

Ανάλυση αριθμητικών ανωμαλιών χρωμοσωμάτων 1 και 7 και πλοειδίας του DNA σε καρκινώματα μαστού

Ν. Καπράνος¹, Σ. Κουνέλη¹, Ε. Καρανιάση¹, Η. Αρβανίτη¹, Σ. Σάββα¹, Φ. Πατρά¹, Κ. Σφήκας², Ε. Κόκκα², Ε. Κουρή-Μπαϊρακτάρη²

Analysis of numeric abnormalities in chromosomes 1 and 7 and DNA ploidy in breast cancer

Kapranos N., Kouneli S., Karantasi E., Arvaniti H., Sava S., Patra F., Sfikas C., Kokka E., Bairaktari E.

Pathology Departments "Amalia Fleming" Gen. Hosp. Athens, Maternity Hospital "H. Venizelou" Athens

AIM. To investigate numeric alterations of chromosomes 1 and 7 as well as DNA ploidy status in breast cancer and to correlate the findings with parameters of prognostic significance.

MATERIAL AND METHODS. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with pericentromeric probes for chromosomes 1 and 7 and DNA content measurement by image analysis based cytophotometry were applied in interphase nuclei from fresh tissue imprints of 29 breast carcinomas.

RESULTS. The correlation between DNA ploidy and chromosomal aberrations revealed significant association between aneuploidy and simultaneous aneusomy of chromosomes 1 and 7 ($P=0.0007$). A similar association was found for chromosome 1 alone ($P=0.001$). A significant correlation was also demonstrated between regional lymph node metastasis and aneusomy of both chromosomes as well as chromosome 1 alone ($P=0.02$ and 0.05 respectively). Polysomy of chromosomes 1 and 7 was more frequent in poorly differentiated (grade III) tumors. No association between chromosome alterations and tumor size, hormone receptor status or p53 protein expression was detected.

CONCLUSION. Our findings indicate that the detection of numerical aberrations of chromosomes 1 and 7 with the FISH technique seems to be more sensitive for detection of abnormal DNA and their presence might be a useful predictor of aggressive biological behavior.

Key words: Breast carcinoma, Fluorescent in situ hybridization, chromosomes

¹Μονάδα Μοριακής Παθολογικής Ανατομικής, Παθολογοανατομικό Τμήμα Ν.Γ.Ν.Μ. "Αμαλία Φλέμιγκ", ²Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής Νοσ. "Ελενα Βενιζέλου"

Υποβλήθηκε: 25.3.2000
Εγκρίθηκε: 13.4.2000

1 and 7, DNA ploidy.

ΣΚΟΠΟΣ Η διερεύνηση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωματοσωμάτων 1 και 7 και της πλοειδίας του DNA σε καρκινώματα μαστού και η συσχέτισή τους με προγνωστικής αξίας παραμέτρους.

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ Εντυπώματα και επιχρίσματα κυττάρων φρέσκου ιστού ελήφθησαν από 29 πορογενή καρκινώματα μαστού. Οι αριθμητικές ανωμαλίες των χρωματοσωμάτων 1 και 7 μελετήθηκαν με την τεχνική φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) και η πλοειδία του DNA με σύστημα ανάλυσης εικόνας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Η σύγκριση μεταξύ πλοειδίας του DNA και χρωματοσωματικών διαταραχών έδειξε σημαντική σχέση μεταξύ ανευπλοειδίας και ταυτόχρονης ανευσωμίας των χρωματοσωμάτων 1 και 7 ($P=0,0007$). Παρόμοια σχέση παρατηρήθηκε και για το χρωματόσωμα 1 μεμονωμένα ($P=0,0007$). Η παρουσία αριθμητικών ανωμαλιών σε αμφότερα τα χρωματοσώματα ή στο χρωματόσωμα 1 μεμονωμένα σχετιζόταν με σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες ($P=0,02$ και $0,05$ αντίστοιχα). Οι ανωμαλίες και των δύο χρωματοσωμάτων ήταν συχνότερες σε καρκινώματα υψηλού βαθμού κακοηθείας ενώ δεν σχετίζοντο με τους ορμονικούς υποδοχείς ή την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης p53.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ Τα ευρήματα μας δείχνουν ότι η ανίχνευση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωματοσωμάτων 1 και 7 με τη μέθοδο FISH αποτελεί ευαίσθητο δείκτη διαταραχών του DNA και ότι η ύπαρξη τους φαίνεται να σχετίζεται με επιδεικτική βιολογική συμπεριφορά.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνωμα μαστού, φθορίζων *in situ* υβριδισμός, χρωματοσώματα 1 και 7, πλοειδία DNA.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χρωματοσωματικές ανωμαλίες θεωρήθηκαν από τις αρχές του 20ου αιώνα ως βασικό χαρακτηριστικό των νεοπλασμάτων¹. Με την πρόοδο της κυτταρογενετικής άρχισαν να περιγράφονται οι διαταραχές του καρυότυπου αρχικά σε αιματολογικά και ακολούθως σε συμπαγή νεοπλασμάτα. Η κλασική κυτταρογενετική όμως, λόγω των προβλημάτων επιλογής, δειγματοληψίας και καλλιέργειας των νεοπλασματικών κυττάρων, δεν καθιερώθηκε ως μέθοδος ρουτίνας στους συμπαγείς όγκους².

Η εξέλιξη των μεθόδων μελέτης χρωματοσωματικών ανωμαλιών οδήγησε στην ανάπτυξη δύο βασικών τεχνικών ανάλυσης με συνεχώς διευρυνόμενες εφαρμογές στο κλινικό εργαστήριο: την κυτταρογενετική της μεσόφασης και την κυτταροφωτομετρία του DNA. Η κυτταρογενετική της μεσόφασης στηρίζεται στον

in situ υβριδισμό αλληλουχιών χρωματοσωμάτων με τη χρήση δεικτών DNA σε ακέραια κύτταρα, χωρίς δηλαδή να απαιτείται καλλιέργεια κυττάρων και λήψη μεταφάσεων³. Ενώ με την παραπάνω τεχνική λαμβάνονται πληροφορίες, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο δείκτη, για κάθε χρωματόσωμα χωριστά, με την τεχνική της κυτταροφωτομετρίας του DNA επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των διαταραχών του συνολικού κυτταρικού DNA με τη βοήθεια κυτταροφωτομετρικών συστημάτων ανάλυσης⁴.

Η τεχνική του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH), έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αριθμητικών κυρίως ανωμαλιών κυττάρων μεσόφασης σε καρκινώματα μαστού⁵⁻⁷. Η κυτταροφωτομετρική ανάλυση της πλοειδίας του DNA έχει επίσης εφαρμοσθεί σε προγνωστικές κυρίως μελέτες καρκινωμάτων μαστού⁸. Ως εκ τούτου, θεωρήσαμε ενδιαφέρον να εφαρμόσου-

με ταυτόχρονα την τεχνική FISH καθώς και τον προσδιορισμό της πλοειδίας του DNA σε πορογενή καρκινώματα μαστού Ελληνίδων ασθενών, με σκοπό να διερευνήσουμε τη συχνότητα και το είδος των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωματοσωμάτων 1 και 7 και τις διαταραχές του ολικού κυτταρικού DNA και να συσχετίσουμε τα ευρήματα των τεχνικών αυτών τόσο μεταξύ τους όσο και με προγνωστικής αξίας παραμέτρους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το υλικό της μελέτης απετέλεσαν 29 περιπτώσεις καρκινώματος μαστού πορογενούς τύπου, γυναικών ηλικίας 34-82 ετών που υποβλήθηκαν σε ριζική μαστεκτομή στο Νοσοκομείο Έλενα Βενιζέλου. Για τη μελέτη των χρωματοσωματικών ανωμαλιών ελήφθησαν από κάθε όγκο εντυπώματα σε πλακίδια θειικά φορτισμένα τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε μίγμα μεθανόλης/οξικού οξέος 3:1 για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη μελέτη της πλοειδίας του DNA ελήφθησαν επιχρίσματα κυττάρων φρέσκου ιστού τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερη φορμόλη για 30 min. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης καθώς και της πρωτεΐνης p53.

Τεχνική FISH

Η τεχνική φθορίζοντος (FISH) που εφαρμόσθηκε για την ανίχνευση των αριθμητικών ανωμαλιών των χρωματοσωμάτων 1 και 7 είναι η ακόλουθη:

Τα επιχρίσματα κυττάρων τοποθετήθηκαν αρχικά σε διάλυμα 2 X SSC 0,5% NP40 για 30 min στους 37°C και ακολούθως αφυδατώθηκαν σε αιθανόλη 70% - 80% - 95% για 2 min κάθε μία. Ακολούθησε στέγνωμα για 15 min. Η αποδιάταξη του χρωματοσωματικού DNA των κυττάρων των επιχρισμάτων έγινε σε διάλυμα 2 X SSC, 70% φορμαμίδη (pH 7) σε υδατόλουτρο 70°C για 2 min και ακολούθησε αφυδάτωση σε 70% - 80% - 95% αιθανόλη σε θερμοκρασία -20°C για 2 min κάθε μία. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τύπου DNA έναντι α-δορυφορικών αλληλουχιών του κεντρομερούς των χρωματοσωμάτων 1 και 7 σημασμένοι με διγοξυγενίνη (Oncor, Gaithersburg, MD). Οι δείκτες αραιώθηκαν σε μίγμα υβριδισμού που περιείχε 2 X SSC/70% φορμαμίδη (Hy-

brisol VI, Oncor) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 1.0 ng/μl, αποδιατάχθηκαν χωριστά από τα κύτταρα του δείγματος σε θερμοκρασία 70°C για 5 min και παρέμειναν σε παγόλουτρο 4°C μέχρι τον υβριδισμό.

Για την επιτέλεση της αντίδρασης υβριδισμού τοποθετήθηκαν 20 μl διαλύματος δείκτη-μίγματος υβριδισμού σε κάθε πλακίδιο, και μετά από επικάλυψη με πλαστική καλυπτρίδα αφέθηκαν σε δάλαμο επώασης θερμοκρασίας 37°C για όλη τη νύχτα.

Για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου δείκτη έγινε μεθυβριδικό ξέπλυμα σε 0,5 X SSC, pH 7, σε 72°C για 5 min και τοποθέτηση των πλακιδίων σε 1X Phosphate Buffer saline/1% Tween 20 (PBD) για 2X3 min.

Η ανίχνευση της αντίδρασης υβριδισμού έγινε με αντίσωμα έναντι της διγοξυγενίνης σημασμένο με FITC (Oncor, Gaithersburg) για 20 min σε 37°C. Ακολούθησε ξέπλυμα των πλακιδίων σε PBD 3X5 min και μετάχρωση των πυρήνων με ιωδιούχο προπίδιο (PI) και antifade.

Αξιολόγηση σημάτων FISH

Η αξιολόγηση των κυττάρων σε μικροσκόπιο προσπίπτοντος φθορισμού (Microphot FX, Nikon, Kogaku KK, Japan) εφοδιασμένο με φίλτρα υπεριώδους για FITC/PI. Για τη λήψη φωτογραφιών χρησιμοποιήθηκε έγχρωμο φιλμ (HC 400, Kodak ektachrome). Από κάθε περίπτωση αξιολογήθηκαν μέχρι 200 κύτταρα στα οποία έγινε καταμέτρηση των χρωματοσωμικών σημάτων. Η καταμέτρηση των πυρηνικών σημάτων έγινε μόνο σε άδικτα κύτταρα, ενώ ανωμάτως αλληλοεπικαλυπτόμενοι πυρήνες δεν υπολογίσθηκαν. Ως ανευσωμία θεωρήθηκε η παρουσία >20% των πυρήνων με αριθμό σημάτων διαφορετικό από δύο για το υπό μελέτη χρωματόσωμα.

Πλοειδία του DNA

Η ποσοτική εκτίμηση του κυτταρικού DNA έγινε επί των ληφθέντων κυτταρικών επιχρισμάτων με σύστημα ανάλυσης εικόνας (CAS 200 Image Analysis System, Elmhurst, IL, USA) μετά από χρώση των κυττάρων κατά Feulgen. Η ρύθμιση του συστήματος έγινε με ειδικά τετραπλοειδικά κύτταρα αρουραίου, τα οποία χρώσθηκαν παράλληλα με τα δείγματα μας, με βάση τα οποία προσδιορίσθηκε η οπτική πυ-

κνότητα στην οποία αντιστοιχεί η μάζα του διπλοειδούς DNA (7,18 pg/κύτταρο). Από κάθε περίπτωση μετρήθηκαν 350-512 νεοπλασματικά κύτταρα. Διπλοειδή θεωρήθηκαν τα καρκινώματα με δείκτη DNA μεταξύ 0,9 και 1,1 και ανευπλοειδή με οποιαδήποτε άλλη τιμή. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του DNA καταγράφηκαν από το σύστημα ανάλυσης εικόνας υπό μορφή ιστογράμματος, ο οριζόντιος άξονας του οποίου αντιστοιχούσε στις τιμές της μάζας του κυτταρικού DNA και ο κάθετος άξονας στον αριθμό των μετρηθέντων κυττάρων για κάθε τιμή μάζας DNA.

Στατιστική ανάλυση

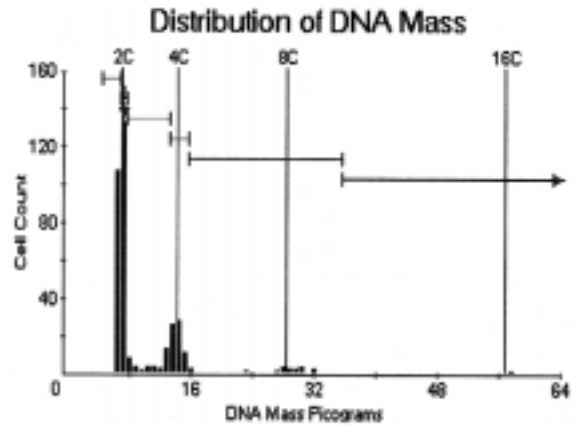
Τα αποτελέσματα της τεχνικής FISH και της πλοειδίας του DNA και τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των περιπτώσεων των καρκινωμάτων μαστού καταχωρήθηκαν σε στατιστικό πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή (Statistica for Windows, StatSoft, Tulsa, USA) και ακολούθησε στατιστική ανάλυση με τη χρήση των δοκιμασιών Fisher exact test και t-test. Κάθε τιμή στατιστικού σφάλματος (P) ίση ή μικρότερη από 0,05 θεωρήθηκε σημαντική.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

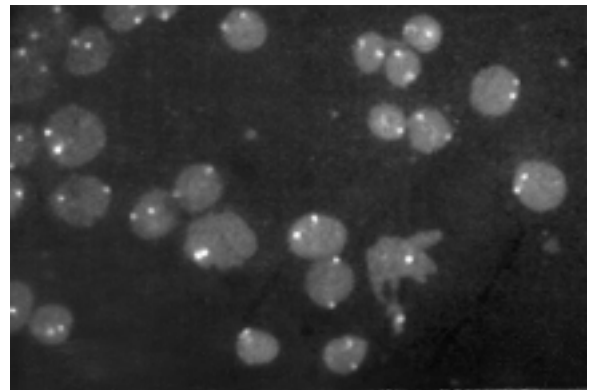
Τα δετικά σήματα υβριδισμού των κεντρομεριδιακών δεικτών DNA ήταν ευκρινή και εύκολα μετρήσιμα και για τα δύο χρωματοσώματα που μελετήθηκαν. Από τις 29 περιπτώσεις καρκινωμάτων που μελετήθηκαν οι 24 (82,7%) παρουσίαζαν ανευσωμία στο χρωμόσωμα 1 με κυρίαρχες διαταραχές την τρισωμία (52%), τετρασωμία (43%) και μονοσωμία (4%). Στο χρωμόσωμα 7 παρατηρήθηκε ανευσωμία επίσης σε 24 περιπτώσεις με κυρίαρχες διαταραχές τρισωμία (53%), τετρασωμία (26%), πεντασωμία (16%) και μονοσωμία (5%). Ο προσδιορισμός της πλοειδίας στα παραπάνω καρκινώματα έδειξε 24 περιπτώσεις με ανευπλοειδία DNA (82,7%) (Εικόνες 1 και 2).

Η σύγκριση μεταξύ πλοειδίας του DNA και χρωματοσωματικών διαταραχών (Πίνακας 1) έδειξε σημαντική σχέση μεταξύ ανευπλοειδίας και ταυτόχρονης ανευσωμίας των χρωματοσωμάτων 1 και 7 ($P=0,0007$). Παρόμοια σχέση παρατηρήθηκε και για το χρωμόσωμα 1 μεμονωμένα ($P=0,001$) και σε μικρότερο βαθμό για το χρωμόσωμα 7 ($P=0,02$).

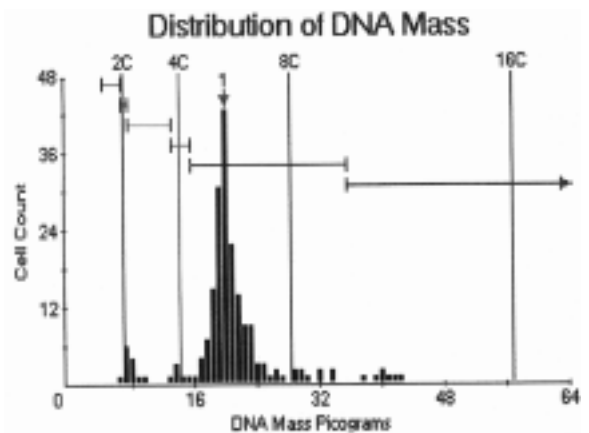
Η συσχέτιση των χρωματοσωματικών διατα-



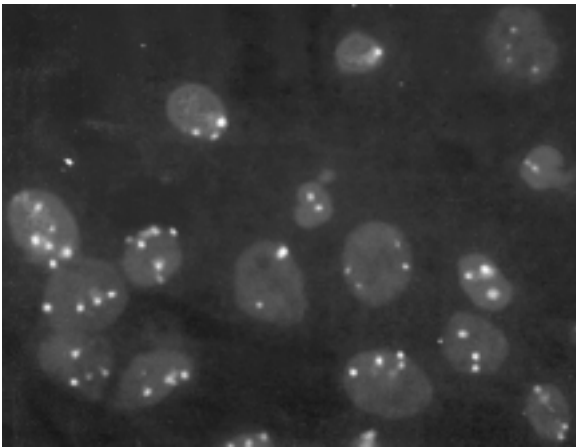
Εικόνα 1α. Ιστογράμμα DNA καρκινώματος μαστού με διπλοειδές DNA.



Εικόνα 16. Εφαρμογή τεχνικής FISH με κεντρομεριδιακό δείκτη DNA έναντι του χρωματοσώματος I σε επίχρισμα κυττάρων από την ίδια περίπτωση. Όλα σχεδόν τα καρκινωματώδη κύτταρα παρουσιάζουν δισωμία (FITC/PI, X 60).



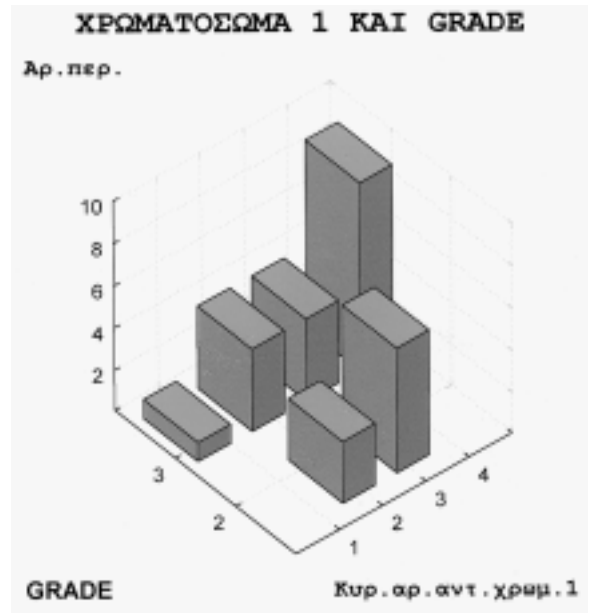
Εικόνα 2α. Ιστογράμμα DNA καρκινώματος μαστού με υπερτετραπλοειδή ανευπλοειδία DNA.



Εικόνα 26. Εφαρμογή τεχνικής FISH με κεντρομεριδιακό δείκτη DNA έναντι του χρωματοσώματος 7 σε επίχρισμα κυττάρων. Τα καρκινωμάτωση κύτταρα είναι ανευσωμικά και παρουσιάζουν 3-6 αντίγραφα του χρωματοσώματος 7 (FITC/PI, X 60).

στατιστικής σημαντικότητας ($P=0,20$)

Η υψηλού βαθμού πολυσωμία χρωματοσωμάτων 1 και 7 σχετιζόταν σημαντικά με καρκινώματα βαθμού κακοηθείας 3 (Εικόνα 3α και 3β). Ειδικότερα, στα καρκινώματα βαθμού κακοηθείας 2 δεν παρατηρήθηκε περίπτωση με κυρίαρχη αριθμητική ανωμαλία μεγαλύτερη από



Εικόνα 3α. Γραφική απεικόνιση σχέσης μεταξύ πολυσωμίας του χρωματοσώματος 1 και βαθμού κακοηθείας. Η έκταση της ανευσωμίας είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα καρκινώματα βαθμού κακοηθείας 3 ($P=0,03$).

ρακών με τις μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες (Πίνακας 2) έδειξε ότι η παρουσία ταυτόχρονων αριθμητικών ανωμαλιών σε αμφότερα τα χρωματοσώματα ή στο χρωματόσωμα 1 μεμονωμένα σχετιζόταν με σημαντικά μεγαλύτερη πιθανότητα μεταστάσεων ($P=0,02$ και $0,05$ αντίστοιχα). Όσον αφορά την πλοειδία του DNA, σε 5 διπλοειδείς όγκους οι 2 (40%) παρουσίαζαν μεταστάσεις, ενώ στους 24 ανευπλοειδείς όγκους οι 17 (71%) παρουσίαζαν μεταστάσεις στους μασχαλιαίους λεμφαδένες, αλλά η διαφορά δεν έφτασε στα όρια της

Πίνακας 1. Συσχέτιση μεταξύ πλοειδίας DNA και αποτελεσμάτων χρωματοσωματικής ανάλυσης καρκινωμάτων μαστού (Fisher exact test).

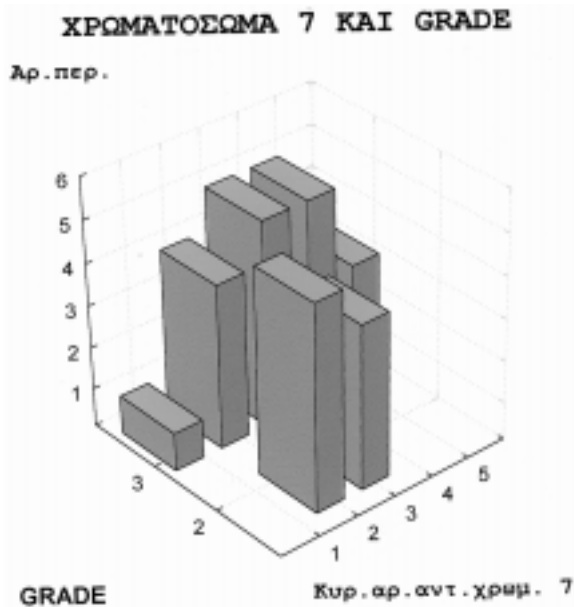
Τύπος DNA	Σύν. Περιπ.	Δισωμία			Ανευσωμία		
		Χρ1	Χρ7	Χρ1/7	Χρ1	Χρ7	Χρ1/7
Διπλοειδία	5	4	3	5	1	2	0
Ανευπλοειδία	24	1	2	2	23	22	22

$P=0,001$ (Χρωματόσωμα 1), $P=0,02$ (Χρωματόσωμα 7), $P=0,0001$ (Χρωματόσωμα 1/7)

Πίνακας 2. Συσχέτιση μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και αποτελεσμάτων χρωματοσωματικής ανάλυσης καρκινωμάτων μαστού (Fisher exact test).

Λεμφαδένες	Σύν. Περιπ.	Δισωμία			Ανευσωμία		
		Χρ1	Χρ7	Χρ1/7	Χρ1	Χρ7	Χρ1/7
+	8	3	2	4	5	6	4
-	18	1	2	2	17	16	16

$P=0,05$ (Χρωματόσωμα 1), $P=0,30$ (Χρωματόσωμα 7), $P=0,03$ (Χρωματόσωμα 1/7)



Εικόνα 36. Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ πολυσωμίας του χρωματοσώματος 7 και του βαθμού κακοηθείας. Παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερη έκταση της ανευσωμίας σε καρκινώματα βαθμού κακοηθείας 3 ($P=0,05$).

3 ($P=0,03$ και $0,05$ αντίστοιχα). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική σχέση μεταξύ χρωματοσωματικών ανωμαλιών και υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης καθώς και ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης p53.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διαδικασία της καρκινογένεσης σχετίζεται με ορισμένες γονιδιακές και χρωματοσωματικές ανωμαλίες, οι οποίες εξελίσσονται παράλληλα με την αυξανόμενη ανευπλοειδία του DNA και το βαθμό κακοηθείας². Οι ανωμαλίες αυτές περιλαμβάνουν ειδικές γονιδιακές αυξήσεις ή απώλειες καθώς και χρωματοσωματικές, δομικές και αριθμητικές, διαταραχές. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα χρωματοσώματα 1, 3, 5, 6, 7, 11, 16 και 17 παρουσιάζουν μη τυχαίες αλλοιώσεις στο καρκίνωμα μαστού¹⁰⁻¹⁴. Ειδικότερα το χρωματόσωμα 1 παρουσιάζει αλλοιώσεις συχνότερα από κάθε άλλο χρωματόσωμα, δεδομένου ότι το 80% περίπου των καρκινωμάτων μαστού εμφανίζει διαταραχές σ' αυτό^{6,15}, ποσοστό συγκρίσιμο με αυτό που βρέθηκε στη μελέτη μας. Οι διαταραχές του χρωματοσώματος 1 αποτελούν πρώιμο γεγονός στη διαδικασία καρκινογένεσης στο μαστό δεδομέ-

νου ότι σχετίζονται με το ενδοπορικό (in situ) καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοηθείας^{15,16}. Ειδικότερα, οι ανωμαλίες του χρωματοσώματος 1 αφορούν πολυσωμία, υπεράριθμο 1q, απώλειες στο 1p καθώς και αναδιατάξεις με τα άλλα χρωματοσώματα^{15,17}. Όσον αφορά το χρωματόσωμα 7, έχει επίσης περιγραφεί η παρουσία πολλαπλών αντιγράφων, στις λίγες μελέτες που αναφέρονται σ' αυτό^{11,12}.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής δείχνουν ότι η ανευσωμία του χρωματοσώματος 1 καθώς και η ταυτόχρονη ανευσωμία των χρωματοσωμάτων 1 και 7 σχετίζονται σημαντικά με αυξημένη πιθανότητα μεταστάσεων στους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Σε ορισμένες δημοσιεύσεις έχει αναφερθεί παρόμοια σχέση μεταξύ αυξημένης πιθανότητας λεμφαδενικών μεταστάσεων και ανευσωμίας των χρωματοσωμάτων 1 και 7¹² ή ανευσωμίας μόνο του χρωματοσώματος 7^{11,18}. Αντίθετα σε άλλες μελέτες καρκινωμάτων μαστού που αναφέρονται στο χρωματόσωμα 1 δεν βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ αριθμητικών ανωμαλιών και λεμφαδενικών μεταστάσεων^{6,19}.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατηρηθείσα σημαντική σχέση μεταξύ βαθμού πολυσωμικών διαταραχών και βαθμού κακοηθείας. Ειδικότερα, ο κυρίαρχος αριθμός αντιγράφων των χρωματοσωμάτων 1 και 7 ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε όγκους βαθμού κακοηθείας 3 σε σχέση με όγκους βαθμού 2. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και από άλλους ερευνητές τόσο για το χρωματόσωμα 1¹⁹, όσο και για το χρωματόσωμα 7¹¹. Το εύρημα αυτό συμβαδίζει με την αυξημένη αστάθεια του γονιδιώματος που παρατηρείται συχνότερα στους όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας.

Στη μελέτη μας, η ταυτόχρονη εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης αριθμητικών ανωμαλιών των χρωματοσωμάτων 1 και 7 και πλοειδίας του ολικού κυτταρικού DNA έδειξε σημαντική σχέση των ευρημάτων των τεχνικών αυτών.

Η σχέση αυτή ήταν ακόμη μεγαλύτερη όταν συνυπελογίζετο η ανευσωμία αμφοτέρων των χρωματοσωμάτων. Παρόμοια σημαντική σχέση μεταξύ ανευπλοειδίας και αριθμητικών ανωμαλιών στο χρωματόσωμα 1 έχει περιγραφεί και από άλλους ερευνητές σε καρκινώματα μαστού^{19,20}. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στην ομάδα των διπλοειδών όγκων βρέθηκε μία περίπτωση με ανευσωμία στο χρωματόσωμα 1 και δύο περιπτώσεις με ανευσωμία στο χρωματόσωμα 7. Το εύρημα αυτό θα μπορούσε να

ερμηνευθεί από το γεγονός ότι για να γίνει ανιχνεύσιμη μία μεταβολή του DNA με το σύστημα ανάλυσης εικόνας πρέπει να αφορά το 4% τουλάχιστον της μάζας του κυτταρικού DNA, δηλαδή 2-3 χρωματοσώματα^{21,22}. Οι μεμονωμένες μεταβολές, ιδιαίτερα των μικρού μεγέθους χρωματοσωμάτων ή αντιρροπούμενες απώλειες και αυξήσεις διαφορετικών χρωματοσωμάτων χωρίς συνολική μεταβολή της μάζας του DNA, είναι δύσκολο να εντοπισθούν με κυτταροφωτομετρικά συστήματα ανάλυσης του ολικού κυτταρικού DNA.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα μας, παρ' όλο που βασίζονται σε σχετικά μικρό αριθμό περιπτώσεων, δείχνουν ότι η ανευσωμία των χρωματοσωμάτων 1 και 7 φαίνεται να σχετίζεται σημαντικά με επιδετική βιολογική συμπεριφορά στο καρκίνωμα του μαστού. Επιπροσθέτως, η μελέτη των χρωματοσωμάτων 1 και 7 με την τεχνική FISH αποτελεί πλέον ευαίσθητο δείκτη διαταραχής του γονιδιώματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αξιόπιστη και οικονομική εναλλακτική λύση για την πρόιμη εκτίμηση διαταραχών του κυτταρικού DNA.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Boveri T. Zur frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena: Fisher, 1914.
2. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells. Wiley & Sons Pb. New York 1995.
3. Kapranos N, Kontogeorgos G, Frangia K, Kokka E. Effect of fixation on interphase cytogenetic analysis by direct fluorescence in situ hybridization on cell imprints. *Biotech Histochem* 72:148-151, 1997.
4. Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. *Path Res Pract* 186:37-62, 1990
5. Herrington CS, Leek RD, and McGee J.O'D. Correlation of numerical chromosome 11 and 17 imbalance with metastasis of primary breast cancer to lymph nodes. *J Pathol* 176:353-359, 1995.
6. Ichikawa D, Hashimoto N, Hoshima M, Yamaguchi T, Sawai K, Nakamura Y, Takahashi T, Abe T, Inazawa J. Analysis of numerical aberrations of specific chromosomes by fluorescent in situ hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. *Cancer* 77:2064-2069, 1996.
7. McManus DT, Patterson AH, Maxwell P, Hamilton PW, Anderson NH, Caughley LM, Toner PG. Interphase cytogenetics of chromosomes 11 and 17 in fine needle aspirates of breast cancer *Hum Pathol* 30:137-144, 1999
8. Pinto AE, Saudade A, Soares. Short term significance of DNA ploidy and cell proliferation in breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic markers in a series of 308 patients. *J Clin Pathol* 52:604-611, 1999
9. Trent JM. Cytogenetic and molecular biologic alteration in human breast cancer: a review. *Breast Cancer Res Treat* 5:221-229, 1985.
10. Anamthawat-Johnson K, Eyfjord JE, Ogmundsdottir HM, Petursdottir I, Steinarsdottir M. Instability of chromosomes 1, 3, 16 and 17 in primary breast carcinomas inferred by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogen* 88:1-7, 1996.
11. Persons DL, Robinson RA, Hsu PH, Seelig SA, Borel TJ, Hartmann LC, Jenkins RB. Chromosome-specific aneusomy in carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 2:883-888, 1996.
12. Adeyinka A, Mertens F, Idvall I, Bondeson L, Pandis N. Multiple polysomies in breast carcinomas: preferential gain of chromosomes 1, 5, 6, 7, 12, 16, 17, 18, and 19. *Cancer Genet Cytogen* 111:144-148, 1999.
13. Mendelin J, McComma G, Wallis T, and Visscher DW. Analysis of chromosome aneuploidy in breast carcinoma progression by using fluorescent in situ hybridization. *Lab Invest* 79:387-393, 1999.
14. Mialche A, Louis J, Cassaneli S, and Seignerin D. Chromosome 11 aneuploidy detected by fluorescent in situ hybridization (FISH) in breast cancer: relation with progesterone receptor expression. *Cytopathol* 10:79-86, 1999.
15. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Peterson C, Bardi G, Idvall I, et al. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromos Cancer* 12:173-185, 1995.
16. Harrison M, Magee HM, O' Loughlin J, Corey TF, and Dervan PA. Chromosome 1 aneusomy, identified by interphase cytogenetics, in mammographically detected ductal breast carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 175:303-309, 1995.
17. Steinarsdottir M, Petursdottir I, Snorradottir S, Eyfjord JE and Omundsdottir HM. Cytogenetic study of breast carcinomas: different karyotypic profiles detected by direct harvesting and short-term culture. *Genes Chrom Cancer* 13:239-248, 1995.
18. Hirata K, Tagawa Y, Kashima K, Kidogawa H, Deguchi M, Tsuji T, Ayabe H. Frequency of chromosome 7 gain in human breast cancer cells: correlation with the number of metastatic lymph nodes and prognosis. *Tohoku J Exp Med* 184:85-97, 1998.
19. Faraboli F, Ceccarelli C, Santini D, Trere D,

- Baldini N, Taffurelli M, Derenzini M. Chromosome 1 aneusomy with 1p36 under-representation is related to histologic grade, DNA aneuploidy, high c-erb B-2 and loss of bcl-2 expression in ductal breast carcinoma. *Int J Cancer* 1996 69:381-385, 1996.
20. Harrison MM, Magee HM, O'Loughlin JF, Gorey TF, Coyne JD. Comparison of chromosome 1 aneusomy detected by interphase cytogenetics and DNA ploidy in carcinoma of the breast. *Histopathol* 30:221-226, 1997
21. Vindelov LL, Christensen IJ, Jensen G, Nissen NI. Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, staining and internal standardization. *Cytometry* 3:332-339, 1983.
22. Persons DL, Takai K, Gibney DJ, Katzman JA, Lieber MM and Jenkins RB. Comparison of fluorescence in situ hybridization with flow cytometry and static image analysis in ploidy analysis of paraffin-embedded prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol* 25:678-683, 1994.