
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ –
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ –
ΠΕΡΙΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διευθυντής ΠΜΣ : Καθηγητής ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ρόλος των miRNA στην πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία του
καρκίνου του μαστού**

Μαρία Κληματσούδα
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗ ΕΠΙΜΕΛΗΤΡΙΑ Μ/Γ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΠΓΝ ΛΑΡΙΣΑΣ

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

ΛΑΡΙΣΑ

Οκτώβριος 2019

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δαπόντε Αλέξανδρος
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ Σάτρα Μαρία
Ε.ΔΙ.Π Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Βαμβακόπουλος Νικόλαος
Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές και συντελεστές του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιολογία της Αναπαραγωγής-Βιοδείκτες στη Μαιευτική και Γυναικολογία-Περιγεννητική Ιατρική» για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφεραν και για τη βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Μεταπτυχιακό αυτό.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής εργασίας μου και διευθυντή μου κ. Αλέξανδρο Δαπόντε για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας. Ευχαριστώ, επίσης, την κ. Μαρία Σάτρα, για τις πολύτιμες συμβουλές της στη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου και την οικογένειά μου για την ηθική υποστήριξη και ενθάρρυνση που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια και όχι μόνο της φοίτησής μου.

Μαρία Κληματσούδα

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Γεννήθηκα στη Λάρισα στις 5 Απριλίου 1979. Αποφοίτησα από το 5^ο Γενικό Λύκειο Λάρισας. Το 1999 εισήχθηκα στην Ιατρική Σχολή του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης. Κατά την διάρκεια της φοίτησής μου ασχολήθηκα με 3 προπτυχιακές εργασίες. Οι διπλωματικές μου εργασίες είχαν ως θέματα: «Συστηματικός Ερυθρηματώδης Λύκος: Σύγχρονη προσέγγιση. Δείκτες Ενεργότητας και Χρονιότητας στην παρακολούθηση της νόσου», «Νεογνικός Ίκτερος: Αντιμετώπιση – Πρόληψη – Συμπεράσματα.», «Σύνδρομο Ενδαγγειακής Πήξης στην κύηση.» Αποφοίτησα από την Ιατρική Σχολή το 2005. Έχω συμμετάσχει σε συνέδρια ως ομιλήτρια. Από το 2015 μέχρι σήμερα συμμετέχω στην οργανωτική επιτροπή των Larissa Symposia. Είμαι μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Λάρισας από το 2007. Από τον Ιανουάριο του 2010 μέχρι τον Μάιο του 2011 πραγματοποίησα την ειδικότητά μου στη Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Εν συνεχεία, έκανα το αγροτικό στο Κέντρο Υγείας Αγιάς από τον Ιούλιο του 2011 μέχρι τον Απρίλιο του 2012. Συνέχισα με την ειδικότητά μου στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Μάιος 2012-Ιούλιος 2013) και έπειτα στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας (Ιούλιος 2013-Ιούνιος 2017). Τον Ιούνιο του 2017 παρατάθηκε η σύμβασή μου στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Από τον Απρίλιο του 2019 είμαι Επικουρική Επιμελήτρια της Μ/Γ Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Εκτός από το κλινικό έργο συμμετέχω και στα μαθήματα των φοιτητών, στα μετεκπαιδευτικά μαθήματα της κλινικής, συμμετέχω σε ομιλίες σε σχολεία της Λάρισας για τη σεξουαλική αγωγή. Επίσης είμαι υπεύθυνη της δημόσιας τράπεζας βλαστοκυττάρων της κλινικής μας και μέλος στην επιτροπή εξωσωματικής γονιμοποίησης.

«Ο ρόλος των miRNA στην πρόληψη, διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού»

Κληματσούδα Μαρία

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, 2018-2019

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Ι. ΔΑΠΟΝΤΕ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Επιβλέπων:** **Δαπόντε Αλέξανδρος**
Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Σύμβουλος :** **Δρ Σάτρα Μαρία**
Ε.ΔΙ.Π Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μέλος :** **Βαμβακόπουλος Νικόλαος**
Καθηγητής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Περίληψη

Τα miRNA είναι μια κλάση μικρών μη κωδικοποιητικών RNA που ελέγχουν την έκφραση γονιδίου μέσω στόχευσης mRNA και οδηγούν είτε σε καταστολή μετάφρασης είτε σε υποβάθμιση RNA. Η ανώμαλη έκφρασή τους μπορεί να εμπλέκεται σε ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συνηθισμένος καρκίνος μεταξύ των γυναικών σε ολόκληρο τον κόσμο και είναι η πιο διαδεδομένη αιτία θανάτου των γυναικών που πάσχουν από καρκίνο. Πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει έναν μεγάλο αριθμό θετικά ρυθμισμένων ογκογόνων miRNA και αρνητικά ρυθμισμένων ογκοκατασταλτικών miRNA σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Σε αυτή την διπλωματική εργασία, παρέχουμε μια επισκόπηση της βιογένεσης και του ρόλου των miRNA στον καρκίνο και συνοψίζουμε τις πιο πρόσφατες μελέτες που εστιάζουν στη διακριτή έκφραση των miRNA και την πιθανότητά τους να είναι χρήσιμα ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού.

Με βάση τα αποτελέσματα της τελευταίας δεκαετίας, μερικά miRNA εμφανίζονται ως βιοδείκτες του BC για διάγνωση (π.χ. miR-9, miR-10b και miR-17-5p), πρόγνωση (π.χ. miR-148a και miR-335) και πρόβλεψη των θεραπευτικών αποτελεσμάτων (δηλαδή, miR-30c, miR-187 και miR-339-5p) και έχουν σημαντικούς ρόλους στον έλεγχο των λειτουργιών BC όπως εισβολή, μετάσταση, πολλαπλασιασμός, θάνατος, απόπτωση, γενωμική αστάθεια. Άλλα miRNA παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως νέα, εύκολα προσπελάσιμα, προσιτά, μη επεμβατικά εργαλεία για την εξατομικευμένη διαχείριση ασθενών με BC επειδή κυκλοφορούν σε σωματικά υγρά (π.χ. miR-155 και miR-210). Τα νέα φάρμακα που βασίζονται σε miRNA είναι επίσης ελπιδοφόρα για τον BC (π.χ. miR-9, miR-21 και miR34a) και άλλα miRNA παρουσιάζουν θεμελιώδη ρόλο στη διαμόρφωση της απόκρισης σε άλλες μη-miRNA θεραπείες, (π.χ. miR-21, miR34a, miR195, miR200c και miR203 σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία).

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος μαστού, microRNA/miRNA, κυκλοφορούντα, βιοδείκτης, διάγνωση, πρόγνωση, πρόβλεψη και θεραπεία.

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs that control gene expression by targeting mRNAs and leading to either translation repression or RNA degradation. Their aberrant expression may be involved in human diseases, including cancer. Breast cancer is the most common cancer among females around the world that is the most prevalent cause of death among females suffering from cancer. Many studies have identified a large number of upregulated oncogenic miRNAs and down regulated tumor-suppressor miRNAs in this type of cancer. In this review, we provide an overview of the biogenesis and role of miRNAs in cancer and summarize the most recent studies focusing on distinctive expression of miRNAs and their potential to be useful as diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer.

Based on the results obtained in the last decade, some miRNAs are emerging as biomarkers of BC for diagnosis (i.e., *miR-9*, *miR-10b*, and *miR-17-5p*), prognosis (i.e., *miR-148a* and *miR-335*), and prediction of therapeutic outcomes (i.e., *miR-30c*, *miR-187*, and *miR-339-5p*) and have important roles in the control of BC hallmark functions such as invasion, metastasis, proliferation, resting death, apoptosis, and genomic instability. Other miRNAs are of interest as new, easily accessible, affordable, non-invasive tools for the personalized management of patients with BC because they are circulating in body fluids (e.g., *miR-155* and *miR-210*). In particular, circulating multiple miRNA profiles are showing better diagnostic and prognostic performance as well as better sensitivity than individual miRNAs in BC. New miRNA-based drugs are also promising therapy for BC (e.g., *miR-9*, *miR-21*, *miR34a*, *miR145*, and *miR150*), and other miRNAs are showing a fundamental role in modulation of the response to other non-miRNA treatments, being able to increase their efficacy (e.g., *miR-21*, *miR34a*, *miR195*, *miR200c*, and *miR203* in combination with chemotherapy).

Key words: Breast cancer, microRNA/miRNA, circulating, biomarker, diagnosis, prognosis, prediction and therapy.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	10
1.1. Βιογένεση των miRNA	10
1.1.1. Η κανονική οδός της βιογένεσης των miRNA	11
1.1.2. Η μη κανονική οδός της βιογένεσης των miRNA	12
2. Καρκίνος του μαστού	14
2.1. Επιδημιολογία	15
2.2. Ανατομία του μαστού	16
2.3. Φυσιολογία – Ανάπτυξη του μαζικού αδένου – Ορμονικό μωσαϊκό	18
2.4. Τύποι καρκίνου του μαστού	21
2.4.1. Μη διηθητικός καρκίνος του μαστού	21
2.4.2. Επιθετικός καρκίνος του μαστού	24
2.4.3. Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Infiltrating lobular carcinoma-ILC)	24
2.4.4. Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων (Infiltrating ductal carcinoma-IDC)	26
2.4.5. Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (Inflammatory breast cancer-IBC) ..	32
2.4.6. Η νόσος του Paget.....	34
2.4.7. Φυλλοειδείς όγκοι.....	35
2.4.8. Καρκίνος του μαστού και κύηση (Pregnancy Associated Breast Cancer-PABC).....	36
2.4.9. Κύηση μετά από θεραπεία καρκίνου του μαστού.....	38
2.5. Παράγοντες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού	39
2.5.1. Δημογραφικοί παράγοντες.....	39
2.5.2. Ορμονικοί παράγοντες.....	40
2.5.3. Άλλοι παράγοντες.....	41
2.5.4. Το οικογενειακό ιστορικό	41
2.6. Μοριακοί ή εγγενείς υπότυποι καρκίνου του μαστού	43
2.6. Στάδια του καρκίνου	46
3. Μειωμένη ρύθμιση των miR σε καρκίνο του μαστού	48
3.1. Γενικά πρότυπα έκφρασης miR στον καρκίνο του μαστού.....	48
3.2. Έκφραση των miR και ο υποδοχέας οιστρογόνων	49
3.3. Μηχανισμοί απορρύθμισης των miR.....	50
4. Βασικά miR στον καρκίνο του μαστού	52
4.1. Η οικογένεια let-7	52
4.2. miR-34	52
4.3. miR-125	53
4.4. miR-200	53
4.5. miR-205	54

4.6. miR-10	55
4.7. miR-21	56
4.8. miR-17-92	57
4.9. miR-15 και miR-16.....	58
5. Δυναμικό των miRNAs ως βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού.....	59
5.1. Τα miRNA που απορρυθμίζονται στον καρκίνο του μαστού.....	61
5.2. Τα miRNA ως βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης και πρόβλεψης της θεραπείας σε BC	65
5.3. Τα miRNA ως «μοριακή ταυτότητα» του BC	74
6. miRNA για θεραπευτική χρήση σε καρκίνο.....	76
6.1. Μέθοδοι για τη διαμόρφωση του miRNA	76
6.2. miRNA-στοχευμένες θεραπείες.....	78
6.3. miRNA και αντίσταση στη χημειοθεραπεία.....	79
6.4. miRNA, CSC και χημειοαντίσταση.....	80
7. Επίλογος-Συμπεράσματα	81
Βιβλιογραφία	83

Πίνακας 1: Παράγοντες αυξημένου κινδύνου	42
Πίνακας 2: Μοριακοί ή εγγενείς υποτύποι καρκίνου του μαστού.....	45
Πίνακας 3: Στάδια του καρκίνου	46
Πίνακας 4: miRNA στον BC	61
Πίνακας 5: Κυκλοφορούντα και μη κυκλοφορούντα miRNA ως βιοδείκτες του BC.	68

Εικόνα 1: Βιογένεση MicroRNA και μηχανισμός δράσης.....	13
Εικόνα 2: Κανονικός μαστός με διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC) σε μεγενθυμένη διατομή του λοβού	25
Εικόνα 3: Κανονικός μαστός με διηθητικό καρκίνωμα πόρων (ILC) σε μεγενθυμένη διατομή του πόρου.	27
Εικόνα 4: (A) Τυπικό πρότυπο συγκυτιακής ανάπτυξης του MBC, με υψηλής πυκνότητας πυρηνική ατυπία (λευκό βέλος). × 400. (B) Περίπτωση ώθησης του MBC (λευκό βέλος) και πυκνή λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση (μαύρο βέλος). × 200. (Chu Z. et al., 2014).....	28
Εικόνα 5: Βλενώδεις καρκίνωμα	30
Εικόνα 6: Σωληνώδεις καρκίνωμα.....	31
Εικόνα 7: Χαρακτηριστική εικόνα του μαστού με φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού.	34
Εικόνα 8: Νόσος του Paget του μαστού	35
Εικόνα 9: Μικρογραφία ενός φυλλοειδούς όγκου.....	36
Εικόνα 10: Παραδείγματα ρυθμιστικών δικτύων miRNA στον καρκίνο του μαστού που προάγουν τη μετάσταση	64
Εικόνα 11: miRNA βιοδείκτες και χαρακτηριστικά του BC.....	76

1. Εισαγωγή

Τα miRNA είναι μικρά μη-κωδικοποιητικά RNA, με μέσο μήκος 22 νουκλεοτιδίων. Τα περισσότερα miRNA μεταγράφονται από αλληλουχίες DNA σε πρωτογενή miRNA (pri-miRNA) και μεταποιούνται σε πρόδρομα miRNA (pre-miRNA) και ώριμα miRNA. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα miRNA αλληλεπιδρούν με την 3' αμετάφραστη περιοχή των mRNA-στόχων για την καταστολή της έκφρασής τους. Εν τούτοις, έχουν επίσης αναφερθεί αλληλεπιδράσεις των miRNA με άλλες περιοχές, συμπεριλαμβανομένης της κωδικής αλληλουχίας της 5' αμετάφραστης περιοχής και των υποκινητών των γονιδίων. Επιπλέον, τα miRNA έχουν αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν την γονιδιακή έκφραση υπό ορισμένες συνθήκες. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNA μεταφέρονται μεταξύ διαφορετικών υποκυτταρικών διαμερισμάτων για τον έλεγχο της ταχύτητας της μετάφρασης, ακόμη και της μεταγραφής. Τα miRNA είναι κρίσιμα για την φυσιολογική ανάπτυξη των ζώων και εμπλέκονται σε μια ποικιλία βιολογικών διεργασιών. Η ανώμαλη έκφραση των miRNA σχετίζεται με πολλές ασθένειες του ανθρώπου. Επιπλέον, τα miRNA εκκρίνονται σε εξωκυττάρια υγρά. Τα εξωκυτταρικά miRNA έχουν αναφερθεί ευρέως ως δυνητικοί βιοδείκτες για μια ποικιλία ασθενειών και χρησιμεύουν επίσης ως μόρια σηματοδότησης για την επικοινωνία μεταξύ κυττάρων. (Jacob et al., 2018)

1.1. Βιογένεση των miRNA

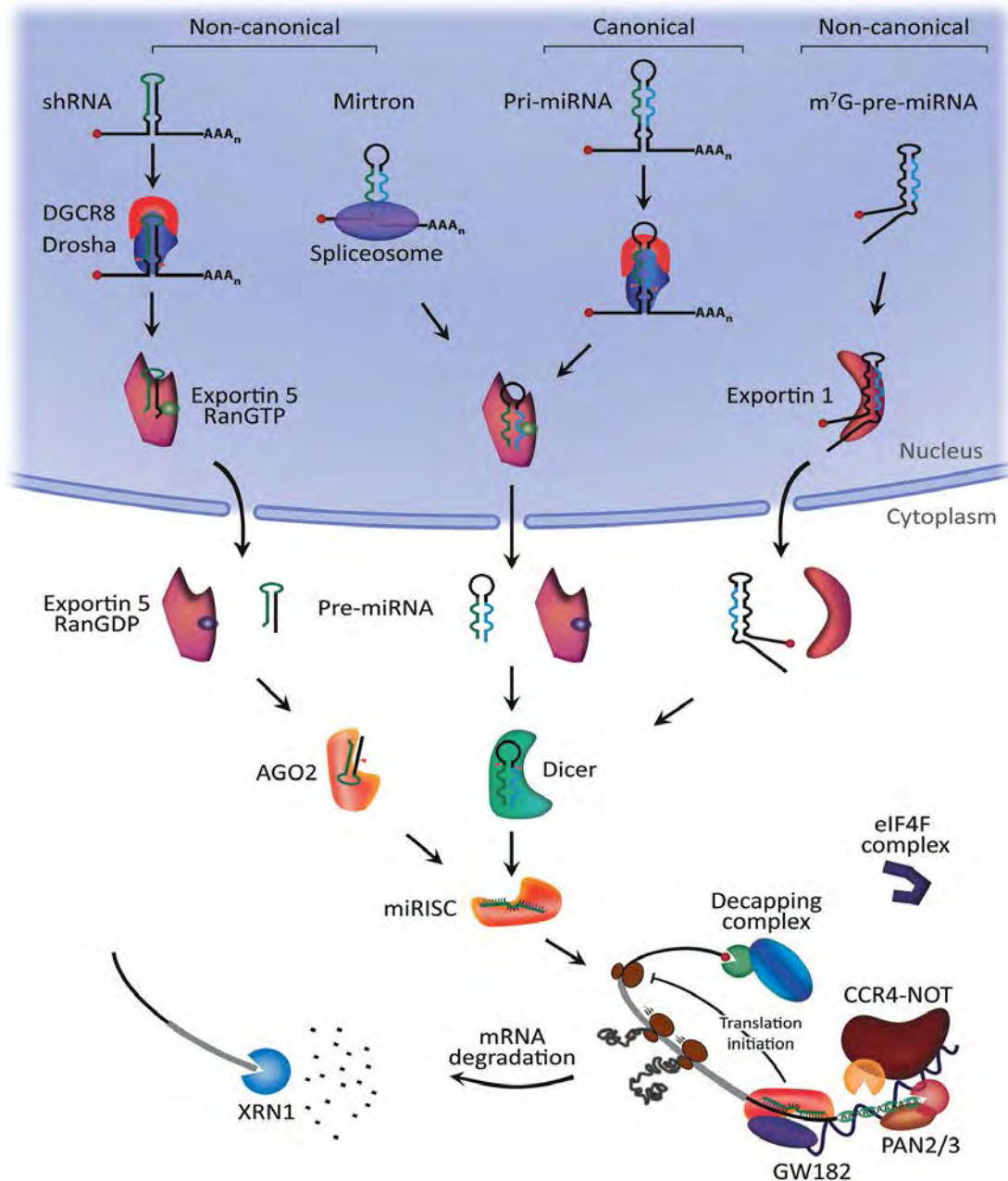
Η βιογένεση των miRNA ξεκινά με την επεξεργασία των μεταγράφων της RNA πολυμεράσης II/III μετά ή συν-μεταγραφικά. Περίπου το ήμισυ όλων των ταυτόχρονα ταυτοποιημένων miRNA είναι ενδογενή και επεξεργάζονται κυρίως από ιντρόνια και σχετικά λίγα εξόνια γονιδίων που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη, ενώ τα υπόλοιπα είναι διαγονιδιακά, μεταγράφονται ανεξάρτητα από ένα γονίδιο-ξενιστή και ρυθμίζονται από τους δικούς τους υποκινητές. Μερικές φορές τα miRNA μεταγράφονται ως ένα μακρύ μετάγραφο που ονομάζεται συστάδα, τα οποία μπορεί να έχουν παρόμοιες seed περιοχές και στην περίπτωση αυτή να θεωρούνται μια οικογένεια. Η βιογένεση των miRNA ταξινομείται σε κανονικές και μη κανονικές οδούς. (O'Brien et al., 2018 & Ha & Kim, 2014)

1.1.1. Η κανονική οδός της βιογένεσης των miRNA

Η οδός της κανονικής βιογένεσης είναι η κυρίαρχη οδός με την οποία επεξεργάζονται τα miRNA. Σε αυτή τη διαδρομή, τα pri-miRNA μεταγράφονται από τα γονίδια τους και στη συνέχεια μεταποιούνται σε pre-miRNA από το σύμπλοκο μικροεπεξεργαστών, που αποτελείται από μία πρωτεΐνη σύνδεσης RNA την DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) και ένα ένζυμο, την ριβονουκλεάση III, την Drosha. Το DGCR8 αναγνωρίζει ένα N6-μεθυλαδενολυωμένο τμήμα με αλληλουχία GGAC και άλλα μοτίβα εντός του pri-miRNA, ενώ η Drosha διασπά το διπλό pri-miRNA στη βάση της χαρακτηριστικής δομής φουρκέτας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας προέκτασης 2 nt 3' επί του pre-miRNA. Μόλις δημιουργηθούν τα pre-miRNA, εξάγονται στο κυτταρόπλασμα με ένα σύμπλεγμα Exportin5 (XPO5) / RanGTP και στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία με την RNA ενδονουκλεάση III που ονομάζεται DICER. Αυτή η επεξεργασία περιλαμβάνει την αφαίρεση του τερματικού βρόχου, με αποτέλεσμα ένα ώριμο διπλό miRNA. Η κατεύθυνση του κλώνου miRNA καθορίζει το όνομα της ώριμης μορφής miRNA. Ο 5p κλώνος προκύπτει από το 5' άκρο της φουρκέτας του pre-miRNA ενώ ο 3p κλώνος προέρχεται από το 3' άκρο. Και οι δύο κλώνοι που προέρχονται από το ώριμο διπλό miRNA μπορούν να φορτωθούν στην οικογένεια πρωτεϊνών Argonaute (AGO) (AGO1-4 σε ανθρώπους) κατά τρόπο εξαρτώμενο από το ATP. Για οποιοδήποτε miRNA, η αναλογία του 5p ή 3p κλώνου που ενώνεται με AGO ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή το κυτταρικό περιβάλλον, που κυμαίνεται από σχεδόν ίσες αναλογίες έως κατά κύριο λόγο το ένα ή το άλλο. Η επιλογή του κλώνου 5p ή 3p βασίζεται εν μέρει επί της θερμοδυναμικής σταθερότητας στα 5' άκρα του διπλού miRNA ή ενός 5' U στη νουκλεοτιδική θέση 1. Γενικά, ο κλώνος με τη χαμηλότερη σταθερότητα στο 5' άκρο ή η ουρακίλη του 5' άκρου είναι κατά προτίμηση ενωμένος στην AGO, και θεωρείται το σκέλος του οδηγού. Το ελεύθερο σκέλος ονομάζεται κλώνος επιβατών, το οποίο θα ξετυλιχθεί από το σκέλος του οδηγού μέσω διαφόρων μηχανισμών που βασίζονται στον βαθμό συμπληρωματικότητας. Τα διπλότυπα miRNA με κεντρική αναντιστοιχία ή miRNA που δεν είναι συνδεδεμένα με AGO2 εκτυλίσσονται παθητικά και αποικοδομούνται. (O'Brien et al., 2018 & Ruby et al., 2007)

1.1.2. Η μη κανονική οδός της βιογένεσης των miRNA

Μέχρι σήμερα έχουν διασαφηνιστεί πολλαπλές μη-κανονικές οδοί βιογένεσης miRNA. Αυτές οι οδοί χρησιμοποιούν διαφορετικούς συνδυασμούς των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κανονική οδό, κυρίως τις πρωτεΐνες Drosha, Dicer, Exportin5 και AGO2. Γενικά, η μη-κανονική βιογένεση miRNA μπορεί να ομαδοποιηθεί σε Drosha / DGCR8-ανεξάρτητες οδούς και Dicer-ανεξάρτητες οδούς. Τα pre-miRNA που παράγονται από το ανεξάρτητο από τις Drosha / DGCR8 μονοπάτι μοιάζουν με τα υποστρώματα που χρησιμοποιεί η Dicer. Ένα παράδειγμα τέτοιων pre-miRNA είναι τα mirtrons, τα οποία παράγονται από τα ιντρόνια του mRNA κατά τη διάρκεια του ματίσματος. Ένα άλλο παράδειγμα είναι τα pre-miRNA που έχουν ένα κάλυμμα 7-μεθυλογουανωσίνης (m^7G). Αυτά τα εκκολαπτόμενα RNA εξάγονται απευθείας στο κυτταρόπλασμα μέσω της exportin1 χωρίς την ανάγκη διάσπασης από την Drosha. Υπάρχει μια έντονη παρουσία 3p κλώνου πιθανότατα λόγω του m^7G καλύμματος που εμποδίζει τη φόρτωση του κλώνου 5p στην Argonaute. Από την άλλη πλευρά, ανεξάρτητα από την Dicer, τα miRNA υποβάλλονται σε επεξεργασία από την Drosha από ενδογενή αντίγραφα RNA μορφής φουρκέτας (shRNA). Αυτά τα pre-miRNA απαιτούν την AGO2 να ολοκληρώσει την ωρίμανσή τους μέσα στο κυτταρόπλασμα επειδή δεν έχουν επαρκές μήκος για να είναι υποστρώματα για την Dicer. Αυτό με τη σειρά του προωθεί τη φόρτωση ολόκληρου του pre-miRNA σε AGO2 και AGO2-εξαρτώμενο τεμαχισμό του 3p κλώνου. Η αποκοπή 3'-5' του κλώνου 5p ολοκληρώνει την ωρίμανσή τους. (O' Brien et al., 2018 & Xie et al., 2013)



Εικόνα 1: Βιογένεση MicroRNA και μηχανισμός δράσης. Η κανονική βιογένεση miRNA ξεκινά με τη δημιουργία του μεταγράφου pri-miRNA. Το σύμπλεγμα μικροεπεξεργαστών, το οποίο αποτελείται από το Droscha και το DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8), διασπά το pri-miRNA για να παράγει το πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Το pre-miRNA εξάγεται στο κυτταρόπλασμα με ένα σύστημα που εξαρτάται από το σύμπλεγμα Exportin5/RanGTP και επεξεργάζεται για να παράγει το ώριμο διπλό miRNA. Τέλος, είτε οι 5p ή 3p κλώνοι του ώριμου διπλού miRNA φορτώνονται στην οικογένεια πρωτεϊνών Argonaute (AGO) για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα σίγασης που προκαλείται από miRNA (miRISC). Στις μη κανονικές οδούς, το μικρό RNA φορκέτα (shRNA) διασπάται αρχικά από το σύμπλεγμα μικροεπεξεργαστών και εξάγεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του συμπλέγματος Exportin5/RanGTP. Αυτά επεξεργάζονται περαιτέρω μέσω της διάσπασης που εξαρτάται από την AGO2, αλλά ανεξάρτητα από το Dicer. Τα Mirtrons και το m7G-pre-miRNA που είναι καλυμμένα με 7-μεθυλογουανίνη (m7G) εξαρτώνται από το Dicer για να ολοκληρώσουν την κυτταροπλασματική ωρίμασή τους, αλλά διαφέρουν στο νοκλεοκυτταροπλασματικό κλειδίωμά τους. Τα Mirtrons εξάγονται μέσω του συμπλέγματος Exportin5/RanGTP ενώ το m7G-pre-miRNA εξάγεται μέσω της Exportin1. Όλα τα μονοπάτια τελικά οδηγούν σε ένα λειτουργικό συγκρότημα miRISC. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το miRISC δεσμεύεται στα mRNA-στόχους για να προκαλέσει μεταφραστική αναστολή, πιθανότατα παρεμβαίνοντας με το σύμπλεγμα eIF4F. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες οικογένειας GW182 που συνδέονται με το Argonaute ενεργοποιούν τις πολυ (A) - δεαδενυλάσες PAN2 / 3 και τις CCR4-NOT. Το PAN2/3 ξεκινά την αποαδενυλίωση ενώ το σύμπλεγμα CCR4-NOT ολοκληρώνει τη διαδικασία, οδηγώντας στην απομάκρυνση του καλύμματος m7G στο mRNA-στόχο από το σύμπλεγμα αποκοπής. Το αποσχισθέν mRNA μπορεί στη συνέχεια να υποβληθεί σε αποικοδόμηση 5'-3' μέσω της εξωριβονουκλεάσης XRN1. (Από: O' Brien et al., 2018 & Hayder et al., 2018)

2. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός καρκίνος και επίσης η κύρια αιτία θνησιμότητας λόγω καρκίνου σε γυναίκες σε όλο τον κόσμο. Περίπου 1,38 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού διαγνώστηκαν το 2008 με σχεδόν το 50% όλων των ασθενών με καρκίνο του μαστού και περίπου το 60% των θανάτων να συμβαίνουν στις αναπτυσσόμενες χώρες. Υπάρχει τεράστια διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης του καρκίνου του μαστού παγκοσμίως, με εκτιμώμενη πενταετή επιβίωση 80% στις ανεπτυγμένες χώρες και κάτω από 40% για τις αναπτυσσόμενες χώρες. Οι αναπτυσσόμενες χώρες αντιμετωπίζουν περιορισμούς πόρων και υποδομών κάτι που καθιστά επιτακτική την ανάγκη βελτίωσης της αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού με έγκαιρη αναγνώριση, διάγνωση και διαχείριση. Στις ανεπτυγμένες χώρες, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, διαγνώστηκαν περίπου 232.340 γυναίκες και πέθαναν περίπου 39.620 γυναίκες λόγω του καρκίνου του μαστού το 2013. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε μια αμερικανή γυναίκα είναι 12,38%. Η σημαντική μείωση της θνησιμότητας που οφείλεται στον καρκίνο του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 1975 έως το 2000 αποδίδεται στη συνεχή ενίσχυση τόσο της μαστογραφίας όσο και στην αποτελεσματική διαχείριση.

Στη χώρα μας, τα τελευταία χρόνια, έχει αυξηθεί πάρα πολύ η συχνότητα του καρκίνου του μαστού και τείνουμε να πλησιάσουμε τη συχνότητα που υπάρχει και στην υπόλοιπη Ευρώπη. Υπολογίζεται ότι περίπου μία στις δέκα γυναίκες, κατά τη διάρκεια της ζωής της, θα αναπτύξει ένα καρκίνο στο μαστό της ή σε απόλυτους αριθμούς, έχουμε περίπου 4.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού στην Ελλάδα ετησίως. Ο καρκίνος του μαστού, εξακολουθεί να αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου γυναικών στην ηλικία μεταξύ 45-55 ετών.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization-WHO), η βελτίωση της έκβασης και της επιβίωσης του καρκίνου του μαστού με την έγκαιρη ανίχνευση παραμένει το θεμέλιο των κανονισμών για τον καρκίνο του μαστού. Διατίθενται διάφορα σύγχρονα φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού με αντιοιστρογόνα όπως η ραλοξιφαίνη ή η ταμοξιφένη μπορεί να χορηγηθεί σε άτομα που έχουν αυξημένη πιθανότητα να τον αναπτύξουν. Η αμφοτερόπλευρη μαστεκτομή είναι ένα πρόσθετο

προληπτικό μέτρο σε γυναίκες με αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου. Σε ασθενείς που έχουν ταυτοποιηθεί με όγκο μαστού, χρησιμοποιούνται διαφορετικές στρατηγικές διαχείρισης όπως στοχευμένη θεραπεία, ορμονική θεραπεία, ακτινοθεραπεία, χειρουργική επέμβαση και χημειοθεραπεία.

Οι δυσάρεστες παρενέργειες της θεραπείας του καρκίνου του μαστού αποτελούν τον πιο βασικό παράγοντα για την εξεύρεση εναλλακτικών μεθόδων. Η χρήση βοτάνων για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού θεωρείται φυσική εναλλακτική λύση, επειδή ορισμένα φυτά μπορεί να περιέχουν ιδιότητες που φυσικά έχουν την ικανότητα να θεραπεύουν τον καρκίνο του μαστού.

2.1. Επιδημιολογία

Επί του παρόντος, μια στις δώδεκα γυναίκες στη Βρετανία ηλικίας μεταξύ 1 και 85 ετών εμφανίζει καρκίνο του μαστού. Με ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις καρκίνου που αναφέρθηκαν στον κόσμο, ο καρκίνος του μαστού είναι κοινός στις γυναίκες και περιλαμβάνει το 18% όλων των περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού προβλέπεται να αυξηθεί σε 85 ανά 100.000 γυναίκες έως το 2021. Το 2012, διαγνώστηκαν 1,67 εκατομμύρια νέα κρούσματα καρκίνου του μαστού που αποτελούν το 25% όλων των μορφών καρκίνου μεταξύ των γυναικών. Οι Ferlay et al. δήλωσαν ότι 883.000 περιπτώσεις βρίσκονται σε λιγότερο αναπτυγμένες χώρες και 794.000 στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες. Σύμφωνα με τα στοιχεία, 145,2 γυναίκες στο Βέλγιο και 66,3 στην Πολωνία μεταξύ 100.000 υποφέρουν από καρκίνο του μαστού. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι μία στις οκτώ γυναίκες και στην Ασία μία γυναίκα πάσχει από καρκίνο του μαστού από τις 35. Στο Ιράν υπάρχουν 10 περιπτώσεις στις 100.000 και έχουν αναφερθεί 7000 νέες περιπτώσεις ετησίως. Η επικράτηση του καρκίνου του μαστού αυξάνεται στο Πακιστάν. Ο καρκίνος του μαστού βρίσκεται κυρίως σε ιδιαίτερα πυκνοκατοικημένες περιοχές των αναπτυσσόμενων χωρών της Νότιας Ασίας. Ο καρκίνος του μαστού σε άνδρες έχει εντοπιστεί στις βόρειες περιοχές του Πακιστάν. Οι Yang et al. δήλωσαν ότι οι νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού στην Κίνα ήταν 168.013 το 2005 και 121.269 το

2000. (Akram, 2017, Ferlay et al., 2015, Haghghat et al., 2012, Jamal et al., 2006 & Yang et al., 2005)

2.2. Ανατομία του μαστού

Τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά άτομα έχουν μαστούς. Ο μαστός αποτελείται από λίπος που ονομάζεται λιπώδης ιστός. Ο μαστός της γυναίκας εκτείνεται από τη 2^η ως την 6^η πλευρά και από το στήθος μέχρι την πρόσθια μασχαλιαία γραμμή στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα, σχηματίζοντας την ουρά του Spencer προς το άνω έξω τμήμα του ως μια πυραμοειδής προσεκβολή. Υπό τον αδένα υπάρχει μια λεπτή περιτονία η οποία καλύπτει τον μείζονα θωρακικό μυ και τον πρόσθιο οδοντωτό κατά ένα τμήμα του. Η θηλή και η θηλαία άλω βρίσκονται επί της γαλακτικής γραμμής. Στην επιφάνεια της άλω παρατηρούνται μικρά επάρματα τα οποία αποτελούν τους πόρους μικρών σμηγματογόνων αδένων, των αδένων του Montgomery.

Ο μαστός αποτελείται από το δέρμα, υποδόριο ιστό και μαζικό αδέν. Αυτός με την σειρά του περιλαμβάνει το στρώμα και το παρέγχυμα το οποίο διαιρείται σε 15-20 μεγάλα λόβια. Αυτά καταλήγουν σε μεγάλους εκφορητικούς πόρους, που συγκεντρώνονται σε ισάριθμες γαλακτοφόρους δεξαμενές στον οπισθοθηλαίο χώρο. Οι 5-10 συλλεκτικοί πόροι καταλήγουν στη θηλή. Η μικροσκοπική ανατομική-λειτουργική μονάδα του μαστού περιγράφηκε από τον Welling ως τελική πορολοβιακή μονάδα (TDLU-Terminal Duct Lobular Unit).

Αυτή η μονάδα αποτελείται από το λοβίδιο με τους ενδολοβιακούς γαλακτοφόρους πόρους και τους τελικούς πόρους. Μικροσκοπικά οι πόροι και τα λοβίδια επενδύονται από:

1. μια βασική στιβάδα κυβοειδών κυττάρων
2. μια επιπολής στιβάδα πεπλατυσμένων κυττάρων. Υπό την επιρροή των οιστρογόνων οι στιβάδες υπερπλάσσονται και ωριμάζουν σε πολύστιβο επιθήλιο.
3. ένας τρίτος τύπος κυττάρων είναι τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα τοποθετημένα κυκλοτερώς στα λόβια και στους μικρούς γαλακτοφόρους εκφορητικούς

πόρους κάτω από την βασική μεμβράνη του επιθηλίου τους. Τα μυοεπιθηλιακά αυτά κύτταρα δεν έχουν δική τους νευρώση αλλά ερεθίζονται με τα στεροειδή, προλακτίνη και ωκυτοκίνη, και έτσι προωθείται το γάλα στους αυλούς.

Ολόκληρος ο μαζικός αδένας είναι ενωματομένος σε δύο περιτονίες – την επιπολής και την εν τω βάθει θωρακική- που καταλήγει στην περιτονία του μείζονος θωρακικού και πρόσθιου οδοντωτού μυός. Οι δύο αυτές περιτονίες ενώνονται με το συνδετικό ενδομαζικό ιστό, ίνες του Cooper κρεμαστήρος συνδέσμου, που θεωρείται και η φυσική στήριξη του μαστού.

Ο μαστός αιματώνεται από την έσω μαστική (θωρακική) αρτηρία και από κλάδους της μασχαλιαίας αρτηρίας: ακρωμιοθωρακική, πλάγια θωρακική και υποπλάτια αρτηρία. Διατιτραίνοντες κλάδοι προς τον μαστό προέρχονται και από τις μεσοπλευρίες αρτηρίες. Η φλεβική παροχέτευση γίνεται μέσω των αντίστοιχων μεσοπλευρίων, έσω μαστικών και μασχαλιαίων φλεβών.

Η λεμφική παροχέτευση του μαστού έχει μεγάλη κλινική σημασία ως προς τις μεταστάσεις του μαστού. Μικρά λεμφικά πλέγματα μέσα στο μαζικό παρέγχυμα και στην υποθηλαία περιοχή συνεχίζουν την παροχέτευση προς τους λεμφαδένες, κυρίως, της μασχάλης. Μια λεμφική οδός καταλήγει και προς τον αντίθετο μαστό καθώς και προς τη θήκη του ορθού κοιλιακού μυός. Τέλος, μέρος του έσω τμήματος του μαστού αποχετεύεται λεμφικά προς τους έσω θωρακικούς και μεσοθωράκιους λεμφαδένες.

Οι μύες της περιοχής του μαστού είναι:

1. ο μείζων θωρακικός μυς
2. ο ελάσσων θωρακικός
3. ο πρόσθιος οδοντωτός και
4. ο πλατύς ραχιαίος μυς.

Νευρώνονται αντίστοιχα από το μέσο θωρακικό νεύρο του βραχιονίου πλέγματος (A8, Θ1), από το μακρύ θωρακικό νεύρο του Bell (A5, A6, A7 ρίζες του βραχιονίου πλέγματος) και το θωρακοραχιαίο νεύρο του βραχιονίου πλέγματος (A6, A7, A8).

Η νεύρωση του μαστού είναι ιδιαίτερα πλούσια στο σύμπλεγμα θηλής-άλω από σωματικές αισθητικές απολήξεις, ενώ το παρέγχυμα ελέγχεται κυρίως από το συμπαθητικό αυτόνομο σύστημα. Τα νεύρα του μαστού προέρχονται από τους έξω μαστικούς κλάδους των μεσοπλευρίων νεύρων ($2^{ου}$ - $6^{ου}$), και τους έσω μαστικούς κλάδους μεσοπλευρίων νεύρων ($2^{ου}$ - $4^{ου}$), ενώ στο δέρμα, την άλω και τη θηλή καταλήγουν τα συμπαθητικά δίκτυα. (Akram, 2017, Κρεατσάς, 2009 & Αντσακλής, 2011)

2.3. Φυσιολογία – Ανάπτυξη του μαζικού αδένου – Ορμονικό μωσαϊκό

Η ανάπτυξη και η διαμόρφωση του μαζικού αδένου βρίσκεται κάτω από την επίδραση πολλών ορμονών, με κυρίαρχο τον ρόλο της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Πέραν όμως αυτών, συμμετοχή στην ανάπτυξη του μαστού έχουν η προλακτίνη, τα ανδρογόνα καθώς και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι επάγονται από τα ωοθηκικά στεροειδή καθώς και τα μόρια ορισμένων κυτταροκινών. Οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων ορμονικών και μη παραμέτρων δημιουργούν τελικά ένα πολύπλοκο υπόστρωμα που καθορίζει τη διαμόρφωση της αρχιτεκτονικής και της βιολογικής συμπεριφοράς του μαζικού αδένου.

Στο νεογνό, ο μαζικός αδένου αποτελείται από τις καταβολές των εκφορητικών πόρων οι οποίοι είναι μικρής ανάπτυξης χωρίς διακλαδώσεις. Κατά την εφηβεία οι πόροι επιμηκύνονται, διακλαδώνονται και αρχίζει να διαμορφώνεται η αδενοκυψελιδική μονάδα και το περιβάλλον στρώμα. Οι μεταβολές αυτές οφείλονται κυρίως στην επίδραση των οιστρογόνων και της αυξητικής ορμόνης. Περαιτέρω ωρίμανση του μαστού με συνεχιζόμενη διαμόρφωση των πορολοβιακών μονάδων σε λοβίδια $1^{ης}$ και $2^{ης}$ τάξης, παρατηρείται κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων χρόνων μετά την εμμηναρχή και οφείλεται στην επίδραση της προγεστερόνης. Η πλήρης ανάπτυξη του μαζικού αδένου διαρκεί πολλά χρόνια, εάν όμως δεν επισυμβεί εγκυμοσύνη, ορισμένα στάδια της πλήρους διαμόρφωσης του αδένου δεν ολοκληρώνονται. Οι σημαντικές διαφορές από άτομο σε άτομο στην ανάπτυξη του μαστού δεν επιτρέπουν την κατηγοριοποίηση των ιστολογικών αλλαγών με βάση την ηλικία. Έτσι, η ανάπτυξη του μαστού προϋπόθεση της ηλικίας περιγράφεται με μια σειρά εξωτερικών μόνο μορφολογικών αλλαγών, πέντε σταδίων κατά Tanner.

Η οιστραδιόλη είναι ο προαπαιτούμενος παράγοντας για την ανάπτυξη του μαζικού αδένου στην εφηβεία. Προάγει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών και των εκφορητικών πόρων. Η δράση των οιστρογόνων ασκείται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του στρώματος, τα οποία εμπλέκονται καθοριστικά στη λειτουργία του αδένου.

Κύρια πηγή προέλευσης των οιστρογόνων για τον μαστό είναι η ωοθήκη κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Άλλη πηγή οιστρογόνων (οιστρόνη) αποτελεί ο περιφερικός μεταβολισμός των ανδρογόνων (Δ4 ανδροστενδιόνη, τεστοστερόνη, DHEA/-S), μέσω της αρωματάσης. Άφθονα είναι επίσης και τα ενδομαστικά παραγόμενα οιστρογονικά μόρια από την εντός του αδένου αρωματοποίηση των ανδρογόνων της περιφέρειας, λόγω της τεράστιας ενζυμικής υποδομής του μαστού. Οι δύο τελευταίες αναφερθείσες πηγές είναι οι κυριότερες στη μετεμμηνοπαυσιακή γυναίκα. Οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων ενδομαστικά είναι 20πλάσιες αυτών του περιφερικού αίματος. Η ενδομαζική οδός μεταβολισμού των ανδρογόνων και οιστρογόνων προς το δραστικότερο μόριο της 17β-οιστραδιόλης αποτελεί τις τελευταίες δεκαετίες τον στόχο θεραπευτικών μεθόδων καρκίνου του μαστού είτε με ταμοξιφαίνη είτε με αναστολείς της αρωματάσης.

Τα οιστρογόνα ασκούν τη δράση τους είτε άμεσα, διαμέσου των οιστρογονικών υποδοχέων ERα και ERβ επάγοντας την έκφραση πολλαπλασιαστικών ογκογονιδίων του κυτταρικού κύκλου όπως το ki67, είτε έμμεσα, με την αύξηση της έκφρασης διαφόρων αυξητικών παραγόντων όπως των IGF-1, EGF και των υποδοχέων τους.

Η αναγνώριση δύο υποτύπων οιστρογονικών υποδοχέων ERα και ERβ καταδεικνύει έναν πολύπλοκο μηχανισμό δράσης των οιστρογόνων στον μαστό. Η έκφραση τους ποικίλλει στις διαφορετικές φάσεις της ζωής της γυναίκας όπως η κύηση-γαλουχία και η εμμηνόπαυση.

Τα οιστρογόνα επάγουν στον μαζικό αδένου την έκφραση των υποδοχέων τους και των υποδοχέων άλλων ορμονών όπως της προγεστερόνης, της προλακτίνης καθώς και αυξητικούς παράγοντες και αντιγόνα πολλαπλασιασμού. Οι δράσεις αυτές

είναι εκείνες που καθιστούν τα οιστρογόνα προαπαιτούμενη παράμετρο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού.

Ο ρόλος της προγεστερόνης στον μαστό μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισε να γίνεται κατανοητός. Η δράση της εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα και στους ινοβλάστες του στρώματος και είναι πολλαπλασιαστική και συνεργική με τα οιστρογόνα, αντίθετα δηλαδή με το ό,τι συμβαίνει στη μήτρα. Η έλλειψη προγεστερόνης έχει ως αποτέλεσμα μείωση των διακλαδώσεων των εκφορητικών πόρων και ελλιπή ανάπτυξη της αδενοκυψελιδικής μονάδας, γεγονός που δείχνει τον σημαντικό ρόλο της προγεστερόνης στην ανάπτυξη του μαζικού αδένα.

Οι μεταβολές του μαζικού αδένα κατά τη διάρκεια του αναπαραγωγικού κύκλου της γυναίκας οφείλονται στις κυκλικές μεταβολές των επιπέδων των ωοθηκικών στεροειδών ή στη χορήγηση ορμονικής αγωγής (αντισυλληπτικά, ορμονική υποκατάσταση). Η δράση της οιστραδιόλης στο επιθήλιο των αδενοκυψελών και των εκφορητικών πόρων στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης επαυξάνεται πολύ περισσότερο κατά την ωχρινική φάση με τη δράση της προγεστερόνης. Η συνεργική δράση των δύο ορμονών αυξάνει την επιφάνεια του επιθηλίου με αποτέλεσμα την προεμμηνορρυσιακή διόγκωση των μαστών.

Μία άλλη ορμόνη, υποφυσιακή αυτή τη φορά, φαίνεται να είναι απαραίτητη στη διαμόρφωση και ωρίμανση του μαζικού αδένα. Η δράση της προλακτίνης στον μαστό δεν περιορίζεται μόνο στην παραγωγή γάλακτος από τα επιθηλιακά κύτταρα. Συμμετέχει ουσιαστικά στην ανάπτυξη των αδενοκυψελών, των λοβιδιακών μονάδων και των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού. Γενικά θεωρείται ένας αυξητικός, πολλαπλασιαστικός και διαφοροποιητικός παράγοντας του μαστού και ένας δυναμικός τροποποιητής της συμπεριφοράς του μαζικού αδένα, παρότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης της δεν είναι γνωστός.

Ενώ ο ρόλος των οιστρογόνων στην ανάπτυξη του μαστού και στη νεοπλασία είναι καλά καθορισμένος, ο ρόλος των ανδρογόνων παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστος. Ο υποδοχέας των ανδρογόνων εκφράζεται στο μαζικό επιθήλιο και τα ανδρογόνα είναι παρόντα στην κυκλοφορία και τους ιστούς της γυναίκας. Η ωοθήκη παράγει, για παράδειγμα, μεγαλύτερες ποσότητες ανδρογόνων απ' ότι

οιστρογόνων. Επίσης, ο μαστός διαθέτει όλα εκείνα τα ορμονικά μονοπάτια για τη σύνθεση τόσο οιστραδιόλης όσο και τεστοστερόνης. Η μέχρι σήμερα κλινική εμπειρία μαρτυρά πως, φυσιολογικά, τα οιστρογόνα διεγείρουν και τα ανδρογόνα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και την ανάπτυξη του μαζικού αδένου ανεξάρτητα από το γενετικό φύλο. Μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της αναλογίας οιστρογόνων - ανδρογόνων που θα έχει προγνωστική αξία για τη διέγερση ή την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στον μαστό.

Πρακτικά, όλη η βιολογία του μαστού βρίσκεται κάτω από ορμονικό έλεγχο. Το ορμονικό υπόστρωμα του μαστού είναι εξαιρετικά πολύπλοκο. Ο μαζικός αδένου αποτελεί ιστό-στόχο ορμονών και αυξητικών παραγόντων, διαθέτει ικανότητα μεταβολισμού στεροειδικών ορμονών και τα παρακρινικά του κυκλώματα είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένα. Διαμορφώνεται έτσι ένα πολύπλοκο ρυθμιστικό λειτουργικό δίκτυο.

2.4. Τύποι καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού, όπως και κάθε νεόπλασμα, διαγιγνώσκεται και ταξινομείται βάσει των ιστολογικών του χαρακτηριστικών. Η ταξινόμηση (ιστολογική κατάταξη) του διηθητικού αδενοκαρκινώματος του μαστού σε διαφορετικούς τύπους δεν έχει περιγραφική μόνο αξία, αλλά προσδιορίζει την πρόγνωση και συμβάλλει στην κατανόηση του καρκίνου του μαστού.

2.4.1. Μη διηθητικός καρκίνος του μαστού

Εξ ορισμού στους όγκους αυτούς τα νεοπλασματικά κύτταρα βρίσκονται μέσα στον μαζικό αδένου, χωρίς να διηθούν τη βασική μεμβράνη που βρίσκεται κάτω από το επιθήλιο. Ως εκ τούτου οι όγκοι αυτοί δεν έχουν μεταστατικές ικανότητες, αφού είναι γνωστό ότι λεμφαγγεία και αγγεία, οι δρόμοι δηλαδή της μετάστασης, βρίσκονται στο υπόστρωμα, κάτω δηλαδή από τη βασική μεμβράνη. Πριν από την εποχή της ευρείας χρήσης της μαστογραφίας για την ανίχνευση υποκλινικών όγκων, οι όγκοι αυτοί ήταν σπάνιοι και ανευρίσκονταν είτε ως ψηλαφητά μορφώματα είτε ως

τυχαία ευρήματα στις βιοψίες για διάφορες καλοήθεις παθήσεις. Με την εισαγωγή της μαστογραφίας και τη διάδοση της χρήσης της ως μέσο ανίχνευσης υποκλινικών όγκων, τα καρκινώματα *in situ* αποτελούν σημαντικό ποσοστό (17% για τις Η.Π.Α.) του συνόλου των νέων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού.

Όπως και οι διηθητικοί όγκοι έτσι και οι μη διηθητικοί διακρίνονται σε καρκινώματα *in situ* των πόρων και των λοβίων με σημαντικές διαφορές τόσο ως προς την κλινική παρουσίαση όσο και ως προς την βιολογική συμπεριφορά. (Δαλαΐνας Β.Η., 2001)

2.4.1.1. Το μη διηθητικό καρκίνωμα των πόρων (πορογενές καρκίνωμα *in situ*)

Το καρκίνωμα αυτό πολύ σπάνια ανιχνεύεται ως ψηλαφητό μόρφωμα. Αντίθετα, το σύνολο σχεδόν των περιπτώσεων ανιχνεύεται με τη μαστογραφία που γίνεται σε γυναίκες χωρίς ψηλαφητό μόρφωμα ως εξέταση ρουτίνας, όπου οι συρρέουσες μικροεπασβεστώσεις αποτελούν το χαρακτηριστικό εύρημα. Τέτοιες συρρέουσες μικροεπασβεστώσεις παρατηρούνται και στο διηθητικό καρκίνωμα των πόρων. 5% από το σύνολο των καρκινωμάτων του μαστού στον άνδρα είναι καρκινώματα μη διηθητικά και σχεδόν πάντα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη αιμορραγικού εκκρίματος από τη θηλή. Οι παράγοντες αυξημένου κινδύνου και οι κανόνες που αφορούν την επιδημιολογία του διηθητικού καρκίνου των πόρων του μαστού αφορούν και το μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα.

Ο όγκος, όταν υπάρχει, έχει τους ίδιους χαρακτήρες με το διηθητικό καρκίνωμα, (υπόσκληρο ψηλαφητό μόρφωμα με ασαφή όρια και χωρίς ευαισθησία). Κατά τη διατομή, μετά την αφαίρεση, μπορεί να προβάλλουν από την επιφάνεια νεκρωμένες ομάδες κυττάρων. Η διατομή από την περιοχή με τις μικροεπασβεστώσεις δίνει μια αίσθηση γρατσουνίσματος. Το παθολογικό εύρημα για το μη διηθητικό καρκίνωμα στο μικροσκόπιο είναι η ανεύρεση νεοπλασματικών κυττάρων μέσα στα όρια του επιθηλίου και όχι στο υπόστρωμα. Διάφοροι τύποι αναγνωρίζονται από τους παθολογοανατόμους, όπως το θηλώδες, το κομίντο και το ηθμοειδές.

Η πρόγνωση για όλους τους τύπους του μη διηθητικού καρκίνου των πόρων του μαστού είναι πολύ καλή. Μεταστάσεις στους λεμφαδένες παρατηρούνται σε ποσοστό που κυμαίνεται από το 1-2%, που προφανώς εξηγούνται από το ότι μικροδιάθεση του υποστρώματος δεν αναγνωρίζεται ή ξεφεύγει από τους παθολογοανατόμους.

Σε περίπτωση μικροσκοπικής εστίας μη διηθητικού καρκίνου των πόρων που έχει αφαιρεθεί με περιορισμένη εκτομή, η πιθανότητα να εμφανιστεί διηθητικό καρκίνωμα αργότερα, είναι υπαρκτή και απαντά σε ποσοστό 50%. Όταν εμφανιστεί το διηθητικό καρκίνωμα, είναι πάντοτε καρκίνωμα των πόρων, εμφανίζεται στο ίδιο τεταρτημόριο του μαστού, όπως το μη διηθητικό, και ο χρόνος που μεσολαβεί κατά κανόνα ξεπερνά τα 5 χρόνια.

Η θεραπεία του μη διηθητικού καρκίνου των πόρων είναι και παραμένει για πολλές περιπτώσεις η απλή μαστεκτομή. Η αποκτηθείσα εμπειρία ωστόσο, έχει μετατοπίσει τη χειρουργική προσέγγιση σε συντηρητικές επεμβάσεις, όπως η απλή εκτομή του όγκου με ή χωρίς ακτινοθεραπεία. (Δαλαϊνας Β.Η., 2001)

2.4.2.2. Το μη διηθητικό καρκίνωμα των λοβίων (λοβιακό καρκίνωμα in situ)

Αποτελεί το 1/3 του συνόλου των μη διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού και με τις σημερινές αντιλήψεις θεωρείται ως παράγοντας αυξημένου κινδύνου εμφάνισης διηθητικού καρκίνου των πόρων και των λοβίων, παρά ως πρόδρομη κατάσταση που εξελίσσεται σε διηθητικό καρκίνωμα των λοβίων.

Το λοβιακό καρκίνωμα in situ είναι πάντοτε ένα τυχαίο εύρημα σε μια βιοψία που γίνεται για καλοήγη πάθηση του μαστού. Δεν υπάρχει ποτέ ψηλαφητό μόρφωμα, και σχεδόν ποτέ δεν υπάρχουν ευρήματα στην μαστογραφία.

Ο όγκος δεν αναγνωρίζεται ως ογκόμορφη μάζα μακροσκοπικά. Στο μικροσκόπιο υπάρχουν νεοπλασματικά κύτταρα μέσα στα διατεταμένα λόβια και τους τελικούς πόρους. Τα κύτταρα είναι μεγάλα με πολύ περιορισμένη συνοχή και έχουν μικρούς πυρήνες με σπάνιες μιτώσεις. Παρατηρείται συχνά πολυμορφία, και

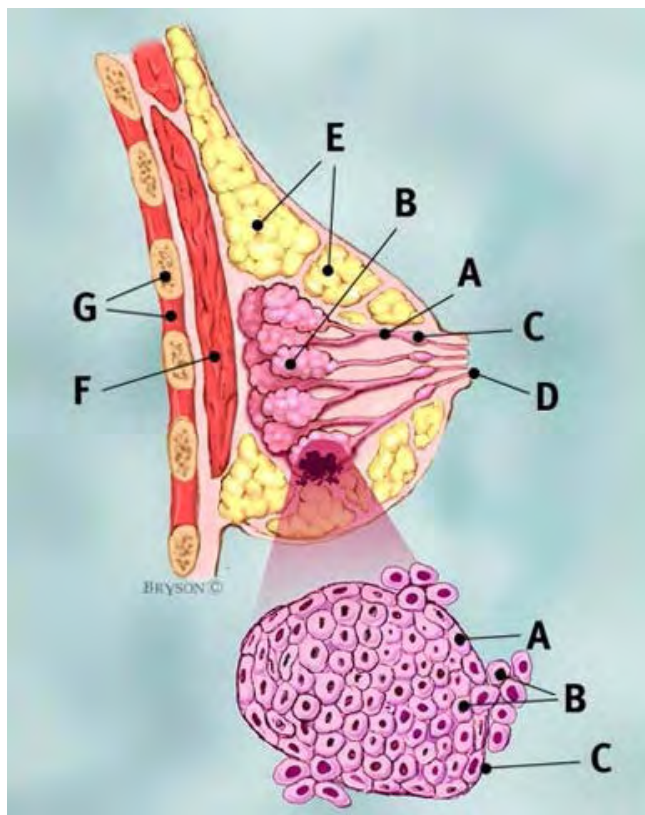
περιστασιακά παρατηρούνται αναπλαστικές μορφές. Το λοβιακό καρκίνωμα *in situ* πρέπει να διαφοροδιαγνωστεί από την άτυπη υπερπλασία των λοβίων. Η διάκριση αυτή μπορεί να είναι μερικές φορές δύσκολη, και κατά κανόνα στηρίζεται στον βαθμό ατυπίας και το ποσοστό των λοβίων που εμφανίζει την κακοήθη εξαλλαγή (ποσοστό 75% ή μεγαλύτερο είναι αποδεικτικό του καρκινώματος *in situ*). Η άτυπη υπερπλασία των λοβίων θεωρείται και είναι παράγοντας που αυξάνει σημαντικά την εμφάνιση διηθητικού καρκινώματος, επομένως μαζί με το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα θεωρούνται δύο διαφορετικές εκφράσεις της ίδιας κατάστασης. (Δαλαϊνας Β.Η., 2001)

2.4.2. Επιθετικός καρκίνος του μαστού

Υπάρχει όταν τα ανώμαλα κύτταρα από τους λοβούς ή τους αγωγούς γάλακτος βρίσκονται σε στενή γειτνίαση με ιστό του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να περάσουν από τον μαστό σε διαφορετικά μέρη του σώματος μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος ή της συστηματικής κυκλοφορίας. Μπορούν να κινηθούν νωρίς στην ανάπτυξη όταν ο όγκος είναι μικρός ή αργότερα όταν ο όγκος είναι τεράστιος. Ο διηθητικός καρκίνος του μαστού είναι ο συνηθέστερος καρκίνος στις γυναίκες. Οι περιοχές με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης είναι πληθυσμοί της Αυστραλίας και της Ευρώπης όπου το 6% των γυναικών εμφανίζει διηθητικό καρκίνο του μαστού πριν από την ηλικία των 75 ετών. Ο επιπολασμός του καρκίνου του μαστού αυξάνει με την αύξηση της ηλικίας. Ο επιθετικός καρκίνος του μαστού που εκτείνεται σε διάφορα όργανα του σώματος αναγνωρίζεται επίσης ως μεταστατικός καρκίνος του μαστού. Τα πιο συνηθισμένα όργανα στο οποία δίνει μεταστάσεις είναι ο εγκέφαλος, τα οστά, οι πνεύμονες και το ήπαρ. Εκεί τα καρκινικά κύτταρα διαχωρίζονται για άλλη μια φορά και αναπτύσσονται ακανόνιστα και παράγουν νέα κύτταρα. Τα νέα κύτταρα που σχηματίζονται αναπτύσσονται σε διαφορετικά μέρη του σώματος, αλλά εξακολουθούν να είναι κύτταρα του καρκίνου του μαστού. (Κρεατσάς, 2009)

2.4.3. Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Infiltrating Lobular Carcinoma-ILC)

Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα χαρακτηρίζεται επίσης ως διηθητικό καρκίνωμα των λοβίων. Ο όγκος αυτός είναι λιγότερο συνήθης από το διηθητικό καρκίνωμα των πόρων και αντιπροσωπεύει το 10-20% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστού. Υπάρχουν εντελώς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που αξίζει να αναφερθούν. Ποτέ δεν χαρακτηρίζεται από μικροεπασβεστώσεις, και έτσι αυτό το σημαντικό ακτινολογικό εύρημα δεν παρατηρείται στον όγκο αυτόν. Έχει την τάση να είναι διηθητικό σε ικανή απόσταση από τα μακροσκοπικά όρια του όγκου, γνώση σημαντική για τον χειρουργό, και ιδιότητα στην οποία οφείλεται η μεγαλύτερη συχνότητα υποτροπής μετά από μαστεκτομή. Η μαστογραφική ανίχνευση αυτών των όγκων, λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τον κάνει δυσδιάγνωστο ακτινολογικά. Σε ποσοστό που κυμαίνεται από 3-5% ο όγκος είναι αμφοτερόπλευρος κατά τη χρονική στιγμή της διάγνωσης, ενώ σε μεταγενέστερο χρόνο εμφανίζεται όγκος στον άλλο μαστό, σε ποσοστό που προσεγγίζει το 30%. Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα προέρχεται από τους αδένες γάλακτος (λοβούς) του μαστού, αλλά εκτείνεται συχνά και σε άλλες περιοχές του σώματος. (Δαλαϊνας Β.Η., 2001)



Εικόνα 2: Κανονικός μαστός με διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (ILC) σε μεγενθυμένη διατομή του λοβού. Προφίλ στήθους: A. Αγωγοί, B. Λοβίδια, C Διευρυσμένο τμήμα του αγωγού για τη συγκράτηση του γάλακτος, D. Θηλή,

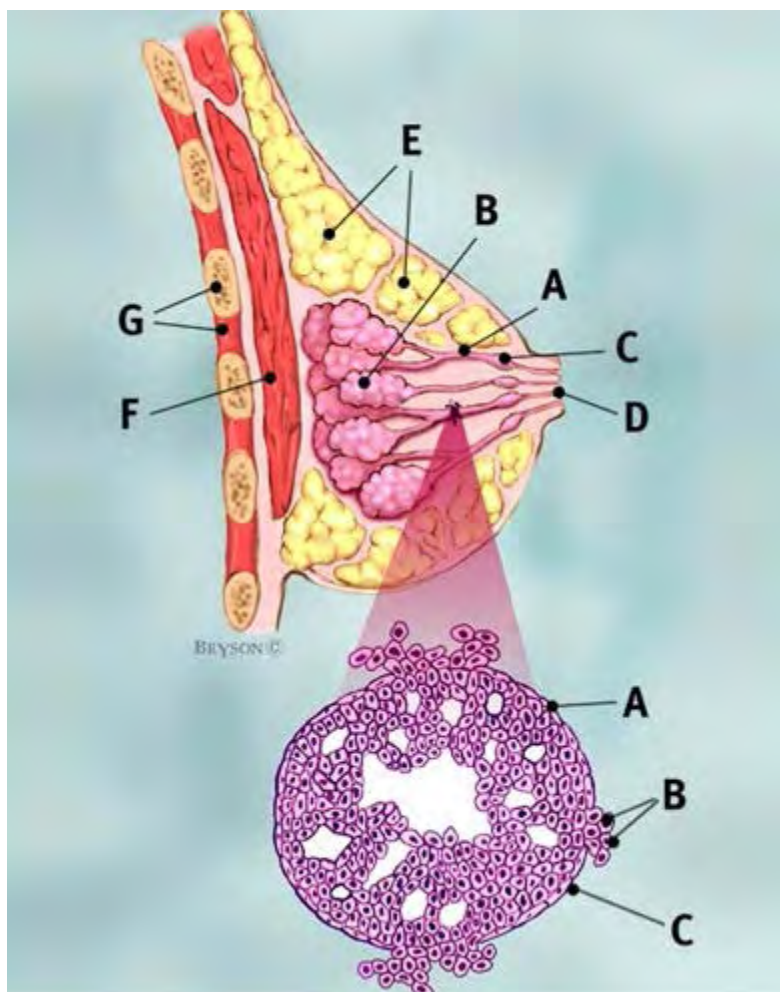
Ε. Λίπος, F. Μείζον θωρακικός μυς, G. Θωρακικό τοίχωμα. Μεγέθυνση: Α. Ένα κανονικό κύτταρο, Β. Καρκινικά κύτταρα που διαπερνούν το τοίχωμα του λοβού, C. Τοίχωμα του λοβού (Πηγή: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/ilc/tests/diagnosing>, πρόσβαση στις 22/8/2019)

2.4.4. Διηθητικό καρκίνωμα των πόρων (Infiltrating Ductal Carcinoma-IDC)

Αποτελεί το 70-80% του συνόλου των καρκινωμάτων στον μαστό. Η επιφάνεια του όγκου σε διατομή συνήθως έχει χρώμα γκριζόλευκο με ανώμαλη ακτινωτή παρυφή. Ο όγκος είναι σκληρός στη διατομή με το νυστέρι και δίνει την αίσθηση του γρατσουνίσματος. Μικρές επασβεστώσεις μπορεί να διαφαίνονται στη μακροσκοπική θεώρηση του όγκου σε διατομή.

Μολονότι δεν υπάρχουν ειδικοί μικροσκοπικοί χαρακτήρες, ο όγκος εύκολα αναγνωρίζεται από τους παθολογοανατόμους από τους αδενικούς σχηματισμούς που εμφανίζονται στο μικροσκόπιο με την ύπαρξη νεοπλασματικών κυττάρων στο στρώμα που συχνά είναι πλούσιο σε ινώδη στοιχεία, γνώρισμα από το οποίο προέρχεται η ονομασία «σκίρρος καρκίνος». Συχνά το διηθητικό καρκίνωμα των πόρων συνυπάρχει με καρκίνωμα μη διηθητικό (in situ). Το εύρημα αυτό δεν επηρεάζει την πρόγνωση, αλλά μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την απόφαση για εκτέλεση συντηρητικής εγχείρησης.

Το IDC προέρχεται από τους πόρους γάλακτος του μαστού και εκτείνεται στο τοίχωμα του αγωγού, εισβάλλοντας στο λιπώδη ιστό του μαστού και πιθανώς σε άλλα μέρη του σώματος. Διήθηση νεύρων, αγγείων και λεμφαγγείων μπορεί να επισημανθούν από τον παθολογοανατόμο. Αποτελούν δυσμενή προγνωστικά ευρήματα. Διάφοροι τύποι του διηθητικού καρκινώματος των πόρων έχουν περιγραφεί (μυελοειδές, σωληνώδες, βλεννώδες ή κολλοειδές και εκκριτικό). Υπάρχουν κριτήρια για τον χαρακτηρισμό ενός εκάστου, τα οποία πρέπει να υπάρχουν σε ολόκληρη την έκταση του όγκου. Συνήθως αυτοί οι τύποι χαρακτηρίζονται από καλοηθέστερη βιολογική συμπεριφορά και καλύτερη πρόγνωση.



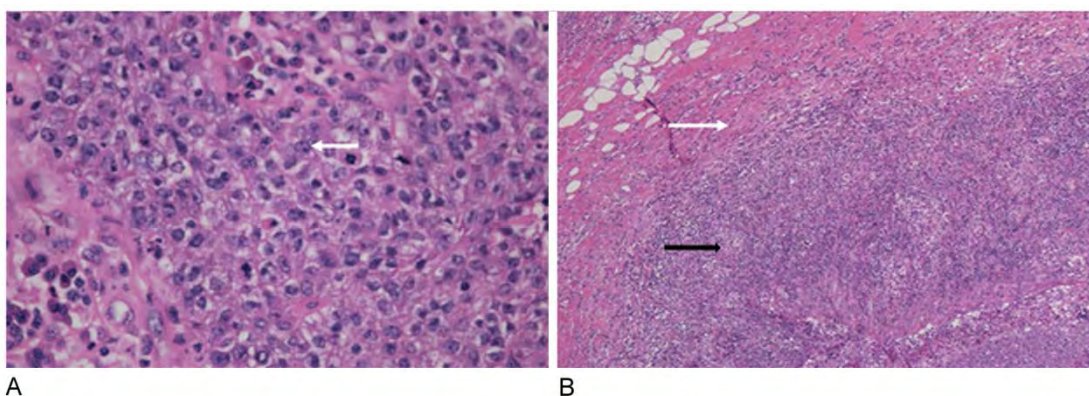
Εικόνα 3: Κανονικός μαστός με διηθητικό καρκίνωμα πόρων (ILC) σε μεγενθυμένη διατομή του πόρου. Προφίλ στήθους: Α. Πόροι, Β. Λοβίδια, C Διευρυσμένο τμήμα του αγωγού για τη συγκράτηση του γάλακτος, D. Θηλή, E. Λίπος, F. Μείζον θωρακικός μυς, G. Θωρακικό τοίχωμα. Μεγέθυνση: Α. Ένα κανονικό κύτταρο πόρου, Β. Καρκινικά κύτταρα που διαπερνούν το τοίχωμα, C. Τοίχωμα του αγωγού (Πηγή: <https://www.breastcancer.org/symptoms/types/idc>, πρόσβαση στις 22/8/2019)

Μυελοειδές καρκίνωμα (Medullary Breast Cancer-MBC)

Το μυελοειδές καρκίνωμα του μαστού είναι ένας σπάνιος υποτύπος του διηθητικού καρκίνου του αγωγού (ο καρκίνος που αρχίζει στον αγωγό γάλακτος και εξαπλώνεται πέρα από αυτόν), που αντιπροσωπεύει περίπου το 3-5% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Ονομάζεται "μυελοειδές" καρκίνωμα επειδή ο όγκος είναι μια μαλακή, σαρκώδης μάζα που μοιάζει με τον μυελό.

Το μυελοειδές καρκίνωμα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά συνήθως επηρεάζει τις γυναίκες στα 40 και στις αρχές της δεκαετίας των 50. Το μυελοειδές καρκίνωμα είναι πιο συχνό σε γυναίκες που έχουν μετάλλαξη στο BRCA1 γονίδιο. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μυελοειδές καρκίνωμα είναι επίσης πιο συχνό στην Ιαπωνία από ό, τι στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Είναι μακροκυστικός και μικροκυστικός, καλά περιγεγραμμένος όγκος. Τα καρκινωματώδη κύτταρα είναι πολύ μεγαλύτερα από εκείνα άλλου τύπου καρκινώματος, έχουν σαφή κυτταροπλασματικά όρια και διατάσσονται σε συμπαγείς καρκινωματώδεις βλάστες, οι οποίες περιβάλλονται από πυκνές λεμφοκυτταρικές και πλασματοκυτταρικές αθροίσεις. Το μυελοειδές καρκίνωμα δεν αναπτύσσεται γρήγορα και συνήθως δεν εξαπλώνεται από τον μαστό στους λεμφαδένες. Για το λόγο αυτό, είναι συνήθως πιο εύκολο να αντιμετωπιστεί από άλλους τύπους καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 4: (A) Τυπικό πρότυπο συγκυτιακής ανάπτυξης του MBC, με υψηλής πυκνότητας πυρηνική ατυπία (λευκό βέλος). × 400. (B) Περίπτωση ώθησης του MBC (λευκό βέλος) και πυκνή λεμφοπλασματοκυτταρική διήθηση (μαύρο βέλος). × 200. (Chu Z. et al., 2014)

Βλεννώδες καρκίνωμα

Αναγνωρίζεται ως κολλοειδές καρκίνωμα, το βλεννώδες καρκίνωμα είναι ένας ασυνήθιστος καρκίνος του μαστού που δημιουργείται από τα καρκινικά κύτταρα που παράγουν μεγάλη ποσότητα βλέννης. Οι γυναίκες με βλεννώδες καρκίνωμα έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση από εκείνες με άλλο τύπο διηθητικού καρκίνου.

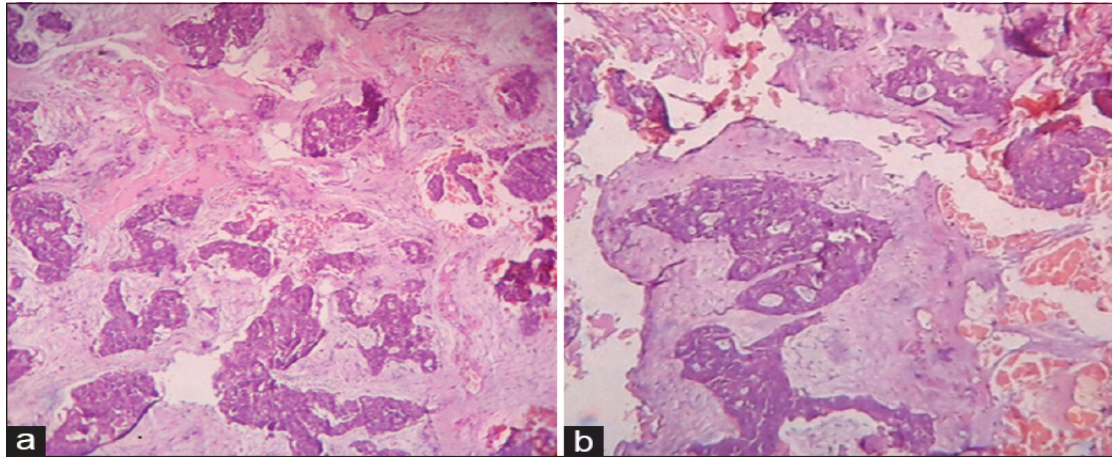
Σε αυτόν τον τύπο καρκίνου, ο όγκος αποτελείται από ανώμαλα κύτταρα που "επιπλέουν" σε ομάδες βλεννίνης.

Κανονικά, βλέννη καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της εσωτερικής επιφάνειας του σώματός μας, όπως η πεπτική οδός, οι πνεύμονες, το ήπαρ και άλλα ζωτικά όργανα. Πολλοί τύποι καρκινικών κυττάρων - συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων κυττάρων καρκίνου του μαστού - παράγουν κάποια ποσότητα βλέννης. Στο βλεννώδες καρκίνωμα, ωστόσο, η βλέννη γίνεται μέρος του όγκου και περιβάλλει τα κύτταρα καρκίνου του μαστού. Κάτω από ένα μικροσκόπιο, φαίνεται ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι διάσπαρτα σε όλες τις δεξαμενές βλεννίνης.

Οι έρευνες δείχνουν ότι μόνο το 2-3% των επιθετικών καρκίνων του μαστού είναι "καθαρά" βλεννώδη καρκινώματα - που σημαίνει ότι αυτός είναι ο μόνος τύπος καρκίνου που υπάρχει στον όγκο. Περίπου το 5% των επιθετικών καρκίνων του μαστού εμφανίζονται να έχουν ένα βλεννώδες συστατικό μέσα σε αυτά, ενώ υπάρχουν και άλλοι τύποι καρκινικών κυττάρων. Το βλεννώδες καρκίνωμα είναι εξαιρετικά σπάνιο στους άνδρες.

Αν και το βλεννώδες καρκίνωμα μπορεί να διαγνωστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, τείνει ωστόσο να επηρεάζει γυναίκες αφού έχουν περάσει στην εμμηνόπαυση. Μερικές μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η μέση ηλικία στη διάγνωση είναι τα 60 έτη με αρχές των 70.

Παρόλο που το βλεννώδες καρκίνωμα είναι ένας επιθετικός καρκίνος του μαστού, τείνει να είναι ένας λιγότερο επιθετικός τύπος που ανταποκρίνεται καλά στη θεραπεία. Το βλεννώδες καρκίνωμα είναι λιγότερο πιθανό να εξαπλωθεί στους λεμφαδένες από άλλους τύπους καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 5: Μικροφωτογραφία που δείχνει (α) συστοιχίες επιθηλιακών κυττάρων διασκορπισμένων (H και E, x40) (β) Μέτριος πυρηνικός πολυμορφισμός συστοιχιών επιθηλιακών κυττάρων (H και E, x100) (Iqbal B. M. Και Banerjee B., 2016)

Σωληνώδες καρκίνωμα

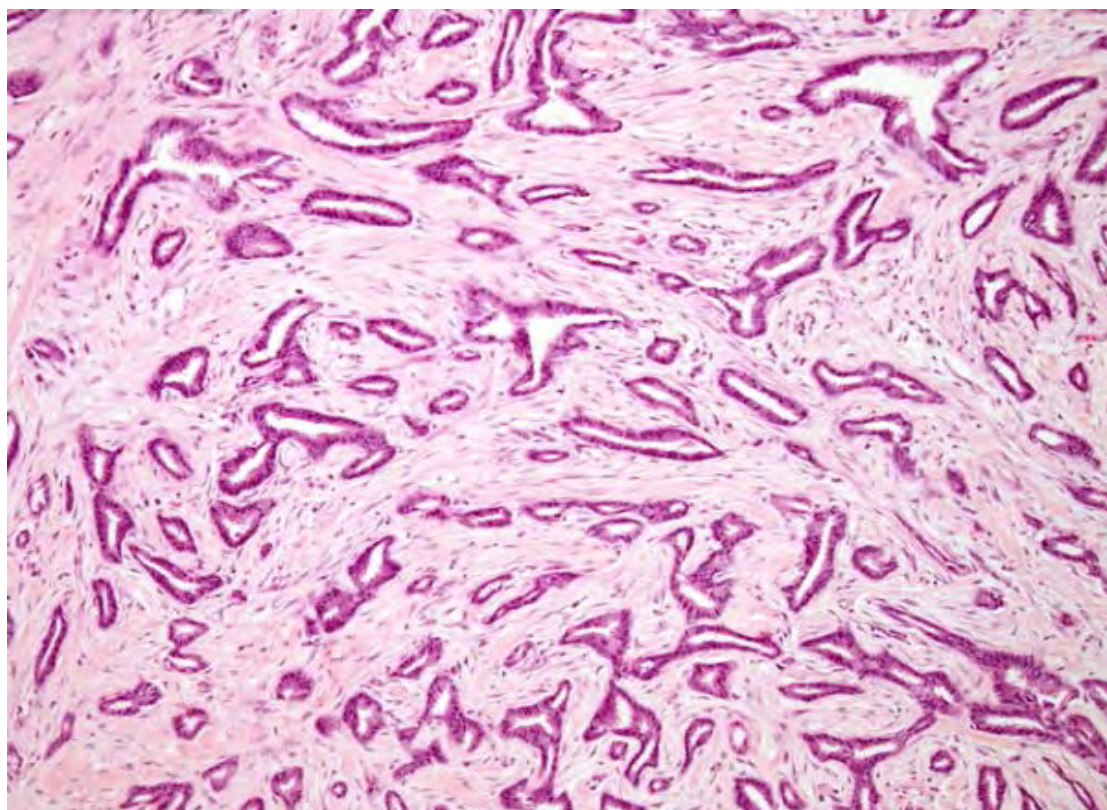
Τα σωληνώδη καρκινώματα είναι ένα ιδιαίτερο είδος διηθητικού καρκίνου του μαστού. Οι γυναίκες με σωληνώδες καρκίνωμα έχουν συνήθως καλύτερη πρόγνωση από εκείνες με άλλο είδος διηθητικού καρκίνου. Τα σωληνώδη καρκινώματα είναι συνήθως μικρά (περίπου 1 cm ή λιγότερο) και αποτελούνται από σωληνοειδείς σχηματισμούς που ονομάζονται "σωληνάρια". Τα νεοπλασματικά κύτταρα συνήθως παρουσιάζουν μικρού βαθμού ατυπία και λίγες πυρηνοκινήσιες. Ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας του σωληνώδους καρκινώματος είναι υψηλής διαφοροποίησης (συνήθως grade 1) και το νεόπλασμα έχει καλή πρόγνωση.

Κάποτε, τα σωληνώδη καρκινώματα αντιπροσώπευαν περίπου το 1-4% όλων των καρκίνων του μαστού. Τώρα που χρησιμοποιείται ευρέως η μαστογραφία ως εξέταση εκλογής, τα σωληνώδη καρκινώματα διαγιγνώσκονται συχνότερα. Οι ακριβείς αριθμοί δεν είναι διαθέσιμοι, αλλά οι μελέτες υποδηλώνουν ότι τα σωληνώδη καρκινώματα μπορεί να αντιπροσωπεύουν λίγο λιγότερο από το 8% έως το 27% όλων των καρκίνων του μαστού.

Μελέτες υποδεικνύουν επίσης ότι η μέση ηλικία διάγνωσης για το σωληνώδες καρκίνωμα είναι στις αρχές της δεκαετίας των 50 ετών, παρόλο που οι γυναίκες

μπορούν να διαγνωστούν με αυτό σε οποιαδήποτε ηλικία. Αυτός ο τύπος καρκίνου είναι σπάνιος στους άνδρες.

Παρόλο που το σωληνώδες καρκίνωμα είναι ένας επεκτατικός καρκίνος του μαστού, τείνει να είναι ένας λιγότερο επιθετικός τύπος που ανταποκρίνεται καλά στη θεραπεία. Δεν είναι πιθανό να εξαπλωθεί έξω από το μαστό και θεωρείται ότι έχει πολύ καλή πρόγνωση.



Εικόνα 6: Το σωληνώδες καρκίνωμα αποτελείται από έναν ακανόνιστο πολλαπλασιασμό μικρών αδένων και σωληναρίων που είναι επενδεδυμένα με ένα μόνο στρώμα κυβοειδούς επιθηλίου. Οι αδένες και τα λοβίδια έχουν γωνιώδη περιγράμματα και ευρέως ανοιχτούς αυλούς. Το νεοπλασματικό επιθήλιο είναι ομοιογενές και στερείται σημαντικής ατυπίας. Οι πυρήνες είναι δυσδιάκριτοι. Η μιτωτική δραστηριότητα δεν αυξάνεται και η νέκρωση απουσιάζει. Η περιφερική εισβολή και η λεμφαγγειακή διήθηση σπάνια παρατηρούνται. (Πηγή: <https://www.webpathology.com/image.asp?n=6&Case=296>, πρόσβαση: 23/8/2019)

Αδενοκυστικό καρκίνωμα

Είναι πολύ σπάνιος όγκος, οι χαρακτήρες του οποίου είναι παρόμοιοι με το αδενοκυστικό καρκίνωμα των σιελογόνων αδένων. Εντοπίζεται, κυρίως, κάτω ή κοντά στην θηλή και τα κύτταρα διατάσσονται σε μικρές κύστεις, οι οποίες περιέχουν βλέννα. Η πρόγνωση είναι καλή.

Θηλώδες καρκίνωμα

Το αμιγές καρκίνωμα είναι σπάνιο και αναπτύσσεται από το επιθήλιο των μεγάλων πόρων. Το καρκινωματώδη κύτταρα σχηματίζουν θηλές, χωρίς συνήθως αγγειοσυνδετικό άξονα, εμφανίζουν σχετική ομοιομορφία και λίγες πυρηνοκινησίες. Κλινικώς παρουσιάζεται έκκριση από την θηλή.

Καρκινোসαρκίνωμα

Συνύπαρξη καρκινώματος και σαρκώματος, τα κύτταρα του οποίου είναι ατρακτοειδή. Πολλές φορές, σε καρκίνωμα, τα κύτταρα είναι ατρακτοειδή, η ύπαρξή τους, όμως, δεν σημαίνει ότι το νεόπλασμα είναι καρκινোসάρκωμα.

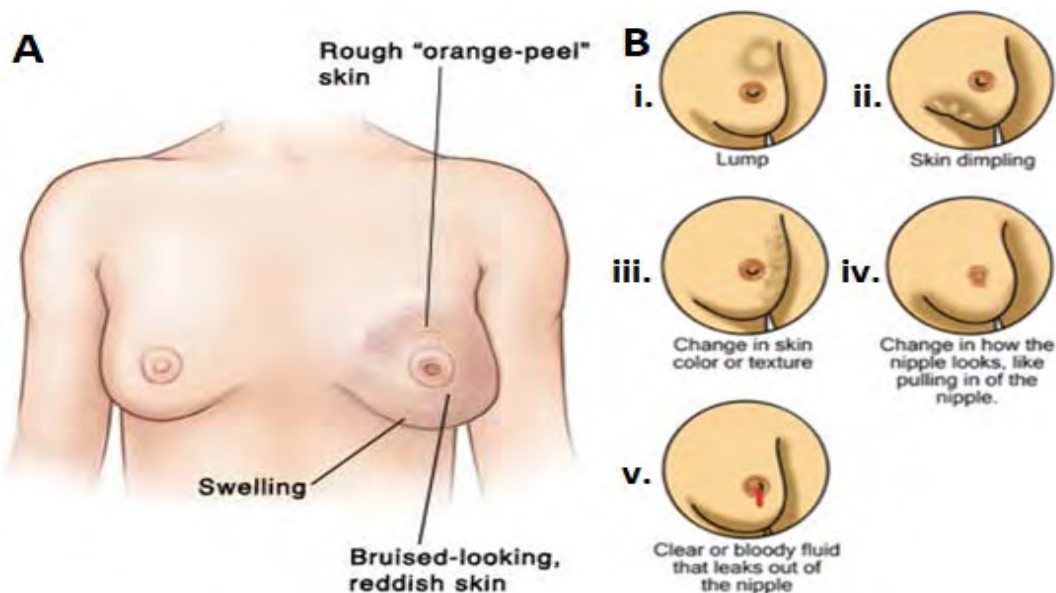
2.4.5. Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (Inflammatory Breast Cancer-IBC)

Τα χαρακτηριστικά του φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού είναι η ερυθρότητα και η τοπικά αυξημένη θερμοκρασία χωρίς πυρετό και τοπική ευαισθησία. Εμφανίζει κοιλότητες ή/και ευρείες κορυφές εξαιτίας καρκινικών κυττάρων που εμποδίζουν λεμφικά αγγεία ή κανάλια στο δέρμα πάνω από το μαστό. Αν και ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι ασυνήθιστος εντούτοις έχει ταχεία εξέλιξη. Η θεραπεία περιλαμβάνει προσεκτικό συγχρονισμό όλων των εμπλεκόμενων ειδικοτήτων και των θεραπευτικών στρατηγικών, όπως η ακτινοθεραπεία, η χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία και η απεικόνιση. Η χορήγηση χημειοθεραπείας έχει συμβάλει σημαντικά στην ενίσχυση της γενικής επιβίωσης από τη στιγμή που γίνεται η πρώτη αναφορά αυτού του θέματος και έχει συμβάλει στην καλύτερη λειτουργία της τοπικής θεραπείας όπως η ακτινοβολία και η χειρουργική επέμβαση που είναι σημαντικές για τη διαρκή βελτίωση της ασθενούς.

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι μια σπάνια και επιθετική μορφή καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου, περίπου το 1% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι φλεγμονώδεις καρκίνοι του μαστού.

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού αρχίζει συνήθως με την ερυθρότητα και το οίδημα του μαστού αντί για μια ξεχωριστή μάζα. Ο IBC τείνει να αναπτύσσεται και να εξαπλώνεται γρήγορα, ενώ τα συμπτώματα επιδεινώνονται εντός ημερών ή ακόμη και ωρών. Είναι σημαντικό να αναγνωριστούν τα συμπτώματα και να αναζητηθεί άμεσα θεραπεία. Ο μαστός παρουσιάζει την χαρακτηριστική εικόνα με διηθημένο το δέρμα «peau d'orange» (όψη φλοιού πορτοκαλιού). Αν και ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι μια σοβαρή διάγνωση, οι θεραπείες σήμερα είναι καλύτερες στον έλεγχο της νόσου από ό, τι ήταν.

Η μέση ηλικία στη διάγνωση για τον φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι τα 57 έτη για τις λευκές γυναίκες και τα 52 έτη για τις γυναίκες της μαύρης φυλής. Αυτές οι ηλικίες είναι περίπου 5 χρόνια λιγότερο από τον μέσο όρο ηλικίας κατά τη διάγνωση για άλλες μορφές καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Καρκίνου, ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι συνηθέστερος στις γυναίκες της Αφρικής. Μια μελέτη του 2008 διαπίστωσε ότι το υπερβολικό βάρος κάνει ένα άτομο πιο πιθανό να αναπτύξει IBC. Όπως και άλλες μορφές καρκίνου του μαστού, ο IBC μπορεί επίσης να επηρεάσει τους άνδρες. (Akram, 2017, Joglekar-Janadekar et al., 2017 & Cariati et al., 2005)



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική εικόνα του μαστού με φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού. Οι αλλαγές που εμφανίζονται στον μαστό απεικονίζονται στο τμήμα Β της εικόνας. i.Ογκίδιο, ii. Εισολκή δέρματος, iii.Αλλαγή του χρώματος και της υφής του δέρματος του μαστού, iv. Αλλαγή όψης της θηλής, v. Διάφανο ή αιματηρό έκκριμα που τρέχει από την θηλή. (Πηγή: <http://pechlivanides.gr/breast-cancer/> και <https://mychart.geisinger.org/Staywel/html/Inpatient/3,40408.html>, πρόσβαση 23/8/2019)

2.4.6. Η νόσος του Paget

Η νόσος του Paget της θηλής είναι μια σπάνια μορφή καρκίνου του μαστού στην οποία τα καρκινικά κύτταρα συλλέγονται μέσα ή γύρω από τη θηλή. Ο καρκίνος επηρεάζει πρώτα τους αγωγούς της θηλής (μικρούς σωλήνες μεταφοράς γάλακτος), στη συνέχεια εξαπλώνεται στην επιφάνεια των θηλών και την θηλαία άλω. Παρατηρείται απώλεια της «μουροειδούς» εμφάνισης της επιφάνειας της θηλής, ερυθρότητα, αίσθημα κνησμού και ευαισθησία. Εμφανίζεται σαν έκζεμα και δυνατόν να καλύπτεται η θηλή από εφελκίδα. Η νόσος μπορεί να συνοδεύεται ή όχι από ψηλαφητό όγκο.

Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου της Αμερικής, η νόσος Paget της θηλής αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 5% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες. Η έγκαιρη αναγνώριση των συμπτωμάτων είναι σημαντική, δεδομένου ότι περισσότερο από το 97% των ατόμων με νόσο του Paget έχουν επίσης καρκίνο, είτε DCIS είτε διηθητικό καρκίνο, κάπου αλλού στο μαστό. Οι ασυνήθιστες αλλαγές στη θηλή και την άλω είναι συχνά η πρώτη ένδειξη ότι υπάρχει καρκίνος του μαστού.

Δεν υπάρχει ακόμη βεβαιότητα για την εξέλιξη της νόσου του Paget. Μία πιθανότητα είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσονται μέσα στους αγωγούς του γάλακτος και στη συνέχεια να βγαίνουν στην επιφάνεια της θηλής. Αυτό φαίνεται να εξηγεί γιατί τόσοι πολλοί άνθρωποι με τη νόσο του Paget της θηλής έχουν μια δεύτερη περιοχή καρκίνου μέσα στο στήθος. Μια άλλη θεωρία είναι ότι τα κύτταρα της ίδιας της θηλής γίνονται καρκινικά. Αυτή η θεωρία θα εξηγούσε τον μικρό αριθμό ατόμων που: (1) έχουν μόνο νόσο του Paget στη θηλή ή (2) έχουν δεύτερο καρκίνο του μαστού που φαίνεται να είναι τελείως ξεχωριστός από τη νόσο του Paget.

Η νόσος του Paget της θηλής είναι πιο συχνή στις γυναίκες, αλλά όπως και άλλες μορφές καρκίνου του μαστού μπορεί να επηρεάσει και τους άνδρες. Η ασθένεια συνήθως αναπτύσσεται μετά την ηλικία των 50 ετών. Σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου της Αμερικής, η μέση ηλικία διάγνωσης στις γυναίκες είναι τα 62 έτη και στους άνδρες τα 69.



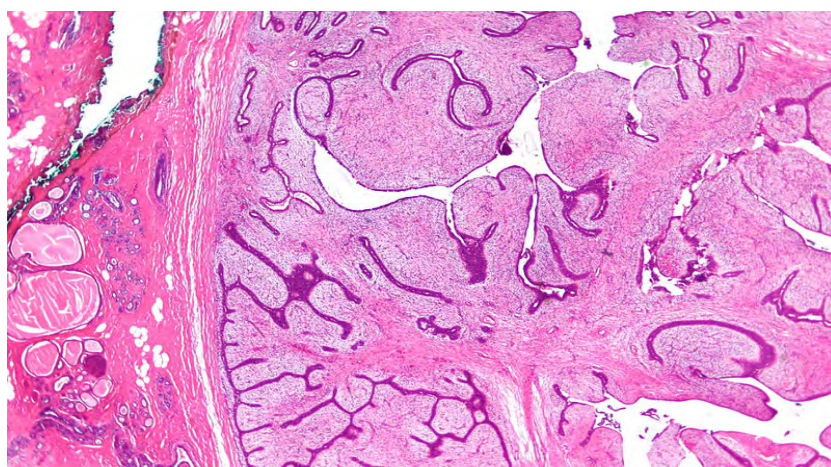
Εικόνα 8: Η πραγματική θεωρία πίσω από την παθογένεση ή την ανάπτυξη της νόσου του Paget του μαστού δεν είναι ξεκάθαρη, ωστόσο, υπάρχουν λίγες θεωρίες που υποστηρίζουν την παθογένειά της. Τα προειδοποιητικά σημάδια περιλαμβάνουν αιμορραγία και έκκριμα από τη θηλή, επιπέδωση ή αναστροφή της θηλής.

2.4.7. Φυλλοειδείς όγκοι

Οι φυλλοειδείς όγκοι μπορεί να είναι είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις. Οι φυλλοειδείς όγκοι αναπτύσσονται στους συνδετικούς ιστούς του μαστού και μπορούν

να αντιμετωπιστούν με χειρουργική εξαίρεση. Οι φυλλοειδείς όγκοι είναι εξαιρετικά ασυνήθιστοι, όντας λιγότεροι από 1% επί του συνόλου των περιστατικών. Λιγότερες από 10 γυναίκες πεθαίνουν κάθε χρόνο από αυτό το είδος καρκίνου του μαστού στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Οι φυλλοειδείς όγκοι μπορεί να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά τείνουν να αναπτύσσονται όταν μια γυναίκα είναι 40 ετών. Οι καλοήθεις φυλλοειδείς όγκοι διαγιγνώσκονται συνήθως σε νεαρότερη ηλικία από τους κακοήθεις φυλλοειδείς όγκους. Οι φυλλοειδείς όγκοι είναι εξαιρετικά σπάνιοι στους άνδρες.



Εικόνα 9: Μικρογραφία ενός φυλλοειδούς όγκου (δεξιά της εικόνας) με τις χαρακτηριστικές μακριές σχισμές και το μυξοειδές κυτταρικό στρώμα. Επίσης παρατηρείται φυσιολογική μεταβολή του μαστού και των ινοκυτταρικών στοιχείων (αριστερά της εικόνας). Χρώση με H & E. (Πηγή: Tan P. H. et al., 2011)

2.4.8. Καρκίνος του μαστού και κύηση (Pregnancy Associated Breast Cancer- PABC)

Περιλαμβάνει διάγνωση καρκίνου του μαστού κατά την κυοφορία και ακόλουθη κύηση μετά από θεραπεία καρκίνου του μαστού.

Πρόκειται για συνύπαρξη καρκίνου του μαστού κατά την εγκυμοσύνη, τη λοχεία και μέχρι ένα χρόνο μετά τον τοκετό. Αποτελεί γρίφο για τον κλινικό ιατρό, λόγω της συνύπαρξης τριών αντικρουόμενων συμφερόντων: του αναπτυσσόμενου κύματος, του μητρικού οργανισμού και της καρκινογένεσης στον μαστό. Ο καρκίνος μαστού στην κύηση εμπεριέχει την έννοια της εκδήλωσης της νόσου σε νεαρή ηλικία και την επίδραση της κύησης στη νόσο.

Ο καρκίνος του μαστού επιπλέκει 1:3000-10000 κήσεις και το ποσοστό αυτό αναμένεται να αυξηθεί. Η μέση ηλικία πρώτης και επόμενων κήσεων έχει αυξηθεί σήμερα και συχνά εμπίπτει εντός του ηλικιακού φάσματος εκδήλωσης της νόσου. Το 2005 διαγνώστηκαν στις ΗΠΑ 5000 νέες περιπτώσεις PABC, ποσοστό που αντιστοιχούσε στο 0,02-0,1% των κήσεων. Σημειώνεται επίσης ότι γυναίκες με κληρονομική προδιάθεση, εμφανίζονται συχνότερα στους πληθυσμούς με PABC.

Η διάγνωση της νόσου περιλαμβάνει την εξέταση των μαστών στην τακτική παρακολούθηση της εγκύου. Οποιαδήποτε ψηλαφητική ανωμαλία πρέπει να διερευνάται με υπερηχογράφημα (παρά τη δύσκολη απεικόνιση λόγω των φυσιολογικών μεταβολών του μαστού κατά την κύηση). Συμπαγείς νεοεμφανιζόμενες βλάβες εξετάζονται και με μαστογραφία

η οποία δεν αντενδείκνυται στην κύηση αλλά η χρήση της περιορίζεται σε ορισμένες ενδείξεις. Οποιοσδήποτε ψηλαφητός όγκος, ή βλάβη που απεικονίζεται με ύποπτα χαρακτηριστικά ή αλλάζει χαρακτήρες κατά τη διάρκεια της κύησης απαιτεί άμεσα ανοιχτή βιοψία υπό γενική αναισθησία, ανεξάρτητα από την ηλικία κύησης. Η FNA με κυτταρολογικό επίχρισμα δεν παρέχει ασφαλή διάγνωση, ιδιαίτερα στην εγκυμοσύνη λόγω των φυσιολογικών αλλαγών.

Πολύ λίγα είναι ξεκαθαρισμένα για το PABC, αλλά αποτελεί γενική πεποίθηση ότι πρόκειται για νόσο πολύ κακής πρόγνωσης, κάτι που εν μέρει είναι σωστό. Ο καρκίνος μαστού σε νεαρότερες γυναίκες έχει γενικά τάση να είναι μάλλον επιθετικότερος από τον μετεμμηνοπαυσιακό καρκίνο. Επιπλέον οι μεταβολές στους μαστούς που συνδέονται με την κύηση καθώς και η μειωμένη ευαισθητοποίηση για τη νόσο, οδηγούν συχνά σε καθυστερημένη διάγνωση. Έτσι, κατά την κύηση, η νόσος εμφανίζεται συχνά σε πιο προχωρημένο στάδιο, με όγκους μεγαλύτερου μεγέθους και συχνότερα διηθημένους λεμφαδένες. Παρ'όλα αυτά, αν αποφευχθούν οι καθυστερήσεις και ο καρκίνος μαστού διαγνωσθεί εγκαίρως και αντιμετωπισθεί κατάλληλα κατά τη διάρκεια της κύησης, δεν συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση από αντίστοιχη νόσο εκτός κύησης σε νέες γυναίκες. Η κύηση δεν αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα.

Ως προς το αρχικό γεγονός που ευθύνεται για την εμφάνιση καρκίνου στην κύηση και τη λοχεία δεν υπάρχει επαρκής γνώση. Η υπάρχουσα πεποίθηση ότι η κύηση οδηγεί σε ανάπτυξη και κλινική εμφάνιση τους μικρούς προϋπάρχοντες υποκλινικούς όγκους λόγω ορμονικών μεταβολών δεν φαίνεται να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις. Σύγχρονες προκλινικές μελέτες συνδέουν την εμφάνιση καρκίνου μαστού κυρίως της λοχείας με τη φάση ιστικής επανόδου στην κατάσταση μη-κύησης, μετά τον τοκετό. Η υποστροφή και το remodelling του μαστού ακολουθεί διαδικασίες ανάλογες της φλεγμονής-ουλοποίησης οι οποίες προδιαθέτουν στην εμφάνιση καρκινικού κλώνου με αυξημένη μεταστατικότητα. Θεωρείται μάλιστα κακό προγνωστικό σημείο η εμφάνιση καρκίνου μαστού 1 ως 2 χρόνια μετά από τοκετό και συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα μεταστατικής νόσου.

Η σταδιοποίηση της νόσου και η ανεύρεση μεταστάσεων είναι βασικό ζήτημα για τη θεραπεία και την πρόγνωση της νόσου. Αξιοποιούνται όλες οι εξετάσεις εκτός από εκείνες που χρησιμοποιούν ιονίζουσα ακτινοβολία. Για σπλαγγικές μεταστάσεις χρησιμοποιείται ακτινογραφία θώρακος με κάλυψη της κοιλίας και υπερηχογράφημα άνω και κάτω κοιλίας. Οι οστικές μεταστάσεις ανιχνεύονται με ακτινολογικό έλεγχο κρανίου και μακρών οστών. Το σπινθηρογράφημα οστών αποφεύγεται. Ελάχιστες περιπτώσεις αναφέρονται στη βιβλιογραφία στον πλακούντα, οι οποίες όμως σε καμία περίπτωση δεν επηρέασαν το κύημα.

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού στην κύηση ακολουθεί τις βασικές αρχές της θεραπείας καρκίνου του μαστού στις νέες γυναίκες και περιλαμβάνει την τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή. Η συστηματική θεραπεία-χημειοθεραπεία χορηγείται επί ενδείξεως, εκτός του πρώτου τριμήνου. Ο θηλασμός στην ίδια κύηση συνήθως αναστέλλεται λόγω επικουρικών θεραπειών ή μετεγχειρητικών δυσκολιών. Πάντως δεν αντενδείκνυται ο θηλασμός σε ενδεχόμενες επόμενες κύσεις.

2.4.9. Κύηση μετά από θεραπεία καρκίνου του μαστού

Όσο οι νέες γυναίκες αναβάλλουν την τεκνοποίησή τους σε ηλικία κατά την οποία παρουσιάζεται αυξημένη εμφάνιση καρκίνου του μαστού, θα προκύπτει

συχνότερα το ερώτημα: είναι ασφαλής η εγκυμοσύνη και η πρόγνωση της γυναίκας όταν κυοφορήσει μετά από ολοκληρωμένη θεραπεία για καρκίνο του μαστού;

Τα δεδομένα προς απάντηση είναι ελάχιστα και προκύπτουν από μελέτες με πολύ λίγα περιστατικά χωρίς να είναι προοπτικές τυχαιοποιημένες. Οι μελέτες ασθενών με καρκίνο του μαστού που κυοφόρησαν και ασθενών οι οποίες δεν κυοφόρησαν, δεν έδειξαν επιβάρυνση της επιβίωσης από τον καρκίνο του μαστού στις κυοφορούσες. Είναι κοινή πρακτική των κλινικών να συμβουλεύουν τις γυναίκες να αποφύγουν την εγκυμοσύνη για 2 τουλάχιστον χρόνια μετά τη διάγνωση του καρκίνου μαστού. Η τάση αυτή είναι κατά κύριο λόγο εμπειρική και βασίζεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες υποτροπές του καρκίνου μαστού εμφανίζονται σε διάστημα διετίας. Επιπλέον δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την ασφάλεια μιας κύησης κατά τη διάρκεια της επικουρικής ορμονικής θεραπείας. Η ασάφεια και η ανυπαρξία τεκμηριωμένων κλινικών μελετών δημιουργεί σκεπτικισμό στη μαιευτική-ογκολογική κοινότητα. (Αντσακλής, 2011, Feng, 2018)

2.5. Παράγοντες αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες που έγιναν στο παρελθόν έχουν δείξει ότι παράγοντες από το ιστορικό, την λειτουργία των ενδοκρινών αδένων, το κληρονομικό κτλ. μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Η αναγνώριση των παραγόντων αυτών εξυπηρετεί δύο σκοπούς:

1. Την οριοθέτηση των ομάδων εκείνων, από τον γενικό πληθυσμό, οι οποίες έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου και την προσεκτικότερη παρακολούθησή τους, και
2. Την κατανόηση του ρόλου που παίζουν οι διάφοροι παράγοντες στην παθογένεια και την εξέλιξη της νόσου, γεγονός που επιτρέπει την επινόηση τρόπων πρόληψης του προβλήματος και θεραπευτικές παρεμβάσεις.

2.5.1. Δημογραφικοί παράγοντες

Από όλους τους παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την εμφάνιση καρκίνου στον μαστό, ο πιο σημαντικός είναι το γένος. Η νόσος είναι ιδιαίτερα ασυνήθης στους άνδρες αλλά όχι ανύπαρκτη. Από το σύνολο των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού ποσοστό μικρότερο του 1% εμφανίζεται στους άνδρες. Από την άλλη μεριά όλες οι γυναίκες έχουν πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

Η ηλικία είναι επίσης καθοριστικός παράγοντας. Η νόσος είναι εξαιρετικά σπάνια στις πολύ νέες γυναίκες (<25 ετών). Η συχνότητα της αυξάνει σταθερά μετά την ηλικία αυτή έως την ηλικία της εμμηνόπαυσης. Σε μεγαλύτερες ηλικίες παρατηρείται επίσης αύξηση της συχνότητας, μολονότι η αύξηση αυτή δεν έχει τους ίδιους ρυθμούς.

2.5.2. Ορμονικοί παράγοντες

Οι ορμόνες παίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην παθογένεια της νόσου όσο και στην εξέλιξή της. Η πρόιμη εμμηναρχή (<12⁰⁰ έτους) και η καθυστερημένη εμμηνόπαυση (>55⁰⁰ έτους) όπως και η ατεκνία, ή η γέννηση παιδιών μετά την ηλικία των 30 αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου στον μαστό. Αντίθετα, η γέννηση παιδιών πριν από την ηλικία των 20 μειώνει τις πιθανότητες. Στις γυναίκες που έχουν πρόιμη εμμηνόπαυση, φυσική ή ιατρογενή, παρατηρείται μείωση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου κατά τα 2/3, με την προϋπόθεση ότι δεν παίρνουν θεραπεία υποκατάστασης.

Η λήψη αντισυλληπτικών φαίνεται ότι δεν συνδέεται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου στον μαστό, όμως η χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων, όπως στη θεραπεία υποκατάστασης, μετά από πρόιμη ή κανονική εμμηνόπαυση, είναι πιθανό να αυξάνει τις πιθανότητες. Όμως οι γιατροί δεν πρέπει να αρνούνται θεραπεία υποκατάστασης σε γυναίκες, ιδιαίτερα σε εκείνες με πρόιμη εμμηνόπαυση, μόνο και μόνο για τον φόβο εμφάνισης καρκίνου στον μαστό. Οι μόνες αντενδείξεις στην θεραπεία αυτή είναι η άτυπη υπερπλασία, ή άτυπη θηλωμάτωση, τα ιστολογικά ευρήματα από προηγηθείσα βιοψία και το έντονο οικογενειακό ιστορικό.

2.5.3. Άλλοι παράγοντες

Η ινώδης κυστική μαστοπάθεια είναι νόσος με μεγάλη ποικιλία παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών (μικροκύστεις, μεγαλοκύστεις, υπερπλασία, θηλωμάτωση, άτυπη υπερπλασία κτλ.) Το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών με ινώδη κυστική μαστοπάθεια δεν εμφανίζει αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου στον μαστό. Όμως ένα μικρό ποσοστό από το σύνολο (3-6%), αυτές με την άτυπη υπερπλασία και την άτυπη θηλωμάτωση, βεβαιωμένα ιστολογικά από προηγούμενη βιοψία, εμφανίζει σημαντικά αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.

2.5.4. Το οικογενειακό ιστορικό

Ο καρκίνος του μαστού είναι συχνό πρόβλημα. Έτσι, είναι σύνηθες να υπάρχουν στο οικογενειακό περιβάλλον μιας γυναίκας στενοί συγγενείς (μητέρα, αδελφές, κόρες, γιαγιά ή θείες) με καρκίνο του μαστού.

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι θετικό οικογενειακό ιστορικό αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Οι πιθανότητες αυτές είναι μεγαλύτερες, αν οι περιπτώσεις αφορούν αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού, εμφάνιση της νόσου σε νέες ηλικίες (<45^{ου} έτους), και βέβαια αν ο αριθμός των περιπτώσεων είναι μεγαλύτερος. Εξάλλου είναι γνωστό ότι το 5% από το σύνολο των περιπτώσεων είναι κληρονομούμενος καρκίνος και ότι τα υπεύθυνα γονίδια έχουν καταδειχθεί (BRCA1, BRCA2, κ.α.)

Κάθε γυναίκα που έχει υποβληθεί σε θεραπεία για καρκίνωμα του μαστού, έχει αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου και στον άλλο μαστό. Ο ετήσιος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου στις γυναίκες αυτές είναι της τάξης του 1%, και ο ισόβιος κίνδυνος προσεγγίζει το 10%, διαπίστωση που σημαίνει ότι από τις 100 γυναίκες που έχουν εμφανίσει το νόσημα στον ένα μαστό, οι 10 θα εμφανίσουν την νόσο και στον άλλο σε κάποια περίοδο της ζωής τους. Διάφορες παράμετροι, όπως το θετικό οικογενειακό ιστορικό, ο πολυεστιακός χαρακτήρας της νόσου, ο λοβιακός

τύπος του όγκου και το λοβιακό καρκίνωμα in situ, αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου και στον άλλο μαστό.

Η προηγηθείσα ακτινοβολία στην περιοχή του μαστού (π.χ. για υπερπλασία του θύμου αδένου στην παιδική ηλικία ή συχνές ακτινοσκοπήσεις για φυματίωση) αυξάνουν σημαντικά τις πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, κάτι που συνήθως γίνεται 20-30 έτη αργότερα.

Η διαίτα «δυτικού τύπου» και η παχυσαρκία, που συχνά είναι το αποτέλεσμα της, αυξάνει τον κίνδυνο, και στο διαφορετικό τύπο διαίτας αποδίδονται οι διαφορές που παρατηρούνται στην επίπτωση της νόσου, σε διαφορετικά κράτη, όπως η Ιαπωνία και οι Η.Π.Α. Αυξημένα ποσοστά λίπους στο σώμα είναι η αιτία αυξημένων επιπέδων οιστρογόνων. Επιπλέον παχύσαρκα κορίτσια έχουν πρωιμότερη εμμηναρχή, γεγονός που σχετίζεται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου. (Πίνακας 1)

Παρά τον πλούτο των γνώσεων πάνω στους παράγοντες αυξημένου κινδύνου, γυναίκες, που δεν έχουν κανέναν από αυτούς, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των γυναικών με καρκίνο στον μαστό. Στην καθημερινή πράξη, όλες οι γυναίκες ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι παραγόντων αυξημένου κινδύνου, είναι πιθανό να εμφανίσουν τη νόσο. Επιπλέον, κάθε γιατρός πρέπει να ερμηνεύει τους παράγοντες αυτούς με σύνεση, έτσι ώστε να μη θορυβεί, συχνά αδικαιολόγητα, τις ασθενείς του. (Δαλαΐνας Β.Η., 2001)

Πίνακας 1: Παράγοντες αυξημένου κινδύνου

1. Δημογραφικοί Παράγοντες
i. Θηλυκό γένος
ii. Μεγαλύτερη ηλικία
2. Ορμονικοί Παράγοντες
i. Πρώιμη εμμηναρχή
ii. Καθυστερημένη εμμηνόπαυση
iii. Ατεκνία ή γέννηση του πρώτου παιδιού μετά το 30 ^ο έτος
iv. Θεραπεία υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση

3. Άλλοι Παράγοντες	
i.	Οικογενειακό ιστορικό
ii.	Ινώδης κυστική μαστοπάθεια (κυρίως ύπαρξη άτυπης υπερπλασίας)
iii.	Προηγούμενα θεραπεία για καρκίνωμα του μαστού
iv.	Προηγούμενα ακτινοθεραπεία στην περιοχή των μαστών
v.	Δίαιτα πλούσια σε ζωικά λίπη
vi.	Παχυσαρκία
vii.	Σημαντική κατανάλωση αλκοόλ

2.6. Μοριακοί ή εγγενείς υπότυποι καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει μια ετερογενή και φαινοτυπικά διαφορετική ομάδα ασθενειών. Αποτελείται από διάφορους βιολογικούς υπότυπους που έχουν ξεχωριστές συμπεριφορές και απαντήσεις στη θεραπεία. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης έχουν εντοπίσει αρκετούς διαφορετικούς υπότυπους καρκίνου του μαστού που διαφέρουν σημαντικά στην πρόγνωση καθώς και στους θεραπευτικούς στόχους που υπάρχουν στα καρκινικά κύτταρα. Με την πρόοδο των τεχνικών δημιουργίας προφίλ γονιδιακής έκφρασης, ο κατάλογος των ενδογενών γονιδίων που διαφοροποιούν αυτούς τους υπότυπους αποτελείται πλέον από διάφορες ομάδες γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptor-ER), την έκφραση του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (Human Epidermal Growth Factor 2-HER2), τον πολλαπλασιασμό και μια μοναδική ομάδα γονιδίων που ονομάζεται βασικοκυτταρική συστάδα. Οι καρκίνοι του μαστού χωρίζονται συνήθως σε πέντε ενδογενείς ή μοριακούς υποτύπους που βασίζονται στο πρότυπο έκφρασης ορισμένων γονιδίων. (Πίνακας 2)

- **Luminal A:** Αυτός ο υπότυπος είναι θετικός για υποδοχέα οιστρογόνων και/ή υποδοχέα προγεστερόνης (Progesterone Receptor-PR), HER2 αρνητικός και έχει χαμηλά επίπεδα Ki-67. Οι Luminal A καρκίνοι αντιπροσωπεύουν περίπου

το 40% όλων των καρκίνων του μαστού. Είναι υψηλής διαφοροποίησης, αργής ανάπτυξης και τείνουν να έχουν την καλύτερη πρόγνωση. Η θεραπεία περιλαμβάνει συνήθως ορμονική θεραπεία.

- **Luminal B:** Ο υπότυπος αυτός αντιπροσωπεύει <20% όλων των καρκίνων του μαστού, είναι θετικός ως ER και/ή PR, είτε HER2 θετικός είτε HER2 αρνητικός και παρουσιάζει υψηλά επίπεδα Ki-67. Οι καρκίνοι Luminal B αναπτύσσονται ελαφρώς ταχύτερα από τους καρκίνους Luminal A και η πρόγνωσή τους είναι ελαφρώς χειρότερη.
- **HER2-εμπλουτισμένος καρκίνος του μαστού:** Αυτός ο υπότυπος αποτελεί το 10%-15% των καρκίνων του μαστού και χαρακτηρίζεται από την απουσία έκφρασης ER και PR, την υψηλή έκφραση των ομάδων γονιδίων HER2 και γονιδίων πολλαπλασιασμού και τη χαμηλή έκφραση των συστοιχιών του αυλού και της βασικοκυτταρικής συστοιχίας. Οι εμπλουτισμένοι με HER2 καρκίνοι αναπτύσσονται ταχύτερα από τους Luminal καρκίνους και έχουν γενικά χειρότερη πρόγνωση. Ωστόσο, μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς με στοχοθετημένες θεραπείες με στόχο την πρωτεΐνη HER2, όπως με το Herceptin (ή trastuzumab), το Perjeta (ή pertuzumab), το Tykerb (ή lapatinib) και το Kadcyla (ή TDM1 ή ado-trastuzumab emtansine). Πρέπει να διευκρινιστεί ότι ο εμπλουτισμένος με HER2 υπότυπος δεν είναι συνώνυμος με τον κλινικά HER2 θετικό καρκίνο του μαστού. Ενώ περίπου το 50% των κλινικών HER2-θετικών καρκίνων του μαστού εμπλουτίζονται με HER2, το υπόλοιπο 50% μπορεί να περιλαμβάνει οποιονδήποτε μοριακό υπότυπο αλλά είναι ως επί το πλείστον HER2-θετικοί Luminal όγκοι. Ωστόσο, περίπου το 30% των εμπλουτισμένων με HER2 όγκων είναι κλινικά HER2-αρνητικοί.
- **Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple-negative/basal-like breast cancer-TNBC):** Είναι περίπου το 20% όλων των καρκίνων του μαστού, ο υπότυπος TNBC χαρακτηρίζεται ως ER-αρνητικός, PR-αρνητικός και HER2-αρνητικός. Το TNBC είναι πιο συχνό σε γυναίκες με μεταλλάξεις γονιδίων BRCA1 καθώς και σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 40 ετών και γυναίκες από την Αφρική και την Αμερική. Ο TNBC συνήθως συμπεριφέρεται πιο επιθετικά από άλλους τύπους καρκίνου του μαστού. Η πιο συνηθισμένη ιστολογική εικόνα που παρατηρείται στο TNBC είναι το διηθητικό καρκίνωμα του αυλού, αν και ένας σπάνιος ιστολογικός υπότυπος, το μυελώδες

καρκίνωμα, είναι γενικά επίσης τριπλά αρνητικός. Σε αντίθεση με άλλους υπότυπους καρκίνου του μαστού με οπλοστάσιο στοχοθετημένων φαρμάκων όπως ανταγωνιστές ER και μονοκλωνικά αντισώματα HER2, η μη χειρουργική θεραπεία του TNBC περιορίστηκε σε συμβατική χημειοθεραπεία, μέχρι την πρόσφατη έγκριση του αναστολέα PARP Olaparib για φορείς μετάλλαξης BRCA1 και BRCA2, οι οποίοι είναι πιθανότερο να αναπτύξουν το TNBC.

- **Κανονικός:** Αυτός ο υπότυπος είναι παρόμοιος με την νόσο Luminal A. Είναι ER και/ή PR-θετικός, HER2 αρνητικός, και έχει χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης Ki-67.

Πίνακας 2: Μοριακοί ή εγγενείς υποτύποι καρκίνου του μαστού

Υπότυποι	Μοριακή υπογραφή	Χαρακτηριστικά
Luminal A	ER+, PR±, HER2-, ↓Ki67 ¹	≈70%, ο πιο κοινός τύπος, καλύτερη πρόγνωση
Luminal B	ER+, PR±, HER2±, ↑Ki67	10%-20%
HER2	ER-, PR-, HER2-	Μικρότερη επιβίωση από τον Luminal A, 5%-15%
Τριπλά αρνητικός	ER-, PR-, HER2-	15%-20%, πιο κοινός σε Αφρικανές, διαγιγνώσκεται σε νεαρή ηλικία, κακή πρόγνωση
Κανονικός	ER+, PR±, HER2-, ↓Ki67	Σπάνιος, Έκφραση συμπλέγματος γονιδίων χαμηλού πολλαπλασιασμού

¹ Η πρωτεΐνη βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και στα πυκνά ινώδη συστατικά του πυρήνα κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης. Οι υγιείς μαστικοί ιστοί εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Ki67. (Yerushalmi R. et al., 2010)

Η κυτταρική και μοριακή ετερογένεια των καρκίνων του μαστού δίνει έναυσμα για τις αναλύσεις πολλαπλών γενετικών αλλαγών, κάτι που κατέστη δυνατό με την εμφάνιση τεχνικών γονιδιωματικής και μεταγραφικής διάταξης επόμενης

γενιάς. Οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης ταυτοποίησαν έτσι διάφορους υπότυπους καρκίνου του μαστού που διαφέρουν σημαντικά στην πρόγνωση και στην έκφραση θεραπευτικών στόχων. Στην πραγματικότητα, οι εγγενείς υπότυποι διακλαδίζονται σε δύο διαχωρισμένες ομάδες που αντιστοιχούν στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με υποδοχείς ορμόνης. Αυτός ο διαχωρισμός είναι συνεπής τόσο με τη βιβλιογραφία όσο και με την κλινική εμπειρία που δείχνει ότι οι ER-θετικοί και οι ER-αρνητικοί καρκίνοι καθορίζουν τους βιολογικά διακριτούς φαινοτύπους που μπορεί να προέρχονται από διαφορετικά προγονικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, οι αναλύσεις γονιδιώματος και το μεταγραφικό προφίλ παρείχαν κρίσιμες γνώσεις σχετικά με τις αποχρώσεις της μοριακής ταξινόμησης των καρκίνων του μαστού και βοήθησαν στην καθιέρωση διάφορων διαγνωστικών και προγνωστικών ομάδων, όπως το Oncotype Dx 21 γονίδιο επαναληπτικότητας (Recurrence Score-RS), ο δείκτης καρκίνου του μαστού (Breast Cancer Index-BCI), η Ανάλυση Predictor Microarray 50 (Predictor Analysis of Microarray 50-PAM50), η βαθμολογία κινδύνου υποτροπής (Risk of Recurrence-ROR), το προγνωστικό προφίλ του γονιδίου 70 του Άμστερνταμ (Mammaprint) και ο δείκτης γονιδιακής τάξης (Genomic Grade Index-GGI).

2.6. Στάδια του καρκίνου

Η κλινική σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού είναι πανομοιότυπη σε όλους τους υποτύπους καρκίνου του μαστού και είναι χρήσιμη, ώστε να διακρίνουμε διαφορές που έχουν προγνωστική σημασία. Μεγάλης σημασίας είναι το γεγονός ότι με τη σωστή σταδιοποίηση κάνουμε τις καλύτερες θεραπευτικές επιλογές. Ορίστηκε σύμφωνα με την Αμερικανική Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer-AJCC) και το σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού της Διεθνούς Ένωσης για τον Έλεγχο του Καρκίνου (International Union for Cancer Control-UICC).

Πίνακας 3: Στάδια του καρκίνου. (Sharma G.N. et al., 2010)

Στάδιο	Περιγραφή
In situ καρκίνωμα	
0	Ο όγκος είναι περιορισμένος και δεν έχει εισβάλλει σε γειτονικό

	μαστικό ιστό.
Τοπικός και περιοχικός επιθετικός καρκίνος	
I	Ο όγκος είναι μικρότερος από 2cm σε διάμετρο και δεν έχει απλωθεί πέρα από τον μαστό.
IIA	Ο όγκος είναι 2cm ή μικρότερος σε διάμετρο και έχει απλωθεί σε έναν έως και τρεις λεμφαδένες στη μασχάλη. Μικροσκοπικές διηθήσεις έχουν εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κοντά στο στήρνο στην ίδια πλευρά με τον όγκο ή Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 2cm αλλά μικρότερος από 5cm σε διάμετρο αλλά δεν έχει εξαπλωθεί πέρα από τον μαστό.
IIIB	Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 2cm αλλά μικρότερος από 5cm σε διάμετρο, και έχει απλωθεί σε έναν έως και τρεις λεμφαδένες στη μασχάλη. Μικροσκοπικές διηθήσεις έχουν εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κοντά στο στήρνο στην ίδια πλευρά με τον όγκο ή Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5cm σε διάμετρο αλλά δεν έχει εξαπλωθεί πέρα από τον μαστό.
IIIA	Ο όγκος είναι 5cm ή λιγότερο σε διάμετρο και έχει εξαπλωθεί σε τέσσερις έως και εννέα λεμφαδένες στη μασχάλη ή έχει διογκώσει τουλάχιστον έναν λεμφαδένα κοντά στο στήρνο στην ίδια πλευρά με τον όγκο ή Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5cm σε διάμετρο και έχει εξαπλωθεί μέχρι και σε εννέα λεμφαδένες στη μασχάλη ή στους λεμφαδένες κοντά στο στήρνο.
IIIB	Ο όγκος έχει εξαπλωθεί στο τοίχωμα του θώρακα ή έχει προκαλέσει φλεγμονή στους μαστούς (φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού).
IIIC	Ο όγκος μπορεί να είναι οποιοδήποτε μέγεθος και να έχει ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: Έχει εξαπλωθεί σε δέκα ή περισσότερους λεμφαδένες στη μασχάλη. Έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες κάτω ή πάνω από την κλείδα. Έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες στη μασχάλη και έχει διογκώσει τουλάχιστον έναν λεμφαδένα κοντά στο στήρνο στην ίδια πλευρά όπως ο όγκος.

	Έχει εξαπλωθεί σε τέσσερεις ή περισσότερους λεμφαδένες στη μασχάλη και μικροσκοπικές διηθήσεις έχουν εξαπλωθεί σε λεμφαδένες κοντά στο στήρνο στην ίδια πλευρά με τον όγκο.
Μεταστατικός καρκίνος	
IV	Ο όγκος, ανεξάρτητα από το μέγεθός του, έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα όργανα ή ιστούς, όπως οι πνεύμονες ή τα οστά, ή σε λεμφαδένες μακριά από τον μαστό.

3. Μειωμένη ρύθμιση των miR σε καρκίνο του μαστού

3.1. Γενικά πρότυπα έκφρασης miR στον καρκίνο του μαστού

Η κατανόησή μας για τη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού προέρχεται από κλασσικές μελέτες ταξινόμησης με mRNA, οι οποίες κατηγοριοποίησαν τους όγκους του μαστού σε 5 κύριες ομάδες: Luminal A, Luminal B, τους τριπλά αρνητικούς, τους HER2-θετικούς και τους κανονικούς όγκους. Πιο πρόσφατα, παρόμοιες παγκόσμιες μελέτες της έκφρασης miR σε φυσιολογικούς ιστούς μαστού και σε όγκους έχουν επιδιώξει να προσδιορίσουν τα miRs που σχετίζονται με την εξέλιξη του καρκίνου και για τον περαιτέρω διαχωρισμό των κατηγοριών των όγκων του μαστού. Το miR-προφίλ υποστηρίζει την προαναφερθείσα ταξινόμηση. Μία πρώιμη μελέτη της έκφρασης miR σε 86 όγκους του μαστού και τους φυσιολογικούς ιστούς αναγνώρισε πολυάριθμα, απορρυθμισμένα miR στον καρκίνο του μαστού και δημιούργησε ένα διαχωριστικό σημείο που διακρίνει μεταξύ των φυσιολογικών και των κακοήθων ιστών του μαστού. Μια μετέπειτα μελέτη 93 δειγμάτων που προερχόταν από τις εξής 2 ομάδες: αυλού A και τριπλά αρνητικούς, επικύρωσε την ισχύ ταξινόμησής τους σε ένα εξωτερικό σύνολο δεδομένων και κατέδειξε επίσης σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης αρκετών miR και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών της νόσου.

Από άλλες μικρότερες μελέτες έχουν ανακύψει συμπεράσματα σχετικά με την κατάσταση του υποδοχέα ορμονών. Μία μελέτη προφίλ των κυτταρικών σειρών του καρκίνου του μαστού έδειξε ότι οι περισσότερες έχουν σοβαρή διαταραχή και

μειωμένη έκφραση miR σε σύγκριση με τον κανονικό ιστό μαστού και μόνο η σειρά PMC42 εμφάνισε ένα κανονικό προφίλ miR. Αυτό έχει προφανείς επιπτώσεις στην ερμηνεία των μελετών miR που βασίζονται σε κυτταρικές σειρές, οι οποίες πρέπει να ερμηνευθούν με κάποιο βαθμό προσοχής.

3.2. Έκφραση των miR και ο υποδοχέας οιστρογόνων

Η έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) είναι το κλειδί για τη βιολογία και τη θεραπεία του όγκου του μαστού και έχει διερευνηθεί εκτενώς η σχέση μεταξύ έκφρασης ER και miR. Οι μελέτες προφίλ έδειξαν ότι υπάρχουν πολυάριθμα miR που σχετίζονται είτε με ER-θετικούς είτε με ER-αρνητικούς όγκους, ενώ τα miR που εμφανίζονται συχνά σε αυτές τις μελέτες περιλαμβάνουν τα let-7 και miR-342 σε ER+ όγκους και miR-135b και miR-18 σε ER-αρνητικούς όγκους. Οι ER-αρνητικοί όγκοι και οι κυτταρικές σειρές τείνουν να εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα miR-221/222, τα οποία στοχεύουν άμεσα το mRNA του ER σε βρόχο αρνητικής ανάδρασης. Αυτός είναι ένας επαναλαμβανόμενος μηχανισμός στην έκφραση miR.

Μία μελέτη προφίλ της έκφρασης miR σε καλλιεργημένα κύτταρα μετά από θεραπεία με οιστραδιόλη αποκαλύπτει πολυάριθμες περιπτώσεις απορρύθμισης, συμπεριλαμβανομένων των miR-21, miR-181, miR-26 και let-7, μερικά από τα οποία είναι ικανά να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό που κατευθύνεται από την οιστραδιόλη όταν παρέχεται εξωγενώς, εμπλέκοντάς τους ως καθοδικούς τελεστές. Μια άλλη μελέτη διαπιστώνει ότι οι παράλογες συστάδες miR-17e92 και miR-106a-363 υπόκεινται σε θετική ρύθμιση και περιέχουν miR (miR-18a, miR-19b και miR-20b) που κατευθύνονται άμεσα στο mRNA του ER. Έχουν γίνει πρόσφατα αρκετές προσπάθειες για τον εντοπισμό των miR που στοχεύουν το mRNA του ER. Τα 21 από τα 319 pre-miR που εξετάστηκαν σε δοκιμασίες μορφομετατροπής βρέθηκαν να ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση του ER, συγκεκριμένα τα miR-18a και b, miR-193b και miR-206. Το miR-206 έχει δειχθεί σε καλλιεργημένα κύτταρα τόσο να καταστέλλεται από τους αγωνιστές ER όσο και να στοχεύει το mRNA του ER, υποδηλώνοντας έναν άλλο μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης.

Η επίδραση των οιστρογόνων στην έκφραση των miR-21 και let-7 είναι αμφιλεγόμενη. Αναφέρθηκε αρχικά ότι η οιστραδιόλη καταστέλλει και τα δύο miR, αλλά σε μια πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε ότι αυτά ρυθμίζονται θετικά σε ένα παρόμοιο σύστημα *in vitro*, συμφωνώντας με την παρατήρηση ότι τα αυξημένα miR-21 και let-7 σχετίζονται με ER-θετικούς όγκους. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το Dicer επάγεται από την οιστραδιόλη και υποδεικνύει περαιτέρω ρόλους για τα miR που ρυθμίζονται από τον ER στην απόκριση των οιστρογόνων. Υπάρχει ένας σύνθετος ιστός των miR που εμπλέκονται στον έλεγχο και τη δραστηριότητα του υποδοχέα οιστρογόνων. Απαιτούνται περαιτέρω εργασίες για την επίλυση συγκρουόμενων μοντέλων και για τον εντοπισμό των σημαντικών μηχανισμών στους όγκους του μαστού.

3.3. Μηχανισμοί απορρύθμισης των miR

Η μεγάλη πλειοψηφία των miR που μεταγράφονται από την RNA Pol II βρίσκονται κάτω από παρόμοιους μηχανισμούς ελέγχου μεταγραφής όπως το mRNA, οπότε θα περίμενε κανείς να παρουσιάζουν ένα παρόμοιο ρεπερτόριο μεταγραφικών απορρυθμιστικών μηχανισμών στον καρκίνο, κάτι που συμβαίνει σε γενικές γραμμές. Είναι σημαντικό ότι τα miR στατιστικά υπερεκπροσωπούνται σε θέσεις γονιδιωματικής ενίσχυσης/εξάλειψης σε μια σειρά καρκίνων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Η σύγχρονη ρύθμιση των miR και των κοντινών mRNA έχει παρατηρηθεί σε ιστούς όγκων του μαστού, γεγονός που υποδηλώνει κοινό μεταγραφικό έλεγχο σε αυτούς τους τόπους. Η επιγενετική ρύθμιση της μεταγραφής των miR έχει περιγραφεί στον καρκίνο του μαστού με υπερμεθυλίωση αρκετών προαγωγέων miR, συγκεκριμένα του miR-9-1, που συσχετίζεται έντονα με την υπερμεθυλίωση άλλων γνωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε πρωτογενείς όγκους του μαστού. Ο υποκινητής του καταστολέα όγκου miR-34 είναι υπερμεθυλιωμένος σε πολυάριθμους τύπους όγκων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, καταλήγοντας σε μεταγραφική σίγαση, ακόμη και παρουσία της κανονικά διενεργούμενης p53.

Μετά την μεταγραφή, η ωρίμανση των miR αποκλίνει αισθητά από εκείνη των mRNA, παρέχοντας μια σειρά σταδίων στα οποία θα μπορούσε να ρυθμίζεται ή

να διαταράσσεται η πληθώρα ή η διαθεσιμότητα των miR. Η επεξεργασία των pri-miR στον πυρήνα ελέγχεται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και διαταράσσεται σε όγκους. Ο TGF- β έχει δείχθει ότι αυξάνει την έκφραση του miR-21 στο καρκίνωμα του μαστού. Οι πρωτεΐνες σηματοδότησης SMAD αλληλεπιδρούν άμεσα με το σύμπλεγμα Drosha και με μερικά pre-miR, συμπεριλαμβανομένων των pri-miR-21 και pri-miR-199a, ρυθμίζοντας έτσι την ωρίμανσή τους. Ο ουμπικουιτινωμένος καταστολέας όγκων p53 αλληλεπιδρά με την Drosha, ενισχύοντας την επεξεργασία των miR που επάγουν την ανάπτυξη σε δύο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Η κυτταροπλασματική επεξεργασία των pre-miR από την Dicer υπόκειται επίσης σε απορρύθμιση σε κύτταρα όγκου. Η knockdown-Dicer προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και τον σχηματισμό όγκου σε κύτταρα θηλαστικών και είναι, σε τουλάχιστον ένα διαγονιδιακό ζωικό μοντέλο, καταστολέας όγκου. Στον καρκίνο του μαστού, η απώλειά της συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και τον μοριακό υποτύπο, που συνδέεται με ER-αρνητικούς και βασικοκυτταρικούς όγκους. Φαίνεται πιθανό ότι ενώ η μερική απώλεια της Dicer ευνοεί τον κακοήγη μετασχηματισμό, η πλήρης καταστολή της λειτουργίας της Dicer είναι επιβλαβής για την επιβίωση των κυττάρων του όγκου, αλλά παραμένει να δούμε ποια miR προκαλούν αυτά τα αποτελέσματα. Ο δείκτης βλαστικών κυττάρων LIN28 καταλύει την 3' πολυουριδυλίωση του pre-miR, σηματοδοτώντας το για αποικοδόμηση, έναν μηχανισμό που διατηρείται στους ανθρώπους και τον *C. elegans*. Το LIN28 είναι το ίδιο στόχος του let-7, σχηματίζοντας έναν αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης LIN28 είναι αυξημένα σε πολλούς όγκους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού και αυτό μετασχηματίζεται *in vitro*.

Υπάρχει μια ενδιαφέρουσα συσχέτιση μεταξύ του μήκους 3'UTR και του πολλαπλασιαστικού δείκτη. Οι κυτταρικές σειρές των όγκων έχουν μικρότερες 3'UTR από τους φυσιολογικούς ιστούς, λόγω της χρήσης και της διάσπασης της εναλλακτικής θέσης πολυαδενυλίωσης. Αυτές οι βραχύτερες μεταγραφές έχουν έλλειψη κάποιων ή όλων των θέσεων στόχων των miR, πράγμα που υποδηλώνει ότι η 3' εξαρτώμενη από την UTR μείωση της ρύθμισης μπορεί να επηρεαστεί κατά τη διάρκεια κακοήθους μετασχηματισμού. Αυτό επιβεβαιώνεται από μελέτες που

δείχνουν ότι πολλά ογκογόνα πράγματι ενεργοποιούνται από αυτόν τον μηχανισμό σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

4. Βασικά miR στον καρκίνο του μαστού

4.1. Η οικογένεια let-7

Η οικογένεια let-7 των 12 miR αναφέρεται συχνά ως τα αρχέτυπα miR καταστολής όγκων. Η Let-7 είναι απαραίτητη για τον προσδιορισμό του κυτταρικού τύπου κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης στο *C. elegans*. Στον ενήλικα άνθρωπο, η έκφραση είναι υψηλότερη στους τελικά διαφοροποιημένους επιθηλιακούς ιστούς. Έχει ένα μοναδικό μηχανισμό ελέγχου με τη μεσολάβηση της LIN28 που διατηρείται σε ζωικούς οργανισμούς από τον άνθρωπο μέχρι τον *C. elegans*. Η έκφραση της Let-7 χάνεται σε πρώιμο στάδιο της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού και η συνεχιζόμενη έκφραση σχετίζεται με όγκους τύπου ER-θετικού και αυλού A. Η έκφραση Let-7 ρυθμίζεται αρνητικά σε υποπληθυσμούς κυττάρων μαστού ποντικών με ιδιότητες παρόμοιες με τα βλαστοκύτταρα και κατά τη διάρκεια της μετάβασης επιθηλίου σε μεσέγγυμα. (epithelial-mesenchyme transition-EMT) (Le Quesne, 2010)

4.2. miR-34

Το miR-34 (οικογένεια τριών miR) ρυθμίζεται μεταγραφικά με την p53 και στοχεύει μια σειρά γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην απόπτωση, συμπεριλαμβανομένου του Bcl-2. Σε μία μελέτη των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού βρέθηκε ότι το 25% έχει μεθυλιωμένους προωθητές miR-34a. Τα επίπεδα miR-34 είναι ιδιαίτερα χαμηλά στις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όγκους ER- / PR- / HER2-, οι οποίες μπορεί να αντανάκλουν την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων της p53 σε αυτόν τον υπότυπο. Επιπλέον, αυτές οι σειρές είναι πιο ευαίσθητες στον κυτταρικό θάνατο που

προκαλείται από την ακτινοβολία και αυτό μπορεί να αντιστραφεί εν μέρει από την υπερέκφραση του miR-34. (Le Quesne, 2010)

4.3. miR-125

Τα miR-125a και miR-125b ταυτοποιήθηκαν νωρίς στην ανάπτυξη του πεδίου ως προς την απορρύθμιση των όγκων του μαστού και από τότε έχουν εντοπιστεί αρκετοί ενδιαφέροντες στόχοι mRNA. Το miR-125 καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και ευνοεί την απόπτωση στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού μέσω στόχευσης του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σταθεροποίησης RNA που ονομάζεται HuR, η οποία είναι και η ίδια ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού. Καταστέλλει επίσης την ανάπτυξη κυττάρων SKBR3 εξαρτώμενων από HER2 όταν υπερεκφράζονται τεχνητά, μέσω της στόχευσης των HER2 και HER3. Το miR-125b έχει επίσης αποδειχθεί ότι στοχεύει στη σχετιζόμενη με τον όγκο πρωτεΐνη CYP24, η οποία μεταβολίζει την αντιπολλαπλασιαστική καλσιτριόλη. Έτσι, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι το miR-125 έχει ογκοκατασταλτική δραστηριότητα. Εντούτοις, σε άλλα κύτταρα θηλαστικών, σχηματίζει ένα άλλο τμήμα της οδού p53, με αμφότερα τα μέλη της οικογένειας να στοχεύουν άμεσα το mRNA του p53 και να ρυθμίζουν τις αποπτωτικές αποκρίσεις στο άγχος. Έτσι, πάλι, υπάρχουν αντιφατικά και ενδεχομένως περιορισμένα ευρήματα όσον αφορά τη συμμετοχή αυτού του miR στον καρκίνο. (Le Quesne, 2010)

4.4. miR-200

Η οικογένεια miR-200 των 5 miRs είναι καταστολείς της EMT. Η άμεση στόχευσή τους στους μεταγραφικούς διαμορφωτές ZEB1 και ZEB2 έχει περιγραφεί αρκετές φορές. Τα ZEB1 και ZEB2 ρυθμίζουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στη διατήρηση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, στη ρύθμιση της E-καντερίνης και στην επαγωγή της βιμεντίνης. Το ZEB1 καταστέλλει

επίσης τη μεταγραφή τουλάχιστον δύο μελών της οικογένειας miR-200, δημιουργώντας ένα μηχανισμό προώθησης προς τα εμπρός, ο οποίος αναμένεται να διατηρήσει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο. Η έκφραση του miR-200 μειώνεται σε κύτταρα τα οποία έχουν εξαναγκαστεί σε EMT in vitro και είναι χαμηλή σε αρνητικές σε E-καντερίνη περιοχές του μεταπλαστικού όγκου του μαστού. Επιπλέον, η ενισχυμένη έκφραση του miR-200 μπορεί να αναστρέψει το EMT σε ένα μοντέλο κυτταρικής σειράς. Η οικογένεια εμπλέκεται επίσης στον φαινότυπο των βλαστοκυττάρων, ο οποίος ρυθμίζεται αρνητικά στα προγονικά κύτταρα του μαστού. Το miR-200c στοχεύει στο BMI1, έναν ρυθμιστή της ανανέωσης των βλαστικών κυττάρων και σε έναν μηχανισμό που είναι πιθανόν να εξαρτάται από τον BMI1. Η έκφραση miR-200c σε βλαστοκύτταρα που προέρχονται από όγκους καταστέλλει την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλο ξενομοσχεύματος. Μία μελέτη δείχνει ότι οι κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού ποντικού με υψηλότερα ποσά miR-200 είναι πιο ικανές να αποικίσουν απομακρυσμένες θέσεις σε μοντέλο ποντικού, παρά το γεγονός ότι διατηρούν την ικανότητά τους να καταστέλλουν την EMT σε αυτό το σύστημα. Οι συγγραφείς υποδεικνύουν ότι ενώ η EMT ευνοεί την μακρινή εξάπλωση, είναι μειονεκτική για την ανάπτυξη σε απομακρυσμένες περιοχές αυτού του συστήματος. (Le Quesne, 2010)

4.5. miR-205

Η φυσιολογική έκφραση του miR-205 στον μαστό περιορίζεται στο βασικό επιθήλιο και παρατηρείται επίσης στο δέρμα και το ουροθήλιο. Φαίνεται πιθανό να είναι ένας ουμπικουιτινωμένος δείκτης των βασικών κυττάρων στα στρωματοποιημένα επιθήλια. Η έκφρασή της γενικά έχει χαθεί νωρίς στην πρόοδο του καρκίνου του μαστού, αλλά η επίμονη (αν και μειωμένη) έκφραση συνδέεται με την παρουσία βασικών ανοσοϊστοχημικών δεικτών. Στο πλαίσιο των ER-/PR-/HER2-αρνητικών (δηλαδή βασικοκυτταρικών) όγκων, η απώλεια του miR-205 είναι ένας κακός προγνωστικός δείκτης, αν και σε ένα πολύ μικρό αριθμό περιπτώσεων. Το miR-205 συσχετίζεται με τη συμπεριφορά των βλαστικών κυττάρων σε μια κυτταρική σειρά μαστικού αδένου, αν και στον ώριμο μαστό εκφράζεται κυρίως σε (προφανώς) τελικά διαφοροποιημένα βασικά μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Το miR-205 έχει ρυθμιστεί αρνητικά ως προς την EMT, μαζί με την οικογένεια miR-200 και,

όπως και τα miR-200, στοχεύουν τόσο το ZEB1 όσο και το ZEB2. Επίσης, στοχεύει το HER3, το οποίο συνεργάζεται με τη μιτογόνο οδό HER2 και στην υπερέκφραση του miR-205, το οποίο μειώνει τον πολλαπλασιασμό στην κυτταρική καλλιέργεια και αυξάνει την ευαισθησία σε αναστολείς κινάσης τυροσίνης. Το miR-205 καταστέλλει τη μετάσταση στον πνεύμονα σε ένα ζωικό μοντέλο και εμπλέκει τα HER3 και VEGF-A. Ως εκ τούτου, το miR-205 είναι ένα miR που καταστέλλει τον όγκο. (Le Quesne, 2010)

4.6. miR-10

Η οικογένεια miR-10 αποτελείται από τα miR-10a και miR-10b. Αυξάνονται σε πολυάριθμους όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του εγκεφάλου, του παχέος εντέρου και του ήπατος. Και τα δύο γονίδια βρίσκονται εντός των ομάδων homeobox (Hox) των γονιδίων που είναι απαραίτητα για το φυσιολογικό σχηματισμό του σώματος στην ανάπτυξη σπονδυλωτών. Αυτά συν-ρυθμίζονται με τα γονίδια Hox, στοχεύουν πολλαπλά mRNA των Hox σε κύτταρα θηλαστικών και είναι απαραίτητα για την φυσιολογική ανάπτυξη του zebrafish.

Στον καρκίνο του μαστού, το miR-10a ενισχύεται και η έκφραση σχετίζεται με ER-θετικούς όγκους. Η υπερέκφραση του miR-10b ξεκινά τη διήθηση και τη μετάσταση σε μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού με καρκίνο του μαστού μέσω της στόχευσης του HoxD10. Η ίδια μελέτη αναφέρει μια συσχέτιση μεταξύ έκφρασης miR-10b και μετάστασης σε ανθρώπινους όγκους. Ωστόσο, μια επακόλουθη πολύ μεγαλύτερη μελέτη αποτυγχάνει να εντοπίσει αυτή τη συσχέτιση και αντιθέτως βρίσκει μια αρνητική συσχέτιση με το μέγεθος και την τάξη του όγκου. Παρά το γεγονός αυτό, το miR-10b σχετίζεται με τη μεταστατική συμπεριφορά στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και το HoxD10 χάνεται προοδευτικά στην πρόοδο των όγκων του μαστού. Σε αντίθεση με τον συμβατικό τρόπο στόχευσης mRNA, έχει επίσης αποδειχθεί ότι το miR-10a επηρεάζει άμεσα τη μεταγραφή του HoxD4 στον καρκίνο του μαστού, κατευθύνοντας τη μεθυλίωση CpG στην περιοχή του υποκινητή του HoxD4.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό της δραστηριότητας των miR-10 είναι ιδιαίτερα εκπληκτικό. Το miR-10a συνδέεται με διάφορα mRNA μέσω των 5'UTR. Έχει μη κανονικές θέσεις πρόσδεσης στα 5'UTR πολλών mRNA ορμονών τελικής ολιγοπυριμιδίνης (Terminal OligoPyrimidine-TOP), τα οποία κωδικοποιούν ριβοσωματικές πρωτεΐνες και παράγοντες έναρξης της μετάφρασης. Η δέσμευση του miR-10a προκαλεί θετική ρύθμιση της μετάφρασης αυτών των mRNA και η υπερέκφραση miR-10a βοηθά τον μετασχηματισμό που κατευθύνεται από τα RAS σε κυτταρική καλλιέργεια. Είναι προκλητικό να υποθέσουμε ότι αυτό μπορεί να είναι ένας μιτογόνος μηχανισμός στους όγκους, αλλά υπάρχουν λίγα στοιχεία για αυτό μέχρι τώρα. (Le Quesne, 2010)

4.7. miR-21

Ο miR-21 ήταν ένα από τα πρώτα ογκογόνα miR που χαρακτηρίστηκαν ότι ρυθμίζονται θετικά σε πολυάριθμους όγκους, ένα εύρημα που παρατηρήθηκε αρχικά στο γλοιοβλάστωμα και σύντομα στη συνέχεια στον καρκίνο του μαστού. Η υπερέκφραση του miR-21 σε όγκους του μαστού επιβεβαιώνεται με υβριδοποίηση in situ, η οποία επίσης καταδεικνύει ότι σε πολλούς όγκους παρατηρείται επίσης υπερέκφραση miR-21 σε ενδομυϊκούς ινοβλάστες. Η έκφραση miR-21 σε όγκους του μαστού συνολικά σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο και μετάσταση και με κακό προσδόκιμο επιβίωσης ανεξάρτητα από το στάδιο. Η καταστολή του miR-21 αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου που προέρχεται από MCF7 σε μοντέλα ξενομοσχεύματος μέσω μειωμένου πολλαπλασιασμού και αυξημένης απόπτωσης και το Bcl-2 εμπλέκεται ως ένας πιθανός στόχος miR-21. Αυτό το εύρημα δεν έχει επιβεβαιωθεί, αλλά έχουν μελετηθεί καλά άλλοι στόχοι.

Αυτοί περιλαμβάνουν την τροπομυοσίνη 1 (TPM1), η οποία καταστέλλει την “ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση” ανάπτυξη in vitro, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο 4 (Programmed Cell Death 4-PDCD4), έναν πολυλειτουργικό καταστολέα όγκου με ρόλο στην αναστολή της μετάφρασης και την maspin (mammary serine protease inhibitor), μια πρωτεΐνη που καταστέλλει τον όγκο. Το miR-21 είναι επίσης πιθανό να στοχεύσει τον καταστολέα όγκων PTEN στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ έκφρασης miR-21 και

απώλειας έκφρασης PTEN στον καρκίνο του μαστού. Αυτοί και άλλοι υποτιθέμενοι στόχοι του miR-21 αναμένεται να συνεισφέρουν σε διάφορα χαρακτηριστικά του μετασχηματισμένου φαινότυπου. (Le Quesne, 2010, Mac Farlane & Murphy, 2010 & Chan et al., 2005)

4.8. miR-17-92

Η συστάδα του miR-17-92 μεταγράφεται ως μία ενιαία μονάδα. Περιέχονται 15 ώριμα miR συνολικά, που περιέχουν τις οικογένειες miR-17, miR-18, miR-19, miR-20, miR-25, miR-92, miR-106 και miR-363. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ότι η συστάδα του miR-17-92 ενισχύεται στα λεμφώματα και τα μέλη της συστάδας αρχικά αναφέρθηκαν ως υπερ-εκφρασμένα σε συμπαγείς όγκους συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων και του μαστού. Η αναγκαστική υπερέκφραση της συστάδας προκαλεί επιταχυνόμενο κακοήγη μετασχηματισμό σε μοντέλο λεμφώματος ποντικού. Και οι τρεις συστάδες έχουν διαγραφεί σε διαγονιδιακούς ποντικούς, με επακόλουθα ελαττώματα στην καρδιοπνευμονική ανάπτυξη, στη λειτουργία των ανοσοκυττάρων και το θάνατο του εμβρύου στη μέση της κύησης.

Ήταν έκπληξη το γεγονός ότι η συστάδα του miR-17-92 τείνει να διαγραφεί σε όγκους του μαστού. Περαιτέρω, στα κύτταρα του μαστού το miR-17 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την ανάπτυξη με στόχευση του ογκογονιδίου AIB1, που ενισχύει τα αποτελέσματα διενεργοποίησης του υποδοχέα οιστρογόνου. Η συστάδα του miR-17-92 καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του καρκίνου του μαστού σε κυτταρική καλλιέργεια, με άμεση στόχευση της κυκλίνης D1, η οποία η ίδια προκαλεί την έκφραση του συμπλέγματος, σχηματίζοντας έναν αρνητικό βρόχο ανάδρασης. Μέχρι στιγμής, αυτά τα μηχανιστικά στοιχεία δείχνουν ότι το σύμπλεγμα είναι κατασταλτικό του όγκου στον καρκίνο του μαστού. Εντούτοις, η συστάδα βρέθηκε να είναι σχετικά θετικά ρυθμισμένη σε βασικοκυτταρικούς όγκους. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτοί οι όγκοι είναι συχνά ανεπαρκείς στον ρυθμιστή σηματοδότησης PI3-κινάσης PTEN που καταστέλλει όγκους και έχει αποδειχθεί ότι το PTEN έχει στοχευθεί από το miR-19 σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων. Επομένως, το miR-19

είναι ογκογονικό, ειδικά σε ER-αρνητικούς όγκους όπου η AIB1 αναμένεται να είναι ανενεργή.

Τι συμβαίνει όμως με άλλες “παραλογικές” συστάδες; Το miR-25 και το miR-106b, σε ένα ιντρονικό σύμπλεγμα εντός του γονιδίου MCM7 στο χρωμόσωμα 7, ενισχύονται σε όγκους του μαστού και εκφράζονται σε όγκους. Το miR-106b είναι ένας στενός συγγενής του miR-17, με μια πανομοιότυπη ακολουθία “seed”, αλλά παραδόξως έχει δείχθει ότι προάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου μέσω της στόχευσης του εξαρτώμενου από κυκλίνη αναστολέα κινάσης p21. Έτσι, μια απλοϊκή εικόνα των miR-17-92 ως ογκογονικής ομάδας των miR είναι ανεπαρκής. Φαίνεται ότι ορισμένα μέλη είναι ογκογονικά και μερικά είναι ογκοκατασταλτικά με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον και απαιτούνται περαιτέρω εργασίες προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι προφανώς αντιφατικές δραστηριότητες αυτών των miR στον καρκίνο του μαστού. (Le Quesne, 2010, Mac Farlane & Murphy, 2010 & Hossain et al., 2006)

4.9. miR-15 και miR-16

Η miR15/16 οικογένεια των miRNA έχει τέσσερα μέλη που είναι υποτιθέμενοι καταστολείς όγκου. Αυτά τα μέλη οργανώνονται σε δύο διακριτές ομάδες, miR15a/miR16-1 που βρίσκονται στο 13q14.3 και miR15b/miR16-2 στο 3q26. Και τα τέσσερα miRNA μοιράζονται μια περιοχή 9 νουκλεοτιδίων που στοχεύει την 3'UTR της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL2 για μετα-μεταγραφική καταστολή. Η ογκογονική πρωτεΐνη BCL2, που συνήθως εκφράζεται σε διάφορους όγκους και κακοήθειες του αιμοποιητικού, προάγει την κυτταρική επιβίωση αποφεύγοντας την απόπτωση.

Η ομάδα miR15a/16-1 miRNA βρέθηκε να είναι μια συχνή περιοχή διαγραφής σε ασθενείς με χρόνια B-λεμφοκυτταρική λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia-CLL). Τα στοιχεία δείχνουν ότι στην περίπτωση αυτή η απουσία miR15a/16-1 σχετίζεται με απώλεια ρύθμισης που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης BCL2. Το BCL2 λειτουργεί για να εμποδίσει την απόπτωση αναστέλλοντας την απελευθέρωση του μιτοχondριακού κυτοχρώματος C

που είναι απαραίτητο για να ενεργοποιήσει την οδό κασπάσης των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Συνολικά, το συμπέρασμα είναι ότι η φυσιολογική έκφραση miR15a/16-1 επάγει ενδογενείς οδούς απόπτωσης με τη μεσολάβηση της καταστολής BCL2.

Μια πρόσφατη μελέτη με επίκεντρο την έκφραση miR15b/miR16-2 βρήκε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν με το miR15a/16-1. Επιπρόσθετα, υπήρξαν αποδείξεις ότι το miR15b/miR16-2 παίζει ρόλο στην αύξηση της χημειοευαισθησίας. Υποτίθεται ότι η καταστολή του BCL2 μέσω του miR15b/miR16-2 μειώνει την ευαισθησία του κυττάρου στην απόπτωση που προκαλείται από φάρμακα.

Η οικογένεια miR15/16 έχει πολλούς προβλεπόμενους στόχους εκτός από το BCL2. Υπολογιστικοί αλγόριθμοι και πρωτεϊνωματική ανάλυση προβλέπουν μια ποικιλία στόχων που συνδέονται με την κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν πρόκειται για άμεσους ή έμμεσους στόχους miRNA. (MacFarlane & Murphy, 2010 & Xia et al., 2008)

5. Δυναμικό των miRNAs ως βιοδείκτες του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής ασθένεια με αρκετές μορφολογικές εμφανίσεις, μοριακά χαρακτηριστικά, συμπεριφορές και απόκριση στη θεραπεία. Η θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού βασίζεται στη διαθεσιμότητα ισχυρών διαγνωστικών και προγνωστικών παραγόντων που καθοδηγούν την απόφαση και την επιλογή διαφορετικών μεθόδων θεραπείας. Τα τρέχοντα in vivo διαγνωστικά εργαλεία για τον καρκίνο του μαστού, π.χ., μαστογραφία και υπερηχογράφημα, χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση πρώιμου σταδίου. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί τεχνικοί περιορισμοί για αυτές τις μεθόδους, όπως η πυκνότητα του μαστού ή η ανίχνευση ελασβεστώσεων. Άλλες μορφές απεικόνισης, π.χ. απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), έχουν προταθεί ως συμπληρωματικές διαγνωστικές μέθοδοι, με περιορισμένη ευαισθησία.

Ορισμένες πρωτεΐνες έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνο του μαστού με την ανάλυση επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων mRNA, π.χ., το καρκινοεμβρυικό αντιγόνο (Carcinoembryonic Antigen-CEA) και το CA-125 (Cancer Antigen-CA). Για τη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου του μαστού, υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμες διάφορες γενετικές εξετάσεις με βάση το mRNA, όπως η δοκιμασία PAM50 (βασισμένη στην τεχνολογία NanoString), η ανάλυση MammaTyper (με βάση την τεχνολογία qRT-PCR), η δοκιμασία MammaPrint (με βάση την τεχνολογία microarray), η Oncotype DX (με βάση την τεχνολογία qRT-PCR), η Endopredict (βασισμένη στην τεχνολογία qRT-PCR) και ο δείκτης γενωμικού βαθμού (με βάση την τεχνολογία microarray). Η χρήση ανεξάρτητων πυρήνων για τη δοκιμή γονιδιακής έκφρασης στον καρκίνο του μαστού, που προέρχεται από διαφορετικές γονιδιακές υπογραφές, μπορεί να είναι μια επιτυχημένη στρατηγική για να ξεπεραστεί η ετερογένεια του όγκου και το σφάλμα δειγματοληψίας.

Αν και οι άμεσες μετρήσεις των βιοδεικτών γονιδίων ιστών έχουν βελτιώσει σημαντικά τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού, η διεισδυτική και δυσάρεστη φύση των διαγνωστικών διαδικασιών περιορίζει την εφαρμογή τους. Η απομόνωση και ο επακόλουθος χαρακτηρισμός των κυκλοφορούντων miRNA παρέχουν την ευκαιρία να παρακαμφθούν τα προβλήματα που σχετίζονται με τη βιοψία ιστών, η οποία απαιτείται σύμφωνα με τις διαθέσιμες σήμερα γενετικές εξετάσεις. Στην πραγματικότητα, τα miRNA που κυκλοφορούν είναι μικρά μόρια, που βρίσκονται στα σωματικά υγρά (αίμα, πλάσμα, ορός, σίελος, ούρα). Όντας σημαντικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και εφόσον απορρυθμίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνων, τα κυκλοφορούντα miRNA έχουν καταστεί ενδιαφέροντα στη νέα έρευνα για τους βιοδείκτες του καρκίνου. Έχουν βρεθεί ότι είναι σταθερά και εκφράζονται συγκεκριμένα σε μαστικούς ιστούς και σε σωματικά υγρά, όταν η νόσος είναι σε εξέλιξη. Αυτά τα χαρακτηριστικά τους επιτρέπουν να ανταποκρίνονται στις τρέχουσες κλινικές ανάγκες, επιτρέποντάς τους να χρησιμοποιηθούν ως εύκολοι, οικονομικά και κλινικά προσιτοί μοριακοί βιοδείκτες στην αναδρομική ανάλυση μεγάλων συλλογών ιστών και για τη διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη θεραπευτικών αποτελεσμάτων στον καρκίνο του μαστού. (Bertoli, 2015)

5.1. Τα miRNA που απορρυθμίζονται στον καρκίνο του μαστού

Αρκετές μελέτες εξέτασαν πιθανά συγκεκριμένα miRNA που απορρυθμίζονται στον καρκίνο του μαστού με διαγνωστικό σκοπό. Τα απορρυθμισμένα miRNAs μπορούν να χωριστούν σε 2 ομάδες, είτε τα ρυθμισμένα θετικά ή τα ρυθμισμένα αρνητικά (Πίνακας 4). Η αυξημένη έκφραση του miR-21 έχει βρεθεί *in vitro* σε ανθρώπινες BC (Breast Cancer-BC) κυτταρικές σειρές και ιστούς, παίζοντας κύριο ρόλο σε όλες τις φάσεις της παθογένειας του καρκίνου του μαστού, παρόλο που φαίνεται επίσης να έχει την ικανότητα να ελέγχει την έναρξη του καρκίνου του μαστού. Η δράση του miR-21 ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το σημείο ελέγχου G2/M και τη διάχυση των μεταστάσεων, καθώς και την έκφραση πολλών αντι-ογκογόνων, συμπεριλαμβανομένου του TPM1, του PDCD4, του maspin και του Bcl-2, για τη στήριξη της μετάστασης και της υπερπλασίας των κυττάρων καρκίνου του μαστού.

Πίνακας 4: Ρυθμισμένα miRNA στον BC (Bertoli, 2015)

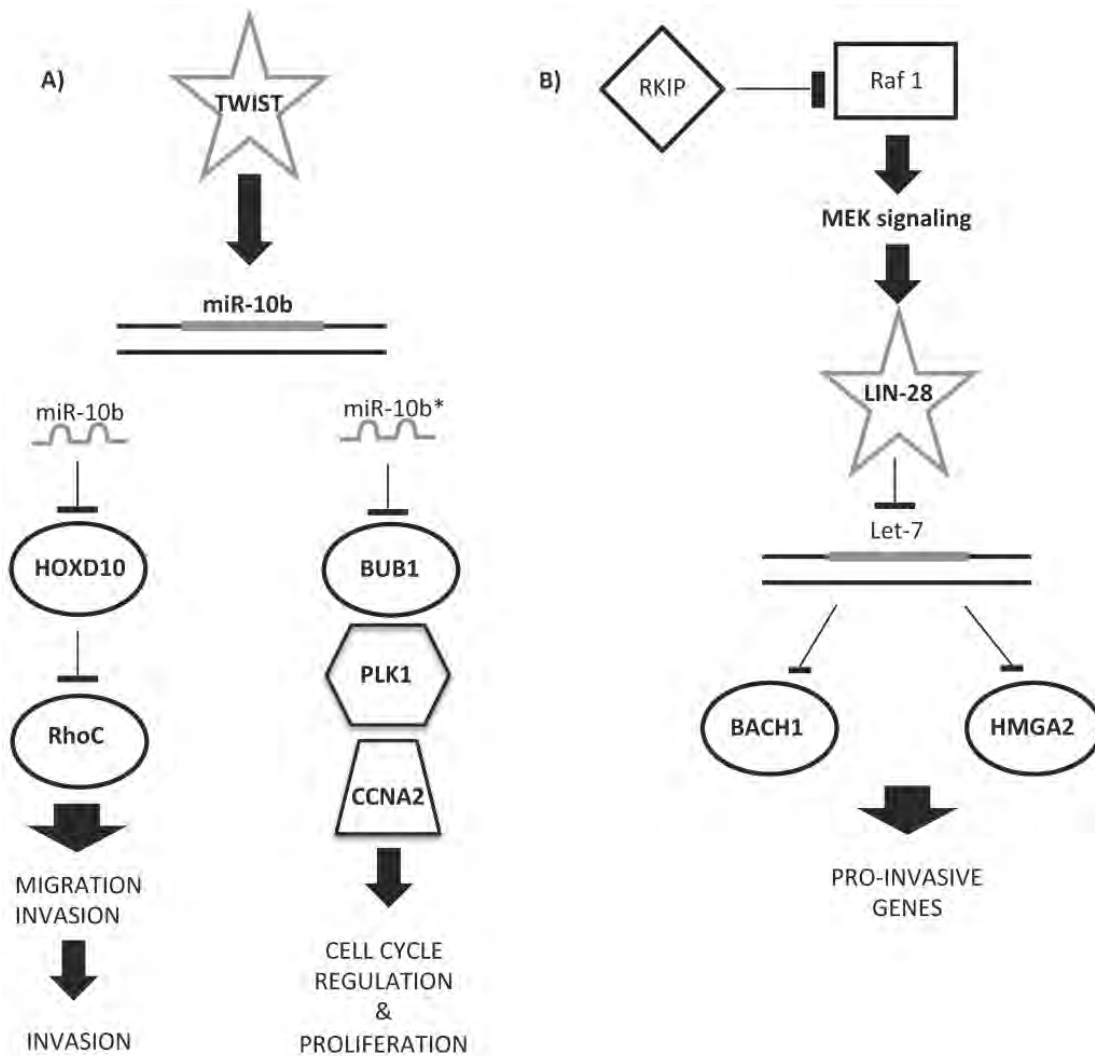
	miRNA	Είδος δείγματος
Θετικά ρυθμισμένα miRNAs	miR-21	Κυτταρικές σειρές BC
	Σύμπλεγμα miR-221/222	Κυτταρικές σειρές BC
	miR-9, miR10b, miR-29a, miR-96, miR-146a, miR-181, miR-373, miR-375, miR-520c, miR589	Κυτταρικές σειρές BC
	miR-10b	Κυτταρικές σειρές BC
	miR-155	Κυτταρικές σειρές BC
	miR-210	Κυτταρικές σειρές BC
Αρνητικά ρυθμισμένα miRNAs	miR-30, miR-31, miR-34, miR-93, miR-126, miR-146a, miR-195, miR-205, miR-206, miR-503	Κυτταρικές σειρές: BC και TNBC
	Οικογένεια let-7	Κυτταρικές σειρές BC
	Σύμπλεγμα miR-92a	Κυτταρικές σειρές: BC και TNBC
	Οικογένεια miR-200	Κυτταρικές σειρές BC
	Σύμπλεγμα miR-15/16, miR-103/107, miR-145, miR-335, miR-128b	Κυτταρικές σειρές BC
	miR-10b*	Κυτταρικές σειρές BC και ξеноγραφημένος όγκος

Αρκετά άλλα miRNA έχουν επικυρωθεί ότι υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού. Αυτά περιλαμβάνουν το σύμπλεγμα miR-221/222, miR-9, miR10b, miR-29a, miR-96, miR-146a, miR-181, miR-373, miR-375, miR-520c και miR589, υπογραμμίζοντας την πιθανή χρήση τους για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τις θεραπευτικές μελέτες. Κάποια θετικά ρυθμισμένα miRNA θα μπορούσαν να συνεργαστούν για τον έλεγχο ενός δικτύου λειτουργικών γονιδίων για να βοηθήσουν στην ανάπτυξη του όγκου ή στη μετάσταση. Η εικόνα 10 δείχνει παραδείγματα ρυθμιστικών δικτύων miRNA στον καρκίνο του μαστού που προάγουν τη μετάσταση μέσω της ικανότητάς τους να στοχεύουν συντονισμένα πολλαπλά γονίδια. Έχει αποδειχθεί ο ρόλος του miR-10b ως οδηγού μετάστασης: το miR-10b, υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα TWIST, δεσμεύει το γονίδιο HOXD10, ενισχύοντας τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων. Το HOXD10, με τη σειρά του, αναστέλλει την οικογένεια των ομολόγων γονιδίων Ras, την πρωτεΐνη μέλους C (RHOC), ευνοώντας τη μεταστατική διάχυση του όγκου (Εικόνα 10A). Ο γενετικός τύπος miR-10b κωδικοποιεί επίσης το miR-10b*/miR10b-3p. Το miR-10b*, αν και θεωρήθηκε λειτουργικά άσχετο, αποδείχθηκε πολύ πρόσφατα ότι είναι σημαντικό για την έξαρση και την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Ως εκ τούτου, αν η θετική ρύθμιση του miR-10b-5p οδηγεί στην επαγωγή παραγόντων ανασχηματισμού ECM για μεταστατική εισβολή, η αρνητική ρύθμιση του miR-10b-3p εμπλέκεται στην αρχική έναρξη και εξέλιξη του καρκίνου, καθώς η υπερέκφρασή του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του καρκινικού κυττάρου στοχεύοντας ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου (BUB1, PLK1 και CCNA2).

Μεταξύ των αρνητικά ρυθμισμένων miRNA, τα miR-30a, miR-31, miR34, miR-93, miR-125, miR-126, miR-146a, miR-195, miR-200, miR-205, και το let-7 έχει αποδειχθεί ότι έχουν ένα ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου μέσω της απώλειας της ογκοκατασταλτικής ιδιότητας. Συνολικά, οι κύριοι μηχανισμοί που επηρεάζονται από τα αρνητικά ρυθμισμένα miRNA είναι ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός και η μετάδοση των μεταστάσεων. Μεταξύ των προαναφερθέντων, μέλη της οικογένειας let-7 έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, καθώς λειτουργούν φυσιολογικά ως καταστολείς όγκων και συχνά αδρανοποιούνται στον καρκίνο. Τα miRNA έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν πολλαπλά

ογκογόνα, όπως το RAS, το c-Myc και την κασπάση-3 και πολλά γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση του φαινοτύπου των βλαστοκυττάρων. Έτσι, η μείωση της ρύθμισης των μελών της οικογένειας let-7 θα μπορούσε να είναι ένα από τα βασικά συμβάντα στην έναρξη του καρκίνου λόγω της απόκτησης ιδιοτήτων που μοιάζουν με αυτές των βλαστοκυττάρων. Τα μέλη της οικογένειας let-7 συγκαταλέγονται μεταξύ των πιο αναπαραγόμενων βιοδεικτών που εντοπίστηκαν στην *in silico* έρευνα της συμβολής του miRNA στον καρκίνο του μαστού. Στην πραγματικότητα, η οικογένεια let-7 είναι παρούσα σε αρκετές υπογραφές έκφρασης miRNA των καρκινικών ιστών του μαστού και επίσης σε άλλους τύπους όγκων.

Το miR-92a είναι ένα άλλο ενδεχομένως αρνητικά ρυθμισμένο miRNA. Αυτό το miRNA ανήκει στην οικογένεια miR-17-92, που μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό του όγκου με έλεγχο της οδού PI3K/Akt/mTOR. Επιπλέον, αυτό το miRNA έχει ως στόχους τον Bcl-2 αλληλεπιδρώντα μεσολαβητή κυτταρικού θανάτου (Bcl-2 interacting mediator-Bim) και πρωτεΐνες p53, αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση των κυττάρων του όγκου και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου και προάγοντας την ογκογένεση. Επιπλέον, εμπλέκεται στην προαγωγή της εισβολής και της μετάστασης του όγκου μέσω της διαμόρφωσης της οδού σηματοδότησης του TGF-β. (Bertoli, 2015)



Εικόνα 10: Παραδείγματα ρυθμιστικών δικτύων miRNA στον καρκίνο του μαστού που προάγουν τη μετάσταση. A) Δύο παραδείγματα του ρόλου του miR-10b/10b* στη ρύθμιση είτε των διεργασιών μετανάστευσης και εισβολής (αριστερή πλευρά) είτε του κυτταρικού κύκλου και πολλαπλασιασμού (δεξιά πλευρά). B) Παράδειγμα ρυθμιστικού ρόλου του let-7 στον έλεγχο του προ-διεσδυτικού γονιδιακού δικτύου. (Bertoli, 2015)

Ένα άλλο αρνητικά ρυθμισμένο miRNA, το miR-206, έχει βρεθεί ότι υποεκφράζεται σε καρκίνο του μαστού με (ER) α-θετικό υποδοχέα οιστρογόνου, τόσο σε δείγματα ασθενών όσο και σε κυτταρικές σειρές BC και σε μεταστατικό καρκίνο στον λεμφαδένα. Αναφορικά με τις λειτουργίες του, έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την 3'UTR της κυκλίνης D1, επάγοντας τη διακοπή της G1 και προκαλώντας μια ελάττωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κύτταρα BC, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρόλο ως καταστολέας όγκου. Έχει αποδειχθεί ότι το miR-206 ρυθμίζει το ERα μέσω αλληλεπίδρασης με την 3' UTR του, επιδεικνύοντας ειδικό ρόλο στους πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου του μαστού.

Άλλα αρνητικά ρυθμισμένα miRNA, τυπικά για τους ιστούς BC, είναι μια ομάδα miRNA που εκφράζονται συνήθως σε βλαστοκύτταρα. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει την οικογένεια miR-200, miR-15/16, miR-103/107, miR-128b, miR-145 και miR-335. Όλα αυτά τα miRNA ρυθμίζονται αρνητικά σε καρκινικά βλαστοκύτταρα (Cancer Stem Cells-CSC), στοχεύοντας κοινά γονίδια (συστατικά των Bmi1 και Suz12, Zeb1/2 και Klf4), όλα τα οποία ανήκουν σε ένα ρυθμιστικό κύκλωμα που διατηρεί την κατάσταση των CSC του μαστού. (Bertoli, 2015)

5.2. Τα miRNA ως βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης και πρόβλεψης της θεραπείας σε BC

Έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για τον εντοπισμό προσιτών υπογραφών του BC για διάγνωση, πρόγνωση και πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης (Πίνακας 4). Όσον αφορά τη διάγνωση, οι Iorio et al. αναγνώρισαν μια υπογραφή 13 miRNA που θα μπορούσε να διαφοροποιήσει τον BC από τους κανονικούς ιστούς μαστού με ακρίβεια 100%. Οι Blenkiron et al. εντόπισαν 133 miRNA που εμφανίζουν ανώμαλα επίπεδα έκφρασης σε ιστούς όγκου μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς μαστού. Παρά την ταύτιση του miRNA με παρεκκλίνουσα έκφραση στους ιστούς BC, παραμένουν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υπογραφών miRNA. Αυτό οφείλεται πιθανώς στην εγγενή ετερογένεια του BC και λόγω των κλινικοπαθολογικών μεταβλητών όπως το στάδιο του όγκου, η αγγειακή εισβολή, ο δείκτης πολλαπλασιασμού και η έκφραση του υποδοχέα HER2, ER ή προγεστερόνης (progesterone receptor-PR). Έτσι, έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί μια υπογραφή miRNA που να αντανakλά τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου. Στο απλούστερο επίπεδο, ο BC περιλαμβάνει 3 διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους: με θετικούς υποδοχείς ορμονικών υποδοχέων (ER +, PR +), οι οποίοι καλύπτουν περίπου το 60% -70% των διαγνωσμένων καρκίνων, οι HER2+ όγκοι, οι οποίοι καλύπτουν το 15% -20% των διαγνωσμένων BC και οι τριπλά αρνητικοί (ER-, PR-, HER2-) όγκοι. Ο προσδιορισμός γονιδιωματικού mRNA έχει υποδιαιρέσει τον BC σε 4 διαφορετικές κατηγορίες: luminal A (ER + & low grade), luminal B (ER + & high grade), HER2 + και basal like (κυρίως τριπλά αρνητικοί). (Blenkiron, 2007)

Οι Blenkiron et al. προσπάθησαν να συσχετίσουν ένα προφίλ miRNA με κάθε μία από αυτές τις γονιδιωματικές κατηγορίες. Μεταξύ των 309 miRNA που εντοπίστηκαν σε 93 ιστούς BC, 9 miRNA (miR-15b, miR-99a, miR-100, miR-103, miR-107, miR-126*, miR-130a, miR-136 και miR-146b) μπορούσαν να διακρίνουν τον luminal A από τον luminal B BC. Στη συνέχεια, οι Lowery et al. αναγνώρισαν 15 miRNA που αντιστοιχούν στην έκφραση των ER (miR-135b, miR-190, miR-217, miR-218, miR-299 και miR-342), PR (miR-377, miR-520f, miR-520g και miR-527-518a) και τον υποδοχέα HER2 (miR-30e, miR-181c, miR-320c, miR-376b και miR-520d). Η ίδια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε από τους Volinia et al., που αντιστοιχούν στην αναγνώριση μιας υπογραφής 17 miRNA για την κατάσταση των ER (miR-30d και miR-30e), PR (miR-19a, miR-29c, miR-30a-5p και miR-106b), HER2+ (let-7f, let-7g, miR-10b, miR-107, miR-126, miR-154 και miR-159) και ER/PR (miR-25, miR-142-5p, miR-200a και miR-205). (Blenkiron, 2007 & Lowery, 2009)

Τέλος, οι Foekens et al. περιγράφουν ένα υποσύνολο των miRNA που σχετίζονται σημαντικά με την υπογραφή των ER+ όγκων, προσδιορίζοντας ιδιαίτερα 4 miRNA που σχετίζονται με την επιθετικότητα του BC. Οι αποκλίσεις μεταξύ των διαφορετικών μελετών υπογραφής του miRNA θα μπορούσαν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι τα miRNA που εντοπίστηκαν σε κάθε μελέτη δεν εξετάστηκαν στις άλλες, εκτός από άλλες μεταβλητές όπως οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι του όγκου (μέγεθος όγκου, βαθμός κλπ.) ή η χρήση διαφορετικών τεχνικών ανίχνευσης (RT-PCR, αλληλούχιση επόμενης γενιάς, κ.λπ.) (Foekens, 2008)

Ως εκ τούτου, ξεκινώντας από δημόσιες βάσεις δεδομένων που περιέχουν προφίλ γονιδιακής έκφρασης, πληροφορίες αριθμού αντιγράφων και προφίλ miRNA, περιγράψαμε 4 νέες miRNA-βασισμένες υπογραφές, προσδιορίζοντας μια μικρή ομάδα miRNA χαρακτηριστικών για τον καρκίνο του μαστού, οι οποίες μπορούσαν να διακρίνουν τις διαφορετικές ποιότητες των καρκινικών ιστών. Διάφορες άλλες μικρές υπογραφές ή μεμονωμένα miRNA έχουν προταθεί με διαγνωστικό ή προγνωστικό σκοπό.

Όλα τα περιγραφόμενα miRNA συνοψίζονται στον Πίνακα 5, τμήμα "Μη κυκλοφορούντα miRNAs". Η παρατήρηση ότι τα miRNA μπορεί να εκκρίνονται από έναν συμπαγή όγκο στο περιβάλλον του και ότι είναι σταθερά στα σωματικά υγρά

καθιστούν τα miRNA υποσχόμενους στόχους εύκολα εντοπιζόμενους στο αίμα, στο πλάσμα και στον ορό. Έχουν γίνει μερικές προσπάθειες για την ταυτοποίηση miRNA μονής κυκλοφορίας με διαγνωστικό ή προγνωστικό σκοπό (Πίνακας 4, ενότητα "Κυκλοφορούντα miRNAs"). Λίγα παραδείγματα μονών κυκλοφορούντων miRNA υποψήφιων ως διαγνωστικά ή προγνωστικά εργαλεία έχουν προταθεί από τους Roth et al., οι οποίοι βρήκαν το miR-155 στον ορό ασθενών με BC και όχι σε υγιείς μάρτυρες, και από τους Heneghan et al. που βρήκαν αυξημένη έκφραση του miR-195 στο αίμα μόνο ασθενών με BC. Άλλα miRNA έχουν ανιχνευθεί στον ορό ασθενών με BC, όπως το miR-29a και miR-21 ή η υπογραφή 4-miRNA από τους Hu et al. (miR-16, miR-25, miR-222 και miR-324-3p) (Πίνακας 5). (Roth, 2010, Heneghan, 2010, Hu, 2012 & Bertoli, 2015)

Πίνακας 5: Κυκλοφορούντα και μη κυκλοφορούντα miRNA ως βιοδείκτες του BC. Όλα τα αναφερόμενα miRNA είναι επιβεβαιωμένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Για κάθε ένα miRNA, σημειώνεται αν έχουν ένα ρόλο στην διάγνωση, πρόγνωση και στην πρόβλεψη της απάντησης σε θεραπεία του BC. Για όλες τις ομάδες υποδεικνύονται τα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. TAM=ταμοξιφένη, H=Herceptin, N=φυσιολογικός ιστός, T=ιστός όγκου, TNBC=Τριπλός αρνητικός καρκίνος. (Bertoli et al., Theranostics 2015)

Είδος miRNA	MiRNA	Ρόλος	Βιολογικό δείγμα	Τεχνική	Αποτελέσματα
Μη κυκλοφορούντα miRNAs	13 miRNAs (miR-9-1, miR-10b, miR-21, miR-34, miR-29b/102, miR126, miR125a/b1/b2, miR-140as, miR-145, miR-155, miR-194, miR-204, miR-213	Διάγνωση	Ιστός	Microarray και northern blot/ 76 BC vs 10 N	4/13 είναι αρνητικά ρυθμισμένα (5 miRNA είναι τα πιο συχνά απορρυθμισμένα στον BC)
	133 miRNAs	Διάγνωση	Ιστός	Microarray/ 99 BC vs 5N και 33 κυτταρικές σειρές BC	31 miRNA είναι συσχετισμένα με υποτύπους των όγκων ή τους κλινικά παθολογικούς παράγοντες
	15 miRNAs miR-342, miR-299, miR-217, miR-190, miR-135b, miR-218, miR-520g, miR-	Διάγνωση	Ιστός	Microarray/ 95BC vs 17N	ER+, PR+, HER2/neu+

377, miR-527-518a, miR-520f-520c, miR-520d, miR-181c, miR-302c, miR-376b, miR-30e					
6 miRNAs miR-21, miR-17-5p, miR-29b-2, miR-146, miR-155, miR-181b-1	Διάγνωση	Ιστός	Microarray/ 363 T v 177 N	31% των συνολικών miRNA ποικίλλει μεταξύ των ιστών T και N. Έχουν ταυτοποιηθεί τα πιο συχνά τροποποιημένα miRNA σε όγκους	
miR-7, miR-128a, miR-210, miR-516-3p, miR-210	Διάγνωση	Ιστός	TaqMan/185 ER+ v 114 ER-	4 miRNA συσχετισμένα με την επιθετικότητα των όγκων σε ER+ BC και το miR-210 σχετίζεται με την επανεμφάνιση σε ER-	
let-7c, miR320dmiR567, miR139-5p	Διάγνωση	Ιστός	Microarray/ 42 BC G1 vs 42 BC G3	4 miRNA υπογραφές	
let-7a, miR-335	Διάγνωση και πρόγνωση	Ιστός	TaqMan/ 60BC vs 60N	Όλα τα miRNA μειώνονται σε φορείς μετάλλαξης BRCA. Το miRNA-335 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης	
miR-155, miR-493, miR-30e, miR-27 ^a	Διάγνωση και πρόγνωση	Ιστός	Microarray/ 80 high risk vs 80 low risk	2 θετικά ρυθμισμένα, «προστατευτικά» miRNA (miRNA-155, miR-493). 2 αρνητικά ρυθμισμένα miRNA (miRNA-30e, miR-27a)	
miR-210, miR-148a	Πρόγνωση	Ιστός	qRT-PCR/ 89 ER+ BC + TAM vs 56N	Τα miRNA-210 και miR-148a σχετίζονται με επιβίωση χωρίς επανεμφάνιση	

miR-190b, miR-338-5p, miR-520-3p/g/h, miR-139-3p, miR-204, miR-502-5p, miR-365, miR-363, miR-7	Πρόβλεψη της απάντησης στην θεραπεία (TAM)	Ιστός	Microarray/ 26 ασθενείς με επανεμφάνιση vs 26 ασθενείς χωρίς	Το miR-7 σχετίζεται με το στάδιο του όγκου
miR-30c, miR-422a, miR-30a-3p, miR-187, miR-182	Πρόβλεψη της απάντησης στην θεραπεία (TAM)	Ιστός	qRT-PCR/ 38 ER+ BC vs 15 BC + TAM	Υψηλές συγκεντρώσεις των miR-30a-3p, miR-30c και miR-182 σχετίζονται με τα οφέλη της θεραπείας
miR-21, miR-181b, miR-26a/26b, miR-27b, miR-23b, οικογένεια let-7, miR-125a-5p/b-5p	Πρόβλεψη της απάντησης στην θεραπεία (TAM)	Ιστός και κυτταρικές σειρές	qRT-PCR/ i) κυτταρικές σειρές BC με ή χωρίς ER ενεργοποίηση ii) 15 ER+ BC+ exemestane and TAM	Όλα τα miRNA είναι θετικά ρυθμισμένα στη θεραπεία εναντίον των οιστρογόνων.
miR-26a, miR-30b,	Πρόβλεψη	Ιστός	Microarray/ 83 BC	Με την τεχνική SVM, αναπτύσσονται 35 miRNA

	οικογένεια let-7, miR-125a/b	της απάντησης στην θεραπεία (H)		+ H vs γειτονικά στρωματικά διατεταγμένα κύτταρα	υπογραφές για την απάντηση στη θεραπεία με H
Κυκλοφορούντα miRNAs	miR-155	Διάγνωση	Ορός	qRT-PCR/ 89BC vs 29N	Το miR-155 είναι αυξημένο, τόσο σε αρχικό όσο και σε μεταστατικό καρκίνο
	miR-195	Διάγνωση	Αίμα	qRT-PCR/ 83BC vs 44N	Το miR-195 είναι αυξημένο κατά 19,25 φορές
	miR-29α, miR-21	Διάγνωση και πρόγνωση	Ορός	qRT-PCR/ 20BC vs 20N	Και τα δύο miRNA είναι αυξημένα. Το miR29α σχετίζεται με το στάδιο του όγκου
	miR-16, miR-25, miR-222, miR-324-3p	Διάγνωση και πρόγνωση	Ορός	TaqMan/ 48BC vs 48N	Όλα είναι αυξημένα σε υψηλού κινδύνου ασθενείς
	let-7, miR-21, miR-202	Διάγνωση και πρόγνωση	Αίμα και ορός	RT-PCR/ 136 BC vs 60 non BC	Όλα τα miRNA είναι αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού
	miR-18b, miR-103, miR-107, miR-652	Διάγνωση και πρόγνωση	Ορός	RT-PCR/ 33 TNBC vs 33N	4 miRNA υπογραφές προβλέπουν την επανεμφάνιση όγκου και τη συνολική επιβίωση
	miR-210	Πρόβλεψη	Πλάσμα	TaqMan/ 18 BC +	Το miR-210 είναι υψηλότερο σε ασθενείς με

		της απάντησης στην θεραπεία (H)		H vs 11 BC μη ανταποκρινόμενο	εναπομείναντα καρκίνο του μαστού (+2 φορές)
	miR-155	Πρόβλεψη της απάντησης στη θεραπεία (taxane)	Ορός	RT-PCR/ 103 BC +taxane vs 55N	H έκφραση του miR-155 σχετίζεται με την πορεία της θεραπείας

Η βασική στρατηγική για τη θεραπεία του BC είναι η χρήση της χειρουργικής παρέμβασης σε συνδυασμό με ή ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία. Τα πιο συνηθισμένα χημειοθεραπευτικά είναι οι ανθρακυκλίνες [δοξορουβικίνη (DOXO), αδριαμυκίνη (ADR) και επιρουβικίνη], εκλεκτικοί ρυθμιστές ER [ταμοξιφένη (TAM)], ταξάνες (ταξόλη ή πακλιταξέλη και δοσεταξέλη), η 5-φθοριοουρακίλη (5-FU) και η κυκλοφωσφαμίδη. Παρά την πρόοδο της θεραπείας που επιτυγχάνεται με το συνδυασμό ορισμένων από αυτές τις ενώσεις, ένας μεγάλος αριθμός ασθενών δεν ανταποκρίνεται στη χημειοθεραπεία.

Σε αυτό το πλαίσιο, τα miRNA που είναι σε θέση να προβλέψουν τη θεραπευτική απόκριση ενός συγκεκριμένου ασθενούς θα μπορούσαν να βοηθήσουν τους κλινικούς ιατρούς στην επιλογή της σωστής θεραπευτικής προσέγγισης. Ορισμένες υπογραφές miRNA έχουν αναπτυχθεί για την αναζήτηση των miRNA που είναι σε θέση να προβλέψουν τη θεραπευτική απόκριση των ασθενών με BC (Πίνακας 4). Το TAM, ένα από τα κύρια μόρια που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του BC, είναι ένα φάρμακο που μειώνει ή εξαλείφει κυκλοφορούντα οιστρογόνα ή εμποδίζει την αλληλεπίδραση του ER με γονιδιωματικούς στόχους. Σε μερικές μελέτες, αξιολογήθηκε εάν το TAM θα μπορούσε να είναι μια επιτυχημένη θεραπεία για τον ER+ καρκίνο του μαστού. Ο πληθυσμός που αναλύθηκε είχε ήδη αναπτύξει μετάσταση πριν από την έναρξη της θεραπείας και το όφελος της θεραπείας μετρήθηκε ως αντικειμενική απόκριση σύμφωνα με τα κριτήρια REMARK. Άλλες υπογραφές miRNA έχουν μελετηθεί για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης του BC σε Herceptin (ή τραστουζουμάμπη, H). Αυτό το μόριο είναι ένα ανασυνδυασμένο εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των HER2 πρωτεϊνών που μπλοκάρει τη μεσολαβούμενη από την HER2 ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών κινασών και τελεστών. Αν και η θεραπεία H παρατείνει την επιβίωση σε ανοσοεπιβλαβείς και μεταστατικές καταστάσεις, η πλειοψηφία των γυναικών με μεταστατική νόσο HER2+ θα αναπτύξει αντίσταση στη θεραπεία εντός ενός έτους. Η αναγνώριση μιας υπογραφής miRNA που προβλέπει τον κίνδυνο του ασθενούς, την έκβαση της νόσου και την ανεκτικότητα στη θεραπεία H, θα βελτίωνε σημαντικά την εξατομικευμένη διαχείριση του HER2+ BC. Μερικές μελέτες έχουν εντοπίσει επιτυχώς μια προγνωστική υπογραφή miRNA για την απόκριση των δειγμάτων ιστού BC σε θεραπεία με H. Μετά το συνδυασμό των αποτελεσμάτων των μη κυκλοφορούντων σημάτων miRNA των BC κυτταρικών σειρών ατόμων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία

με TAM ή H, προκειμένου να προσδιοριστούν τα miRNA με προγνωστική ικανότητα, μόνο η οικογένεια let-7 και miR-125a-5p/b-5p εμφανίζονται ως σημαντικοί παράγοντες πρόβλεψης της θεραπευτικής απάντησης. Το miR-125, του οποίου η έκφραση συσχετίζεται με την κατάσταση του HER2, έχει βρεθεί ότι μειώνεται σημαντικά σε ασθενείς με BC. Πειραματικά, η υπερέκφραση του miR-125 μειώνει τα ERBB2 και ERBB3, μειώνοντας την κυτταρική κίνηση και την εισβολή πολλών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του BC. Το ρυθμιστικό δίκτυο let-7 καταστέλλει τη μετάσταση με άμεση στόχευση της πρωτεΐνης αναδιαμόρφωσης χρωματίνης HMGA2 και του παράγοντα μεταγραφής BACH1 (Σχήμα 5B). Και οι δύο στόχοι προάγουν τη μεταγραφή προ-διεισδυτικών γονιδίων που καταστέλλουν την κυτταρική εισβολή και τη μετάσταση στα οστά.

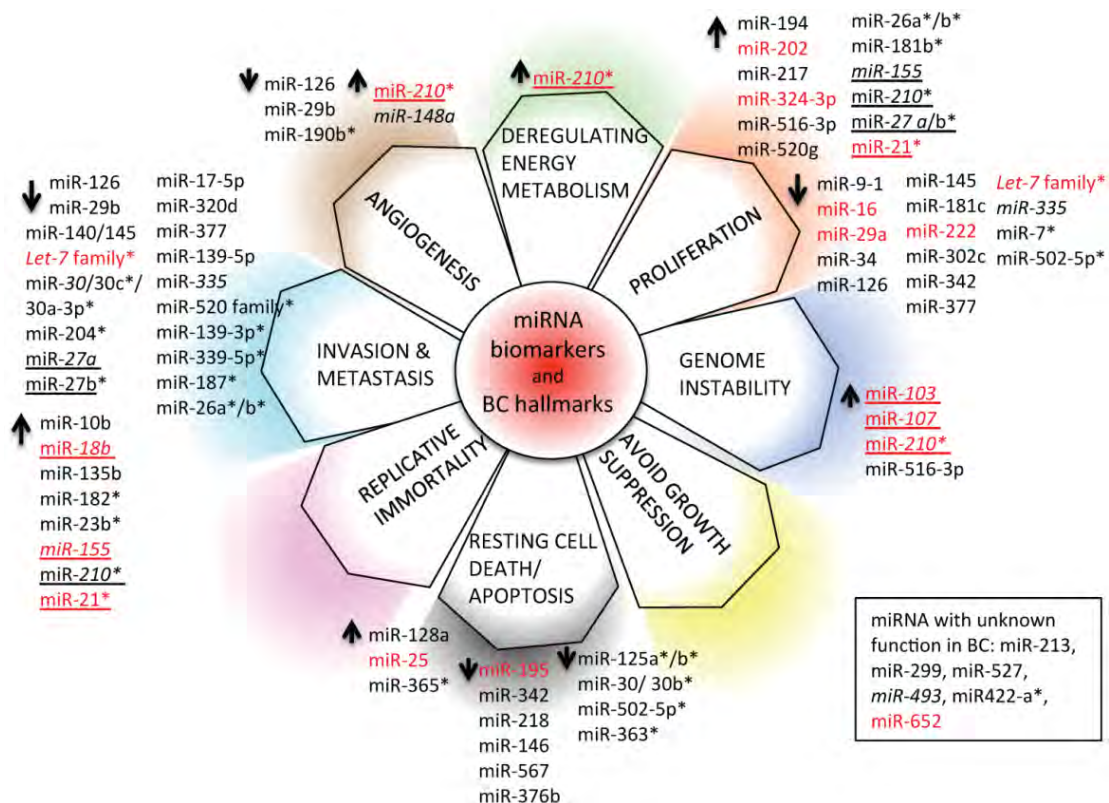
Σχεδόν όλες οι δημοσιεύσεις για τα προφίλ των κυκλοφορούντων miRNA και η απόκριση του τύπου HER2+ BC στη θεραπεία έχουν χρησιμοποιήσει κυτταρικές σειρές BC για να αναγνωρίσουν μεμονωμένα miRNA ή ομάδες miRNA των οποίων η έκφραση μεταβάλλεται μετά από παρατεταμένη θεραπεία με H. Ένα miRNA που ενδεχομένως εμπλέκεται στην απάντηση στη θεραπεία με H είναι το miR-210, το οποίο υπάρχει τόσο στον ιστό όσο και στα σωματικά υγρά ασθενών με BC. Η κυκλοφορία του miR-210 έχει συσχετιστεί με την ευαισθησία του H, την παρουσία όγκου και τη μετάσταση στους λεμφαδένες, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή χρήση του miR-210 για την παρακολούθηση της απόκρισης του HER2 + BC σε θεραπείες με βάση το H. Ένα άλλο miRNA, το miR-155, χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της επίδρασης της θεραπείας με ταξάνη στον BC. Οι Sun et al. παρατήρησαν τη μειωμένη έκφραση του miR-155 στον ορό μετά από χημειοθεραπεία, η οποία έφθασε σε επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά των υγιών ατόμων. (Bertoli, 2015)

5.3. Τα miRNA ως «μοριακή ταυτότητα» του BC

Προηγουμένως έγινε μια επισκόπηση των miRNAs που μπορούν ήδη να θεωρηθούν ως biomarkers BC. Αυτό περιγράφεται στον Πίνακα 4. Έγινε προσπάθεια ταξινόμησης όλων των κυκλοφορούντων και μη κυκλοφορούντων miRNAs με διαγνωστική, προγνωστική και προβλεπτική ικανότητα σε σχέση με τη λειτουργία

τους, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία. Η κύρια ομάδα miRNA (27 miRNA), επηρεάζει τα γονίδια που ανήκουν στο μονοπάτι πολλαπλασιασμού, παρόλο που μερικά από αυτά τα miRNA (miR-155, miR-210, miR-21 και η οικογένεια let7) συμμετέχουν επίσης στην κατεύθυνση της εισβολής BC και στις μεταστατικές οδούς, που ελέγχονται από άλλα 24 miRNA. Ο κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση είναι οι στόχοι της τρίτης μεγαλύτερης ομάδας 14-miRNA. Πέντε miRNA είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της αγγειογένεσης, ενώ 2 miRNA ελέγχουν τη γονιδιωματική αστάθεια. Το miR-210 είναι το miRNA με ευρύτερη δραστηριότητα, συμμετέχοντας στον ενεργειακό μεταβολισμό, την αγγειογένεση και τη γονιδιωματική αστάθεια μαζί με τον ήδη περιγραφόμενο ρόλο στην εισβολή και τον πολλαπλασιασμό. Άλλα miRNA, όπως το miR-21, το miR-27a/b και το miR-155, έχει αποδειχθεί ότι έχουν πολλαπλές λειτουργίες. Αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από το γεγονός ότι η δράση ορισμένων miRNA εξαρτάται από το κυτταρικό μοντέλο ή το περιβάλλον στο οποίο έχουν μελετηθεί. Μόνο 5 miRNA δεν έχουν ακόμη χαρακτηριστεί in vitro για τη λειτουργία τους στην ανάπτυξη BC (miR-213, miR-299, miR-422a, miR-493 και miR-527).

Όσον αφορά την κλινική χρήση των απεικονιζόμενων miRNAs, η πλειοψηφία αυτών (33/59) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαγνωστικά εργαλεία. Ένας μικρός αριθμός από αυτά (7/59) (που σημειώνονται με πλάγιους χαρακτήρες στην εικόνα) έχουν επίσης προγνωστική ικανότητα (μέλη της οικογένειας let-7, miR-27a, miR-30, miR-148a, miR-155, miR-210 και miR-335). Ορισμένα από αυτά (19/59) έχουν την ικανότητα να προβλέπουν την ανταπόκριση του BC στη θεραπεία (υποδεικνυόμενα με * στην εικόνα: let-7, miR-7, miR-21, miR-23b, miR-26a/b, miR-27b, miR-30b/c, miR-125a/b, miR-139-3p, miR-181b, miR-182, miR-187, miR-204, miR-210, miR-339-5p, miR-363, miR-365, miR-502-5p και οικογένεια miR-520). Τα 10/59 (σημειώνονται με κόκκινο χρώμα στην εικόνα) είναι κυκλοφορούντα miRNA, που παρουσιάζουν διαφορετικές λειτουργίες στο BC και τα 2/59 (miR-155 και miR-210) είναι κυκλοφορούντα miRNA με διαγνωστικό και προγνωστικό ρόλο στον BC.



Εικόνα 11: miRNA βιοδείκτες και χαρακτηριστικά του BC. Τα miRNA έχουν ρόλο διαγνωστικού miRNA, προγνωστικά miRNA (πλάγια γράμματα), miRNA πρόβλεψης της απόκρισης στη θεραπεία του BC (*) ή miRNA με πολλαπλές λειτουργίες (διάγνωση, πρόγνωση, πρόβλεψη της θεραπευτικής έκβασης, υπογραμμισμένα). Εμφανίζονται τα κυκλοφορούντα (κόκκινα) και μη κυκλοφορούντα (μαύρα) miRNA του Πίνακα 4.

6. miRNA για θεραπευτική χρήση σε καρκίνο

Η χρήση των miRNA για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών βασίζεται σε 2 προσεγγίσεις: 1) χρήση miRNA ως φαρμακευτικών μορίων, με βάση τη σύνθεση και την απελευθέρωση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων, ικανών να αυξήσουν ή να μειώσουν τα επίπεδα των miRNA στον BC ή 2) τη ρύθμιση των miRNA, σε συνδυασμό με μη βασισόμενες σε miRNA θεραπείες, για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των συμβατικών θεραπειών. (Bertoli, 2015)

6.1. Μέθοδοι για τη διαμόρφωση του miRNA

Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη θεραπειών με βάση το miRNA: ανταγωνιστές και μιμητικά ολιγονουκλεοτίδια. Οι ανταγωνιστές microRNA

παράγονται για να αναστέλλουν τα miRNA που είναι ενεργά σε ανθρώπινες ασθένειες.

Η πιο κοινή στρατηγική για την εξάλειψη της λειτουργίας των miRNA επιτυγχάνεται με μονοκλωνικά ολιγονουκλεοτίδια με συμπληρωματικές αλληλουχίες. Αντίθετα, τα μιμητικά miRNA χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση των miRNA που παρουσιάζουν απώλεια λειτουργίας, όπως στην παραδοσιακή γονιδιακή θεραπεία. Αυτή η προσέγγιση, γνωστή και ως θεραπεία αντικατάστασης miRNA, έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς παρέχει μια νέα ευκαιρία για θεραπευτική εκμετάλλευση καταστολέων όγκων. Το χαμηλού μοριακού βάρους miRNA επιτρέπει την απελευθέρωση θεραπευτικών miRNA ως μικρών δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Για να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της απελευθέρωσης miRNA / αντι-miRNA in vivo, έχουν αναπτυχθεί τροποποιημένα μόρια miRNA, τόσο μιμητικά miRNA όσο και ανταγωνιστές microRNA, με μεγαλύτερες ημιζωές και αυξημένη αποτελεσματικότητα, όπως ολιγονουκλεοτίδια αντι-miRNA (anti-miRNA oligonucleotides-AMO), κλειδωμένο νουκλεϊνικό οξύ (Locked Nucleic Acid-LNA) τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια, συζευγμένα με χοληστερόλη και το πρόσφατα αναπτυχθέν 2'-Ο-μεθοξυαιθυλ-4'-θειοRNA (MOE-SRNA).

Τα τελευταία χρόνια, έχει περιγραφεί μια μέθοδος που αναστέλλει τη λειτουργία των miRNA χρησιμοποιώντας συνθετικά mRNA που περιέχουν πολλαπλές θέσεις δέσμησης για ένα συγκεκριμένο miRNA και ονομάζονται «σπόγγι» miRNA. Στις κυτταρικές σειρές καρκίνου της ουροδόχου κύστης έχει αποδειχθεί ότι η εξαναγκασμένη έκφραση ενός «σπόγγου» miRNA που έχει σχεδιαστεί για την αναστολή του miR-21 οδηγεί σε μείωση της αερόβιας γλυκόλυσης του όγκου, δηλ. στην ικανότητα των κυττάρων να μεταβολίζουν τη γλυκόζη ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες. Οι «σπόγγι» miRNA έχουν επικυρωθεί ακόμη και σε ένα μοντέλο ποντικού SUM149-επιθηλιακού BC κυττάρου, όπου η αναστολή του miRNA-9 που καθοδηγείται από το Myc, χρησιμοποιώντας ένα συνθετικό mRNA που περιέχει αρκετές θέσεις δέσμησης miR-9, μείωσε την ανάπτυξη πνευμονικών μεταστάσεων. Η παρεμπόδιση του αποτελέσματος πολλαπλασιασμού κυττάρων BC έχει παρατηρηθεί ακόμη και σε ένα άλλο μοντέλο ποντικού με ξενομοσχεύματα εμφυτευμένο με την κυτταρική σειρά MDA-MB-231 BC, όπου αναστολή με βάση

τον «σπόγγο» miR-150 οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού του όγκου μέσω αύξησης του P2X7 υποδοχέα. (Bertoli, 2015)

6.2. miRNA-στοχευμένες θεραπείες

Η χρήση μόνο miRNA σε αντικαρκινική θεραπεία για την αναστολή του πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης του BC είναι ακόμα μια πρόκληση, αν και έχουν ήδη ληφθεί κάποια υποσχόμενα αποτελέσματα τόσο σε πειράματα *ex vivo* όσο και *in vivo*. Για παράδειγμα, το miR-145 έχει επιλεγεί ως στοχευμένη θεραπεία σε κύτταρα BC, επειδή συνήθως ρυθμίζεται αρνητικά στον καρκίνο του μαστού. Η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων miRNA μμητικών ή αναστολέων έχει αξιοποιηθεί σε *in vivo* πειράματα. Άλλο παράδειγμα, το miR-21, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον καρκίνο του μαστού επειδή έχουν ήδη αναπτυχθεί χημικώς τροποποιημένα αντι-miRNA ολιγονουκλεοτίδια για την *in vivo* θεραπεία των ξενομοσχευμένων BC ποντικών μοντέλων. Για να αποφευχθεί η ταχεία υποβάθμιση και απέκκριση των miRNA, είναι απαραίτητη η μελέτη νέων συστημάτων χορήγησης, τα οποία θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη σταθερότητα και τη δράση στους ιστούς-στόχους.

Πρόσφατα, ορισμένες μελέτες επικεντρώθηκαν στην πιθανή χρήση νανοϋλικών για τη διευκόλυνση της παράδοσης βιομορίων μέσα στους όγκους. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια χρυσού, με τη μεγάλη τους συγγένεια με τα βιομόρια, τη μειωμένη κυτταροτοξικότητα, τον εύκολο έλεγχο μεγέθους και την καλά ανεπτυγμένη επιφανειακή χημεία, έχουν τροποποιηθεί για να αυξήσουν τη συμπληρωματικότητά τους για τα νουκλεϊνικά οξέα, επιτρέποντας την αποτελεσματική παροχή των RNA σίγασης μέσα στα κύτταρα. Η ίδια προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί για την απελευθέρωση του miR-145 σε κύτταρα BC. Επομένως, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την απελευθέρωση των ολιγονουκλεοτιδίων miR-145 εντός των BC κυτταρικών σειρών.

Το ερώτημα σχετικά με την επίδραση της χορήγησης σε όργανα μη-στόχους και τη συστηματική τοξικότητα της χημικής ένωσης παραμένει αναπάντητο. Ένα εμπόδιο για τη χρήση των miRNA στη θεραπεία είναι το γεγονός ότι η τροποποίηση

του miRNA μπορεί να επηρεάσει εκατοντάδες μεταγραφές σε διαφορετικούς ιστούς, που είναι δυνητικά ικανές να κλείσουν ολόκληρες οδούς. Έτσι, μέχρι σήμερα, λίγες εταιρείες χρησιμοποίησαν miRNA για να αναπτύξουν μια νέα κατηγορία θεραπευτικών φαρμάκων για τον καρκίνο. Η MRX34, μία μιμητική ένωση miR-34a, είναι πιθανώς ένας από τους πρώτους παράγοντες αντικατάστασης miRNA που θα υποβληθεί σε κλινικές δοκιμές. Τα ολιγονουκλεοτίδια antago-miR μπορούν να χορηγηθούν εύκολα μέσω τοπικών ή παρεντερικών οδών έγχυσης με επαρκή πρόσληψη του παράγοντα για επίτευξη σταθερής αναστολής στους ιστούς-στόχους και τα όργανα χωρίς την ανάγκη για τυποποίηση. Παρόλα αυτά, τα χαρακτηριστικά των miRNA, όπως η σταθερότητα και η εκτεταμένη δράση τους σε διάφορους στόχους, μας οδηγούν στο να σκεφτούμε ότι πριν από τη χρήση miRNA στις θεραπείες απαιτούνται πολλές μελέτες για να αποκτηθούν πιο λεπτομερείς και ολοκληρωμένες γνώσεις σχετικά με το θεραπευτικό δυναμικό των miRNA, όπως η κατανομή των miRNA στους ιστούς και η συστηματική τοξικότητά τους. (Bertoli, 2015)

6.3. miRNA και αντίσταση στη χημειοθεραπεία

Τα miRNA μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για την αύξηση της απόκρισης του BC σε μια θεραπευτική παρέμβαση. Ως παράδειγμα, τα κύτταρα BC έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικά στην χημειοθεραπεία όταν κάποια miRNA απορρυθμίζονται (π.χ. το miR-125b). Τα miRNA μιμητικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία αυξάνουν τα επίπεδα ενός δεδομένου miRNA σε έναν BC στον οποίο χάνεται αυτό το miRNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με συμβατική θεραπεία για να επιτευχθεί ένα αυξημένο όφελος για τους ασθενείς. Ένα παράδειγμα αυτής της προσέγγισης χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη του Yang et al., όπου η θετική ρύθμιση του miR-195, που επετεύχθη με μιμητικά ολιγονουκλεοτίδια, και που παρέχεται σε ανθεκτικές σε ADR κυτταρικές σειρές MCF7 BC, αύξησε την ευαισθησία των κυττάρων στη θεραπεία, οδηγώντας σε απόπτωση μέσω της αρνητικής ρύθμισης των Raf-1 και Bcl-2. Επιπλέον, η συνδυασμένη αγωγή σε έναν ασθενή με BC χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια antago-miR για τη διακοπή των αυξημένων επιπέδων έκφρασης του miRNA σ' αυτόν τον συγκεκριμένο ασθενή, θα μπορούσε δυνητικά να αυξήσει το αποτέλεσμα της συμβατικής θεραπείας. Αυτή η

προσέγγιση έχει χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, για να αποδειχθεί *in vitro* ότι τα αντιπληροφοριακά ολιγονουκλεοτίδια miR-21 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με Η για να σκοτώσουν ανθεκτικά κύτταρα BC σε ξενομοσχευμένα ποντίκια. (Bertoli, 2015)

6.4. miRNA, CSC και χημειοαντίσταση

Η ικανότητα των miRNA να ρυθμίζουν τον φαινότυπο CSC και την EMT είναι κρίσιμη για τη διαχείριση της αντίστασης στη θεραπεία. Στην πραγματικότητα, τα CSC σε όγκους είναι οι στάσιμοι πληθυσμοί. Η υπάρχουσα κοινή χημειοακτινοθεραπεία μπορεί να στοχεύει μόνο τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Έτσι, τα CSC θα διαφύγουν από το θάνατο και έτσι θα είναι σε θέση να γίνουν ανθεκτικά, να μετασταθούν ή να δημιουργήσουν υποτροπές. Η τροποποίηση των miRNA είναι επομένως θεμελιώδης για την αύξηση της απόκρισης του όγκου στη θεραπεία. Έχει αποδειχθεί, για παράδειγμα, ότι μια λευχαιμική κυτταρική σειρά ανθεκτική στη δαουνορουβικίνη παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα miR-21, το miRNA που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της EMT, ενώ η καταστολή αυτού του miRNA στην ίδια κυτταρική σειρά ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της δαουνορουβικίνης.

Επιπλέον, στον BC, η αντίσταση στη θεραπεία επηρεάζεται σαφώς από τα miRNA των CSC. Για παράδειγμα, η έκφραση του miR-34a, που είναι απαραίτητη για τη διατήρηση των CSC, ρυθμίζεται αρνητικά σε κυτταρικές σειρές BC ανθεκτικές σε ADR και η θετική του ρύθμιση οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία στη θεραπεία, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επιπλέον, μια συσχέτιση μεταξύ του miR-200c, miR-203 και ενός παράγοντα μεταγραφής βλαστοκυττάρων, Bmi1, έχει περιγραφεί στον BC. Ειδικότερα, οι Yin et al. έδειξαν ότι το Bmi1, που συχνά ρυθμίζεται στον BC και συμμετέχει στη συντήρηση των βλαστοκυττάρων, ρυθμίζεται από τα miR-200c και miR-203. Η έκφραση Bmi1 και η παράλληλη ρύθμιση των miR-200c και miR-203 συνοδεύονται από την αναστροφή της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές BC. (Yin, 2013)

Σε όλα αυτά τα παραδείγματα, είναι σαφές ότι η διαμόρφωση των miRNA έχει κρίσιμη επίδραση στη συντήρηση των CSC, της EMT, και, γενικά, στην ανταπόκριση της νόσου στη θεραπεία. Επειδή τα CSC εμπλέκονται στην υποτροπή του BC, η διαφοροποίηση των miRNA σε συνδυασμό με τη θεραπεία θα μπορούσε να μειώσει την πιθανότητα επόμενης υποτροπής του BC. (Bertoli, 2015)

7. Επίλογος-Συμπεράσματα

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο συνηθισμένος καρκίνος μεταξύ των γυναικών ανά τον κόσμο και είναι η πιο διαδεδομένη αιτία θανάτου μεταξύ των ασθενών με καρκίνο. Έτσι, η ανίχνευση της νόσου σε πρώιμα στάδια είναι ζωτικής σημασίας. Έχει διεξαχθεί ένα μεγάλο σύνολο μελετών για τη διερεύνηση του επιπέδου έκφρασης των miRNA, τα αποτελέσματα των οποίων δείχνουν τις προγνωστικές τιμές των σχετιζόμενων με τον καρκίνο miRNA ή των ειδικών miRNA του καρκινικού ιστού σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Έχουν αναγνωριστεί διάφορα miRNA, των οποίων η έκφραση είναι απορρυθμισμένη στο αίμα ή στους ιστούς ασθενών με καρκίνο του μαστού. Δεδομένου ότι τα miRNA είναι ανιχνεύσιμα σε σωματικά υγρά, όπως το αίμα, σε πολύ πρώιμα στάδια καρκίνου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες. Ωστόσο, επειδή υπάρχουν πολλές παράμετροι, όπως το μικρό μέγεθος δείγματος, ο τύπος δείγματος, οι πειραματικές μέθοδοι σχηματισμού προφίλ, η ετερογένεια θεραπείας / όγκου, το στάδιο, οι εθνοτικές διαφορές που επηρεάζουν τα αποτελέσματα, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες σε μεγαλύτερους ομοιογενείς πληθυσμούς για να διερευνηθεί η αξία αυτών των βιολογικών δεικτών. Επιπλέον, οι νέες τεχνολογίες, όπως η microRNA microarray και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς, θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην αναγνώριση νέων πιθανών βιοδεικτών miRNA.

Ωστόσο, το πλήρες δυναμικό των miRNA δεν πρέπει να εξαντληθεί στη χρήση τους ως βιοδείκτες του BC. Οι μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να κατευθύνονται στην ανάπτυξη και την χρήση φαρμακευτικών ουσιών με βάση τα miRNAs στον BC. Από την άποψη αυτή, μερικά miRNA έχουν ήδη δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (π.χ. miR-9, miR-21, miR34a, miR145 και miR150).

Έτσι, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη βελτιστοποίηση της σταθερότητας των φαρμάκων με βάση τα miRNAs, στη βελτίωση της χορήγησης miRNAs και στον έλεγχο των επιδράσεων εκτός στόχου των θεραπευτικών μέσων miRNAs. Επιπλέον, για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των επί του παρόντος χρησιμοποιούμενων μη-miRNA θεραπειών για BC (π.χ. χημειοθεραπεία), θα πρέπει να καταβληθούν μεγάλες προσπάθειες για τη χρήση τέτοιων μη-miRNA θεραπειών σε συνδυασμό με miRNA που φαίνεται να έχουν θεμελιώδη ρόλο στη διαμόρφωση της απόκρισης στη θεραπεία (π.χ. miR-21, miR34a, miR195, miR200c και miR203 σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία).

Βιβλιογραφία

- [1] **Adhmani M., Haghdoost A.A., Sadeghi B.** “MicroRNAs in Breast Cancer: A Review” *Cancer Press*, 2017:3(2):44-49.
- [2] **Akram M., Iqbal M. et al.** “Awareness and current knowledge of breast cancer” *Biol Res*, 2017:50:33.
- [3] **Bertoli G., Cava C., Castiglioni I.** “MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer” *Theranostics*, 2015: 5(10): 1122-1143.
- [4] **Blenkiron C., Goldstein L.D., Thorne N.P. et al.** “MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype.” *Genome Biol*, 2007:8: R214.
- [5] **Cariati M., Bennett-Britton T.M. et al.** “Inflammatory breast cancer” *Surg Oncol*, 2005:14:133-143.
- [6] **Chan J.A., Krichensky A.M., Kosik K.S.** “MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells.” *Cancer Res*, 2005:65:6029-6033.
- [7] **Chu Z., Lin H. et al.** “Clinicopathologic Characteristics of Typical Medullary Breast Carcinoma: A Retrospective Study of 117 Cases” *Plos One*, 2014:9(11)
- [8] **Feng Y., Spezia M. et al.** “Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics and molecular pathogenesis” *Genes & Diseases*, 2018:5:77-106.
- [9] **Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M.** “Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.” *Int J Cancer*, 2015:136:359-386.
- [10] **Foekens J.A., Sieuwerts A.M., Smid M. et al.** “Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008:105:13021-13026.
- [11] **Ha M., Kim V.N.** “Regulation of microRNA biogenesis.” *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2014:15:509-524

- [12] **Haghighat S., Akbari M. et al.** “Standardized breast cancer mortality rate compared to the general female population of Iran.” *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2012;13:5525-5528.
- [13] **Hayder H., O’Brien J., Nadeem U. et al.** “MicroRNAs: crucial regulators of placental development.” *Reproduction*, 2018;155: R259-271.
- [14] **Heneghan H.M., Miller N., Lowery A.j. et al.** “Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer.” *Ann Surg*, 2010;251:499-505.
- [15] **Hossain A., Kuo M.T., Saunders G.F.** “Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of A1B1 mRNA.” *Mol. Cell. Biol.*, 2006;26:8191-8201.
- [16] **Hu Z., Dong J., Wang L.E. et al.** “Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls.” *Carcinogenesis*, 2012;33:828-834.
- [17] **Iqbal B. M., Banerjee B.** “Mucinous carcinoma of breast in a 30-year-old female: A rare case report and discussion”, *CCIJ*, 2016;5 (5): 489-491.
- [18] **Jamal S., Mamoon N. et al.** “Carcinoma of the male breast: a study of 141 cases from Northern Pakistan.” *Asian Pac J cancer Prev.*, 2006;7:119-121.
- [19] **Joglekar-Javadekar M., Van Laere S. et al.** “Characterization and targeting of platelet-derived growth factor alpha (PDGFRA) in inflammatory breast cancer (IBC).” *Neoplasia*, 2017;19:564-573.
- [20] **Le Quesne J., Caldas C.** “Micro-RNAs and breast cancer” *Molecular Oncology*, 2010;4:230-241.
- [21] **Lowery A.J., Miller N., Devaney A. et al.** “MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer.” *Breast Cancer Res*, 2009;11: R27.
- [22] **MacFarlane L. A., Murphy P. R.** “MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer” *Current Genomics*, 2010;11:537-561.

- [23] **O'Brien J., Hayder H. et al.** "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation" *Frontiers in Endocrinology*, 2018: 9: 402.
- [24] **Roth C., Rack B., Muller V et al.** "Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res*, 2010:12: R90.
- [25] **Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P.** "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." *Nature*, 2007:448:83-86.
- [26] **Sharma G. N., Dave R. et al.** "Various types and management of breast cancer: An overview" *J Adv Pharm Tecnol Res*, 2010 Apr-Jun:1 (2): 109-126.
- [27] **Xia L., Zhang D., Du R. et al.** "miR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells." *Int. J. Cancer*, 2008:123:372-379.
- [28] **Xie M., Li M. et al.** "Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA." *Cell*, 2013:155:1568-1580.
- [29] **Yang L., Parkin D., Ferlay J.** "Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2005:14:243-250.
- [30] **Yerushalmi R., Woods R. et al.** "Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential" *Lancet Oncol*, 2010:11:174-183.
- [31] **Yin J., Zheng G., Jia X. et al.** "A Bmi1-miRNAs cross-talk modulates chemotherapy response to 5-fluorouracil in breast cancer cells." *PLoS One* 2013:8: e73268.
- [32] **Αντσακλής Α.** «Μαιευτική και γυναικολογία» Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού, 2^η έκδοση, 2011, σελ. 450-479.
- [33] **Δαλαϊνός Β.Η.** «Γενική Χειρουργική» University Studio Press, Τόμος II, 2001, σελ. 791-811.
- [34] **Κρεατσάς Γ.Κ.** «Σύγχρονη Μαιευτική & Γυναικολογία» Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2^η έκδοση, Τόμος I, 2009, σελ. 928-989.