDL-1 προσδέτης βρίσκονται στα T λεμφοκύτταρα ή στα νεοπλασματικά κύτταρα που ρυθμίζουν την αντινεοπλασματική ανοσία [151]. Σε ένα ποσοστό της τάξης του 30–50% των περιπτώσεων με καρκίνο του μαστού, ο υποδοχέας PD-L1 υπερεκφράζεται στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων [152,153]. Η σύνδεση με αντισώματα έναντι του PDL-1 υποδοχέα, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση εξειδικευμένων έναντι του όγκου T κυττάρων, ειδικών για τον καρκίνο, αποκαθιστώντας την ενδογενή αντινεοπλασματική δραστηριότητα [154, 155].



**Εικόνα 8.** Μονοπάτια ανοσοθεραπείας στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ανατύπωση από: Lucy M. De La Cruz and Brian J. Czerniecki, Immunotherapy for Breast Cancer is Finally at the Doorstep: Immunotherapy in Breast Cancer, Ann Surg Oncol, 2018

## **2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1 Σκοπός**

Στην παρούσα εργασία επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN και KLLN σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, προκειμένου να δούμε το ρόλο των επιγενετικών αλλαγών στα γονίδια αυτά και την πιθανή επίδρασή τους στην καρκινογένεση του μαστού. Παράλληλα, μελετώντας τα επίπεδα μεθυλίωσης των υποκινητών των συγκεκριμένων γονιδίων σε φυσιολογικό ιστό των ιδίων ασθενών θελήσαμε να εξετάσουμε τυχόν διαφορές και πώς αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες.

### **2.2 Υλικό της μελέτης**

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 44 ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Όλες ήταν γυναίκες ηλικίας 40-85 (μέση τιμή  $63 \pm 12.44$  έτη). Οι ασθενείς είχαν χειρουργηθεί στο Πανεπιστημιακό Περιφερειακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και τα χειρουργικά παρασκευάσματα ήρθαν στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής και Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Περιφερειακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας για παθολογοανατομική εκτίμηση. Με τη βοήθεια ιατρού Παθολογοανατόμου έγινε επιλογή και λήψη καρκινικού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού. Παράλληλα, έγινε συλλογή των κλινικο-ιστολογικών παραμέτρων των ασθενών.

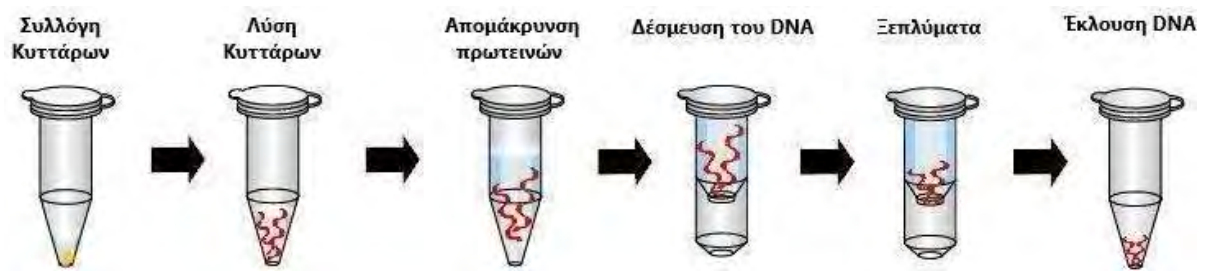
Η στατιστική ανάλυση έγινε με το λογισμικό IBM SPSS v. 22. Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν την Student's t-test και ONE WAY ANOVA. Η τιμή σημαντικότητας προσδιορίστηκε ως μικρότερη από 0,05.

### **2.3 Απομόνωση DNA από νωπό ιστό (DNA extraction)**

Η απομόνωση του γενομικού DNA έγινε με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

1) Το ιστοτεμάχιο του νωπού ιστού (καρκινικός – παρακείμενος φυσιολογικός) κατακερματίστηκε σε τρυβλίο petri και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Falcon χωρητικότητας 15ml

- 2) Προσθήκη λυτικού διαλύματος σύστασης:
  - 2ml ATL (Tissue Lysis Buffer)
  - 1ml SDS 0,5%
  - 0,5ml πρωτεΐνωση K συγκέντρωσης 10mg/ml
- 3) Ομογενοποίηση του μείγματος και επώασή του σε υδατόλουτρο στους 37°C για 1-3 ημέρες (μέχρι να διαλυθεί ο ιστός).
- 4) Τοποθέτηση 400μl του ομογενοποιημένου διαλύματος σε 2 σωληνάρια τύπου eppendorf των 2ml.
- 5) Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 400μl λυτικού διαλύματος PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer και περιδίνηση
- 6) Προσθήκη σε κάθε σωληνάριο 400μl απόλυτης αιθανόλης (100%) και καλή περιδίνηση για 5 δευτερόλεπτα.
- 7) Μεταφορά του δείγματος και από τα δύο σωληνάρια σε στήλη παρεχόμενη από το kit και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου 22°C και απόρριψη του υγρού που συλλέγεται (Η διαδικασία μεταφοράς επαναλαμβάνεται περίπου 4 φορές, καθώς μεταφέρουμε από περίπου 640μl τη φορά)
- 8) Μεταφορά της στήλης σε καθαρό σωληνάριο συλλογής και απόρριψη του προηγούμενου. Προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 1 (Wash Buffer 1) στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές για 1 λεπτό (22°C).
- 9) Αντικατάσταση του σωληναρίου συλλογής και προσθήκη 500μl διαλύματος πλύσης 2 (Wash Buffer 2) στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές για 3 λεπτά (22°C).
- 10) Τοποθέτηση της στήλης σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου eppendorf και προσθήκη 300μl δις απεσταγμένου νερού (ddH<sub>2</sub>O).
- 11) Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 1 λεπτό.
- 12) Φύλαξη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής (DNA Genomic) στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση.



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση απομόνωσης γενωμικού DNA.

## 2.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

### 2.4.1 Φωτομέτρηση

Πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του DNA των δειγμάτων μας για να αξιολογηθεί η συγκέντρωση και η καθαρότητά τους. Η καθαρότητα του δείγματος προσδιορίζεται εάν μετρηθεί η απορρόφηση του ίδιου δείγματος τόσο στα 260nm όσο και στα 280nm και μετά υπολογιστεί ο λόγος  $OD_{260}/OD_{280}$ . Για τιμές μεταξύ 1.7-1.9, το DNA χαρακτηρίζεται σχετικά καθαρό. Τιμές μικρότερες του 1.7 είναι ενδεικτικές της ύπαρξης προσμίξεων, συνήθως είτε πρωτεϊνών είτε φαινόλης, ενώ μεγαλύτερες του 1.9 είναι ενδεικτικές πρόσμιξης με άλλα μακρομόρια. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{dsDNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{τιμή } OD_{260} \times 50 \times \text{συντελεστής αραίωσης.}$$

### 2.4.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων μας σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για να ελέγξουμε την ακεραιότητα του δείγματός μας και αξιολόγηση με τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης υπό υπεριώδες φως (UV).

### 2.4.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

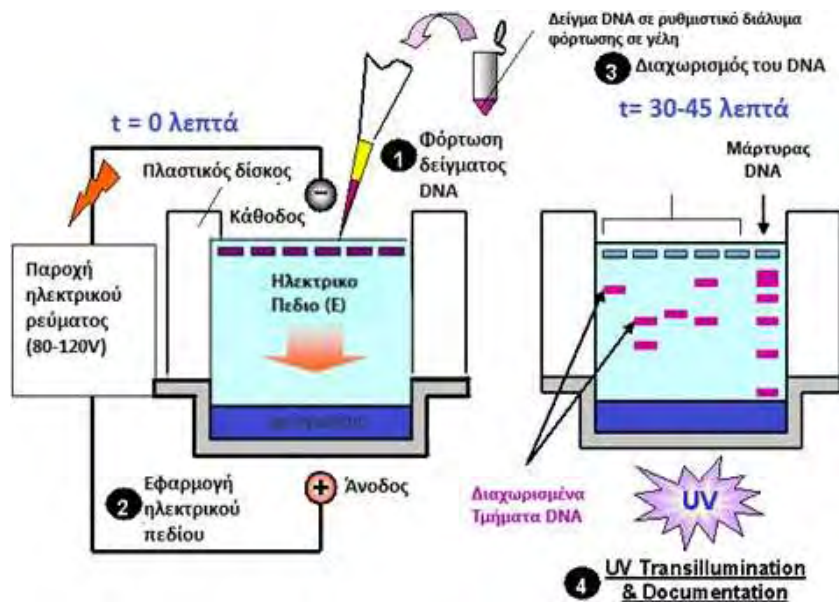
Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης ακολουθήσαμε τα παρακάτω βήματα:

- 1) Μέτρηση σε ζυγό ακριβείας της επιθυμητής ποσότητας αγαρόζης σε σκόνη και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Boric Edta) 1x και ανάδευση.
- 2) Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές το διάλυμα.
- 3) Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μίγμα (τυπικά 0,5μg/ml). Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (για αυτό και είναι γνωστός μεταλλαξιογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός.
- 4) Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο. Παραμονή σε ανοιχτό απαγωγό μέχρι να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
- 5) Τέλος αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο.

### 2.4.4 Διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Πριν την τοποθέτηση του δείγματος στο πήκτωμα αγαρόζης αυτό αναμιγνύεται με μια χρωστική φόρτωσης (μπλέ της βρωμοφαινόλης). Αυτή εξυπηρετεί πολλούς σκοπούς. Αρχικά, επειδή είναι ορατή στο φυσικό φως βοηθάει στην αναγνώριση της θέσης φόρτωσης του δείγματος και παράλληλα καθώς μετακινείται μαζί με το DNA χρησιμεύει στην παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Τέλος, η γλυκερόλη που περιέχει προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο DNA και δεν το αφήνει να βγει έξω από το πηγαδάκι φόρτωσης του δείγματος. Ταυτόχρονα με τα δείγματα φορτώνεται και ένα δείκτης γνωστού μοριακού βάρους για την εκτίμηση του μεγέθους των προϊόντων μας.

Η μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται προς την άνοδο (+) λόγω του αρνητικού φορτίου που τους προσδίδει η παρουσία των φωσφορικών ομάδων. Το τελευταίο στάδιο είναι η μεταφορά του πηκτώματος υπό υπεριώδες φως (UV), αξιολόγηση των εμφανιζόμενων δειγμάτων και καταγραφή με την μορφή αποθήκευσης εικόνας των δεδομένων στοιχείων (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** Διαδικασία ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων. Πηγή: <https://schoolworkhelper.net/gel-electrophoresis-basics-steps>

## 2.5 Τροποποίηση με δισουλφιδικό νάτριο των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών του DNA (Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA)

Η επώαση του DNA με δισουλφιδικό νάτριο έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή των μη-μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, αφήνοντας τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες αμετάβλητες. Επομένως, με τη διαδικασία αυτή έχουμε διαφορετική αλληλουχία DNA για το μεθυλιωμένο και το μη-μεθυλιωμένο DNA. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήσαμε το EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN) και ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο, όπως αυτό περιγράφεται στη συνέχεια σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

1) Ετοιμάζω το μείγμα μεθυλίωσης (Bisulfite Mix). Το διάλυμα αυτό περιέχει δισουλφιδικό νάτριο στο βέλτιστο pH για την πλήρη μετατροπή των κυτοσινών σε ουρακίλες, χωρίς επιπλέον ρύθμιση του pH. Για τη διαλυτοποίησή του προσθέτω 800ml δις απεσταγμένο  $H_2O$ . Ο όγκος αυτός επαρκεί για τη μεθυλίωση 8 DNA δειγμάτων.

2) Ακολουθεί PCR. Η συγκέντρωση του DNA θα πρέπει να είναι 1ng-2μg.

DNA: 1ng-2μg

H<sub>2</sub>O: αναλόγως της ποσότητας του DNA

DNA + H<sub>2</sub>O = 20μl όγκος

Bisulfite Mix: 85μl

DNA protect

Buffer: 35μl

Ντελικό: 140μl

3) Συνθήκες

Στάδια	Χρόνος	Θερμοκρασία
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	25 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	85 λεπτά	60°C
Αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C
Επώαση	175 λεπτά	60°C
Διατήρηση	αόριστο	20°C

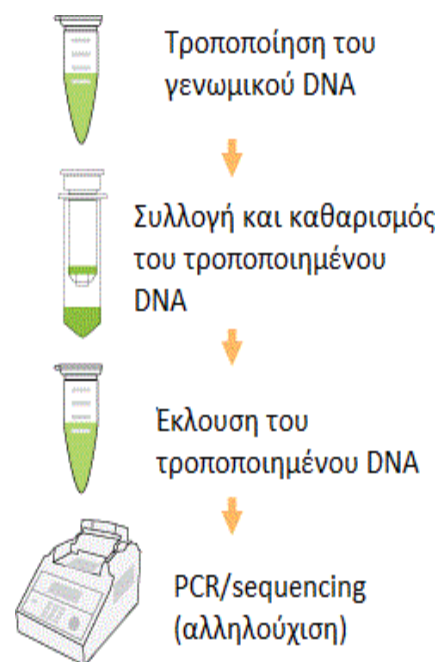


**Εικόνα 11.** Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής τύπου Eppendorf

## 2.6 Καθαρισμός και αλληλούχιση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

### 2.6.1 Καθαρισμός του τροποποιημένου DNA (bisulfite converted)

- 1) Σύντομη φυγοκέντρηση (spin) των σωληναρίων της PCR
- 2) Μεταφορά του δείγματος σε σωληνάρια τύπου erpendorf
- 3) Προσθήκη 560μl διαλύματος BL σε κάθε δείγμα
- 4) Μεταφορά των δειγμάτων σε στήλες παρεχόμενες από το kit
- 5) Φυγοκέντρηση στις 15.000 στροφές για 3 λεπτά
- 6) Προσθήκη 500μl διαλύματος BW σε κάθε στήλη
- 7) Φυγοκέντρηση στις 15.000 για 3 λεπτά
- 8) Προσθήκη 500μl διαλύματος BD σε κάθε στήλη και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 9) Φυγοκέντρηση στις 15.000 για 3 λεπτά
- 10) Προσθήκη 500μl BW διαλύματος σε κάθε στήλη
- 11) Επανάληψη του βήματος 10
- 12) Απόρριψη του διηθήματος και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 3 λεπτά
- 13) Μεταφορά των στηλών σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου erpendorf και προσθήκη 20μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O.
- 14) Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες για 3 λεπτά
- 15) Μεταφορά του δείγματος ξανά μέσα στη στήλη και προσθήκη επιπλέον 20μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O
- 16) Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και



**Εικόνα 12.** Σχηματική απεικόνιση του καθαρισμού των επεξεργασμένων DNA μορίων.

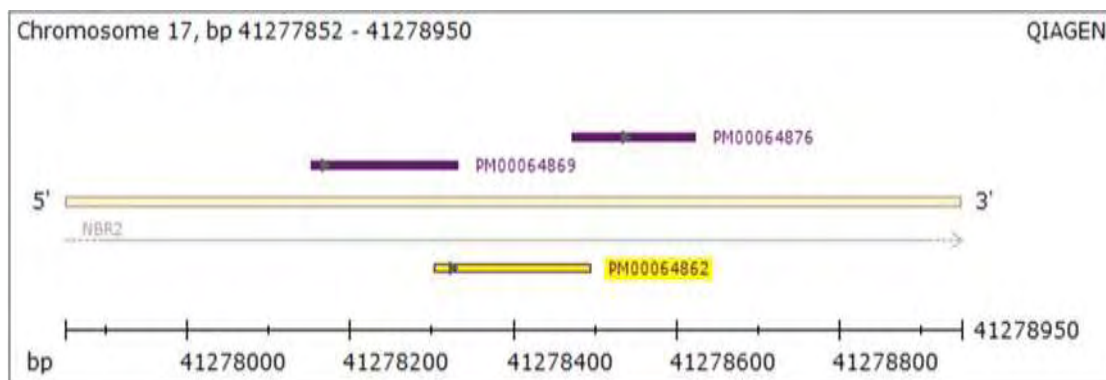


φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες για 3 λεπτά

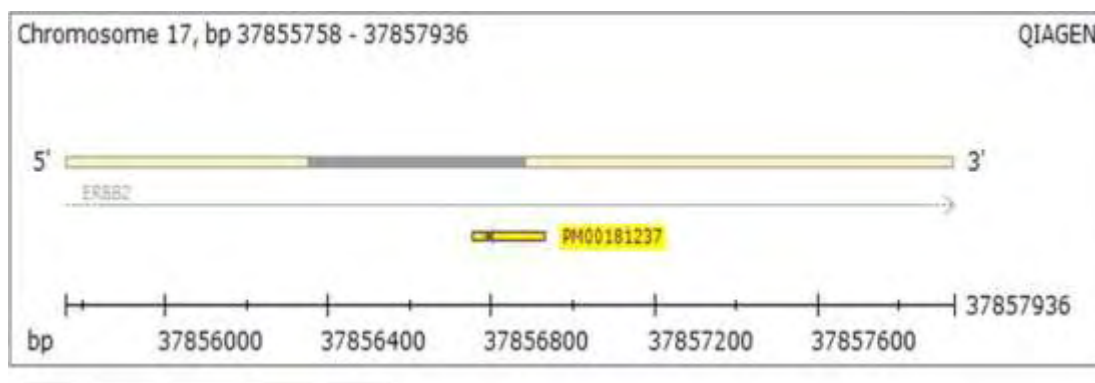
17) Φύλαξη του περιεχομένου του σωληναρίου συλλογής στην κατάψυξη

### 2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR για ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδιακών τμημάτων

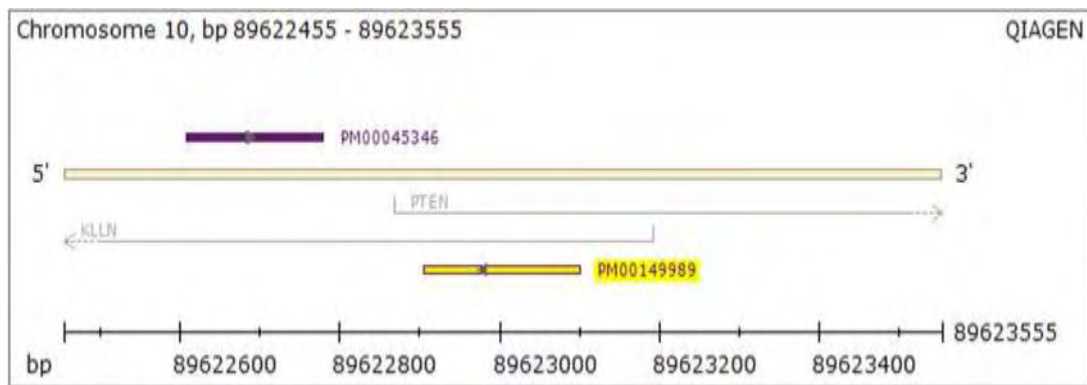
Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο παρατίθενται στη συνέχεια:



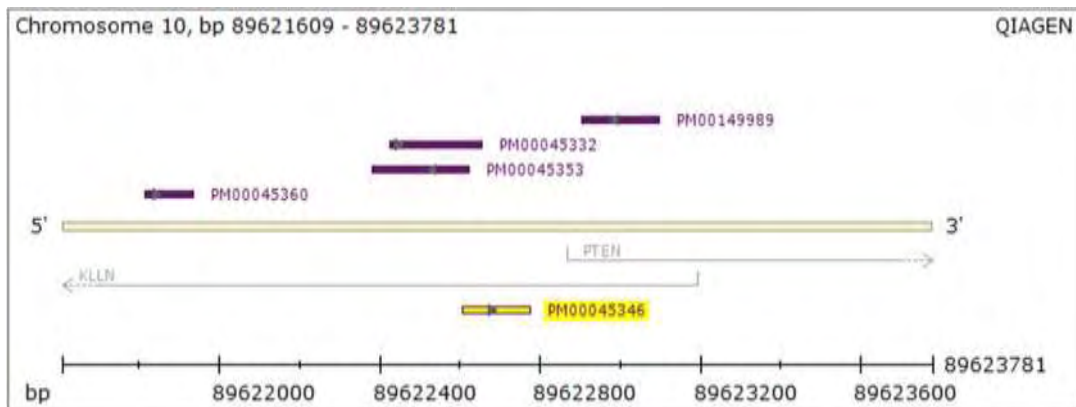
**Εικόνα 13.** BRCA1 CpG pyromark assay. Ο ανάστροφος εκκινητής (επισήμανση με κίτρινο χρώμα) είναι ο βιοτυνλιωμένος εκκινητής.



**Εικόνα 14.** ERBB2 CpG pyromark assay. Ο ανάστροφος εκκινητής (επισήμανση με κίτρινο χρώμα) είναι ο βιοτυνλιωμένος εκκινητής.



**Εικόνα 15.** PTEN CpG pyromark assay. Ο ανάστροφος εκκινητής (επισήμανση με κίτρινο χρώμα) είναι ο βιοτυνλιωμένος εκκινητής.



**Εικόνα 16.** KLLN CpG pyromark assay. Ο ανάστροφος εκκινητής (επισήμανση με κίτρινο χρώμα) είναι ο βιοτυνλιωμένος εκκινητής.

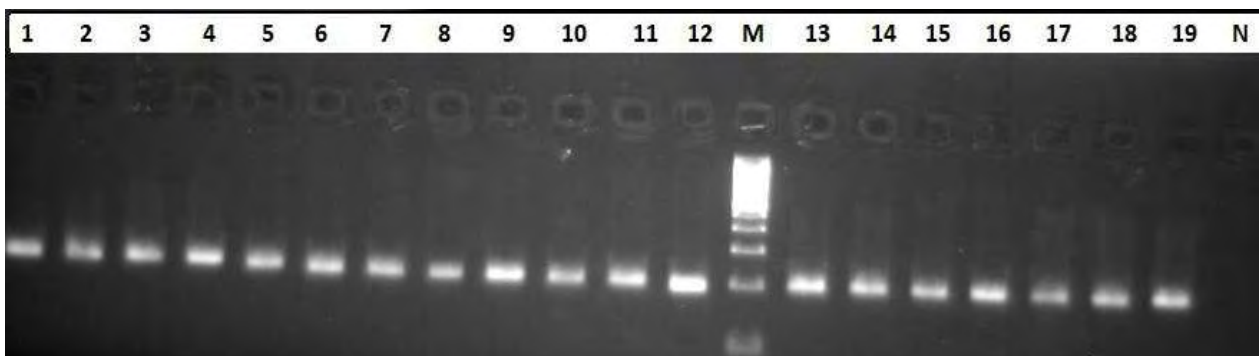
<b>Συστατικά</b>	<b>Όγκος ανά αντίδραση (μl)</b>
Pyromark PCR Master Mix, 2x	12,5
CoralLoad Concetrates, 10x	2,5
Εκκινητής	1
Νερό (ddH <sub>2</sub> O)	7
DNA	1
Τελικός όγκος	25

## Συνθήκες PCR

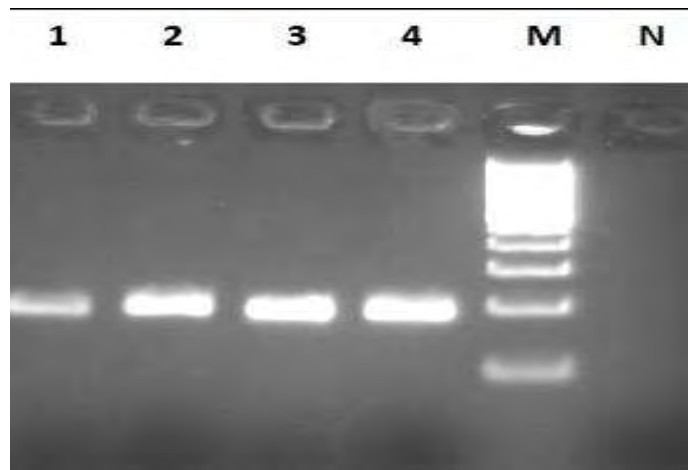
Βήμα ενεργοποίησης	15 λεπτά	95°C	Η HotstartTaq DNA πολυμεράση έχει ενεργοποιηθεί
<b>Κύκλος τριών βημάτων</b>			
Αποδιάταξη	30 δευτερόλεπτα	94 °C	
Υβριδοποίηση	30 δευτερόλεπτα	56 °C	
Επιμήκυνση	30 δευτερόλεπτα	72 °C	
Αριθμός κύκλων	45		
Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C	

### 2.7 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων των γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN, PTEN/KLLN

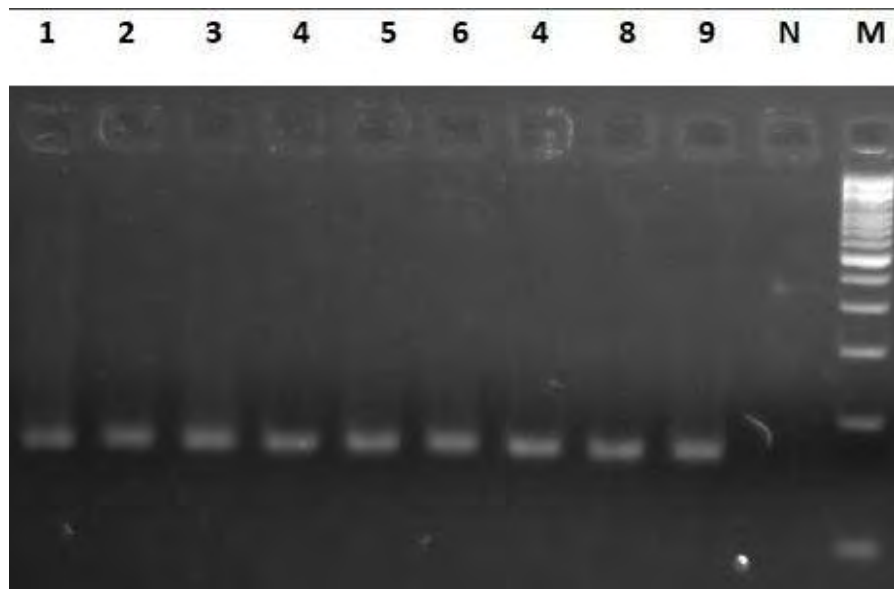
Ηλεκτροφορήσαμε τα PCR προϊόντα για κάθε ένα από τα εξεταζόμενα γονίδια για να αποκλείσουμε τυχόν επιμόλυνση και να ελέγξουμε ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό προϊόν σε κάθε περίπτωση, σε πήκτωμα αγαρόζης 3% σύστασης.



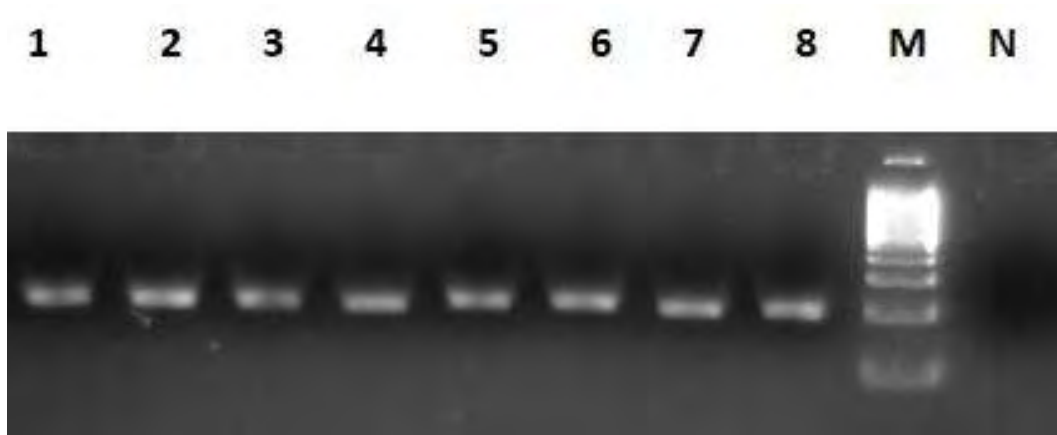
**Εικόνα 17.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του BRCA1 γονιδίου σε 3% πήκτωμα αγαρόζης. 1-19: δείγματα ασθενών μήκους 193 ζ.β., M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας



**Εικόνα 18.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου ERBB2 σε 3% πήκτωμα αγαρόζης. 1-4: δείγματα ασθενών με BCA μήκους 178 ζ.β. , M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας



**Εικόνα 19.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου PTEN/KILLN σε 3% πήκτωμα αγαρόζης, 1-9: δείγματα ασθενών μήκους 172 ζ.β., M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας

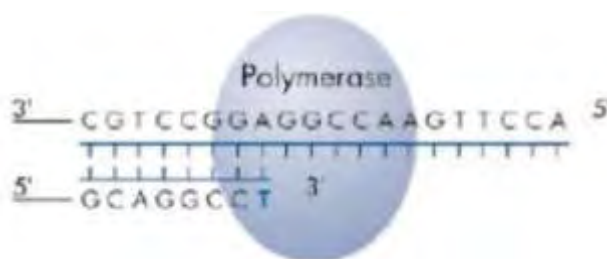


**Εικόνα 20.** Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων του γονιδίου PTEN σε 3% πήκτωμα αγαρόζης, 1-8: δείγματα ασθενών μήκους 197 ζβ., M: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους (Thermo Fischer), N: αρνητικός μάρτυρας

## 2.8 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing)

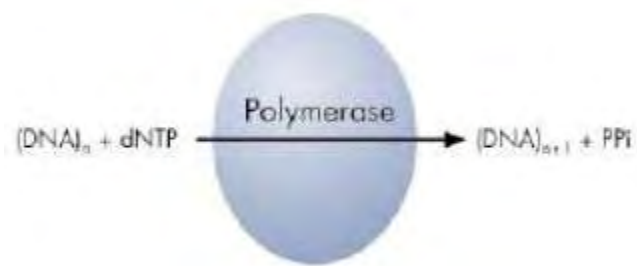
Η τεχνολογία της πυροαλληλούχισης (Pyrosequencing) χρησιμοποιεί αλληλούχιση μέσω σύνθεσης για την ακριβή και ποσοτική ανάλυση αλληλουχιών DNA.

**Βήμα 1.** Ένας εκκινητής αλληλούχισης υβριδίζεται σε ένα μονόκλωνο τμήμα DNA, ενισχυμένο με PCR που λειτουργεί ως μήτρα και επώάζεται με τα ένζυμα DNA πολυμεράση, ATP σουλφουρυλάση, λουσιφεράση και απυράση καθώς επίσης και με τα υποστρώματα 5' φωσφοθειική αδενοσίνη (APS) και λουσιφερίνη.



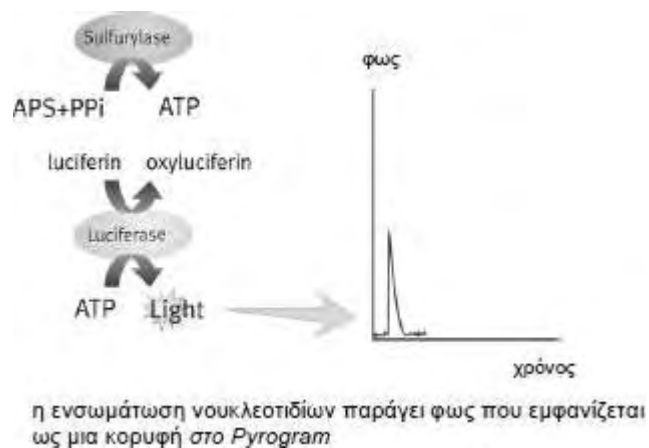
**Εικόνα 21.** Υβριδοποίηση του εκκινητή.

**Βήμα 2.** Το πρώτο από τέσσερα νουκλεοτίδια προστίθεται στην αντίδραση. Εάν το νουκλεοτίδιο είναι συμπληρωματικό στη βάση στον κλώνο της μήτρας, αυτό θα ενσωματωθεί στον κλώνο DNA από την DNA πολυμεράση. Κάθε συμβάν ενσωμάτωσης συνοδεύεται από την απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi) σε ισομοριακή ποσότητα με την ποσότητα του νουκλεοτιδίου που ενσωματώνεται.



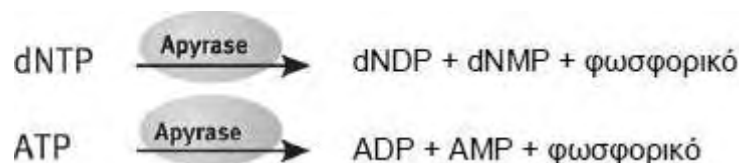
**Εικόνα 22.** Ενσωμάτωση dNTP και απελευθέρωση πυροφωσφορικού (PPi).

**Βήμα 3.** Η ATP σουλφουρυλάση μετατρέπει ποσοτικά την PPi σε ATP υπό την παρουσία 5' φωσφοθειικής αδενοσίνης. Αυτό ενεργοποιεί τη μετατροπή της λουσιφερίνης σε οξυλουσιφερίνη από τη λουσιφεράση, παράγοντας ορατό φως σε ποσότητες ανάλογες προς την ποσότητα του ATP. Το φως ανιχνεύεται με χρήση συζευγμένων με φορτίο στοιχείων (CCD) και εμφανίζεται ως μια κορυφή (πυρόγραμμα). Κάθε φωτεινό σήμα είναι ανάλογο προς τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται.



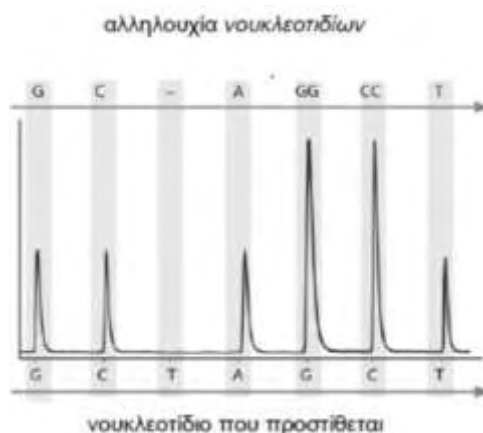
**Εικόνα 23.** Μετατροπή του πυροφωσφορικού (PPi) σε ATP και εκπομπή ορατού φωτός.

**Βήμα 4.** Η απυράση, ένα ένζυμο αποικοδόμησης των νουκλεοτιδίων, αποικοδομεί συνεχώς τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια και το ATP. Όταν ολοκληρωθεί η αποικοδόμηση, προστίθεται ένα άλλο νουκλεοτίδιο.



**Εικόνα 24.** Αντίδραση αποικοδόμησης μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων.

**Βήμα 5.** Τα νουκλεοτίδια προστίθενται ένα κάθε φορά. Σημειώνεται ότι η άλφα-θειο τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATPαS) υποκαθιστά τη φυσική τριφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (dATP) καθώς χρησιμοποιείται αποτελεσματικά από την DNA πολυμεράση, αλλά δεν αναγνωρίζεται από την λουσιφεράση. Καθώς η διαδικασία συνεχίζεται, δημιουργείται η συμπληρωματική αλληλουχία, και η αλληλουχία νουκλεοτιδίων προσδιορίζεται από την κορυφή στο πυρόγραμμα.



**Εικόνα 25.** Δημιουργία πυρογράμματος βάσει της συντιθέμενης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

## 2.9 Αντιδράσεις πυροαλληλούχισης των προϊόντων των εξεταζόμενων γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN, KLLN

- Τα βιοτινυλιωμένα προϊόντα PCR ακινητοποιούνται επάνω σε επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη σφαιρίδια σεφαρόζης (Streptavidin Sepharose High Performance).

### Master Mix για ακινητοποίηση του DNA

Συστατικά	Όγκος ανά αντίδραση (μl)
Streptavidin Sepharose High Performance	2
Δεσμευτικό ρυθμιστικό διάλυμα (PyroMark Binding Buffer)	40
Νερό	28
Τελικός όγκος αντίδρασης	70

- Μοιράζω 70μl από το Master Mix σε κάθε πηγαδάκι και προσθέτω 12μl από το προϊόν της PCR.
- Ανάδευση των μειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά στις 1.400 στροφές.
- Είναι σημαντικό πριν ξεκινήσουμε τη διαδικασία στη συσκευή να έχουμε παρασκευάσει και τοποθετήσει όλα τα απαραίτητα διαλύματα στους ξεχωριστούς περιέκτες που παρέχονται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό PyroMark Q24 (QIAGEN) (Εικόνα 26).



**Εικόνα 26.** Σταθμός εργασίας με αντλία υπό κενό PyroMark Q24 (QIAGEN).

- Διαλυτοποίηση του εκκινητή αλληλούχισης σε 1175 μl ρυθμιστικό διάλυμα υβριδοποίησης Mix

Συστατικά	Όγκος ανά δείγμα (μl)
Εκκινητής αλληλούχισης	0,8
Ρυθμιστικό διάλυμα ανασύνδεσης (PyroMark Annealing)	24,2
Τελικός όγκος	25,0



- Μοιράζω 25μl του παραπάνω μείγματος σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας 24 θέσεων PyroMark Q24 που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.
- Αμέσως μετά την ακινητοποίηση, τοποθετώ το σωληνάρια PCR (strips) και το πλακίδιο PyroMark Q24 στο σταθμό εργασίας και εφαρμόζω κενό ανοίγοντας τον διακόπτη της αντλίας κενού.
- Χαμηλώνω προσεκτικά τους δειγματολήπτες με φίλτρο μέσα στο πλακίδιο που περιέχει τα PCR προϊόντα για 1 λεπτό, με σκοπό να δεσμευθούν τα σφαιρίδια που περιέχουν το ακινητοποιημένο DNA.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 40ml 70% αιθανόλη για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 40ml διαλύματος αποδιάταξης (Denaturation Solution) για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει 50ml ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer) για 10 δευτερόλεπτα.
- Ανυψώνω το εργαλείο κατακόρυφα περισσότερο από 90° για 10 s, για να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο.



**Εικόνα 27.** Δειγματολήπτης με φίλτρα

- Ενώ κρατάω το εργαλείο επάνω από το πλακίδιο PyroMark Q24, κλείνω τον διακόπτη στην αντλία κενού (απενεργοποίηση).

- Ανακινώντας το εργαλείο απαλά από πλευρά σε πλευρά, απελευθερώνονται τα σφαιρίδια στο πλακίδιο που περιέχει τον εκκινητή αλληλούχησης.
- Με τον διακόπτη κενού κλειστό (απενεργοποίηση), μεταφέρω το εργαλείο στον περιέκτη που περιέχει νερό υψηλής καθαρότητας και ανακινώ για 10 δευτερόλεπτα.
- Ξεπλένω τους δειγματολήπτες με φίλτρο βυθίζοντάς τους στο δεύτερο περιέκτη με νερό υψηλής καθαρότητας και εφαρμόζοντας κενό.
- Ανυψώνω το εργαλείο κατακόρυφα περισσότερο από 90° για 5 s, για να αποστραγγιστεί το υγρό από τους δειγματολήπτες με φίλτρο.
- Κλείνω τον διακόπτη στην αντλία κενού (απενεργοποίηση) και τοποθετώ τον δειγματολείπτη στη θέση στάθμευσης (P).
- Θερμαίνω το πλακίδιο PyroMark Q24 που περιέχει τα δείγματα στους 80°C για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας το στήριγμα πλακιδίου PyroMark Q24 (δύο παρέχονται με τον σταθμό εργασίας υπό κενό) κι ένα θερμικό μπλοκ.
- Αφαιρώ το πλακίδιο από το στήριγμα πλακιδίου και αφήνω τα δείγματα να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για τουλάχιστον 5 λεπτά. Το πλακίδιο μπορεί τώρα να τοποθετηθεί στον αναλυτή PyroMark Q24.
- Διαλυτοποίηση του λυοφιλοποιημένου ενζύμου και του υποστρώματος σε 620μl δις απεσταγμένου H<sub>2</sub>O
- Εισάγω το κατάλληλο πρόγραμμα στον υπολογιστή με τις αντίστοιχες θέσεις των δειγμάτων και υπολογίζονται οι αντίστοιχοι όγκοι των νουκλεοτιδίων, του ενζύμου και του υποστρώματος
- Γεμίζω τη φύσιγγα PyroMark Q24 (Cartridge), με τους απαιτούμενους όγκους των αντιδραστηρίων (νουκλεοτίδια, ένζυμο, υπόστρωμα).



**Εικόνα 28.** Φύσιγγα PyroMark Q24 (Cartridge)

- Τοποθετώ τη γεμάτη φύσιγγα αντιδραστηρίων και την πλάκα στη συσκευή και εισάγω το πρόγραμμα με το USB στη θύρα υποδοχής της συσκευής.
- Αφού έχει ολοκληρωθεί η εκτέλεση, τα δεδομένα εκτέλεσης έχουν μεταφερθεί στη μονάδα μνήμης USB.
- Αφαιρώ τη φύσιγγα και ξεπλένω πολύ καλά.
- Ακολουθεί η εισαγωγή του USB στον υπολογιστή και η ανάλυση των δειγμάτων με την μέθοδο της πυροαλληλούχισης



**Εικόνα 29.** Συσκευή πυροαλληλούχισης PyroMark Q24 (Qiagen).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς της μελέτης μας ομαδοποιήθηκαν σε δύο ηλικιακές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα συμπεριλάβαμε όλους τους ασθενείς ηλικίας <50 ετών, ενώ στη δεύτερη ομάδα οι ασθενείς με ηλικία  $\geq 50$  ετών.

Με βάση τις κλινικο-ιστολογικές παραμέτρους που συλλέξαμε, καταγράψαμε τον τύπο του καρκίνου, καθώς και το μέγεθος του όγκου με βάση τη διάμετρο. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου του μαστού είναι ο πορογενής καρκίνος, ενώ οι υπόλοιποι τύποι, συμπεριλαμβανομένων και των μικτών τύπων, είναι λιγότερο συχνοί. Συνεπώς, οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν ανάλογα με το αν ο τύπος καρκίνου είναι πορογενής ή όχι. Όσον αφορά στη διάμετρο του όγκου, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες, εκείνοι που είχαν διάμετρο όγκου μικρότερη από 2 εκατοστά και εκείνοι με διάμετρο μεγαλύτερη ή ίση των 2 εκατοστών.

Τα κλινικο-ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω (Πίνακας 3).

<i>Παράμετρος</i>	<i>Αριθμός</i>	<i>Ποσοστό (%)</i>
<b><i>Ηλικία</i></b>		
< 50	7	15.9
$\geq 50$	37	84.1
<b><i>Βαθμός κακοήθειας</i></b>		
<i>Χαμηλός</i>	9	20.5
<i>Μέσος</i>	23	52.3
<i>Υψηλός</i>	10	22.7
<b><i>Τύπος καρκινώματος</i></b>		
<i>Πόρων</i>	37	84.1
<i>Άλλο</i>	7	15.9

<b>Μέγιστη διάμετρος όγκου</b>		
< 2cm	12	27.3
≥ 2cm	32	72.7
<b>Αγγειακή διήθηση</b>		
Απουσία	27	61.4
Παρούσα	17	38.6
<b>Έκφραση ER</b>		
Αρνητική	11	25.0
Θετική	33	75.0
<b>Έκφραση PR</b>		
Αρνητική	12	27.3
Θετική	32	72.7
<b>Υπερέκφραση HER2</b>		
Αρνητική	7	15.9
Θετική	37	84.1
<b>Μεταστατικοί λεμφαδένες</b>		
Απουσία	18	40.9
Παρουσία	26	59.1

**Πίνακας 3.** Κλινικο-ιστολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3, η πλειοψηφία των ασθενών ήταν ηλικίας άνω των 50 ετών (84.1%). Οι μισοί σχεδόν ασθενείς (52.3%) παρουσίασαν όγκους ενδιάμεσου βαθμού κακοηθείας, ενώ ο υψηλός και χαμηλός βαθμός κακοήθειας φάνηκαν να κατανέμονται σχεδόν ισότιμα στους υπόλοιπους ασθενείς της μελέτης μας. Ο συχνότερος τύπος καρκίνου του μαστού είναι ο καρκίνος των πόρων, γεγονός που

επιβεβαιώνεται και στο δείγμα μας, καθώς 37/44 ασθενείς (84.1%) φέρει το συγκεκριμένο καρκινικό τύπο, 7/44 ασθενείς (15.9%) φέρουν άλλους τύπους καρκίνου.

Η πλειοψηφία των ασθενών (32/44) είχε μέγιστη διάμετρο όγκου  $\geq 2$  εκατοστά (72.7%). Όσον αφορά στην παρουσία ή απουσία της αγγειακής διήθησης, η πλειοψηφία των ασθενών (27/44, ποσοστό 61.4%), δεν είχε αγγειακή διήθηση και μόλις 17/44 ασθενείς (38.6%) είχαν αγγειακή διήθηση. Σχεδόν τα  $\frac{3}{4}$  των ασθενών της μελέτης μας (75.0%) είχαν υπερέκφραση των υποδοχέα των οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR). Επιπρόσθετα, ο υποδοχέας HER2 υπερεκφράζεται στην πλειοψηφία των δειγμάτων μας (37/44, 84.1%). Μεταστάσεις σε απομακρυσμένους λεμφαδένες εμφάνιζαν 26/44 ασθενείς (59.1%) ενώ δεν εμφάνιζαν μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης 18/44 ασθενείς (40.9%).

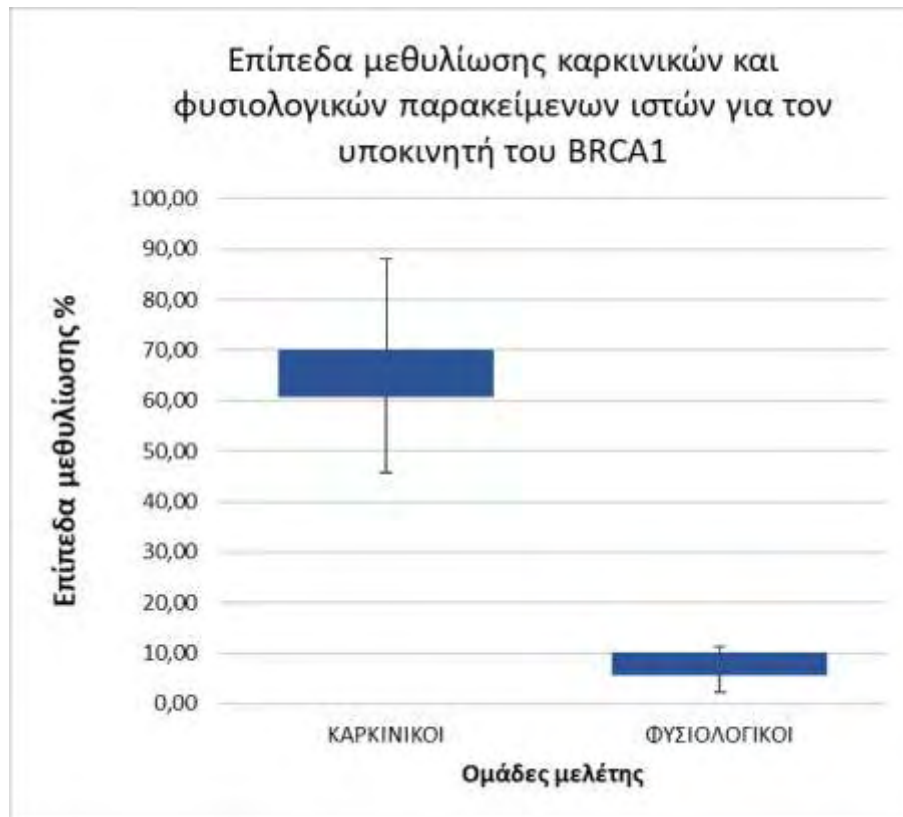
### **3.1 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων των BRCA1, ERBB2, PTEN και PTEN/KLLN γονιδίων.**

#### *3.1.1 Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του BRCA1 γονιδίου*

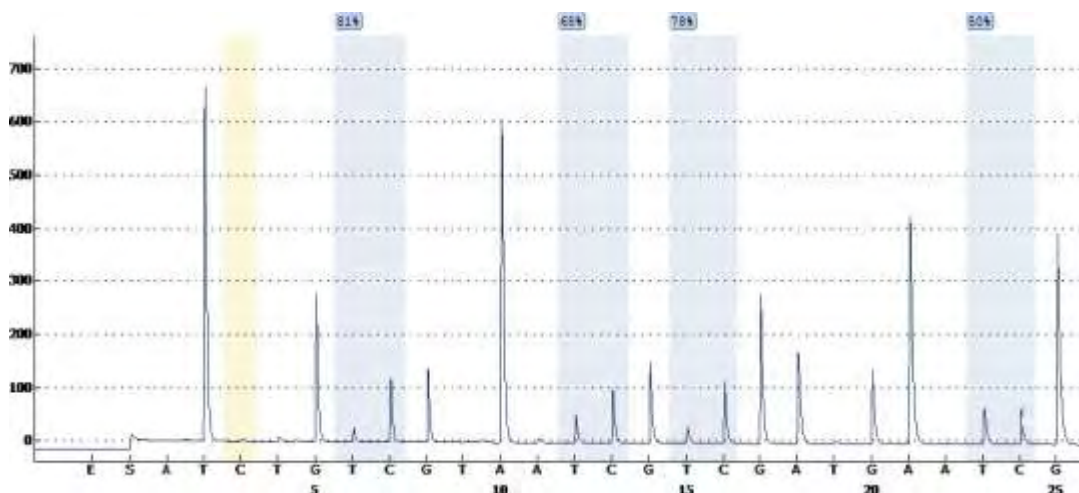
Μελετήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης σε τέσσερις CpG νησίδες στην περιοχή του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου, που εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης, που επιτρέπει πέρα από τον προσδιορισμό των μεθυλιωμένων και μη μεθυλιωμένων DNA δειγμάτων και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων. Επιλέξαμε παράλληλα παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τις ασθενείς της μελέτης μας και αφού απομονώσαμε και επεξεργαστήκαμε κατάλληλα το DNA μετρήσαμε κι εδώ τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων του BRCA1 γονιδίου.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των τεσσάρων CpG νησίδων του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου είχαν για μεν τους ασθενείς μέση τιμή  $61 \pm 32\%$  (45,5-88%), ενώ στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκαν στο  $7,25 \pm 3,3\%$  (0,5-11,25 %). Όπως φαίνεται τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του BRCA1 υποκινητή είναι σημαντικά υψηλότερα στους καρκινικούς ιστούς, συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών, συσχέτιση που είναι στατιστικά σημαντική [( $p < 0.05$ ), (1.17\*10<sup>-31</sup>)]. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των καρκινικών και

παρακείμενων φυσιολογικών ιστών του υποκινητή του γονιδίου BRCA1 απεικονίζονται στο γράφημα 1.

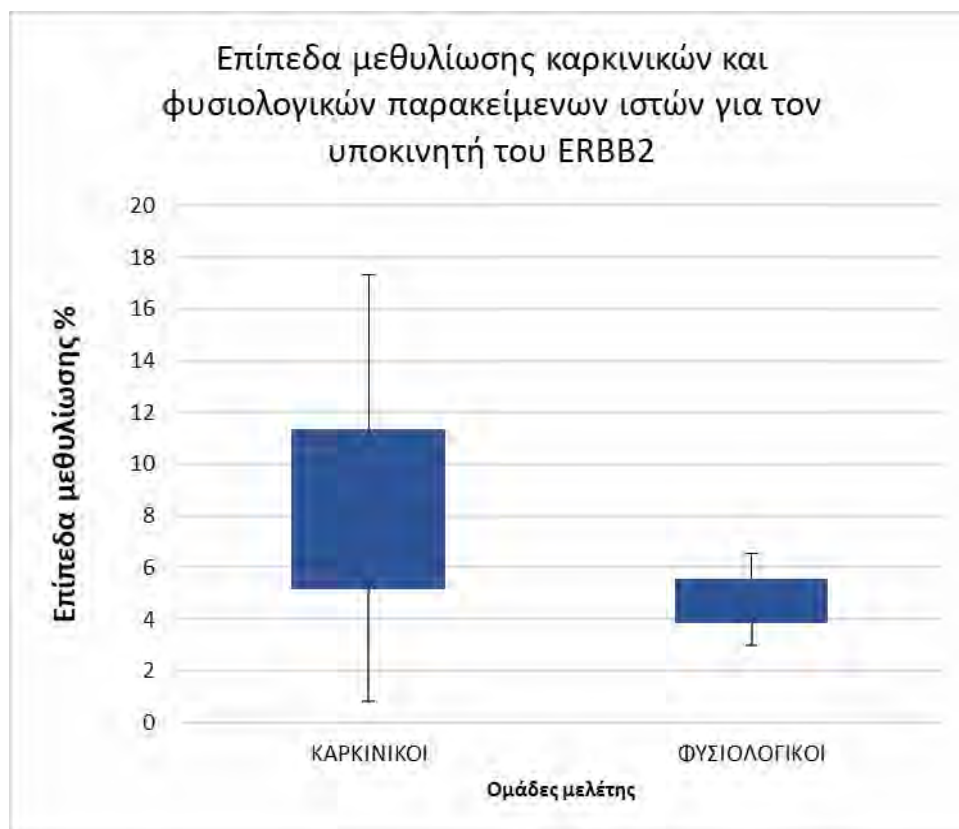


**Γράφημα 1.** Επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου σε καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης.



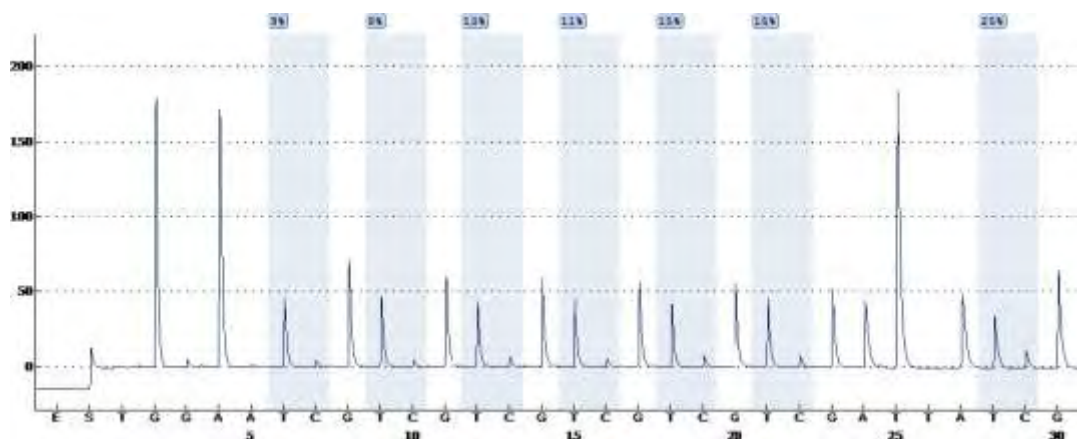
**Εικόνα 30.** Ανίχνευση των επιπέδων μεθυλίωσης στις τέσσερις CpG περιοχές του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου.

Μελετήσαμε το βαθμό μεθυλίωσης σε επτά CpG νησίδες του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου που επίσης εδράζεται στο χρωμόσωμα 17. Με τη μέθοδο της πυροαλληλούχησης εκτιμήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των συγκεκριμένων περιοχών τόσο στους καρκινικούς όσο και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης στους καρκινικούς ιστούς κυμαίνονται από 0.85% έως 19.35% (μέση τιμή:  $9.21 \pm 4.2$  %), ενώ στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας οι τιμές κυμαίνονταν από 3% έως 6.57% (μέση τιμή:  $5 \pm 1.1$ %). Τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του ERBB2 υποκινητή είναι υψηλότερα στους καρκινικούς ιστούς, συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς, συσχέτιση που είναι στατιστικά σημαντική [( $p=0.007, <0.05$ )]. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου απεικονίζονται στο γράφημα 2.



**Γράφημα 2.** Επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου σε καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης.

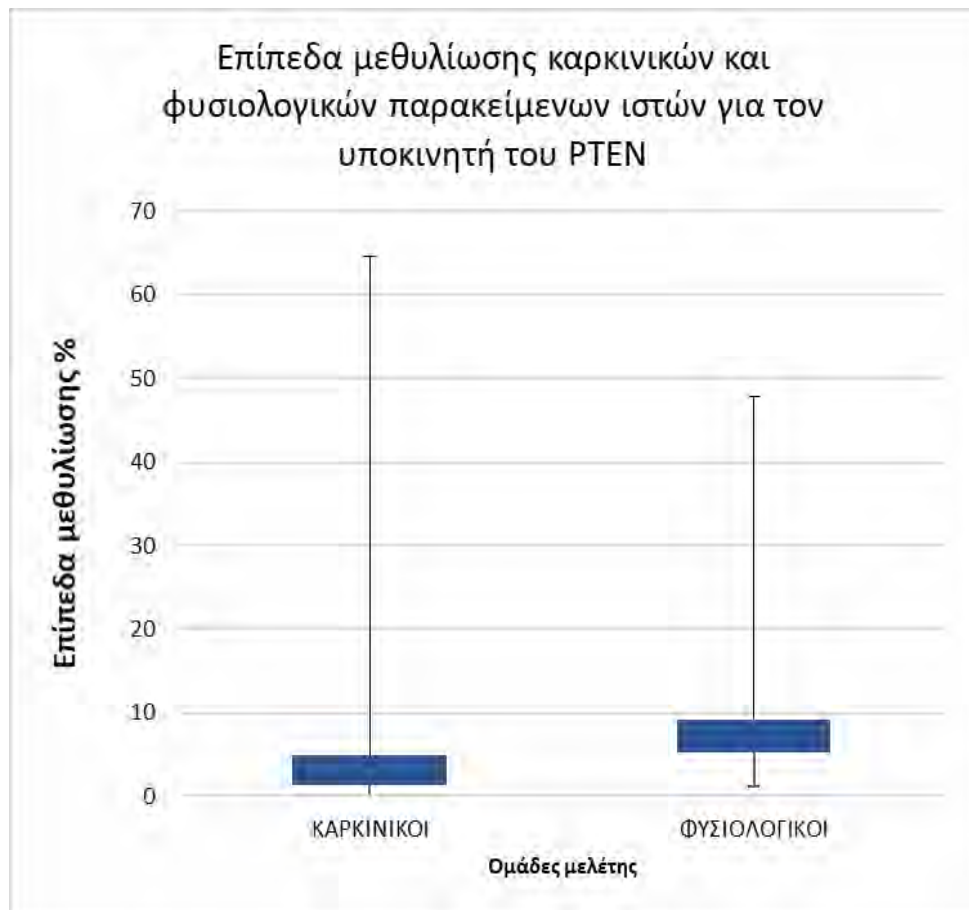




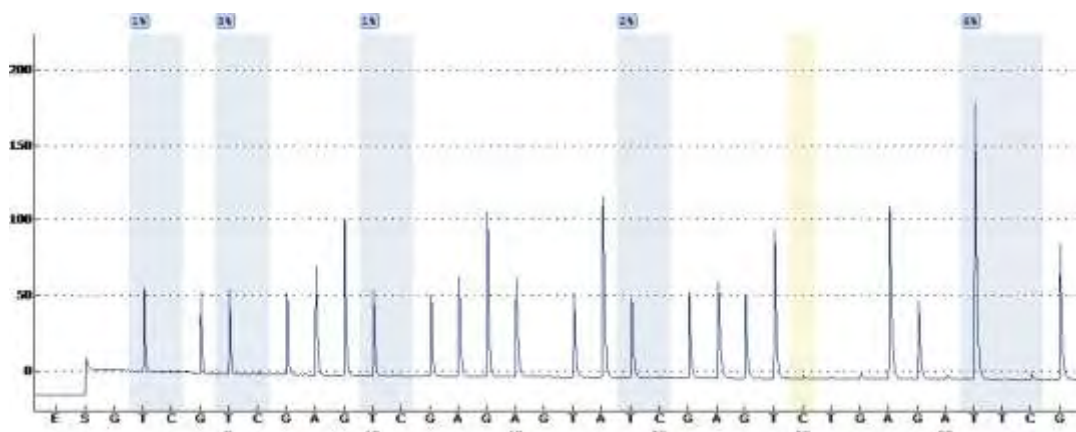
**Εικόνα 31.** Ανίχνευση των επιπέδων μεθυλίωσης στις επτά CpG περιοχές του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου.

### *3B Μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του PTEN γονιδίου*

Στη συνέχεια μελετήσαμε το βαθμό μεθυλίωσης σε πέντε CpG νησίδες του υποκινητή του PTEN γονιδίου που εδράζεται στο χρωμόσωμα 10. Με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης και πάλι εκτιμήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των συγκεκριμένων περιοχών τόσο στους καρκινικούς όσο και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης στους καρκινικούς ιστούς κυμαίνονται από 0-64.6 % (μέση τιμή:  $2.1 \pm 13.51$  %), ενώ στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας οι τιμές κυμαίνονταν από 3% έως 6.57% (μέση τιμή:  $6.2 \pm 10.7$  %). Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του PTEN υποκινητή είναι σχεδόν παρόμοια στους καρκινικούς ιστούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που καταδεικνύει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο δε φαίνεται να είναι μεθυλιωμένο στον καρκίνο του μαστού. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών του υποκινητή του PTEN γονιδίου απεικονίζονται στο γράφημα 3.

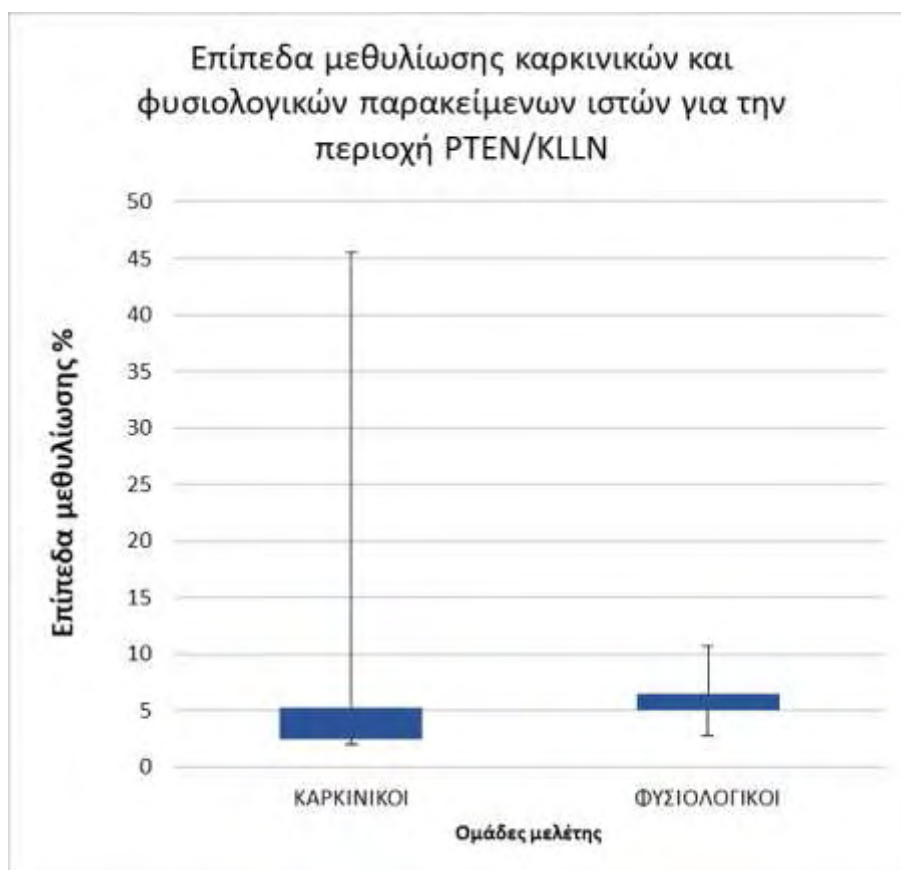


**Γράφημα 3.** Επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου PTEN σε καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς μαστού.

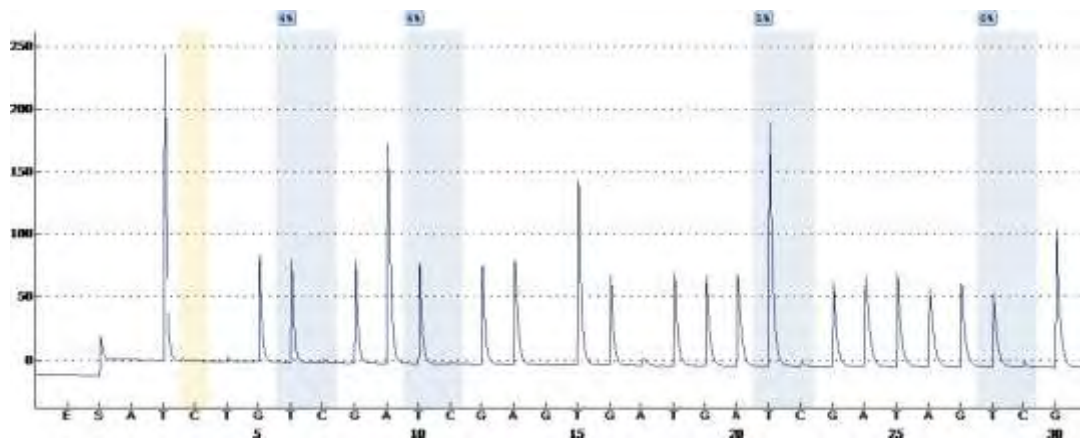


**Εικόνα 32.** Ανίχνευση των επιπέδων μεθυλίωσης στις πέντε CpG περιοχές του υποκινητή του PTEN γονιδίου.

Τέλος μελετήσαμε το βαθμό μεθυλίωσης σε τέσσερις CpG νησίδες του υποκινητή του PTEN/KLLN γονιδίου που εδράζεται επίσης στο χρωμόσωμα 10. Με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης και πάλι εκτιμήσαμε τα επίπεδα μεθυλίωσης των συγκεκριμένων περιοχών στους καρκινικούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του PTEN/KLLN γονιδίου υποκινητή κυμαίνονται από 1.2-47.8 % (μέση τιμή:  $3.5 \pm 7\%$ ), ενώ στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς κυμαίνονται από 2.75-10.75% (μέση τιμή:  $5 \pm 2\%$ ). Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του συγκεκριμένου γονιδίου είναι σχεδόν παρόμοια στους καρκινικούς ιστούς και στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των καρκινικών και παρακείμενων φυσιολογικών ιστών του υποκινητή του PTEN/KLLN γονιδίου απεικονίζονται στο γράφημα 4.



**Γράφημα 4.** Επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου PTEN/KLLN σε καρκινικούς και παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς μαστού.



**Εικόνα 33.** Ανίχνευση των επιπέδων μεθυλίωσης στις τέσσερις CpG περιοχές του υποκινητή του PTEN/KILLN γονιδίου.

Με βάση τα αποτελέσματά μας αναδεικνύεται ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων των υποκινητών των BRCA1 και ERBB2 γονιδίων είναι σημαντικά υψηλότερα στους καρκινικούς έναντι των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Παράλληλα, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης για τον υποκινητή του κάθε γονιδίου με τις κλινικο-ιστολογικές παραμέτρους των ασθενών της μελέτης μας.

Αρχικά συγκρίναμε τα επίπεδα μεθυλίωσης του κάθε γονιδίου με την ηλικία ώστε να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των δύο ηλικιακών ομάδων.

<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και ηλικιακή ομάδα</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και ηλικιακή ομάδα</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και ηλικιακή ομάδα</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και ηλικιακή ομάδα</i>	>0.05

**Πίνακας 4.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και των ηλικιακών ομάδων των ασθενών.

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4, δεν αναδείχθηκε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης των υπό εξέταση γονιδίων και των δύο ηλικιακών ομάδων των ασθενών. Ανάλογη εικόνα προέκυψε και κατά τη συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των τεσσάρων γονιδίων με το βαθμό κακοηθείας των καρκινωμάτων των ασθενών της μελέτης (Πίνακας 5).

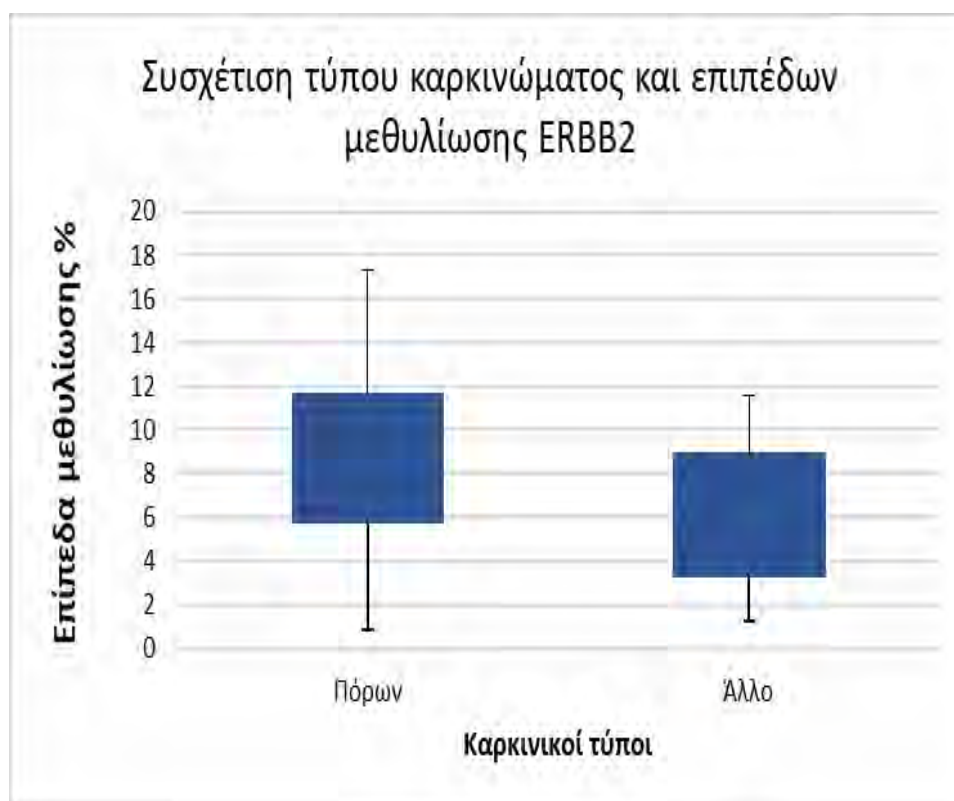
<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και βαθμός κακοήθειας</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και βαθμός κακοήθειας</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και βαθμός κακοήθειας</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και βαθμός κακοήθειας</i>	>0.05

**Πίνακας 5.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και του βαθμού κακοηθείας των καρκινωμάτων των ασθενών.

Η συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των γονιδίων με τον τύπο του καρκίνου δεν ανέδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6 τα επίπεδα μεθυλίωσης του ERBB2 γονιδίου δείχνουν τάση συσχέτισης με τον πορογενή τύπο καρκίνου ( $p=0.076$ ), (Γράφημα 5).

Παράμετροι συσχέτισης	Τιμή σημαντικότητας (p)
Επίπεδα μεθυλίωσης <i>BRCA1</i> και τύπος καρκινώματος	>0.05
Επίπεδα μεθυλίωσης <i>ERBB2</i> και τύπος καρκινώματος	0,076
Επίπεδα μεθυλίωσης <i>PTEN</i> και τύπος καρκινώματος	>0.05
Επίπεδα μεθυλίωσης <i>PTEN/KILLN</i> και τύπος καρκινώματος	>0.05

**Πίνακας 6.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και των ηλικιακών ομάδων των ασθενών.



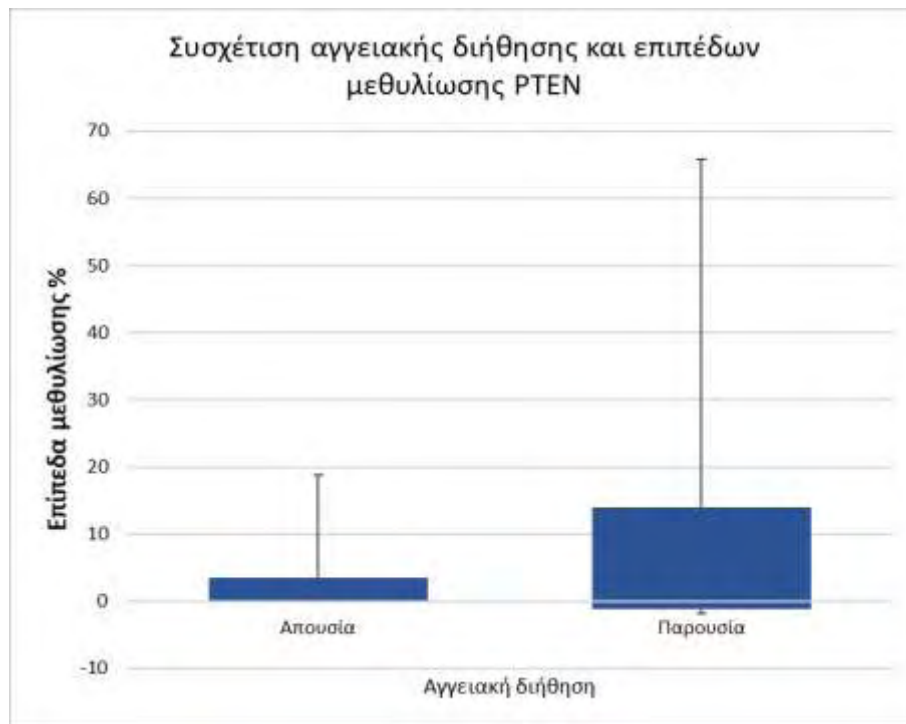
**Γράφημα 5.** Συσχέτιση του τύπου του καρκινώματος και των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου.

Η συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN και PTEN/KLLN με τη διάμετρο του όγκου, δεν ανέδειξε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p>0.05$ ).

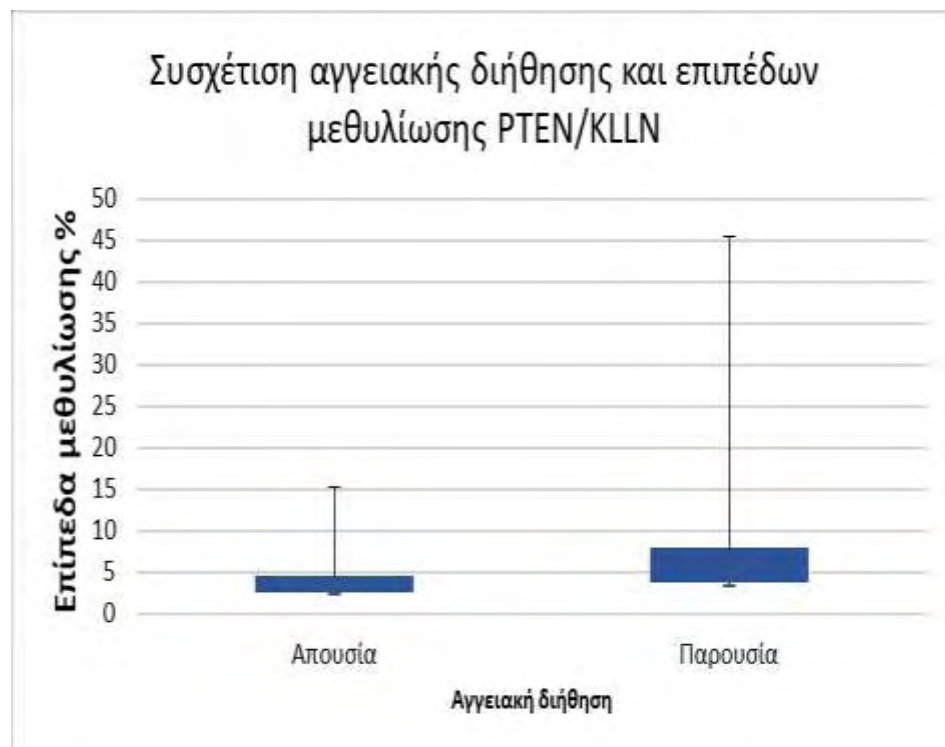
Η συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των γονιδίων BRCA1 και ERBB2 με την παρουσία αγγειακής διήθησης δεν ανέδειξε στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Ωστόσο, όσον αφορά στα γονίδια PTEN και PTEN/KLLN φαίνεται να υπάρχει η τάση για συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσής τους με την παρουσία αγγειακής διήθησης ( $p=0.091$ ) και ( $p=0.082$ ) αντίστοιχα (Πίνακας 7), (Γράφημα 6).

<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και παρουσία αγγειακής διήθησης</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και παρουσία αγγειακής διήθησης</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και παρουσία αγγειακής διήθησης</i>	0,091
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και παρουσία αγγειακής διήθησης</i>	0,082

**Πίνακας 7.** Συσχέτιση της παρουσίας αγγειακής διήθησης των ασθενών με τα επίπεδα μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων.



**Γράφημα 6.** Συσχέτιση της παρουσίας αγγειακής διήθησης και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου.



**Γράφημα 7.** Συσχέτιση της παρουσίας αγγειακής διήθησης και των επιπέδων μεθυλίωσης του γονιδίου PTEN/KILLN.



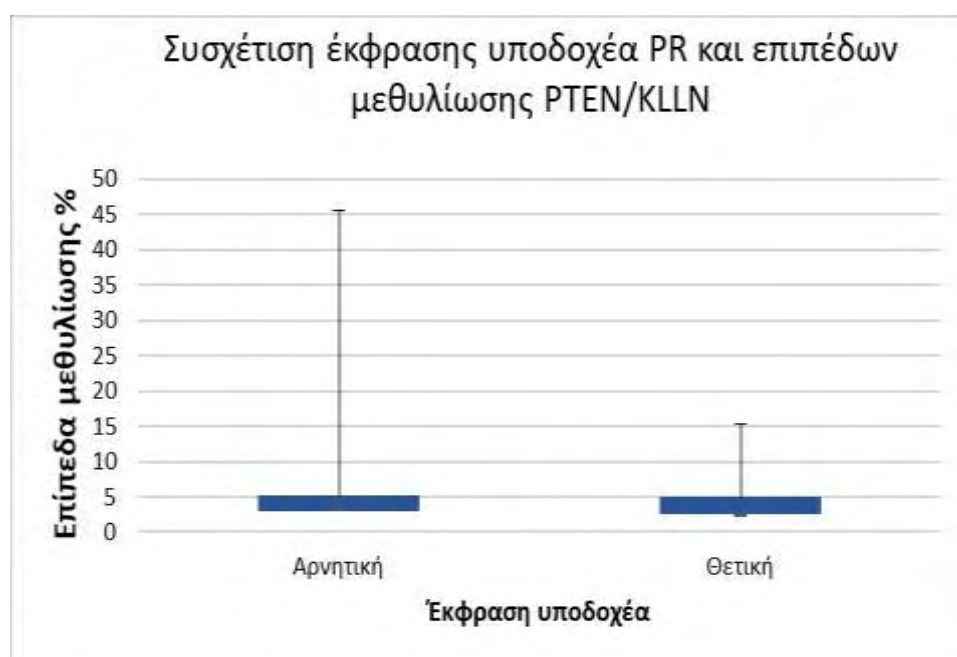
Στη συνέχεια εξετάσαμε πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης των CpG νησίδων κάθε υποκινητή με την παρουσία ή απουσία έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), καθώς και της έκφρασης του HER2 υποδοχέα. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης με την έκφραση των ER, PR υποδοχέων. Ωστόσο, η συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του PTEN/KLLN υποκινητή δείχνει τάση για συσχέτιση με την έκφραση του υποδοχέα προγεστερόνης ( $p=0.098$ ) (Πίνακες 8, 9).

<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και έκφρασης ER</i>	<i>&gt;0.05</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και έκφρασης ER</i>	<i>&gt;0.05</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και έκφρασης ER</i>	<i>&gt;0.05</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και έκφρασης ER</i>	<i>&gt;0.05</i>

**Πίνακας 8.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και της έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER).

Παράμετροι συσχέτισης	Τιμή σημαντικότητας (p)
Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και έκφρασης PR	>0.05
Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και έκφρασης PR	>0.05
Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και έκφρασης PR	>0.05
Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και έκφρασης PR	0.098

**Πίνακας 9.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και της έκφρασης του υποδοχέα προγεστερόνης (PR).



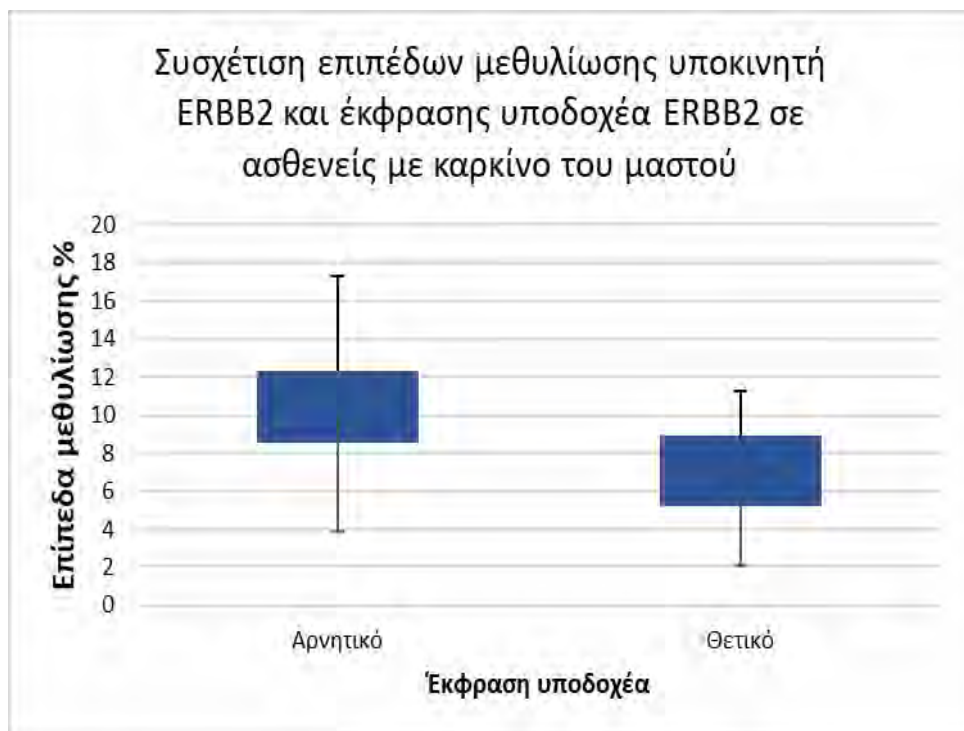
**Γράφημα 8.** Συσχέτιση της έκφρασης του PR υποδοχέα και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN/KILLN γονιδίου.

Επιπρόσθετα, εξετάσαμε την πιθανή συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων με την έκφραση του ERBB2 υποδοχέα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10, τα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου φαίνεται

να σχετίζονται με την έκφραση του ERBB2 υποδοχέα. Η συσχέτιση που προκύπτει είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.024$ ) (Γραφήματα 9, 10).

<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και έκφρασης ERBB2</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και έκφρασης ERBB2</i>	<b>0.024</b>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και έκφρασης ERBB2</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και έκφρασης ERBB2</i>	>0.05

**Πίνακας 10.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των μελετούμενων γονιδίων και της έκφρασης του ERBB2 υποδοχέα.



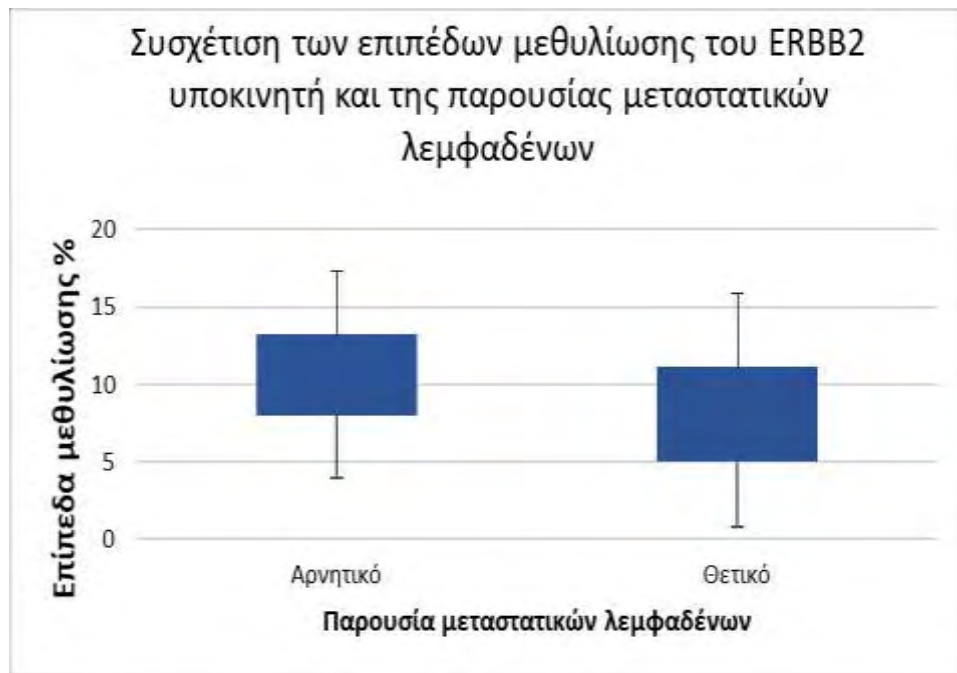
**Γράφημα 9.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου και της έκφρασης του υποδοχέα του.

Όπως φαίνεται στο γράφημα 9, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 στις ασθενείς με απουσία έκφρασης του ERBB2 υποδοχέα έχουν διάμεση τιμή 9.9%. Ο υποκινητής δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως μεθυλιωμένος. Ωστόσο, η διάμεση τιμή των επιπέδων μεθυλίωσης των ασθενών με έκφραση του ERBB2 υποδοχέα ήταν αρκετά χαμηλότερη, στο 6.425%. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.024$ ), παρέχοντας μία πρώτη ένδειξη συσχέτισης της έκφρασης του ERBB2 υποδοχέα και των επιπέδων μεθυλίωσής του στους ασθενείς με καρκίνο.

Συσχετίσαμε επιπρόσθετα τα επίπεδα μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων με την παρουσία μεταστατικών λεμφαδένων στις ασθενείς της μελέτης μας (Πίνακας 11). Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις. Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει ασθενής συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του ERBB2 υποκινητή και της παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων ( $p=0.095$ ), (Πίνακας 10).

<i>Παράμετροι συσχέτισης</i>	<i>Τιμή σημαντικότητας (p)</i>
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης BRCA1 και παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης ERBB2 και παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων</i>	0.095
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN και παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων</i>	>0.05
<i>Επίπεδα μεθυλίωσης PTEN/KILLN και παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων</i>	>0.05

**Πίνακας 11.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και της παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων των ασθενών.



**Γράφημα 10.** Συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου και της παρουσίας μεταστατικών λεμφαδένων.

## Συζήτηση

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια στις γυναίκες. Συγκαταλέγεται μεταξύ των τριών συχνότερων καρκίνων μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του παχέος εντέρου [1]. Τα τελευταία χρόνια στις αναπτυγμένες χώρες η θνησιμότητα από τον καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί σημαντικά, γεγονός που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην έγκαιρη διάγνωση και στην εφαρμογή βελτιωμένων θεραπειών [4].

Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού δεν είναι ξεκάθαροι. Στους κυριότερους συγκαταλέγονται το φύλο, η ηλικία, το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό, και η κληρονομικότητα [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17].

Πρόκειται για μία ιδιαίτερα ετερογενή νόσο με διακριτά βιολογικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, διαφορετική ανταπόκριση στη θεραπεία κι έκβαση της νόσου [57]. Με βάση την ιστολογική ταξινόμηση τόσο το *in situ* όσο και το διηθητικό καρκίνωμα διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, το πορογενές και το λοβιακό καρκίνωμα [57, 58]. Για τη σταδιοποίηση χρησιμοποιείται το σύστημα TNM.

Τελευταία, η μεγάλη ετερογένεια σε συνδυασμό με την ανάπτυξη αντοχής στις τρέχουσες θεραπείες οδήγησαν στη μελέτη και αναζήτηση νέων βιοδεικτών που θα συμβάλλουν τόσο στην πρόγνωση όσο και στην αντιμετώπιση της νόσου. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας συνέβαλλε στη μελέτη πλήθους γονιδίων και σηματοδοτικών μονοπατιών και τα δεδομένα που προέκυψαν έχουν οδηγήσει στην μοριακή ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού που αντιμετωπίζονται πλέον ως διακριτές οντότητες [58, 83]. Η μοριακή ταξινόμηση κατατάσσει τους όγκους του μαστού ανάλογα με την έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER), της προγεστερόνης (PR) και του HER2, σε luminal A, luminal B, HER2 ενισχυμένοι και basal-like (τριπλά αρνητικοί) [84, 86, 87, 88].

Η πλειοψηφία των καρκίνων του μαστού είναι σποραδικού τύπου (70%), ενώ οι υπόλοιποι είναι οικογενούς τύπου (30%). Στους οικογενείς συγκαταλέγονται και οι περιπτώσεις κληρονομικού καρκίνου του μαστού, που στην πλειοψηφία τους φέρουν μεταλλάξεις στα επιδιορθωτικά γονίδια BRCA1, BRCA2 [95, 96]. Ωστόσο, στον σποραδικό καρκίνο του μαστού οι μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα γονίδια δεν ξεπερνούν το 10% των περιπτώσεων, γεγονός που θέτει το ερώτημα ποιοι άλλοι παράγοντες σχετίζονται με την καρκινογένεση του μαστού.

Τελευταία, πολλές μελέτες έχουν εστιάσει την προσοχή τους στις επιγενετικές αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, που δε σχετίζονται με γενετικές αλλαγές, καθώς φαίνεται ότι μέσω των κύριων επιγενετικών μηχανισμών: της μεθυλίωσης του DNA, των τροποποιήσεων των ιστονών και των αλλαγών της έκφρασης των miRNA μορίων, μπορούν να επηρεάσουν τα πρότυπα της πρωτεϊνικής σύνθεσης και ως εκ τούτου να προκαλέσουν.

Μεγάλος αριθμός γονιδίων που μετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες έχουν βρεθεί μεθυλιωμένα στον καρκίνο του μαστού. Μερικά από αυτά συμπεριλαμβάνουν τα BRCA1, MLH1, MGMT, RASSF1A, CDKN2A γονίδια, ενώ αναμένεται να προστεθούν ακόμη περισσότερα, με τη ραγδαία εξέλιξη τεχνολογιών που επιτρέπουν την εις βάθος ανάλυση των επιγενετικών γεγονότων σε έναν ιστό ή στο περιφερικό αίμα των ασθενών.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και παίζει σημαντικό ρόλο σε κυτταρικές διεργασίες, όπως η επιδιόρθωση βλαβών του DNA, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η ρύθμιση της μεταγραφής, η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος, και η ρύθμιση της απόπτωσης ως αποτέλεσμα βλαβών στο DNA. Η επιγενετική αδρανοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως του BRCA1 αποτελεί σημαντικό μηχανισμό αποσιώπησής του στο σποραδικό καρκίνο του μαστού [134]. Σε πρόσφατες μελέτες η απώλεια της έκφρασης του BRCA1 γονιδίου έχει σχετιστεί με όγκους basal-like/TNBC [134].

Στο ίδιο χρωμόσωμα εδράζεται και το πρωτο-ογκογονίδιο HER-2/neu που υπερεκφράζεται στο 20-30% των καρκίνων του μαστού, γεγονός που σχετίζεται με κακή [123]. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν ότι υπάρχει συσχέτιση της μεθυλίωσης των CpG νησίδων διαφόρων γονιδίων, μεταξύ των οποίων τα με καρκίνους του μαστού που παρουσιάζουν ενίσχυση του HER2 γονιδίου [116].

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια PTEN και KILLIN εδράζονται στο χρωμόσωμα 10 και μοιράζονται τον ίδιο υποκινητή. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε ασθενείς με σύνδρομο Cowden, και παράλληλα φαίνεται να εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης σε καρκινικούς ιστούς, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς [134].

Στην παρούσα εργασία θελήσαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα μεθυλίωσης υποκινητών των γονιδίων BRCA1, ERBB2, PTEN, PTEN/KLLN, που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του μαστού, σε Ελληνίδες ασθενείς με σποραδικό καρκίνο του μαστού. Στη μελέτη μας συμπεριλάβαμε 44 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο

του μαστού στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας. Συλλέξαμε καρκινικό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό και απομονώσαμε γενωμικό DNA. Παράλληλα, συλλέξαμε τις κλινικο-ιστολογικές παραμέτρους των ασθενών, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη συσχετίσεων μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης των εξεταζόμενων γονιδίων και των αντίστοιχων παραμέτρων. Οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν την ηλικία διάγνωσης της νόσου, το βαθμό κακοήθειας, τον τύπο του καρκινώματος, τη μέγιστη διάμετρο του όγκου, την παρουσία αγγειακής διήθησης, την παρουσία διηθημένων λεμφαδένων και την έκφραση των υποδοχέων ER, PR, HER2/neu.

Για τα πειράματά μας απομονώσαμε γενωμικό DNA το οποίο στη συνέχεια τροποποιήσαμε επιδρώντας με διθειώδες νάτριο που οδηγεί στη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες. Η ενίσχυση των τμημάτων των υποκινητών των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τη χρήση κατάλληλων, βιοτυνιλιωμένων εκκινητών. Τα επίπεδα μεθυλίωσης των ενισχυμένων τμημάτων για την ομάδα των ασθενών και για την ομάδα ελέγχου εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της πυροαλληλούχισης. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η ανεύρεση όλων των πιθανών συσχετίσεων έγινε με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού IBM SPSS v.22. Οι στατιστικές δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Student's t-test για τη σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης μεταξύ των καρκινικών και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών και ONE-WAY ANOVA για τη σύγκριση των επιπέδων μεθυλίωσης των ασθενών και των κλινικοπαθολογικών τους παραμέτρων.

Η μέση ηλικία διάγνωσης των ασθενών ήταν 63 έτη  $\pm$  12.44 και το ηλικιακό εύρος κυμάνθηκε από 40 μέχρι και 85 έτη. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα προηγούμενων ερευνών, σε δύο ηλικιακές ομάδες, < 50 ετών και  $\geq$  50 ετών [159]. Η πλειοψηφία των ασθενών είχε όγκους μέσου βαθμού κακοηθείας. 37/44 ασθενείς διαγνώστηκαν με πορογενή τύπο καρκίνου του μαστού, ενώ οι υπόλοιπες 7/44 έφεραν άλλους τύπους καρκίνου. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν για μέγιστη διάμετρο όγκου μικρότερη από 2 εκατοστά και μεγαλύτερη ή ίση των 2 εκατοστών, σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφία [163]. 12/44 ασθενείς είχαν διάμετρο όγκου μικρότερη των δύο εκατοστών και 32/44 ασθενείς είχαν διάμετρο όγκου μεγαλύτερη ή ίση των δύο εκατοστών. 27/44 ασθενείς δεν παρουσίαζαν αγγειακή διήθηση. 26/44 ασθενείς είχαν διηθημένους λεμφαδένες.

Όσον αφορά στην έκφραση των ορμονικών υποδοχέων ER, PR και HER2/neu, 33/44 ασθενείς και 32/44 ασθενείς είχαν θετικούς ορμονικούς υποδοχείς οιστρογόνων



και προγεστερόνης αντίστοιχα. Παράλληλα, 37/44 ασθενείς εξέφραζαν τον υποδοχέα HER2/neu. Στο μελέτη μας δεν υπήρχαν ασθενείς που να ανήκουν στον basal-like (τριπλά αρνητικό) καρκίνου του μαστού, ο οποίος χαρακτηρίζεται από χειρότερη επιβίωση [164].

Αρχικά, από τους υποκινητές των γονιδίων που εξετάσαμε στην παρούσα εργασία, αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης παρουσιάστηκαν στον υποκινητή του BRCA1 γονιδίου. Η διάμεση τιμή των επιπέδων κυμάνθηκε στο 61% και υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης ανιχνεύθηκαν και στις 44 ασθενείς του δείγματος στους καρκινικούς ιστούς σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς.

Η μεθυλίωση του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου αποτελεί πολύ συχνό φαινόμενο στην παγκόσμια βιβλιογραφία για τον καρκίνο του μαστού, καθώς αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης για τον υποκινητή του BRCA1 γονιδίου ανιχνεύονται συνεχώς σε αντίστοιχες μελέτες [157-160, 163, 164, 167, 168]. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου σε ανάλογες μελέτες ποικίλουν από 10% για την ομάδα των ασθενών [158], μέχρι και 87% [164], γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη σύσταση του πληθυσμού της εκάστοτε μελέτης.

Στη δική μας μελέτη ο υποκινητής του BRCA1 ήταν μεθυλιωμένος στο σύνολο των ασθενών μας. Προηγούμενες μελέτες σε ομάδες ασθενών με καρκίνο του μαστού έχουν ανιχνεύσει αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα δεδομένα άλλων μελετών, καθώς ανίχνευσαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης στο σύνολο του δείγματος των ασθενών [158] και στο 92% των ασθενών [164]. Σε ανάλογη μελέτη σε Ασιατικό πληθυσμό, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου περιορίστηκαν στο 10% των ασθενών [159] γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πιθανές διαφορές μπορεί να είναι αποτέλεσμα γεωγραφικής ετερογένειας.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου στους καρκινικούς ιστούς ήταν πολύ υψηλότερα από αυτά των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών ( $p=1.17 \cdot 10^{-31}$ ), υποδηλώνοντας ότι η μεθυλίωση αποτελεί κύριο μηχανισμό αποσιώπησης του συγκεκριμένου γονιδίου στο σποραδικό καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν με τη βιβλιογραφία, καθώς σε όλες τις μελέτες που εξετάζονται τα επίπεδα μεθυλίωσης του BRCA1 υποκινητή, η διαφορά μεταξύ των καρκινικών και φυσιολογικών ιστών είναι πάντα στατιστικά σημαντική [157-160, 163, 164, 167, 168]. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας υποστηρίζονται από τη μελέτη των Liu και συνεργατών (2015), που έδειξαν ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης

του BRCA1 υποκινητή είναι σημαντικά υψηλότερα σε καρκίνους πορογενούς τύπου, σε σύγκριση με άλλους υπότυπους ή φυσιολογικούς ιστούς [160]. Αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου είναι ανιχνεύσιμα και στο περιφερικό αίμα ασθενών, όπως έχει αναφερθεί από τη μετα-ανάλυση των Tang και συνεργατών (2016), παρέχοντας μία πιθανή εναλλακτική λύση στα πλαίσια διαγνωστικής εφαρμογής.

Οι περαιτέρω συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου και των κλινικο-ιστολογικών παραμέτρων των ασθενών δεν ανέδειξαν στατιστικώς σημαντικά ευρήματα. Έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του BRCA1 υποκινητή είναι σημαντικά υψηλότερα στους τριπλά αρνητικούς καρκίνους μαστούς σε σχέση με τους υπόλοιπους μοριακούς υποτύπους [164]. Ωστόσο, δεν είχαμε τέτοια περιστατικά στη δική μας μελέτη. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν επίσης ότι τα αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του BRCA1 γονιδίου εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς σταδίου III [163, 168] και σχετίζονται με την παρουσία διηθημένων απομακρυσμένων λεμφαδένων [168].

Τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου προσδιορίστηκαν στο 9.21% για τους καρκινικούς ιστούς, ενώ στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς κυμάνθηκαν στο 5% (μέση τιμή). Αν και τα επίπεδα μεθυλίωσης του ERBB2 υποκινητή βρίσκονται κάτω από το 10% και στις δύο ομάδες που εξετάσαμε (καρκινικοί versus παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί), η διαφορά τους παραμένει στατιστικά σημαντική ( $p=0.007$ ), καθώς η μεθυλίωση στους καρκινικούς ιστούς φαίνεται να είναι σχεδόν διπλάσια από αυτή των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Η μεθυλίωση του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και σχεδόν δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να συμφωνούν ή να διαφοροποιούνται από τα δικά μας ευρήματα. Σε μία πρόσφατη μελέτη των Spitzweiser και συνεργατών (2017), φαίνεται ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου ήταν ιδιαίτερα χαμηλά, υποδηλώνοντας ότι ο υποκινητής χαρακτηρίζεται ως μη μεθυλιωμένος [166].

Μελετήσαμε την πιθανή συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου με τις κλινικοιστολογικές παραμέτρους των ασθενών. Παρατηρήσαμε μία ασθενή συσχέτιση ( $p=0.076$ ) μεταξύ του καρκινικού τύπου και των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του ERBB2 γονιδίου, καθώς φαίνεται να είναι υψηλότερα στον πορογενή τύπο καρκίνου σε σχέση με τους υπόλοιπους υπότυπους.

Επιπρόσθετα, από τα αποτελέσματά μας προέκυψε ότι η μεθυλίωση του ERBB2 υποκινητή σχετίζεται με την έκφραση του HER2 υποδοχέα. Η συσχέτιση που προέκυψε είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.024$ ). Η απουσία έκφρασης του HER2 υποδοχέα σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του γεγονός που παρέχει κάποιες πρώτες ενδείξεις για την εμπλοκή της μεθυλίωσης ως επιγενετικός μηχανισμός αποσιώπησης του ERBB2 γονιδίου στον καρκίνο του μαστού.

Ο επόμενος υποκινητής που μελετήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων μεθυλίωσής του είναι ο υποκινητής του PTEN γονιδίου. Η διάμεση τιμή των επιπέδων μεθυλίωσης των καρκινικών ιστών μας προσδιορίστηκε στο 2.1%, ενώ τα αντίστοιχα επίπεδα μεθυλίωσης των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών προσδιορίστηκαν στο 6.2%. Παρόλα αυτά, δεν αναδείχθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα σχετικά με τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN στους καρκινικούς ιστούς για το δείγμα μας.

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τη μεθυλίωση του υποκινητή του PTEN γονιδίου είναι αμφιλεγόμενα. Οι προηγούμενες μελέτες που εξετάζουν ή συμπεριλαμβάνουν τη μεθυλίωση του υποκινητή του PTEN γονιδίου είναι πρόσφατες και παρέχουν κάποιες πρώτες ενδείξεις για τη μεθυλίωσή του. Εκτός από τη μελέτη των Spitzweiser και συνεργατών (2017), στη μελέτη των Bock και συνεργατών (2018), δεν ανιχνεύθηκαν επιγενετικές τροποποιήσεις στον υποκινητή του PTEN γονιδίου, ενώ στη μελέτη των Klajic και συνεργατών (2013), τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή προσδιορίστηκαν στο 5.15% και δεν εμφάνισαν κάποια στατιστική συσχέτιση με τα αντίστοιχα επίπεδα μεθυλίωσης των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών [162].

Αντιθέτως, η μελέτη των Yari και συνεργατών (2016) [169], η οποία διεξήχθη σε Κουρδικό πληθυσμό, ανίχνευσε επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου της τάξης του 41.7% στους 103 ασθενείς που εξετάστηκαν, ενώ στους φυσιολογικούς συμμετέχοντες, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή προσδιορίστηκαν στο 6%, παρέχοντας μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ( $p < 0.001$ ). Παρόμοια ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου αναφέρονται στη μελέτη των Siddiqui και συνεργατών (2016) σε πληθυσμό 306 ασθενών της Βόρειας Ινδίας, όπου τα επίπεδα της μεθυλίωσης προσδιορίζονται στο 39,44% [165]. Τέλος, πρόσφατη μετα-ανάλυση των Luo S και συνεργατών (2016), αναφέρει υψηλά ποσοστά υπερμεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου, στους *in situ* πορογενείς και πορογενείς υπότυπους καρκίνου του μαστού [161].

Τα δικά μας ευρήματα συμφωνούν με τις μελέτες που ανιχνεύουν χαμηλά ποσοστά μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου, γεγονός που ερμηνεύεται ότι ο υποκινητής του συγκεκριμένου γονιδίου δεν είναι μεθυλιωμένος και άρα η μεθυλίωση δεν αποτελεί επιγενετικό μηχανισμό αποσιώπησης του συγκεκριμένου γονιδίου στον καρκίνο του μαστού. Μια άλλη εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι η πιθανή απώλεια ετεροζυγωτίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN που είναι συχνή στον καρκίνο του μαστού και ενδεχομένως δικαιολογεί και τα χαμηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης συγκριτικά με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς των ασθενών της μελέτης μας.

Στη συνέχεια μελετήσαμε τη συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου και των κλινικοιστολογικών παραμέτρων των ασθενών. Επιπλέον, παρατηρήσαμε μία ασθενή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου και της παρουσίας αγγειακής διήθησης στους ασθενείς μας ( $p=0.091$ ). Οι ασθενείς με αγγειακή διήθηση φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου σε σχέση με τις ασθενείς που απουσιάζει η αγγειακή διήθηση. Οι ενδείξεις αυτές οδηγούν στην υπόθεση ότι η μεθυλίωση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN σχετίζεται ενδεχομένως με χειρότερη πρόγνωση και χρειάζεται να αναλυθεί μεγαλύτερος αριθμός ασθενών για να επιβεβαιωθεί η συγκεκριμένη υπόθεση.

Στη μελέτη μας δεν παρουσιάστηκε κάποια άλλη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υποκινητή του PTEN γονιδίου και των υπολοίπων κλινικοιστολογικών παραμέτρων. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης του PTEN γονιδίου είναι υψηλότερα σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου καρκίνου του μαστού (III και IV) σε σύγκριση με ασθενείς αρχικών σταδίων [166]

Τέλος, στη μελέτη των Sidiqqui και συνεργατών (2016), αναφέρεται η συσχέτιση της απουσίας μεθυλίωσης του υποκινητή του PTEN γονιδίου και της απουσίας έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης. Ωστόσο, δεν αναδεικνύεται κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την έκφραση του HER2/neu υποδοχέα [165].

Τέλος στην εργασία μας μελετήσαμε τον υποκινητή του PTEN/KILLN γονιδίου. Τα επίπεδα μεθυλίωσης στους καρκινικούς ιστούς προσδιορίστηκαν στο 3.5%, ενώ για τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, τα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή προσδιορίστηκαν στο 5%, χωρίς να παρατηρείται κάποια στατιστικώς σημαντική

συσχέτιση.

Αντίστοιχα με το PTEN, παρατηρήθηκε μία ασθενής συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή PTEN/KILLN και της παρουσίας αγγειακής διήθησης. Οι ασθενείς με αγγειακή διήθηση είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή PTEN/KILLN, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικώς σημαντική ( $p=0.082$ ). Τέλος, παρατηρήσαμε ακόμη μία ασθενή συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή PTEN/KILLN και της έκφρασης του ορμονικού υποδοχέα προγεστερόνης (PR) ( $p=0.098$ ). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι ασθενείς που ήταν αρνητικοί για τον υποδοχέα προγεστερόνης είχαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του υποκινητή PTEN/KILLN.

Τα ευρήματα που σχετίζονται με τη ανίχνευση των επιπέδων μεθυλίωσης του υποκινητή PTEN/KILLN αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις στη βιβλιογραφία, καθώς ο συγκεκριμένος υποκινητής και τα επίπεδα μεθυλίωσής του δεν έχουν μελετηθεί. Η αναλογία των συσχετίσεων που υπάρχει μεταξύ των PTEN, PTEN/KILLN και των κλινικο-ιστολογικών παραμέτρων μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα δύο γονίδια μοιράζονται τον ίδιο υποκινητή, άρα έχουν ενδεχομένως κοινές θέσεις μεθυλίωσης (CpG νησίδες).

Τα αποτελέσματα της εργασίας μας αποτελούν πρώτες ενδείξεις για τη συσχέτιση των επιπέδων μεθυλίωσης των συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού. Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη αφενός σε μεγαλύτερο πληθυσμό και αφετέρου λαμβάνοντας υπόψη και άλλες παραμέτρους και στοιχεία παρακολούθησης των ασθενών.

## **Βιβλιογραφία**

- 1. Nadia Harbeck, Michael Gnant, Breast cancer, Lancet 2017; 389: 1134–50**
- 2. Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rajesh Dikshit, Sultan Eser, Colin Mathers, Marise Rebelo, Donald Maxwell Parkin, David Forman and Freddie Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, Int. J. Cancer, 2015, 136: 359–386**
- 4. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, et al. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukemias. Ann Oncol 2016; 27: 725–31.**
- 5. Greta Carioli , Matteo Malvezzi , Teresa Rodriguez , Paola Bertuccio , Eva Negri , Carlo La Vecchia, Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe, The Breast, 2017, 36: 89-95**
- 6. WERNER WERNER PLATZER, HELGA FRITSCH, WOLFGANG KUHNEL, WERNER KAHLE , MICHAEL FROTSCHER ‘Περιγραφική Ανατομική –‘ Εσωτερικά Όργανα II, Πασχαλίδης , 2011**
- 7. SCHUNKE Gustavo Zucca-Matthes,corresponding author<sup>1,2</sup> Cícero Urban,<sup>3</sup> and André Vallejo, Anatomy of the nipple and breast ducts, Gland Surg. 2016 ; 5(1): 32–36.**
- 8. AGIOS Άγιος Α.Ε. ‘Περιγραφική και εφαρμοσμένη ανατομική ‘ Τόμος Α .UniversitystudioPress 1997**
- 9. Siegel RL, Miller KD, and Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017; 67: 7-30.**
- 10. Yi-Sheng Sun, Zhao Zhao, Zhang-Nv Yang, Fang Xu, Hang-Jing Lu, Zhi-Yong Zhu, Wen Shi, Jianmin Jiang, Ping-Ping Yao, Han-Ping Zhu, Risk Factors and Preventions of Breast Cancer, Int. J. Biol. Sci., 2017; 13(11): 1387-1397**
- 11. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. Breast Cancer Res Treat. 2017; 165: 193-200.**
- 12. Nichols HB, Berrington de Gonzalez A, Lacey JV, Jr., Rosenberg PS,**

**Anderson WF. Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. J Clin Oncol. 2011; 29: 1564-1569.**

13. Gierach GL, Curtis RE, Pfeiffer RM, et al. Association of Adjuvant Tamoxifen and Aromatase Inhibitor Therapy With Contralateral Breast Cancer Risk Among US Women With Breast Cancer in a General Community Setting. *JAMA Oncol.* 2016.
14. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Ann Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9: 321-345.
15. Tung N, Lin NU, Kidd J, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34: 1460-1468.
16. 48. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA.* 2017;317: 2402-2416.
17. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med.* 2014;371: 497-506.
18. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin.* 1999, 49(1):33-64, 1
19. Bertrand KA, Scott CG, Tamimi RM, et al. Dense and nondense mammographic area and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015;24: 798-809.
20. Boyd NF, Martin LJ, Rommens JM, et al. Mammographic density: a heritable risk factor for breast cancer. *Methods Mol Biol.* 2009;472: 343-360.
21. Harris HR, Tamimi RM, Willett WC, Hankinson SE, Michels KB. Body size across the life course, mammographic density, and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.* 2011;174: 909-918.
22. Boyd NF. Tamoxifen, mammographic density, and breast cancer prevention. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103: 704-705.
23. Lambertini M, Santoro L, Del Mastro L, et al. Reproductive behaviors and risk of developing breast cancer according to tumor subtype: A systematic review and meta- analysis of epidemiological studies. *Cancer Treat Rev.* 2016;49: 65-76.



24. Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvale G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer*. 2005;92: 167-175.
25. Schedin P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nature Rev Cancer*. 2006;6: 281-291.
26. Faupel-Badger JM, Arcaro KF, Balkam JJ, et al. Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute-sponsored workshop. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105: 166-174.
27. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocrine-related Cancer*. 2007;14: 907-933.
28. Washbrook E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. *Women's Health Medicine*. 2006; 3: 8-14.
29. Horn J, and Vatten LJ. Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. *International journal of women's health*. 2017; 9: 265-272.
30. Dall GV, and Britt KL. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol*. 2017; 7: 110
31. Rosato V, Bosetti C, Negri E, et al. Reproductive and hormonal factors, family history, and breast cancer according to the hormonal receptor status. *Eur J Cancer Prev*. 2014; 23: 412-417.
32. Bassuk SS, Manson JE. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. *Ann Epidemiol*. 2015;25: 193-200.
33. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105: 526-535.
34. Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, et al. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. *JAMA*. 2013;310:

**1353-1368.**

35. Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*. 2011; 8: 669-676.
36. Morrow M, Schnitt SJ, Norton L. Current management of lesions associated with an increased risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12: 227-238.
37. King TA, Pilewskie M, Muhsen S, et al. Lobular Carcinoma in Situ: A 29-Year Longitudinal Experience Evaluating Clinicopathologic Features and Breast Cancer Risk. *J Clin Oncol*. 2015;33: 3945-3952.
38. Dyrstad SW, Yan Y, Fowler AM, Colditz GA. Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149: 569-575
39. Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD, Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res*. 2002;158: 220- 235.
40. Travis LB, Hill DA, Dores GM, et al. Breast cancer following radiotherapy and chemotherapy among young women with Hodgkin disease. *JAMA*. 2003;290: 465-475.
41. La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *Oncologist*. 2011;16: 726-729
42. Gunter MJ, Wang T, Cushman M, et al. Circulating Adipokines and Inflammatory Markers and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107.
43. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Friedman ER, Singerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017.
44. Liu Y, Nguyen N, Colditz GA. Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. *Women's Health (London, England)*. 2015;11: 65-77
45. Jayasekara H, MacInnis RJ, Hodge AM, et al. Is breast cancer risk

**associated with alcohol intake before first full-term pregnancy? Cancer Causes Control. 2016;27: 1167- 1174**

46. Hildebrand JS, Gapstur SM, Campbell PT, Gaudet MM, Patel AV. Recreational physical activity and leisure-time sitting in relation to postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22: 1906-1912
47. Cao Y, Hou L, Wang W. Dietary total fat and fatty acids intake, serum fatty acids and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cancer.* 2016;138: 1894-1904
48. Farvid MS, Chen WY, Michels KB, Cho E, Willett WC, Eliassen AH. Fruit and vegetable consumption in adolescence and early adulthood and risk of breast cancer: population based cohort study. *BMJ.* 2016;353: i2343.
49. Emaus MJ, Peeters PH, Bakker MF, et al. Vegetable and fruit consumption and the risk of hormone receptor-defined breast cancer in the EPIC cohort. *Am J Clin Nutr.* 2016;103: 168-177.
50. Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, et al. Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105: 219-236.
51. Knight JA, Fan J, Malone KE, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *Int J Cancer.* 2017; 141: 916-924.
52. Catsburg C, Miller AB, and Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int J Cancer.* 2015; 136: 2204-2209.
53. Gaudet MM, Carter BD, Brinton LA, et al. Pooled analysis of active cigarette smoking and invasive breast cancer risk in 14 cohort studies. *International journal of epidemiology.* 2017; 46: 881-893.
54. McKenzie F, Ellison-Loschmann L, Jeffreys M, et al. Cigarette smoking and risk of breast cancer in a New Zealand multi-ethnic case-control study. *PLoS One.* 2013; 8: e63132.
55. Kispert S, and McHowat J. Recent insights into cigarette smoking as a lifestyle risk factor for breast cancer. *Breast Cancer : Targets and Therapy.* 2017; 9: 127-132.

56. Morrow M. Chapter 3: Physical Exam of the Breast. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. Diseases of the Breast. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2014 KAINIKH EIKONA
57. MARIA VITTORIA DIECI, ENRICO ORVIETO, MASSIMO DOMINICI, PIERFRANCO CONTE, VALENTINA GUARNERI, Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities, *The Oncologist*, 2014;19:805–813
58. Jaafar Makki. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights: Pathology* 2015;8 23–31
59. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ, eds. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth ed. IARC, Lyon; 2012. ISBN.13.
60. Michael Co, Ava Kwong. *Cancer Treatment and Research Communications* 2018, 14: 17-20
61. Fattaneh AT, Peter D. WHO Classification Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, France; 2003.
62. Amy E McCart Reed, Jamie R Kutasovic, Sunil R Lakhani and Peter T Simpson. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Research*, 2015 17:12
63. Haagensen CD, Lane N, Lattes R, Bodian C. Lobular neoplasia (so-called lobular carcinoma in situ) of the breast. *Cancer*. 1978; 42:737–69.
64. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Tenth ed. Elsevier, Lyon, France; 2011.
65. Ferlicot S, Vincent-Salomon A, Medioni J, Genin P, Rosty C, Sigal-Zafrani B, et al. Wide metastatic spreading in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*. 2004; 40:336–41
66. Farid M. Essentials of Diagnostic Breast Pathology, Practical Approach. 1st ed. Berlin: Springer; 2007. ISBN 978-3-540-45117-4.
67. Diab SG, Clark GM, Osborne CK et al. Tumor characteristics and clinical

**outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. J Clin Oncol 1999;  
17:1442–1448.**

68. Louwman MW, Vriezen M, van Beek MW et al. Uncommon breast tumors in perspective: Incidence, treatment and survival in the Netherlands. *Int J Cancer* 2007 ;121:127–135.
69. Stutz JA, Evans AJ, Pinder S et al. The radiological appearances of invasive cribriform carcinoma of the breast. *Clin Radiol* 1994;49: 693–695.
70. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Lyon, France; 2009.
71. Armes JE, Venter DJ. The pathology of inherited breast cancer. *Pathology*. 2002;34:309–14.
72. Alaa Zare, Alexandra Petrova, Mehdi Agoumi, Heather Armstrong, Gilbert Bigras, Katia Tonkin, Eytan Wine and Shairaz Baksh. RIPK2: New Elements in Modulating Inflammatory Breast Cancer Pathogenesis. *Cancers* 2018, 10: 184
73. Anderson, W.F.; Schairer, C.; Chen, B.E.; Hance, K.W.; Levine, P.H. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). *Breast Dis.* 2005, 22: 9–23.
74. Hance, K.W.; Anderson, W.F.; Devesa, S.S.; Levine, P.H. Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: The surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003, 82: S148.
75. Jaiyesimi, I.A.; Buzdar, A.U.; Hortobagyi, G. Inflammatory breast cancer: A review. *J. Clin. Oncol.* 1992, 10: 1014-1024
76. Sobin, L.H.; Compton, C.C. TNM seventh edition: What's new, what's changed: Communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 2010, 116: 5336–5339.
77. Edge, S.B.; Compton, C.C. The American Joint Committee on Cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* 2010, 17, 1471–1474.
78. Naser Tayyebi Meibodi, Vahid Mashayekhi Ghoyunlu, Zari Javidi and Yalda Nahidi. CLINICOPATHOLOGIC EVALUATION OF MAMMARY PAGET'S DISEASE. *Indian J Dermatol.* 2008 Jan-Mar; 53(1): 21–23



79. Niedt G. Paget's disease. In: Rigel DS, Fridman RJ, Dezubow LM, Reintgen DS, et al., editors. *Cancer of the skin*. China: Elsevier; 2005. pp. 303–9.
80. Kerry H, Lyndsey S. Radiotherapy and perianal Paget's disease. *J Radiother Pract*. 2006;5:55–60.
81. Lev-Schelouch D, Sperber F, Gat A, Klausner J, Gutman M. [Paget's disease of the breast]. *Harefuah*. 2003;142(6):433-7, 85
82. American Joint Committee, *Breast Cancer Staging, 2009, 7th EDITION*
83. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747–52.
84. Atefeh Taherian-Fard, Sriganesh Srihari and Mark A. Ragan. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis. *BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS*. VOL 16. NO 3. 461-474 'HHHH Oxford University Press. 2014 VOL 16. NO 3. 461-474
85. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:736–750
86. Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Save-Soderborgh J, et al. (1992) Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10: 1049-1056.
87. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673-1684.
88. Darina Vuong, Peter T. Simpson, Benjamin Green, Margaret C. Cummings, Sunil R. Lakhani. Molecular classification of breast cancer *Virchows Arch* (2014) 465:1–14
89. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ;100(14):8418–23.

**90. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schnitt FC, Tan PH,**

**Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS, Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*, 2011, 24:157–167.**

**91. Pilar Eroles, Ana Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo, Ana Lluch. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 2012, 38: 698–707**

**92. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol* 2007;8(5):R76.**

**93. Parker JS, Prat A, Mullins M, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1160–7.**

**94. Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12(5):R68.**

**95. 1. Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:722–31.**

**96. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:937–48.**

**97. Brohet RM, Velthuisen ME, Hogervorst FBL, Meijers-Heijboer HEJ, Seynaeve C, Collée MJ, et al. Breast and ovarian cancer risks in a large series of clinically ascertained families with a high proportion of BRCA1 and BRCA2 Dutch founder mutations. *J Med Genet*. 2014;51:98–107.**

**98. Paraskevi Apostolou and Florentia Fostira. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 747318, 11 pages**

**99. D. F. Easton, K. A. Pooley, A.M. Dunning et al., “Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci,” *Nature*, 2007 vol. 447, no. 7148: 1087– 1093,**

100. D. J. Hunter, P. Kraft, K. B. Jacobs et al., “A genome-wide association study identifies alleles in *FGFR2* associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer,” *Nature Genetics*, 2007, vol. 39, no. 7: 870–874
101. S. Ahmed, G. Thomas, M. Ghousaini et al., “Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23,” *Nature Genetics*, 2009 vol. 41, no. 5: 585–590,
102. G. Thomas, K. B. Jacobs, P. Kraft et al., “A multistage genomewide association study in breast cancer identifies two new risk alleles at 1p11.2 and 14q24.1 (*RAD51L1*),” *Nature Genetics*, 2009, 41, 5: 579–584
103. W. Zheng, J. Long, Y. T. Gao et al., “Genome-wide association study identifies a new breast cancer susceptibility locus at 6q25.1,” *Nature Genetics*, 2009 vol. 41, no. 3: 324–328
104. D.S. Tan, C. Marchio, J.S. Reis-Filho, Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies. *J. Clin. Pathol.*, 2008, 61: 1073–1082
105. Esteller M. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358(11):1148–1159.
106. Maruyama R, Choudhury S, Kowalczyk A et al. Epigenetic regulation of cell type- specific expression patterns in the human mammary epithelium. *PLoS Genet.*, 2011 7(4): e1001369
107. Stephanie A. Tammen, Simonetta Friso, and Sang-Woon Choi, Epigenetics: the link between nature and nurture, *Mol Aspects Med*. 2013 ; 34(4): 753–764.
108. Shumei Zhang, Yihan Wang, Yue Gu, Jiang Zhu, Ce Ci, Zhongfu Guo, Chuangeng Chen, Yanjun Wei, Wenhua Lv, Hongbo Liu, Dongwei Zhang and Yan Zhang, Specific breast cancer prognosis-subtype distinctions based on DNA methylation patterns, *Molecular Oncology*, 2018, 12: 1047–1060
109. Brenner C, Fuks F. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 2006;301:45–66.
110. Dworkin AM, Huang TH, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin. Cancer*



111. Seher Karsli-Ceppioglu, Aslihan Dagdemir, Gaëlle Judes, Marjolaine Ngollo, Frédérique Penault-Llorca, Amaury Pajon, Yves-Jean Bignon, Dominique Bernard- Gallon, Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge, *Epigenomics*, 2014 6(6): 651–664
112. Hany A Abdel-Hafiz, Kathryn B Horwitz, Role of epigenetic modifications in luminal breast cancer, *Epigenomics*, 2015 7(5): 847–862
113. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.*,2010, 28(10): 1057–1068
114. Khan SI, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chem. Res. Toxicol.*,2012 25(1): 61–73
115. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S. Epigenetics in breast cancer: what’s new? *Breast Cancer Res.*,2011, 13(6): 225
116. Heena Singla, Abhilash Ludhiadch, Raman Preet Kaur, Harish Chander, Vinod Kumar, Anjana Munshi, Recent advances in HER2 positive breast cancer epigenetics: Susceptibility and therapeutic strategies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 142: 316-327
117. P.A. Jones, S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer, *Nat. Rev. Genet.*,2002, 3: 415-428
118. Fang F, Turcan S, Rimmer A et al. Breast cancer methylomes establish an epigenomic foundation for metastasis. *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3(75): 75-25
119. Rohini Roy, Jarin Chun, and Simon N. Powell, BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection, *Nat Rev Cancer.*,2016 ; 12(1): 68–78.
120. Petra van der Groep & Elsken van der Wall, Paul J. van Diest, Pathology of hereditary breast cancer, *Cell Oncol.* ,2011 34:71–88
121. Wu H-C, Wang Q, Delgado-Cruzata L, Santella RM, Terry MB. Genomic Methylation Changes Over Time in Peripheral Blood Mononuclear Cell DNA: Differences by Assay Type and Baseline Values. *Cancer epidemiology*,

**biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2012;21(8):1314-1318. doi:10.1158/1055- 9965.EPI-12-0300.**

**122. Stefansson OA, Jonasson JG, Olafsdottir K, Hilmarsdottir H, Olafsdottir G, et al. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics*. 2011; 6:638–649.**

123. Rita Nahta, HER2-targeted therapies in breast cancer, *Expert Opin Biol Ther.* 2013 ; 13(7): 949–952
124. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235: 177–82. Original paper to establish correlation between poor prognosis and HER2 over-expression in breast cancer.
125. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol.* 1999;26(4 Suppl 12):51-9.
126. K. Terada, E. Okochi-Takada, S. Akashi-Tanaka, K. Miyamoto, K. Taniyama, H. Tsuda, K. Asada, M. Kaminishi, T. Ushijima, Association between frequent CpG island methylation and HER2 amplification in human breast cancers, *Carcinogenesis*, 2009, 30: 466-471
127. S.Y. Park, A.N. Seo, H.Y. Jung, J.M. Gwak, N. Jung, N.-Y. Cho, G.H. Kang, Alu and LINE-1 hypomethylation is associated with HER2 enriched subtype of breast cancer, *PLoS One*, 2014, 9:e100429
128. Yan Guo, Hui Chang, Jing Li, Xin-yuan Xu, Lan Shen, Zhi-bin Yu, Wen-chao Liu, Thymosin alpha 1 suppresses proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, *Apoptosis* (2015) 20:1109–1121
129. Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Persson C, Lovgren K, Jumppanen M, Staaf J, Jonsson G, Pires MM, Maurer M, Holm K, Koujak S, Subramaniam S, Vallon-Christersson J, Olsson H, Su T, Memeo L, Ludwig T, Ethier SP, Krogh M, Szabolcs M, Murty VV, Isola J, Hibshoosh H, Parsons R, Borg A , Recurrent gross mutations of the pten tumor suppressor gene in breast cancers with deficient dsb repair. *Nat Genet*, 2008, 40:102–107
130. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB, Hidalgo M, Reduced pten expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3Kinase/akt pathway. *Ann Oncol*, 2004, 15: 1510–1516
131. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW (1998) Negative regulation of



**pkb/akt-dependent cell survival by the tumor suppressor pten. Cell 95:29–39**

132. Park YH, Jung HA, Choi MK, Chang W, Choi YL, Do IG, Ahn JS, Im YH , Role of HER3 expression and PTEN loss in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer (MBC) who received taxane plus trastuzumab treatment. *Br J Cancer*, 2014 110(2):384–391.
133. Enders K Ng, Vivian Y Shin, Candy P Leung, Vivian W Chan, Fian B Law, Man T Siu, Brian H Lang, Edmond S Ma, Ava Kwong, Elevation of methylated DNA in KILLIN/PTEN in the plasma of patients with thyroid and/or breast cancer, *OncoTargets and Therapy* 2014;7 2085–2092
134. Yu Wang, Xin He, Qi Yu and Charis Eng, Androgen receptor-induced tumor suppressor, KLLN, inhibits breast cancer growth and transcriptionally activates p53/p73- mediated apoptosis in breast carcinomas, *Human Molecular Genetics*, 2013, Vol. 22, No. 11 2263–2272
135. Olive Peart, *Breast Intervention and Breast Cancer Treatment Options*, *RADIOLOGIC TECHNOLOGY*, May/June 2015, Volume 86, Number 5
136. Peart O. Treatment options. In: *Mammography and Breast Imaging PREP*. New York, NY: McGraw-Hill; 2012:397-436.
137. Umberto Veronesi, Peter Boyle, Aron Goldhirsch, Roberto Orecchia, Giuseppe Viale, *Breast cancer*, *Lancet* 2005; 365: 1727–41
138. Εταιρεία Ογκολόγων Παθολόγων Ελλάδας, 2017, <https://www.hesmo.gr/el/>
139. E. Senkus, S. Kyriakides, S. Ohno, F. Penault-Llorca, P. Poortmans, E. Rutgers, S. Zackrisson & F. Cardoso, on behalf of the ESMO Guidelines Committee, Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Annals of Oncology* 26 (Supplement 5): v8–v30, 2015
140. Darby S, McGale P et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 1707–1716.
141. (NCCN) NCCN. Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer 2016

142. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA* 2006; 295: 1658–1667.

143. Clarke M, Coates AS, Darby SC et al. Adjuvant chemotherapy in oestrogen receptor- poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2008; 371: 29– 40.

144. Breast Cancer Treatment (PDQ®), 2018, <https://>

145. G. Valabrega, F. Montemurro, M. Aglietta, Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer, *Ann. Oncol.* 18 (2007) 977-984.

146. S. Palomeras, A. Diaz-Lagares, S. Ariadna, C.A. Belen, G.-P. Ariadna, J. Sandoval, M. Rabionet, M. Esteller, T. Puig, Abstract 2130A: epigenetic silencing of TGFb1, BCL6, KILLIN and CTSZ is related to trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer models, *Cancer Res.* 76 (2016) 2130A

147. Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al. Prognostic value of tumorinfiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199.

148. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicinbased chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol.* 2013;31:860–7.

149. Dieci MV, Mathieu MC, Guarneri V, et al. Prognostic and predictive value of tumor- infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1698–704

150. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes is prognostic and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol.* 2014

151. Lucy M. De La Cruz, and Brian J. Czerniecki, Immunotherapy for Breast Cancer is Finally at the Doorstep: Immunotherapy in Breast Cancer, *Ann Surg Oncol*, 2018
152. Muenst S, Soysal SD, Gao F, et al. The presence of programmed cell death (PD-1)- positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013.
153. Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2015;384:164–72.
154. Raufi AG, Kemplern SJ. Immunotherapy for advanced gastric and esophageal cancer: preclinical rationale and ongoing clinical investigations. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6:561– 9.
155. Pardoll DM The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:252–64.
156. Bock J et al, Single CpG hypermethylation, allele methylation errors, and decreased expression of multiple tumor suppressor genes in normal body cells of mutation-negative early-onset and high-risk breast cancer patients, *Int. J. Cancer*: 143, 1416–1425 (2018)
157. Figueroa J et al, Integrated analysis of DNA methylation, immunohistochemistry and mRNA expression, data identifies a Methylation Expression Index (MEI) robustly associated with survival of ER-positive breast cancer patients, *Breast Cancer Res Treat*. 2015 April ; 150(2): 457–466. doi:10.1007/s10549-015-3314-6.
158. Klajic J et al, Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors *BMC Cancer* 2013, 13:456 <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/456>
159. Li Q, Wei W, Jiang Y, Yang H, Liu J. Promoter methylation and expression changes of BRCA1 in cancerous tissues of patients with sporadic breast cancer, *ONCOLOGY LETTERS* 9: 1807-1813, 2015

**160. Liu L et al, Quantitative detection of methylation of FHIT and BRCA1 promoters in the serum of ductal breast cancer patients, Bio-Medical Materials and Engineering 26 (2015) S2217–S2222, DOI 10.3233/BME-151527**

161. Luo S, Chen J, Mo X, The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis, *OncoTargets and Therapy* 2016;9 5643–5650
162. Ng E.K. et al, Elevation of methylated DNA in KILLIN/PTEN in the plasma of patients with thyroid and/or breast cancer, *OncoTargets and Therapy* 2014;7 2085–2092
163. Saelee P et al, Clinicopathological Significance of BRCA1 Promoter Hypermethylation in Thai Breast Cancer Patient, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 15, 2014
164. Sharma P et al, The prognostic value of BRCA1 promoter methylation in early stage triple negative breast cancer, *J Cancer Ther Res.* 2014 March 19; 3(2): 1–11. doi:10.7243/2049-7962-3-2.
165. Siddiqui S., Akhter N., Deo SVS, Shukla NK, Husain SA, A study on promoter methylation of PTEN in sporadic breast cancer patients from North India, *Breast Cancer* (2016) 23:922–931 DOI 10.1007/s12282-015-0665-0
166. Spitzwieser M et al, Hypermethylation of CDKN2A exon 2 in tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients, Spitzwieser et al. *BMC Cancer* (2017) 17:260 DOI 10.1186/s12885-017-3244-2
167. Tang Q, Cheng J, Cao X, Surowy H, Burwinkel B, Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review, *Clinical Epigenetics* (2016) 8:115 DOI 10.1186/s13148-016-0282-6
168. Zhang L and Long X., Association of BRCA1 promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies, *Nature Scientific Reports* | 5:17869 | DOI: 10.1038/srep17869
169. Yari K, Payandeh M, Rahimi Z, Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran., *Tumour Biol.* 2016 Jun;37(6):8145-52. doi: 10.1007/s13277-015-4731-1.