

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΗΡΙΩΝ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΥ ΤΟΥ C677T
ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ MTHFR ΣΕ
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

πτυχιακή εργασία
των

Ζύμαρη Παναγιώτη και Μουγιολάρη Ιωάννας



Επιβλέπουσα: Δρ. Παπουτσή Ανδρονίκη,
Αναπλ. Καθηγήτρια Βιολογίας-Γενετικής.

Π Τ Υ Χ Ι Α Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	3
---------------	---

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Καρκίνος μαστού	
1.1 Ιστορία του καρκίνου του μαστού	7
1.2 Ανατομία μαστού.....	13
1.3 Διάγνωση και θεραπεία.....	18
1.4 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού.....	24
1.5 Γενετική και μοριακή βάση του καρκίνου του μαστού.....	31
2. Μεθυλενο-τετραυδροφυλλικήαναγωγή (MTHFR).....	35
2.1 Το φυλλικό οξύ.....	36
2.2 Κύκλος φυλλικού οξέος και μεθειονίνης.....	37
2.3 Ο πολυμορφισμός C677T.....	39
2.4 Μηχανισμός καρκινογένεσης.....	40
2.5 Άλλες επιπλοκές.....	43
2.6 Φαρμακογενωμική και πολυμορφισμοί του MTHFR.....	47

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Σκοπός.....	50
1.2 Υλικά.....	53
1.3 Μέθοδοι.....	54
1.4 Αποτελέσματα.....	57
1.5 Συζήτηση.....	60
1.6 Βιβλιογραφία.....	62

Πρόλογος

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών που προκαλούν αλλαγές στα κύτταρα του σώματος με συνέπεια την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη τους. Τα περισσότερα ήδη καρκινικών κυττάρων εν τέλει σχηματίζουν μάζες, τους αποκαλούμενους όγκους. Η πλειονότητα των καρκίνων του μαστού ξεκινάνε στα σημεία του μαστικού ιστού που αποτελούνται από τους αδένες που παράγουν γάλα, τους λοβούς, και τους πόρους που συνδέουν τους λοβούς με την θηλή. Ο υπόλοιπος μαστός αποτελείται από λιπώδη, συνδετικό και λεμφικό ιστό (1).

Ο καρκίνος του μαστού συνήθως είτε ανιχνεύεται στον προληπτικό έλεγχο πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων, είτε όταν η γυναίκα παρατηρεί κάποιο εξόγκωμα. Οι περισσότερες μάζες που ανιχνεύονται στην μαστογραφία είναι καλοήγη μορφώματα. Όταν υπάρχει η υποψία καρκίνου, είναι απαραίτητη η μικροσκοπική ανάλυση για την καθοριστική διάγνωση και την αξιολόγηση του σταδίου του καρκίνου (*in situ* ή επεκτατικός) (1).

Ο καρκίνος του μαστού ήταν γνωστός στην ανθρωπότητα από τους αρχαίους χρόνους. Έχουν γίνει αναφορές για τον καρκίνο του μαστού σχεδόν σε κάθε περίοδο της καταγεγραμμένης ιστορίας. Σε αντίθεση με άλλους εσωτερικούς καρκίνους, ιδιαίτερα σε μεταγενέστερα στάδια, ο καρκίνος του μαστού δίνει ορατά συμπτώματα, ως αποτέλεσμα αυτού έχουν γίνει πολλές καταγραφές από γιατρούς στην αρχαιότητα (2).

Τη σήμερον εποχή, η γνώση μας γύρω από την βιολογία του καρκίνου έχει οδηγήσει σε αξιοσημείωτη πρόοδο όσον αφορά στην πρόληψη, στην πρόωμη διάγνωση και στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η επιστημονική κοινότητα έχει μάθει τις τελευταίες δυο δεκαετίες, περισσότερα για τον καρκίνο από ότι είχε μάθει σε όλους τους προηγούμενους αιώνες (3). Συνεπακόλουθα, πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει άμεσα ή έμμεσα ορισμένα γονίδια και τους αντίστοιχους πολυμορφισμούς τους με τον καρκίνο του μαστού.

Ένα από τα γονίδια που έχουν συσχετιστεί τελευταία με τον καρκίνο του μαστού, είναι και το γονίδιο της αναγωγής του μεθυλενο-τετραυδροφυλλικού οξέος ή αλλιώς *MTHFR*, το οποίο εδρεύει στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1

στην ζώνη 36.22 (1p36.22). Αποτελείται από 19.3 kb DNA και περιέχει 11 εξόνια. Η έκφρασή του είναι πολύ έντονη στους όρχεις και μέτρια στον εγκέφαλο και τα νεφρά. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι το ένζυμο αναγωγή του τετραϋδροφυλλικού οξέος(4).

Το MTHFR (E.C: 1.5.1.20) είναι το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του 5,10-μεθυλενοτετραυδροφυλλικού οξέος (CH₂-H₄folate) σε 5-μεθυλοτετραυδροφυλλικό οξύ (CH₃-H₄folate) χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο (δότη ηλεκτρονίων) το NADPH και ως δέκτη ηλεκτρονίων το φλαβινোসυνένζυμο FAD (5,6).

Η ανάλυση των πολυμορφισμών του γονιδίου έχει υποδείξει τη συσχέτισή του με την εμφάνιση του καρκίνου. Συγκεκριμένα, ο C677T πολυμορφισμός έχει προταθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος, τη μεθυλίωση, τη σύνθεση και την επιδιόρθωση του DNA και ότι συμμετέχει στην καρκινογένεση στο μαστικό αδένα. Ωστόσο, η επισκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας δείχνει πως η συσχέτιση αυτή είναι αμφιλεγόμενη. Για το λόγο αυτό θεωρήσαμε σκόπιμο να διερευνήσουμε την συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σε Ελληνίδες ασθενείς με καρκίνο του μαστού, κατοίκους της Βορείως Ελλάδος.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από το Γενικό και το Ειδικό μέρος. Στο πρώτο παρατίθενται γενικές πληροφορίες για τον καρκίνο του μαστού από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα, ανατομικά και επιδημιολογικά στοιχεία της νόσου καθώς και μέθοδοι διάγνωσης. Επίσης αναλύεται η δράση της ενζυμικής πρωτεΐνης MTHFR, η συμμετοχή της στους βιοχημικούς κύκλους του φυλλικού οξέος και της μεθειονίνης καθώς και η εμπλοκή των πολυμορφισμών του γονιδίου σε μηχανισμούς καρκινογένεσης. Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται το προς μελέτη υλικό, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα της έρευνάς μας.

Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Βιολογίας και Γενετικής» του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (Σ.Ε.Υ.Π.) του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης (Α.Τ.Ε.Ι.Θ.) υπό την επίβλεψη της υπεύθυνης του εργαστηρίου, Αναπλ. Καθηγήτριας Βιολογίας-Γενετικής, κας Παπουτσή Ανδρονίκης.

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες στις Δρ. Ανδρονίκη Παπουτσή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιολογίας και Γενετικής του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, Σ.Ε.Υ.Π, Α.Τ.Ε.Ι.Θ, της οποίας η συνεχής καθοδήγηση, η αστείρευτη υπομονή και η επιστημονική κατάρτιση αποδείχθηκαν στοιχεία απαραίτητα προκειμένου να ολοκληρωθεί η εργασία. Επίσης θα θέλαμε να την ευχαριστήσουμε για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας καθώς και για τις επιστημονικές και ηθικές αξίες που μας μετέδωσε ως Καθηγήτρια, ως επιβλέπουσα και ως συνεργάτης.

Έπειτα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον συνάδελφο μας Αλέξανδρο Παντελιό, για την βοήθεια που μας προσέφερε στην απομόνωση του DNA από τα δείγματα στα οποία εργαστήκαμε καθώς και την πολύτιμη συνεισφορά του για την επίλυση των δυσκολιών που προέκυψαν κατά την διάρκεια της πραγμάτωσης της παρούσας εργασίας. Ευχαριστίες επίσης οφείλουμε και στην συμφοιτήτρια μας Κατερίνα Δανέζη με την οποία η συνεργασία μας στο εργαστήριο αποδείχθηκε άψογη αλλά και για την βοήθεια της όποτε την χρειαστήκαμε.

Ευχαριστούμε τον διευθυντή Δρ. Ιωάννη Ευστρατίου του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Γ.Ν.Θ «Παπαγεωργίου», τις Α' Επιμελήτριες ιατρούς του εργαστηρίου, κα. Περβανά Σταυρούλα και κα. Παζαρλή Ελισάβετ καθώς και το υπόλοιπο ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό του εργαστηρίου, και ιδιαίτερα τον τεχνολόγο κ. Στέλιο Κατσαρό για την πολύτιμη βοήθειά τους στην επιλογή και την συλλογή των δειγμάτων.

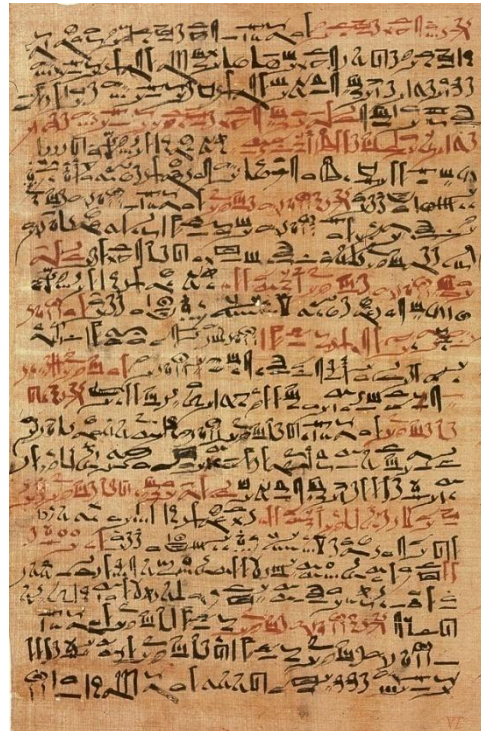
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ιστορία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού ήταν γνωστός στην ανθρωπότητα από τους αρχαίους χρόνους. Έχουν γίνει αναφορές για τον καρκίνο του μαστού σχεδόν σε κάθε περίοδο της καταγεγραμμένης ιστορίας. Σε αντίθεση με άλλους εσωτερικούς καρκίνους, ο καρκίνος του μαστού, ιδιαίτερα σε μεταγενέστερα στάδια, δίνει ορατά συμπτώματα, ως αποτέλεσμα αυτού έχουν γίνει πολλές καταγραφές από γιατρούς στην αρχαιότητα (2).

Προϊστορία και αρχαίος κόσμος

Η παλαιότερη περιγραφή του καρκίνου (αν και δεν χρησιμοποιήθηκε η λέξη καρκίνος) ανακαλύφθηκε στην Αίγυπτο και χρονολογείται περίπου το 3,000-2,500 π.χ.. Στον χειρουργικό πάπυρο του EdwinSmith, περιέχονται χειρόγραφα του Imhotep (αιγύπτιου παθολόγου-αρχιτέκτονα) που περιγράφουν οκτώ περιπτώσεις όγκων. Στον πάπυρο γίνονται αναφορά σε ένα έλκος του μαστού, το οποίο ήταν "δροσερό στην αφή, διογκωμένο και εξαπλώθηκε σε όλο το στήθος" και αφαιρέθηκε με καυτηρίαση με ένα εργαλείο που ονομάζεται το τρυπάνι φωτιά. Για την ασθένεια αναφέρει ότι "δεν υπάρχει θεραπεία" (7).



Εικόνα 1: Ο πάπυρος του EdwinSmith.
<https://wall.alphacoders.com/big.php?i=419404>

Το 460 π.Χ., ο Ιπποκράτης, ο πατέρας της Δυτικής Ιατρικής, περιέγραψε τον καρκίνο του μαστού ως χυμική ασθένεια. Έχει διατυπώσει την άποψη ότι το σώμα αποτελείται από τέσσερις χυμούς - Πύρ (ξανθή χολή), Αήρ (αίμα), Ύδωρ (φλέγμα) και Γη (μαύρη χολή). Υπέδειξε ότι ο καρκίνος προκλήθηκε από την περίσσεια μαύρης χολής, διότι στην εμφάνιση του ο καρκίνος του μαστού ήταν πολύ μαύρος (8,9).

Ο Γαληνός από την Πέργαμο το 200 π.Χ., απέδιδε και αυτός όπως και ο Ιπποκράτης, τον καρκίνο του μαστού στη συσσώρευση μαύρης χολή στο αίμα και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ήταν μια συστηματική νόσος, όποτε η χειρουργική αφαίρεση δεν θεωρούταν χρήσιμη (10). Ο Γαληνός επέτρεπε να αιμορραγούν ελεύθερα τα χειρουργικά τραύματα για να απαλλαγούν από τη μαύρη χολή. Η λέξη "καρκίνος" επινοήθηκε από τον ίδιο καθώς οι διεσταλμένες φλέβες του όγκου έμοιαζαν με τα πλοκάμια του καβουριού (11). Ο Celsius (περίπου 25 π.Χ. - 50 μ.Χ.) μετέφρασε την λέξη ελληνική "καρκίνος" στην αντίστοιχη λατινική λέξη "cancer" για τα καβούρια (3).

Ο Λεωνίδας της Αλεξάνδρειας, στο 1ο αιώνα μ.Χ., δοκίμασε την αφαίρεση όγκων περιορισμένης έκτασης. Αυτό το γεγονός προανήγγελλε της σύγχρονες χειρουργικές πρακτικές τις ογκολογίας (11).

Μεσαίωνα

Μεταξύ του 476 και 1500 μ.Χ. η ιατρική πρόοδος ερχόταν σε αντίθεση με τις αναδυόμενες θρησκευτικές φιλοσοφίες. Οι παλαιοχριστιανική πεποιθήσεις επέμεναν στην επούλωση των τραυμάτων μέσα από την πίστη και τα θαύματα, ενώ η χειρουργική επέμβαση θεωρούνταν βάρβαρη. Ισλαμική εμφάνιση αναβίωσε τις θεωρίες της ελληνικής ιατρικής και μέσα από σχολαστικές μεταφράσεις, έσωσε ιατρικές γνώσεις για τις επόμενες γενιές (12).



Εικόνα2:

ΤαπάθητηςαγίαςΑγάθας,SebastianodelPiombo,
1520.

<http://www.christianiconography.info/agatha.html>

Αναγέννηση - 16ος και 18ος αιώνας

Κατά τη διάρκεια της Αναγέννησης οι επιστήμονες ανέπτυξαν μεγαλύτερη κατανόηση του ανθρώπινου σώματος.

Το 1761, ο Giovanni Morgagni από τη Πάντοβα ήταν ο πρώτος ο οποίος έκανε κάτι, που στη σημερινή εποχή είναι ρουτίνα - έκανε αυτοψίες προσπαθώντας να συσχετίσει την ασθένεια με κάποιο παθολογικό εύρημα μετά τον θάνατο. Σήμερα αυτό είναι το θεμέλιο της επιστημονικής ογκολογίας και της μελέτης του καρκίνου (3).

Ο διάσημος σκοτσέζος χειρουργός John Hunter (1728-1793) αντικατέστησε από αίτια της καρκίνου του μαστού την "μαύρη χολή" του Ιπποκράτη, με την λέμφο (12). Επίσης, πρότεινε ότι σε κάποια είδη καρκίνου μπορεί να υπάρχει δυνατότητα χειρουργικής αφαίρεσης και ότι ο χειρουργός μπορεί να αποφασίσει ποιους καρκίνους μπορεί να χειρουργήσει και ποιους όχι. Ανέφερε ότι, εάν ο όγκος δεν εισβάλει σε γύρω ιστούς και είναι "κινητός" τότε "δεν υπάρχει καμία παρατυπία στην αφαίρεση του". Έναν αιώνα αργότερα, μετά την ανάπτυξη της αναισθησίας επιτράπηκαν χειρουργικές επεμβάσεις, όπως η ριζική μαστεκτομή (3).

Εκείνη την εποχή, υπήρχαν πολλές θεωρίες περί δημιουργίας του καρκίνου του μαστού, θεωρίες όπως συσσώρευση γάλακτος, τραύματα, η προσωπικότητα, έκθεση σε μολυσμένο αέρα κτλ. Η παρακολούθηση οικογενειακών ιστορικών, είχε σαφή συσχέτιση με τη πιθανή μολυσματική μετάδοση της ασθένειας. Για την επίτευξη του στόχου και την αποκάλυψη της αληθινής αιτίας, είχαν πραγματοποιηθεί εκείνη την εποχή, μια σειρά από χαστικές χειρουργικές επεμβάσεις που περιλάμβαναν από άπλες λεμφικές εκτομές μέχρι και ριζική αφαίρεση του θώρακα (12).

Η χρυσή εποχή της χειρουργικής - 19ος και 20ος αιώνας

Μέχρι τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα, η χειρουργική επέμβαση ήταν πλέον διαθέσιμη επιλογή για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η ανάπτυξη, κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, του αντισηπτικού, της αναισθησίας και της

μετάγγιση αίματος, αύξησε την πιθανότητα επιβίωσης μετά τη χειρουργική επέμβαση (12).

Ο William Halstead (1882) στην Νέα Υόρκη, πραγματοποίησε την πρώτη ριζική μαστεκτομή, η οποία έγινε χρυσό πρότυπο για τα επόμενα 100 χρόνια. Η ριζική μαστεκτομή περιλάμβανε αφαίρεση του μαστού, των μασχαλιαίων αδένων και των δύο μυών στο στήθος, σε μια ενιαία χειρουργική επέμβαση. Παλαιότερα γινόταν αφαίρεση του κάθε τμήματος χωριστά, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα εξαπλώσεις του καρκίνου (12).

Αν και ριζική μαστεκτομή βοήθησε τις γυναίκες στην επιβίωση, ειδικά αν πραγματοποιούνταν νωρίς, πολλές γυναίκες δεν το επιλέγουν λόγω της παραμόρφωσης. Επιπλέον, πρόεκυπταν και άλλα προβλήματα όπως παραμορφωμένα θώρακα τοιχώματα, λεμφοίδημα ή πρήξιμο στο χέρι, λόγω της αφαίρεσης των λεμφαδένων και πόνο (12).

Ο σκοτσέζος χειρουργός George Beatson (1895), ανακάλυψε ότι η αφαίρεση των ωοθηκών, σε μια ασθενή του, είχε ως αποτέλεσμα την συρρίκνωση του καρκίνου του μαστού της. Μετέπειτα, πολλοί χειρουργοί άρχισαν, πέρα από την ριζική μαστεκτομή, να πραγματοποιούν και αφαίρεση των ωοθηκών. Η μείωση του όγκου μετά την αφαίρεση των ωοθηκών οφειλόταν στο γεγονός, ότι τα οιστρογόνα που παράγονταν στις ωοθήκες, βοηθούσαν στην ανάπτυξη του όγκου και η απομάκρυνσή τους βοηθούσε στην μείωση του μέγεθους του όγκου (12).

Στις γυναίκες χωρίς ωοθήκες, τα οιστρογόνα παράγονταν από τα επινεφρίδια, έτσι το 1952 ο Charles Huggins πραγματοποίησε την αφαίρεση των επινεφριδίων μιας γυναίκας (επινεφριδεκτομή) σε μια προσπάθεια λιμοκτονίας του όγκου από την έλλειψη οιστρογόνων. Στην προσπάθεια αποκοπής του όγκου από τα οιστρογόνα, ο Rolf Leffert και ο Herbert Olivecrona ξεκίνησαν την αφαίρεση του αδένα της υπόφυσης, μιας άλλης περιοχής παραγωγής οιστρογόνων (12).

Σύγχρονη εποχή - 21^{ος} αιώνας

Τη σήμερον εποχή, η γνώση μας γύρω από την βιολογία του καρκίνου έχει οδηγήσει σε αξιοσημείωτη πρόοδο όσον αφορά τη πρόληψη, τη πρόωπη διάγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι επιστημονική κοινότητα έχει μάθει τις τελευταίες δυο δεκαετίες, περισσότερα για τον καρκίνο από ό, τι είχε μάθει σε όλους τους προηγούμενους αιώνες.

Ωστόσο, υπάρχουν πολλά περισσότερα που πρέπει να μάθουμε και για αυτό η έρευνα για τον καρκίνο σήμερα προχωρά σε τόσα πολλά μέτωπα, όπως:

Στοχευόμενες θεραπείες: Καθώς μαθαίνουμε όλο και περισσότερα για την μοριακή βιολογία του καρκίνου, οι επιστήμονες έχουν περισσότερους στόχους για τα καινούρια φάρμακα. Πέρα από τα μονοκλωνικά αντισώματα και τους μικρούς αναστολείς των ενδοκυτταρικών μηχανισμών σηματοδότησης, οι επιστήμονες έχουν αναπτύξει νέες κατηγορίες μορίων όπως αντίθετης φοράς ολιγονουκλεοτίδια και μικρά RNA παρεμβολής (siRNA). Η έρευνα αυτή γίνεται για την ανάπτυξη στοχευμένων φαρμάκων, που στοχεύουν σε πρωτεΐνες που παράγονται από συγκεκριμένες γονιδιακές μεταλλάξεις, στα καρκίνα κύτταρα.

Ανοσοθεραπεία: Ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να σκοτώσει καλύτερα τα καρκινικά κύτταρα, μέσα από την στοχευόμενη λειτουργία φαρμάκων σε συγκεκριμένα σημεία του ανοσοποιητικού.

Γενετική του καρκίνου: Οι επιστήμονες ψάχνουν για γενετικές μεταλλάξεις που προκαλούν σε ορισμένους ασθενείς καλύτερη ανταπόκριση σε ορισμένα φάρμακα.

Νανοτεχνολογία: Η παραγωγή νέας τεχνολογίας υλικών, που μπορούν να σχηματίσουν μικροσκοπικά σωματίδια, οδηγεί σε πολύ υποσχόμενα τεστ απεικόνισης, που μπορούν να ανιχνεύσουν με μεγάλη ακρίβεια την θέση του καρκίνου. Επίσης, ένας άλλος στόχος είναι η χορήγηση φαρμάκων, συγκεκριμένα και αποτελεσματικά, κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα.

Ρομποτική χειρουργική: Χειραγώγηση των χειρουργικών εργαλείων εξ αποστάσεως από βραχίονες του ρομπότ και άλλες συσκευές, που ελέγχονται από έναν

χειρουργό. Ρομποτικά συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες ογκολογικές χειρουργικές επεμβάσεις. Η πιο κοινή χρήση ρομποτικής χειρουργικής στην ογκολογία είναι στην ριζική προστατεκτομή. Με την αλματώδη ανάπτυξη της μηχανικής και των υπολογιστών, μερικοί επιστήμονες πιστεύουν ότι τα επόμενα χρόνια θα αναπτυχθούν μελλοντικά συστήματα τα όποια θα είναι σε θέση να αφαιρέσουν τον όγκο με μεγαλύτερη ακρίβεια και με μικρότερο χειρουργικό τραύμα.

Έκφραση προφίλ και πρωτεϊνωματική: Η έκφραση του προφίλ επιτρέπει τον καθορισμό της παραγωγής εκατοντάδων ή ακόμα και χιλιάδων μορίων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών που παράγονται από RNA, DNA, ή ακόμα και ένα ολόκληρο κύτταρο ή ιστό) ταυτόχρονα. Γνωρίζοντας τι ειδή πρωτεϊνών παρήγονται στο κύτταρο, μπορούμε να προβλέψουμε πολλά για την συμπεριφορά του. Στον καρκίνο, αυτό μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση περισσότερο επιθετικών από λιγότερο επιθετικούς καρκίνους και την πρόβλεψη φάρμακου που θα έχει την καλύτερη ανταπόκριση (13).

1.3 Ανατομία μαστού

Ανατομική δομή μαστού

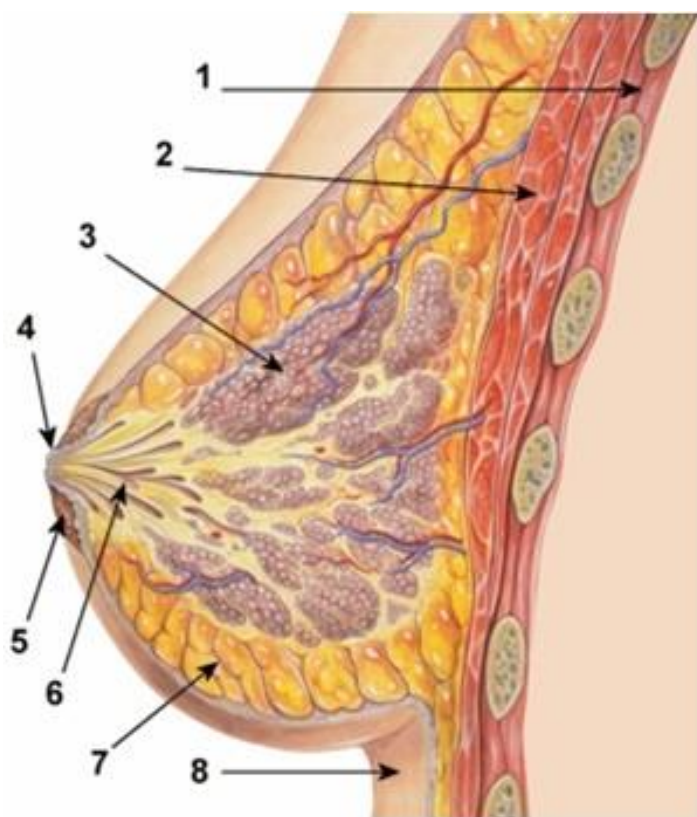
Οι μαστοί, είναι αδένες του αναπαραγωγικού συστήματος, που εκκρίνουν γάλα. Υπάρχουν τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, αλλά στους άνδρες ανευρίσκονται σε υποτυπώδη κατάσταση, εκτός και αν έχει αναπτυχτεί κάποια διαταραχή (14).

Στο θηλυκό οι μαστοί είναι ημικυκλικές λιπώδης πτυχές του δέρματος (15). Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξής τους, ο κάθε μαστός καταλαμβάνει την πρόσθια επιφάνεια του θώρακα, από το 2°-3° ως το 6°-7° πλευρό (9). Προς τα έξω εκτείνεται μέχρι την πρόσθια μασχαλιαία γραμμή, ενώ προς τα έσω μέχρι το πλάγιο χείλος του στέρνου (15).

Πριν από την εφηβεία οι μαστοί έχουν μικρό μέγεθος, αλλά αυξάνουν σε μέγεθος όταν ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους τα αναπαραγωγικά όργανα. Αυξάνουν σημαντικά σε μέγεθος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ιδιαίτερα μετά τον τοκετό, και ατροφούν στα γηρατειά. Ο αριστερός μαστός είναι συνήθως λίγο μεγαλύτερος από τον δεξιό (14).

Μετά την ωρίμανση, το αδενικό τμήμα του μαστού έχει μια μοναδική και ξεχωριστή μορφή προεξέχοντος κώνου. Η βάση του κώνου είναι περίπου κυκλική. Υπάρχει τεράστια διακύμανση στα μεγέθη του μαστού. Ένα τυπικό βάρος ενός μη γαλουχούντος μαστού είναι μεταξύ των 150 και 220 g, ενώ ενός γαλουχούντος μαστού μπορεί να υπερβαίνει τα 500 g (9). Ο μαστός διακρίνεται ανατομικά σε τρία τμήματα: το μαστικό αδένα, τη θηλή και τη θηλαία άλω. Ο μαστικός αδένας αποτελείται από 15-20 λοβούς, οι όποιοι είναι διατεταγμένα κυκλικά στο υποδόριο στρώμα και οριοθετούνται από διαφράγματα συνδετικού και λιπώδους ιστού (16). Οι λοβοί έχουν σχήμα πυραμοειδές, με την κορυφή προς τη θηλή, όπου και καταλήγει ο αντίστοιχος γαλακτοφόρος πόρος. Οι γαλακτοφόροι πόροι συγκλίνουν προς τη θηλή και εκβάλλουν είτε μεμονωμένα είτε μαζί με άλλους στην κορυφή της θηλής. Πριν από την εκβολή του στη θηλή, κάθε γαλακτοφόρος πόρος εμφανίζει μία

διευρυμένη μοίρα, το γαλακτοφόρο κόλπο, όπου είναι δυνατή η συλλογή γάλακτος (15).



Τομή μαστού:

1. Μεσοπλευρικοί μύες
2. Θωρακικοί μύες
3. Λοβοί του μαστικού αδένα
4. Θηλή
5. Θηλαία άλως
6. Γαλακτοφόροι κόλποι
7. Περιμαστικό λίπος

Εικόνα 3: Ο μαστός και η ανατομία του.

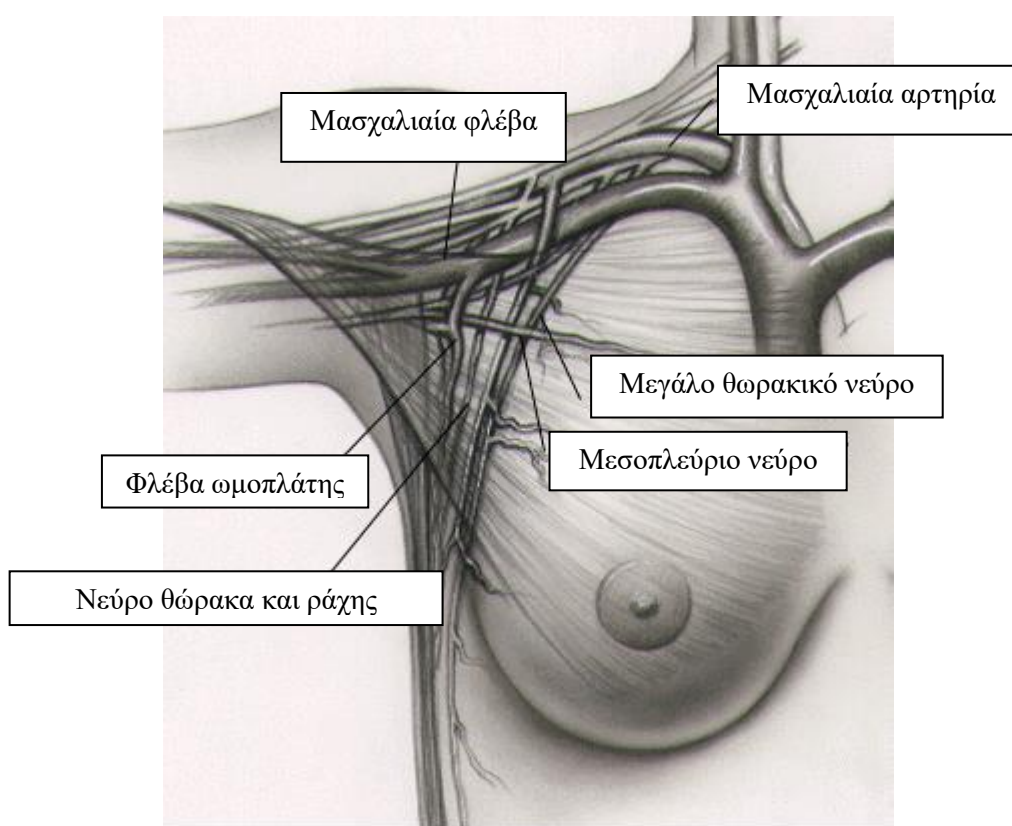
<http://tsirigotakis.com/%CE%BC%CE%B1%CF%83%CF%84%CE%BF%CF%83/>

Για την περιγραφή του μαστού διακρίνουμε δύο επιφάνειες, την πρόσθια και την οπίσθια, καθώς και την περιφέρεια. Η πρόσθια επιφάνεια του μαστού καλύπτεται από λεπτό και λείο δέρμα, στο μέσο περίπου του οποίου βρίσκονται η θηλή και η θηλέα άλως. Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού είναι ελαφρά υπόκοιλη, επικάθεται στην περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός. Και τέλος η περιφέρεια του μαστού μεταβαίνει βαθμιαία στο γύρω δέρμα (17).

Αρτηρίες: Οι αρτηρίες που τροφοδοτούν τους μαστούς προέρχεται από την έσω μαστική, την πλάγια και άνω θωρακική, το θωρακικό κλάδο της ακρωμιοθωρακικής, τους διατριπαινόντες κλάδους των μεσοπλευρίων αρτηριών και την υποπλάτιο αρτηρία (12).

Φλέβες: Οι φλέβες διαγράφουν έναν αναστομωτικό κύκλο γύρω από τη βάση της θηλής. Διακρίνονται σε επιπολής και εν τω βάθει. Οι επιπολής φλέβες εκβάλλουν στην έσω μαστική φλέβα, ενώ οι εν τω βάθει ακολουθούν τρεις βασικές οδούς προς την έσω μαστική, τη μασχालιαία και τις μεσοπλεύριες φλέβες (9,15).

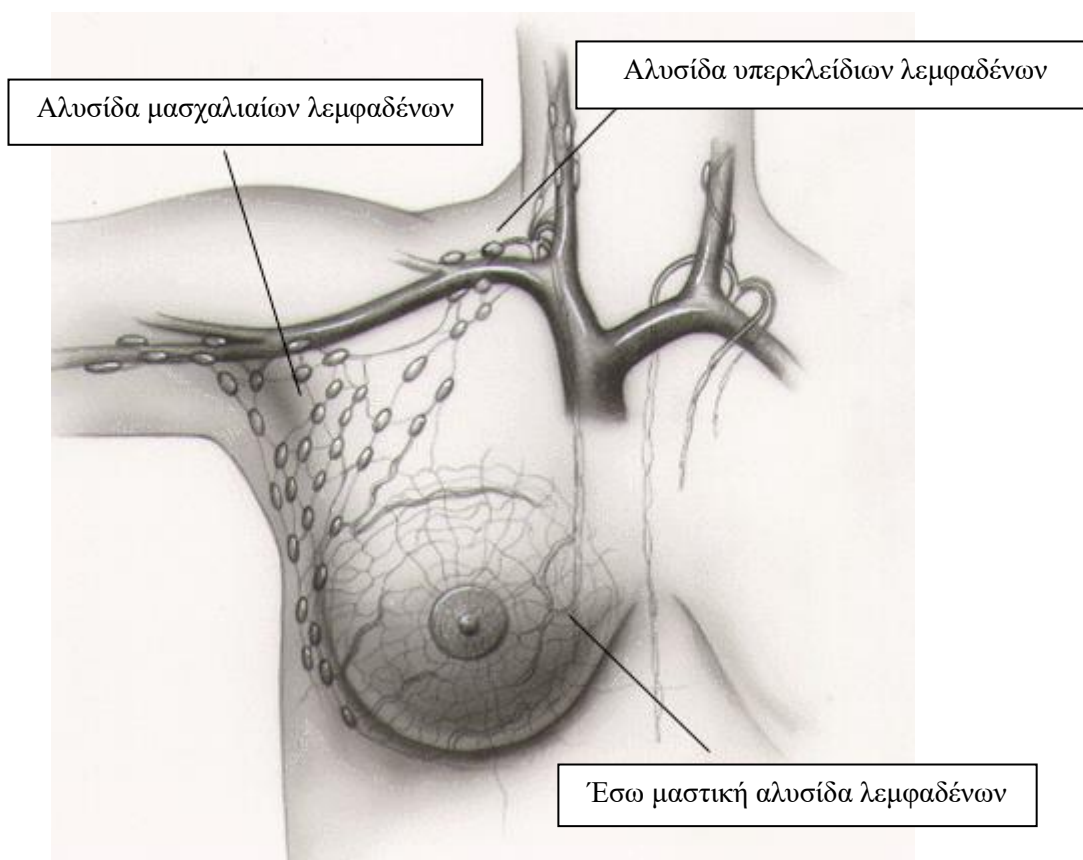
Νεύρωση: Η νεύρωση του μαστού γίνεται από το 4ο -6ο μεσοπλεύριο νεύρο, το μεσοπλευροβραχιόνιο νεύρο, το θωρακοραχιαίο, το μακρύ θωρακικό ή νεύρο του Bell και απ' το αυτόνομο νευρικό σύστημα. Η θηλή εμφανίζει ιδιαίτερη νευροβρίθεια, όπου οι νευρικές ίνες τελειώνουν στα απτικά σωματίδια του Meissner (9).



Εικόνα 4: Φλέβες, αρτηρίες και νεύρα του μαστικού αδένα
<http://www.breastdiseases.com/anat.htm>

Λεμφαγγεία: Το λεμφαγγειακό δίκτυο του μαστού αποχετεύει τη λέμφο προς δύο κατευθύνσεις, προς τους μασχालιαίους και προς τους λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας. Μεταξύ των δυο οδών υπάρχουν πολλές αναστομώσεις. Οι λεμφαδένες του μαστού διακρίνονται σε τρεις ομάδες, τους μασχालιαίους, τους υπερκλείδιους και τους λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας (17). Οι λεμφαδένες

της μασχάλης χωρίζονται σε τρία επίπεδα, που έχουν σημασία για το λεμφαδενικό καθαρισμό της περιοχής σε περίπτωση καρκίνου (15).



Εικόνα 5: Τα τρία επίπεδα διαχωρισμού των λεμφαγγείων του μαστικού αδένα.
<http://www.breastdiseases.com/anat.htm>

Φυσιολογική ανάπτυξη μαστού

Θηλαρχή είναι η έναρξη ανάπτυξης μαστού στη γυναίκα και συμβαίνει κατά τη αρχή της εφηβείας. Η ανάπτυξη του μαστού συνδέεται άμεσα με την έκκριση των οιστρογόνων, των γοναδοτροπινών και της αυξητικής ορμόνης. Η έναρξη της εφηβείας χαρακτηρίζεται από προοδευτικά αυξανόμενη έκκριση GnRH από τον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την ολοένα και αυξανόμενη έκκριση γοναδοτροπινών από την υπόφυση και φυλετικών ορμονών από την ωοθήκη (15). Μετά τη θηλαρχή ακολουθεί η αδρεναρχή, δηλαδή η ανάπτυξη των δευτερογενών χαρακτηρισμών του φύλου, την επιτάχυνση της αύξησης του αναστήματος και την εμμηναρχή, χωρίς ωστόσο η σειρά αυτή να είναι απόλυτη (18). Σήμερα η έναρξη της θηλαρχής, αρχίζει

κατά μέσο όρο κατά το 8ο -9ο έτος της ηλικίας. Η ανάπτυξη του μαστού διακρίνεται στα πέντε στάδια κατά Tanner (19).



Εικόνα 6: Τα πέντε στάδια κατά Tanner.
http://www.iatrikionline.gr/ELL_M_2_2009/2.pdf

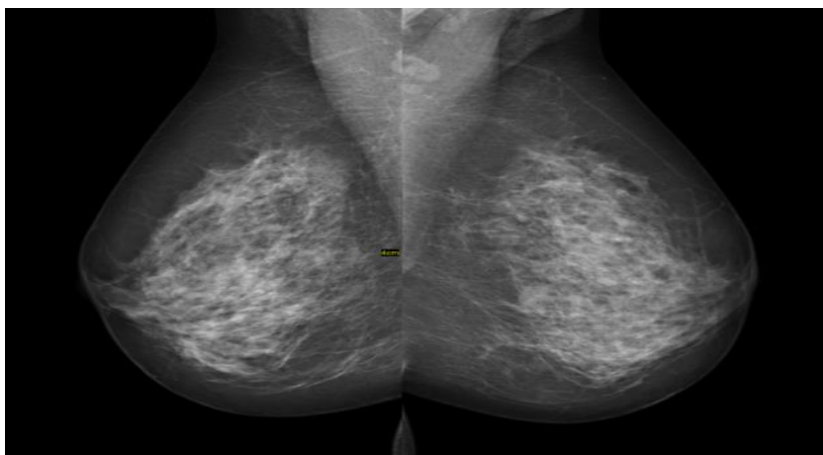
1.3 Διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού

Διάγνωση

Συμπτωματική διάγνωση : Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού γίνεται συνήθως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, ωστόσο μεγάλος είναι ο αριθμός των γυναικών που διαγιγνώσκονται χωρίς να έχουν κανένα εμφανές σύμπτωμα. Το πιο κοινό σύμπτωμα του καρκίνου του μαστού είναι η εμφάνιση μιας νέας μάζας ή ενός εξογκώματος στον μαστό το οποίο μπορεί να παρουσιάζει πόνο ή όχι, να έχει σαφές ή ακανόνιστο περίγραμμα και τέλος να είναι σκληρό ή μαλακό. Με κάθε τέτοια παρατήρηση η γυναίκα οφείλει να απευθυνθεί στον γιατρό της για περαιτέρω διερεύνηση. Άλλα κοινά συμπτώματα είναι: 1) Διόγκωση ενός μέρους ή ολόκληρου του μαστού. 2) Εσωλική θηλής ή/και αιμορραγία ή άλλη απέκκριση εκτός μητρικού γάλακτος. 3) Ευαισθησία του δέρματος. 4) Πόνος στον μαστό ή την θηλή. 5) Διογκωμένοι τραχηλικοί και μασχαλιαίοι λεμφαδένες (α).

Απεικονιστικές μέθοδοι διάγνωσης

Μαστογραφία: Κατά την μαστογραφία γίνεται απεικόνιση του μαστού με την χρήση ακτίνων X. Χρησιμοποιείται για να βοηθήσει στην διάγνωση τόσο των ψηλαφητών όσο και των μη ψηλαφητών αλλοιώσεων (20). Η εξέταση της μαστογραφίας διακρίνεται σε αυτή του προληπτικού ελέγχου και στην διαγνωστική μαστογραφία. Η δεύτερη ζητείται από τον ιατρό σε περίπτωση υποψίας κάποιας αλλοίωσης η οποία χρήζει καλύτερης απεικόνισης (β).



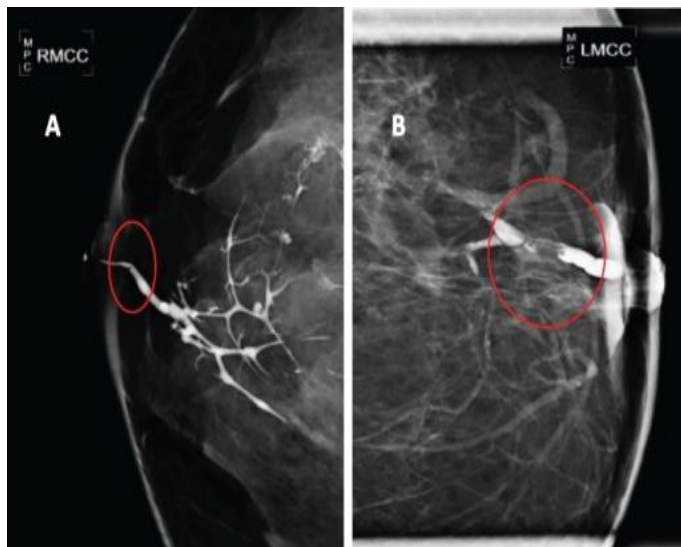
Εικόνα 7: Αποτελέσματα ψηφιακής μαστογραφίας : By ©
NevitDilmen, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19905282>

Υπερηχογράφημα: Βασίζεται στην αντανάκλαση των υπερηχητικών κυμάτων από τους διαφορετικούς τύπους ιστού για την δημιουργία απεικόνισης του μαστού μέσω υπολογιστή. Είναι εντελώς ακίνδυνη τεχνική καθώς ούτε τραυματίζει τους ιστούς ούτε χρησιμοποιεί ακτίνες X (α). Ωστόσο η διαγνωστική του αξία είναι αρκετά περιορισμένη συγκριτικά με άλλες απεικονιστικές μεθόδους (β).



Εικόνα 8: Παράδειγμα υπερηχογραφήματος μαστού στο οποίο διακρίνεται μια σαφώς περιγεγραμμένη ωοειδής μάζα.
<http://www.ultrasoundpaedia.com/pathology-breast/>

Γαλακτογραφία: Χρησιμοποιείται όταν υπάρχει έκκριμα θηλής αγνώστου αιτιολογίας και δίνει σαφή εικόνα του εσωτερικού των γαλακτοφόρων αδένων. Με την χρήση μιας λεπτής σύριγγας εισάγεται σκιαγραφικό από την θηλή και με την χρήση ακτινών X αναπαρίσταται στον υπολογιστή το εσωτερικό της θηλής και των γαλακτοφόρων αδένων καθώς και οι πιθανώς υπάρχουσες αλλοιώσεις (21).



Εικόνα 9: Δύο παραδείγματα ενδεικτικών αλλοιώσεων γαλακτογραφίας.
https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC4162680_can-8-461fig2&req=4

Επεμβατικές μέθοδοι διάγνωσης

Κυτταρολογία κατόπιν FNA: Κατά την εξέταση FNA (Fine Needle Aspiration – Βιοψία λεπτής βελόνης) μια σύριγγά εισάγεται στην ύποπτη μάζα ή αλλοίωση από την οποία αναρροφώνται κύτταρα, και αν αυτά είναι επαρκή, ακολουθούν κυτταρολογικές τεχνικές που οδηγούν στην τελική διάγνωση.



Εικόνα 10: Βιοψία δια λεπτής βελόνης
<https://blogforbreastcancer.wordpress.com/tag/fna/>

Βιοψία: Γίνεται με μεγάλο διαμετρήματος βελόνα (8-14 G) με την χρήση της οποίας και υπό τοπική αναισθησία, αφαιρείται ιστικός κύλινδρος προοριζόμενος για ιστολογικές τεχνικές. Ενδείκνυται σε περιπτώσεις στις οποίες η αναρρόφηση κυττάρων δεν είναι δυνατή ή η διάγνωση δεν μπορεί να γίνει με κυτταρολογικές τεχνικές. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στοιστοτεμάχιο που παραλαμβάνεται μπορεί



Εικόνα 11: Βιοψία με βελόνα μεγάλου διαμετρήματος υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση.
<http://plasticsurgerykey.com/breast-cancer/>

να γίνει και έλεγχος των δεικτών της νόσου (β).

Προγνωστικοί παράγοντες

Οι προγνωστικοί παράγοντες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για την έκβαση της νόσου την δεδομένη στιγμή της διάγνωσης καθώς και να βοηθήσουν στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Μερικοί από αυτούς που εξετάζονται είναι: η ηλικία της ασθενούς την χρονική στιγμή της διάγνωσης, η κοινωνικοοικονομική κατάσταση και η φυλή της ασθενούς, το μέγεθος του όγκου, ο ιστολογικός τύπος του όγκου, η επέκταση σε μασχαλιαίους λεμφαδένες και ο αριθμός αυτών, οι δείκτες αγγειογένεσης (π.χ ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF), οι μεταλλάξεις της πρωτεΐνης p53 και το προφίλ γονιδιακής έκφρασης (21).

Θεραπεία

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι θεραπείας του καρκίνου του μαστού, ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου.

Τοπικές θεραπείες

Είναι θεραπείες που αντιμετωπίζουν τον όγκο χωρίς να επηρεάζουν το υπόλοιπο σώμα. Τυπικές τοπικές θεραπείες που χρησιμοποιούνται στον καρκίνο του μαστού είναι η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία(α).

Χειρουργική επέμβαση: Οι περισσότερες γυναίκες με καρκίνο του μαστού έχουν κάποιο είδος χειρουργικής επέμβασης, ως μέρος της θεραπείας τους. Η χειρουργική επέμβαση μπορεί να γίνει για διάφορους λόγους όπως για παράδειγμα αφαιρέσει του καρκινικού όγκου ή για ανίχνευση διήθησης στους γύρω ή για ανακούφιση από τα συμπτώματα προχωρημένου καρκίνου (α).

Ακτινοθεραπεία: Η ακτινοθεραπεία είναι ένα είδος θεραπείας με ακτίνες υψηλής ενέργειας ή σωματίδια που καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν 2 κύρια είδη ακτινοθεραπείας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, η εξωτερική και η εσωτερική. Στην εξωτερική ακτινοβολία η ακτινοβολία προέρχεται από μια μηχανή έξω από το σώμα, ενώ στην εσωτερική

τοποθετείται στο εσωτερικό του σώματος για ένα σύντομο χρονικό διάστημα μια ραδιενεργός πηγή (α).

Συστηματικές θεραπείες

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί επίσης να αντιμετωπιστεί με τη χρήση φαρμάκων, τα οποία μπορεί να δοθούν είτε από το στόμα είτε απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος. Ονομάζονται συστηματικές θεραπείες επειδή μπορούν να φθάσουν τα καρκινικά κύτταρα οπουδήποτε στο σώμα. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου του μαστού, μπορούν να χρησιμοποιηθεί διαφορετικοί τύποι φαρμάκων όπως χημειοθεραπεία, ορμονοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία (α).

Χημειοθεραπεία: Η χημειοθεραπεία είναι η θεραπεία με φάρμακα κατά του καρκίνου που χορηγούνται ενδοφλεβίως ή από το στόμα και ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα περισσότερα μέρη του σώματος για να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα. Με την χημειοθεραπεία αντιμετωπίζεται ο καρκίνος του μαστού σε ολόκληρο το σώμα μιας γυναίκας και όχι μόνο στο στήθος της. Η λήψη των φαρμάκων χημειοθεραπείας είναι δυνατό να προκαλέσουν πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες, οι οποίες ωστόσο δεν είναι ίδιες για όλες τις γυναίκες που παίρνουν τα φάρμακα αυτά (α).

Ορμονοθεραπεία: Ορισμένοι τύποι καρκίνου του μαστού επηρεάζονται από τις ορμόνες στο αίμα. Στους ER-θετικούς και PR-θετικούς καρκίνους του μαστού, τα καρκινικά κύτταρα έχουν στην επιφάνεια τους υποδοχείς που συνδέονται με τα οιστρογόνα και αυτή η σύνδεση προάγει την ανάπτυξη τους. Υπάρχουν διάφορα φάρμακα (ορμονοθεραπεία) που χρησιμοποιούνται για να σταματήσουν την σύνδεση των οιστρογόνων με τους υποδοχείς. Η ορμονοθεραπεία συνιστάται σε γυναίκες με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς (ER-θετική ή / και PR-θετική), ωστόσο δεν βοηθά τις γυναίκες των οποίων οι όγκοι έχουν αρνητικούς ορμονικούς υποδοχείς (τόσο ER- και PR-αρνητικούς) (α).

Στοχευμένη θεραπεία: Καθώς οι ερευνητές έχουν μάθει περισσότερα σχετικά με τις αλλαγές που οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, έχουν αναπτύξει νέους τύπους φαρμάκων που στοχεύουν κάποιες από αυτές τις αλλαγές. Αυτά τα στοχευμένα φάρμακα έχουν σχεδιαστεί για να μπλοκάρουν την

ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, λειτουργούν διαφορετικά από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία επιτίθενται σε όλα τα κύτταρα που αναπτύσσονται γρήγορα (συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων) (α).

Συμμετοχή σε κλινική δοκιμή

Οι κλινικές δοκιμές είναι προσέχτικα ελεγχόμενες ερευνητικές μελέτες που στοχεύουν στην περαιτέρω διερεύνηση νέων υποσχόμενων θεραπειών ή διαδικασιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι ο μόνος τρόπος απόκτησης πρόσβασης σε νεότερες θεραπείες. Δεν είναι κατάλληλες για όλους (α).

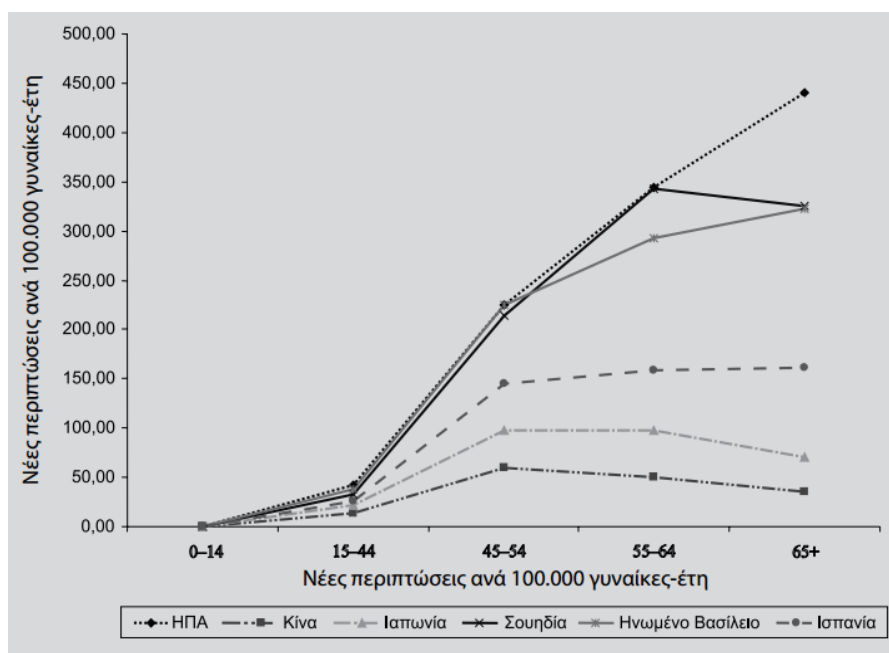
Συμπληρωματικές και εναλλακτικές μέθοδοι

Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να περιλαμβάνουν βιταμίνες, βότανα, ειδικές δίαιτες, ή άλλες μεθόδους όπως βελονισμός ή μασάζ. Συμπληρωματικές μέθοδοι αναφέρονται σε θεραπείες που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τη τακτική ιατρική φροντίδα. Οι εναλλακτικές θεραπείες χρησιμοποιούνται αντί για ιατρική θεραπεία. Αν και ορισμένες από αυτές τις μεθόδους μπορεί να είναι χρήσιμες για την ανακούφιση των συμπτωμάτων, δεν έχουν αποδειχθεί για τη αποτελεσματικότητά τους. Μερικές είναι ακόμη και επικίνδυνες (α).

1.4 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι περίπου 100 φορές συχνότερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες και προσβάλλει περισσότερο γυναίκες ανώτερων οικονομικών τάξεων (22). Αποτελεί το συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως, με σχεδόν 1,7 εκατομμύρια καινούργιες διαγνώσεις το 2012 (101). Μια στις εννέα περίπου γυναίκες θα εμφανίσει καρκίνο μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής της (23).

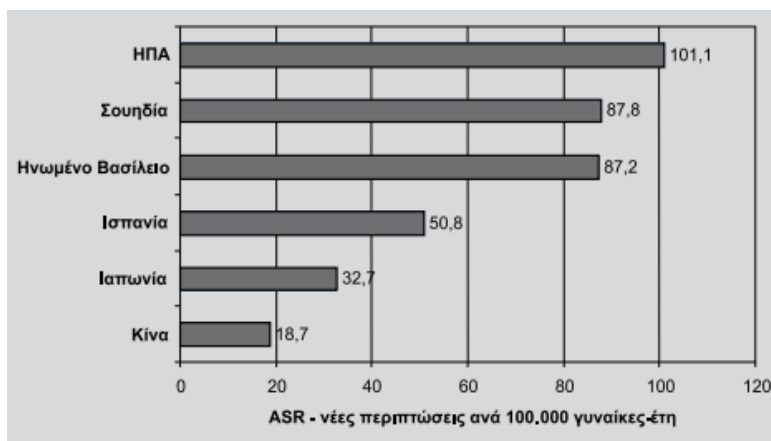
Παρόλο που το σχήμα της καμπύλης της κατά ηλικία επίπτωσης είναι παρόμοιο μεταξύ των χωρών, υπάρχουν μεγάλες διαφοροποιήσεις ως προς το επίπεδο επίπτωσης. Η επίπτωση της νόσου αυξάνει με την ηλικία και ο ρυθμός αύξησης μειώνεται μετά από την εμμηνόπαυση, γεγονός που ενισχύει το ρόλο των αναπαραγωγικών ορμονών στην αιτιολογία της νόσου (22,24,25,26).



Εικόνα 12: Κατά ηλικία δείκτες επίπτωσης καρκίνου μαστού.
<http://www.mednet.gr/archives/2008-6/pdf/742.pdf>

Η νόσος είναι πολύ συχνότερη σε περιοχές όπως η Βόρεια Αμερική, Αυστραλία, καθώς και η Βορειοδυτική Ευρώπη (23), σε σχέση με την Κίνα ή την Ιαπωνία (27). Σε έρευνες γυναικών μεταναστών που μετακινήθηκαν από χώρες χαμηλού σε χώρες υψηλού κινδύνου, αποδείχθηκε ότι η επίπτωση εξομοιώνεται με

την αντίστοιχη της χώρας υποδοχής, συνήθως δύο γενιές αργότερα (28,29) Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι διεθνείς διαφοροποιήσεις στους δείκτες του καρκίνου του μαστού οφείλονται, σε μεγάλο μέρος, σε διαφοροποιήσεις του μακρο- και μικροπεριβάλλοντος και όχι σε γενετικούς παράγοντες (30).



Εικόνα 13: Κατά ηλικία δείκτες επίπτωσης καρκίνου του μαστού.
<http://www.mednet.gr/archives/2008-6/pdf/742.pdf>

Παράγοντες κίνδυνου

Φύλο

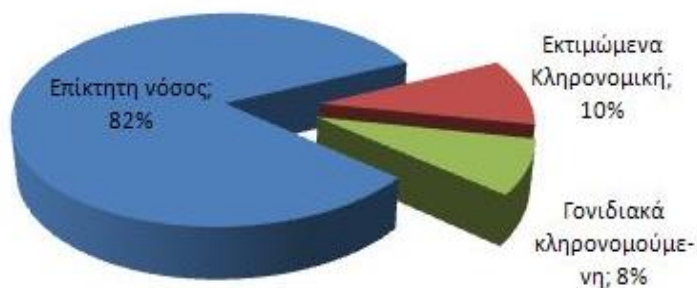
Η αναλογία του καρκίνου του μαστού στη γυναίκα σε σχέση με τον άνδρα είναι 100:1 (31).

Οικογενειακό και γενετικό ιστορικό

Ο παράγοντας κινδύνου αυξάνεται όταν 1) Υπάρχουν δυο ή περισσότεροι συγγενείς Α' βαθμού με ιστορικό καρκίνου μαστού. 2) Υπάρχει συγγενής Α' βαθμού με ιστορικό καρκίνου μαστού σε νεαρή ηλικία (<40). 3) Υπάρχει ιστορικό πολλαπλού καρκίνου μαστού σε Α' βαθμού συγγενή. 4) Υπάρχουν πολλαπλοί καρκίνοι στην οικογένεια (στήθος, ωθήκη, προστάτης) σε Α' και Β' βαθμού συγγένεια (31).

Περίπου το 11%-19% των γυναικών με διαγνωσμένο καρκίνο του στήθους , έχουν ένα σημαντικό οικογενειακό ιστορικό ασθένειας το οποίο αντικατοπτρίζει από 1) την κληρονομικότητα της γενετικής μετάλλαξης , 2) τους άγνωστους

κληρονομούμενους γενετικά παράγοντες κινδύνου ή 3) την παρουσία περιβαλλοντικών παραγόντων (31).



Εικόνα 14: Ποσοστά επίκτητης κακοήθειας μαστών.
<http://www.doctorvasiliadis.gr/menusidebrcaepid.html>

Ηλικία

Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού έχει αυξηθεί στα τελευταία σαράντα χρόνια, σε ποσοστό περίπου 100% (γ). Παρακάτω φαίνεται ο στατιστικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου μαστού ανάλογα την ηλικία ανά δεκαετίες (32).

20 ετών 1 στις 1760

30 ετών 1 στις 229

40 ετών 1 στις 69

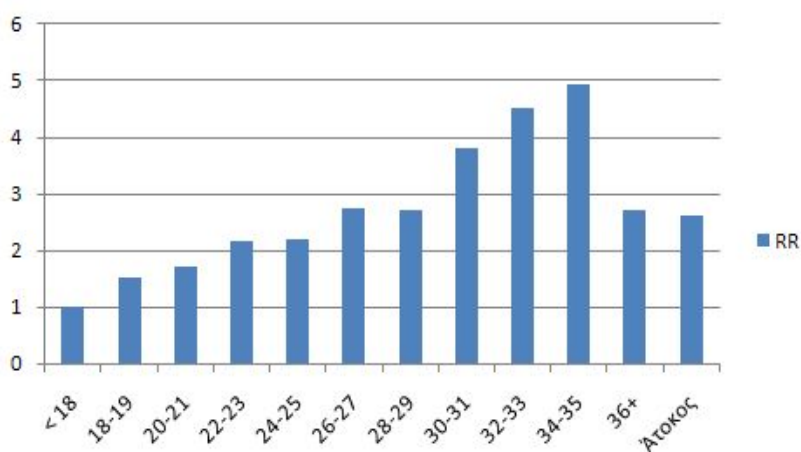
50 ετών 1 στις 42

60 ετών 1 στις 29

70 ετών 1 στις 27

Τεκνοποίηση

Ο καρκίνος μαστού επηρεάζεται από το εάν η γυναίκα είχε ή όχι ποτέ τελειόμηνη εγκυμοσύνη και από την ηλικία που είχε την πρώτη της κύηση. Ο σχετικός κίνδυνος εμφανίσεως καρκίνου μαστού είναι 1,67 για τις γυναίκες οι οποίες δεν κάνουν ποτέ παιδί (άτοκες) και 2,23 για τις γυναίκες που ολοκληρώνουν την πρώτη εγκυμοσύνη μετά τα 30 έτη (33). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των κυήσεων μίας γυναίκας τόσο μειώνεται ο κίνδυνος. Επιπλέον, η πρώτη κύηση σε μικρή ηλικία (γύρω στα 20 έτη) θεωρείται προστατευτικός παράγων διότι μειώνεται σημαντικά ο κίνδυνος (22).



Εικόνα 15: Η κατανομή του σχετικού κινδύνου σε σχέση με την ηλικία του πρώτου τοκετού.

<http://www.doctorvasiliadis.gr/menusidebrcaepid.html>

Αντισυλληπτικά χάπια και θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης

Η μακροχρόνια χρήση από του στόματος αντισυλληπτικών δισκίων αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Για τον μη διηθητικό καρκίνο ο σχετικός κίνδυνος υπολογίζεται στο 1,24. Ελαφρώς μεγαλύτερος κίνδυνος υπάρχει στα τριφασικά αντισυλληπτικά. Ο κίνδυνος μειώνεται στο 1,16 στα 1 έως 4 χρόνια με από τον τερματισμό της χορήγησης των αντισυλληπτικών δισκίων και εξαφανίζεται στα 5 έως 10 χρόνια από την διακοπή. Πολλές μελέτες αποδεικνύουν τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού που σχετίζεται με την μακροπρόθεσμη χρήση θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (ΘΟΥ). Σε γυναίκες που εφαρμόζεται

ΘΟΥ για μεγαλύτερο χρόνο (από 5 έως 10 έτη) ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου κυμαίνεται μεταξύ 1.2 και 1.5. Επίσης υπάρχει η διαπίστωση μεταξύ των μελετών αξιολόγησης θνησιμότητας του καρκίνου του μαστού και χρήση ΘΟΥ ότι η θνησιμότητα στην ομάδα αυτή είναι μειωμένη. Η συνδυασμένη θεραπεία οιστρογόνων – προγεστερόνης που λαμβάνεται πάνω από 10 χρόνια μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού κατά 80% σε σχέση με γυναίκες που δεν τους έχουν χορηγηθεί ορμόνες, αλλά και προσθήκη της προγεστερόνης στα σκευάσματα με οιστρογόνο στην προαναφερόμενη ομάδα μελέτης βρίσκεται να επιβαρύνει περισσότερο την εμφάνιση κακοήθειας (34).

Αναπαραγωγική ηλικία

Στις γυναίκες, τις οποίες οι έμμηνος ρύση άρχισε πριν από την ηλικία των 12 ετών, εμφανίζεται αύξηση του κίνδυνου αναπτύξει καρκίνο μαστού. Ο σχετικός κίνδυνος για αυτές βρέθηκε να είναι 1,3 σε σύγκριση με εκείνες στις οποίες η περίοδος άρχισε μετά την ηλικία των 15 ετών. Στο άλλο άκρο της αναπαραγωγικής περιόδου, όσες γυναίκες δεν έφθασαν στην εμμηνόπαυση μέχρι την ηλικία των 55 ετών ή μετά από αυτή είχαν ένα σχετικό κίνδυνο 1,22 σε σύγκριση με εκείνες που η εμμηνόπαυση συνέβη πριν από την ηλικία των 45. Συμπεραίνεται ότι ο κίνδυνος που απορρέει για τον καρκίνο του μαστού από τις γυναικολογικές μεταβλητές αυτές είναι μια απλή λειτουργία του το αριθμού των ωορρηκτικών κύκλων της εμμηνορυσίας που υφίσταται μια γυναίκα κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής. Ως υποστήριξη για την ιδέα αυτή, έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες που τις έχουν αφαιρεθεί και δύο ωοθήκες χειρουργικά πριν από την ηλικία των 40 ετών δείχνουν μια μείωση της συχνότητα εμφάνισης κατά 45% σε κίνδυνο σε σύγκριση με τις γυναίκες που υφίστανται ένα φυσικό κύκλο προς εμμηνόπαυση στην ηλικία των 50 έως 54 (35).

Ατομικό ιστορικό

Ο κίνδυνος να παρουσιαστεί καρκίνος και στον άλλο μαστό μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, από την εμφάνιση του πρωτοπαθή όγκου του μαστού, είναι 5 φορές μεγαλύτερος από τον κίνδυνο που διατρέχει ο γενικός πληθυσμός.

Η κυστική μαστοπάθεια θεωρείται από τους πλέον ισχυρούς προδιαθεσικούς παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η αύξηση των επιθηλιακών στοιχείων χωρίς υπερπλασία, αυξάνει τον κίνδυνο 1,9 φορές, ενώ η παρουσία υπερπλασίας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου κατά 5 φορές περίπου. Η παρουσία ατυπίας συνοδευόμενη από θετικό οικογενειακό ιστορικό αυξάνει τον κίνδυνο κατά 11 φορές. Τέλος, η παρουσία και ασβεστώσεων μαζί με την επιθηλίωση κάνει τον κίνδυνο ακόμα μεγαλύτερο για την δημιουργία καρκίνου του μαστού (30).

Διατροφικοί παράγοντες

Η διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε ζωικές πρωτεΐνες ή ζωικά λίπη και η υπερβολική κατανάλωση οινοπνεύματος αποτελούν παράγοντες αυξημένου κινδύνου για την εκδήλωση της νόσου. Ως προστασία συνιστάται τροφή πλούσια σε φυτικές ίνες, φρούτα και λαχανικά (30).

Υπάρχει διαφορετική επίδραση του πάχους της γυναίκας στον προ-εμμηνοπαυσιακό και στο μετα-εμμηνοπαυσιακό καρκίνο μαστού:

- Στις προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ο καρκίνος του μαστού φαίνεται να είναι αυξημένος σε γυναίκες με χαμηλό βάρος.
- Στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ο καρκίνος του μαστού φαίνεται να αυξάνει με την αύξηση του βάρους (36).

Κάπνισμα

Πρόσφατες μελέτες, δικαιολογούν την υποψία ότι η έναρξη του καπνίσματος σε μικρή ηλικία συνδέεται με αύξηση του κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού κατά 20%. Άλλες μελέτες επίσης δείχνουν ότι το κάπνισμα πακέτου για

πολλά χρόνια ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο από 10% έως 30%. Ωστόσο, τα ισχυρότερα αποδεικτικά στοιχεία για μια ενεργή σχέση του καπνίσματος με τον κίνδυνο καρκίνου μαστού προέρχονται από μελέτες που εξετάζουν το κάπνισμα από γενετική άποψη. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις N-ακετυλτρανσφεράσες (NAT1 και NAT2) εμφανίζουν ποικίλους πολυμορφισμούς και επειδή τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στην μεταβολική ενεργοποίηση και στην εξουδετέρωση των αρωματικών αμινών του καπνού, μελετήθηκε ο πιθανός ρόλος των διαφορετικών γονότυπων NAT με τον κίνδυνο του καρκίνου μαστού. Τρεις μετα-αναλύσεις και μια ομαδοποιημένη ανάλυση βρήκαν αυξήσεις 35% έως 50% στους μακροχρόνια καπνιστές με διαφοροποιήσεις στους γονοτύπους τους με αργή δράση του ενζύμου NAT2. Γενικά, το κάπνισμα στον καρκίνο του μαστού, είτε πρόκειται για ενεργητικό είτε για παθητικό κάπνισμα επιβαρύνει τη συχνότητα εμφάνισης του με τον σχετικό κίνδυνο να κυμαίνεται από 1,05 έως 2,1 (31).

1.5 Γενετική και μοριακή βάση

Ένας καρκίνος δημιουργείται από συσσώρευση μεταλλάξεων σε κρίσιμα γονίδια, όπως σε αυτά που ελέγχουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση ή την επισκευή του κατεστραμμένου DNA. Ως αποτέλεσμα, της διαταραχής των λειτουργιών αυτών, τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα και έτσι σχηματίζουν όγκους. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, αυτές οι μεταλλάξεις (σποραδικές) αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και εντοπίζονται μόνο σε ορισμένα κύτταρα του μαστού (37). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού (περίπου 70%) θεωρούνται σποραδικές και δεν μεταβιβάζονται στους απογόνους (38). Πιο σπάνια γονιδιακές μεταλλάξεις, που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, μπορεί να εντοπίζονται σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Αυτές οι γενετικές αλλαγές, οι οποίες ταξινομούνται ως βλαστικές μεταλλάξεις, συνήθως κληρονομούνται (37). Ο οικογενής καρκίνος του μαστού (περίπου 30% των ασθενών) έχει συσχετιστεί με έναν αριθμό γονιδίων, υψηλού, μέτριου και χαμηλού κινδύνου (38).

Η ιδέα ότι η καρκίνος του μαστού έχει μια οικογενειακή ή κληρονομική συνιστώσα προτάθηκε για πρώτη φορά το 1757, όταν ο Ledran περιέγραψε την περίπτωση μιας κοπέλας δεκαεννέα ετών, η οποία πίστευε ότι είχε κληρονομήσει τον καρκίνο του μαστού της από τους συγγενείς της με καρκίνο μαστού (39). Το 1866, ο Paul Broca, ένας Γάλλος χειρουργός, παρατήρησε μια οικογένεια σε βάθος τεσσάρων γενεών, στην οποία δέκα γυναίκες επλήγησαν από τον καρκίνο του μαστού (38).

Προκείμενου να εντοπιστούν γονίδια προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού, προϋπόθεση ήταν η μελέτη μεγάλων οικογενειών, σε βάθος πολλών γενεών, με πολλά περιστατικά καρκίνου μαστού. Η μελέτη των οικογενειών αυτών άρχισε να αποκαλύπτει το μοριακό γενετικό κίνδυνο που κρύβεται πίσω από τον καρκίνο του μαστού, με την ανακάλυψη του *BRCA1* (BRCA1 gene 1) το 1994 και του *BRCA2* (BRCA2 gene 2) το 1995 (38).

Ωστόσο, πολλές οικογένειες με υψηλή συχνότητα εμφάνισης καρκίνου μαστού δεν έχουν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στο *BRCA1* / *BRCA2*. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει την ύπαρξη πρόσθετων γονιδίων προδιάθεσης.

Υψηλού κίνδυνου κληρονομήσιμοι παράγοντες.

Το σύνδρομο του κληρονομικού καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών (HBOC), είναι μια εξαιρετικά διεισδυτική αυτοσωμική κυρίαρχη διαταραχή, η οποία προκαλείται από κληρονομικές μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* ή *BRCA2*. Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από αυξημένη πιθανότητα αναπτύξεις καρκίνου, τις περισσότερες φορές στο μαστό ή / και στις ωοθήκες. Το *BRCA1* και το *BRCA2* είναι δυο κλασικά ογκοκατασταλτικάγονίδια, τα οποία εμπλέκονται στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας μέσα από την επιδιόρθωση του DNA, κυρίως μέσα από την επισκευή του δίκλωνου DNA με ομόλογο ανασυνδυασμό (38).

Η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* στο γενικό πληθυσμό είναι μεταξύ του 1 στα 300 και του 1 στα 800. Αυτή η συχνότητα είναι υψηλότερη στο εβραϊκό πληθυσμό Ασκενάζι, όπου 1 στα 40 άτομα φέρει μία από τις κύριες μεταλλάξεις που προκαλούν ασθένειες (40)

Οι γυναίκες φορείς των μεταλλάξεων των γονιδίων *BRCA1* και *BRCA2* έχουν υψηλό κίνδυνο προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, αυξημένο κίνδυνο εμφανίσεις καρκίνου του παγκρέατος και ενδεχομένως, άλλων ειδών καρκίνου. Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού στους φορείς των μεταλλάξεων του *BRCA1* στην ηλικία των 70 ετών, έχει υπολογιστεί στο εύρος μεταξύ 40 - 87% και για τον καρκίνο των ωοθηκών μεταξύ του 16 - 68%. Οι αντίστοιχοι κίνδυνοι για τους φορείς των μεταλλάξεων του *BRCA2* εκτιμάται ότι είναι 40 - 84% για τον καρκίνο του μαστού και 11 - 27% για καρκίνο των ωοθηκών(41). Οι άνδρες φορείς των μεταλλάξεων του γονιδίου *BRCA2* διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του παγκρέατος, του προστάτη και του μαστού (42).

Υπάρχουν και αλλά κληρονομήσιμα καρκινικά σύνδρομα στα οποία μεταλλάξεις σε συσχετιζόμενα γονίδια προσδίδουν παρόμοιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού όπως και τα γονίδια *BRCA1/BRCA2*. Αυτά περιλαμβάνουν το σύνδρομο Cowden που σχετίζονται με το γονίδιο *PTEN*, το σύνδρομο Peutz-Jeghers

με το *STK11* και το σύνδρομο Li-Fraumeni με μεταλλάξεις στο *TP53*. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι λιγότερο συχνές από ό, τι στο *BRCA1* και *BRCA2* (38).

Μετρίου κίνδυνου κληρονομήσιμοι παράγοντες.

Η ανίχνευση γονιδίων χαμηλότερου κινδύνου (λιγότερο διεισδυτικά) απαιτεί την εφαρμογή γενετικών στρατηγικών όπως μεγάλες μελέτες συσχέτισης ασθενών-μαρτύρων μέσω της αλληλούχισης των υποψηφίων γονιδίων και οικογενειακές μελέτες. Υποψήφια καρκινικά γονίδια που πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το *BRCA1* ή το *BRCA2*, σε διαδικασίες που αποτελούν μέρος της κυτταρικής επιδιορθώσεως το DNA (43).

Μετά από εντατικές έρευνες και εξετάσεις πολλών υποψηφίων, εντοπίστηκαν λίγα και σχετικά σπάνια (συχνότητα πληθυσμό λιγότερο από 1%) γονίδια που σχετίζονται με μέτριο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Αυτές περιλαμβάνουν τα γονίδια *CHEK2*, *ATM*, *BRCA1*, *PALB2* και *RAD51C*, τα οποία έχουν ευρέως προσδιοριστεί μέσω ενός συνδυασμού οικογενειακών και του πληθυσμιακών προσεγγίσεων. Τα γονίδια αυτά προδιαθέτουν σχετικό κίνδυνο ≥ 1.5 και < 5 . Έχει εκτιμηθεί ότι οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι υπεύθυνες για λιγότερο από το 3% του οικογενούς καρκίνου του μαστού (44).

Χαμηλού κίνδυνου κληρονομήσιμοι παράγοντες.

Μέρος του ανεξήγητου κλάσματος του οικογενούς σχετικού κινδύνου, είναι πιθανό να μπορεί να εξηγηθεί από ένα πολυγονιδιακό μοντέλο που περιλαμβάνει έναν συνδυασμό πολλών επιμέρους πολυμορφισμών γονιδίων με χαμηλό κίνδυνο. Η συχνότητα αυτών των αλληλουχιών μπορεί να κυμαίνεται από 5% έως 50% και θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι υψηλότερη σε οικογένειες με ιστορικό καρκίνου του μαστού. Μεμονωμένα έχουν μικρή επίδραση στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (σχετικός κίνδυνος ≥ 1.01 και $< 1,5$). Παρ' όλα αυτά, μπορούν να αντιπροσωπεύουν συλλογικά ένα μεγάλο τμήμα της κληρονομικότητας του καρκίνου του μαστού (38).

Πέρα από τα επιμέρους γονίδια.

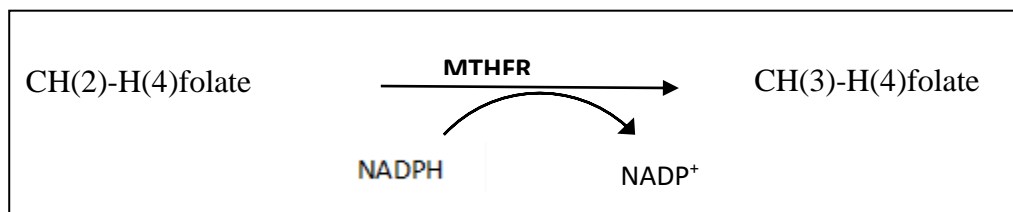
Εκτός από τα επιμέρους γονίδια και τις ποικιλία των μεταλλάξεων, άλλοι γενετικοί μηχανισμοί μπορεί επίσης να οδηγήσουν σε καρκίνο του μαστού. Τα γενετικά ατυχημάτων που μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο είναι πολλά και διάφορα. Για παράδειγμα μπορεί τα γονίδια να συντηχθούν μαζί, ή μπορεί να υπάρξουν μικρές διαγραφές του DNA, ή αστάθεια των σύντομων των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, ή απώλεια ενιαίων γονιδίων και του DNA τους, ή διακυμάνσεις στον αριθμό των αντιγράφων ενός γονιδίου, ή λάθη στη δομή των χρωμοσωμάτων ή και τον αριθμό χρωμοσωμάτων (45).

Επιπλέον, υπάρχουν και επιγενετικοί παραγόντες που μεταβάλλουν τη συμπεριφορά των γονιδίων. Μπορεί να γίνει κάποιο λάθος στην μεθυλίωση του DNA. Τα noncoding RNAs, όπως τα microRNAs, ελέγχουν τα γονίδια και μπορούν είτε να δρουν ως καταστολείς των όγκων, είτε να ενθαρρύνουν την ανάπτυξη τους. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές μόλις αρχίζουν να ανακαλύπτουν το ρόλο ενός άλλου noncoding RNA, που ονομάζεται long noncoding RNA, στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού (45).

2. MTHFR

Το γονίδιο της αναγωγάσης του μεθυλενο-τετραυδροφυλλικού οξέος ή αλλιώς *MTHFR* εδρεύει στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1 στην ζώνη 36.22 (1p36.22). Αποτελείται από 19.3 kb DNA και περιέχει 11 εξώνια. Η έκφρασή του είναι πολύ έντονη στους όρχεις και μέτρια στον εγκέφαλο και τα νεφρά. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι το ένζυμο αναγωγάση του τετραυδροφυλλικού οξέος(4).

Το MTHFR (E.C: 1.5.1.20) είναι το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή του 5,10-μεθυλενοτετραυδροφυλλικού οξέος (CH₂-H₄folate) σε 5-μεθυλο-τετραυδροφυλλικό οξύ (CH₃-H₄folate) χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο (δότη ηλεκτρονίων) το NADPH και ως δέκτη ηλεκτρονίων το φλαβινোসυνένζυμο FAD (5,6).



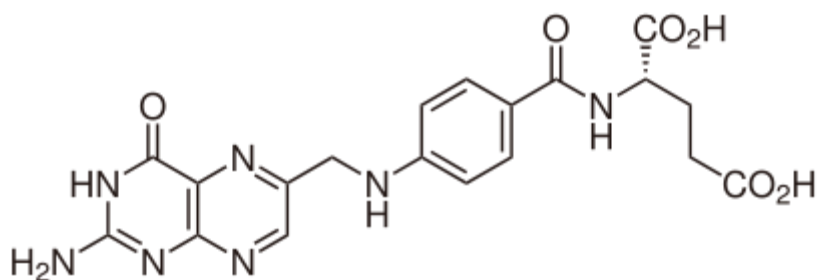
Εικόνα 16 : Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο MTHFR

2.1 Το φυλλικό οξύ

Το φυλλικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η B9, η οποία βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε φαγητά όπως το σπανάκι, τα ξερά φασόλια, το συκώτι και τα δημητριακά ολικής άλεσης (46). Το φυλλικό οξύ απαιτείται στη σύνθεση, τη διόρθωση και τη λειτουργία του DNA και του RNA. Κατά συνέπεια, το φυλλικό οξύ απαιτείται για την παραγωγή και τη συντήρηση των νέων κυττάρων και είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά τη διάρκεια περιόδων ταχείας ανάπτυξης, όπως η βρεφική ηλικία και η εγκυμοσύνη (δ). Η ημερήσια συνιστώμενη ποσότητα για τους ενήλικες είναι περίπου 0,4 mg και αυτή θα πρέπει να αυξάνεται κατά 50% κατά την εγκυμοσύνη και κατά την περίοδο γαλουχίας.

Από το 1996 η FDA έχει συντάξει νομοθετικές ρυθμίσεις για τον εμπλουτισμό τροφίμων όπως τα αρτοπαρασκευάσματα και το ρύζι με καθαρό φυλλικό οξύ. Παρόμοιες προτάσεις έχουν γίνει και από τις υπηρεσίες υγείας και τροφίμων άλλων χωρών, ωστόσο με επιφυλάξεις, καθώς ο εμπλουτισμός τροφίμων με φυλλικό οξύ μπορεί να εμποδίσει την εμφάνιση συμπτωμάτων της συνδεδεμένης με την ανεπάρκεια βιταμίνης 12 αναιμίας καθώς και τις προκύπτουσες αλλαγές στο νευρικό σύστημα, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμη νευρική βλάβη (46,δ).

Το μόριο του φυλλικού οξέος αποτελείται από ένα υδροξυ-αμινο-παράγωγο της πτεριδίνης ενωμένο με ένα π-αμινοβενζοϊκό οξύ και ένα L-γλουταμικό οξύ. Συναντάται επίσης στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του η οποία χρησιμοποιείται στα συμπληρώματα διατροφής και στα εμπλουτισμένα τρόφιμα (47).



Εικόνα 17: Στερεοχημική μορφή του φυλλικού οξέος.
https://en.wikipedia.org/wiki/Folic_acid#/media/File:Folic_acid.svg

2.2 Κύκλος φυλλικού οξέος και μεθειονίνης

Κύκλος φυλλικού οξέος

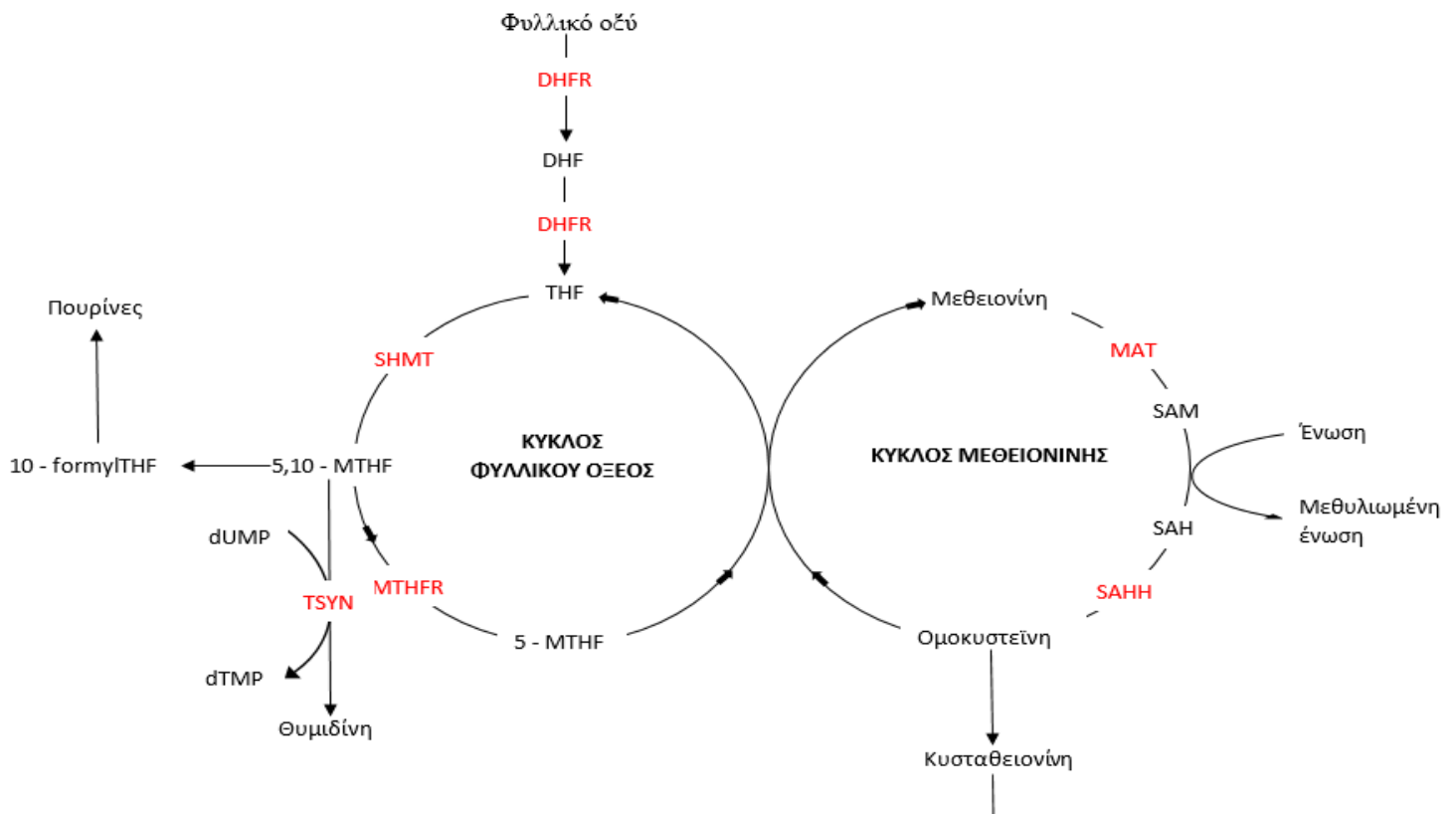
Το φυλλικό οξύ έπειτα από την εισαγωγή του στο εσωτερικό των κυττάρων ανάγεται σε διϋδροφυλλικό οξύ (DHF) και ύστερα σε τετραυδροφυλλικό οξύ (THF) με δύο διαδοχικές αντιδράσεις επιτελούμενες από το ένζυμο αναγωγή του διϋδροφυλλικού (DHFR). Στη συνέχεια με την βοήθεια του ενζύμου υδροξυμεθυλοτρανσφεράση της σερίνης (SHMT) μετατρέπεται σε 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικό οξύ το οποίο και ανάγεται σε 5 – μεθυλοτετραυδροφυλλικό οξύ από την αναγωγή του τετραυδροφυλλικού οξέος (MTHFR) ή σε 10-φόρμυλοτετραυδροφυλλικό. Τέλος, το 5-μέθυλοτετραυδροφυλλικό απομεθυλιώνεται σε τετραυδροφυλλικό οξύ προκειμένου να ολοκληρωθεί ο κύκλος του φυλλικού οξέος, με την μεθυλομάδα που προκύπτει να αξιοποιείται στον κύκλο της μεθειονίνης από την μεθυλοτρανσφεράση της ομοκυστεΐνης και την βιταμίνη 12. (48,49)

Το 10-φόρμυλοτετραυδροφυλλικό οξύ μπορεί να δωρίσει μονοανθρακικές ομάδες για την σύνθεση των πουρινών (50) ενώ το 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικό οξύ μπορεί να αξιοποιηθεί επίσης από την συνθάση της θυμιδίνης για την μετατροπή της ουριδίνης σε θυμιδίνη με τελικό σκοπό την ρύθμιση της ισορροπίας των νουκλεοτιδίων (51). Επομένως η αναγωγή του τετραυδροφυλλικού οξέος και η συνθάση της θυμιδίνης έχουν ανταγωνιστικό ρόλο ως προς την σύνδεση τους με το 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικό οξύ (50).

Κύκλος μεθειονίνης

Ο κύκλος τη μεθειονίνης ξεκινά με την μεταφορά της μεθυλομάδας από το 5-μεθυλοτετραυδροφυλλικό στην ομοκυστεΐνη η οποία και μετατρέπεται σε μεθειονίνη. Μέσω της αδενυλοτρανσφεράσης της μεθειονίνης (MAT), η μεθειονίνη χρησιμοποιείται για την παραγωγή της S-αδενοσυλμεθειονίνης (SAM) που χάνοντας μια μεθυλομάδα μετατρέπεται σε S-αδένυλο-L-ομοκυστεΐνη (SAH). Οι μεθυλομάδες που προσφέρονται από την S-αδενοσυλμεθειονίνη αξιοποιούνται από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες για την μεθυλίωση του DNA (51,52). Τέλος, η υδρολάση της S-αδένυλο-L-ομοκυστεΐνης (S-adenosyl homocysteinehydrolase - SAHH), μετατρέπει

και πάλι την S-αδένυλο-L-ομοκυστεΐνη σε ομοκυστεΐνη κλείνοντας έτσι τον κύκλο της μεθειονίνης (53). Η ομοκυστεΐνη μπορεί επίσης να ακολουθήσει την οδό της διαθείωσης. Η οδός της διαθείωσης κινητοποιείται υπό συνθήκες περίσσειας μεθειονίνης και, κατ' αυτήν, από την ομοκυστεΐνη και την σερίνη παράγεται κυσταθειονίνη με τη μεσολάβηση του ενζύμου β-συνθετάση της κυσταθειονίνης (CBS), με την καταλυτική δράση της βιταμίνης B₆. Η κυσταθειονίνη μετατρέπεται, στη συνέχεια, σε γλουταθειόνη και άλλες θειούχες ενώσεις, που αποβάλλονται με ούρα (54). Η γλουταθειόνη αποτελεί την κυριότερη αντιοξειδωτική ένωση στα κύτταρα των θηλαστικών. (53)



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση των κύκλων του φυλλικού οξέος και της μεθειονίνης. DHFR: αναγωγή του διϋδροφυλλικού οξέος, DHF: διϋδροφυλλικό οξύ, THF: τετραϋδροφυλλικό οξύ, SHMT: υδροξυμεθλοτρανσφεράση της σερίνης, 5,10-MTHF: 5,10-μεθυλενοτετραϋδροφυλλικό οξύ, 10-formylTHF: 10-φορμυλοτετραϋδροφυλλικό οξύ, TSYN: συνθάση της θυμιδίνης, MTHFR: αναγωγή του μεθυλενοτετραϋδροφυλλικού οξέος, 5-MTHF: 5-μεθυλοτετραϋδροφυλλικό οξύ, MAT: αδενυλοτρανσφεράση της μεθειονίνης, SAH: S-αδένυλο-L-ομοκυστεΐνη, SAHH: υδρολάση της S-αδένυλο-L-ομοκυστεΐνης

2.3 Ο πολυμορφισμός C677T

Οι δύο πιο συχνοί πολυμορφισμοί που απαντώνται στο γονίδιο MTHFR είναι ο A1298C και ο C677T. Ο πρώτος χαρακτηρίζει την αντικατάσταση της αδενίνης από την κυτοσίνη στην θέση 1298 του γονιδίου που οδηγεί στην μετατροπή του 429^{ου} αμινοξέος από γλουταμινικό οξύ σε αλανίνη (55). Ο C677T πολυμορφισμός αφορά την αντικατάσταση της κυτοσίνης από την θυμίνη στο 677^ο ζεύγος βάσεων του γονιδίου. Ως αποτέλεσμα στην θέση 222 κωδικοποιείται η βαλίνη έναντι της αλανίνης (A222V), επομένως πρόκειται για μετάλλαξη με λάθος νόημα (missense mutation) (56). Συνέπεια αυτών είναι η έκφραση ενός θερμοευαίσθητου ενζύμου με λειτουργικότητα που ανέρχεται στο 60% και στο 30% αυτής του φυσιολογικού ενζύμου στους ετεροζυγώτες και τους ομοζυγώτες αντίστοιχα (57). Τα ποσοστά των ομοζυγωτών για την C677T μετάλλαξη παρουσιάζουν διακύμανση στις διαφορετικές εθνικότητες ακόμα και σε διαφορετικούς πληθυσμούς της ίδιας πολιτείας. Στο Τέξας το ποσοστό στον Ισπανόφωνο πληθυσμό ανέρχεται στο 18% ενώ στους μη Ισπανόφωνους στο 10%. Χαμηλά ποσοστά απαντώνται στην Αφρική με το ποσοστό να μην ξεπερνάει το 1%, στην Τουρκία όπου ανέρχεται στο 7%, στην Γερμανία στο 8%, στην Ολλανδία στο 9%, στην Βρετανία και στον Καναδά στο 12%. Αντίθετα υψηλά ποσοστά συναντώνται στον Ισπανόφωνο πληθυσμό της Καλιφόρνια (21%) και στην Κολομβία (25%) (58,59).

Μετάλλαξη	Επηρεασμένο Κωδικόνιο	Εξώνιο
129C→T	P39P	1
677C→T	A222V	4
1068T→C	S352S	6
1298A→C	E429A	7
1317T→C	F435F	7
1739G→A	R594Q	11

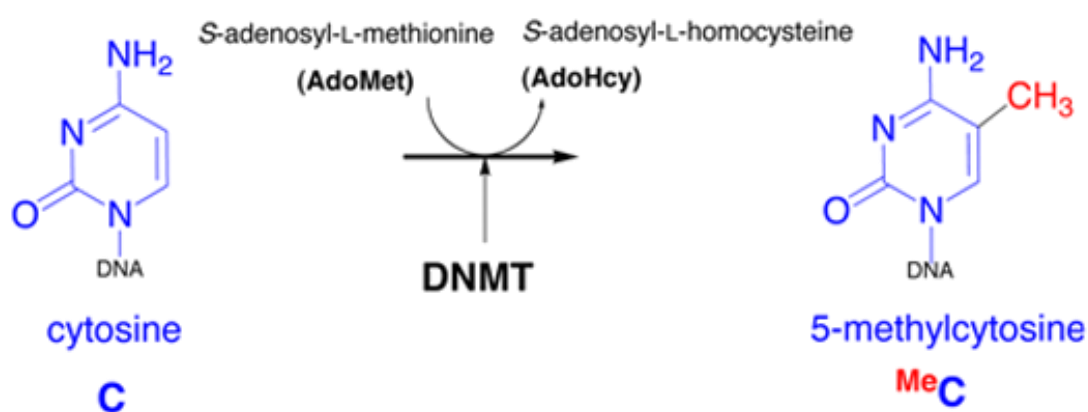
Πίνακας 1: Λίστα των πολυμορφισμών στο γονίδιο του MTHFR που εμπεριέχονται στα εξώνια. (Leclerc D, Sibani S, Rozen R. Molecular Biology of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013)

2.4 Μηχανισμός καρκινογένεσης

Η μειωμένη λειτουργικότητα του ενζύμου συμβάλλει στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού επηρεάζοντας τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA και την συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης στους ιστούς και το πλάσμα.

Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση του DNA είναι ένας από τους κυριότερους επιγενετικούς μηχανισμούς της ρύθμισης της έκφρασης της γενετικής πληροφορίας. Πρόκειται για την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στον 5^ο άνθρακα της κυτοσίνης του DNA, επιτελούμενη από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (Εικόνα 1) (60). Στα θηλαστικά, το 98% της μεθυλίωσης συμβαίνει στα δινουκλεοτίδια CpG στα σωματικά κύτταρα (60). Φυσιολογικά, η μεθυλίωση του DNA αποτελεί την βάση για πολλά φαινόμενα, όπως η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και η γονεϊκή αποτύπωση (61) συνεισφέροντας έτσι στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Τα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA σχετίζονται με την δομή της χρωματίνης. Αυτό σημαίνει ότι οι ενεργές περιοχές της χρωματίνης (ευχρωματίνη) που επιτρέπουν την γενετική έκφραση χαρακτηρίζονται από υπομεθυλιωμένο DNA ενώ οι ανενεργές περιοχές της χρωματίνης (δυσχρωματίνη) χαρακτηρίζονται από υπερμεθυλιωμένο DNA (62).



Εικόνα 19: Η κατάλυση της μεθυλίωσης από την DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT).
<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/DNAMethylationID20127.html>

Από την στιγμή που η S-αδενοσυλμεθειονίνη προσφέρει μεθυλομάδες για την μεθυλίωση του DNA, είναι φυσιολογικό η διαδικασία να επηρεάζεται άμεσα όταν τα επίπεδα της μεθειονίνης είναι χαμηλά λόγω μειωμένης δράσης του ενζύμου MTHFR. Ως αποτέλεσμα η ικανότητα του οργανισμού για μεθυλίωση μειώνεται προκαλώντας ολική υπομεθυλίωση του DNA. Η ολική υπομεθυλίωση, πέραν του ότι προάγει την γενετική αστάθεια, οδηγεί και στην έκφραση περιοχών του DNA που συμβάλλουν στην ογκογένεση. (63)

Παρά το γεγονός ότι η υπομεθυλίωση του DNA ήταν η πρώτη επιγενετική ανωμαλία των καρκινικών όγκων που ανακαλύφθηκε το 1983 από δύο διαφορετικά ανεξάρτητα εργαστήρια, αγνοήθηκε από την επιστημονική κοινότητα για πολλά χρόνια καθώς η υπερμεθυλίωση των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων θεωρούνταν πως έχει τον πρωταρχικό ρόλο στην καρκινογένεση (64). Ωστόσο έχουν δημοσιευτεί έρευνες οι οποίες δείχνουν πως σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, όπως ενός υποσυνόλου γαστρεντερολογικών καρκίνων, η υπομεθυλίωση του DNA που συσσωρεύεται με την πάροδο των χρόνων προηγείται σε μερίδιο ευθύνης της υπερμεθυλίωσης αλλά και των γενετικών ανωμαλιών (65). Το ποσοστό αυτών των περιπτώσεων όμως είναι πολύ χαμηλό. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δείχνει πως η υπομεθυλίωση του DNA παίζει πολύ μεγαλύτερο ρόλο στην έκβαση και την διεισδυτικότητα του καρκίνου, παρά στην δημιουργία του.

Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού, παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο BCSG1 (breastcancer – specificgene 1). Το BCSG1 δεν εκφράζεται στον φυσιολογικό μαστικό αδένα αλλά εκφράζεται στην πλειοψηφία των καρκινικών όγκων του μαστού προχωρημένου σταδίου και προωθεί τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και την μετάσταση του όγκου. Όταν αναλύθηκε για τα επίπεδα μεθυλίωσης μιας συγκεκριμένης CpG νησίδας στο εξόνιο 1, χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές προερχόμενες από όγκους του μαστού αλλά και φυσιολογικές, βρέθηκε ότι 15 CpG δινουκλεοτίδια ήταν τελείως αμεθυλιώτα σε όλες τις καρκινικές κυτταρικές σειρές (5/5) ενώ ήταν πυκνά μεθυλιωμένα σε 3 από τις 4 φυσιολογικές καρκινικές σειρές (66). Σε άλλη έρευνα στην οποία εξετάστηκαν τα ολικά ποσοστά μεθυλίωσης του DNA καρκινικών όγκων του μαστού, βρέθηκε όχι μόνο ότι το ποσοστό της μεθυλίωσης ήταν σημαντικά χαμηλότερο από αυτό του γειτονικού παρεγχύματος ($P=0.0001$) ή των καλοηθών όγκων ($P=0.0002$), αλλά και

το ότι υπάρχει συσχετισμός του επιπέδου της μεθυλίωσης του DNA με το στάδιο της νόσου ($P=0.0009$) αλλά και με το μέγεθος του όγκου ($P=0.0026$) (67)

Επίπεδα ομοκυστεΐνης

Η ομοκυστεΐνη είναι αμινοξύ που δεν συμμετέχει στην σύνθεση πρωτεϊνών. Εξυπηρετεί σαν ενδιάμεσο του μεταβολισμού της μεθειονίνης και προκύπτει από την απομεθυλίωση αυτής (50). Έπειτα είτε επαναμεθυλιώνεται για να σχηματίσει μεθειονίνη είτε καταβολίζεται σε κυσταθειονίνη (βλ. κύκλο φυλλικού οξέος). Σε περίπτωση κάποιας έλλειψης ενός ενζύμου που συμμετέχει στον μεταβολισμό της (όπως το ένζυμο MTHFR) ή αυξημένης ποσότητας μεθειονίνης, τα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στον ορό ανεβαίνουν, οδηγώντας σε υπερομοκυστεϊναιμία. Υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης στον ορό προωθούν χρόνιες φλεγμονώδεις διεργασίες μέσω του οξειδωτικού στρες, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες καρκινογένεσης (68-71).

2.5 Άλλες επιπλοκές

Άλλες επιπλοκές με τις οποίες έχει συνδεθεί ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός είναι οι εξής:

Ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα

Ο C677T πολυμορφισμός μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα (72,73). Τόσο η ετεροζυγωτία όσο και η ομοζυγωτία για το T αλληλόμορφο ευθύνονται για μειωμένες συγκεντρώσεις φυλλικού οξέος στους ιστούς και αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης (74), που κατά τα πρώιμα στάδια της κύησης αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την δημιουργία ανωμαλιών του νευρικού σωλήνα (75). Οι ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα είναι σοβαρότατα εκ γενετής ελαττώματα που συμβαίνουν όταν ο νευρικός σωλήνας, η



Εικόνα 20: Έμβρυο με ανεγκεφαλία.
https://en.wikipedia.org/wiki/Anencephaly#/media/File:Anencephaly_side.jpg



Εικόνα 21: Αναπαράσταση εμβρύου με δισχιδής ράχη.
http://www.ygeiaonline.gr/images/stories/News22/myelospina_bifida3.jpg

πρόδρομη μορφή του κεντρικού νευρικού συστήματος, αποτυγχάνει να κλείσει πλήρως κατά τον σχηματισμό και την ανάπτυξη του (76). Οι δύο πιο συχνές ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα είναι η ανεγκεφαλία και η δισχιδής ράχη. Στην ανεγκεφαλία, επειδή ο νευρικός σωλήνας δεν κλείνει σωστά, ο αναπτυσσόμενος εγκέφαλος δεν προστατεύεται, εκτίθεται στο αμνιακό υγρό και εκφυλίζεται (ε), με αποτέλεσμα να μένει μια μικρή αγγειωμένη μάζα από αποδιοργανωμένο νευρικό ιστό. Η ανεγκεφαλία είναι μη συμβατή με την ζωή (ζ). Η δισχιδής ράχη περικλείει πολλές δυσμορφίες που

προκύπτουν ανάλογα με το σημείο που δεν έγινε το σωστό κλείσιμο του νευρικού

σωλήνα. Πιο συχνά αυτό συμβαίνει στην οσφυοϊερή περιοχή ωστόσο η αλλοίωση μπορεί να είναι και πιο εκτεταμένη και να εντοπίζεται σε ολόκληρη την σπονδυλική στήλη (ζ). Οι επιπλοκές εξαρτώνται από το μέγεθος της βλάβης και περιλαμβάνουν μέχρι και νοητικά προβλήματα. Το σίγουρο είναι πως όλα τα νεύρα κάτωθεν της βλάβης επηρεάζονται σε κάποιο βαθμό (η).

Καρδιαγγειακές παθήσεις

Παράγοντα κινδύνου και για καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελεί ο C677T πολυμορφισμός, λόγω των αυξημένων επιπέδων ομοκυστεΐνης στο αίμα που προκύπτουν από την μη επαρκή δράση του ενζύμου (θ). Η υπερομοκυστεϊναιμία έχει αναγνωρισθεί ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης (77). Ασθενείς με συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο πλάσμα άνω του μετρίου έχουν 3 φορές περισσότερες πιθανότητες εκδήλωσης καρδιαγγειακών παθήσεων (θ). Αποτελέσματα μιας μετά-ανάλυσης όπου εξετάζεται η σχέση των επιπέδων της ομοκυστεΐνης με τις καρδιαγγειακές παθήσεις, υποδεικνύουν ότι η μείωση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης στο αίμα κατά 3 $\mu\text{mol/l}$ μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης ισχαιμικής καρδιοπάθειας κατά 16%, τον κίνδυνο εμφάνισης εν τω βάθη θρομβώσεων κατά 25% και τον κίνδυνο εμφάνισης εγκεφαλικού κατά 24% (78).

Κατάθλιψη

Συσχετισμός υπάρχει επίσης και με την κατάθλιψη (79) καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εμπλέκεται με την λειτουργία της σεροτονίνης (80) αλλά και λόγω του ότι η ομοκυστεΐνη είναι επιβλαβής για τους νευρώνες και τα αιμοφόρα αγγεία συμπεριλαμβανομένων αυτών της εγκεφαλικής μικροκυκλοφορίας (81).

Τα τραυματικά γεγονότα της παιδικής ηλικίας συνδέονται με την έναρξη και την υποτροπή της μείζονας καταθλιπτικής διαταραχής. Ο C677T πολυμορφισμός, εφόσον σχετίζεται με μειωμένη άμυνα του οργανισμού έναντι στο οξειδωτικό στρες, θα μπορούσε να αποτελεί πιθανό προγνωστικό δείκτη εμφάνισης ή υποτροπής της νόσου. Σε έρευνα που έγινε, ασθενείς με ιστορικό παιδικών τραυματικών γεγονότων και φορείς του T αλληλόμορφου είχαν 2,4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για υποτροπή

συγκριτικά με ασθενείς με παρόμοιο ιστορικό αλλά που δεν έφεραν το T αλληλόμορφο (P=0.002) (82).

2.6 Φαρμακογενωμική και πολυμορφισμοί του MTHFR

Η φαρμακογενωμική αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την εξατομικευμένη θεραπεία. Έχουν ερευνηθεί πολλοί πολυμορφισμοί σε προσπάθειες να βελτιστοποιηθεί η θεραπεία ασθενών με τη χρήση των κατάλληλων φαρμάκων, ωστόσο οι κλινικές εφαρμογές παραμένουν περιορισμένες (83).

Η φθοριοουρακίλη και η μεθοτρεξάτη είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται κοινώς στην αντιμετώπιση του καρκίνου και ιδιαίτερα του καρκίνου του μαστού. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που υποδεικνύουν πως οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του MTHFR επηρεάζουν την δράση αυτών και άλλων παρόμοιων φαρμάκων λόγω των αλλαγών που προκαλούν στον φυσιολογικό βιοχημικό κύκλο του φυλλικού οξέος (84).

Η φθοριοουρακίλη ή 5-FU (εμπορικό όνομα Adrucil®) είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο ευρέως χρήσεως που ανήκει στην οικογένεια των αντιμεταβολιτών και αποτελεί ανάλογο της πυριμιδινικήςουρακίλης. (i) In vivo, μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη 5-φθόριο-2-δεοξουριδίνη-5-μονοφωσφορική (5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate) ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με την θυμιδική συνθάση και το 5,10- μεθυλενοτετραυδροφυλλικό οξύ εμποδίζοντας έτσι την δράση της θυμιδικήςσυνθάσης και επομένως την σύνθεση του DNA (85). Οπότε, ο MTHFR C677T πολυμορφισμός, που συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων του 5,10-μέθυλοτετραυδροφυλλικού οξέος, φαίνεται πως αυξάνει την κυτταροτοξική δράση της 5-FU αυξάνοντας τον σχηματισμό και την σταθερότητα του τριαδικού συμπλόκου που αναφέρθηκε προηγουμένως (86).

Η μεθοτρεξάτη (methotrexate – MTX) μαζί με την πεμετρεξίδη και άλλο παρόμοια φάρμακα ανήκουν επίσης στους αντιμεταβολίτες και στοχεύουν διαφορετικά ένζυμα του κύκλου του φυλλικού οξέος ή της σύνθεσης των πουρινών ή των πυριμιδίων (87). Η μεθοτρεξάτη αποτελεί ανάλογο του φυλλικού οξέος. Πέρα από την αντινεοπλασματική του δράση, χρησιμοποιείται και σε ασθενείς με ψωρίαση και ρευματοειδή αρθρίτιδα. Η δράση της έγκειται στην αναστολή λειτουργίας της αναγωγάσης του δΐυδροφυλλικού μειώνοντας έτσι τα επίπεδα του 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικού οξέος και εμποδίζοντας την σύνθεση των πουρινών και επομένως την σύνθεση του DNA (99). Επίσης, η συσσώρευση της αναγωγάσης του

δϋδροφυλλικού αναστέλλει τόσο την λειτουργία της θυμιδικήςσυνθάσης όσο και των υπόλοιπων ενζύμων που συμμετέχουν στην σύνθεση των πουρινών (86). Σε αυτή τη περίπτωση επομένως, ο πολυμορφισμός που μελετάμε και που οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικού οξέος, θα έχει αρνητική επίδραση στην δραστικότητα της μεθοτρεξάτης τροποποιώντας την αντιπολλαπλασιαστική της αποτελεσματικότητα (87). Πέραν τούτου, λόγω της υπάρχουσας υπερομοκυστεΐναιμίας και της αποδιοργάνωσης των αντιδράσεων της τρανς – μεθυλίωσης, ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία με μεθοτρεξάτη ενδέχεται να εμφανίσουν ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω τοξικότητας του φαρμάκου (87). Σε εργασία δημοσιευμένη το 1996, σημειώνεται η περίπτωση 6 ασθενών που εμφάνισαν σοβαρότατες και απειλητικές για την ζωή επιπλοκές έπειτα από χορήγηση σχήματος φαρμάκου κυκλοφωσφαμίδης, μεθοτρεξάτης και φθοριοουρακίλης. Μετέπειτα γενετική ανάλυση του γονιδιώματος των ασθενών αποκάλυψε πως 5 από τους 6 ασθενείς ήταν ομόζυγοι για τον MTHFR C677T πολυμορφισμό (88).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Σκοπός

Ο καρκίνος του μαστού αναφέρεται σε κακοήθεις όγκους που έχουν σχηματιστεί από κύτταρα του μαστού. Αποτελεί το συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως (και το δεύτερο πιο συχνό καρκίνο γενικά), με σχεδόν 1.7 εκατομμύρια καινούργιες διαγνώσεις στο 2012. Αυτό αντιπροσωπεύει περίπου το 12% όλων των νέων καρκινικών περιπτώσεων και το 25% όλων των καρκίνων στο γυναικείο πληθυσμό (89).

Η αναγωγή του τετραυδροφυλλικού οξέος ή MTHFR είναι ένζυμο που δρα στον κύκλο του φυλλικού οξέος και καταλύει τη μετατροπή του 5,10 – μεθυλενοτετραυδροφυλλικού οξέος σε 5 – μεθυλοτετραυδροφυλλικό οξύ (5,6). Αυτό το ένζυμο έχει μια σημαντική ρυθμιστική λειτουργία στο μεταβολισμό του φολικού οξέος, και κατευθύνει το πλεόνασμα του φολικού οξέος για την εκ νέου μεθυλίωση ομοκυστεΐνης σε βάρος της σύνθεσης του DNA και του RNA. Η σχέση μεταξύ των επιπέδων των φυλλικών και της ουρακίλης, καθώς και των βλαβών του DNA στα διαιρούμενα κύτταρα, καθιστά την μεθυλενοτετραυδροφυλλική αναγωγή, κατάλληλο υποψήφιο για μελέτες για καρκινική προδιάθεση, συμπεριλαμβανομένου και για του καρκίνου του μαστού (90).

Το γονίδιο της μεθυλενοτετραυδροφυλλικής αναγωγής (MTHFR) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα στάδια που εμπλέκονται στην επεξεργασία των αμινοξέων. Η ανάλυση των πολυμορφισμών στο γονίδιο MTHFR αποκάλυψε συσχετίσεις με τον καρκίνο, και ειδικότερα ο πολυμορφισμός C677T, ο οποίος έχει προταθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό του φολικού οξέος, τη μεθυλίωση, τη σύνθεση και την επισκευή του DNA και συμβάλλει στην προαγωγή όγκων στον μαστικό αδένα (90).

Αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν αναφερθεί στο γονίδιο MTHFR, ένας εκ των οποίων, ο C677T (pAla222Val) στο εξόνιο 4, κωδικοποιεί μια θερμοασταθή παραλλαγή της πρωτεΐνης που μειώνει τη συνολική δραστηριότητά της (91). Έχει αναφερθεί ότι η παραλλαγή C677T του MTHFR καταλήγει σε μία θερμο-ασταθή πρωτεΐνη με ενζυματική δραστηριότητα που μειώνεται κατά 35% στην ετεροζυγωτική κατάσταση (CT γονότυπος) και κατά 70% σε κατάσταση ομοζυγώτη

(TT γονότυπος) (102). Τα άτομα με τη θερμοασταθή μορφή του ενζύμου έχουν αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα τους (92). Αυτά τα αποτελέσματα, ως εκ τούτου, δείχνουν ότι η παρουσία του 677TT γονότυπου μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια αντιστάθμισης της ενδοκυτταρικής διανομής του φολικού, η οποία θα μπορούσε να προωθήσει τη διατήρηση του φυλλικού οξέος που απαιτείται για τη σύνθεση πουρίνης και πυριμιδίνης.

Ως εκ τούτου, η αποσαφήνιση των γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού μεταξύ των διαφόρων εθνοτικών ομάδων θα μπορούσε να συμβάλει σε μια καλύτερη συνολική κατανόηση της εξέλιξης του καρκίνου, καθώς και της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία (90). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση του επιπολασμού του C677T πολυμορφισμού του γονιδίου *MTHFR* σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Για τον προσδιορισμό του C677T πολυμορφισμού εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ακολουθούμενη από πέψη με περιοριστικό ένζυμο (PCR-RFLP) σε παραφिनιοποιημένα δείγματα ιστού από γυναίκες με καρκίνο του μαστού.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Βιολογίας και Γενετικής» του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων της Σχολής Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (Σ.Ε.Υ.Π.) του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης (Α.Τ.Ε.Ι.Θ.) υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθηγήτριας Βιολογίας-Γενετικής, Δρ. Παπουτσή Ανδρονίκης.

1.2 Υλικό

Στη παρούσα μελέτη εξετάσθηκαν 47 δείγματα ιστού εγκλεισμένα σε παραφίνη από γυναίκες με καρκίνο του μαστού (βιοψία μαστού ή μαστεκτομή). Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού έγινε κατόπιν ιστολογικών και κυτταρολογικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν στα συγκεκριμένα παρασκευάσματα.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν και διαγνώσθηκαν εργαστηριακά στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Γ.Ν.Θ Παπαγεωργίου, υπό την ευθύνη του διευθυντή του εργαστηρίου Δρ. Ιωάννη Ευστρατίου. Για την επιλογή και τη λήψη των τομών από τα παραφινοποιημένα παρασκευάσματα ευγενώς συνεισέφερε το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό του εργαστηρίου. Η εκπόνηση του πειραματικού μέρους της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας και Γενετικής του τμήματος Ιατρικών Εργαστηρίων, Σ.Ε.Υ.Π, Α.Τ.Ε.Ι.Θ, με επιβλέπουσα την Αναπλ. Καθηγήτρια Ανδρονίκη Παπουτσή.

Πιο συγκεκριμένα, το προς μελέτη υλικό μας αποτελείται από 47 γυναίκες με εύρος ηλικιών από 36 έως 85 ετών και μέσο όρο ηλικίας τα 60.9 έτη.

Το DNA απομονώθηκε από μονιμοποιημένα ιστοτεμάχια από τα οποία λήφθηκαν 8-12 τομές μικροτόμου. Η καθαρότητα του διαλύματος του DNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ακολουθούμενη από υδρόλυση με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *HinfI* (PCR-RFLP).

1.3 Μέθοδοι

1.3.1 Απομόνωση DNA από τα ιστοτεμάχια

Η απομόνωση του DNA έγινε με την χρήση του BiOstic® FFPE Tissue DNA IsolationKit της MOBIO Laboratories Inc, το οποίο εφαρμόζεται σε τομές μικροτόμου από μονιμοποιημένα και παραφινωποιημένα παρασκευάσματα. Οι τομές επωάζονται σε ειδικό διάλυμα τήξης της παραφίνης σε συνδυασμό με Πρωτεϊνάση K προκειμένου να γίνει πέψη του ιστού. Έπειτα τα δείγματα θερμαίνονται στους 90°C προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες συνδεδεμένες με το DNA που εμποδίζουν την ομαλή διαδικασία της αντιγραφής και να διασφαλιστεί η επιτυχία της PCR. Έστερα τα δείγματα αναμιγνύονται με χαοτροπικούς παράγοντες και απόλυτη αιθανόλη ώστε να μπορεί να γίνει η σύνδεση του DNA στις μεμβράνες πυριτίου των μικροστηλών. Ακολουθεί κατάλληλος καθαρισμός και τέλος έκλυση του DNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και ο έλεγχος της καθαρότητας του γονιδιωματικού DNA έγινε φασματοφωτομετρικά με μέτρηση στο φάσμα του υπεριώδους και σε μήκη κύματος 260nm και 280nm.

1.3.2 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμερής (PCR)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον πολλαπλασιασμό της περιοχής που εμπεριέχει την πολυμορφική περιοχή του γονιδίου *MTHFR* χρησιμοποιώντας εκκινητές που στοχεύουν στη θέση αυτή. Στη συνέχεια, ακολουθεί υδρόλυση του προϊόντος της PCR με το ένζυμο περιορισμού *Hinf I*, για τον προσδιορισμό του γονότυπου του κάθε ατόμου (ομόζυγο φυσιολογικό, ετερόζυγο, ομόζυγο ως προς την μετάλλαξη), καθώς η παρουσία της μετάλλαξης δημιουργεί θέση αναγνώρισης του ενζύμου.

Το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα είχε περιγραφεί από τους Zhou-Cun A, et al. (64) και εφαρμόστηκε ύστερα από ορισμένες τροποποιήσεις ως αποτέλεσμα της βελτιστοποίησης της μεθόδου στις συνθήκες του εργαστηρίου μας. Συγκεκριμένα, στο διάλυμα της αντίδρασης συμπεριλήφθηκαν 2.5 μl 10x reaction buffer [750 mM Tris HCl (pH 9.0), 500 mM KCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄],

1.5 mM MgCl₂, 200 μM από το κάθε δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTPsmix), 10 pmol από τον κάθε εκκινητή (forward&reverseprimer), 1 U Taq πολυμεράση και 200 ng του απομονωθέντος DNA. Το διάλυμα της αντίδρασης συμπληρώνεται με νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τα 25 μl. Ως αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε νερό ελεύθερο νουκλεασών (DNase-RNasefreewater)

Το θερμοκρασιακό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την αντίδραση της PCR, συνίσταται σε:

- Αρχική αποδιάταξη: 5 λεπτά στους 94° C
 - Αποδιάταξη: 30 δευτερόλεπτα στους 94° C
 - Υβριδισμός: 30 δευτερόλεπτα στους 57° C
 - Επιμήκυνση: 30 δευτερόλεπτα στους 72° C
 - Τελική επιμήκυνση: 5 λεπτά στους 72° C
 - Διατήρηση στους 6° C
- } 35 κύκλοι

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τον πολλαπλασιασμό του του C677T πολυμορφισμού του γονιδίου *MTHFR* είχαν τις εξής αλληλουχίες:

- Forward: 5'-CATCCCTATTGGCAGGTTAC-3'

- Reverse: 5'-GACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

Πριν την πέψη των PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο είναι απαραίτητο να επιβεβαιωθεί πως η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Για τον σκοπό αυτό, τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης.

Για τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR, 10μl του προϊόντος ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1,5% w/v στα 100 Volts για 45 λεπτά. Ως διάλυμα παρασκευής της πηκτής αγαρόζης αλλά και ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε 1x TBE Buffer (90mM Tris, 90mM BoricAcid, 2mM EDTA p.H 8.0) και ως μάρτυρας μοριακού βάρους το 100 bp GeneRuler DNA Ladder της εταιρείας Fermentas. Στο διάλυμα της πηκτής αγαρόζης προστέθηκε 1%

διάλυμα EtBr με τελική συγκέντρωση 0,5μg/mL. Η πηκτή αγαρόζης στη συνέχεια εκτέθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία (UVtransluminator) και αποτυπώθηκε ψηφιακά με το σύστημα ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας Alpha Imager Mini της εταιρείας Proteinsimple.

Το αναμενόμενο αποτέλεσμα της PCR παράγαγε θραύσμα 256 ζευγών βάσεων ενώ ο αρνητικός μάρτυρας της κάθε αντίδρασης ήταν ελεύθερος επιμολύνσεων. Τα προϊόντα της PCR αποθηκεύτηκαν στους -20° C μέχρι την πραγματοποίηση του επόμενου σταδίου.

1.3.3 Πέψη των προϊόντων της PCR

Η παρουσία του *MTHFR C677T* πολυμορφισμού δημιουργεί στο γονίδιο θέση αναγνώρισης για την περιοριστική ενδονουκλεάση *Hinf* I. Για τον λόγο αυτό έγινε πέψη των προϊόντων της PCR με το συγκεκριμένο ένζυμο.

Τα συστατικά του τελικού διαλύματος πέψης όγκου 20μL ήταν τα εξής: 15μL προϊόντος PCR, 5U από το περιοριστικό ένζυμο *Hinf* I, 2μL από το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα [10xBuffer R: 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA] και 2.5μL H₂O. Το διάλυμα επωάστηκε στους 37° C overnight και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 2.5 % w/v.

Μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο, τα αναμενόμενα θραύσματα που λαμβάνονται είναι:

- Ένα θραύσμα μήκους 265 bp για τους ομοζυγώτες ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο,
- Τρία θραύσματα μήκους 265, 171 και 95 bp για τους ετεροζυγώτες,
- Δύο θραύσματα μήκους 171 και 95 bp για τους ομοζυγώτες ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο.

1.4 Αποτελέσματα

Στην εικόνα που παρατίθεται απεικονίζονται ενδεικτικά ορισμένα από τα αποτελέσματα μας:



Εικόνα 22: Αποτελέσματα ηλεκτοφόρησης.

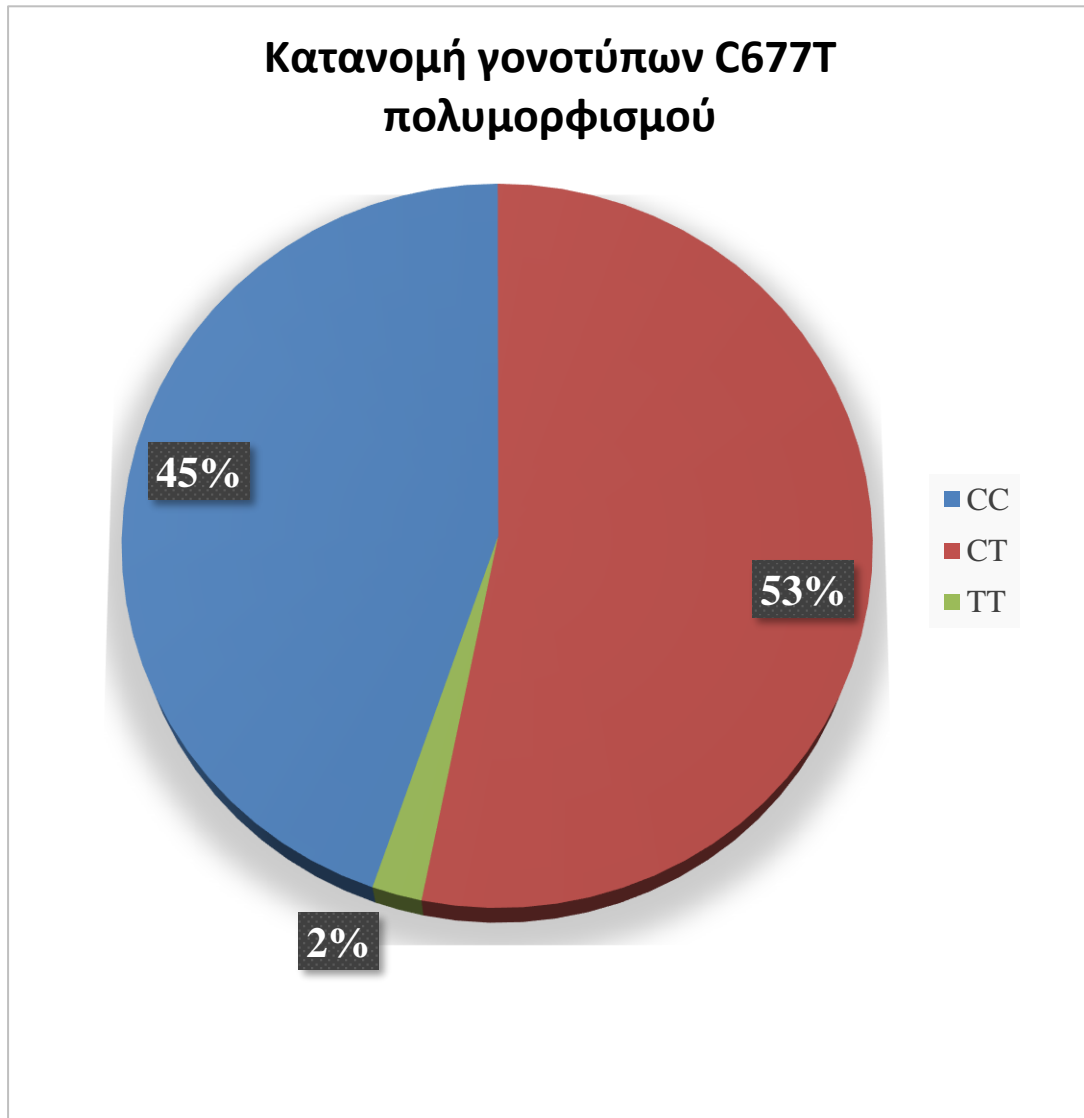
L1, L2: 100 bp GeneRuler DNA Ladder (Fermentas)

1,2: εξεταστέα δείγματα, ομόζυγα ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο C (γονότυπος CC) – μήκος θραύσματος 256 bp

3,4,5: εξεταστέα δείγματα, ετερόζυγα (γονότυπος CT) – μήκη θραυσμάτων: 256, 171 και 95 bp

6: εξεταστέο δείγμα, ομόζυγο ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T (γονότυπος TT) – μήκη θραύσματος: 171 και 95 b

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, έδειξαν πως από τους 47 εξετασθέντες ασθενείς, 21 ήταν ομόζυγοι ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο C (CC γονότυπος 44,7%), 25 ήταν ετερόζυγοι (CT γονότυπος 53,2 %) και 1 ήταν ομόζυγος ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T (TT γονότυπος 2,1 %).



Συχνότητα C αλληλίου : 0.71

Συχνότητα T αλληλίου: 0,29

Πίνακας 2: Γονότυποι ασθενών για τον πολυμορφισμό.

C=φυσιολογικό αλληλόμορφο, T=μεταλλαγμένο αλληλόμορφο

A/A δείγματος	Γονότυπος
1	CC
2	CT
3	CT
4	CT
5	CT
6	CC
7	CT
8	CC
9	CC
10	CC
11	CC
12	CT
13	TT
14	CC
15	CC
16	CC
17	CT
18	CC
19	CC
20	CC
21	CT
22	CC
23	CC
24	CT
25	CT
26	CC
27	CT
28	CT
29	CT
30	CT

A/A δείγματος	Γονότυπος
31	CC
32	CT
33	CT
34	CC
35	CT
36	CT
37	CT
38	CT
39	CC
40	CT
41	CC
42	CT
43	CT
44	CT
45	CC
46	CC
47	CT

1.5 Συζήτηση

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια με σύνθετη αιτιολογία και θεωρείται πως αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας στις βιομηχανοποιημένες χώρες. Αποτελεί το συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως (και το δεύτερο πιο συχνό καρκίνο γενικά), με σχεδόν 1.7 εκατομμύρια καινούργιες διαγνώσεις στο 2012 (89).

Το γονίδιο της μεθυλενοτετραϋδροφυλλικής αναγωγάσης (MTHFR) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα στάδια του μεταβολισμού που εμπλέκονται στην επεξεργασία των αμινοξέων. Η ανάλυση των πολυμορφισμών στο γονίδιο MTHFR αποκάλυψε συσχετίσεις με τον καρκίνο, και ειδικότερα ο πολυμορφισμός C677T, ο οποίος έχει προταθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό του φολικού οξέος, τη μεθυλίωση, τη σύνθεση και την επισκευή του DNA, θεωρείται ότι συμβάλλει στην προαγωγή όγκων στον μαστικό αδένα (90).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας έδειξε πως από τα 47 εξετασθέντα δείγματα ασθενών, 21 ήταν ομόζυγα ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο C (CC γονότυπος 44,7%), 25 ήταν ετερόζυγα (CT γονότυπος 53,2 %) και 1 ήταν ομόζυγο ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T (TT γονότυπος 2,1 %). Επιπλέον η συχνότητα του C αλληλίου είναι 0.71 ενώ η συχνότητα T αλληλίου είναι 0.29.

Μια σειρά μελετών ασχολήθηκαν με την συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού C677T του MTHFR καθώς και του A1298C με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε διάφορες εθνοτικές ομάδες αλλά τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα, κυρίως εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων. Ορισμένες συσχετίζουν τον TT γονότυπο με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού ενώ άλλες όχι. Ωστόσο σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση που δημοσιεύτηκε το 2014 [Kai Li et al., PLOS ONE, June '14 9(6):e71290] από τα αποτελέσματα 57 μεμονωμένων μελετών διαπιστώθηκε ότι ο πολυμορφισμός C677T του MTHFR μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού.

Συγκρινόμενα με τη μελέτη του πολυμορφισμού σε υγιή γενικό πληθυσμό της Ελλάδας, τα αποτελέσματα μας εμφανίζουν σχετική αναλογία όσον αφορά στην εμφάνιση των γονοτύπων με ελαφρώς μειωμένο το ποσοστό της ομοζυγωτίας για το γονότυπο TT. Αναλυτικότερα, στη συγκεκριμένη μελέτη τα ποσοστά ομοζυγωτίας ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ετεροζυγωτίας και ομοζυγωτίας ως προς το

μεταλλαγμένο αλληλόμορφο ανέρχονται στα 38%, 54% και 8% αντίστοιχα. Επίσης σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, σε πληθυσμό ατόμων χωρίς ιστορικό καρκίνου του μαστού αλλά με ιστορικό θρομβοφιλίας, ο TT γονότυπος για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό εμφανίζεται σε ποσοστό 22.4 %.

Ωστόσο, καθώς η μελέτη μας είναι ακόμα υπό εξέλιξη, ο επί του παρόντος αριθμός δειγμάτων είναι αρκετά περιορισμένος ώστε να μπορέσουμε να συνάγουμε ασφαλή συμπεράσματά σχετικά με την συσχέτιση του πολυμορφισμού C677T του γονιδίου MTHFR με τον καρκίνο του μαστού. Απαιτείται η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων για την ικανοποίηση των κριτηρίων που θα μας επιτρέψουν να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

1.6 Βιβλιογραφία

Άρθρα και βιβλία

- 1) American Cancer Society, « Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016 », Atlanta: American Cancer Society, Inc. (2015).
- 2) Mandal A., « History of Breast Cancer », News Medical Life Sciences & Medicine, Sep (2013).
- 3) « The History of Cancer », American Cancer Society, (2014).
- 4) Saffroy R, Lemoine A, Debuire B., « MTHFR (5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase) », Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol; 9(4):310-312, (2005).
- 5) Trimmer EE, « Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance », Curr Pharm Des.;19(14):2574-93, (2013).
- 6) Trimmer EE Ballou DP Matthews RG, « Methylenetetrahydrofolate reductase from Escherichia coli: elucidation of the kinetic mechanism by steady-state and rapid-reaction studies », Biochemistry.;40(21):6205-15, May (2001).
- 7) Breasted JH, « The Edwin Smith Surgical papyrus », Chicago Illinois: The University Chicago Press; 1930, special edition, (1984).
- 8) Κωνσταντίνος Καλαχάνης, « Η Ιπποκρατική θεωρία περί των χυμών », Πεμπτουσία, Μάρτιος (2013).
- 9) Homer. Iliad. [Translated by WHD Rouse] New York: A Signet Classic. New American Library; p 15, 36, (1966).
- 10) De Moulin D, « A short history of breast cancer », Boston: Martinus Nijhoff; pp. 1–107, (1983).
- 11) Lewison EF, « The surgical treatment of breast cancer; an historical and collective review », Surgery;34:904–53, (1953).
- 12) Lakhtakia R, « A Brief History of Breast Cancer: Part I: Surgical domination reinvented ». Sultan Qaboos University Medical Journal, 14(2), e166–e169, (2014).
- 13) « Special Report: Treatment of primary breast cancer », N Engl J Med;301:340, (1979).
- 14) Henry Gray, « Anatomy of the Human Body », (1918).
- 15) Δ. Κελλαρτζής Μ. Ζαφράκας Α. Παπανικολάου Φ. Τζεβελέκης Β. Ταρλατζής, «Ανατομία, φυσιολογική διάπλαση και διαταραχές της ανάπτυξης των μαστών», Ελληνική Μαιευτική & Γυναικολογία, (2009).

- 16) Williams, P. L.; Warwick, R.; Dyson, M. & Bannister, L. H., «Gray's anatomy», 37th ed, London, Churchill Livingstone, (1989).
- 17) Χατζημπούγιας Ι. «Ο Μαστός», Στο: Χατζημπούγιας Ι (εκδ). «Στοιχεία ανατομικής του Ανθρώπου», Θεσσαλονίκη: GM Designs;267-276, (2000).
- 18) Marshall WA Tanner JM, «Variations in pattern of pubertal changes in girls», Arch Dis Child; 44:291-303, (1969).
- 19) Mimouni F Merlob P Reisner SH, «Occurrence of 121 supernumerary nipples in newborns», Am J Dis Child; 137:952-953, (1983).
- 20) James CE Underwood, Simon S, «Cross. General and Systematic Pathology», 5th Edition, Elsevier Limited, (2009).
- 21) Hajopj M Kantarjian Robert A Wolff Charles A Koller, «The MD Anderson Manual of Medical Oncology», 2nd Edition, The McGraw-Hill Companies, (2011).
- 22) RC Swanson JO, «Breast cancer: A review of the literature», J Insur Med, 35:85–101, (2003).
- 23) «Καρκίνος Μαστού », Hoffmann-La Roche Ltd, Sep 2015.
- 24) Key TJ Verkasalo PK Banks E, «Epidemiology of breast cancer», Lancet Oncol, 2:133–140 7, (2001).
- 25) Parkin DM Bray F Ferlay J Pisani P, «Estimating the world cancer burden», Globocan 2000, Int J Cancer, 94:153–156 8, (2001).
- 26) Ferlay J Bray F Pisani P Parkin DM, Globocan 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence. Worldwide IARC cancer base no 5, version 2.0, IARC Press, Lyon, (2004).
- 27) Tominaga S, «Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States». Natl Cancer Inst Monogr, 69:83–92 10, (1985).
- 28) Ziegler RG Hoover RN Pike MC Hildesheim A Nomura AM West DW et al. «Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women». J Natl Cancer Inst, 85:1819– 1827, (1993).
- 29) Λάγιου Α., «Επιδημιολογία και πρόληψη του καρκίνου του μαστού», Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής, 25(6):742-748, (2008).
- 30) Μπανσκουσλί Ισάμ, «Καρκίνος του μαστού: αιτιολογία και παράγοντες κινδύνου», Ογκολογικό Αθηνών.
- 31) Βασιλειάδης Θεόδωρος , «Καρκίνος μαστών - Επιδημιολογικά στοιχεία », (2011).
- 32) «Breast Cancer Facts & Figures», American Cancer Society, Inc. No. 861009, (2009).

- 33) Brinton LA Hoover R & Fraumeni JF Jr, «Reproductive factors in the aetiology of breast cancer», Environmental Epidemiology Branch, National Cancer Institute, U.S.A., (1983).
- 34) Kubba AA, «Breast cancer and the pill», J. R. Soc. Med.; 96:280-283, (2009).
- 35) Singletary Eva S, «Rating the risk factors for breast cancer», Annals of Surgery Vol. 237, No. 4, 474-482, Lippincott Williams & Wilkins, Inc, (2005).
- 36) Margot P Cleary and Michael E Grossmann, «Obesity and Breast Cancer: The Estrogen Connection», Endocrinology; 150(6): 2537–2542, Jun (2009).
- 37) «Your Guide to Understanding Genetic Conditions», Genetics Home Reference. Nov. (2016).
- 38) Filippini S Vega A, «Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2», Frontiers in Bioscience 18, 1358-1372, June (2013).
- 39) Eisinger F Sobol H Serin and Whorton JC, «Hereditary breast cancer», circa 1750. Lancet 351, 1366 (1998).
- 40) Foulkes WD, «Inherited susceptibility to common cancers», N Engl J Med 359(20):2143-53 (2008).
- 41) Barnes DR Antoniou AC, «Unravelling modifiers of breast and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: update on genetic modifiers», J Intern Med 271(4):331-343 (2012).
- 42) Breast Cancer Linkage Consortium, «Cancer risks in BRCA2 mutation carriers», J Natl Cancer Inst 91: 1310–1316, (1999).
- 43) Walsh T King MC, «Ten genes for inherited breast cancer», Cancer Cell 11, 103-105, (2007).
- 44) Pharoah PD Antoniou AC Easton DF and Ponder BA, «Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer», N Engl J Med 358, 2796-2803 (2008).
- 45) Tabitha M. Powledge , «Breast cancer genes: Beyond BRCA1 and BRCA2», Genetic Literacy Project, Apr (2014).
- 46) «Η χημική ένωση του μήνα: Φυλλικό Οξύ», Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο, Ιούνιος (2006).
- 47) «Dietary Supplement Fact Sheet: Folate», Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health.
- 48) Jason W Locasale, «Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle», Nature Reviews Cancer 13,572–583, (2013).

- 49) Greenberg JA Bell SJ Guan Y Yu Y, «Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention», *Reviews in Obstetrics and Gynecology*,;4(2):52-59, (2011).
- 50) Henk J Blom Yvo Smulders, «Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects», *J Inherit Metab Dis* 34:75–81, (2011).
- 51) Lynn B Bailey, «Folate in Health and Disease», 2nd Edition. CRC Press, (2009).
- 52) Simon N Young Marjan Shalchi, «The effect of methionine and S-adenosylmethionine on S-adenosylmethionine levels in the rat brain», *J Psychiatry Neurosci*, 30(1): 44–48, (2005).
- 53) Flaubert T Thomas B Shea, «Vitamins & Hormones», Elsevier, (2008).
- 54) V. Christopoulou-Cokkinou, «Homostyceine as a risk factor for thrombosis», *Archives of Hellenic Medicine*, 18(5):526-536, (2001).
- 55) Leclerc D Sibani S Rozen R, «Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms», In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience; (2000-2013).
- 56) Soltanpour MS Soheili Z Shakerizadeh A, «Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of retinal vein thrombosis», *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*;18(6):487-491, (2013).
- 57) Pradeep K Upendra Y Vandana R, «Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and breast cancer risk: Evidence for genetic susceptibility», *Meta Gene* 6, 72-84, (2015).
- 58) Lorenzo D Botto and Quanhe Yang, «5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review», *Am. J. Epidemiol*, 151 (9): 862-877, (2000).
- 59) Ogino S Wilson RB, «Genotype and Haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis», *J Hum Genet* ;48(1):1-7, (2003).
- 60) Bilian Jin Yajun Li and Keith D Robertson, «DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy?», *Genes & Cancer* 2(6) 607 –617, (2011).
- 61) Melanie R Hassler and Gerda Egger, «Epigenomics of cancer – emerging new concepts», *Biochimie* 94, 2219-2230, (2012).

- 62) Moshe Szyf, «DNA methylation signatures for breast cancer classification and prognosis (Review)», *Genome Medicine* 4:26, (2012).
- 63) Kulis M Esteller M, «DNA methylation and cancer». *Adv Genet*, 70:27-56,(2010).
- 64) Melanie Ehrlich, «DNA hypomethylation in cancer cells». *Epigenomics*, 2): 239–259, (2009)
- 65) Suzuki K Suzuki I Leodolter A Alonso S Horiuchi S Yamashita K Perucho M, «Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage», *Cancer Cell*;9(3):199-207, Mar (2006).
- 66) Gupta A Godwin AK Vanderveer L Lu A Liu J, «Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma», *Cancer Res*;63(3):664-73, Feb (2003).
- 67) Soares J1 Pinto AE Cunha CV André S Barão I Sousa JM Cravo M, «Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression», *Cancer*;85(1):112-8 Jan (1999).
- 68) Donghong Zhang Xuemei Wen Wei Wu Ye Guo Wei Cui, «Elevated Homocysteine Level and Folate Deficiency Associated with Increased Overall Risk of Carcinogenesis: Meta-Analysis of 83 Case-Control Studies Involving 35,758 Individuals», *PLoS ONE* 10(5): e0123423, (2015).
- 69) Simone Reuter Subash C Gupta Madan M Chaturvedi Bharat B Aggarwal, «Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?», *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 49, Issue 11, Pages 1603-1616, Dec (2010).
- 70) Nicholas S Brown Roy Bicknell, «Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative stress - its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer», *Breast Cancer Research*, 3:323, (2001).
- 71) FarukTas Hasan Hansel Ahmet Belce SennurIlvan Andac Argon Hakan Camlica ErkanTopuz, «Oxidative stress in breast cancer», *Medical Oncology*, 22:11, March (2005).
- 72) Kirke P N Mills J L Molloy A M Brody L C O’Leary V B Daly L Scott, «Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study». *BMJ : British Medical Journal*, 328(7455), 1535–1536, (2004).
- 73) Wang Y1 Liu Y Ji W Qin H Wu H Xu D Turtuohut T Wang Z, «Variants in MTHFR gene and neural tube defects susceptibility in China», *Metab Brain Dis* ;30(4):1017-26, Aug (2015).

- 74) Botto LD Yang Q, «5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a huge review», *Am J Epidemiol*, 1;151(9):862-77, May (2000).
- 75) Mills JL McPartlin JM Kirke PN Lee YJ Conley M, Weir DG Scott JM, «Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects», *Lancet*, 21;345(8943):149-51, Jan (1995).
- 76) Greene N D E & Copp A J, «Neural Tube Defects», *Annual Review of Neuroscience*, 37, 221–242, (2014).
- 77) Cortese C1 Motti C, «MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease», *Public Health Nutr* ;4(2B):493-7, Apr (2001).
- 78) Wald David S Law Malcolm Morris Joan K, «Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis» *BMJ*; 325 :1202, (2002).
- 79) Bjelland I Tell GS Vollset S Refsum H Ueland P Folate, «Vitamin B12, Homocysteine, and the MTHFR 677C→T Polymorphism in Anxiety and Depression: 80The Hordaland Homocysteine Study», *Arch Gen Psychiatry*;;60(6):618-626, (2003).
- 80) Simon N Young, «Folate and depression - a neglected problem», *J Psychiatry Neurosci*;; 32(2): 80–82, Mar (2007).
- 81) Almeida Osvaldo P, «Contribution of the MTHFR gene to the causal pathway for depression, anxiety and cognitive impairment in later life», *Neurobiology of Aging* , Volume 26 , Issue 2 , 251 – 257, (2005).
- 82) Lok, A et al. «Interaction between the MTHFR C677T Polymorphism and Traumatic Childhood Events Predicts Depression», *Translational Psychiatry* 3.7 (2013): e288–. PMC. Web. 27 Oct. (2016).
- 83) De Mattia E Toffoli G, «C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation», *Eur J Cancer*;;45(8):1333-5, May (2009).
- 84) Rai V, «Methylenetetrahydrofolate Reductase A1298C Polymorphism and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of 33 Studies», *Annals of Medical and Health Sciences Research* 4.6: 841–85, (2014).
- 85) John G Kuhn, «Fluorouracil and the New Oral Fluorinated Pyrimidines», *Ann Pharmacother*, vol. 35 no. 2 217-227, Feb (2001).

- 86) Kyoung-JinSohn Ruth Croxford Zoe Yates Mark Lucock Young-In Kim, «Effect of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Chemosensitivity of Colon and Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate», JNCI J Natl Cancer Inst 96 (2): 134-144, (2004).
- 87) Bernd Christian Schwahn and Rima Rozen, «Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms: Pharmacogenetic Effects», Austin (TX): Landes Bioscience; (2000-2013).
- 88) G Toffoli A Veronesi M Boiocchi D Crivellari, «MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF)», Ann Oncol 11 (3): 373-374, (2000).
- 89) Ferlay J Soerjomataram I Ervik M Dikshit R Eser S Mathers , Rebelo MParkin DM Forman D Bray F, «Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base», No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; (2014).
- 90) A Ramos-Silva LE Figuera OM Soto-Quintana AM Puebla-Pérez R Ramírez-Patiño I Gutiérrez-Hurtado DI Carrillo-Moreno GM Zúñiga-González IP Dávalos-Rodríguez, MP Gallegos-Arreola, «Association of the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with breast cancer in a Mexican population», Genet. Mol. Res. 14 (2): 4015-4026 (2015).
- 91) Marques-Gallego P, et al., J Inorg Biochem, 103, (2009)
- 92) Zetterberg et al., 104, (2002).

Ιστοσελίδες

- α) <http://www.cancer.org>
- β) <http://www.nationalbreastcancer.org>
- γ) <https://www.ons.gov.uk>
- δ) <http://www.eufic.org/article/el/nutrition/vitamins-minerals-phytonutrients/artid/about-folate/>
- ε) <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/anencephaly>

- ζ) <http://neuropathology-web.org/chapter11/chapter11bNTD.html>
- η) http://www.ninds.nih.gov/disorders/spina_bifida/detail_spina_bifida.html
- θ) <http://www.mthfrsupport.com.au/mthfr-polymorphisms-and-cardiovascular-disease/>
- ι) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3385>

Περίληψη

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες παγκοσμίως (και το δεύτερο πιο συχνό καρκίνο γενικά), με σχεδόν 1.7 εκατομμύρια καινούργιες διαγνώσεις στο 2012. Ο πολυμορφισμός C677T του MTHFR έχει προταθεί ότι επηρεάζει το μεταβολισμό του φυλλικού οξέος, τη μεθυλίωση, τη σύνθεση και την επισκευή του DNA και ότι συμβάλλει στην προαγωγή όγκων στον μαστικό αδένα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της συχνότητας της μετάλλαξης C677T του γονιδίου MTHFR σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Στην μελέτη συμπεριλήφθηκαν 47 γυναίκες με καρκίνο του μαστού, ιστολογικά και κυτταρολογικά διαγνωσμένο. Η απομόνωση του DNA έγινε από μονιμοποιημένα και παραφινοποιημένα παρασκευάσματα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *HinfI* (PCR-RFLP).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως από τους 47 εξετασθέντες ασθενείς, 21 ήταν ομόζυγοι ως προς το φυσιολογικό αλληλόμορφο C (CC γονότυπος 44,7%), 25 ήταν ετερόζυγοι (CT γονότυπος 53,2 %) και 1 ήταν ομόζυγος ως προς το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο T (TT γονότυπος 2,1 %). Συγκρινόμενα με τη μελέτη του πολυμορφισμού σε υγιή γενικό πληθυσμό της Ελλάδας τα αποτελέσματά μας εμφανίζουν σχετική αναλογία όσον αφορά στην εμφάνιση των γονοτύπων με ελαφρώς μειωμένο το ποσοστό της ομοζυγωτίας για το γονότυπο TT.

Καθώς η εργασία μας είναι ακόμα υπό εξέλιξη, ο επί του παρόντος αριθμός δειγμάτων είναι αρκετά περιορισμένος ώστε να μπορέσουμε να συνάγουμε ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά στη συσχέτιση του πολυμορφισμού του C677T του γονιδίου του MTHFR με τον καρκίνο του μαστού. Απαιτείται διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για την ικανοποίηση των κριτηρίων που θα μας επιτρέψουν να καταλήξουμε σε ασφαλές συμπέρασμα.

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer in women worldwide (and the second most frequent cancer in general), with nearly 1.7 million new diagnoses in 2012. C677T polymorphism has been suggested to affect the metabolism of folate, methylation, synthesis and repair of DNA and that helps promote tumors in the mammary gland. The aim of this study is to investigate the frequency of the C677T mutation of MTHFR gene in women with breast cancer.

The study included 47 women with breast cancer, histologically and cytologically diagnosed. DNA was isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. Polymerase Chain Reaction followed by digestion with restriction enzymes was applied in the isolated DNA solutions.

Results indicated that of the 47 patients examined, 21 were homozygous for the normal allele C (CC genotype 44.7%), 25 were heterozygous (CT genotype 53.2%) and 1 was homozygous for the mutant allele T (TT genotype was 2.1%). Compared to the study of polymorphism in a healthy Greek population our results show a relative ratio with respect to the emergence of genotypes with slightly reduced the percentage of homozygosity for genotype TT.

As our study is still in progress, the current number of samples is quite limited so we can draw a safe conclusion on the association of the C677T polymorphism with breast cancer. The investigation of a larger number of samples is required to meet the criteria that will allow us to reach a safe conclusion.