

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΠΡΟΤΑΣΗΣ

Επιστημονική Περιοχή: Εργαστηριακή Ιστολογία – Ιστοπαθολογία.

Λέξεις Κλειδιά: Καρκίνος μαστού, ογκογονίδιο Bcl-2, ανοσοϊστοχημεία, προγνωστικοί και προβλεπτικοί δείκτες.

Πανεπιστήμιο/Τμήμα/Τομέας/Εργαστήριο: Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Πειραιά – Μεταξά.

Γλώσσα: Ελληνική.

ΤΙΤΛΟΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

Η μελέτη του Bcl-2 σε πρωτοπαθές διηθητικό καρκίνωμα μαστού και η συσχέτισή του με τους κλασικούς μορφολογικούς και ανοσοφαινοτυπικούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς δείκτες.

Αναλυτική περιγραφή ερευνητικής πρότασης

Εισαγωγή

Το καρκίνωμα του μαστού είναι ο πιο συχνός τύπος καρκινώματος και το πρώτο συχνότερο αίτιο θανάτου λόγω κακοήθειας στις γυναίκες, σε παγκόσμιο επίπεδο. Ανήκει στους τρεις πλέον συχνούς παγκοσμίως, μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, ανεξαρτήτως φύλου (1). Περίπου 1 εκατομμύριο νέα περιστατικά καρκινώματος μαστού διαγιγνώσκονται ετησίως με το ήμισυ των ασθενών και το 60% περίπου των θανάτων να εντοπίζονται στις αναπτυσσόμενες χώρες. Επιπλέον, παρατηρείται τεράστια διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης μετά τη διάγνωση καρκινώματος μαστού μεταξύ των διαφορετικών χωρών με τις αναπτυγμένες χώρες να παρουσιάζουν 80% πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης και τις αναπτυσσόμενες χώρες να παρουσιάζουν 40% πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης των ασθενών (2).

Στην εποχή της εξατομικευμένης ιατρικής, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη μοριακή ανάλυση των υποτύπων του καρκίνου του μαστού (3). Τα κύρια σχήματα ταξινόμησης που βασίζονται στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης αναφέρονται συχνά ως ενδογενείς υποτύποι και περιλαμβάνουν:

- **Αυλικός τύπος A:** ER θετικό (+) ή / και PR θετικό (+), HER2 Αρνητικό (-)
- **Αυλικός τύπος B:** ER θετικό (+) ή / και PR θετικό (+), HER2 Αρνητικό (-) ή Θετικό (+)
- **HER2+:** ER Αρνητικό (-) και PR Αρνητικό (-), HER2 Θετικό (+) (4) (5)
- **Τριπλός αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC):** ER Αρνητικό (-) και PR Αρνητικό (-), HER2 Αρνητικό (-) (6) (7).

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με ελεγχόμενο τρόπο τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μάζας νεοπλασματικών κυττάρων που ονομάζεται όγκος. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η αντίστασή τους στη διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, δηλαδή στην απόπτωση. Η απόπτωση είναι μία με εξαιρετική ακρίβεια ρυθμιζόμενη διαδικασία κυτταρικού θανάτου. Σε αντίθεση με τη νέκρωση που είναι μία τραυματική εκδοχή του κυτταρικού θανάτου, η απόπτωση είναι μία

συνεπής και ενεργής απόφαση που λαμβάνεται για τη θυσία συγκεκριμένων κυττάρων προς μεγαλύτερο όφελος του οργανισμού. Είναι μια φυσιολογική διαδικασία που πραγματοποιείται συνήθως σε πολυκύτταρους οργανισμούς (8).

Η αποπτωτική διαδικασία ελέγχεται από ποικιλία γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων και της απώλειας λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως τα γονίδια Bcl-2 και p53 (9). Μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων προκαλούν αλλαγές στην ποσότητα και την ποιότητα των πρωτεϊνών τους και συμβάλλουν στην παθογένεση ορισμένων τύπων καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκινώματος μαστού. Αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στον έλεγχο της ανάπτυξης και στα αποπτωτικά μονοπάτια, τα οποία φαίνεται να παίζουν βασικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου και στην απόκριση σε αντινεοπλασματικούς παράγοντες, επηρεάζοντας το βαθμό της απόπτωσης ή αλλάζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (10) (11).

Το Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) θεωρείται ογκογονίδιο που εμπλέκεται σε διάφορους τύπους κακοηθειών, ιδιαίτερα στη λευχαιμία και το λέμφωμα, αποτελώντας βασικό παράγοντα για τη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης (12).

Το Bcl-2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21 και κωδικοποιεί μια ενσωματωμένη πρωτεΐνη στη εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη 26 kDa η οποία εμποδίζει τον αποπτωτικό θάνατο των κυττάρων. Η υπερέκφραση της Bcl-2 πρωτεΐνης αναστέλλει τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο και ενεργοποιεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του όγκου.

Ο ρόλος του Bcl-2 στο καρκίνωμα μαστού έχει διερευνηθεί σε διάφορες μελέτες. Με δεδομένη την αντιαποπτωτική του δράση αναμένεται να σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση. Παρά ταύτα προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Ορισμένες αναφέρουν δυσμενή επίδραση στην επιβίωση των ασθενών με καρκίνωμα μαστού, ενώ οι περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν ευνοϊκό προγνωστικό αποτέλεσμα. Επίσης, ορισμένες μελέτες δεν ανέδειξαν συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Bcl-2 και της επιβίωσης (12). Τα παραπάνω ευρήματα αφήνουν ανοικτό το ερώτημα κατά πόσο η Bcl-2 έκφραση αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη.

Σημειώνεται επιπλέον αλληλεπίδραση του Bcl-2 και της κατάστασης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) με αποτέλεσμα η Bcl-2 έκφραση να διαφέρει ανάλογα με τους μοριακούς υποτύπους (13) (14).

Σκοπός

Παρά τις βελτιώσεις στην έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία, το ποσοστό επιβίωσης στο καρκίνωμα μαστού είναι μέτριο. Επομένως, η αξιολόγηση προγνωστικών βιολογικών δεικτών εξακολουθεί να είναι σημαντικός στόχος.

Το Bcl-2 έχει κατά καιρούς προταθεί ως υποψήφιος προγνωστικός δείκτης για το καρκίνωμα του μαστού. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, εξακολουθεί να μην είναι απόλυτα αποδεκτός με δεδομένο ότι τα αποτελέσματα συσχέτισης του με την επιβίωση των ασθενών είναι αντικρουόμενα.

Σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση του ρόλου του Bcl-2 ως πιθανού προγνωστικού δείκτη σε ασθενείς με πρωτοπαθές καρκίνωμα μαστού. Επίσης θα μελετηθεί η σχέση του με άλλες μοριακές παραμέτρους, σημαντικής προγνωστικής και προβλεπτικής αξίας: την κατάσταση των ορμονικών υποδοχέων ER (οιστρογόνων) και PR (προγεστερόνης), του HER2

(ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας 2) και τα επίπεδα του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (MIB-1).

Ζητούμενο είναι να ελεγχθεί η έκφραση του Bcl-2 ως προς την εγκυρότητα και την αξιοπιστία του ως ένας ανεξάρτητος και ισχυρός προγνωστικός πρωτεϊνικός δείκτης.

Υλικά και μέθοδοι

Στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά – Μεταξά, με Διευθύντρια και Τομεάρχη την κ Ολυμπία Τζαΐδα, θα συλλεχθούν n=100 περιστατικά γυναικών με πρωτοπαθές καρκίνωμα μαστού. Σε τομές των όγκων θα μελετηθεί η Bcl-2 του έκφραση με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Θα μελετηθούν επίσης οι παρακάτω μεταβλητές:

- Η ηλικία
- Το μέγεθος του όγκου
- Ο ιστολογικός τύπος
- Ο βαθμός της ιστολογικής διαφοροποίησης (Grade)
- Η λεμφαδενική κατάσταση και ο αριθμός των μεταστατικών διηθημένων λεμφαδένων
- Η έκφραση των βασικών μοριακών δεικτών:
 - i. Των υποδοχέων ER (οιστρογόνων) και PR (προγεστερόνης)
 - ii. Του ογκογονιδίου HER2 (ανθρώπινος επιδερμικός αυξητικός παράγοντας 2)
 - iii. Του δείκτη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (MIB-1).

Τα στοιχεία μεγέθους του πρωτοπαθούς όγκου της κατάστασης των λεμφαδένων και ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης κατά Scarf, Bloom και Richardson) θα ληφθούν από την ιστολογική έκθεση.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των οιστρογονικών (ER) και προγεστερονικών(PR) υποδοχέων, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 (MIB-1) και του ογκογονιδίου του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) θα παρασχεθούν από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά – Μεταξά. (Σημειώνεται ότι οι ER και PR θεωρούνται θετικοί όταν $\geq 1\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων εμφανίζει πυρηνική ανοσοχρώση και το HER2 θεωρείται θετικό όταν $\geq 10\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων εμφανίζει ολομεμβρανική έντονη ανοσοχρώση, αποτέλεσμα το οποίο καταγράφεται ως 3+).

Η αναζήτηση του Bcl2 θα γίνει με ανοσοϊστοχημική τεχνική σε τομές παραφίνης από υλικό όγκου μονιμοποιημένο σε 10% ουδέτερη φορμόλη ακολουθώντας τις διεθνείς οδηγίες μονιμοποίησης, εγκλεισμού και προετοιμασίας τομών-πλακιδίων.

Όλα τα αντιδραστήρια και οι μάρτυρες πριν τη χρησιμοποίησή τους θα έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου (20ο-25οC) και όλες οι επωάσεις θα γίνουν ομοίως σε αντίστοιχες θερμοκρασίες. Κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες θα χρησιμοποιηθούν σε όλες τις περιπτώσεις. Θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της στρεπταβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης.

Η τεχνική διαδικασία θα περιγραφεί στη συνέχεια αναλυτικά στο τεχνικό τμήμα της εργασίας.

Με τα δεδομένα που θα συλλεχθούν θα δημιουργηθεί στατιστικό πρωτόκολλο με το πρόγραμμα SPSS.

Η μελέτη αναμένεται να ολοκληρωθεί σε διάστημα 36 μηνών.

Αναμενόμενα αποτελέσματα/Συμπεράσματα

Με βάση τα αποτελέσματα, η παρούσα μελέτη θα διερευνήσει τον ενδεχόμενο προγνωστικό ρόλο του Bcl-2 και τον αντίκτυπό του στην επιβίωση του καρκινώματος μαστού. Θα αξιολογήσει επίσης τη συσχέτισή του με τους κλασικούς μορφολογικούς και τους σημαντικούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς μοριακούς δείκτες στο καρκίνωμα μαστού, ώστε να διαπιστωθεί η εγκυρότητα και η αξιοπιστία του ως ένας ανεξάρτητος και ισχυρός προγνωστικός δείκτης στους ασθενείς με καρκίνωμα του μαστού.

Βιβλιογραφία

1. Hyuna Sung , Jacques Ferlay , Rebecca L Siegel , Mathieu Laversanne , Isabelle Soerjomataram , Ahmedin Jemal , et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May; 71(3): 209-249.
2. Muhammad Akram , Mehwish Iqbal , Muhammad Daniyal , Asmat Ullah Khan. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 2017 Oct; 50(1): 33.
3. Simona Maria Fragomeni , Andrew Sciallis , Jacqueline S Jeruss. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2018 Jan; 27(1): 95-120.
4. Tsuda H. Histological Significance of Intrinsic Subtype Classification. *Annals of Oncology.* 2012 Oct; 23(11): xi59.
5. Yuan Tang , Yue Wang , Mohammad F Kiani , Bin Wang. Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2016 Oct; 16(5): 335-343.
6. Hirotaka Iwase , Junichi Kurebayashi , Hitoshi Tsuda , Tomohiko Ohta , Masafumi Kurosumi , Kazuaki Miyamoto , et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer.* 2010 Apr; 17(2): 118-2.
7. Garpis N, Damaskos C, Garpis A, Nikolettos K, Dimitroulis D, Diamantis E, et al. Molecular Classification and Future Therapeutic Challenges of Triple-negative Breast Cancer. *In Vivo.* 2020 Jul-Aug; 34(4): 1715-1727.
8. Xu X, Yueyang Lai , Zi-Chun Hua. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019 Jan; 1(31): 39.
9. MattiaBarbareschi , Orazio Caffo , Silvio Veronese , Russel D Leek , Paolo Fina , Steven Fox , et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: A study with long-term follow-up. *Human Pathology.* 1996 November; 27(11): 1149-1155.
10. Q L Lu , P Abel , C S Foster , E N Lalani. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol.* 1996 Feb; 27(2): 102-10.
11. M Hollstein , D Sidransky , B Vogelstein , C C Harris. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul ; 253(5015): 49-53.
12. Ki-Tae Hwang , Young A Kim , Jongjin Kim , Hyeon Jeong Oh , Jeong Hwan Park , In Sil Choi , et al. Prognostic influences of BCL1 and BCL2 expression on disease-free survival in breast cancer. *Scientific Reports.* 2021 Jun; 11(1): 11942.
13. Yong Hwa Eom , Hyung Suk Kim , Ahwon Lee , Byung Joo Song , Byung Joo Chae. BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2016 September; 19(3): 252-260.
14. Ki-Tae Hwang , Wonshik Han , Jongjin Kim , Hyeong-Gon Moon , Sohee Oh , Yun Seon Song , et al. Prognostic Influence of BCL2 on Molecular Subtypes of Breast Cancer. *J Breast Cancer.* 2017 Mar; 20(1): 54–64.
15. Alfonso Dueñas-González , María del Mar Abad-Hernández , Juan-Jesús Cruz-Hernández , Rogelio González-Sarmiento. Analysis of bcl-2 in sporadic breast carcinoma. *Cancer.* 2000 November; 80(11): 2100-2108.

16. Chu Van Nguyen, , Quang Tien Nguyen , Ha Thi Ngoc Vu , Huyen Thi Phung , Khoa Hong Pham , Roanh Dinh Le. Combined p53 and Bcl2 Immunophenotypes in Prognosis of Vietnamese Invasive Breast Carcinoma: A Single Institutional Retrospective Analysis. *Technol Cancer Res Treat*. 2020 Jan-Dec ; 19.
17. L Nakopoulou , A Michalopoulou , I Giannopoulou , A Tzonou , A Keramopoulos , A C Lazaris , et al. bcl-2 protein expression is associated with a prognostically favourable phenotype in breast cancer irrespective of p53 immunostaining. *Histopathology*. 1999 Apr; 34(4): 310-9.
18. Julia M. W. Gee , John F. R. Robertson , Ian O. Ellis , Peter Willsher , Richard A. McClelland , Helen B. Hoyle , et al. Immunocytochemical localization of BCL-2 protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy. *International journal of cancer*. 1994 December; 59(5): 619-628.
19. Visscher DW , Sarkar F , Tabaczka P. Clinicopathologic analysis of bcl-2 immunostaining in breast carcinoma. *Modern Pathology : an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. 1996 Jun; 9(6): 642-646.