



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ
ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

ΕΥΡΥΔΙΚΗ ΜΠΟΥΚΑΚΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΑΣΤΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΥΛΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΚΤΙΝΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Επιβλέπουσα
Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.
Θ. Θεοφανίδης, Ομότιμος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Αναστασοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., Επιβλέπουσα
Μ. Κουή, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.
Δ. Ντούλια, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.
Δ. Υφαντής, Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Θ. Θεοφανίδης, Ομότιμος Καθηγητής Ε.Μ.Π.
Ν. Παπαϊωάννου, Αν.Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.
Ν. Ψαρουδάκης, Επ. Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Η διατριβή εγκρίθηκε την 26^η Ιουνίου 2012.

Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, αρ.202).

Ευχαριστώ την Ιατρό, Δρ. Π. Αραπαντώνη-Δαδιώτη, Δ/ντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά» για την διάθεση των δειγμάτων από καρκινικούς ιστούς μαστού και την άψογη συνεργασία κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής. Επίσης ευχαριστώ τον Ιατρό, Δρ. Χ. Βαλαβάνη, Επιμελητή Β' του ίδιου Εργαστηρίου για την βοήθειά του και τις παρατηρήσεις για την επιτυχία της έκβασης της έρευνας.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω προς τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου της Ανκόνα, Ιταλία, G. Tosi και την ομάδα του, για την διάθεση του εργαστηρίου του για την λήψη και επεξεργασία των χαρτογραφημένων υπέρυθρων φασμάτων των καρκινικών ιστών, δεδομένου ότι το Ε.Μ.Πολυτεχνείο δεν διαθέτει την ανάλογη συσκευή.

Ευχαριστώ τον Ομ. Καθηγητή Θ. Θεοφανίδη για τις εύστοχες παρατηρήσεις για την, κατά το δυνατόν, αριστοποίηση της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τις τεχνολόγους του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιώς «Μεταξά» για την βοήθεια και εκπαίδευση της τεχνικής επεξεργασίας των καρκινικών ιστών του μαστού.

Για την συμπαράσταση και βοήθεια που μου παρείχαν στην τελική εμφάνιση και βελτίωση της διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την. Β. Δρίτσα, Δρ. Χημικό και την Κ. Πισσαρίδη, Δρ. Χημ. Μηχανικό.

Ευχαριστώ τέλος την επιβλέπουσα καθ. Ι. Αναστασοπούλου για την ανάθεση του θέματος και την συνεργασία μας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα για την επιβίωση του γυναικείου πληθυσμού. Η θεραπευτική αντιμετώπιση της νόσου εξαρτάται από την έγκαιρη διάγνωση. Δυστυχώς οι περισσότερες γυναίκες επισκέπτονται τον γιατρό όταν βρίσκονται στα στάδια I και II. Υπολογίζεται ότι στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 4.500 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού το χρόνο, ενώ υπολογίζεται ότι **1 στις 8 γυναίκες παγκοσμίως θα παρουσιάσει καρκίνο μαστού σε κάποια φάση της ζωής της** [1].

Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία προτείνει μηνιαίο αυτοέλεγχο για τον καρκίνο του μαστού και ετήσια μαστογραφία μετά την ηλικία των 40. Στον μαστογραφικό έλεγχο του πληθυσμού 5-30% των καρκίνων του μαστού έχει λανθασμένα αρνητικό αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ ποσοστό περί το 80% δείχνει λανθασμένα αρνητικό και επιβάλλεται περαιτέρω έλεγχος.

Για την ανίχνευση των καρκίνων του μαστού η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος σήμερα είναι μαστογραφία. Η περιορισμένη ευαισθησία όμως της μαστογραφίας σημαίνει ότι ορισμένες μορφές καρκίνου είναι δύσκολο ή αδύνατο να ανιχνευθούν έως ότου ο όγκος είναι μεγάλος. Άλλες μέθοδοι είναι ο υπέρηχος, η μαγνητική τομογραφία (MR), η αξονική τομογραφία (CT) και η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου (PET). Επίσης όλες έχουν κάποιους περιορισμούς και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για έλεγχο πληθυσμού (screening). Ιδιαίτερα, τόσο η μαγνητική όσο και η αξονική τομογραφία είναι αρκετά δαπανηρές, αλλά και αποφεύγονται σε κλειστοφοβικά άτομα. Οι άλλες απαιτούν έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία. [2]. Μορφές οπτικής απεικόνισης στο εγγύς υπέρυθρο (NIR) θα μπορούσαν να προσφέρουν εναλλακτική μορφή απεικόνισης χρησιμοποιώντας κυρίως μήκη κύματος, ειδικά μεταξύ 700 και 1000 nm, στο NIR φάσμα, αλλά λόγω της χαμηλής απορροφητικότητας από τους ιστούς δεν μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν *in vivo* [3].

Η λάθος διάγνωση εξαρτάται και από την ηλικία της γυναίκας γι' αυτό για την έγκαιρη διάγνωση χρειάζεται να αναπτυχθεί μία μέθοδος που το αποτέλεσμά της να μην εξαρτάται από το βάρος και την ηλικία της γυναίκας, να είναι ταχύτερη και κυρίως να εμφανίζει επαναληψιμότητα. Κάθε μία όμως από αυτές τις παραπάνω μεθόδους ανιχνεύει την ασθένεια, αλλά καμμία δεν μπορεί να απαντήσει σχετικά με τις μεταβολές σε μοριακό επίπεδο που προκαλούνται λόγω της ασθένειας.

Για τον σκοπό αυτό στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μικρο-υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (micro-Fourier Transform Infrared, micro-FT-IR). Η FT-IR είναι μη καταστρεπτική μέθοδος και προσφέρεται για την μελέτη της δομής πολύπλοκων συστημάτων σε μοριακό επίπεδο, όπως τα βιολογικά μόρια και οι βιολογικοί ιστοί γιατί στηρίζεται στην μελέτη χαρακτηριστικών ομάδων των βιολογικών μορίων, όπως NH, DNA [4-10].

Τα τελευταία χρόνια η FT-IR φασματοσκοπία άρχισε να χρησιμοποιείται ευρύτατα για την μελέτη των βιολογικών συστημάτων και ασθενειών, επειδή μπορεί να καταγράψει τις μεταβολές που προκαλεί η επικείμενη νόσος [4-6].

Έτσι η FT- IR φασματοσκοπία παρέχει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες των πρωτεϊνών, όπως π.χ. ο πεπτιδικός δεσμός, των λιπιδίων, των νουκλεϊκών οξέων, κλπ., οι οποίες αποτελούν τα «δακτυλικά αποτυπώματα». Επιπλέον παρέχει πληροφορίες σχετικά με παθολογικές χημικές αλλοιώσεις τόσο σε ιστούς όσο και σε υγρά του σώματος που μπορούν να οφείλονται σε λοιμώξεις παθογόνων μικροοργανισμών ή να αφορούν άλλες παθολογικές καταστάσεις [11]

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιείται η Micro-FT- IR φασματοσκοπία για την μελέτη των μεταβολών που προκαλούν τα είδη και στάδια του καρκίνου του μαστού στην διαμόρφωση των ιστών. Η μέθοδος επιτρέπει την σημειακή λήψη πολλαπλών φασμάτων σε όλη την έκταση του ιστού και στις διεπιφάνειες, ενώ το δείγμα δεν υφίσταται καμμία ιδιαίτερη κατεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1.1. ΜΑΣΤΟΣ	8
1.1.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ.....	8
1.1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ	9
1.1.3. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ.....	11
1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	11
1.2.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	11
1.2.2. ΟΓΚΟΙ ΜΑΣΤΟΥ	12
1.2.2.1. ΠΟΡΟΓΕΝΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ <i>in situ</i> (DCIS).....	13
1.2.2.2. ΛΟΒΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ <i>in situ</i> (Lobular carcinoma <i>in situ</i> LCIS)	14
1.2.2.3. ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	14
1.2.2.4. Πορογενές καρκίνωμα , μη ειδικού τύπου (NOS).....	15
1.2.2.5. Μυελοειδές καρκίνωμα.....	16
1.2.2.6. Βλεννώδες καρκίνωμα	17
1.2.2.7. Δηθητικό λοβιακό καρκίνωμα	18
1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ.....	19
1.3.1. ΔΙΑΓΝΩΣΗ - SCREENING.....	19
1.3.2. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ.....	19
1.3.3. ΠΡΟΓΝΩΣΗ	21
1.4. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ	22
1.4.1. ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	22
1.5. ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ	24
1.5.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ	24
1.5.2. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων	24
1.6. Φασματοφωτομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT- IR	27
1.7. ΜΙΚΡΟ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR ΜΙΚΡΟ- ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ).....	28
1.8. ΠΗΓΕΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΦΩΤΟΣ ΣΥΓΧΡΟΤΡΟΝ (SYNCHROTRON)	28
1.9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΔΟΝΗΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ- ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ	31
1.9.1. Ερμηνεία φασμάτων	31
1.9.2. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας υπερύθρου στην ιατρική- βιολογία.	32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	33
2.1. Προετοιμασία Δείγματος.....	33

2.2. Micro FT-IR φάσματα.....	34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
3.1. Υπέρυθρα φάσματα λοβιακού καρκίνου	38
3.1.1. Grade III (δείγματος 1)	38
3.2. micro-FT-IR φάσματα <i>in situ</i> λοβιακού καρκίνου Grade III (δείγματος 2)	48
3.3. micro-FT-IR φάσματα λοβιακού καρκίνου μαστού Grade II(δείγματος 3)	49
3.4. Micro-FT-IR πορογενούς καρκίνου.....	51
3.5. Micro-FT-IR πορογενούς <i>in situ</i> καρκίνου (δείγματος 9)	54
3.6. Σύγκριση micro FT-IR φασμάτων διαφορετικών Grade	55
3.7. Micro-FT-IR Αδενοκαρκινώματος (δείγματος 6).....	57
3.8. Micro-FT-IR φάσματα οστεοσαρκώματος (δείγματος 7).....	58
3.9. Micro-FT-IR φάσματα πορογενούς <i>in situ</i> καρκίνου (δείγματος 12).....	62
3.10. micro-FT-IR φάσματα πορογενούς καρκίνου μαστού Grade III (δείγματος 13)	66
3.11. II/III Διηθητό αδενοκαρκίνωμα Grade I και Grade III (δείγματος 15)	68
3.11.1. Grade II.....	68
3.11.2. Grade III.....	70
3.12. Άτυπο μυελοειδές III (δείγματος 8).....	72
3.13. Micro-FT-IR φάσματα πορογενούς <i>in situ</i> καρκίνου Grade III.	76
3.14. Micro FT-IR φάσματα δείγματος λοβιακού <i>in situ</i> καρκίνου (δείγματος 5)....	80
3.15. Σύγκριση των φασμάτων διαφόρων καρκινικών ιστών.....	83
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	91
ABSTRACT.....	93
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	95
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΜΑΣΤΟΣ

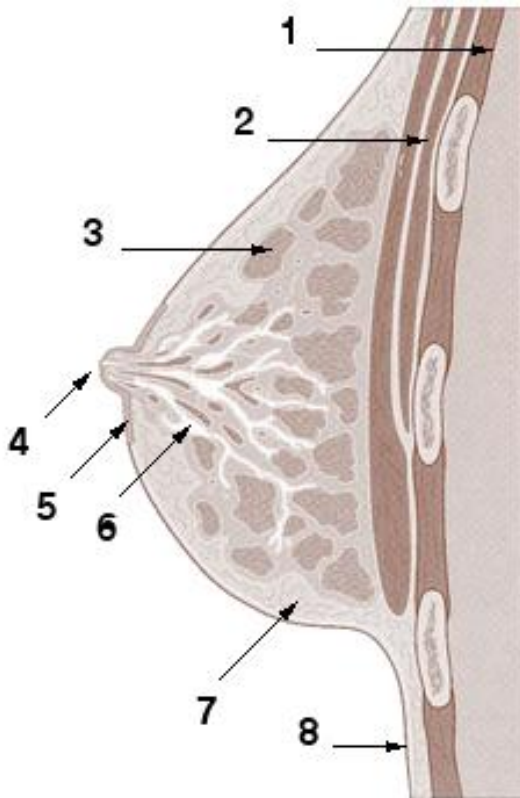
1.1.1. ANATOMIA

Ο φυσιολογικός γυναικείος μαστός έχει διάμετρο 10-12 cm και μπορεί να ζυγίζει σε μη γαλακτοπαραγωγική φάση από 50 gr έως και 400 gr. Κατά την διάρκεια του θηλασμού το βάρος του μπορεί να ξεπεράσει τα 400 gr [12]. Η εξωτερική μορφολογία του μαστού περιλαμβάνει την θηλή την θηλαία άλω και τον μαστικό αδένα. Η θηλή αποτελεί έπαρμα του δέρματος του μαστού που βρίσκεται λίγο πιο κάτω και έξω από το μέσο του μαστού. Στην κορυφή της υπάρχουν 15-20 στόμια όπου καταλήγουν οι γαλακτοφόροι πόροι. Το καστανέρυθρο χρώμα της θηλής οφείλεται στην άφθονη παρουσία μελανίνης. Η θηλαία άλως αποτελεί υποστρόγγυλη και ελαφρά επηρμένη περιοχή γύρω από την θηλή με διάμετρο 1,5-6 cm [13].

Ο μαστικός αδένας βρίσκεται πίσω από την θηλαία άλω και τα τρία τέταρτα του βρίσκονται στο πρόσθιο θωρακικό μυ, ενώ αποτελείται κατά κύριο λόγο από λιπώδη ιστό, στρωματικά υποστηρικτικά στοιχεία και αδενικά επιθήλια. Το σχήμα και το περίγραμμά του δημιουργείται από πυκνές ταινίες συνδετικού ιστού που ονομάζονται σύνδεσμοι του Cooper (Couper's ligaments) [14]. Ο μαστικός αδένας αποτελείται από τους λοβούς όπου παράγεται το γάλα και τους γαλακτοφόρους πόρους που μεταφέρουν το γάλα στους γαλακτοφόρους κόλπους.

Ο μαστός περιλαμβάνει 15-25 γαλακτοφόρους πόρους οι οποίοι ξεκινούν από την θηλή, διακλαδίζονται σε μικρότερους πόρους και καταλήγουν στους λοβούς. Ο κάθε λοβός αποτελείται από έναν τελικό πόρο και πολλούς μικρούς πόρους (λόβια). Οι μεγάλοι και οι μικροί πόροι καλύπτονται εσωτερικά από μία στιβάδα κυβοειδών και κυλινδρικών κυττάρων και εξωτερικά από μία στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων.

Ο συνδετικός ιστός μέσα στο λοβό συνίσταται από ινοβλάστες μέσα σε ένα υπόστρωμα όξινης βλέννης και κολλαγόνου με ιστοκύτταρα και περιστασιακά με λεμφοκύτταρα. Το στρώμα ανάμεσα στα λόβια είναι υποκυτταρικό και συντίθεται από ινολιπώδη ιστό [15].



Εικόνα 1 Ανατομία φυσιολογικού γυναικείου μαστού. Τονίζονται τα ιδιαίτερα τμήματα τομής μαστού: 1. Μεσοπλεύριοι μύες 2. Θωρακικοί μύες 3. Λοβοί του μαστικού αδένα 4. Θηλή 5. Θηλαία άλως 6. Γαλακτοφόροι κόλποι 7. Περιμαστικό λίπος

1.1.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Στις γυναίκες, το μεγαλύτερο μέρος του γυναικείου μαστού αναπτύσσεται μετά τη γέννησή τους. Αντίθετα, στους άνδρες καμία περαιτέρω εξέλιξη των μαστών δεν λαμβάνει μέρος μετά τη γέννηση. Η αύξηση και η ανάπτυξη της διακλάδωσης των μαζικών αδένων γίνεται αργά κατά τη διάρκεια των προεφηβικών ετών. Οι μαζικοί αδένες αυξάνονται εντυπωσιακά στην εφηβεία με την περαιτέρω διακλάδωση των πόρων, την αύξηση του σχηματισμού των λοβίων, και το δραματικό πολλαπλασιασμό του στρώματος μεταξύ των πόρων. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό της μαστικής εκβλάστησης.

Στην εφηβεία, οι μαζικοί αδένες αναπτύσσονται γρήγορα, πρώτιστα λόγω του πολλαπλασιασμού του στρώματος και του συνδετικού ιστού γύρω από τους πόρους. Η αύξηση του συστήματος των πόρων εμφανίζεται μέσω της επιρροής των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, που εκκρίνονται από τις ωοθήκες κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Μόνο κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ο μαστός επιτυγχάνει την πλήρη δομική ωρίμανση και την πλήρη λειτουργική δραστηριότητα.

Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι ενδο-λοβιακοί πόροι αναπτύσσονται γρήγορα, διαμορφώνοντας τις εκβλαστήσεις που γίνονται φατνία, και αντιστρέφεται η αναλογία στρώμα/αδενικό ιστό. Μέχρι το τέλος της εγκυμοσύνης, ο μαστός αποτελείται σχεδόν εξ ολοκλήρου από αδενικές μονάδες που χωρίζονται από μικρές ποσότητες στρωματικού ιστού. Μετά τη γαλακτοφορία, επέρχεται ατροφία των λοβίων, στενεύουν οι δομές των πόρων, και ολόκληρος ο μαστός μικραίνει εμφανώς σε μέγεθος.

Η ανάπτυξη και η λειτουργία του μαστού ξεκινά από ποικίλα ορμονικά ερεθίσματα, των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, της προλακτίνης, της ωκυτοκίνης, της θυροξίνης, της κορτιζόλης, και της αυξητικής ορμόνης. Τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη, και η προλακτίνη είναι ουσιαστικά για τη φυσιολογική ανάπτυξη και τη λειτουργία του μαστού. Τα οιστρογόνα επιδρούν στην ανάπτυξη των πόρων, ενώ η προγεστερόνη είναι υπεύθυνη για τη διαφοροποίηση του επιθηλίου και για την ανάπτυξη των λοβίων. Η προλακτίνη είναι το αρχικό ορμονικό ερέθισμα για τη λακτογένεση στην εγκυμοσύνη και τη μετά τον τοκετό περίοδο. Ρυθμίζει τους ορμονικούς υποδοχείς και προάγει την επιθηλιακή ανάπτυξη. Η έκκριση των νευροτροφικών ορμονών από τον υποθάλαμο ρυθμίζει την έκκριση των ορμονών που επηρεάζουν τους ιστούς του μαστού. Η ωχρινοποιητική ορμόνη (LH) και η θυλακιοτρόπος (FSH) ρυθμίζουν την απελευθέρωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από τις ωοθήκες. Στη συνέχεια, η απελευθέρωση της LH και FSH από τα βασεόφιλα κύτταρα που βρίσκονται στη πρόσθια υπόφυση ρυθμίζεται από την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της γοναδοτροπίνης (gonadotropin-releasing hormone) (GnRH) από τον υποθάλαμο. Θετική και αρνητική ανάδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης ρυθμίζει την έκκριση των LH, FSH και GnRH.

Οι ορμόνες αυτές είναι αρμόδιες για την ανάπτυξη, τη λειτουργία και τη διατήρηση των ιστών του μαστού.

Στο θηλυκό νεογνό, τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται μετά από τη γέννηση και παραμένουν χαμηλά σε όλη τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας, λόγω του άξονα μεταβολισμού υποθαλάμου-υπόφυσης που δρα προς την μείωση (αρνητική ανάδραση, feedback). Με την αρχή της εφηβείας, αναστρέφεται η ανάδραση υποθαλάμου-υπόφυσης με αποτέλεσμα την αύξηση των οιστρογόνων και επομένως θετικό feedback. Η αύξηση που προκαλείται στην έκκριση GnRH, FSH και LH, οδηγεί στην αύξηση της έκκρισης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης από τις ωοθήκες, και στην έναρξη της έμμηνης ρύσης. Στην αρχή της έμμηνης ρύσης, υπάρχει αύξηση στο μέγεθος και την πυκνότητα των μαστών, η οποία ακολουθείται από την αύξηση των ιστών του μαστού και

τον πολλαπλασιασμού του επιθηλίου. Με την αρχή της εμμηνόπαυσης, η αύξηση των μαστών υποχωρεί και ο πολλαπλασιασμός του επιθηλίου μειώνεται (16).

1.1.3. ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Οι περισσότερες αλλοιώσεις και παθήσεις του μαστού είναι καλοήθειες παρόλα αυτά δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στις κακοήθειες και συγκεκριμένα στον καρκίνο του μαστού. Οι πιο συχνές καλοήθειες αλλοιώσεις μπορούν να ταξινομηθούν σαν ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη του μαστού, φλεγμονώδεις αλλοιώσεις, ινοκυστικές αλλαγές, αλλοιώσεις των κυττάρων του στρώματος και στα νεοπλάσματα [17] ή αλλιώς σε μη νεοπλασματικές και καλοήθειες νεοπλασματικές αλλοιώσεις [18].

Στις μη νεοπλασματικές αλλοιώσεις περιλαμβάνονται παθήσεις όπως οι ινοκυστικές αλλαγές π.χ. οι δημιουργία κύστεων, η φλεγμονώδης διαστολή των αγωγών, και η επιθηλιακή υπερπλασία, ενώ στις καλοήθειες νεοπλασματικές παθήσεις περιλαμβάνονται το λίπωμα, το ινοαδένωμα, το αδένωμα, το αμάρτωμα (καλοήθης όγκος γνωστός και ως ινοαδενολίπωμα) κ.α. [17,18]. Λόγω του ότι ορισμένες καλοήθειες παθήσεις του μαστού μπορούν να οδηγήσουν σε κακοήθεια η κλινική τους εξέταση και παρακολούθηση κρίνεται κάτι παραπάνω από απαραίτητη.

1.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες στην βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Στην Ελλάδα υπολογίζεται ότι εμφανίζονται περίπου 4500 νέα περιστατικά το χρόνο [1].

Πολλοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού όσο και στην αξιολόγηση πιθανότητας εμφάνισής του με κυριότερο παράγοντα την ηλικία. Έχει βρεθεί ότι γυναίκες ηλικίας πάνω των 55 ετών έχουν 64% μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν την νόσο. Οι υπόλοιποι παράγοντες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 μεγάλες ομάδες [19]:

- *Οικογενειακό ιστορικό /γενετική προδιάθεση*

Γυναίκες με ιστορικό καρκίνου του μαστού στην οικογένειά τους έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Επιπλέον η ύπαρξη των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 σε μια οικογένεια σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση του καρκίνου αν και στον γενικό πληθυσμό η ύπαρξη αυτών των γονιδίων είναι σπάνια [20-21].

- *Αναπαραγωγικοί / Ορμονικοί*

Σε γενικές γραμμές η εμφάνιση της εμμηνόρροιας σε μικρή ηλικία και η μεγάλη ηλικία κατά την οποία η γυναίκα έχει την πρώτη της εγκυμοσύνη αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (22), ενώ αντίθετα η εμμηνόπαυση σε μικρή ηλικία έχει προστατευτικό ρόλο. Ειδικότερα όσο αφορά τις εγκυμοσύνες έχει βρεθεί ότι άτεκνες γυναίκες διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου από αυτές που έχουν τεκνοποιήσει [23].

Η παρατεταμένη χρήση αντισυλληπτικών καθώς και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) κυρίως με οιστρογόνα θεωρούνται ως παράγοντες αύξησης του κινδύνου εμφάνισης της νόσου [24].

- *Καλοήθειες παθήσεις του μαστού*

Έχει διαπιστωθεί ότι διάφορες καλοήθειες παθολογικές καταστάσεις του μαστού όπως η άτυπη πορώδη και λοβιακή υπερπλασία, εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου, ενώ τα ινοαδενώματα, οι κύστες, οι ινοεπιθηλιακές βλάβες και εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα. Μέθοδοι όπως η βιοψία δια λεπτής βελόνης και core biopsy βοηθούν τους κλινικούς ιατρούς στην διάγνωσή και στην περαιτέρω αντιμετώπιση της βλάβης [25-27]. Ορισμένες από αυτές τις περιπτώσεις χρειάζονται απλή παρακολούθηση, ενώ άλλες απαιτούν χειρουργική αντιμετώπιση.

- *Αξιολόγηση ευρημάτων μαστογραφίας.*

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι οι παρεγχυματικές περιοχές οι οποίες εμφανίζονται πιο σκούρες στην μαστογραφία μπορούν να αξιολογηθούν σαν μια αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου κάποια στιγμή αργότερα. Η μαστογραφία δεν θεωρείται προληπτική παρεμβατική μέθοδος αλλά μια διαγνωστική μέθοδος [28].

Επιπλέον υπάρχουν κάποιες μελέτες οι οποίες συσχετίζουν τις διαιτητικές επιλογές, την χρήση αλκοόλ καθώς και την παχυσαρκία με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (24), ενώ κάποιες άλλες λαμβάνουν υπόψη τους και τον τρόπο ζωής του ατόμου [29] όπως πχ την άσκηση.

1.2.2. ΟΓΚΟΙ ΜΑΣΤΟΥ

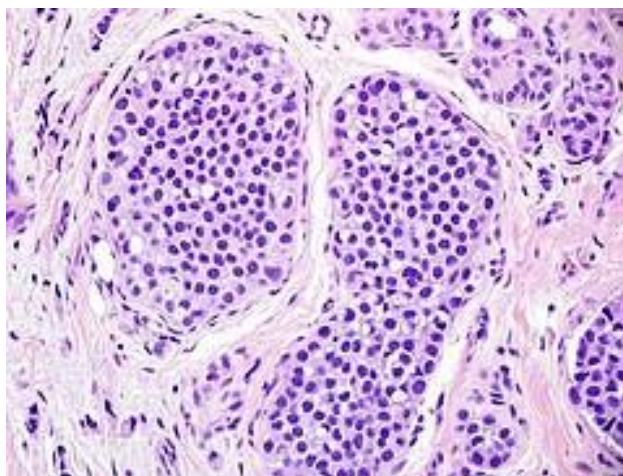
Η κατηγοριοποίηση και σταδιοποίηση των όγκων του μαστού έχει μεγάλη κλινική σημασία και για τον λόγο αυτό έχει δημιουργηθεί ένα παγκόσμιο σύστημα στο οποίο οι όγκοι εξετάζονται ανάλογα με την μορφολογία τους αλλά και με άλλα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα. Οι κυριότεροι κακοήθεις τύποι καρκίνου του μαστού μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες: στους *in situ* ή μη διηθητικούς τύπους και στους διηθητικούς τύπους. Ο *in situ*

καρκίνος ανάλογα με τα κυτταρικά του στοιχεία και τον τρόπο ανάπτυξης διακρίνεται σε πορογενές καρκίνωμα *in situ* (DCIS) και σε λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS) [30,31].

ΜΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.2.1. ΠΟΡΟΓΕΝΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ *in situ* (DCIS)

Συνήθως έχει μικρή νεοπλασματική ανάπτυξη και η ανίχνευσή του είναι τυχαία είτε σε εγχειρητικά παρασκευάσματα που αφαιρέθηκαν για άλλους λόγους ή σε τυχαίους μαστογραφικούς ελέγχους. Μικροσκοπικά το πορογενές καρκίνωμα εμφανίζεται όταν σε πόρους με ανέπαφη βασική μεμβράνη, υπάρχουν αρκετά επιθυλιακά κύτταρα με βασικά στοιχεία κακοήθειας: μεγάλα κύτταρα, πυρήνες με έλλειψη προσανατολισμού, αύξηση της πυρηνοπλασματικής σχέσης καθώς και αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας. Με την βοήθεια άλλων μικροσκοπικών γνωρισμάτων τα νεοπλάσματα αυτά μπορούν να καταταγούν σε διάφορους αρχιτεκτονικούς τύπους, όπως ο συμπαγής, ο φαγεσωρικός, ο ηθμοειδής και το θηλώδες. Χαρακτηριστικό των καρκινωμάτων *in situ* είναι η παρουσία νεοπλασματικών εστιών σε απόσταση περισσότερη των 50 χιλ. από την κύρια νεοπλασματική εστία, ή νεοπλάσματα *in situ* σε περισσότερα από ένα τεταρτημόρια του μαστού.



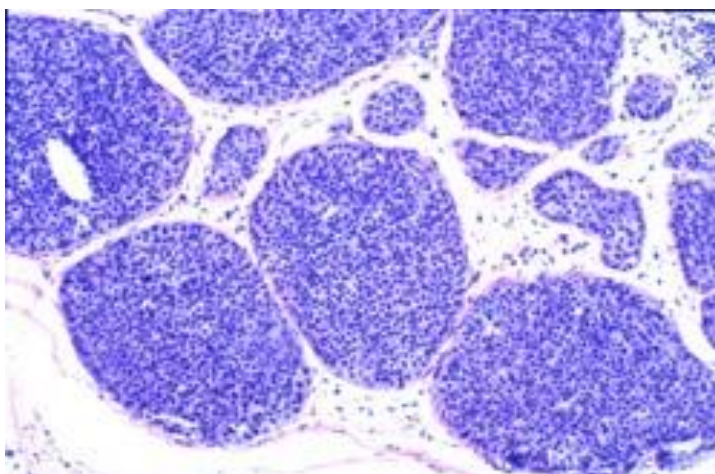
Εικόνα 2: Πορογενές καρκίνωμα *in situ*. Άτυπα κύτταρα γεμίζουν τους αγωγούς (32)

1.2.2.2. ΛΟΒΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ *in situ* (Lobular carcinoma *in situ* LCIS)

Προέρχονται από τις αδενοκυψέλες των λοβίων και αποτελούν σπάνια μορφή καρκινώματος *in situ*. Είναι σχεδόν πάντα πολυεστιακό και συχνά αμφοτερόπλευρο και αποτελεί τυχαίο μικροσκοπικό εύρημα. Στο λοβιακό καρκίνωμα *in situ* υπάρχει πλήρης απόφραξη των αδενοκυψελών από συμπαγείς μάζες νεοπλασματικών κυττάρων. Η αρχιτεκτονική των λοβίων δεν διαταράσσεται, ενώ τα κακοήθη κύτταρα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιομορφία : στρογγυλά κύτταρα, με ασαφή όρια και χωρίς συνοχή, πυκνοχρωματικοί πυρήνες, δυσδιάκριτοι πυρηνίσκοι και ελάχιστες μιτώσεις. Αναγνωρίζονται δύο τύποι λοβιακού καρκινώματος *in situ* βάση της μορφολογίας των πυρήνων.

- Τύπος Α: οι πυρήνες είναι μικροί, στρογγυλοί, ομοιόμοφοι με δυσδιάκριτους πυρηνίσκους.
- Τύπος Β: Οι πυρήνες είναι λίγο μεγαλύτεροι, πολύμορφοι και με ευδιάκριτους πυρηνίσκους.

Το λοβιακό καρκίνωμα έχει βραδύτερο ρυθμό εξέλιξης από εκείνον του πορογενούς αν και τα δύο αυτά καρκινώματα αποτελούν τύπους προδιηθητικής νεοπλασίας.



Εικόνα 3: Λοβιακό καρκίνωμα *in situ*. Όλοι οι λοβιακοί χώροι είναι γεμάτοι από καρκινικά κύτταρα [33].

1.2.2.3. ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

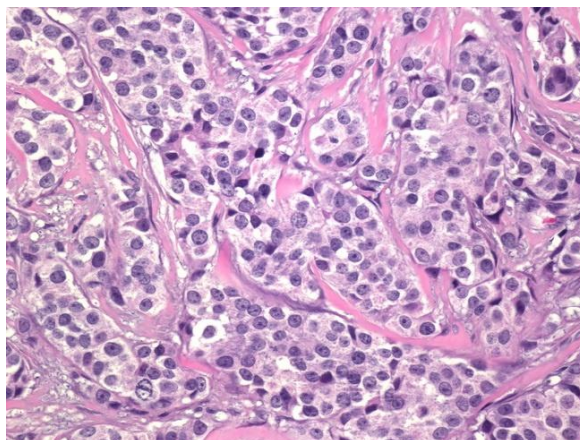
Τα διηθητικά καρκινώματα διαιρούνται σε πολλούς μικροσκοπικούς τύπους με κυριότερο το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Οι συνήθεις ιστολογικοί τύποι διηθητικών νεοπλασιών είναι οι εξής:

- Πορογενές καρκίνωμα , μη ειδικού τύπου (NOS)
- Μυελοειδές καρκίνωμα
- Βλεννώδες καρκίνωμα
- Λοβιακό καρκίνωμα

Υπάρχουν τουλάχιστον άλλοι 18 τύποι διηθητικών νεοπλασιών οι οποίοι είναι λιγότερο συχνοί ως και σπάνιοι.

1.2.2.4. Πορογενές καρκίνωμα , μη ειδικού τύπου (NOS)

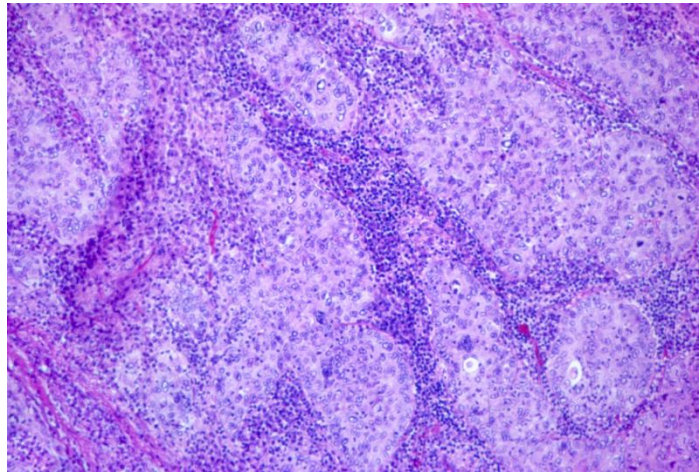
Είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος καρκίνου, στον οποίο ανήκουν όλα εκείνα τα καρκινώματα τα οποία δεν έχουν κοινά μικροσκοπικά χαρακτηριστικά. Κατά την μικροσκοπική εξέταση τα καρκινικά κύτταρα, διατάσσονται σε συμπαγείς βλάστες, δοκίδες και σε άτυπους αδενικούς σχηματισμούς μέσα σε πυκνό υπόστρωμα ινώδους συνδετικού ιστού. Ο βαθμός πολυμορφισμού των πυρήνων καθώς και η μιτωτική δραστηριότητα κατατάσσονται κατά Bloom και Richardson(1957)-τροποποίηση Nottingham (Elston και Ellis, 1991)- σε τρεις βαθμούς διαφοροποίησης: I έως III, υψηλού, μέσου και χαμηλού. Σύνηθης είναι και η παρουσία εναποθέσεων αλάτων ασβεστίου. Εκτός από την διήθηση του ινώδους υποστρώματος, ο όγκος έχει την τάση να διηθεί τα αιμο-λεμφοφόρα αγγεία, το περιμαστικό λίπος και σπάνια το μείζονα θωρακικό μυ. Λεμφαδενικές μεταστάσεις ανιχνεύονται σε ποσοστό 75%.



Εικόνα 4: Πορογενές καρκίνωμα, μη ειδικού τύπου grade II [34].

1.2.2.5. Μυελοειδές καρκίνωμα

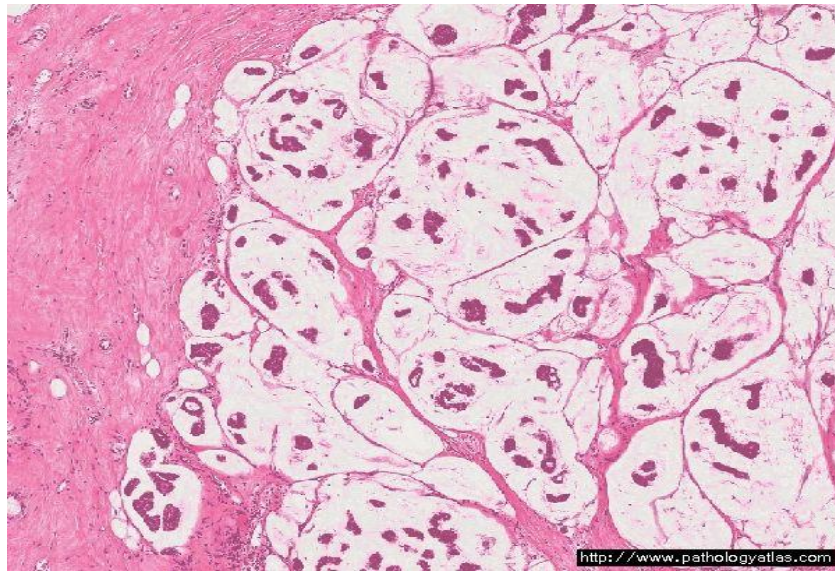
Αντιπροσωπεύει το 2 έως 5% όλων των καρκινωμάτων του μαστού. Το μυελοειδές καρκίνωμα είναι μαλακό όπως ο μυελός ή ο εγκέφαλος, δεδομένου ότι δεν περιέχει σκληρό κολλαγόνο. Ο όγκος έχει την τάση να παίρνει μεγάλες διαστάσεις με σαφές περίγραμμα και είναι ευκίνητος. Κατά την διατομή του όγκου παρατηρούνται νεκρωτικές και αιμορραγικές περιοχές. Τα μικροσκοπικά γνωρίσματα του τύπου αυτού είναι η μεγάλη κυτταροβρίθεια και το ελάχιστο υπόστρωμα ινώδους συνδετικού ιστού.



Εικόνα 5: Μυελοειδές καρκίνωμα. Τα λεμφοκύτταρα περιβάλλουν τις εστίες των καρκινικών κυττάρων. Μεγέθυνση 25x [35].

1.2.2.6. Βλεννώδες καρκίνωμα

Το βλεννώδες ή κολλοειδές καρκίνωμα εμφανίζεται συνήθως σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ η συχνότητα εμφάνισης του κυμαίνεται στο 2-5%. Ο όγκος είναι συνήθως μεγάλος και κατά την ψηλάφηση μπορεί να δώσει την εντύπωση κύστης. Κατά την μικροσκοπική εξέταση παρατηρούνται καρκινικά κύτταρα, μεμονωμένα ή κατά δοκίδες τα οποία είναι βυθισμένα σε λίμνες εξωκυττάριας βλέννης. Η διήθηση αιμοφόρων και λεμφοφόρων αγγείων είναι ανύπαρκτη.

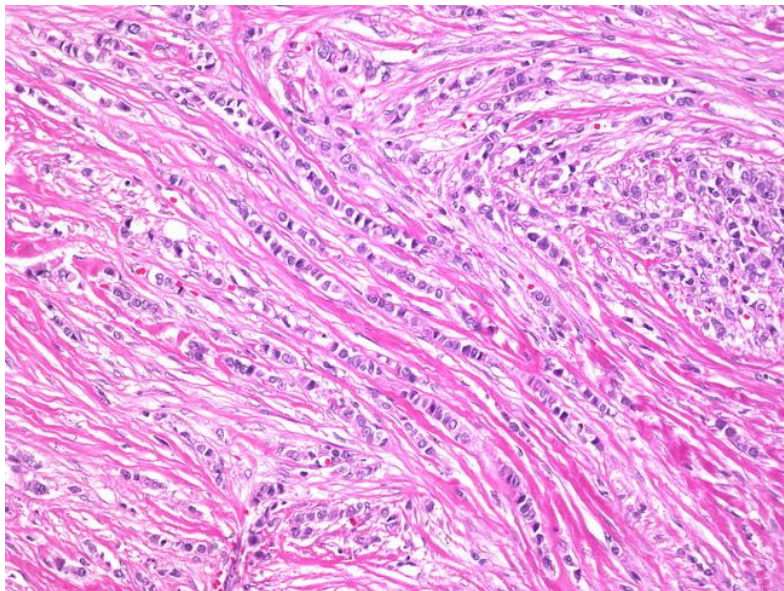


Εικόνα 6: Μικροσκοπική απεικόνιση βλεννώδους ή κολλοειδούς καρκινώματος. Μέσα σε λίμνες βλέννης επιπλέον “νησιά” καρκινικών κυττάρων [36].

1.2.2.7. Διθηθικό λοβιακό καρκίνωμα

Εμφανίζεται με μια συχνότητα περίπου 10% και μικροσκοπικά αποτελείται από ομοιόμορφα νεοπλασματικά κύτταρα μικρού μεγέθους με πυρήνες που διηθούν το υπόστρωμα. Ο τρόπος με τον οποίο οι πυρήνες διηθούν το υπόστρωμα διαμορφώνει και τους διάφορους τύπους του καρκινώματος οι οποίοι διακρίνονται σε :

- Κλασικός τύπος
- Βοτρυοειδής
- Συμπαγής
- Σωληνολοβιακός
- Πολύμορφος και
- Μεικτός



Εικόνα 7: Απεικόνιση Διθηθικού λοβιακού καρκινώματος. Διακρίνονται τα μικρά ομοιόμορφα καρκινικά κύτταρα που διεισδύουν στο στρώμα [37].

1.3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΠΡΟΓΝΩΣΗ

1.3.1. ΔΙΑΓΝΩΣΗ - SCREENING

Η έγκαιρη διάγνωση είναι το μοναδικό μέσο καταπολέμησης του καρκίνου του μαστού ειδικά όταν αυτός βρίσκεται στα αρχικά στάδια, ενώ η μέση πενταετής επιβίωση μπορεί να φτάσει σε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά.

Πολλοί τύποι καρκίνου μαστού δεν εμφανίζουν καθόλου συμπτώματα, ενώ κάποιοι άλλοι συνοδεύονται από συμπτώματα τα οποία μπορούν να είναι αποτέλεσμα κάποιας λοίμωξης ή κύστης. Παρόλα αυτά όταν υπάρχει κάποια έκκριση υγρού κυρίως αιματηρού, ή κάποια εξέλκωση της θηλής, πόνος αλλά και διόγκωση των μασχαλιαίων αδένων τότε θα πρέπει να αναζητείται βοήθεια από ειδικό.

Επιπλέον υπάρχουν συγκεκριμένες απλές ενέργειες που κάθε γυναίκα καλείται να κάνει τακτικά, οι οποίες οδηγούν σε έγκαιρη διάγνωση. Αρχικά η αυτοεξέταση μια φορά το μήνα, η οποία πρέπει να ξεκινάει από μικρή ηλικία, η μαστογραφία μια φορά τον χρόνο από την ηλικία των 40, καθώς και η εξέταση από ειδικό χειρουργό είναι απαραίτητες διαδικασίες ελέγχου. Ένα πρόσθετο μέτρο είναι η υπερηχογραφία, ειδικά για νεαρές γυναίκες των οποίων ο μαστός είναι πυκνός και η μαστογραφία δεν μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες. Σε γυναίκες με ιστορικό καρκίνου του μαστού στην οικογένεια προτείνεται συχνός έλεγχος καθώς και έλεγχος κάποιων γονιδίων πχ BRCA1 και BRCA2. Τέλος όταν υπάρχει ψηλαφητός όγκος η τεχνική της βιοψίας βοηθάει στην διάγνωση και στην ταυτοποίηση του όγκου καθώς και στην περαιτέρω αντιμετώπισή του [38]. Τέλος, στην προσπάθεια μιας έγκαιρης διάγνωσης οι επιστήμονες προσπαθούν να αναπτύξουν μέθοδο διάγνωσης στηριζόμενοι στο γνωστό τεστ του Έλληνα Γ. Παπανικολάου [39, 40]. Με βάση αυτό αναπτύχθηκε η τεχνική του HALO Breast Pap Test [41] κατά την οποία συλλέγεται υγρό από τον μαστό το οποίο ελέγχεται κυτταρολογικά για την παρουσία ή όχι νεοπλασματικών κυττάρων. Το τεστ αυτό παρόλο που είναι εγκεκριμένο από το FDA δεν θεωρείται διαγνωστικό και δεν αντικαθιστά τις κλασικές μεθόδους διάγνωσης.

1.3.2. ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ

Με βάση την διάγνωση λαμβάνονται υπόψη τα χαρακτηριστικά του όγκου και με την βοήθεια ενός συστήματος σταδιοποίησης εκτιμάται η περαιτέρω πρόγνωση και επομένως εφαρμόζεται η απαραίτητη θεραπεία. Ως σύστημα σταδιοποίησης χρησιμοποιείται αυτό που πρώτος ο Pierre Denoix ανέπτυξε στις αρχές της δεκαετίας του 1950, το ονομαζόμενο TNM

(Tumor, Node, Metastase). Το T (T-Tumor) δείχνει την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου, το N (N-Nodes) εκφράζει την απουσία ή παρουσία λεμφαδενικής προσβολής και τον βαθμό προσβολής των περιοχικών λεμφαδένων και το M (M-Metastasis) την απουσία ή παρουσία απομακρυσμένων εστιών. Η προϊούσα επέκταση της νόσου εκφράζεται με αριθμητικά προθέματα στους δείκτες T, N και M όπως:

- i. T0, T1, T2, T3, T4
- ii. N0, N1, N2, N3
- iii. M0, M1.[42]

Στον Πίνακα περιέχονται οι ερμηνεία των δεικτών του συστήματος TNM.

Πίνακας 1: Το σύστημα σταδιοποίησης κατά TNM.

Πρωτοπαθής εστία (T)	
Tx	Έλλειψη στοιχείων ικανών για να προσδιοριστεί ο καρκίνος
Tis	Καρκίνος μη διηθητικός (καρκίνωμα in situ) ή καρκίνωμα εντός του πόρου μη διηθητικό ή νόσος Paget χωρίς εμφανή όγκο
T0	Χωρίς ένδειξη της καρκινικής εστίας
T1	Όγκος με μέγιστη διάμετρο ≤ 2 cm.
T2	Όγκος με μέγιστη διάμετρο >2 εκ αλλά και ≤ 5 cm.
T3	Όγκος με διάσταση > 5 cm.
Όγκοι που προκαλούν εισωλική της θηλής και του δέρματος, δε διαφοροποιούν τη σταδιοποίηση του T. Αντιθέτως όγκοι που διηθούν τη φάσια του μείζονος θωρακικού μυός διαφοροποιούν τη σταδιοποίηση του T η οποία διαχωρίζεται στο αντίστοιχο στάδιο με α ή β εάν δε συμβαίνει ή συμβαίνει αντίστοιχα η διήθηση της φάσιας του μυός.(π.χ. T2β: στάδιο με όγκο διαμέτρου >2 cm αλλά ≤ 5 cm και με διήθηση της φάσιας του μείζονος θωρακικού	
T4	Όγκοι οποιασδήποτε διαμέτρου που διηθούν το δέρμα ή το θωρακικό τοίχωμα (πλευρές, μεσοπλεύριους μυς μα δεν περιλαμβάνονται οι θωρακικοί μυς)
T4a	Διήθηση και ακινητοποίηση του όγκου στο θωρακικό τοίχωμα
T4β	Οίδημα ή εξελκώσεις του δέρματος ή δορυφορικά υποδερματικά οζίδια στα όρια του μαστού
T4γ	Ταυτόχρονη εμφάνιση των χαρακτηριστικών T4a και T4β
Λεμφαδενικές μεταστάσεις	
Nx	Ακαθόριστα στοιχεία για λεμφαδενικές μεταστάσεις
N0	Χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις
N1a	Ψηλαφητοί Λεμφαδένες μασχαλιαίοι στην ομόπλευρη μασχάλη που δε θεωρούνται μεταστατικοί
N1β	Ψηλαφητοί Λεμφαδένες μασχαλιαίοι στην ομόπλευρη μασχάλη που θεωρούνται μεταστατικοί
N2	Λεμφαδένες μασχάλης ομόπλευροι και αμετακίνητοι λόγω διήθησης μεταξύ τους ή

	με άλλες δομές
N3	Ομόπλευροι λεμφαδένες υπερκλείδιοι ή στην περιοχή της κλείδας ,ή αλλιώς οίδημα του άκρου ή μεταστατικοί λεμφαδένες στην περιοχή της ομόπλευρης έσω μαστικής αρτηρίας
Μεταστάσεις σε άλλα όργανα	
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (σε άλλα όργανα)
Mx	Ακαθόριστο αν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις

1.3.3. ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση του καρκίνου αυξάνει την επιβίωση των ασθενών
Παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση είναι:

- 1 *Ο ιστολογικός τύπος.* Τα βλεννώδη, σωληνώδη και τα λοβιακά καρκινώματα έχουν μικρότερη συχνότητα μεταστάσεων άρα καλύτερη πρόγνωση. Διηθητικά καρκινώματα με 25% in situ συστατικό, σχετίζονται με καλή πρόγνωση.
- 2 *Ιστολογική διαφοροποίηση.* Ο βαθμός διαφοροποίησης συνδέεται με την πρόγνωση. Βαθμός διαφοροποίησης I (υψηλή διαφοροποίηση) σχετίζεται με καλή πρόγνωση ενώ βαθμός διαφοροποίησης III (χαμηλή διαφοροποίηση) σχετίζεται με κακή πρόγνωση.
- 3 *Μέγεθος όγκου.* Όγκοι με μικρό μέγεθος (<2 cm) έχουν καλύτερη πρόγνωση.
- 4 *Λεμφαδενικές μεταστάσεις.* Αποτελούν ένδειξη κακής πρόγνωσης. Ασθενείς με μικρού μεγέθους όγκους και χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις έχουν καλύτερη πρόγνωση από ασθενείς με μεγάλο μεγέθους όγκους και 1-3 θετικούς λεμφαδένες.
- 5 *Διήθηση αιμο-λεμφοφόρων χώρων.* Είναι κακός προγνωστικός δείκτης.
- 6 *Όρια χειρουργικής εκτομής.* Διήθηση χειρουργικών ορίων από καρκινώματα έχουν αυξημένο κίνδυνο υποτροπής.
- 7 *Αγγειογένεση.* Όγκοι με ανεπτυγμένο αγγειακό δίκτυο δείχνουν κακή πρόγνωση με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό.
- 8 *Στρωματογένεση.* Η ανάπτυξη εκτεταμένης ίνωσης σε θέσεις λεμφαδενικής μετάστασης συνδέεται με μεγάλη επιθετικότητα του όγκου.
- 9 *Ορμονικοί υποδοχείς.* Ορμονικοί υποδοχείς όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη δίνουν πληροφορίες για την συμπεριφορά του όγκου.
- 10 *Μεμβρανικό αντιγόνο c-erbB-2.* Η υπερέκφραση του αντιγόνου αυτού είναι ένας καλός προγνωστικός δείκτης, λόγω της ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία με Herceptin. [31].

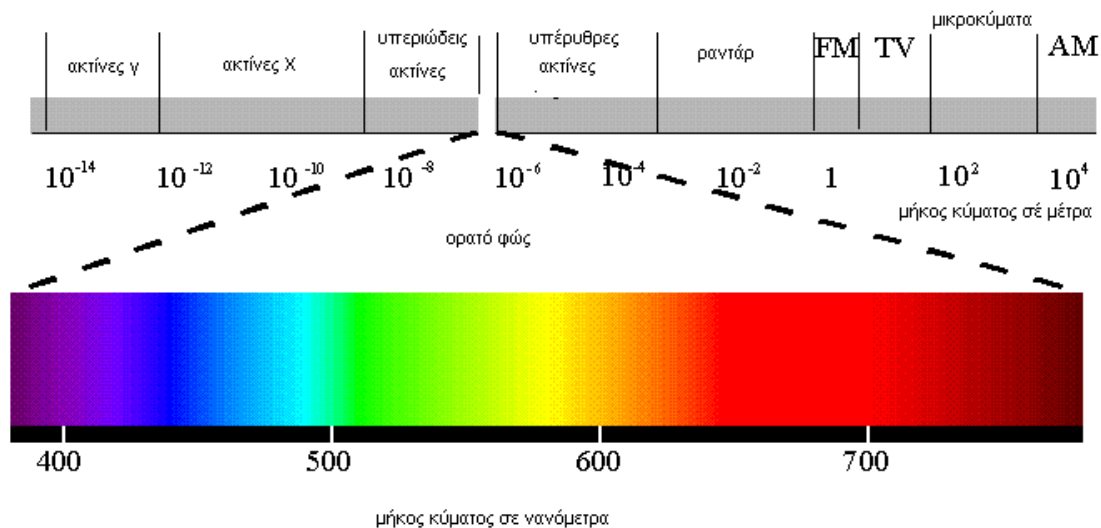
1.4. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

1.4.1. ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελείται από κύματα ενέργειας, τα οποία είναι συνδυασμός δύο εναλλασσόμενων πεδίων των ηλεκτρικών και των μαγνητικών πεδίων, των οποίων τα επίπεδα είναι κάθετα.

Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να παραχθεί από διάφορες πηγές και σύμφωνα με τα μήκη κύματος τα οποία εκπέμπει κάθε πηγή, έχουμε παραγωγή διαφορετικών ακτινοβολιών οι οποίες έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στην ύλη στην οποία προσκρούουν. Το εύρος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποτελεί το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα το οποίο περιλαμβάνει τις ακτίνες γ και X, το υπεριώδες φως, την ορατή περιοχή, το υπέρυθρο φως και τα μικροκύματα.



Εικόνα 8: Ηλεκτρομαγνητικό φασμακοσμικής ακτινοβολίας

Πιο αναλυτικά το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αποτελείται από τις εξής περιοχές:

- Ραδιοκύματα (radiofrequency): συχνότητα 3×10^6 - 3×10^{10} Hz, μήκος κύματος 10m-10 cm. Στην περιοχή αυτή η ενέργεια προκαλεί μεταβολή στο spin τόσο του πυρήνα (NMR, Nuclear Magnetic Resonance) όσο και του ηλεκτρονίου (EPR, Electron Paramagnetic Resonance).
- Μικροκύματα (microwave) : συχνότητα 3×10^{10} - 3×10^{12} Hz, μήκος κύματος 1cm-100μm. Εκπομπή ακτινοβολίας λόγω της περιστροφής των μορίων.

- Περιοχή υπέρυθρου (infrared): συχνότητα 3×10^{12} - 3×10^{14} Hz, μήκος κύματος 100 μ m-1 μ m. Στην περιοχή αυτή έχουμε διέγερση των ταλαντώσεων των ατόμων και των μορίων.
- Ορατό και Υπεριώδες (visible , ultra violet): συχνότητα 3×10^{14} - 3×10^{16} Hz, μήκος κύματος 1 μ m-10nm. Διέγερση των ηλεκτρονίων σθένους προκαλεί μεταβολή της ηλεκτρονικής δομής του μορίου.
- Ακτίνες x (x-ray): συχνότητα 3×10^{16} - 3×10^{18} Hz, μήκος κύματος 10nm-100pm. Μεταβολές στα εσωτερικά ηλεκτρόνια του ατόμου ή του μορίου.
- Ακτίνες γ (γ -ray): συχνότητα 3×10^{18} - 3×10^{20} Hz, μήκος κύματος 100pm-1pm. Ανακατατάξεις των πυρηνικών σωματιδίων.
- Κοσμικές ακτίνες (cosmic rays): συχνότητα $\sim 10^{22}$ Hz, μήκος κύματος 0.01pm.

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος διαιρείται επίσης σε τρεις περιοχές:

- το εγγύς IR (0,8 μ m έως 2,5 μ m)
- το μέσο IR (2,5 μ m έως 50 μ m)
- το άπω IR (50 μ m έως 1000 μ m)

Στα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου χρησιμοποιείται συνήθως η περιοχή του φάσματος από 2 μ m έως 50 μ m, δηλαδή εκείνη τη περιοχή που αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4000 cm^{-1} έως 200 cm^{-1} και επομένως ανήκουν στο μέσο IR. Στην περιοχή αυτή παρατηρούνται βασικές μεταβολές στην δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ στο άπω IR παρατηρούνται μεταβολές στην περιστροφή τους [43].

1.5. ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

1.5.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μίας ένωσης προκαλεί διέγερση των μορίων αυτών σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή ταλάντωσης και βοηθάει στην ταυτοποίηση της μοριακής δομής της. Τα μόρια με διπολική ροπή παραμορφώνονται στην περιοχή του υπέρυθρου, και αυτή η παραμόρφωση οφείλεται σε κάμψεις αλλά και δονήσεις των δεσμών των ατόμων του μορίου. Όταν όμως ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Για να απορροφήσει ένα μόριο στο IR πρέπει να μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR π.χ. τα μόρια των H_2 , N_2 δεν δίδουν υπέρυθρο φάσμα (IR-inactive). Έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση. Τα φάσματα απορρόφησης υπέρυθρου είναι διαφορετικά για κάθε μόριο και αποτελούν θεμελιώδη ιδιότητα, του μορίου και παρουσιάζονται σαν ταινίες απορρόφησης μικρού εύρους. Τα φάσματα αυτά χρησιμεύουν ως δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) ενός μορίου ή μιας ένωσης, και βοηθούν τόσο στην ποιοτική ανάλυση της ένωσης ή του μορίου όσο και στην απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, δηλαδή για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και τη διάταξή τους στο χώρο.

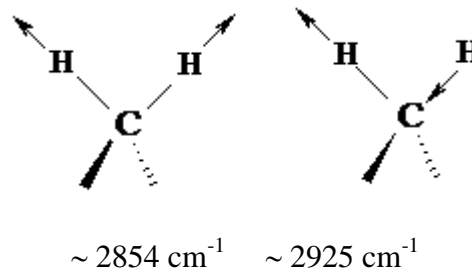
1.5.2. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων

Για την φασματοσκοπική μελέτη δονήσεων ενός διατομικού ατόμου λαμβάνεται υπόψη ο αρμονικός ταλαντωτής. Βάση αυτού του προτύπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι συχνότητες δόνησης για τον υπολογισμό των σταθερών των δεσμών των διατομικών ατόμων. Στα πολυατομικά μόρια το φάσμα IR γίνεται πιο πολύπλοκο λόγω της πολλαπλής δυνατότητας δόνησης του μορίου. Λόγω του ότι η μελέτη των φασμάτων τους είναι η προέκταση των θεωρητικών συμπερασμάτων των φασμάτων των απλών μορίων, εάν φανταστούμε ένα μόριο με N άτομα, τότε η θέση κάθε ατόμου στο χώρο καθορίζεται από τις τρεις ισότιμες συντεταγμένες x , y και z . Ο ολικός αριθμός των τιμών των συντεταγμένων είναι $3N$, δηλαδή το μόριο έχει $3N$ βαθμούς ελευθερίας (degrees of freedom) κινήσεων στο χώρο. Έτσι, το μόριο είναι ελεύθερο να κινηθεί στον τρισδιάστατο χώρο χωρίς αλλαγή του

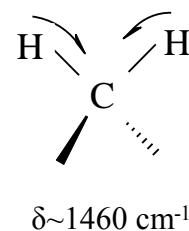
σχήματός του. Επιπλέον το ίδιο μπορεί να θεωρηθεί και για την περιστροφή ενός μη γραμμικού μορίου όταν αναλυθεί στα συστατικά μέρη των τριών καθέτων αξόνων συμμετρίας. Ο καθορισμός των αξόνων αυτών απαιτεί άλλους τρεις βαθμούς ελευθερίας, έτσι το μόριο έχει τελικά $3N-6$ βαθμούς ελευθερίας στη διάθεσή του για να κινηθεί στο χώρο. Για ένα μη γραμμικό μόριο με N άτομα μπορούν να υπάρξουν $3N-6$ διαφορετικές δονήσεις, ενώ για ένα γραμμικό μόριο, που η περιστροφή γύρω από τον άξονα του δεσμού δεν μεταβάλλει την κατάσταση του μορίου, οι βαθμοί ελευθερίας είναι $3N-5$.

Για την περιγραφή των τρόπων δόνησης των πολυατομικών μορίων χρησιμοποιείται εκείνη η περιγραφή κατά την οποία οι περιοδικές κινήσεις των ατόμων λαμβάνουν χώρα ακριβώς στην ίδια συχνότητα. Οι δονήσεις αυτές του μορίου ονομάζονται κανονικές δονήσεις (normal vibrations ή normal modes). Στις κανονικές δονήσεις όλα τα άτομα περνούν συγχρόνως από την θέση ισορροπίας τους και φθάνουν στις ακραίες θέσεις τους την ίδια στιγμή, κατά την διάρκεια της ταλάντωσης. Οι τρόποι δόνησης ενός μορίου χαρακτηρίζονται ως εξής [44].

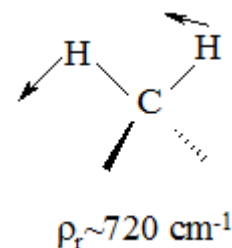
- **Δονήσεις τάσης** (stretching vibrations). Εμφανίζονται όταν δύο άτομα πάλλονται με τρόπο ώστε να μεταβάλλεται η μεταξύ τους απόσταση ($\leftarrow\text{C-H}\rightarrow$). Η ενέργεια τάσης είναι μεγαλύτερη των δονήσεων κάμψης.



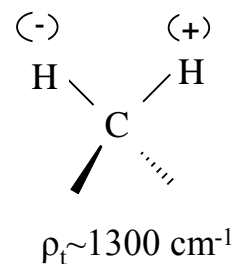
- **Δονήσεις κάμψης ή ψαλίδισης** (bending ή scissoring vibrations). Στην περίπτωση αυτή υπάρχουν συνεχείς μεταβολές της γωνίας που σχηματίζουν δύο δεσμοί.



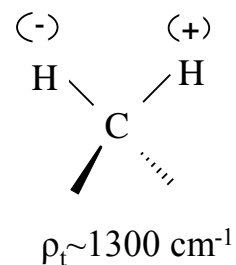
- **Δονήσεις αιώρησης** (rocking vibrations). Εμφανίζονται όταν η ομάδα των ατόμων $-\text{CH}_2-$ δονείται εντός του επιπέδου H-C-H (in-plane).



- **Δονήσεις συστροφής** (twisting vibrations).
Λαμβάνουν χώρα όταν μία ομάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από το δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο μόριο.



- **Δονήσεις σείσης** (wagging vibrations).
Παρατηρούνται όταν τα άτομα που είναι συνδεδεμένα μέσω τρίτου μορίου να παλινδρομούν εκτός επιπέδου σε φάση.

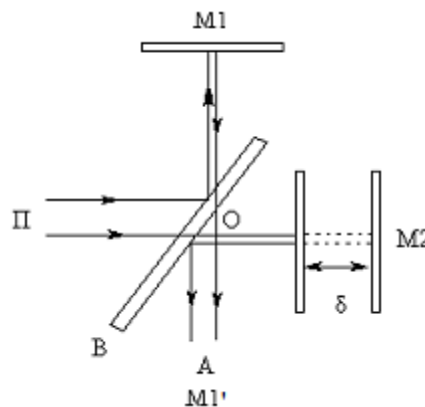


Σύμφωνα με τον συμβολισμό, το (+) σημαίνει κίνηση πάνω από το επίπεδο της σελίδας ενώ το (-) σημαίνει κίνηση έξω από αυτό (out-of-plane)

1.6. Φασματοφωτομετρία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier, FT- IR

Η φασματοφωτομετρία υπερέθρου, λόγω του ότι δίνει πληροφορίες των χημικών ενώσεων προς εξέταση, μπορούμε να πούμε ότι παρέχει το δακτυλικό αποτύπωμα της κάθε χημικής ένωσης. Μπορεί να χαρακτηριστεί και σαν δακτυλικό αποτύπωμα, επειδή και δύο ισόμορφες της ίδιας χημικής ένωσης δεν παράγουν το ίδιο φάσμα υπερέθρου. Έτσι, κάθε φάσμα είναι μοναδικό και αποτελεί «ταυτότητα» της ένωσης, την οποία και χαρακτηρίζει.

Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης και η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις. Το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier αποτελεί το συμβολόμετρο Michelson (Σχήμα 1.)



Εικόνα 9: Σχηματική παράσταση συμβολομέτρου Michelson. Π = πηγή, $M1$ = κάτοπτρο μίξης, $M1'$ = είδωλο του $M1$ όπως φαίνεται από τη θέση A , $M2$ = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (*chopper*) και A = αναλυτής

Το συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από δύο κάτοπτρα κάθετα μεταξύ τους, από τα οποία το ένα είναι κινητό ενώ το άλλο σταθερό, και ένα διαιρέτη δέσμης (beam splitter) που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο κατόπτρων σε γωνία 45° . Η πολυχρωματική ή μονοχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr το οποίο δεν απορροφά στην IR, και είναι φτιαγμένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ανακλά το 50% της ακτινοβολίας

που πέφτει πάνω της. Με αυτό τον τρόπο η πλάκα διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη και στέλνει το $\frac{1}{2}$ στον καθρέπτη M1 και το άλλο $\frac{1}{2}$ στον καθρέπτη M2. Οι δύο δέσμες ανακλώνται στους καθρέπτες και γυρνούν στην πλάκα-διαχωριστή (plate-beam splitter) της δέσμης του φωτός, όπου συνενώνονται πάλι σε μια δέσμη φωτός με κατεύθυνση το δείγμα της ουσίας και μετά στον ανιχνευτή. Όταν μια μονοχρωματική δέσμη φωτός εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα A υπόκειται σε θετική ή αρνητική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις της από τους καθρέπτες M1 και M2. Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά πολλαπλάσιο του μήκους κύματος (ολόκληροι ή ακέραιοι αριθμοί) της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται θετική συμβολή που δίνει μια δέσμη φωτός μεγάλης έντασης. Εάν όμως οι αποστάσεις της A από τους M1 και M2 είναι μισοί ολόκληροι αριθμοί ($1/2$, κλπ) του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στους καθρέπτες, επανέρχονται στην A και εξουδετερώνονται. Καθώς ο καθρέπτης M2 κινείται αργά προς την πλάκα A ή απομακρύνεται από αυτή, ο ανιχνευτής θα δέχεται ακτινοβολία εναλλασσόμενης έντασης λόγω φαινομένου συμβολής [45].

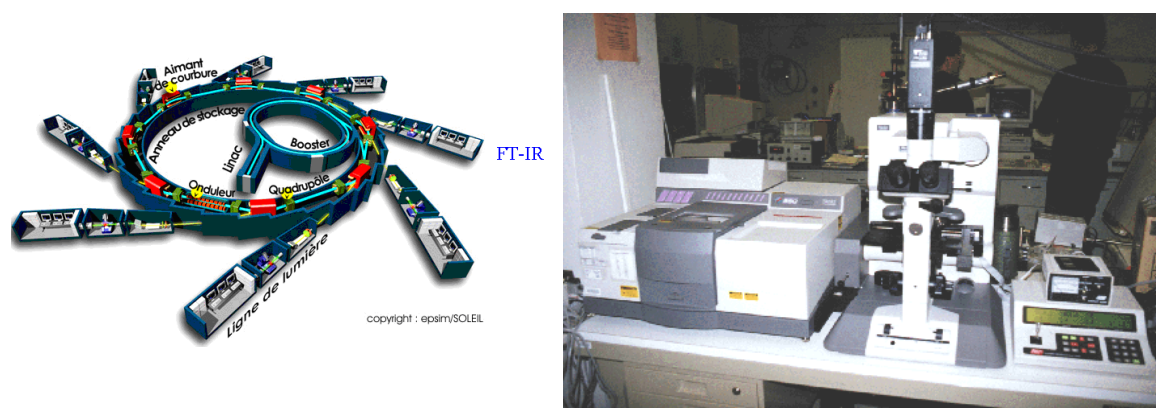
1.7. ΜΙΚΡΟ-ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (MICRO- FT-IR)

Η σύζευξη του φασματοφωτόμετρου υπερύθρου με μικροσκόπιο επιτρέπει τη μελέτη δειγμάτων με ταυτόχρονη διατήρηση της τοπογραφίας/μικρο-αρχιτεκτονικής του δείγματος. Η μέθοδος είναι πολύ χρήσιμη για τη μελέτη δειγμάτων/τομών ανομοιογενών ιστών, όπως για παράδειγμα το οστόν, ο μαστός, κ.ά.

1.8. ΠΗΓΕΣ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ ΦΩΤΟΣ ΣΥΓΧΡΟΤΡΟΝ (SYNCHROTRON)

Τα τελευταία χρόνια άρχισε να χρησιμοποιείται υπέρυθρη ακτινοβολία παραγόμενη σε σύγχροτρο. Το σύγχροτρον (synchrotron) είναι διάταξη επιτάχυνσης φορτισμένων σωματιδίων, όπως ηλεκτρόνια, πρωτόνια κ.α. σε κυκλική τροχιά. Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από γραμμικό επιταχυντή ή ραδιενεργά ισότοπα καθοδηγούνται μέσα σε ένα στενό κυκλικό αγωγό, που ονομάζεται «δακτύλιος αποθήκευσης ηλεκτρονίων» (electron storage ring). Στην Εικόνα 10 δίνεται η μορφή ενός επιταχυντή και η κατανομή των διάφορων ενεργειακών παραθύρων. Μέσα στον δακτύλιο επικρατεί υψηλό κενό. Σχεδόν όλος ο αέρας και η υγρασία αντλούνται εκτός του δακτυλίου, έτσι ώστε τα ταχέα ηλεκτρόνια να μην χάνουν ενέργεια λόγω πολλαπλών συγκρούσεων με τα μόρια του αέρα. Καθώς τα

ηλεκτρόνια διατρέχουν τον δακτύλιο επιταχύνονται από ισχυρούς μαγνήτες που βρίσκονται κατά μήκος του αγωγού και αποκτούν σχετικιστικές ταχύτητες.



A

B

Εικόνα 10: A: Επιταχυντής σύγχροτρον παραγωγής δέσμης. B: Σύγχροτρον micro-FT-IR φασματοφωτόμετρο

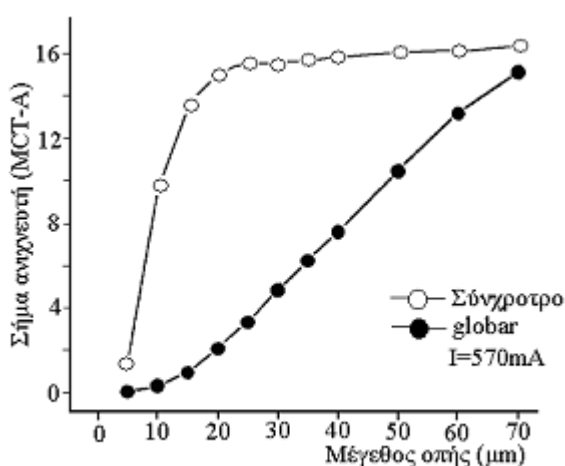
Η σχετικιστική ταχύτητα μετατρέπει τα ηλεκτρόνια σε ισχυρή ακτινοβολία υψηλής εστίασης (η οποία περιλαμβάνει συχνότητες από την άπω υπέρυθρη περιοχή έως τις ακτίνες X). Με κατάλληλα οπτικά συστήματα και φίλτρα, μια έντονη δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας κατευθύνεται στο μικρο-φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου [46,47]. Σε άλλες θέσεις μπορούν να κατευθυνθούν οι δέσμες των ηλεκτρονίων κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παραχθούν διάφορες άλλες ενέργειες, π.χ. Ακτίνες X, UV-ακτινοβολίας κ.ά.

Τα συμβατικά micro-FT-IR φασματοφωτόμετρα διαθέτουν θερμές πηγές (thermal/globalbar) και διαφέρουν από τα σύγχροτρον micro-FT-IR φασματοφωτόμετρα στην λαμπρότητα της ακτινοβολίας, η οποία είναι 100 έως 1000 φορές μεγαλύτερη μιας συμβατικής πηγής. Αυτό το πλεονέκτημα της λαμπρότητας δεν οφείλεται στο γεγονός ότι το δραστικό (effective) μέγεθος της πηγής είναι μικρό και στο ότι το φως εκπέμπεται μέσα σε ένα μικρό εύρος γωνιών.

Τα συμβατικά micro-FT-IR φασματοφωτόμετρα παρουσιάζουν μειονεκτήματα, επειδή τα μεγάλα μήκη κύματος (wavelengths) της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζουν τη διακριτική ικανότητα (resolution) στην τοπολογική ανάλυση (spatial resolution). Για λεπτομερή τοπολογική ανάλυση πρέπει η αναλογία σήματος-θορύβου (signal-to-noise ratio ή S/N) να μειώνεται, το οποίο δεν μπορούν να επιτύχουν οι συμβατικές πηγές επειδή απαιτούν να κλείνουν οι οπές (apertures) ώστε η δέσμη υπέρυθρου να προσπέσει σε μικρότερες επιφάνειες δειγμάτων, με αποτέλεσμα την περίθλαση (diffraction) του φωτός. Τα

υπάρχοντα μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται σε συμβατική πηγή υπερύθρου λόγω του λόγου S/N περιορίζουν τις δυνατότητες, γιατί οι οπές επιτρέπουν δέσμη υπερύθρου σε επιφάνειες διαμέτρου 20 μm έως 30 μm .

Η υψηλή λαμπρότητα της πηγής σύγχροτρον επιτρέπει τη χαρτογράφηση μικρότερων επιφανειών με αποδεκτή αναλογία σήματος–θορύβου. Σήμερα, με την εξέλιξη των διατάξεων και φακών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν οπές μικρότερες από το μήκος κύματος του φωτός χωρίς η περίθλαση να περιορίζει τον βαθμό τοπολογικής ανάλυσης.



Εικόνα 11: Σύγκριση της έντασης του υπερύθρου φωτός σε συνάρτηση με το μέγεθος οπής για την πηγή σύγχροτρο (κενοί κύκλοι) και κλασσική (γεμάτοι κύκλοι) [46]

Τα μικροσκόπια υπερύθρου για σύγχροτρον διαφέρουν από τα συμβατικά μόνο στο ότι όλα τα οπτικά μέρη αποτελούνται από κάτοπτρα, αντί για φακούς. Έτσι, το υπέρυθρο φως καθώς διέρχεται μέσα από το σύστημα δεν απορροφάται.

Τα μικρο-FT-IR φάσματα γενικά συλλέγονται: 1) είτε ως μεμονωμένα μικρο-φάσματα, 2) είτε ως μέρος μιας γραμμής ή χάρτη περιοχής. Για τα περισσότερα συστήματα μικρο-φασματοσκοπίας υπερύθρου, η δεύτερη μέθοδος είναι αυτοματοποιημένη με έλεγχο λογισμικού (software) και αυτοματοποιημένο σύστημα συντεταγμένων του μικροσκοπίου. Για τη συλλογή τυπικών μικρο-φασμάτων υπερύθρου μπορεί να απαιτηθούν από 10-30 s έως 5-10 min. Η μικρο-φασματοσκοπική χαρτογράφηση ολόκληρης της περιοχής μπορεί να απαιτήσει ακόμη και ώρες [46,47].

1.9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΔΟΝΗΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ- ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Τελευταία, έγινε σημαντική προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί η υπέρυθη φασματοσκοπία για διαγνωστικούς σκοπούς. Η ανάλυση κυττάρων τόσο των ιστών, όσο και των βιολογικών υγρών με υπέρυθη φασματοσκοπία έδωσε αισιόδοξα μηνύματα επειδή οι μεταβολές του φάσματος ενός συγκεκριμένου ιστού δεν δίνουν απλά και μόνον την εμφάνιση της επικείμενης νόσου σε μοριακό επίπεδο, αλλά μπορούν να δώσουν πληροφορίες ακόμη και για την πρόβλεψη του μηχανισμού έναρξης [48-54].

Επειδή οι ιστοί είναι σύνθετα βιολογικά συστήματα απαιτείται ιδιαίτερη γνώση για την επιλογή της τεχνικής λήψης των υπέρυθρων φασμάτων των δειγμάτων. Έτσι ιστοί που περιέχουν μεγάλο ποσοστό νερού μελετώνται με ATR (Attenuated Total Reflectance) τεχνική, η οποία επιτρέπει την εξάτμιση του νερού, χωρίς να καταστραφεί η διαμόρφωση των πρωτεϊνών στον χώρο, όπως αυτή υφίσταται στο βιολογικό περιβάλλον [4].

Η σύγχροτον μικρο-υπέρυθη φασματοσκοπία σήμερα δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν παράλληλα όλες οι δυνατές τεχνικές και να μελετηθεί ακόμη και ένα μόνο κύτταρο [5-6].

1.9.1. Ερμηνεία φασμάτων

Η ερμηνεία των φασμάτων στα πολύπλοκα βιολογικά συστήματα δεν είναι εύκολη, επειδή πολλές από τις χημικές ομάδες, όπως NH, C=O, κ.ά., ανήκουν σε πολλά βιολογικά μόρια, γι' αυτό και απαιτείται αρκετή εμπειρία. Στη διαδικασία ερμηνείας των IR φασμάτων λαμβάνονται υπόψη ορισμένοι κανόνες, που στηρίζονται στο γεγονός ότι οι χαρακτηριστικές ομάδες απορροφούν στην ίδια περιοχή του φάσματος [44].

- Οι χαρακτηριστικές ομάδες των πρωτεϊνών εμφανίζουν απορροφήσεις στην περιοχή 4000-1500 cm^{-1} . Οι χαρακτηριστικές ομάδες μπορούν να δώσουν μία ή περισσότερες απορροφήσεις οι οποίες εξαρτώνται από τη φύση και τη θέση τους στο μόριο.
- Η περιοχή κάτω από τους 1000 κυματαριθμούς περιλαμβάνει απορροφήσεις των δονήσεων του σκελετού των ανθρακικών αλυσίδων και χαρακτηρίζεται ως *δακτυλικό αποτύπωμα* της εκάστοτε ενώσεως.

- Η σύγκριση των φασμάτων αγνώστων ενώσεων με φάσματα γνωστών ενώσεων, μπορούν να βοηθήσουν στην πιστοποίησή τους. Θεωρητικά, τα δύο φάσματα πρέπει να είναι παρόμοια. Η ύπαρξη «βιβλιοθήκης» φασμάτων υπέρυθρου παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης του φάσματος ενός μείγματος συστατικών στα επί μέρους συστατικά του και επομένως τη δυνατότητα ποιοτικής ανάλυσης του μείγματος.

1.9.2. Εφαρμογές της φασματοσκοπίας υπέρυθρου στην ιατρική- βιολογία.

Επειδή το υπέρυθρο φάσμα είναι μοναδιαίο και αποτελεί το “δακτυλικό αποτύπωμα” του κάθε χημικού ή βιολογικού μορίου, γίνεται προσπάθεια τα τελευταία χρόνια να χρησιμοποιηθεί η υπέρυθρη φασματοσκοπία στην διάγνωση ή και προδιάγνωση ασθενειών. Όπως φαίνεται και από την παρούσα μελέτη, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην προδιάγνωση των ασθενειών, δεδομένου ότι το φάσμα των βιολογικών μορίων επηρεάζεται και από την μεταβολή του περιβάλλοντος μέσου [4,6-9,44-48].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Προετοιμασία Δείγματος

Οι καρκινικοί ανθρώπινοι ιστοί χορηγήθηκαν από την Τράπεζα του Ιστοπαθολογικού Τμήματος του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά «Μεταξά». Στα περισσότερα δείγματα δαπιστώθηκαν παράλληλα νεοπλασματικές και κανονικές περιοχές. Επίσης, σε πολλά δείγματα συνυπήρχαν περιοχές με διαφορετικά στάδια (Grade) εξέλιξης του καρκίνου

Όλα τα χειρουργικά παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% όχι περισσότερο από 12 h. Στη συνέχεια τα υπό εξέταση τμήματα των μαστών σκηνώθηκαν σε παραφίνη από όπου με την βοήθεια μικροτόμων λήφθηκαν παράλληλες τομές των 5 μm αμέσως μετά την τομή που μελετήθηκε ιστοπαθολογικά. Η μικροσκοπική εξέταση και η ταξινόμηση των ιστών έγινε με την βοήθεια της χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Στη συνέχεια η παραφίνη απομακρύνθηκε από τους ιστούς με σταγόνες ξυλόλης, ενώ η απομάκρυνση της περίσσειας ξυλόλης έγινε με ακετόνη. Το δείγμα τοποθετήθηκε στη συνέχεια σε μεταλλική ανοξειδωτή πλάκα ειδική για την λήψη υπέρυθρων φασμάτων. Αμέσως μετά την τομή του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την ιστοπαθολογική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν άλλες 3-5 μικροτομές του ίδιου δείγματος, ώστε να χρησιμοποιηθούν τόσο για την μελέτη των μεταβολών της μοριακής δομής των συστατικών των ιστών όσο και ως «τυφλό» δείγμα πιστοποίησης της μεθόδου.

Λήφθηκαν συνολικά δείγματα όγκων του μαστού από 17 γυναίκες. Στον Πίνακα 1 δίνονται τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Ο αριθμός του κάθε δείγματος αντιστοιχεί στους ίδιους αριθμούς με τα υπέρυθρα φάσματα. Από αυτά 9 ήταν πορογενή, 5 λοβιακά, 1 άτυπο μυελοειδές, 1 οστεοσάρκωμα και 1 αδενοκαρκίνωμα.

Πίνακας 2: Καρκίνοι μαστού. Ο χαρακτηρισμός έγινε ιστοπαθολογικά

A/A	Αριθμός Δείγματος	Ιστολογικός Τύπος	grade	In situ στοιχείο
1	6497	Λοβιακό	3	Όχι
2	5079	Λοβιακό	2	Ναι
3	5381	Λοβιακό	2	Όχι
4	5457	Λοβιακό	2	Όχι
5	6830	Λοβιακό		Ναι
6	5262	Αδενοκαρκίνωμα	3	Ναι πορογενές και λοβιακό
7	6490	Οστεοσάρκωμα		
8	6489	Άτυπο μυελοειδές	3	Όχι
9	5619	Πορογενές	3	Ναι
10	5635	Πορογενές	2	Ναι
11	5686	Πορογενές	1 και 2	Όχι
12	5925	Πορογενές	2 και 3	Ναι
13	6414	Πορογενές	3	Όχι
14	6442	Πορογενές	1	Ναι
15	6806	Πορογενές	2 και 3	Όχι
16	7136	Πορογενές	3	Ναι
17	7140	Πορογενές	3	Ναι

2.2. Micro FT-IR φάσματα

Τα micro-FT-IR φάσματα καταγράφηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με micro-FT-IR φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Spectrum GX1 and PerkinElmer Spotlight 400, συνδεδεμένο με μικροσκόπιο PerkinElmer Autoimage microscope photoconductive HgCdTe και ανιχνευτή MCT. Σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων υπήρχε συνεχής παροχή υγρού αζώτου. Χρησιμοποιήθηκε η περιοχή του υπέρυθρου φάσματος από 4000 μέχρι 700 cm^{-1} . Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν 4 cm^{-1} .

Η ιδιαίτερη διακριτική ικανότητα της οπής (aperture) εξαρτήθηκε από την ετερογένεια του δείγματος και ήταν 50x50 και 6.25x6.25 μm , ενώ για να αυξηθεί ο λόγος σήμα προς θόρυβο τα υπέρυθρα φάσματα προέκυψαν από το άθροισμα 32 και 128 ιδιαίτερα φάσματα, αντίστοιχα, σε κάθε σημειακή περιοχή. Η περιοχή αυτή περιελάμβανε μερικά

κύτταρα του ιστού. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην ανοξειδωτή πλάκα και λήφθηκαν υπέρυθρα φάσματα ανάκλασης [6].

Η επιλογή των θέσεων ενδιαφέροντος, όπου θα λαμβάνονταν τα υπέρυθρα φάσματα για την μελέτη, έγινε με μικροσκόπιο, μέσω βιντεοκάμερας και με βάση τον προηγούμενο παθολογικό χαρακτηρισμό των δειγμάτων. Η γραμμή αναφοράς ορίστηκε με την σύμπτωση της αντίστοιχης γραμμής του polynomial, ενώ η δεύτερη παράγωγος προέκυψε με βάση 9 σημεία. Το deconvolution και ο λόγος των ταινιών που μας ενδιέφεραν έγινε με βάση την Gaussian ανάλυση. Για την μαθηματική ανάλυση έγινε αναγωγή στην ένταση της ταινίας απορρόφησης των ομάδων των αμιδίων (Amide I και II) [5-6]

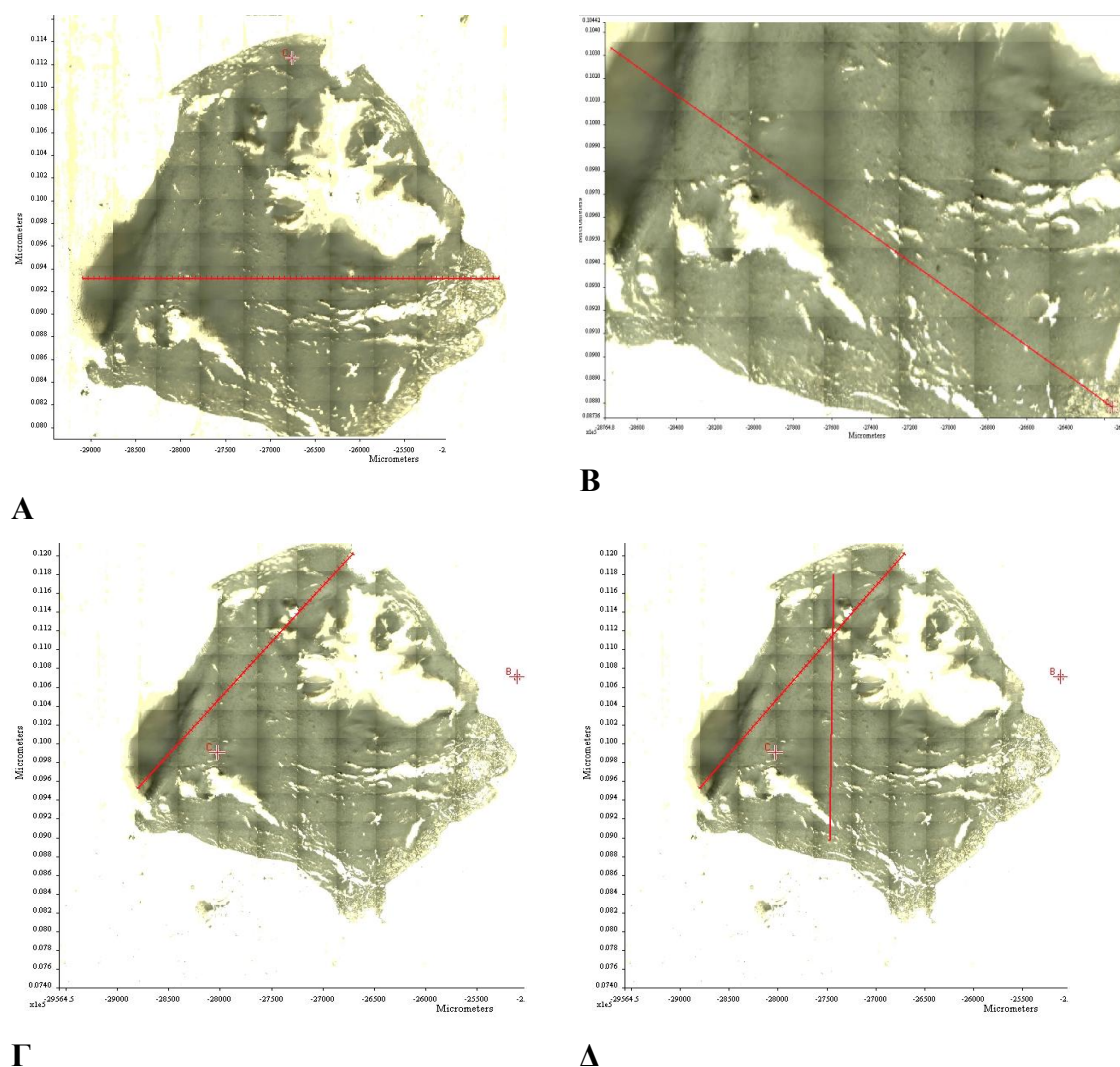
Για την απεικόνιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα PerkinElmer Auto IMAGE 5.0.1 και Spectrum IMAGE 1.6.1. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με πρόγραμμα Spectrum v.6.3.1 (PerkinElmer), Grams AI (Galactic Corp.) και Pirouette 4.0 (Infometrix Corp.) πολυπαραγοντικής ανάλυσης [5-6].

Για την κάθε τομή λήφθηκαν ιδιαίτερα 500–1000 υπέρυθρα φάσματα στην περιοχή 1800–900 cm^{-1} . Στην περιοχή αυτή του υπέρυθρου φάσματος εμφανίζονται οι περισσότερες χαρακτηριστικές δονήσεις απορρόφησης των αμινομάδων των πρωτεϊνών, των σακχάρων, του DNA, κ.ά. Οι κυριότερες χαρακτηριστικές ταινίες χρησιμοποιήθηκαν και τοποθετήθηκαν στην βάση δεδομένων για την ανάλυση hierarchical clustering analysis (HCA). Για τον σκοπό αυτό όλα τα φάσματα μετατράπηκαν σε φάσματα απορρόφησης. Η γραμμή αναφοράς (baseline linear) καθορίστηκε με βάση την αυτόματη θέση του προγράμματος ενώ για το smoothing λήφθηκαν 5 σημεία (5 points) [5-6]. Η επαναληψιμότητα και αποτελεσματικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με βάση το πρόγραμμα HCA σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της δεύτερης παραγωγού των φασμάτων (Savitzky–Golay, 9 points). Ο συσχετισμός SIMCA (χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους για HCA) μας επέτρεψε την σχηματοποίηση των φασμάτων. Τα φάσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που λήφθηκαν σημείο προς σημείο από την περιοχή ενδιαφέροντος για χαρτογράφηση (mapping). Οι χαρακτηριστικές ταινίες που εμφάνιζαν τις διαφορές σχετικά με την επίδραση του είδους και του σταδίου της ανάπτυξης της ασθένειας έγινε στατιστική ανάλυση.

Επειδή η καταγραφή των υπέρυθρων φασμάτων με micro-FT-IR φασματοσκοπία έγινε για πρώτη φορά και επειδή τα δείγματα από ασθενείς δεν είναι εύκολο να ληφθούν, για μείωση του χρόνου ανάλυσης και ελέγχου του δείγματος, έγινε ταχεία λήψη των φασμάτων προς διάφορες κατευθύνσεις. Η διαδικασία αυτή μας έδωσε την δυνατότητα να ελέγξουμε τα βήματα του μικροσκοπίου, την ευαισθησία της μεθόδου, την διαχωριστική ικανότητα ως

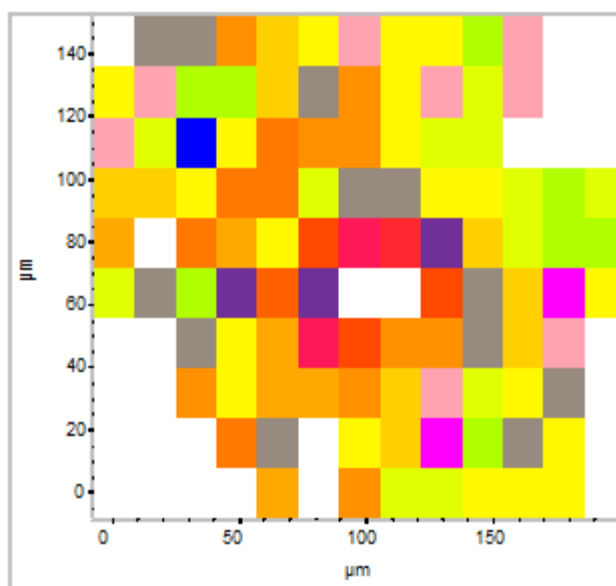
προς το είδος και το στάδιο του καρκίνου, καθώς και σε άλλα ερωτήματα που προκύπτουν από την έρευνα.

Στην Εικόνα 12 (Α,Β,Γ,Δ) φαίνονται οι κατευθύνσεις προς τις οποίες επιλέχθηκαν οι διαδρομές λήψης. Μετά από αυτή τη διαδικασία λήφθηκαν φάσματα πλήρους σάρωσης των δειγμάτων. Η διαδικασία αυτή έδωσε τη δυνατότητα να διαπιστώσουμε αν η μέθοδος προσφέρεται για ταχεία βιοψία στο χειρουργείο. Η επιλογή γενικά των διαδρομών είχε ως κριτήριο αφενός μεν την ιστολογική απεικόνιση αφετέρου δε την μακροσκοπική ανομοιογένεια του δείγματος.



Εικόνα 12: Πορογενής καρκίνος μαστού Grade II και Grade III, όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο. Α; Οριζόντια καταγραφή, Β; Διαγώνια καταγραφή, Γ; Τυχαία επιλογή και Δ; Δύο τυχαίες επιλογές

Μετά τον γραμμικό έλεγχο έγινε πλήρης σάρωση του δείγματος, η οποία άρχισε πάντα από το κέντρο του μικροσκοπίου προς όλες τις κατευθύνσεις, ώστε σημειακά να δοθεί η δυνατότητα επεξεργασίας του δείγματος.



Εικόνα 13: Πλήρης *micro-FT-IR* χαρτογράφηση καρκινικού ιστού. Η χρωματική διαβάθμιση αντιστοιχεί σε διαφορετικά φάσματα. Το λευκό αντιστοιχεί σε κενό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Υπέρυθρα φάσματα λοβιακού καρκίνου

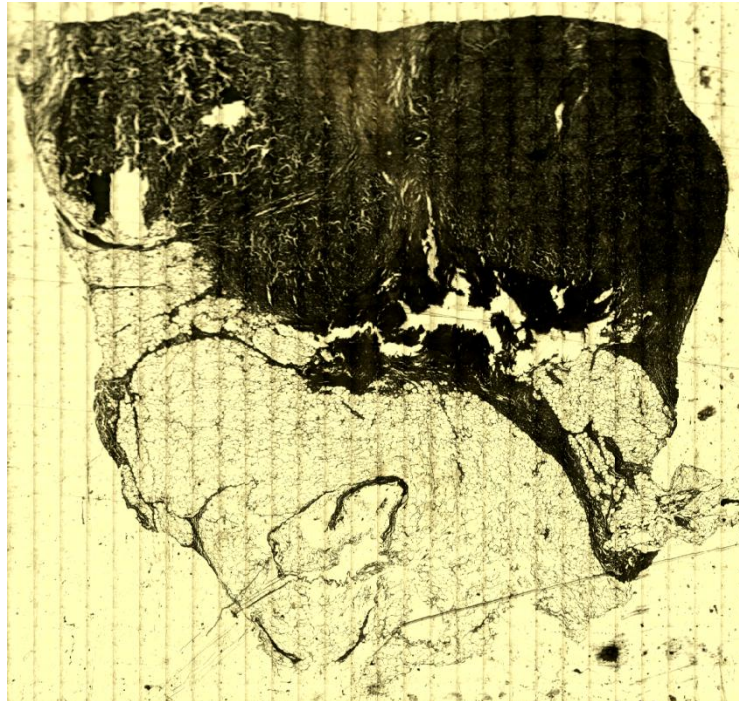
3.1.1. Grade III (δείγματος 1)

Στην Εικόνα 14 φαίνεται μία τυπική τομή ενός λοβιακού in situ καρκίνου του μαστού grade III από το δείγμα 1. Η Εικόνα 15 δίδει την ίδια τομή από το video του μικροσκοπίου του φασματοφωτομέτρου.



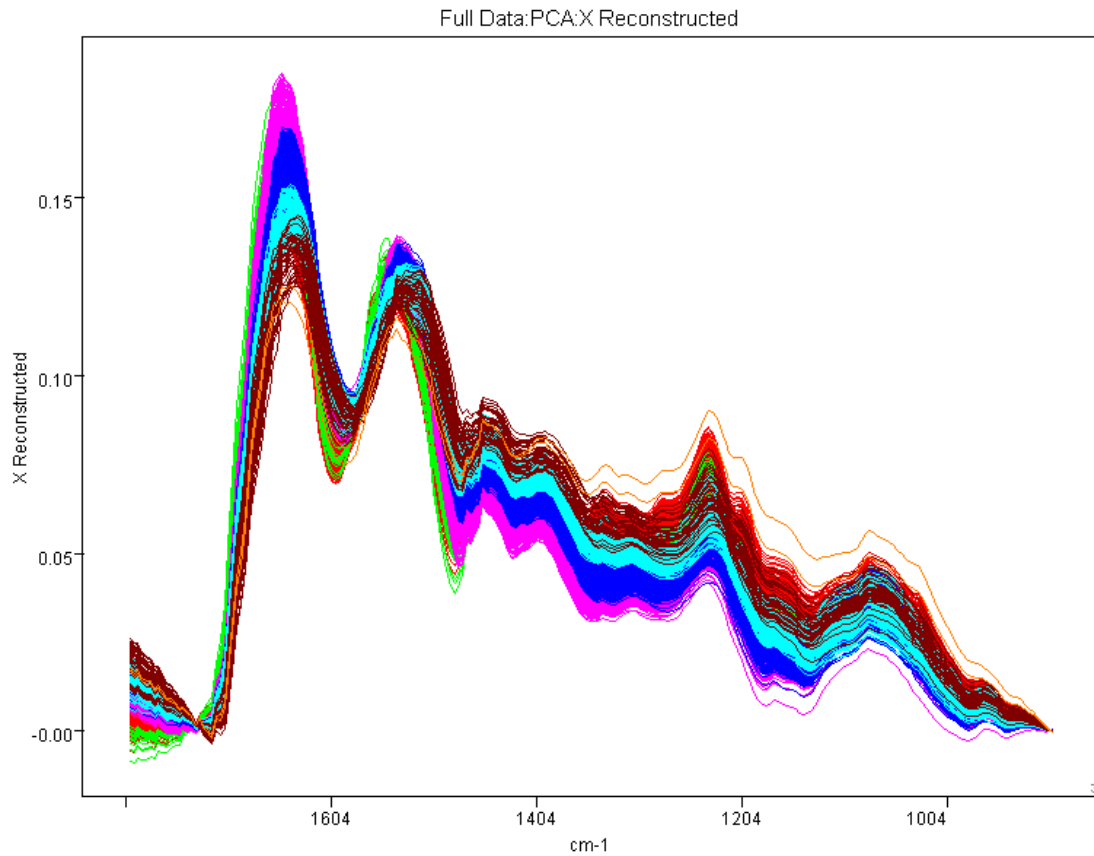
Εικόνα 14: Μικροτομή λοβιακού καρκίνου: Grade III δ.1

Οι παράλληλες ταινίες είναι ανάλογες του ανοίγματος (aperture) του μικροσκοπίου, και δείχνουν τα βήματα σάρωσης για την χαρτογράφηση των φασμάτων στην μελετούμενη περιοχή.



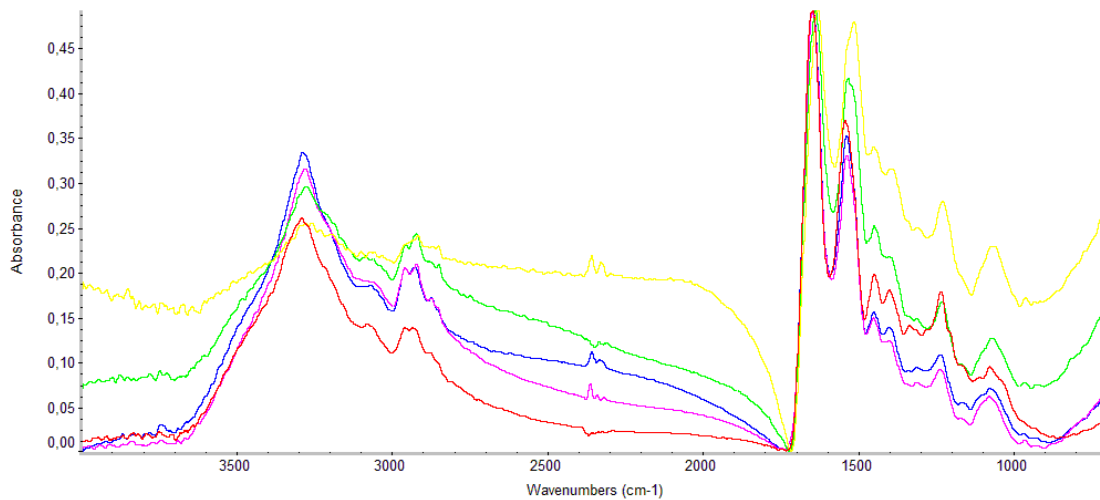
Εικόνα 15: Μικροτομή λοβιακού *in situ* καρκίνου Grade III (δ.1), όπως φαίνεται στην Video απεικόνιση του φασματοφωτομέτρου. Κάθε παράλληλη γραμμή αντιστοιχεί στα βήματα του μικροσκοπίου

Στο Σχήμα 1 φαίνονται τα FT-IR φάσματα τμήματος του χάρτη λοβιακού καρκίνου τύπου Grade III, που λήφθηκαν σε όλη την επιφάνεια του δείγματος. Παρατηρείται ότι τα φάσματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Οι διαφορές αυτές είναι επαναλήψιμες για κάθε λοβιακό *in situ* καρκίνο Grade III και για όλους τους ασθενείς. Στο ίδιο χρώμα ανήκουν τα φάσματα που απορρέουν από ιστό με ίδια βιολογική και βιοχημική συμπεριφορά. Αυτό ερμηνεύεται ότι οι υγιείς ή οι ασθενείς ιστοί έχουν ίδιο φάσμα ανεξάρτητα από την θέση του δείγματος στην οποία βρίσκονται. Αυτό αποδεικνύεται και από την ιστοπαθολογική εξέταση ότι το δείγμα δεν είναι πάντα σε όλη την έκταση καρκινικό ή ότι στο ίδιο δείγμα περιέχονται διάφορες φάσεις ανάπτυξης του καρκίνου. Μικρή χρωματική ζώνη δείχνει περιορισμένο αριθμό υπέρυθρων φασμάτων με τις ίδιες ιδιότητες, ενώ αντίθετα μεγάλη ζώνη δείχνει μεγάλο αριθμό υπέρυθρων φασμάτων με τις ίδιες ιδιότητες



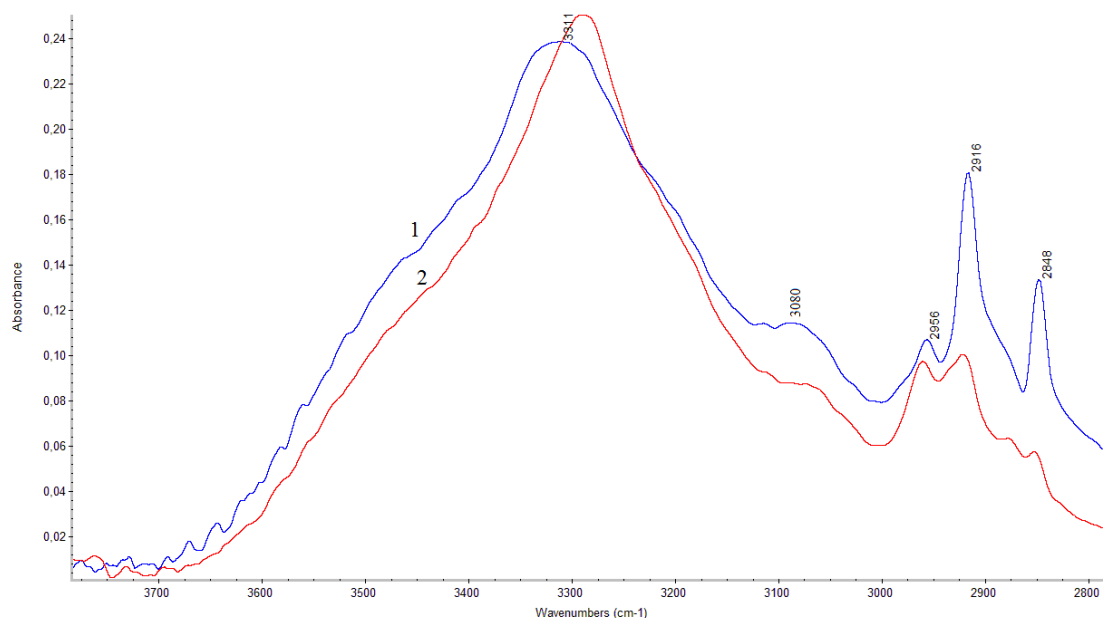
Σχήμα 1: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού *in situ* καρκίνου του μαστού *grade III* στην περιοχή $4000-700\text{ cm}^{-1}$.

Στο Σχήμα 2 διακρίνονται μερικά από τα υπέρυθρα φάσματα σε διάφορες θέσεις του χάρτη του δείγματος. Παρατηρείται ότι τα φάσματα για το ίδιο ιστολογικό δείγμα διαφέρουν μεταξύ τους. Η διαφορά εξαρτάται από την θέση ανάπτυξης της ασθένειας αλλά και το στάδιο του καρκίνου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαφορές μεταξύ των φασμάτων είναι αντίστοιχες εκείνων των ιστοπαθολογικών δεδομένων.



Σχήμα 2: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού *in situ* καρκίνου του μαστού *grade III* στην περιοχή $4000-700\text{ cm}^{-1}$.

Για βελτίωση της ευκρίνειας και μελέτης των μεταβολών στις εντάσεις αλλά και στις μετατοπίσεις των ταινιών τα φάσματα διαχωρίστηκαν σε μικρότερες περιοχές. Στο Σχήμα 3 δίνονται τα FT-IR φάσματα στην περιοχή $4000-2800\text{ cm}^{-1}$ για δύο τυχαία φάσματα που λήφθηκαν σε δύο διαφορετικές θέσεις.



Σχήμα 3: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού καρκίνου του μαστού *grade III* στην περιοχή $4000-2800\text{ cm}^{-1}$ στις θέσεις 1; 21557,6038, 1399 και 2;20072,13777, 1399 του δείγματος, ως προς το κέντρο του μικροσκοπίου

Παρατηρείται ότι σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φασμάτων εμφανίζονται σε όλη την περιοχή του φάσματος από $4000-700\text{ cm}^{-1}$. Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ

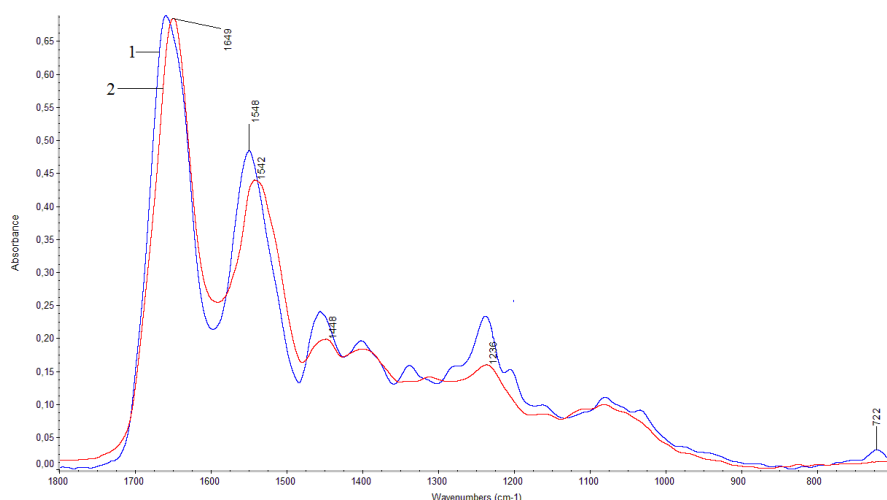
4000-2800 εμφανίζονται οι ταινίες απορρόφησης των δονήσεων τάσης ομάδων νNH των αμινοξέων καθώς και οι ταινίες των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλ (νCH₃) και μεθυλενομάδων (νCH₂) των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων. Από την μετατόπιση των ταινιών στα 3311 cm⁻¹ προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς φαίνεται ότι, αυξανόμενης της βλάβης λόγω της ασθένειας, μειώνονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων των πρωτεϊνών, καθώς επίσης και του DNA.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι η ένταση της ταινίας στα 3060 cm⁻¹ αυξάνεται με την ασθένεια ενώ αυξάνει περαιτέρω από grade I σε grade II. Η ταινία αυτή αποδίδεται στην υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών. Η ταινία αυτή με την αντίστοιχη ταινία στα 1740 cm⁻¹ δείχνει ότι παράλληλα με την ανάπτυξη του καρκίνου αυξάνει η παραγωγή αλδευδών. Στον μηχανισμό ανάπτυξης φαίνεται να συμπεριλαμβάνονται αντιδράσεις ελευθέρων ριζών, οι οποίες οδηγούν σε υπεροξειδωση από το μοριακό οξυγόνο των κυττάρων. Πιθανόν ένα από τα αίτια που συμβάλλουν στην μείωση του οξυγόνου (ανοξία) στα καρκινικά κύτταρα να είναι οι πολλές υπεροξειδώσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξή του.

Στην περιοχή 3000-2850 cm⁻¹ οι ταινίες που εμφανίζονται στα 2954 και 2880 cm⁻¹ αποδίδονται στις αντισυμμετρικές (ν_{as}CH₃) και συμμετρικές (ν_sCH₃) δονήσεις τάσης των μεθυλομάδων, αντίστοιχα. Οι αντισυμμετρικές (ν_{as}CH₂) και συμμετρικές (ν_sCH₂) δονήσεις τάσης των μεθυλενομάδων απαντώνται στα 2924 και 2854 cm⁻¹, αντίστοιχα. Deconvolution της περιοχής έδειξε ότι οι ταινίες των συμμετρικών και αντισυμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλενομάδων είναι διπλές, γεγονός που αποδεικνύει ότι μέρος των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων έχουν σπάσει και επομένως έχει μεταβληθεί το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την μεταβολή των εντάσεων των ταινιών. Η αύξηση της έντασης δεν είναι αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των ανθρακικών αλυσίδων, αλλά οφείλεται στην αύξηση των βαθμών ελευθερίας κινήσεων των αλειφατικών αλυσίδων. Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών των δονήσεων τάσης των ομάδων συνεπάγεται επίσης ότι έχει μειωθεί σημαντικά η λιποφολικότητα των ανθρακικών αλυσίδων ως αποτέλεσμα της σχάσης του μήκους των ανθρακικών αλυσίδων. Η μείωση του μήκους των ανθρακικών αλυσίδων προκύπτει και από την παρατηρούμενη αύξηση της έντασης της ταινίας που εμφανίζεται στους 3080 περίπου κυματαριθμούς. Η ταινία αυτή αποδίδεται στην δόνηση τάσης ν=C-H, με ολεφινικό χαρακτήρα [52-55].

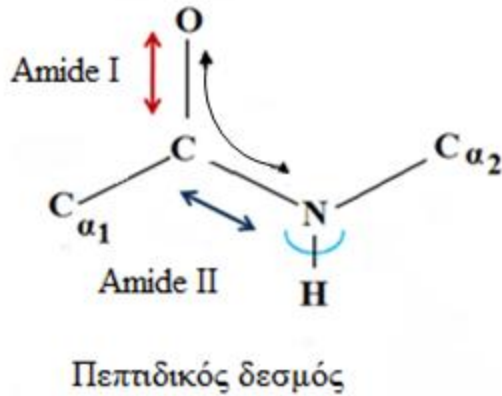
Στο Σχήμα 4 ενδεικτικά δίνονται δύο από τα χιλιάδες FT-IR φάσματα του λοβιακού καρκίνου του μαστού grade III, που λήφθηκαν στα σημεία 21557, 6038, 1399 και 20072,

13777, 1399 ως προς το κέντρο που μικροσκοπίου στην περιοχή του φάσματος 1800-700 cm^{-1} .



Σχήμα 4: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού καρκίνου του μαστού *grade III* στην περιοχή 1800-700 cm^{-1} στις θέσεις 1; 21557,6038, 1399 και 2; 20072,13777, 1399, ως προς το κέντρο του μικροσκοπίου

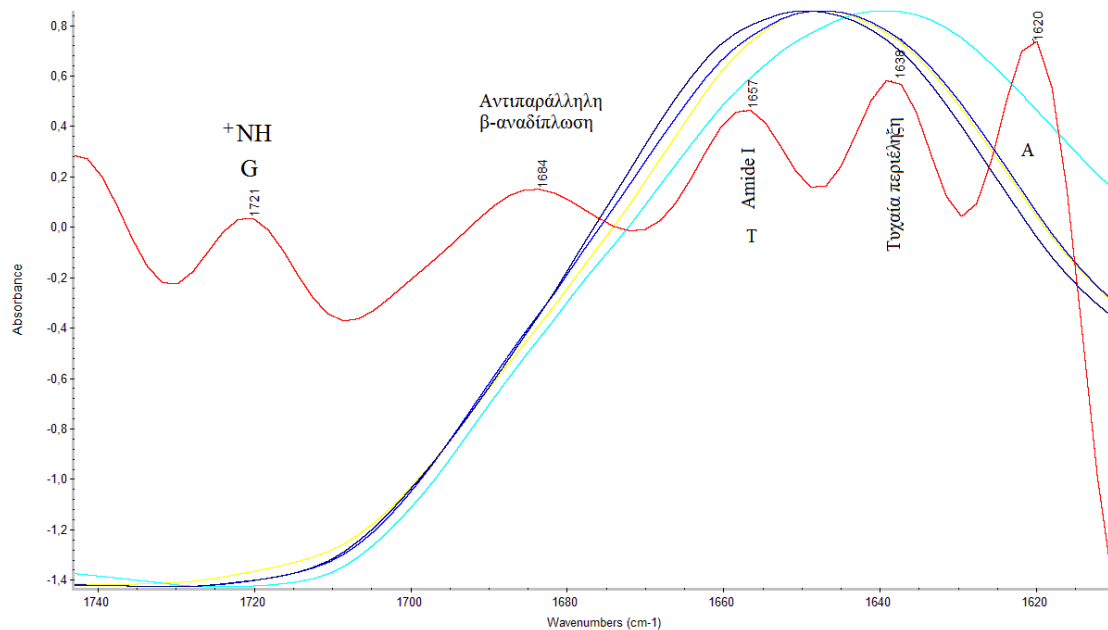
Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 1700-700 cm^{-1} εμφανίζονται οι δονήσεις των ταινιών που αποδίδονται στις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων των αμιδίων των πεπτιδικών δεσμών. Οι δονήσεις αυτές παρέχουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος της βλάβης που προκαλεί η επικείμενη ασθένεια στην δευτεροταγή δομή κυρίως των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια στους ιστούς. Έτσι, για υγιείς ιστούς η ταινία που απορρέει από την δόνηση των Amide I των πεπτιδικών δεσμών $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}-$ των πρωτεϊνών αναμένεται να εμφανισθεί στους 1650 cm^{-1} . Η ταινία αυτή δείχνει επίσης την επικρατέστερη συμμετοχή της συχνότητας της ομάδας $\nu\text{C}=\text{O}$ έναντι των ομάδων νNH στον πεπτιδικού δεσμού.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση πεπτιδικού δεσμού

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών αυτών σε μικρότερους κυματαριθμούς συμπεραίνεται ότι όσο προχωρά η εξέλιξη της νόσου, η μοριακή διαμόρφωση της έλικας των αμινοξέων μεταβάλλεται σταδιακά από α-έλικα σε β-πτυχωτή και μετά αποκτά τυχαία περιέλιξη (αδιαμόρφωση) [52-55].

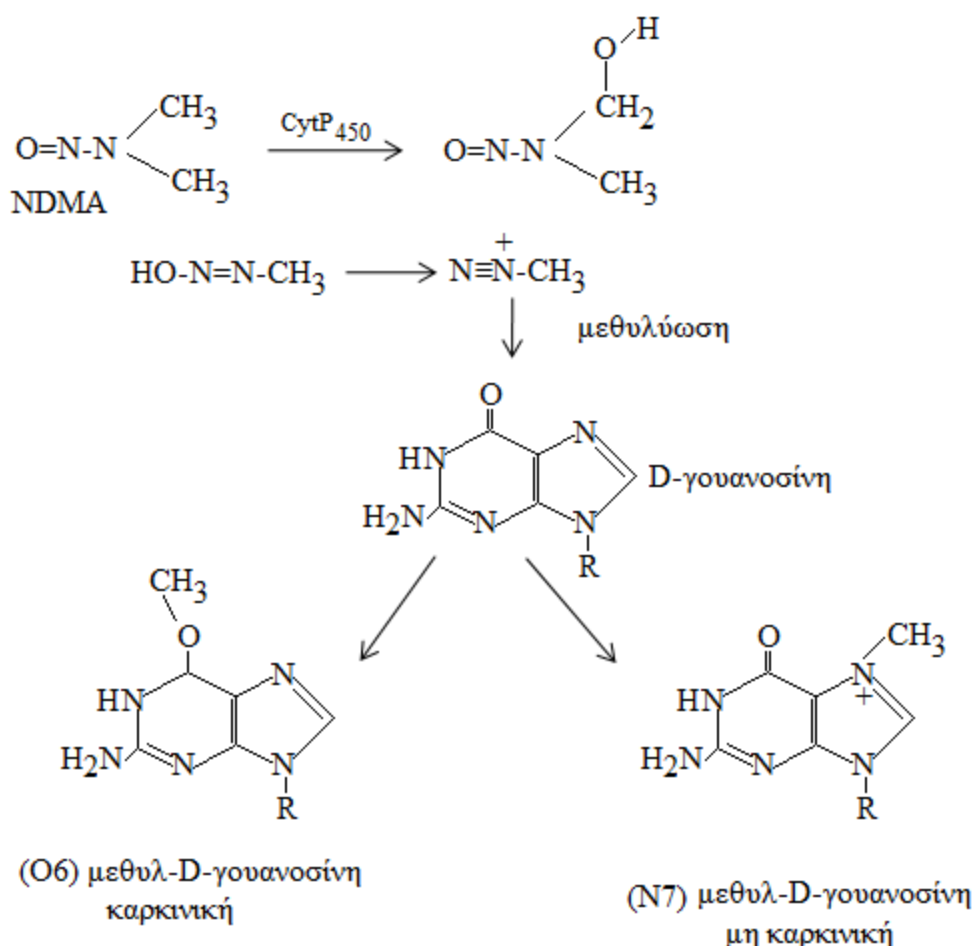
Επιλέγοντας ένα ακόμη πιο στενό παράθυρο ανάλυσης στην περιοχή $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ του δείγματος 1(λοβιακό) (Σχήμα 5) παρατηρούμε ότι η αναμενόμενη χαρακτηριστική ταινία στα 1717 cm^{-1} που αποδίδεται στην εντός επιπέδου δόνηση (in-plane) της γουανίνης του B-DNA μειώνεται σημαντικά μέχρι και την εξαφάνισή της [56,57].



Σχήμα 5: micro-FT-IR φάσματα λοβιακού καρκίνου του μαστού grade III στην περιοχή $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ του δείγματος 1.

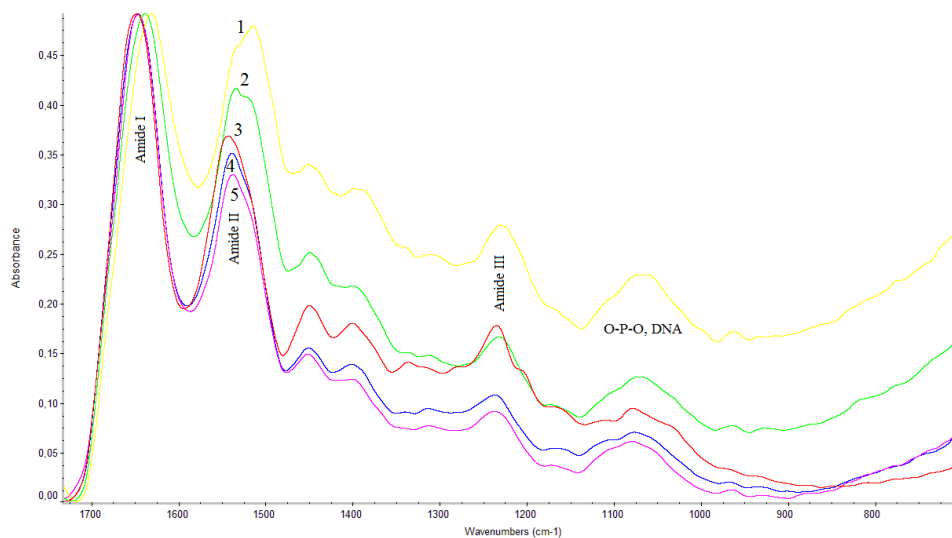
Η ταινία αυτή φαίνεται μόνο μετά από deconvolution του φάσματος αν και πάλι είναι σχετικά ασθενής και μόνο η εμπειρία και επαναληψιμότητα την κάνουν αποδεκτή. Από την ανάλυση αυτή φαίνεται ότι λόγω του καρκίνου το DNA από B διαμόρφωση που έχει στη φυσιολογική κατάσταση καταστρέφεται και σε συνδυασμό με τις μεταβολές των φασμάτων στην περιοχή $1200-700\text{ cm}^{-1}$ φαίνεται ότι αποκτά διαμόρφωση Z-DNA. Αυτό διαπιστώθηκε και από την απορρόφηση της δόνησης της βάσης της κυτοσίνης, η οποία ως γνωστόν στην έλικα του DNA σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την γουανίνη, που από τα 1492 cm^{-1} μετατοπίζεται στα 1486 cm^{-1} , ενώ η έντασή της έχει μειωθεί σημαντικά.

Είναι γνωστό ότι σε πολλούς καρκίνους μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του μαστού, κατά την καρκινογένεση γίνεται μεθυλίωση του DNA [58]. Η μεθυλίωση γίνεται με μηχανισμό ανάλογο με αυτόν της αντίδρασης της γουανίνης (βάσης του DNA) με την N-νιτροζοδιμεθυλ αμίνη (NDMA) σύμφωνα με την Εικόνα 17 [59,60]:



Εικόνα 17: Σχηματική παράσταση της μεθυλίωσης της βάσης της γουανίνης

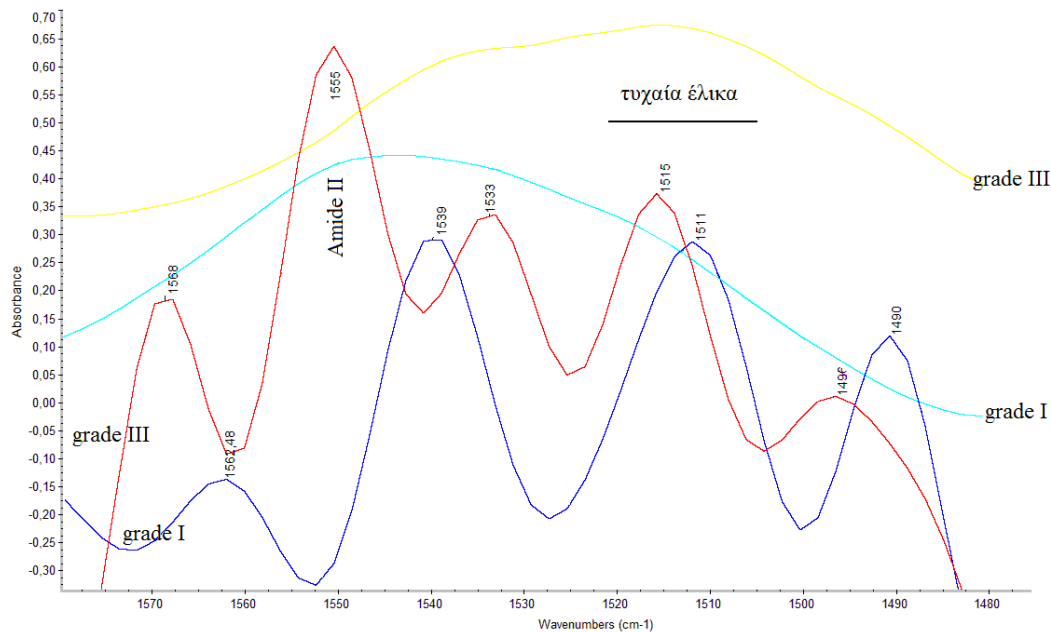
Η μεθυλίωση μπορεί να γίνει είτε στην θέση N7 είτε στην θέση O6 της βάσης της γουανίνης. Στην πρώτη περίπτωση το προϊόν δεν προκαλεί μεταλλάξεις, ενώ στην δεύτερη περίπτωση οδηγεί σε καρκινογένεση. Η παρουσία του μεθυλίου στην θέση O6 της βάσης καταστρέφει τον δεσμό υδρογόνου στις θέσεις GpC (G=γουανίνη, C=κυτοσίνη) με αποτέλεσμα να χάνεται η ισορροπία της διπλής έλικας. Οι αντιδράσεις της Εικόνας 17 ερμηνεύουν ικανοποιητικά την σημαντική μείωση της έντασης στα 1715 cm^{-1} στους καρκινικούς ιστούς του μαστού.



Σχήμα 6: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού *in situ* καρκίνου του μαστού grade III στην περιοχή $1700\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ του δείγματος I.

Λεπτομερέστερη ανάλυση των φασμάτων 1 και 3 (Σχήμα 6), που αντιστοιχούν στις ακραίες θέσεις grade I και grade III, δείχνει ότι λόγω της ανάπτυξης της νεοπλασίας καταστρέφονται οι ενδομοριακοί δεσμοί (κυρίως δεσμοί υδρογόνου) που συγκρατούν την έλικα των πρωτεϊνών, οδηγώντας στη συνέχεια την πλήρη σχάση και μετατροπή της μοριακής διαμόρφωσης. Οι ταινίες που εμφανίζονται στην περιοχή μεταξύ $1570\text{-}1480\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται κυρίως στις δονήσεις των Amide II. Οι ταινίες αυτές, αναφέρεται στην βιβλιογραφία, ότι δεν είναι πολύ ευαίσθητες στις μεταβολές της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών [61]. Παρ' όλα αυτά, στην περίπτωση του καρκίνου των μαστών οι αναλογίες των Amide I και Amide II έδειξαν αναστροφή.

Στο Σχήμα 7 δίνονται για σύγκριση τα FT-IR φάσματα λοβιακού καρκίνου του μαστού grade III στην περιοχή $1600\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ για καταστάσεις grade I και grade III, δηλαδή στην περιοχή όπου εμφανίζονται οι ταινίες απορρόφησης των Amide II.



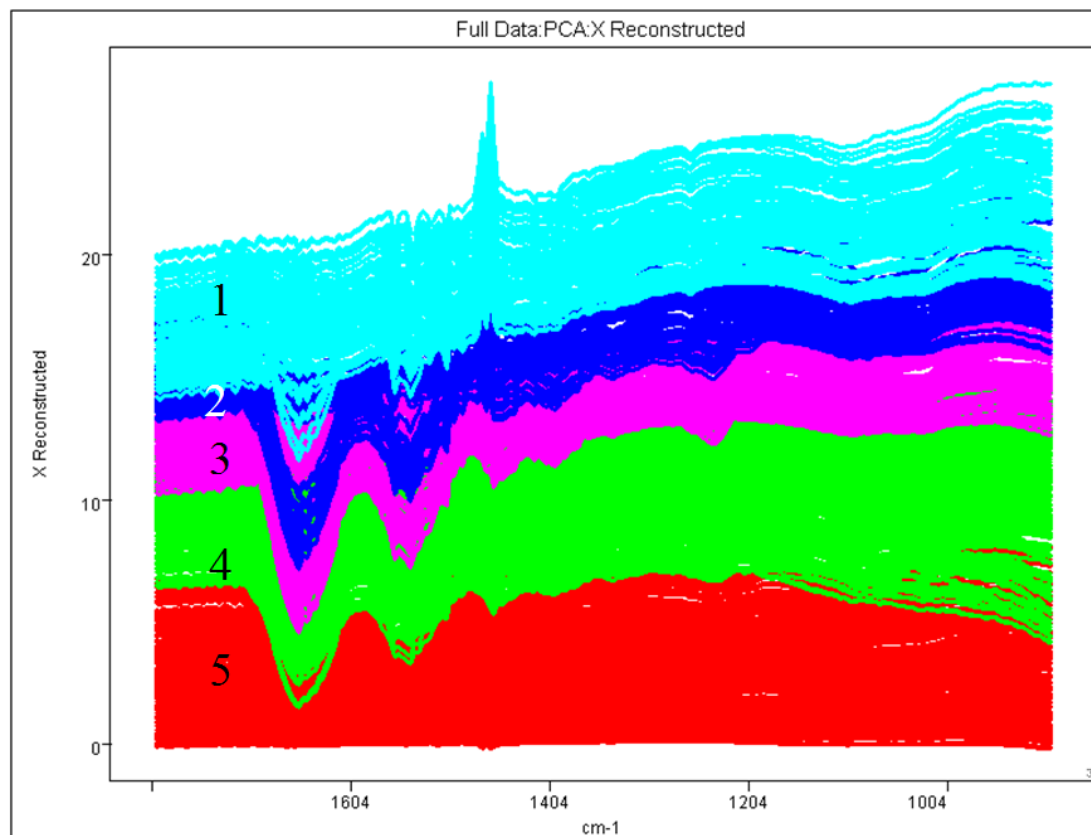
Σχήμα 7: Deconvolution των φασμάτων λοβιακού *in situ* καρκίνου του μαστού grade I και grade III στην περιοχή των Amide II.

Διαπιστώνεται ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο φασμάτων είναι σημαντικές. Ιδιαίτερα φαίνεται ότι στην φάση της ασθένειας grade III οι μετατοπίσεις των ταινιών προς μικρότερες συχνότητες είναι περισσότερο εμφανείς. Αυτές οι μετατοπίσεις, όπως προαναφέρθηκε, δείχνουν ότι η δευτεροταγής μοριακή δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλεται με την πρόοδο της ασθένειας. Σε συνδυασμό με τις μεταβολές της δομής των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων (περιοχή του φάσματος $3000-2850\text{ cm}^{-1}$), φαίνεται ότι η εμφάνιση του καρκίνου συνοδεύεται με καταστροφή τόσο του DNA όσο και των πρωτεϊνών.

Η ταινία στα 820 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην ριβόζη του σκελετού της αλυσίδας του DNA, αναφέρεται βιβλιογραφικά ως “διαγνωστική ταινία” (marker band), έχει μετατοπισθεί προς μικρότερες συχνότητες στα 813 cm^{-1} [62-64] επιβεβαιώνοντας ότι το DNA από την σταθερή δομή B-DNA μετατράπηκε σε Z-DNA, δηλαδή καρκινικό. Υπάρχουν επίσης σημεία στα οποία το DNA έχει μετατραπεί σε A-DNA. Ο δακτύλιος επομένως της ριβόζης από διαμόρφωση C2'-endo/anti (820 cm^{-1}) μετατρέπεται σε C3'-endo/anti (813 cm^{-1}).

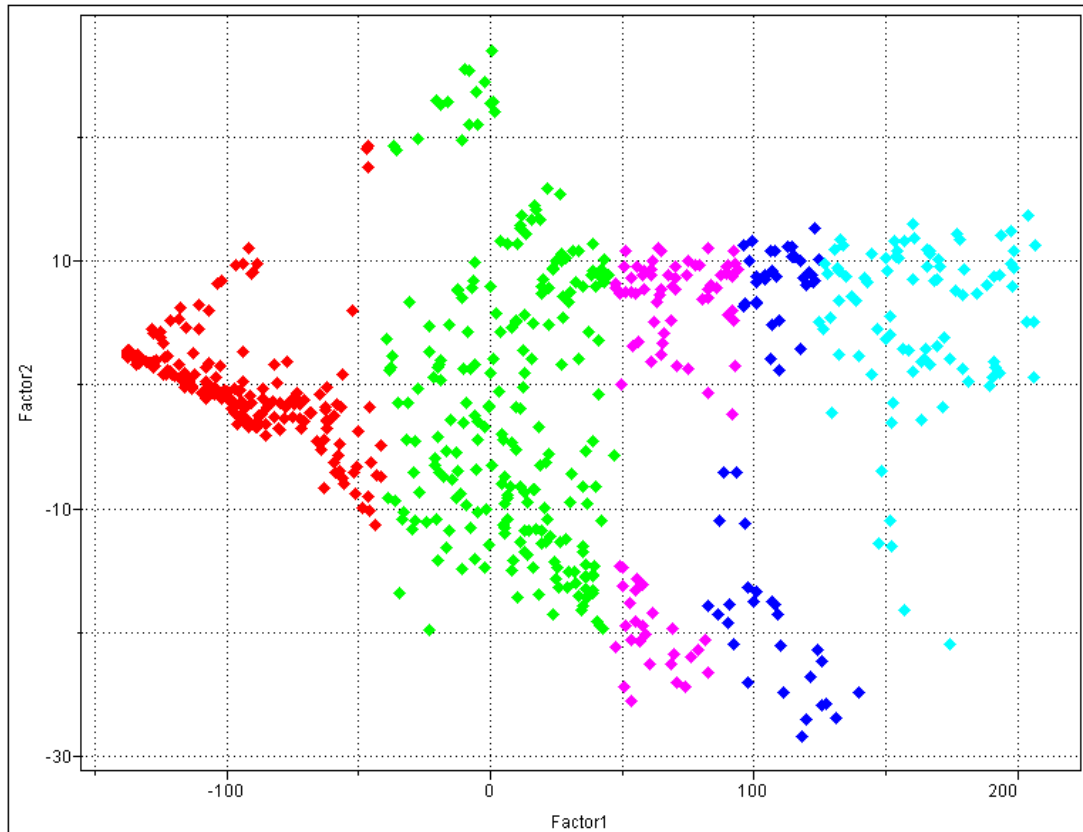
3.2. micro-FT-IR φάσματα *in situ* λοβιακού καρκίνου Grade III (δείγματος 2)

Στην Εικόνα 18 φαίνονται τα micro-FT-IR φάσματα *in situ* λοβιακού καρκίνου μαστού Grade III του δείγματος 2.



Εικόνα 18: *micro-FT-IR* φάσματα *in situ* λοβιακού καρκινώματος σε διάφορες θέσεις της επιφάνειας της μικροτομής. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε φυσιολογικές περιοχές (2) και το κόκκινο σε grade III. Τα ενδιάμεσα χρώματα έχουν διαφορετικές καρκινικές και προκαρκινικές καταστάσεις (Θαλασσί 1).

Η ανάλυση των φασμάτων έδωσε παρόμοια συμπεριφορά ως προς το προηγούμενο δείγμα (δ.1). Η χρωματική διαβάθμιση των ίδιων φασμάτων στην έκταση του προς ανάλυση καρκινικού ιστού, δείχνει την συνύπαρξη κυττάρων που αρχίζει από τα υγιή, προκαρκινικά και διαφόρων σταδίων εξέλιξης της ασθένειας.



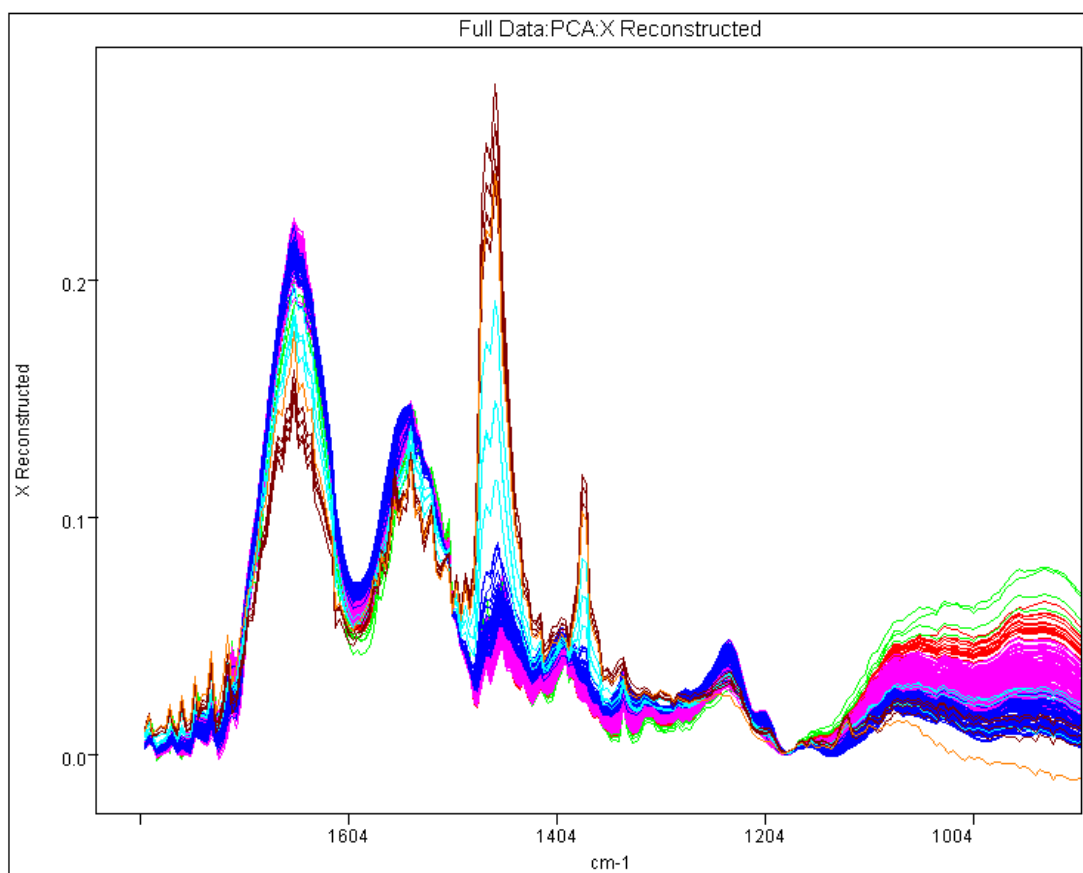
Εικόνα 19: Κατανομή σύμφωνα με τα υπέρυθρα φάσματα των υγιών και καρκινικών κυττάρων στον εξεταζόμενο ιστό. Το μπλε αντιστοιχεί σε υγιή κύτταρα, τα κόκκινο Grade III, το πράσινο Grade II, το ροζ Grade I και το θαλασσί σε προκαρκινικά.

Στην Εικόνα 19 φαίνεται η κατανομή των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, του δείγματος του ιστού με λοβιακό καρκίνο Grade III, σύμφωνα με τα υπέρυθρα φάσματά τους. Από την χρωματική διαφορά αποδεικνύεται ότι μεταξύ των καρκινικών κυττάρων του ιστού με βαθμό Grade III υπάρχουν όλες οι διαβαθμίσεις.

Συγκρινόμενα τα φασματοσκοπικά δεδομένα με τα αντίστοιχα ιστολογικά μπορούμε να συμπεράνουμε ότι με την υπέρυθρη φασματοσκοπία είναι δυνατή η διάκριση ακόμη και ενός μοναδιαίου καρκινικού κυττάρου.

3.3. micro-FT-IR φάσματα λοβιακού καρκίνου μαστού Grade II(δείγματος 3)

Στο Σχήμα 8 φαίνονται τα micro-FT-IR φάσματα λοβιακού καρκίνου μαστού Grade II στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $1800-700\text{ cm}^{-1}$.

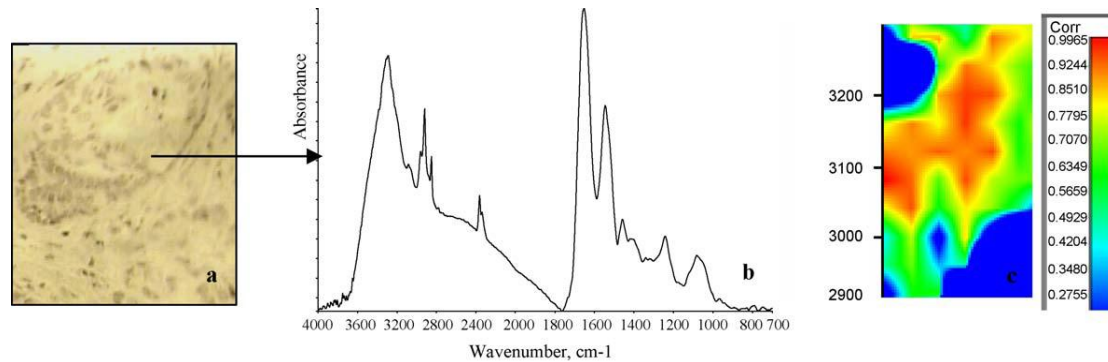


Σχήμα 8: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού καρκίνου μαστού Grade II(δ.3). περιοχή 1800-800 cm^{-1} .

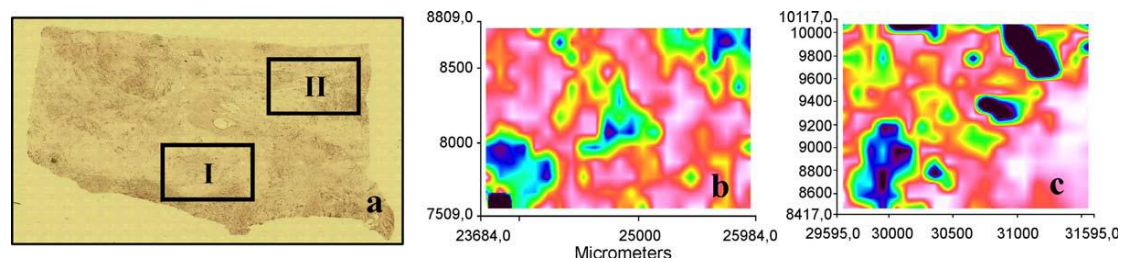
Στα φάσματα παρατηρείται μία έντονη αύξηση της έντασης ταινίας στα 1455 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην αντισυμμετρική δόνηση κάμψης δCH_3 των αλειφατικών αλυσίδων των πρωτεϊνών και του κολλαγόνου. Η αύξηση αυτή δείχνει τόσο την αύξηση του αριθμού των μεθυλομάδων όσο και με την μεταβολή του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η μεθυλίωση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου.

3.4. Micro-FT-IR πορογενούς καρκίνου

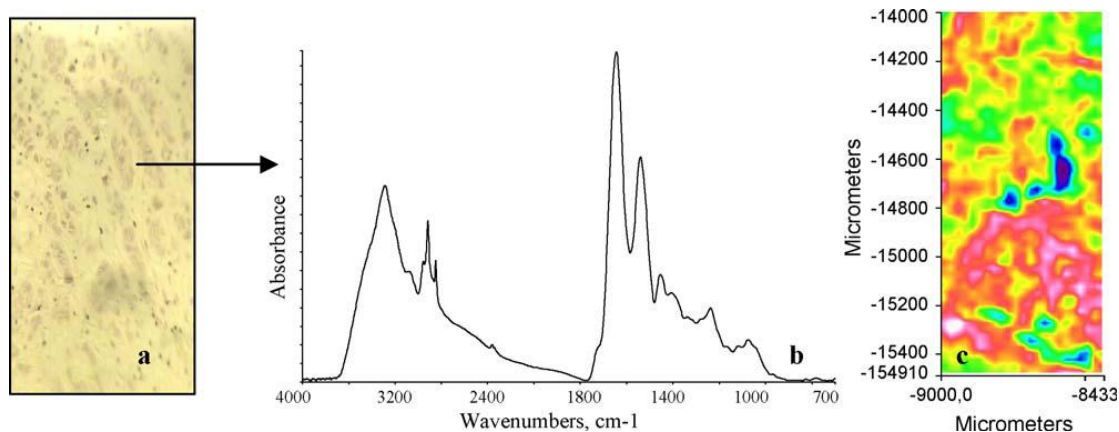
Στην Εικόνα 20 δίνεται η φωτογραφία από την βιντεοκάμερα του μικροσκοπίου του φασματοφωτομέτρου ενός πορογενούς *in situ* καρκίνου (a) το αντίστοιχο φάσμα από τον καρκίνο στο σημείο που δείχνει το βέλος (b) και η συσχέτιση της χαρτογραφικής κατανομής των φασμάτων (c).



Εικόνα 20: Πορογενής *in situ* καρκίνος (a), το αντιπροσωπευτικό φάσμα του καρκίνου στη θέση του βέλους (b) και η χαρτογράφηση (c)



Εικόνα 21: Πορογενής *in situ* καρκίνος Grade I και Grade II (a) χαρτογράφηση της περιοχής με Grade I (b) και χαρτογράφηση της περιοχής με Grade II (c)

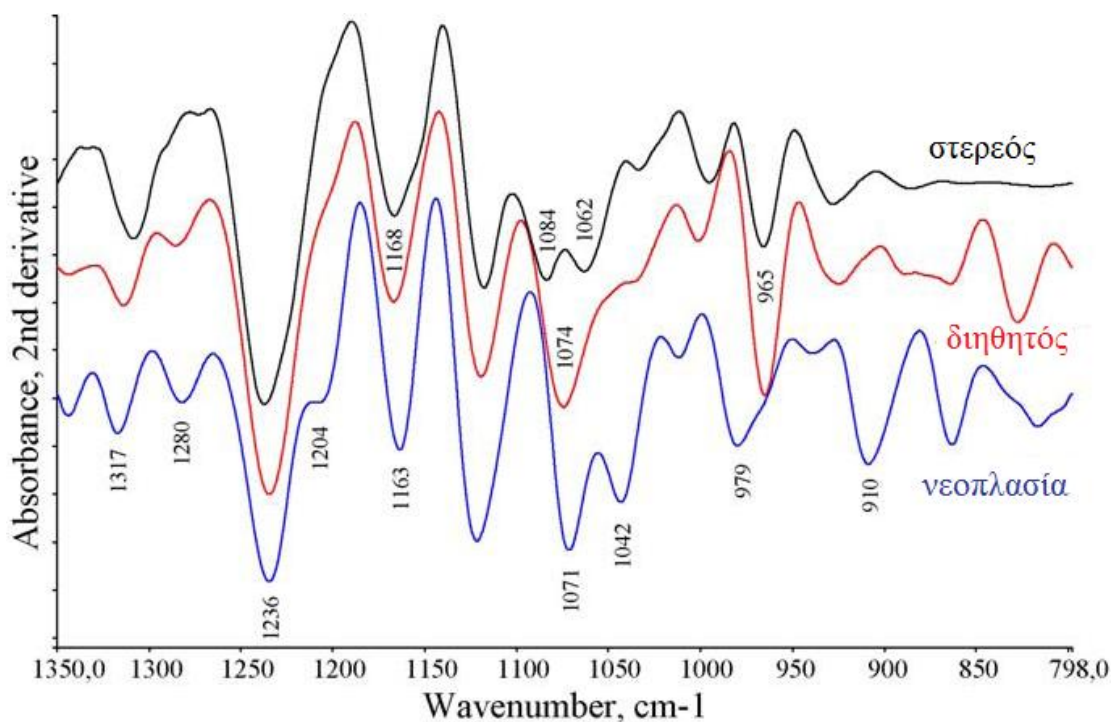


Εικόνα 22: Διηθητικός πορογενής καρκίνος (a), το αντιπροσωπευτικό φάσμα του καρκίνου στη θέση του βέλους (b) και η χαρτογράφηση (c)

Από την σύγκριση των βασικών χαρακτηριστικών φασμάτων του πορογενούς καρκίνου φαίνεται ότι τα φάσματα είναι παρόμοια. Παρόλα αυτά, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον διηθητικό πορογενή καρκίνο Grade II. Από τον λόγο των εντάσεων των ταινιών στις συχνότητες $1660/1635\text{ cm}^{-1}$ που αναφέρεται στις σχέσεις των λόγων α-έλικας προς β-επίπεδο, βρέθηκε ότι ο λόγος αυξάνει από Grade I σε Grade II. Οι δονήσεις των ομάδων C-OH των σακχάρων μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματαριθμούς.

Τέλος στον πορογενή καρκίνο Grade II παρατηρείται ότι αυξάνει η ένταση της ταινίας στα 970 cm^{-1} [5,6,65]. Η αύξηση της έντασης αποδίδεται στην αύξηση της συγκέντρωσης του DNA.

Στο Σχήμα 9 δίνεται η δεύτερη παράγωγος στερεού καρκίνου, διηθητικού καρκίνου και νεοπλασίας.



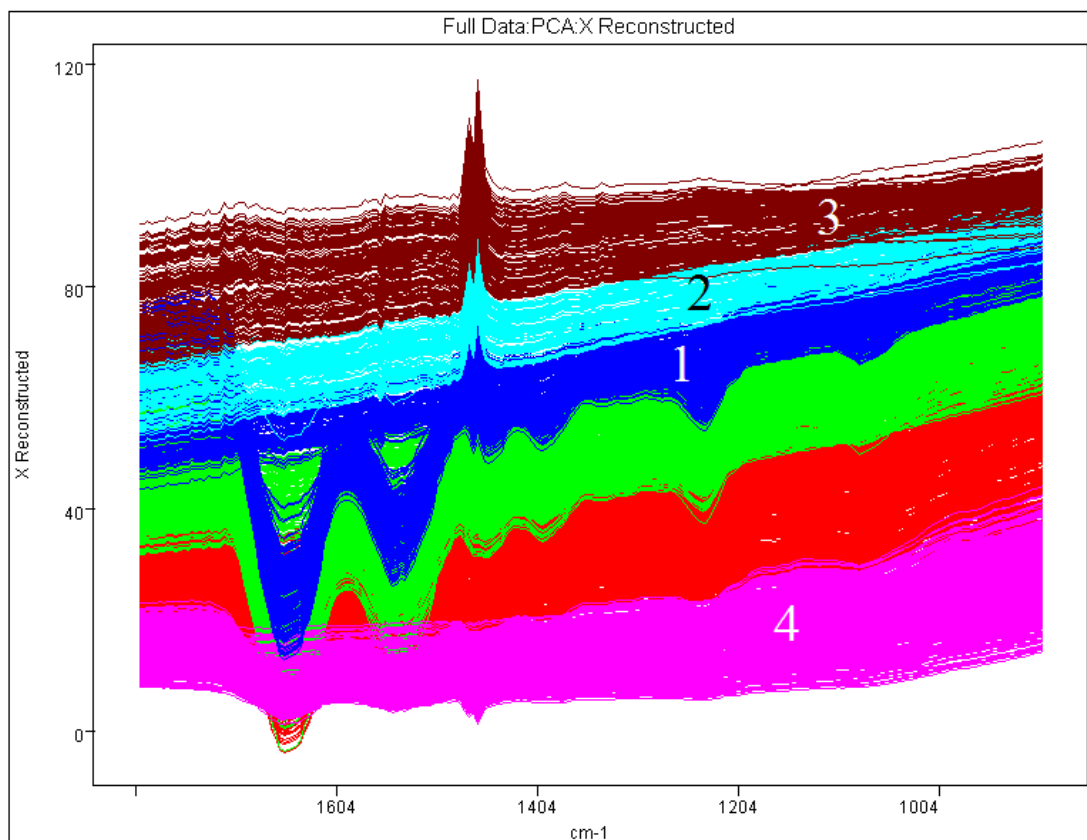
Σχήμα 9: Απορρόφηση και δεύτερη παράγωγος στερεού καρκίνου, διηθητικού καρκίνου και νεοπλασίας στην περιοχή $1350\text{--}800\text{ cm}^{-1}$.

Οι ταινίες των Amide III του κολλαγόνου στις συχνότητες 1204 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} και 1317 cm^{-1} εμφανίζονται μόνο στην νεοπλασία, ενώ απουσιάζει από τις άλλες δύο περιπτώσεις. Οι δονήσεις των ομάδων C–H των υδρογονανθράκων μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματαριθμούς από τον στερεό καρκίνο προς τον διηθητικό και την νεοπλασία. (από 1163 σε 1168 cm^{-1}). Η μετατόπιση αυτή σχετίζεται με την φωσφοριλύωση, αφού αυξάνουν οι ομάδες C–OP. Η μορφή της ταινίας στα 1084 cm^{-1} μαζί με την ταινία στα 1030 cm^{-1} στους στερεούς καρκίνους γίνεται απλή στους διηθητικούς (1074 cm^{-1}) και στην νεοπλασία εμφανίζεται στα 1071 and 1042 cm^{-1} . Η δόνηση κάμψης των ομάδων O–P–O του DNA από τα 965 cm^{-1} στους στερεούς και διηθητικούς καρκίνους μετατοπίζεται στα 979 cm^{-1} και επικαλύπτεται με μια δεύτερη ταινία στα 910 cm^{-1} . Η τελευταία ταινία συνδέεται με τον σχηματισμό μονοεστέρος, λόγω των φωσφοριλυμένων πρωτεϊνών.

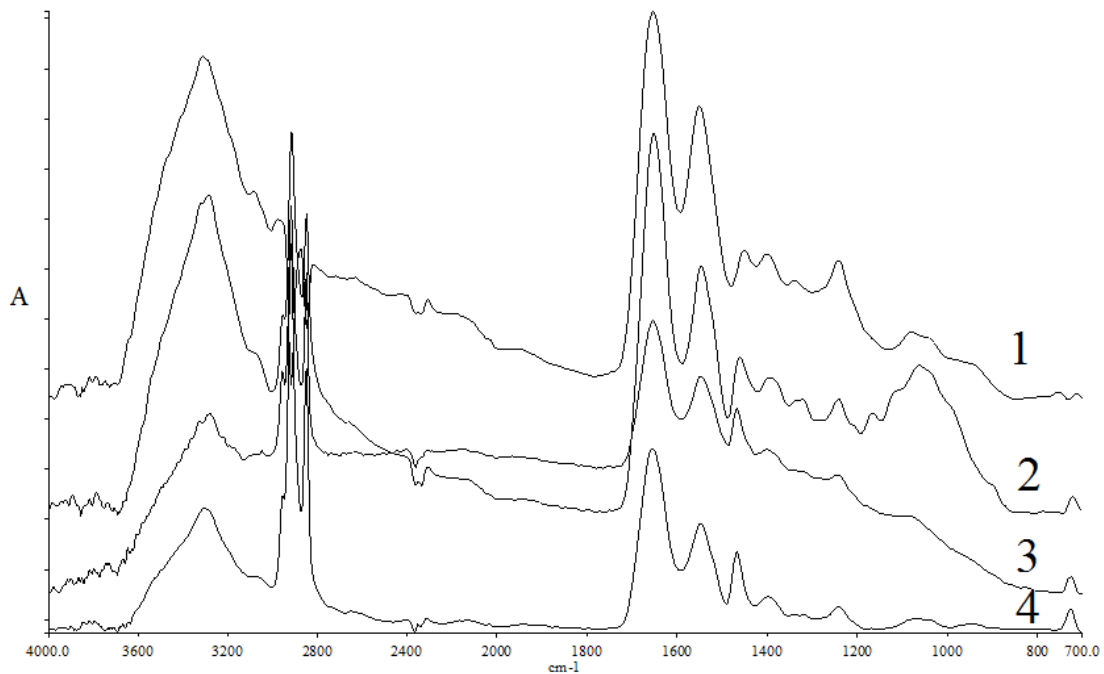
Οι παρατηρούμενες μεταβολές δείχνουν ότι όχι μόνον οι μεταβολές των μοριακών δομών των βιολογικών μορίων επηρεάζουν τα υπέρυθρα φάσματα, αλλά και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα βιολογικά μόρια επιδρά πάνω στην μορφή των υπέρυθρων φασμάτων.

3.5. Micro-FT-IR πορογενούς in situ καρκίνου (δείγματος 9)

Στην Εικόνα 23 φαίνονται τα χαρτογραφημένα micro-FT-IR φάσματα πορογενούς καρκίνου Grade III, ενώ στο Σχήμα 10 δίνονται μερικά από τα χαρακτηριστικά φάσματα των αντίστοιχων χρωματικών περιοχών.



Εικόνα 23: Απορρόφηση και δεύτερη παράγωγος στερεού καρκίνου, διηθητικού καρκίνου και νεοπλασίας στην περιοχή $1350-800\text{ cm}^{-1}$.

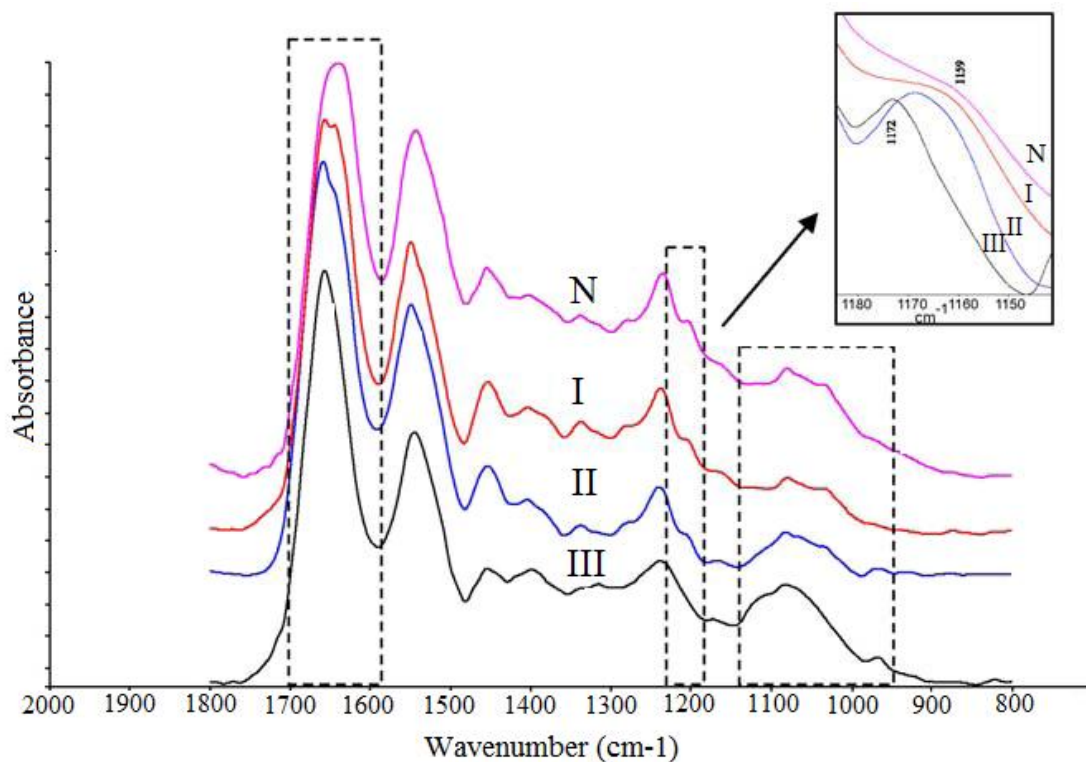


Σχήμα 10: Χαρακτηριστικά FT-IR φάσματα πορογενούς *in situ* καρκίνου Grade III στην περιοχή $4000-800\text{ cm}^{-1}$. Τα φάσματα 1,2,3 και 4 αντιστοιχούν στις χρωματικές περιοχές των φασμάτων της Εικόνας 23.

Παρατηρείται ότι τα υπέρυθρα φάσματα δεν διαφέρουν από τα φάσματα του πορογενούς καρκίνου Grade III. Από την ανομοιογένεια των φασμάτων συμπεραίνεται η ανομοιογένεια της κατανομής του καρκίνου που επικρατεί στον ιστό του μαστού. Οι πιο σημαντικές διαφορές παρατηρούνται, όπως αναμένεται, στην περιοχή $1200-900\text{ cm}^{-1}$, όπου εμφανίζονται οι ταινίες απορρόφησης των φωσφορικών ομάδων του DNA. (PO_2^-)

3.6. Σύγκριση *micro* FT-IR φασμάτων διαφορετικών Grade

Συνεχίζοντας την έρευνα συμπεριλάβαμε όλα τα φάσματα στερεού καρκίνου στα τρία στάδια εξέλιξης Grade I, II και III και τα συγκρίναμε με τον φυσιολογικό ιστό. Στο Σχήμα 11 δίνονται αντιπροσωπευτικά φάσματα φυσιολογικού (N) και καρκίνου Grade I, II και III στην περιοχή $1800-700\text{ cm}^{-1}$.



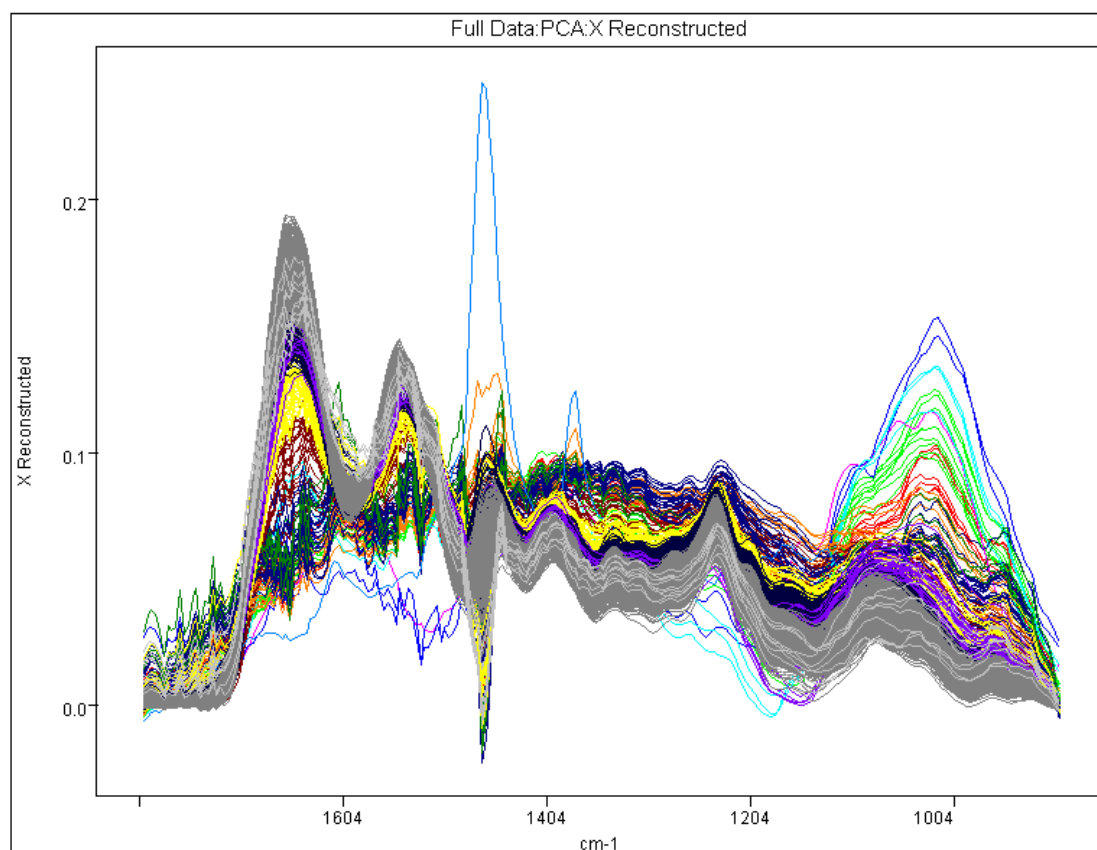
Σχήμα 11: Αντιπροσωπευτικά φάσματα φυσιολογικού (N) και καρκίνου Grade I, II και III στην περιοχή $1800-700\text{ cm}^{-1}$.

Από τη σύγκριση των φασμάτων φαίνεται ότι στους φυσιολογικούς ιστούς η χαρακτηριστική ταινία των ομάδων Amide I απαντά στα 1641 cm^{-1} και σε καρκίνο Grade I, II εμφανίζονται αντίστοιχα στους 1643 cm^{-1} και 1655 cm^{-1} κυματαριθμούς. Στον καρκίνο Grade III η ταινία μετατοπίζεται περισσότερο προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς και απαντά στα 1658 cm^{-1} . Η συμπεριφορά αυτή δείχνει την σταδιακή εξέλιξη της επίδρασης της νόσου, η οποία επηρεάζει την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και κυρίως του κολλαγόνου και που διαφοροποιεί την παρουσία της α-έλικας και β-επίπεδη διαμόρφωσης. Ο συνδετικός ιστός είναι ακόμη παρών στο στάδιο I, σε μικρότερη συγκέντρωση στο στάδιο II. Στο στάδιο II είναι ορατή ακόμη η ταινία του DNA στα 960 cm^{-1} .

Η ταινία απορρόφησης της ομάδας C-OH από τα 1162 cm^{-1} που είναι για τα φυσιολογικά κύτταρα μετατοπίζεται προς τα 1171 cm^{-1} για ιστούς που βρίσκονται στο στάδιο III. Επίσης η μορφή και η ένταση της ταινίας στα 1080 cm^{-1} διακρίνεται στο στάδιο III, όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.

3.7. Micro-FT-IR Αδενοκαρκινώματος (δείγματος 6)

Στην Εικόνα 24 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα αδενοκαρκινώματος. Από την χαρτογράφηση του δείγματος φαίνεται ότι τα φάσματα διαφέρουν, όπως και σε άλλες περιπτώσεις, από σημείο σε σημείο του δείγματος. Το ίδιο χρώμα, όπως προαναφέρθηκε αντιστοιχεί σε ίδιο υπέρυθρο φάσμα, αλλά όχι στο ίδιο σημείο.



Εικόνα 24: *micro-FT-IR φάσματα Αδενοκαρκινώματος (δ.6)*

Σημαντικό είναι να τονισθεί η σημαντική αύξηση της έντασης της ταινίας στα 1457 cm^{-1} . Η ταινία αυτή αποδίδεται στην δόνηση κάμψης των μεθυλενομάδων δCH_2 των λιπιδίων. Η αύξηση της έντασης της ταινίας είναι χαρακτηριστική σε πολλά είδη καρκίνου εκτός του καρκίνου του μαστού.

Λαμβάνοντας υπόψη τις συχνότητες και την μορφή των ταινιών απορρόφησης των χαρακτηριστικών ομάδων των συστατικών των κυττάρων (Πίνακας 3), παρατηρείται ότι στο αδενοκαρκίνωμα τα υπέρυθρα φάσματα δείχνουν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες μεταξύ $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι ταινίες απορρόφησης των φωσφορικών ομάδων του κορμού της έλικας του DNA. Στην ίδια περιοχή διαπιστώνεται ότι

υπάρχουν και μικροαποτιτανώσεις. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ταινίες διάγνωσης της εξέλιξης του καρκίνου.

Πίνακας 3: Συχνότητες απορρόφησης χαρακτηριστικών ομάδων και οι αποδόσεις τους.

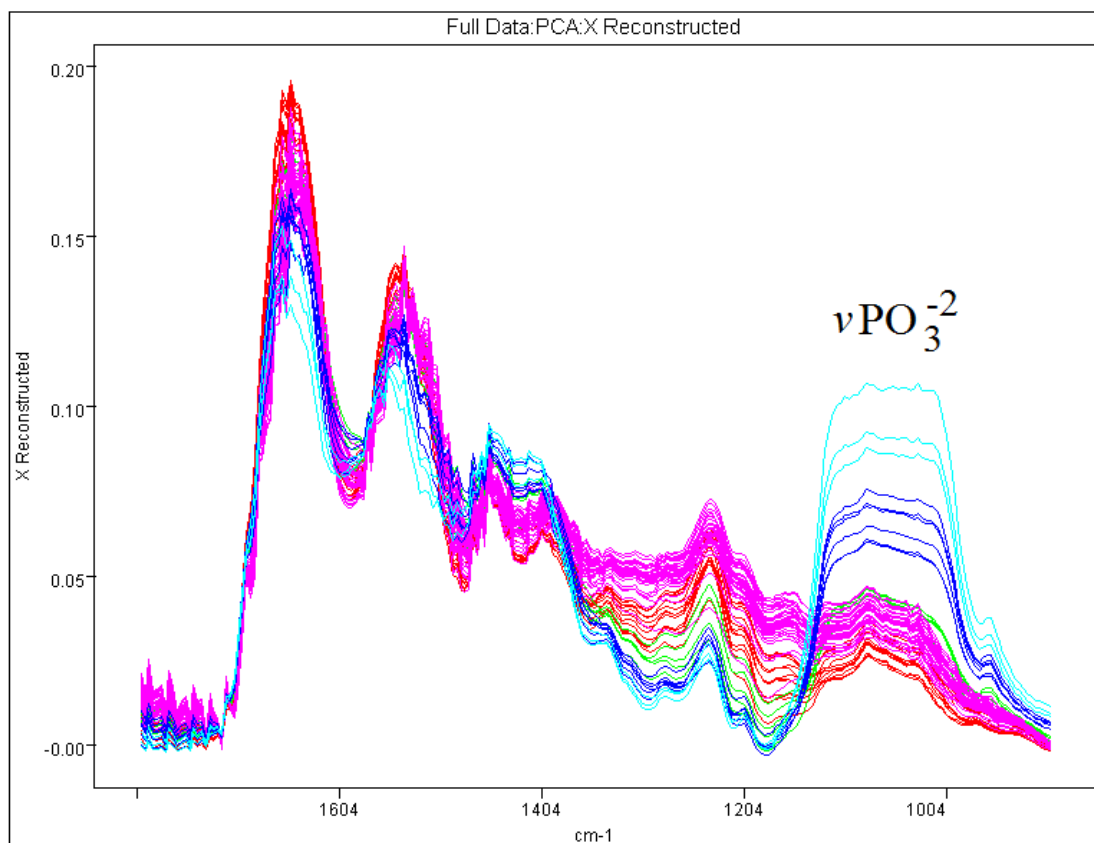
Συχνότητα cm^{-1}	Χαρακτηριστική ομάδα	χαρακτηρισμός
1743	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Αλδεΐδες
1717	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Γουανίνης, εντός επιπέδου διπλής έλικας του DNA
1650	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Amide I των πρωτεϊνών
1549	$\nu\text{C}-\text{N}$, $\delta\text{N}-\text{H}$	Amide II των πρωτεϊνών
1457	$\delta\text{s}(\text{CH}_2)$	Μεθυλενίων των λιπιδίων
1399	$\delta\text{as}(\text{CH}_2)$	Μεθυλενίων των λιπιδίων
1238	$\nu\text{as}(\text{PO}_2^-)$	Φωσφοδιεστέρες των φωσφολιπιδίων και DNA, RNA
1155	$\delta(\text{C}-\text{O})$ C-OH	Ομάδες σακχάρων και αλκοολών
1084	$\nu\text{s}(\text{PO}_2^-)$	Φωσφοδιεστέρες των φωσφολιπιδίων και DNA, RNA
970	$\nu\text{s}(\text{PO}_3^{2-})$	Φωσφοδιεστέρες των φωσφολιπιδίων και DNA, RNA
830	Δακτύλιος σακχάρου	C2'-endo/anti [61-64]
820	Δακτύλιος σακχάρου	C2'-endo/anti [61-64]
813	Δακτύλιος σακχάρου	C3'-endo/anti [61-64]
720	δCH_2	Αλειφατικής αλυσίδας των λιπιδίων

Παρατηρείται ότι σε αρκετές θέσεις του δείγματος οι εντάσεις των ταινιών των απορροφήσεων των φωσφορικών ομάδων του DNA αυξάνονται σημαντικά. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην φωσφορυλίωση κατά την ανάπτυξη του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι κατά την καρκινογένεση η φωσφορυλίωση αποτελεί ένα από τα στάδια

3.8. Micro-FT-IR φάσματα οστεοσαρκώματος (δείγματος 7)

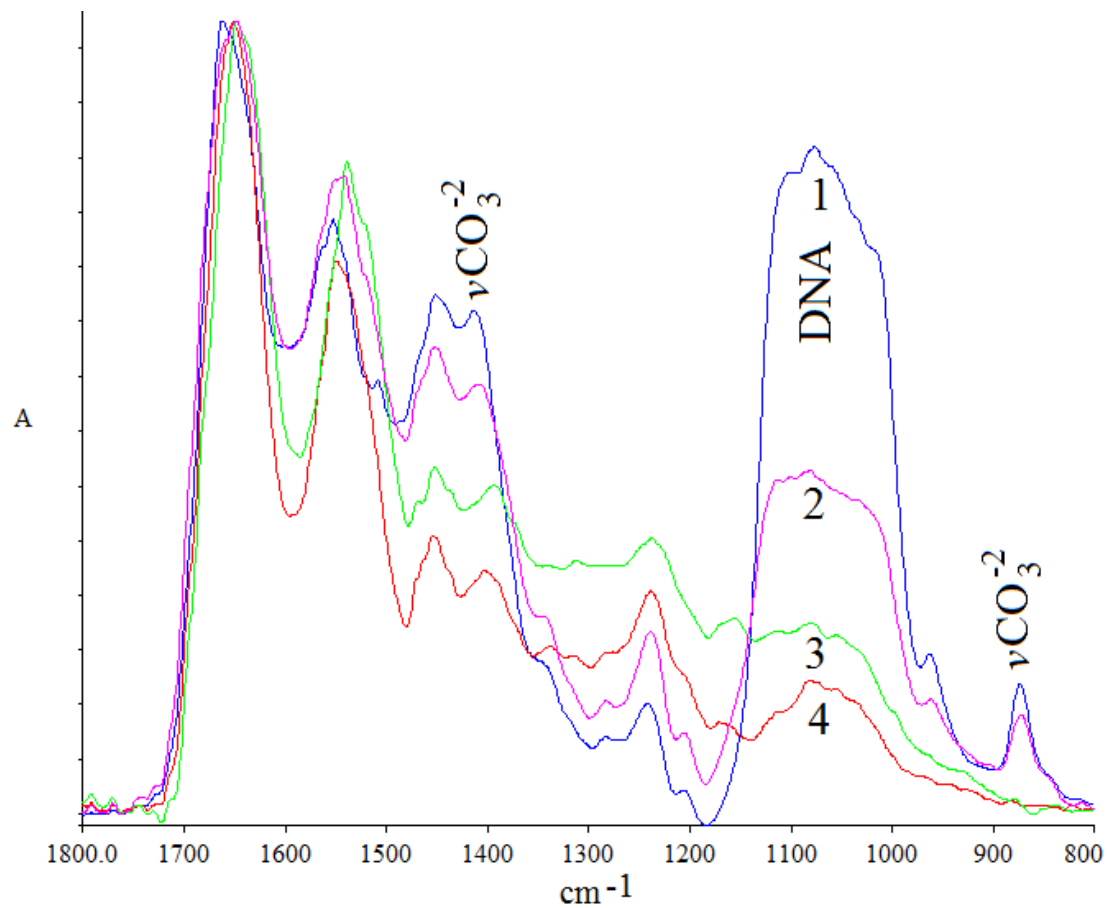
Στην Εικόνα 25 φαίνονται σε μορφή χειμάρρου τα micro-FT-IR φάσματα οστεοσαρκώματος (δ.7) στην περιοχή 1800-700. Συγκρινόμενα τα υπέρυθρα φάσματα με τα αντίστοιχα υπέρυθρα φάσματα όλων των άλλων ειδών καρκίνου φαίνεται μία σημαντική

διαφορά κυρίως στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $1200-900\text{ cm}^{-1}$ όπου απορροφούν οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων του DNA και νουκλεοτιδίων.



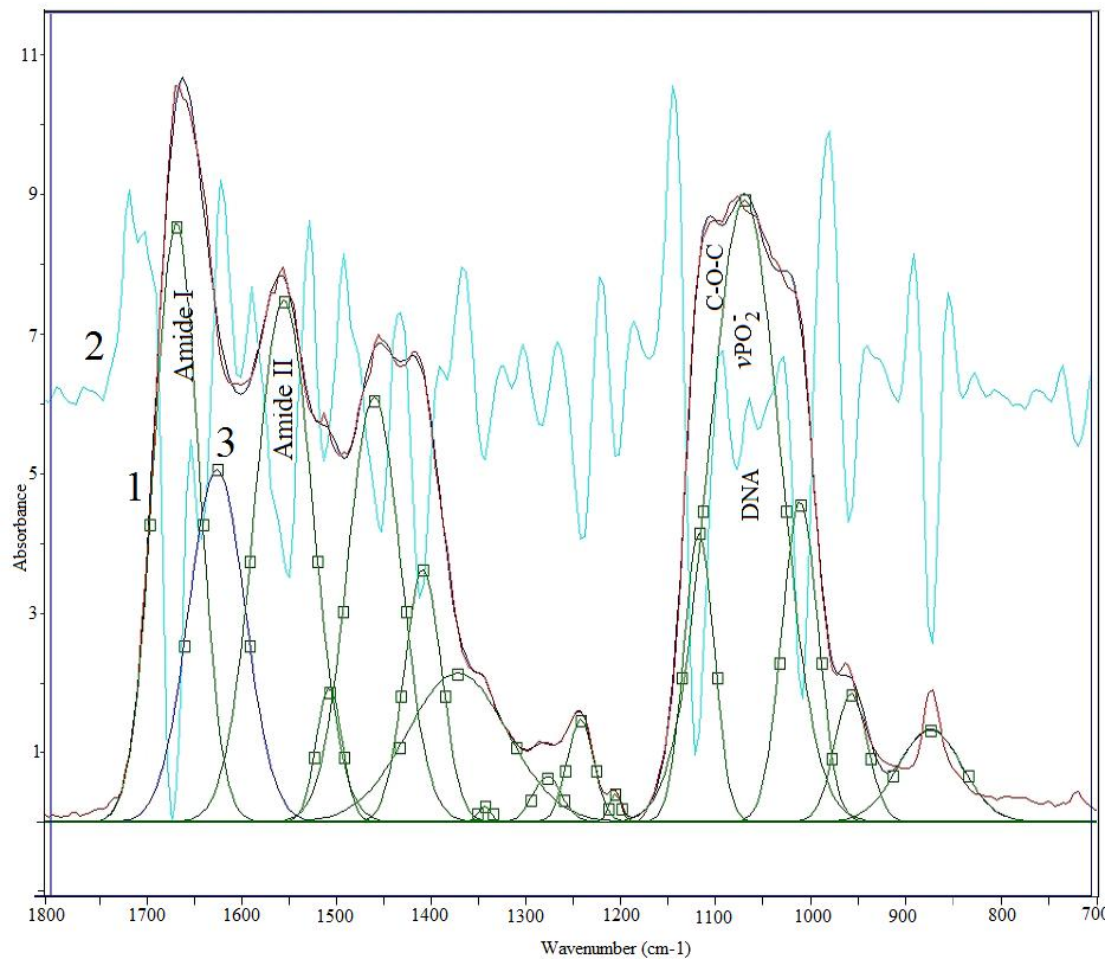
Εικόνα 25: *micro-FT-IR* φάσματα οστεοσαρκώματος Περιοχή του φάσματος $1800-800\text{ cm}^{-1}$

Για καλύτερη απεικόνιση στο Σχήμα 12 δίνονται μερικά από τα υπέρυθρα φάσματα. Διαπιστώνεται η διαφορά μεταξύ των φασμάτων σε διαφορετικά σημεία και εξέλιξη της νόσου.



Σχήμα 12: Μερικά από τα *micro-FT-IR* φάσματα οστεοσαρκώματος 1,2 χαρακτηριστικά φάσματα οστεοσαρκώματος, 3,4 υγιών. Περιοχή του φάσματος 1800-800 cm^{-1} .

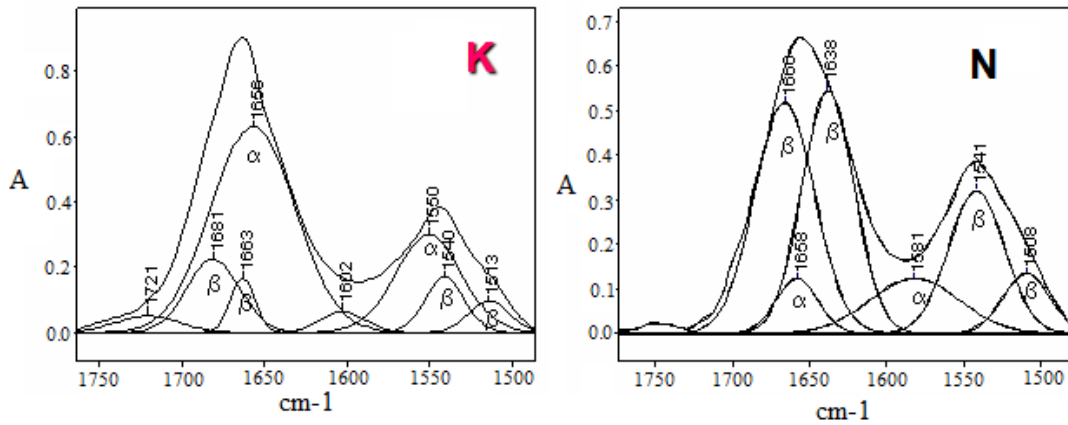
Αν λάβουμε την δεύτερη παράγωγο Σχήμα 13 (Σχήμα 13.1) και το deconvolution (Σχήμα 13.2) των φασμάτων φαίνεται ότι οι δύο καμπύλες δεν συμπίπτουν σε όλα τα σημεία. Από αυτό συμπεραίνεται ότι κατά την καρκινογένεση και την εξέλιξη της ασθένειας παράγονται διάφορα προϊόντα, που επηρεάζουν την μαθηματική ανάλυση.



Σχήμα 13: FT-IR φάσμα, 2; η δεύτερη παράγωγος και 3; deconvolution του αντίστοιχου φάσματος.

Σημαντικό είναι να τονισθεί ότι παρατηρήθηκε ότι οι ταινίες των Amide I και Amide II γίνονται οξείες σε μορφή και μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματάρηθους. Στα καρκινικά κύτταρα διαπιστώθηκε επίσης ότι ο λόγος των Amide I/ Amide II αυξάνει.

Στο Σχήμα 14 δίνονται τα φάσματα και οι αναλύσεις τους στην περιοχή των αμιδίων (amide I και Amide II) υγιών και καρκινικών κυττάρων.

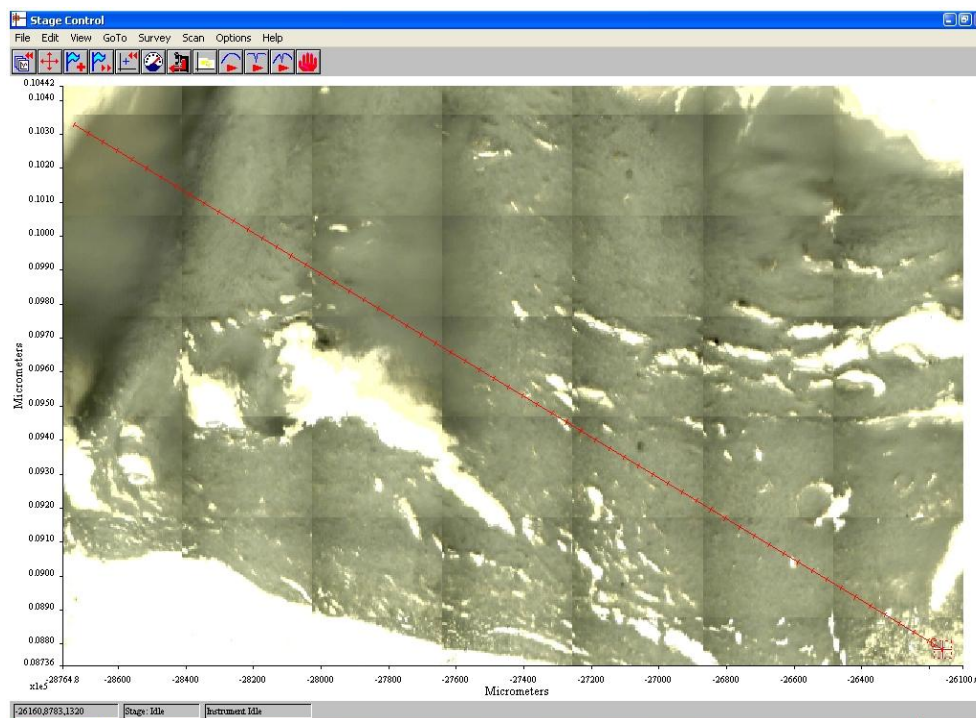


Σχήμα 14: Deconvolution των FT-IR φάσματα καρκινικών (K) και υγιών (N) κυττάρων στην περιοχή $1750-1450\text{ cm}^{-1}$

Το κριτήριο αυτό μπορεί να αποτελέσει δείκτη διάγνωσης της έναρξης του καρκίνου από την εμφάνιση του πρώτου κυττάρου.

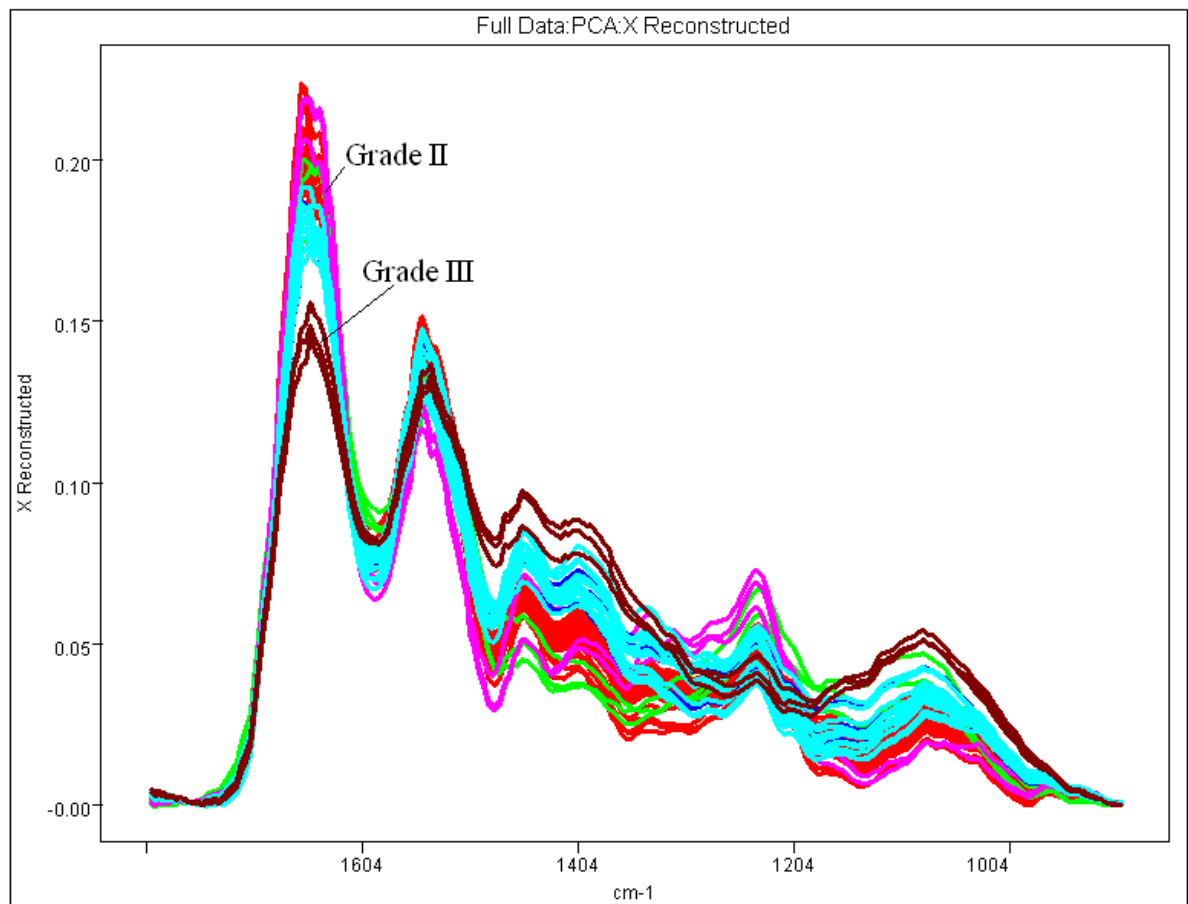
3.9. Micro-FT-IR φάσματα πορογενούς in situ καρκίνου (δείγματος 12)

Στην Εικόνα 26 φαίνεται video-φωτογραφία του πορογενούς in situ καρκινικού ιστού, στο οποίο συνυπάρχουν τα στάδια Grade II και III.



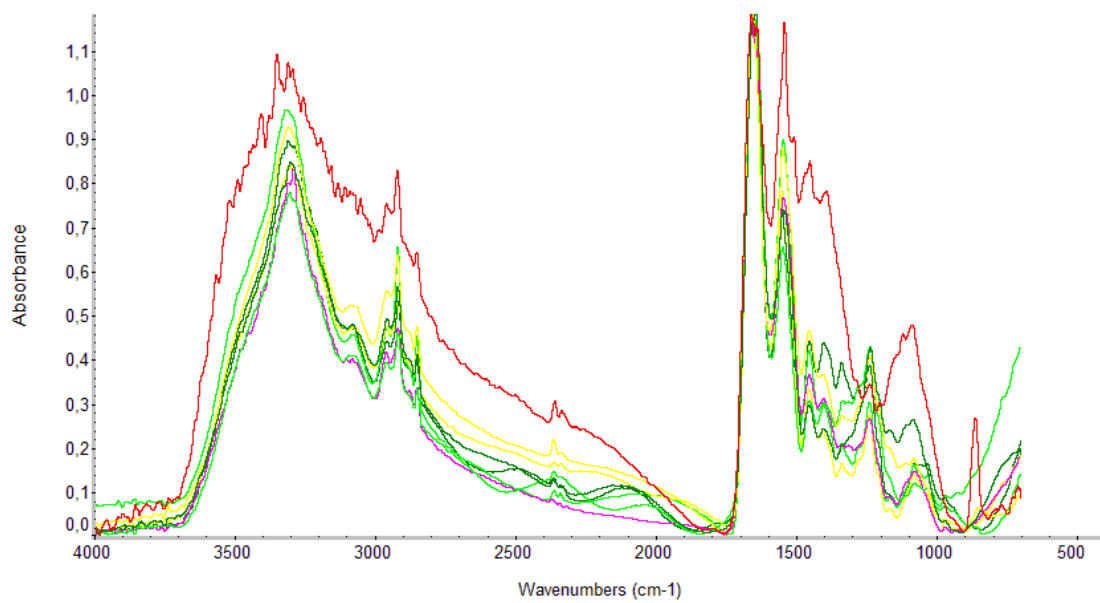
Εικόνα 26: Φωτογραφία video-φωτογραφία του πορογενούς in situ καρκινικού ιστού

Στο Σχήμα 15 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα του δείγματος 12 με πορογενή καρκίνο *in situ* και στάδια II και III.



Σχήμα 15: *micro-FT-IR* πορογενούς *in situ* καρκινικού ιστού grade II και Grade III στην περιοχή 1800-700 cm^{-1}

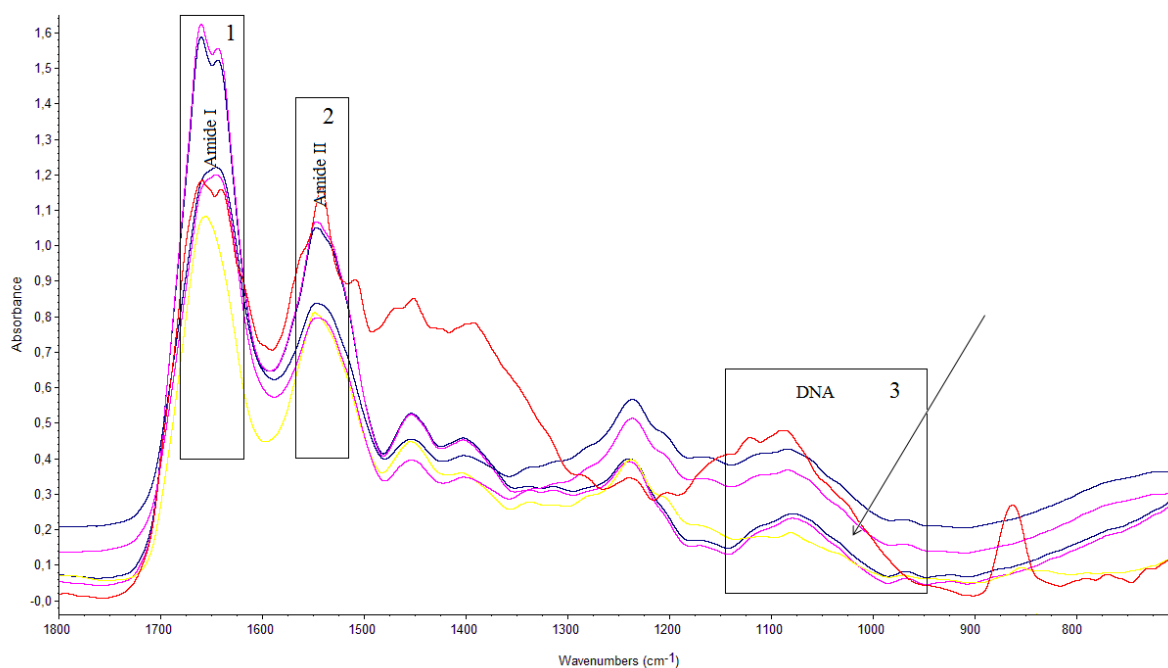
Στο Σχήμα 16 δίνονται μερικά χαρακτηριστικά φάσματα στην περιοχή $4000-700\text{ cm}^{-1}$.



Σχήμα 16: *micro-FT-IR* πορογενούς *in situ* καρκινικού ιστού *grade II* και *Grade III* στην περιοχή $4000-700\text{ cm}^{-1}$

Η παρατηρούμενη ανομοιογένεια των φασμάτων στις διάφορες θέσεις του δείγματος δείχνει και την αντίστοιχη ανομοιογένεια των κυττάρων του ιστού, και του τρόπου ανάπτυξης της ασθένειας στην ασθενή.

Στο Σχήμα 17 δίνεται επιλογή μερικών από τα φάσματα στην περιοχή $1800-700\text{ cm}^{-1}$ για το δείγμα 12.

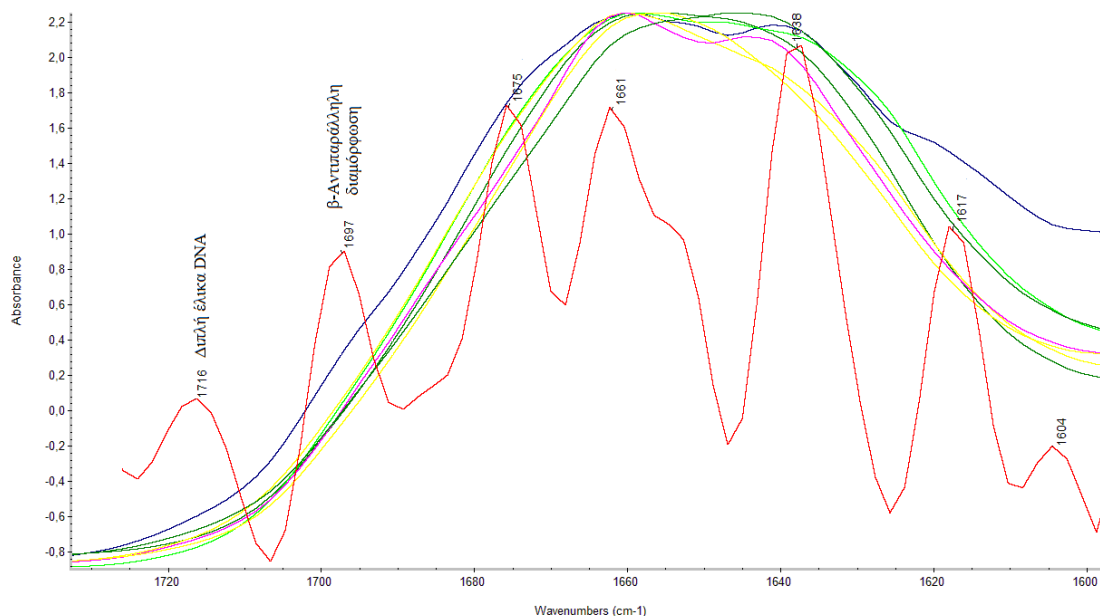


Σχήμα 17: *micro-FT-IR* πορογενούς *in situ* καρκινικού ιστού grade II και Grade III στην περιοχή $1800-700\text{ cm}^{-1}$

Στο Σχήμα 17 διακρίνονται τρεις σημαντικές περιοχές μεταξύ $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, $1600-1500\text{ cm}^{-1}$ και $1200-900\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αντιστοιχούν στη περιοχή των Amide I (Σχήμα 17.1), Amide II (Σχήμα 17.2) και στην περιοχή όπου απορροφούν οι φωσφορικές ομάδες και τα σάκχαρα του DNA. Διαπιστώνεται ότι με αύξηση της βλάβης του ιστού και του grade του καρκίνου οι ταινίες των Amide I και Amide II στα 1650 cm^{-1} και 1550 cm^{-1} μειώνονται σημαντικά, μέχρι την εξαφάνισή τους. Παρατηρείται ότι η ταινία στα 1650 cm^{-1} γίνεται διπλή με μέγιστο η μία στα 1670 cm^{-1} και η άλλη στα 1640 cm^{-1} . Αυτό δείχνει ότι η δομή α-έλικας των πρωτεϊνών καταστρέφεται και μέρος των πρωτεϊνών αποκτά αντιπαράλληλη δομή και το άλλο μέρος δομή τυχαίας έλικας. Το ίδιο συμπέρασμα εξάγεται και από την μετατόπιση προς μικρότερους κυματαριθμούς της ταινίας των Amide II που από τα 1650 cm^{-1} της β-έλικας μετατοπίζεται προς τα 1540 cm^{-1} σε β-πτυχωτή μέχρι τυχαία έλικα.

Στην περιοχή του φάσματος $1200-900\text{ cm}^{-1}$, όπου απορροφούν οι φωσφορικές ομάδες και τα σάκχαρα του DNA διαπιστώνεται πέραν των μεταβολών μία αύξηση στην

κλίση της καμπύλης του φάσματος, όπως δείχνει το βέλος (Σχήμα 17. 3). Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της κλίσης συνδέεται με αύξηση της εξέλιξης της ασθένειας.



Σχήμα 18: *micro-FT-IR* πορογενούς *in situ* καρκινικού ιστού *grade II* και *Grade III* στην περιοχή $1800-1600\text{ cm}^{-1}$ και *deconvolution*

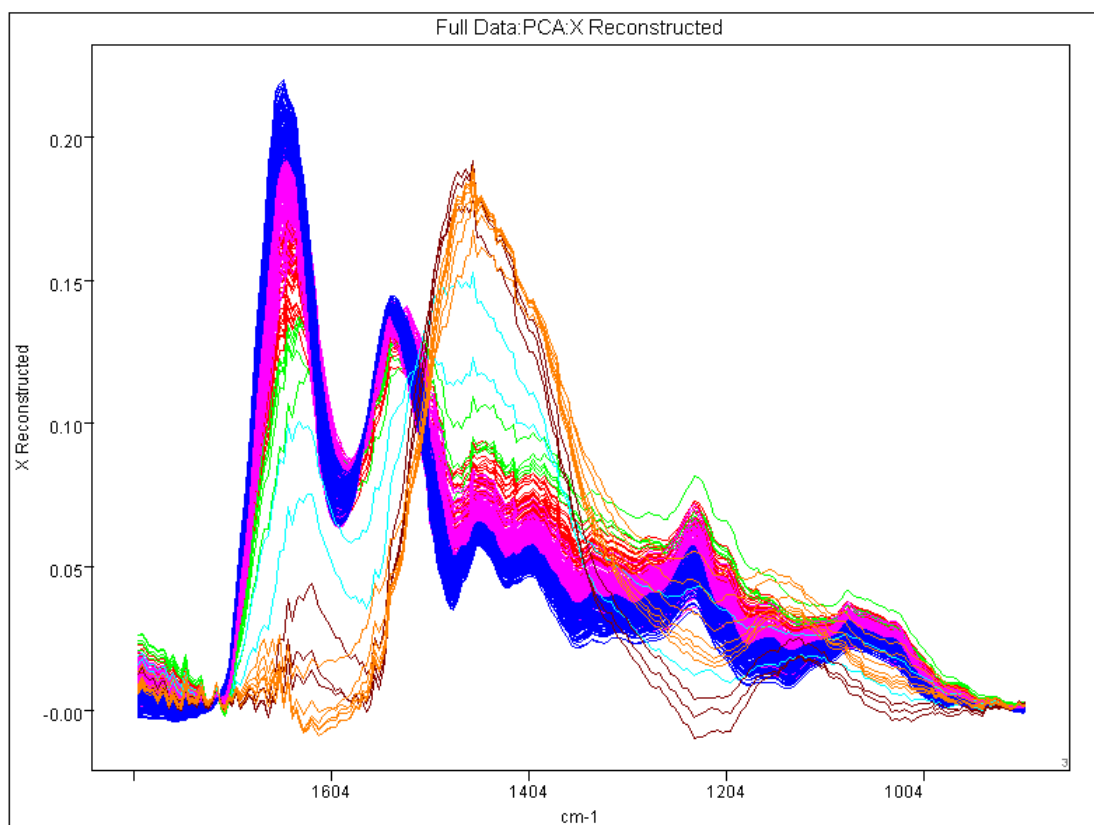
Τέλος παρατηρήθηκαν φάσματα στα οποία η εμφάνιση νέων ταινιών αποδόθηκε στις βάσεις του DNA και των πρωτεϊνών. Αυτό δείχνει ότι όσο προχωρά η νεοπλασία και ο καρκίνος τόσο η βλάβη είναι εντονότερη. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από την δεύτερη παράγωγο των φασμάτων που συγκρίθηκε με την *deconvolution* ανάλυση. Η μη σύμπτωση των καμπυλών αυτών έδειξε ότι η νεοπλασία οδήγησε στην παραγωγή πολλών προϊόντων.

Στο Σχήμα 18 δίνεται η διασπορά των φασμάτων στην έκταση του δείγματος. Από την κατανομή παρατηρείται συμφωνία με τα παθολογικά δεδομένα στα οποία, όπως προαναφέρθηκε τα χαρακτηριστικά των πορογενών *in situ* καρκινωμάτων είναι η διασπορά τους σε μεγάλη έκταση του μαστού και μακριά από την κύρια νεοπλασματική εστία.

3.10. *micro-FT-IR* φάσματα πορογενούς καρκίνου μαστού *Grade III* (δείγματος 13)

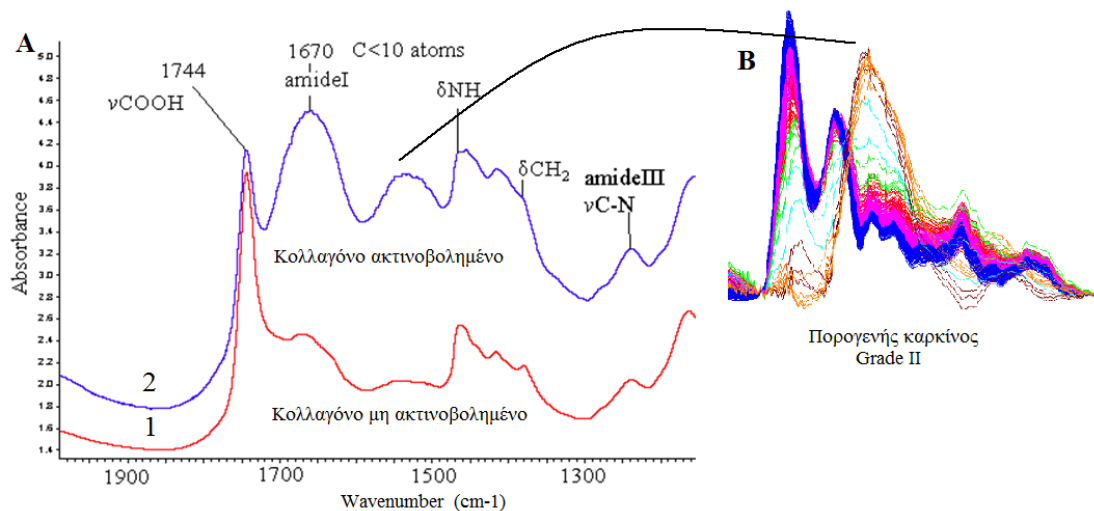
Στο Σχήμα 19 φαίνονται τα *micro-FT-IR* φάσματα πορογενούς καρκίνου μαστού *Grade III*. Παρατηρείται ότι σε αρκετά σημεία του ιστού οι εντάσεις των ταινιών στην περιοχή $1700-$

1500 cm^{-1} μειώθηκαν σημαντικά. Η περιοχή αυτή του φάσματος εκφράζει επίσης την συμπεριφορά του κολλαγόνου.



Σχήμα 19: *micro FT-IR φάσματα πορογενούς καρκίνου Grade II*

Προκειμένου να αντιληφθούμε πως συμπεριφέρεται το κολλαγόνο στην ανάπτυξη του καρκίνου ακτινοβολήθηκε με ακτινοβολία γ καθαρό κολλαγόνο.



Σχήμα 20: FT-IR φάσματα κολλαγόνου (1) και κολλαγόνου μετά από ακτινοβολήση με 6Gy (2). B; Micro FT-IR φάσματα πορογενούς καρκίνου Grade II[47]

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 20 μετά την ακτινοβολήση η ένταση της ταινίας των δονήσεων τάσης Amide I του κολλαγόνου αυξάνει, ενώ παράλληλα μειώνεται σημαντικά η ένταση της ταινίας των Amide II. Στην περιοχή μεταξύ 1450-1500 cm^{-1} , εμφανίζεται μια νέα ταινία. Συγκρίνοντας την νέα ταινία που εμφανίζεται μετά την ακτινοβολήση του κολλαγόνου με την αντίστοιχη του φάσματος πορογενούς καρκίνου σταδίου II, μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την συμπεριφορά του κολλαγόνου, των κυττάρων των ιστών, στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου, όπως ότι η παρουσία των ελευθέρων ριζών παίζει σημαντικό ρόλο κατά την καρκινογένεση. (Σχήμα B)

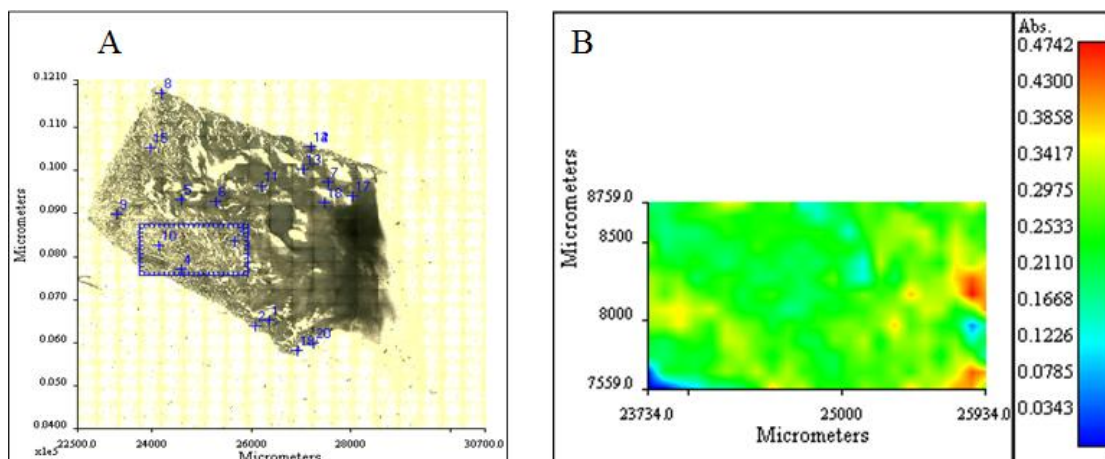
3.11. Πορογενές Διθητικό αδenoκαρκίνωμα Grade II/III (δείγματος 15)

Στο Σχήμα 21 δίνονται τα micro-FT-IR φάσματα διθητού πορογενούς αδenoCa Grade II στην περιοχή 4000-700 cm^{-1} .

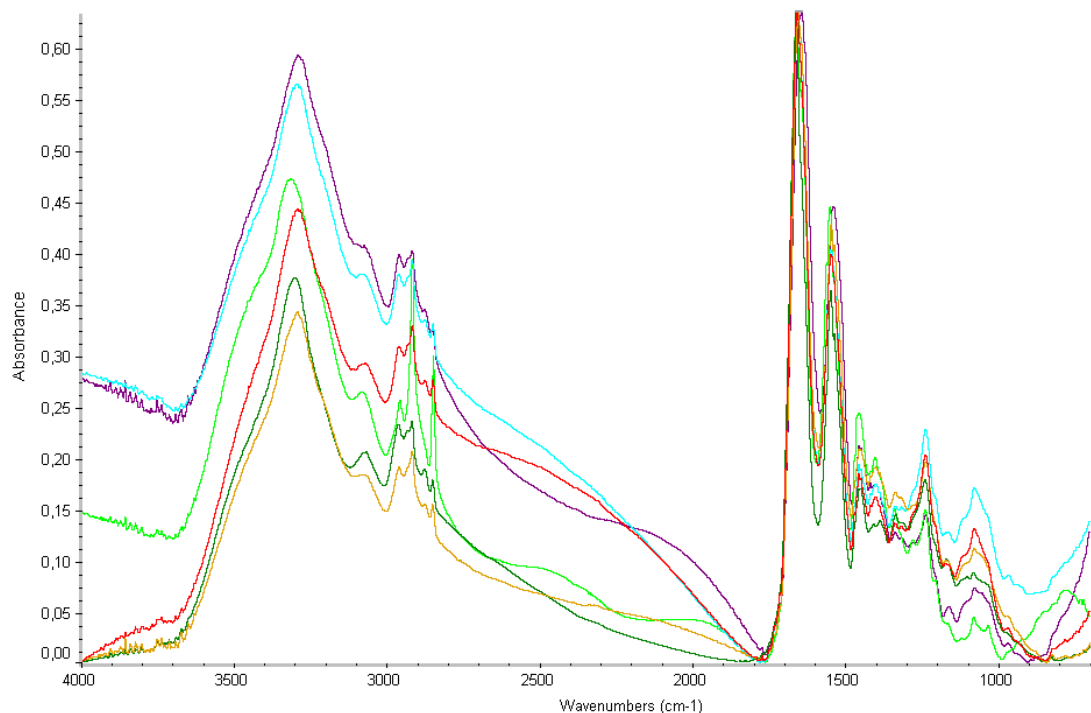
3.11.1. Grade II

Στην video-φωτογραφία του μικροσκοπίου Εικόνα 27(A) φαίνεται η περιοχή με πορογενή διθητικό αδenoCa Grade II. Τα σημεία δείχνουν την διασπορά του αδenoκαρκινώματος με την ίδια ιστολογική διάγνωση. Στην Εικόνα 27(B) φαίνεται η κατανομή των φασμάτων στο τετραγωνίδιο του δείγματος A με κοινά χαρακτηριστικά. Η

χρωματική κλίμακα δείχνει την ένταση των ταινιών απορρόφησης και την πυκνότητα ανάπτυξης της ασθένειας.



Εικόνα 27: A: video-φωτογραφία του μικροσκοπίου πορογενούς διθητικού αδενόCa. Η περιγεγραμμένη περιοχή αντιστοιχεί σε καρκίνο Grade II, με διάσπαρτα σημεία της ίδιας ιστολογικής διάγνωσης. B: κατανομή των φασμάτων στο τετραγωνίδιο του δείγματος A με κοινά χαρακτηριστικά.

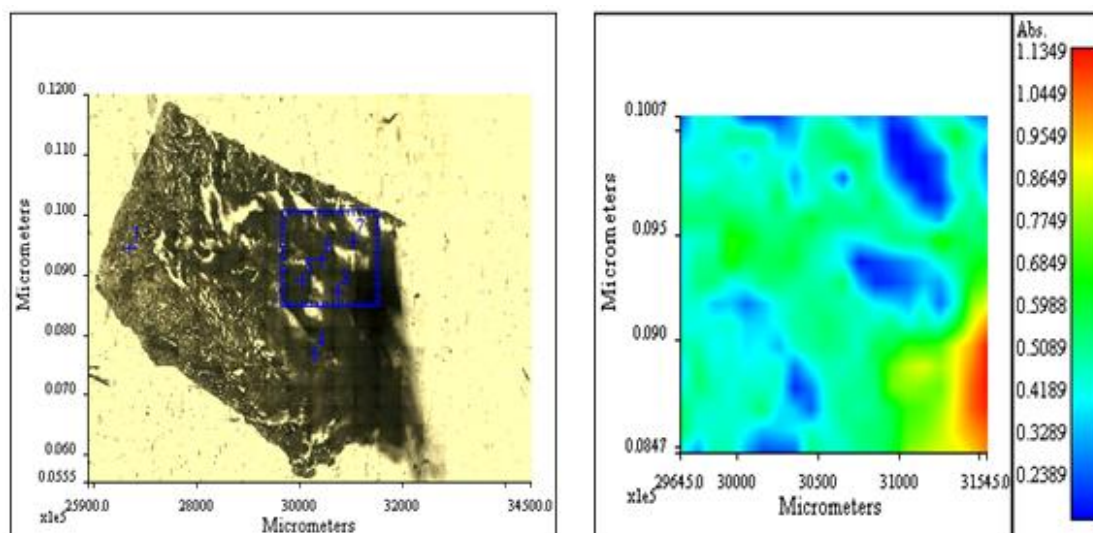


Σχήμα 21: micro-FT-IR φάσματα διθητικού αδενοκαρκινώματος Grade II στην περιοχή 4000-700 cm^{-1} .

Όπως φαίνεται από τα φάσματα ότι οι περιοχές όπου εμφανίζονται οι ταινίες των συμμετρικών και αντισυμμετρικών δονήσεων τάσης των ομάδων νCH_3 και νCH_2 ($3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$) δείχνουν διαφορές μεταξύ των φασμάτων. Οι ίδιες μεταβολές παρατηρούνται στις περιοχές των Amide II και Amide III ($1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$) και ιδιαίτερα στην περιοχή όπου εμφανίζονται οι δονήσεις των φωσφορικών ομάδων του DNA ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$).

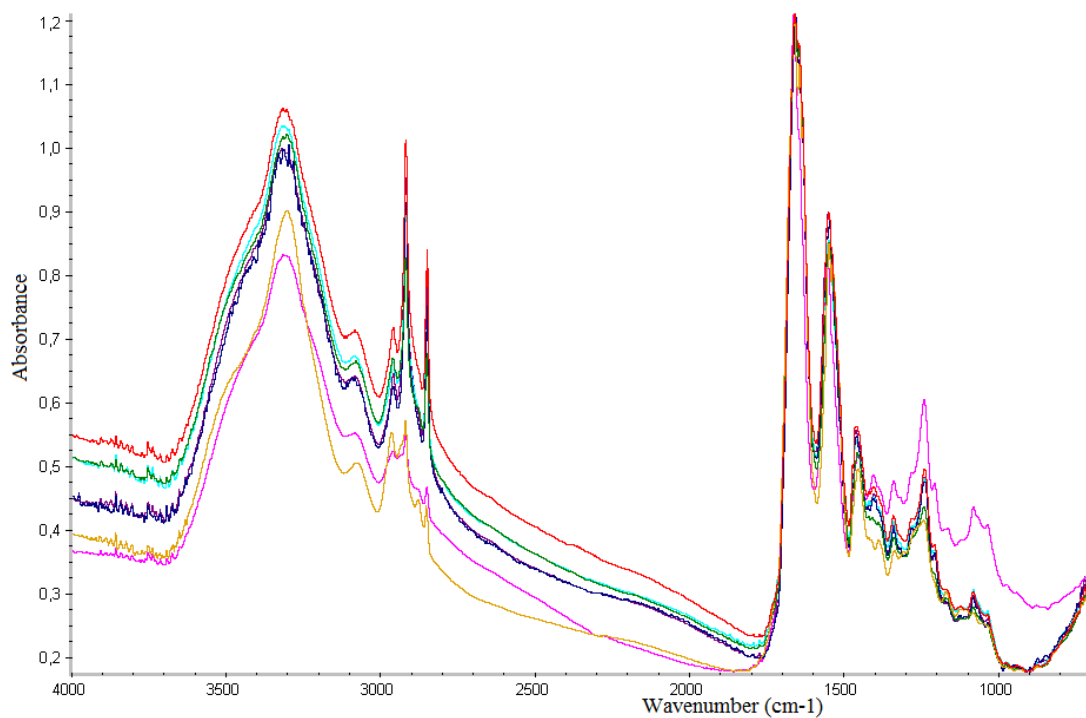
3.11.2. Grade III

Στην video-φωτογραφία του μικροσκοπίου Εικόνα 28 (A) φαίνεται το δείγμα με πορογενές διηθητικό αδενoCa. Η περιγεγραμμένη περιοχή χαρακτηρίστηκε ιστολογικά ότι είναι καρκίνος Grade III με διάσπαρτες ίδιες καρκινικές καταστάσεις. Στην Εικόνα 28 (B) δίνεται η κατανομή των φασμάτων που λήφθηκαν για την περιγεγραμμένη περιοχή του τετραγωνιδίου του δείγματος A, που έχουν κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά καρκίνου Grade III.



Εικόνα 28: A: video-φωτογραφία του μικροσκοπίου. Φαίνονται μερικά από τα σημεία διασποράς των περιοχών με νεοπλασία Grade III. B: κατανομή των φασμάτων στο τετραγωνίδιο του δείγματος A με κοινά χαρακτηριστικά. Το σκούρο μπλε χρώμα αντιστοιχεί σε υγιή κύτταρα και προς το κόκκινο επικρατεί έντονη ανάπτυξη καρκίνου

Στο Σχήμα 22 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα, micro FT-IR φάσματα, πορογενούς διηθητικού αδενoCa Grade III του περιγεγραμμένου τετραγωνιδίου της Εικόνας 28 .



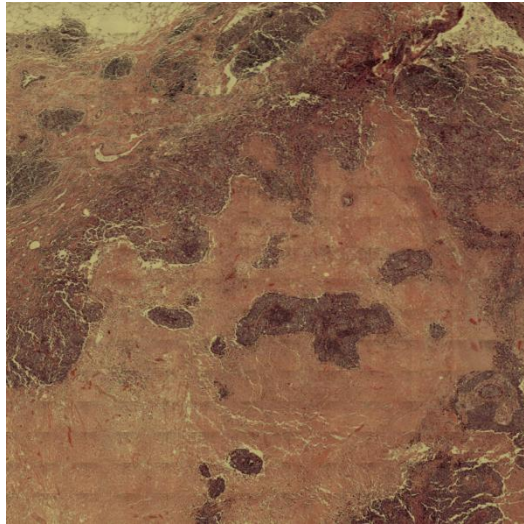
Σχήμα 22: *micro FT-IR* φάσματα διηθητικού αδενοκαρκινώματος *Grade III* στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $4000-700\text{ cm}^{-1}$.

Από την σύγκριση των φασμάτων φαίνεται καθαρά ότι οι δύο καταστάσεις είναι φασματοσκοπικά διακριτές. Οι πλέον σημαντικές μεταβολές παρατηρούνται στην περιοχή του φάσματος $3000-2850\text{ cm}^{-1}$, όπου διαπιστώνεται ότι με την ανάπτυξη της νόσου αυξάνει η ευκινησία των ανθρακικών αλυσίδων των μεμβρανών των καρκινικών κυττάρων. Επίσης στην περιοχή μεταξύ $200-900\text{ cm}^{-1}$, όπου εμφανίζονται οι δονήσεις των φωσφορικών ομάδων του DNA οι μεταβολές δείχνουν αύξηση της φωσφορυλίωσης.

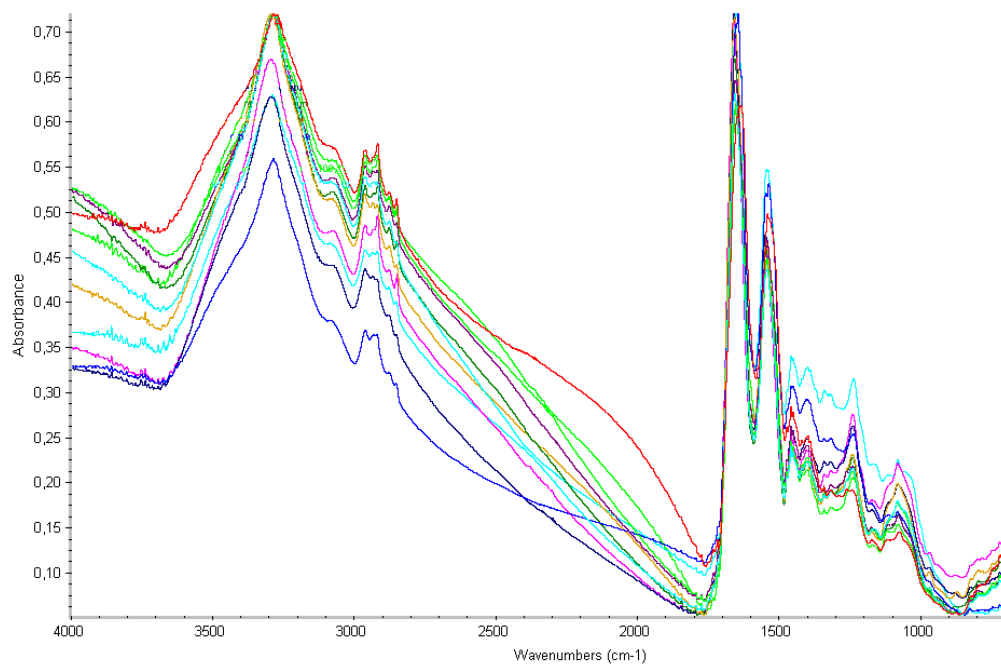
Γενικά, τα διάσπαρτα σημεία εμφάνισης της ασθένειας δεν είχαν εντοπισθεί ιστολογικά, επειδή η χρωστική αποδίδει σε μεγαλύτερη έκταση και όχι σε επίπεδο κυττάρου, όπως συμβαίνει με την υπέρυθη φασματοσκοπία.

3.12. Άτυπο μυελοειδές ΙΙΙ (δείγματος 8)

Στην Εικόνα 29 δίνεται η video απεικόνιση ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade ΙΙΙ, όπως χαρακτηρίστηκε ιστολογικά.



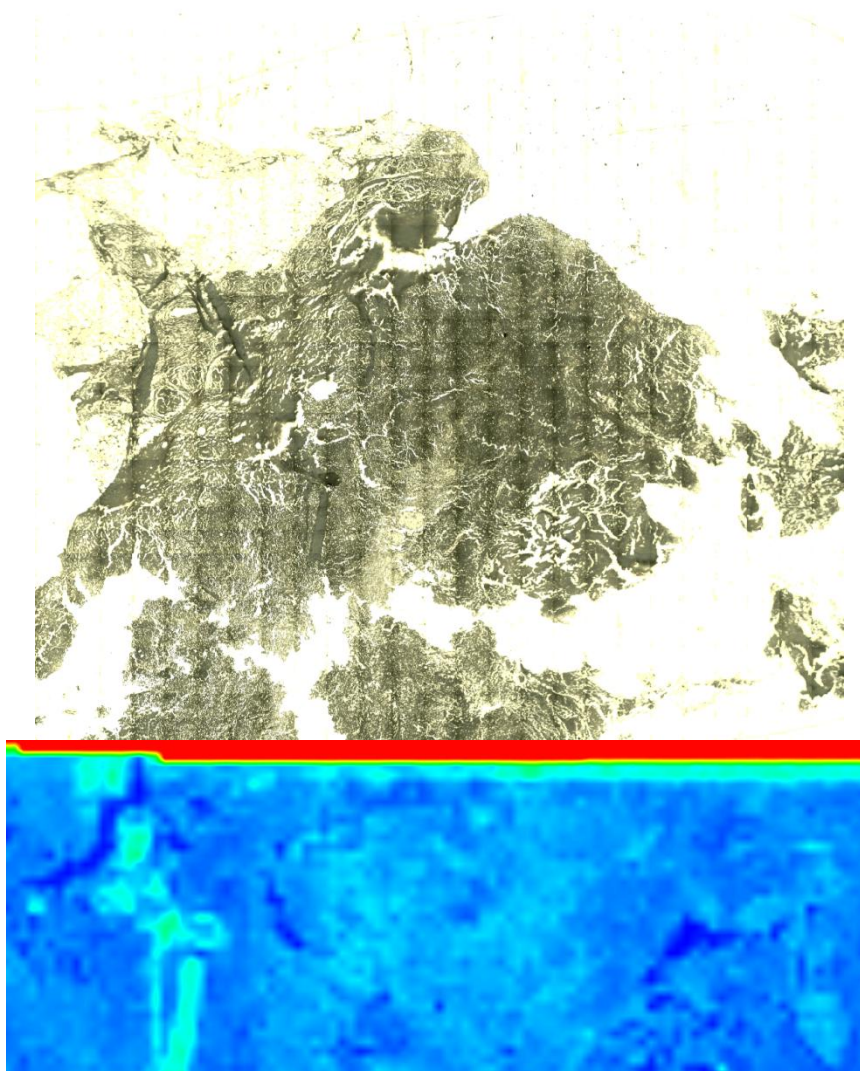
Εικόνα 29: Video απεικόνιση ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade ΙΙΙ. (δ.8)



Σχήμα 23: micro FT-IR φάσματα διηθητικού άτυπου μυελοειδούς καρκίνου Grade ΙΙΙ στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 4000-700 cm^{-1} .

Τα υπέρυθρα φάσματα δείχνουν και πάλι μεταβολές στις αναμενόμενες περιοχές, όπου εμφανίζονται οι δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων που καθορίζουν την βιοχημική κατάσταση των μεμβρανών και του DNA.

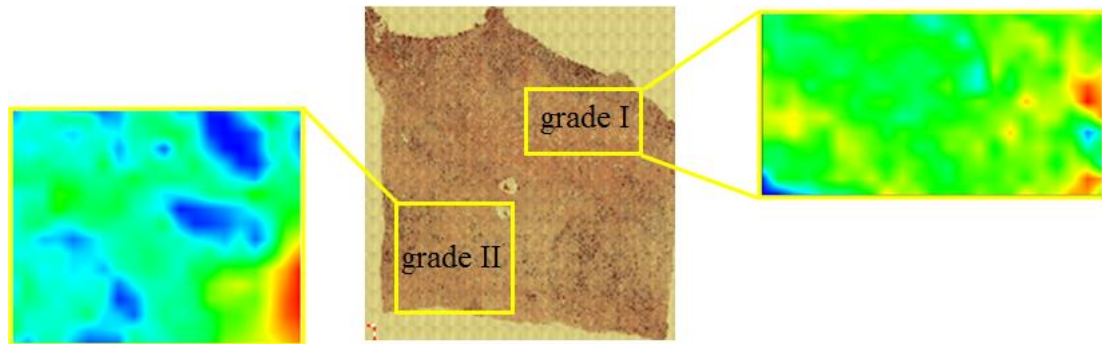
Στην Εικόνα 30 φαίνεται η κατανομή των υπέρυθρων φασμάτων στο δείγμα του μυελοειδούς καρκίνου Grade III.



Εικόνα 30: Εικόνα του μικροσκοπίου του *micro-FT-IR* φασματφωτομέτρου ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III. (δ.8)

Από την χρωματική διαβάθμιση των φασμάτων φαίνεται ότι το δείγμα περιέχει διάφορες διαβαθμίσεις του καρκίνου στην επιφάνεια του δείγματος.

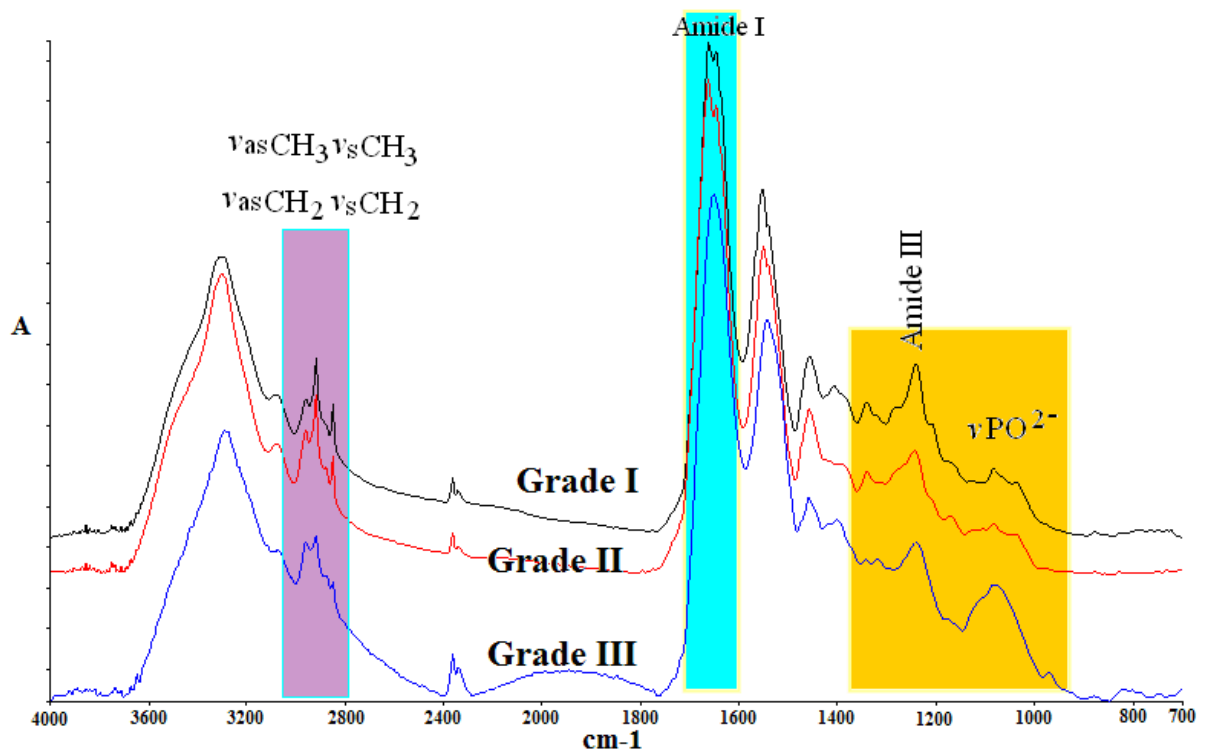
Στην Εικόνα 31 δίνονται οι κατανομές των κυττάρων σύμφωνα με τα υπέρυθρα φάσματα σε δύο εντοπισμένες περιοχές Grade I και Grade II του καρκινικού ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III, όπως χαρακτηρίστηκε ιστολογικά.



Εικόνα 31: Κατανομή των φασμάτων του καρκινικού ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III σε δύο στενές περιοχές Grade I και Grade II (δ.8)

Οι χρωματικές διαφορές δείχνουν ότι οι δύο περιοχές δίνουν τελείως διαφορετικά υπέρυθρα φάσματα. [6-66].

Στο Σχήμα 24 δίνονται χαρακτηριστικά micro-FT-IR φάσματα των περιοχών που εμφανίζουν ιστολογικά διαβαθμίσεις Grade I, Grade II και Grade II.

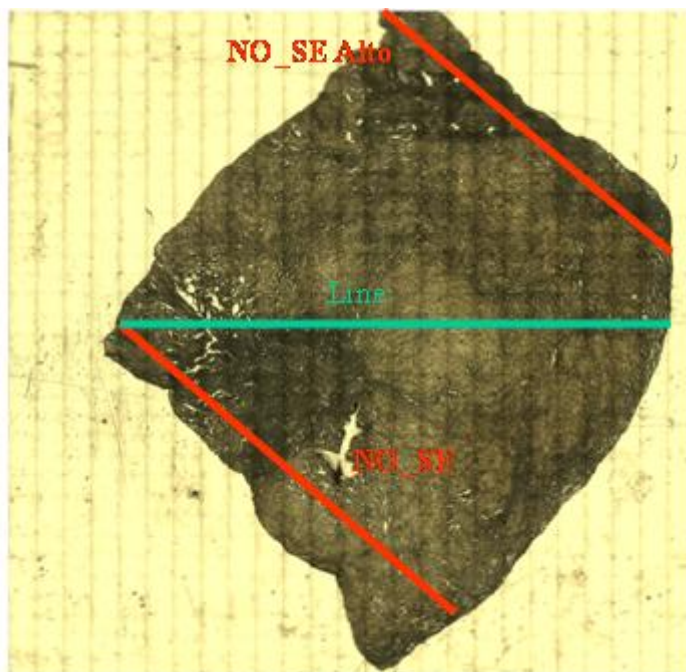


Σχήμα 24: *micro FT-IR* φάσματα διηθητού άτυπου μυελοειδούς καρκίνου *Grade I*, *Grade II* και *Grade III* στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $4000-700\text{ cm}^{-1}$.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 24 τα φάσματα διαφέρουν σημαντικά στις περιοχές που εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες των ομάδων νCH , $\nu\text{C}=\text{O}$, νPO_2^- του DNA. Οι διαφορές εμφανίζονται τόσο στις εντάσεις των ταινιών, όσο και στις μετατοπίσεις προς μεγαλύτερες ή μικρότερες συχνότητες.

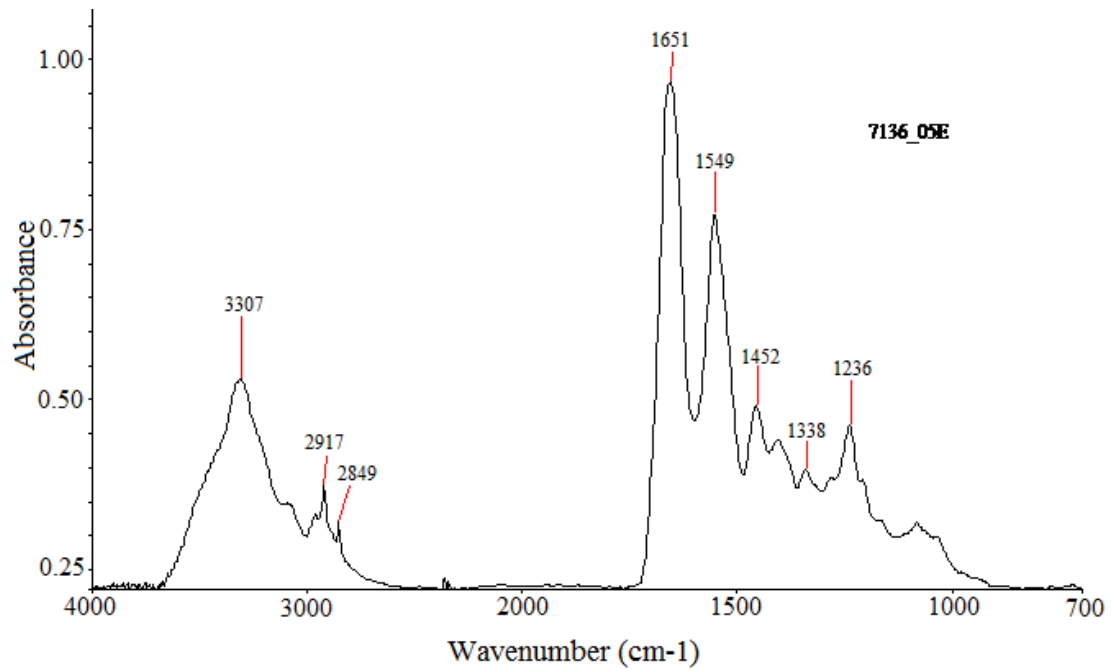
3.13. Micro-FT-IR φάσματα πορογενούς in situ καρκίνου Grade III.

Στην Εικόνα 32 δίνεται η απεικόνιση από το μικροσκόπιο του micro-FT-IR φασματοφωτομέτρου του δείγματος 16, το οποίο ιστολογικά χαρακτηρίστηκε in situ καρκίνου Grade III.



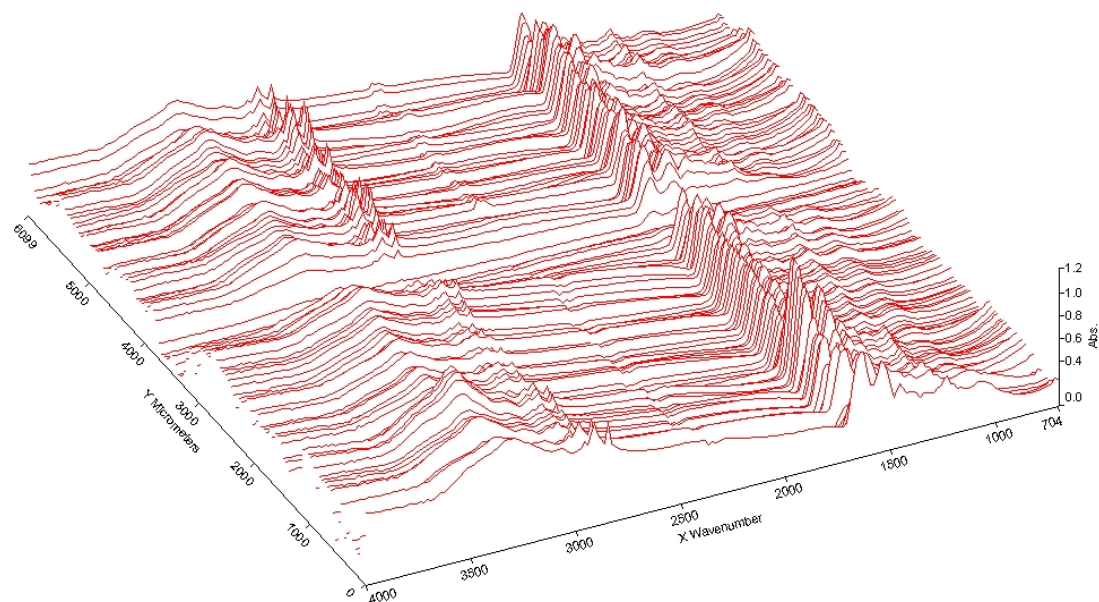
Εικόνα 32: Δείγμα καρκινικού ιστού μαστού(δ.16) . Ανιχνευτική λήψη υπέρυθρων φασμάτων σε γραμμική διάταξη προς τρεις γραμμές (πάχος δείγματος 4 μm και εύρος 21 μm)

Οι γραμμές δείχνουν τις κατευθύνσεις προς τις οποίες λήφθηκαν τα υπέρυθρα φάσματα. Στο Σχήμα 25 δίνεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα.



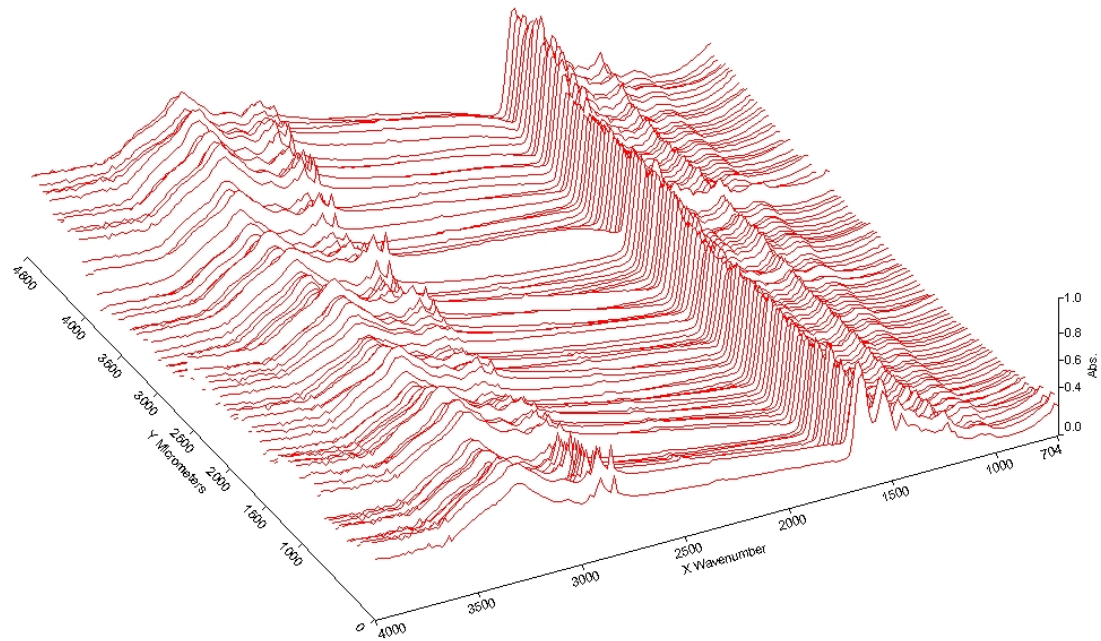
Σχήμα 25: *micro-FT-IR* φάσμα στην περιοχή 4000-700 cm^{-1} κατά την διεύθυνση NO_SE. (δ.16)

Στο Σχήμα 26 φαίνονται τα *micro-FT-IR* φάσματα υπό μορφή καταρράκτη, κατά την διεύθυνση NO_SE

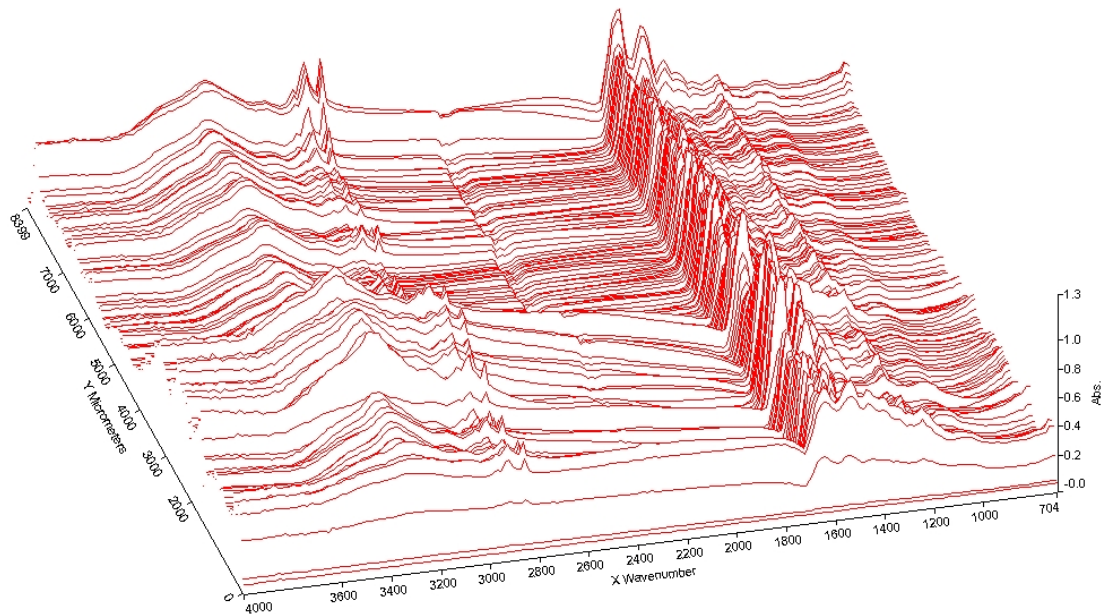


Σχήμα 26: *micro-FT-IR* φάσματα υπό μορφή καταρράκτη, κατά την διεύθυνση NO_SE. (δείγμα.16)

Παρατηρείται ότι τα φάσματα διαφέρουν σημαντικά κατά μήκος της γραμμής NO_{SE}, απόδειξη της ανομοιογένειας του ιστού, αλλά και της ανάπτυξης της ασθένειας.

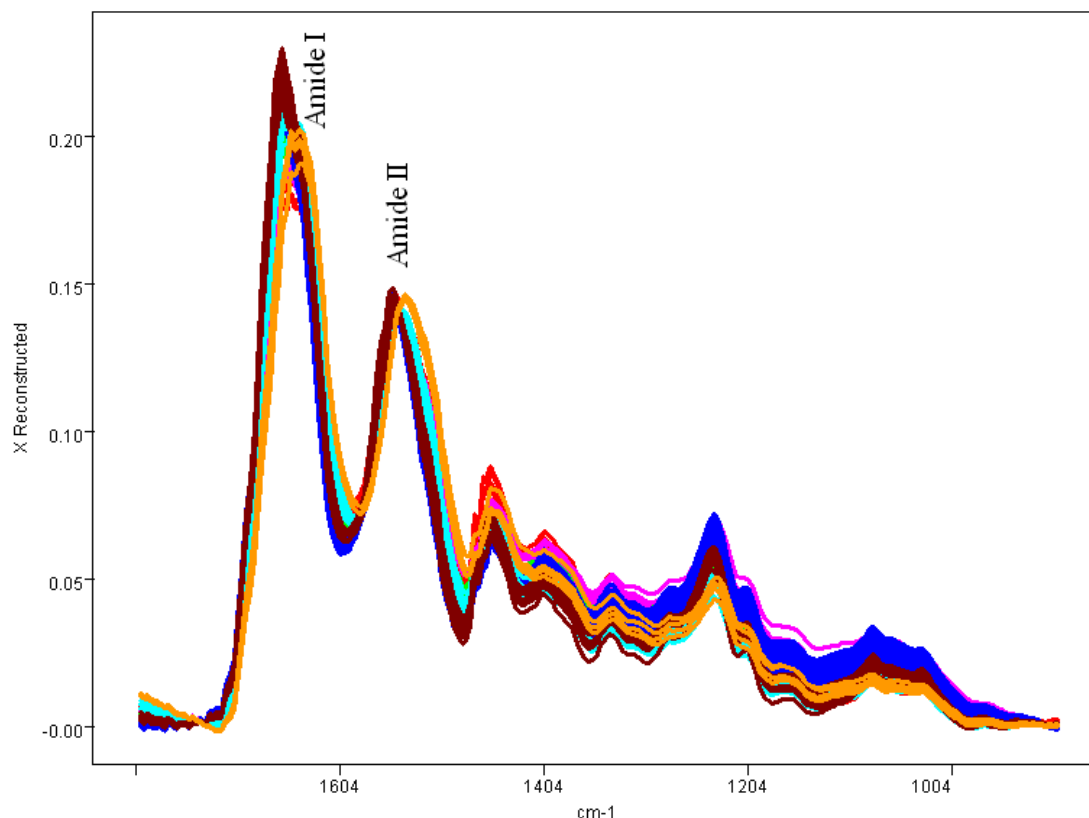


Σχήμα 27: *micro-FT-IR* φάσματα υπό μορφή καταρράκτη, κατά την διεύθυνση NO_{SE} Alto. (δείγμα.16)



Σχήμα 28: *micro-FT-IR* φάσματα υπό μορφή καταρράκτη, κατά την οριζόντια γραμμή (δείγμα.16)

Από τη σύγκριση των φασμάτων NO_SE και NO_SE Alto και οριζόντια βλέπουμε ότι αν και οι τρεις γραμμές βρίσκονται πολύ κοντά, διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Παρατηρείται δηλαδή ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία είναι πολύ ευαίσθητη μέθοδος και ότι μπορούμε να διαχωρίσουμε τα φάσματα μεταξύ τους και να αποφανθούμε για την πορεία ανάπτυξης της ασθένειας στον ίδιο όγκο.

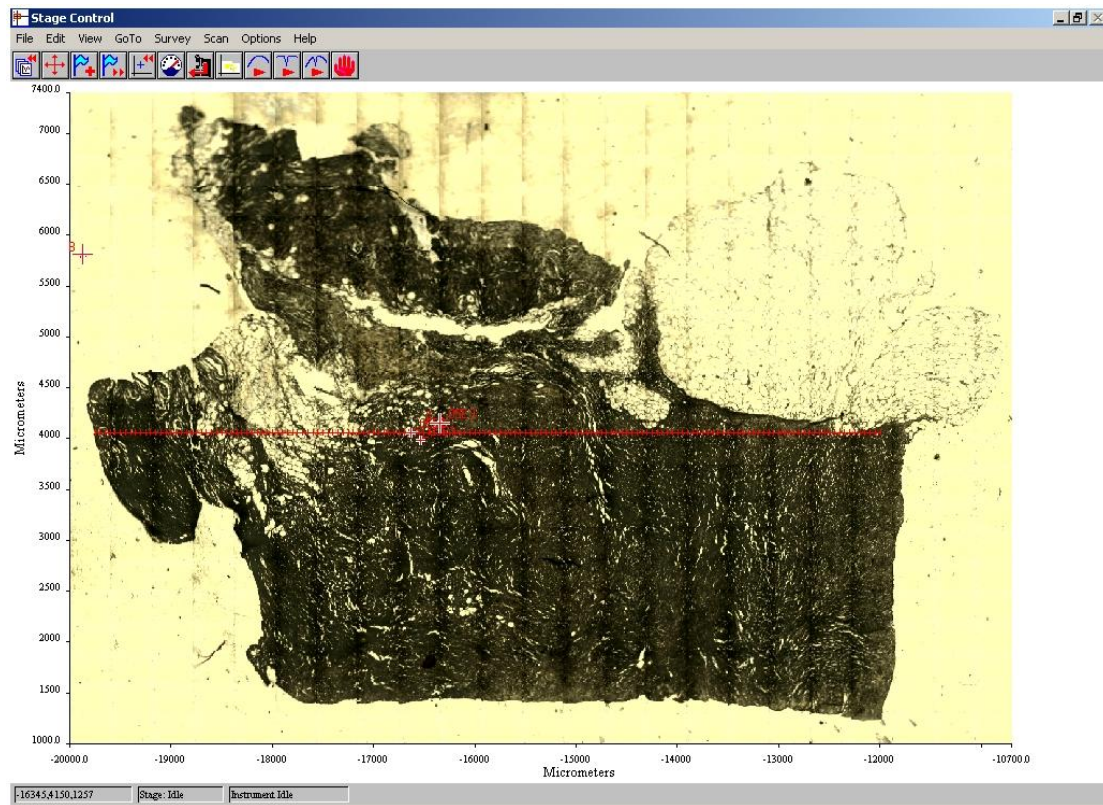


Σχήμα 29: *microFT-IR* φάσματα χαρτογράφησης του δείγματος 16

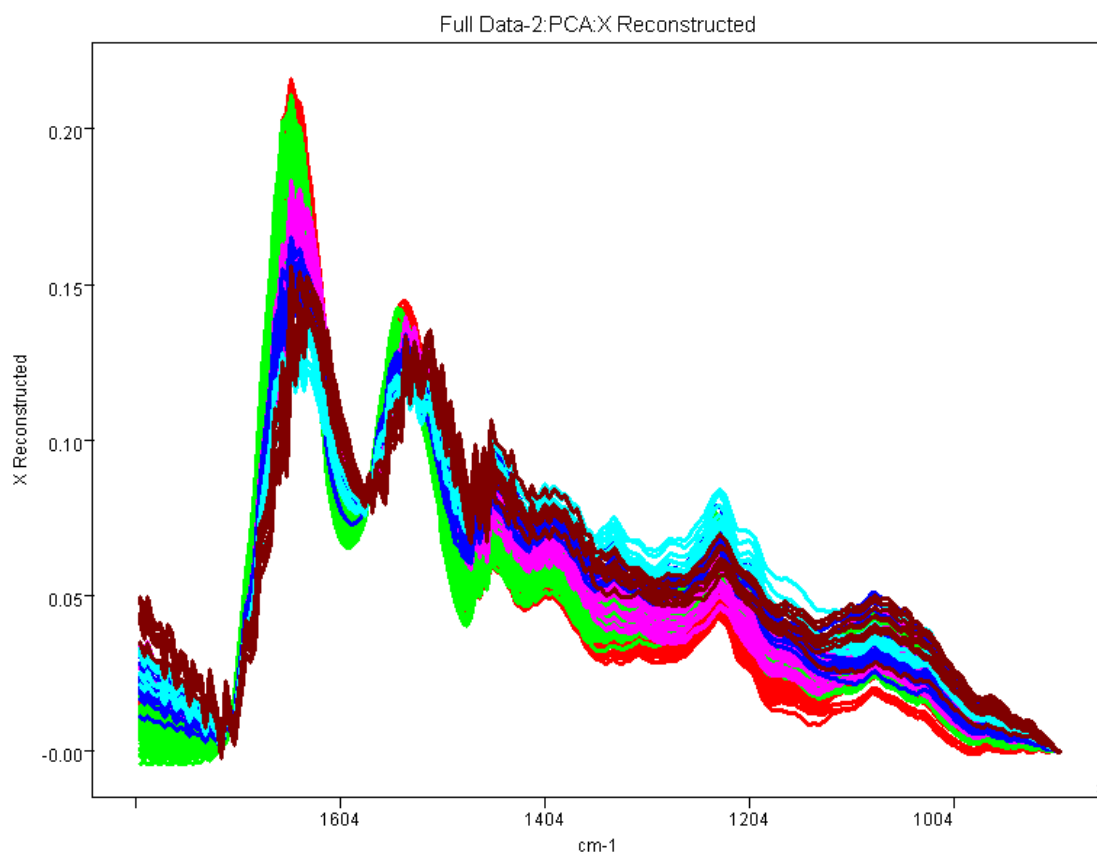
Στο Σχήμα 29 φαίνονται τα *microFT-IR* φάσματα χαρτογράφησης του δείγματος 16 σε όλη την έκταση του δείγματος. Παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε όλη την έκταση του δείγματος. Παρατηρούνται μεταβολές στην περιοχή $1700-1500\text{ cm}^{-1}$, όπου απορροφούν οι δονήσεις των ομάδων Amide I Amide II των πρωτεϊνών. Οι ταινίες παρατηρείται ότι μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματαριθμούς όσο προχωρεί η βλάβη.

3.14. Micro FT-IR φάσματα δείγματος λοβιακού *in situ* καρκίνου (δείγματος 5)

Στην Εικόνα 33 φαίνεται δείγμα λοβιακού *in situ* καρκίνου (δείγμα 5) και η γραμμή κατά την οποία λήφθηκε μια σειρά φασμάτων. Διαπιστώνεται και στην περίπτωση αυτή ότι τα φάσματα διαφέρουν μεταξύ τους. Αν και παθολογικά δεν δόθηκε κανένας χαρακτηρισμός (τυφλό δείγμα), όμως τα φάσματα δείχνουν ότι συνυπάρχουν ανάμικτα κύτταρα σταδίου I, II και III (Σχήμα 30).

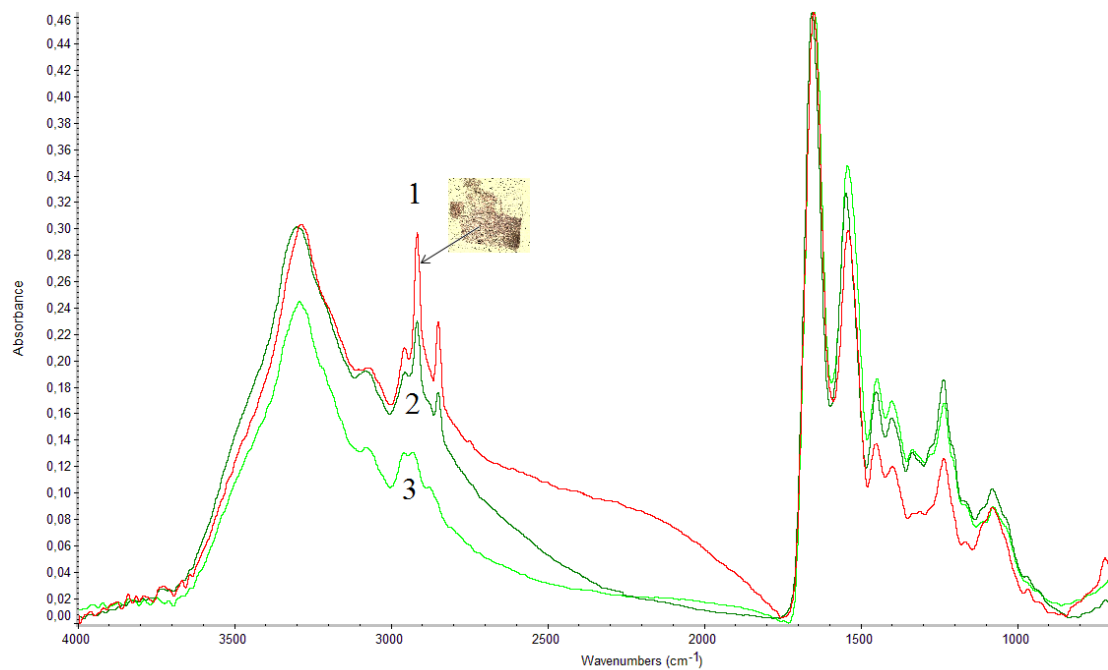


Εικόνα 33: Ιστός λοβιακού καρκίνου Grade II (δείγμα 5)



Σχήμα 30: *micro-FT-IR* φάσματα ιστού με λοβιακό καρκίνο *Grade II* (δείγμα 5)

Τα φάσματα στο Σχήμα 30 δείχνουν παρόμοια συμπεριφορά με τα προηγούμενα δείγματα. Και εδώ φαίνεται από την αύξηση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή μεταξύ $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ ότι τα κύτταρα βρίσκονται στο στάδιο III. Το βέλος στο φάσμα Σχήμα 31 (1) δείχνει το σημείο πάνω στο δείγμα που έχει συμπεριφορά καρκίνου σταδίου III.



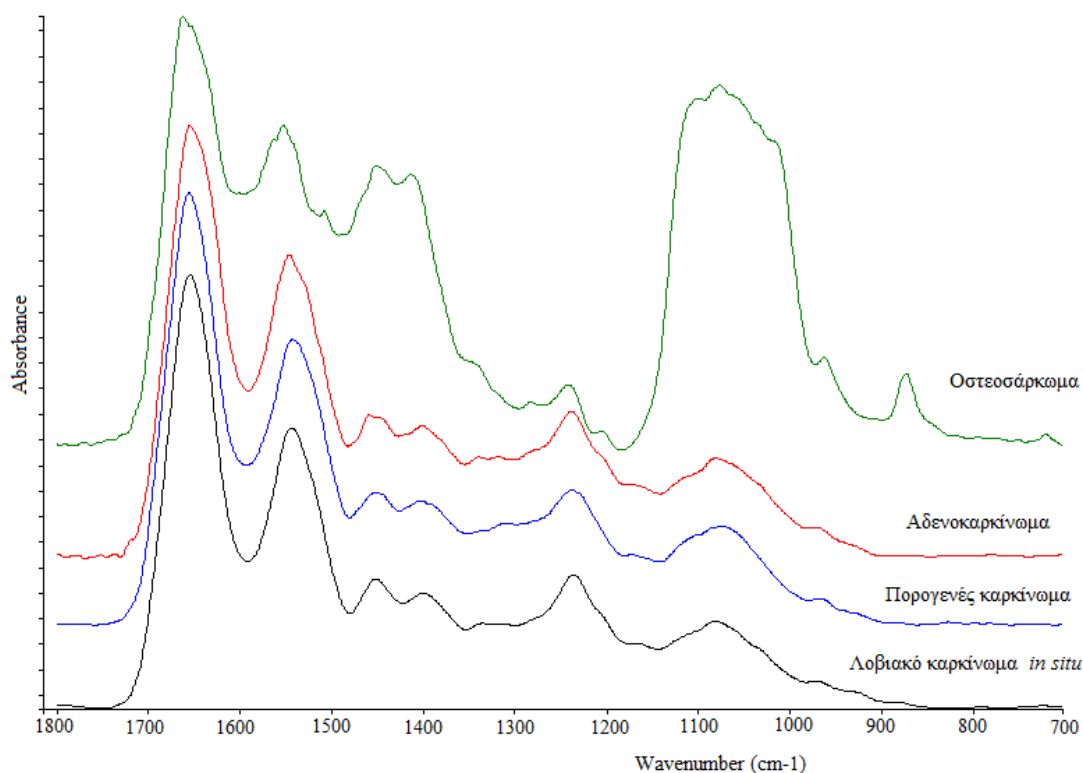
Σχήμα 31: *micro-FT-IR* φάσματα λοβιακού καρκίνου Grade II. Το βέλος δείχνει το ακριβές σημείο στο οποίο αντιστοιχεί στο φάσμα.

Συγκρινόμενο το φάσμα 1 (Σχήμα 31.1) με τα αντίστοιχα φάσματα 2 και 3 του ίδιου σχήματος φαίνεται ότι στην υπόλοιπη περιοχή του φάσματος όλες οι εντάσεις των ταινιών μειώνονται σημαντικά., όχι όμως αυτές κάτω από 1500 cm^{-1} .

Η κλίση των ταινιών στην περιοχή $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, όπου απορροφούν οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων των φωσφολιπιδίων και του DNA, δείχνει ότι ο καρκίνος είναι σε προχωρημένη κατάσταση και συμφωνεί με τους λοβιακούς *in situ* καρκίνους.

3.15. Σύγκριση των φασμάτων διαφόρων καρκινικών ιστών

Στην προσπάθειά μας να δούμε αν η υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier θα μπορούσε να αποτελέσει διαγνωστική μέθοδο, τοποθετήσαμε τα φάσματα των διαφόρων ειδών καρκίνου στο ίδιο σχήμα. Στο Σχήμα 32 φαίνονται τα micro-FT-IR φάσματα λοβικού *in situ* καρκινώματος, πορογενούς καρκινώματος, αδενοκαρκινώματος και οστεοσαρκώματος. Οι μεταξύ τους διαφορές είναι εμφανείς.

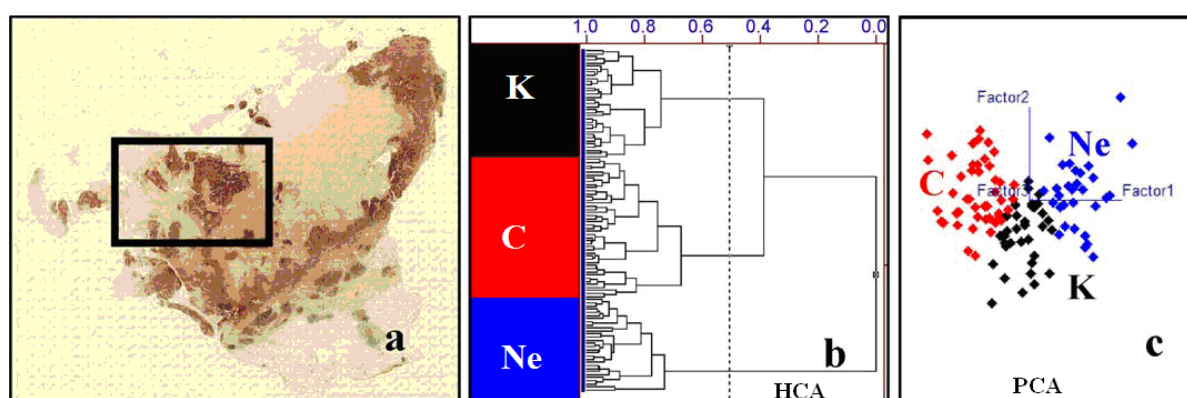


Σχήμα 32: *micro-FT-IR* φάσματα Οστεοσαρκώματος, αδενοκαρκινώματος, πορογενούς καρκίνου και λοβιακού *in situ* καρκίνου.

Χρησιμοποιώντας ιδιαίτερα τους λόγους των εντάσεων των ταινιών των απορροφήσεων των Amide I και II $1660/1650\text{ cm}^{-1}$, των ταινιών $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3/\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ και $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2/\nu_{\text{asym}}\text{CH}_3$ στην περιοχή 3000 των δονήσεων τάσης και την μορφή τους στα 1080 cm^{-1} διαπιστώσαμε ανάλογη σχέση μεταξύ των ιστολογικών δεδομένων. Αποτέλεσμα αυτού ήταν δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν τα φάσματα και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά. Επί πλέον, η δυνατότητα να διαπιστωθούν προκαρκινικά κύτταρα, που δεν

ανιχνεύονται ιστολογικά, δείχνει τις δυνατότητες χρήσης της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στην ιατρική.

Στην Εικόνα 34 δίνεται το δείγμα ιστού το οποίο ιστολογικά είχε χαρακτηριστεί ως πορογενής καρκίνος Grade III. Η περιγεγραμμένη περιοχή δείχνει μια ομοιογένεια ως προς τις λύσεις των ιστών λόγω της ασθένειας και το στάδιο του καρκίνου. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περιφέρεια του μαστικού ιστού. Η Hierarchical Clustering Analysis (HCA) και (c) Principal Components Analysis (PCA) ανάλυση έδωσαν τρεις κύριες περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν στον καρκίνο (K), σε συνδετικό ιστό (C) και σε νεκρωτικό ιστό (Ne).



Εικόνα 34: (a)Μικροφωτογραφία δείγματος (10.000 mm-7000 mm) πορογενούς καρκίνου Grade II (b) Hierarchical Clustering Analysis (HCA) και (c) Principal Components Analysis (PCA) από την περιγεγραμμένη περιοχή (5000 mm-1900 mm)[6]

Στο Σχήμα 33 δίνονται αντιπροσωπευτικά micro-FT-IR φάσματα από την περιγεγραμμένη περιοχή της Εικόνας 34. Από την σύγκριση των φασμάτων φαίνεται ότι τα φάσματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η μελέτη των φασμάτων στην περιοχή $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ δεν δείχνει να επικρατεί υπομεθυλίωση (hypomethylation) των πρωτεϊνών στα νεοπλασματικά κύτταρα (Σχήμα 3). Η αυξημένη ένταση των ταινιών στην περιοχή αυτή δείχνει ότι στον συνδετικό ιστό επικρατεί μια ευκαμψία των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων που σχηματίζουν την μεμβράνη των κυττάρων του ιστού αυτού (C).

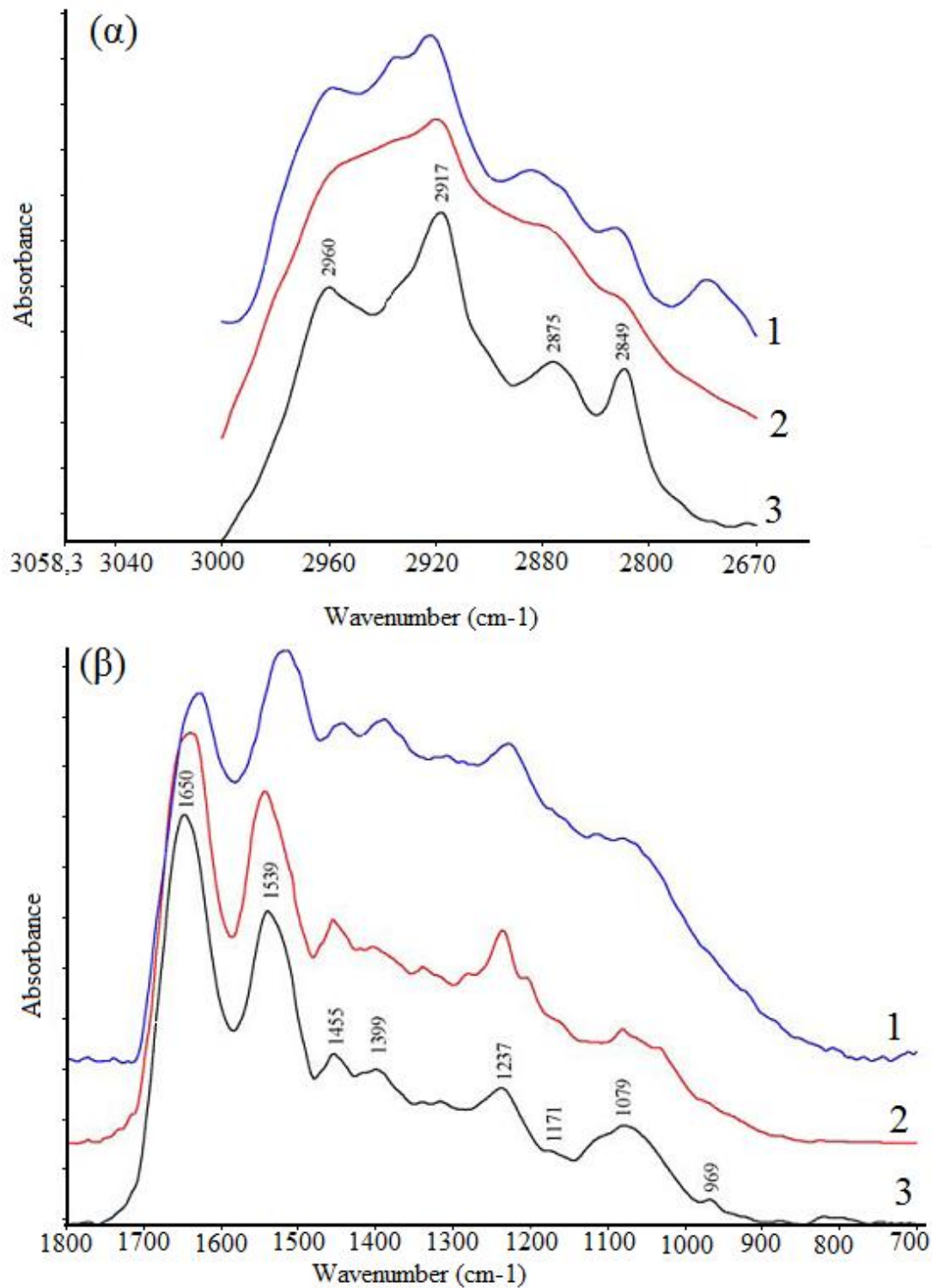
Στην περιοχή του φάσματος $1800-800\text{ cm}^{-1}$ από τις ταινίες στα 1651 cm^{-1} και 1547 cm^{-1} που αποδίδονται στις απορροφήσεις των δονήσεων τάσης των Amide I και Amide II δείχνουν ότι στον καρκίνο (3) η δευτεροταγής διαμόρφωση των πρωτεϊνών αποκτά δομή α -

έλικας, σε αντίθεση με τα διηθητικά κύτταρα όπου έχουμε β-έλικα. Φαίνεται δηλαδή ότι η δευτεροταγής δομή μεταβάλλεται κατά την καρκινογένεση.[66-69]

Από τους λόγους των εντάσεων των ταινιών των δονήσεων κάμψης δCH_2 και δCH_3 , 1454/1400 δείχνει ότι στους διηθητούς ιστούς (Σχήμα 33.2) λαμβάνει χώρα υπομεθυλίωση των πρωτεϊνών, αν και δεν φαίνεται αυτή η σχέση από τους λόγους των δονήσεων τάσης $\nu_{\text{asym}}\text{CH}_3/\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ στην περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000-2800 cm^{-1} , η οποία δεν δείχνει παρόμοια συμπεριφορά. Η πληροφορία αυτή συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα όπου ο Wong και οι συνεργάτες του έχουν διαπιστώσει παρόμοια συμπεριφορά [70-72].

Τα φάσματα στην περιοχή 1300–1200 cm^{-1} επιτρέπουν τον διαχωρισμό των διηθητικών κυττάρων από τα άλλα συστατικά του διηθητού ιστού. Ιδιαίτερα οι χαρακτηριστικές ταινίες στις θέσεις 1204 cm^{-1} , 1236 cm^{-1} και 1280 cm^{-1} (συμπεριλαμβανομένης της ταινίας στα 1240 cm^{-1} που αντιστοιχεί στην δόνηση τάσης νPO_2^- του DNA) από την μορφή τους δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την διαφοροποίηση των νεοπλασιών.

Η μικρή αλλά σημαντική μετατόπιση προς μικρότερους κυματαριθμούς της ταινίας απορρόφησης της ομάδας C–OH από τα 1161 cm^{-1} για τον συνδετικό ιστό (καμπύλη 2) στα 1172 cm^{-1} για τον καρκίνο (καμπύλη 3) που απουσιάζει η διήθηση αποδίδεται στην φωσφορυλίωση του DNA κατά την καρκινογένεση και συνδέεται με την μείωση των δεσμών υδρογόνου [5]. Στους καρκινικούς ιστούς η ταινία 1114 cm^{-1} η οποία δεν εμφανίζεται σε διηθητούς καρκίνους συνδέεται με την μεταβολή των γλυκοπρωτεϊνών.



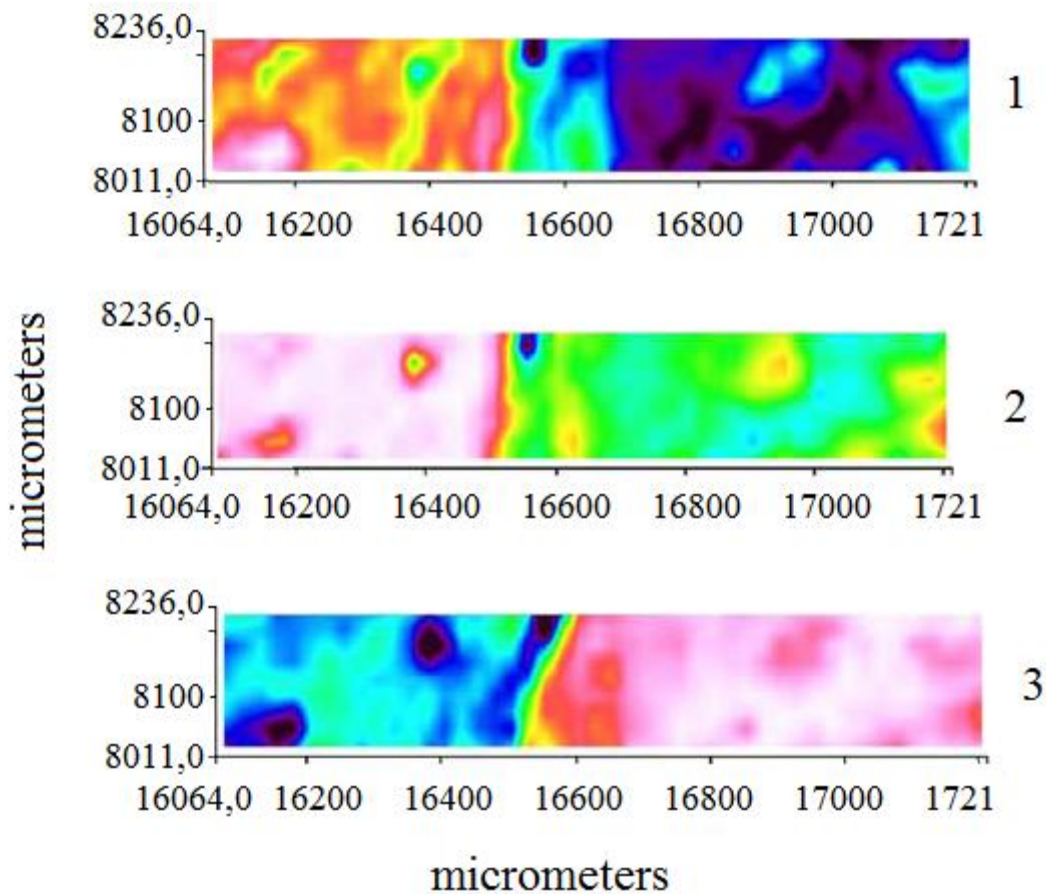
Σχήμα 33: Αντιπροσωπευτικά *micro-FT-IR* φάσματα από την περιγεγραμμένη περιοχή της Εικόνας 34. 1 Νεκρωτικός ιστός, 2 Συνδετικός ιστός, 3 Καρκινικός ιστός στις περιοχές του φάσματος (α) $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ και (β) $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ [6]

Διαφορές μεταξύ μη διηθητικού και διηθητικού καρκίνου φάνηκαν και στην περιοχή $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων των

νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) με μέγιστα στις συχνότητες 1089 cm^{-1} και 1080 cm^{-1} , αντίστοιχα. Οι ταινίες αυτές υπερκαλύπτονται επίσης από τις απορροφήσεις των υδρογονανθράκων στα 1034 cm^{-1} . Τέλος η δόνηση τάσης των φωσφορικών ομάδων νDNA-O-P-O στα 970 cm^{-1} εμφανίζεται μόνο στους μη διηθητούς καρκινικούς ιστούς.[73,74]

Η νεκρωτική περιοχή είναι πολύ εύκολα να εντοπισθεί και να διαχωριστεί από τον διηθητικό ή μη διηθητικό καρκινικό ιστό. Στους νεκρωτικούς ιστούς οι ταινίες απορρόφησης των αμιδίων μετατοπίζονται προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς (Σχήμα 33 καμπύλη 1). Επίσης ο λόγος των AmideI/AmideII είναι πολύ μικρότερος της μονάδας. Αυτό δείχνει ότι στους νεκρωτικούς ιστούς η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών έχει κυρίως διαμόρφωση β-έλικας και όχι α-έλικας, όπως συμβαίνει με τους καρκινικούς ιστούς. Επίσης ο λόγος των ταινιών 1454/1400 είναι ίσος με την μονάδα, λόγω των μεταβολών κατά την μετάβαση στην νέκρωση.

Στην Εικόνα 35 φαίνονται οι χάρτες κατανομής των υπέρυθρων φασμάτων από την νεκρωτική, διηθητή και καρκινική περιοχή του ιστού της Εικόνας 34. Από την κατανομή των φασμάτων είναι εμφανής η διαφορετική έκφραση των κυττάρων, λόγω της ασθένειας.



Εικόνα 35: Χαρτογράφηση των φασμάτων του ιστού της Εικόνας 34 . Οι χάρτες 1, 2 και 3 αντιστοιχούν σε νεκρωτικό, διηθητικό και καρκινικό ιστό. Στην περιοχή 16064 μm μέχρι 1721 μm [6]

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η περιοχή μεταξύ 1800–900 cm^{-1} μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ιστοπαθολογική ανάλυση.

Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί ότι η περιοχή του φάσματος μεταξύ 3000-2800 cm^{-1} , μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της μεταβολής του βιολογικού περιβάλλοντος των καρκινικών ιστών. Η αύξηση της έντασης των ταινιών συνδέεται άμεσα με την μεθυλίωση του DNA, αλλά και την ευκινησία των μεγαλομορίων, λιπιδίων και φωσφολιπιδίων, που αποτελούν την μεμβράνη των κυττάρων. Η περιοχή μεταξύ 1700-1500 cm^{-1} παρέχει πληροφορίες για την κατάσταση των πεπτιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Μεταβολή των εντάσεων και μετατόπιση των ταινιών συνδέονται άμεσα με την νόσο.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η micro-FT-IR φασματοσκοπία για την μελέτη καρκινικών ιστών από διάφορους τύπους καρκίνου του μαστού και των μεταβολών που προκαλεί η ασθένεια στην μοριακή δομή των κυττάρων και των συστατικών του. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα καρκίνων του μαστού που είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί ιστολογικά. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα “τυφλά”, προκειμένου να χαρακτηριστεί η ασθένεια και μετά να ταυτιστεί με τα ιστολογικά δεδομένα.

Από τα πειράματα διαπιστώθηκε ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια για την μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, όπως είναι τα βιολογικά μόρια και οι ανθρώπινοι ιστοί.

Όλες οι κατηγορίες καρκίνων έδειξαν γενικά μεταβολές στις εντάσεις των χαρακτηριστικών ταινιών, καθώς και μετατοπίσεις προς άλλους κυματαριθμούς.

Από τους λόγους των εντάσεων των ταινιών $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3/\nu_{\text{asym}}\text{CH}_3$ και $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2/\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ στην περιοχή $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ φαίνεται ότι η συμμετρία των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων, που σχηματίζουν την μεμβράνη των κυττάρων, καταστρέφεται σημαντικά με την εξέλιξη της ασθένειας. Η διαφορά είναι σημαντική από το αρχικό στάδιο της ασθένειας (Grade I) στο τελικό (Grade III). Η διαφορά αυτή αποδίδεται κυρίως στην μεταβολή των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και στην σχάση των ανθρακικών αλυσίδων των λιπιδίων της μεμβράνης. Επίσης στην μεταβολή συμβάλει και ο βαθμός μεθυλίωσης του DNA.

Από τους λόγους των εντάσεων των ταινιών των απορροφήσεων των Amide I και Amide II στα $1660/1550\text{ cm}^{-1}$ και την μετατόπιση προς μικρότερους κυματαριθμούς δείχνει ότι στα καρκινικά κύτταρα η β-έλικα των πρωτεϊνών καταστρέφεται, ενώ επικρατεί α-έλικα με μετατοπισμένες προς μεγαλύτερες συχνότητες τις απορροφήσεις των ταινιών των Amide I.

Από την μορφή και την ένταση των ταινιών των δονήσεων τάσης στα 1080 cm^{-1} διαπιστώσαμε ανάλογη σχέση μεταξύ των ιστολογικών δεδομένων. Αποτέλεσμα αυτού ήταν δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν τα φάσματα και να μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά

Τέλος οι ταινίες των φασμάτων στην περιοχή των $800-840\text{ cm}^{-1}$ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες κακοήθειας, αφού μπορούν να διαφοροποιήσουν το φυσιολογικό B-DNA από το κακοήθες Z-DNA και το καλοήθες A-DNA.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπική υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (micro-FT-IR) για την μελέτη της μοριακής δομής διαφόρων καρκίνων του μαστού. Χρησιμοποιήθηκαν 17 δείγματα από την Τράπεζα του Ιστοπαθολογικού τμήματος του Ειδικού Αντικαρκινικού Νοσοκομείου Πειραιά «Μεταξιά».

Από την μελέτη διαπιστώθηκε ότι η micro-FT-IR φασματοσκοπία είναι μια μέθοδος που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων όπως ιστών, κυττάρων, οστών, κ.ά.

Με την micro-FT-IR λάβαμε πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολές που παρουσίαζαν τα βιολογικά μόρια τα οποία αποτελούν συστατικά των καρκινικών ιστών. Η κατάταξη των φασμάτων έγινε με βάση τον αρχικό ιστοπαθολογικό χαρακτηρισμό των καρκινικών ιστών.

Οι κατ' αρχήν παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των φασμάτων αφορούσαν αυτές μεταξύ υγιών και εν γένει νεοπλασματικών ιστών. Αν και οι διαφορές ήταν σημαντικές σε όλο το εύρος του φάσματος από 4000 μέχρι 700 cm^{-1} , στην μελέτη διαχωρίστηκε το φάσμα σε μικρότερες ζώνες, οι οποίες συμπεριλάμβαναν τις δονήσεις χαρακτηριστικών χημικών ομάδων των βιολογικών μορίων. Στόχος ήταν η χρήση των ζωνών αυτών ως διαγνωστικών ταινιών για την προδιάγνωση του καρκίνου του μαστού.

Τα φάσματα των καρκινικών ιστών συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα φάσματα υγιών ιστών στις περιοχές του φάσματος όπου εμφανίζονται οι ταινίες των δονήσεων τάσης και κάμψης των χημικών ομάδων νNH (δNH), $\nu\text{C}=\text{O}$, νCH_3 (δCH_3), νCH_2 (δCH_2), Amide I, Amide II και DNA. Οι ταινίες των ομάδων αυτών δίνουν επίσης πληροφορίες και για την μοριακή δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών και της έλικας του DNA

Στους καρκινικούς ιστούς από τις μεταβολές στα 3000–2800 cm^{-1} διαπιστώθηκε μειωμένη μεθυλίωση. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της ευκινήσιας και ευκαμψίας των ανθρακικών αλυσίδων των μεμβρανών των νεοπλασματικών κυττάρων έναντι των καρκινικών. Από την διαφορά αυτή συμπεραίνεται ότι μπορούμε να διακρίνουμε ένα προκαρκινικό κύτταρο (neoplasia) από το καρκινικό (cancer).

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών απορρόφησης των AmideI και AmideII από 1651 cm^{-1} and 1547 cm^{-1} , αντίστοιχα, προς μικρότερους κυματαριθμούς συνεπάγεται ότι στα

καρκινικά κύτταρα μεταβάλλεται η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών. Στους διηθητούς καρκίνους η ταινία μετατοπίζεται προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς.

Οι μεταβολές στην περιοχή $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ παρέχουν πληροφορίες μεταξύ υγιούς και διηθητικού ιστού. Η μικρή αλλά σημαντική διαφορά της μετατόπισης της ταινίας απορρόφησης της ομάδας C–OH από τα 1161 cm^{-1} για συνδετικό ιστό στα (C) στα 1172 cm^{-1} για τον καρκίνο (K), πρέπει μάλλον να σχετίζεται με την αυξημένη φωσφορυλίωση κατά την καρκινογένεση. Τέλος, οι μεταβολές των δονήσεων κάμψης δO-P-O στα 950 cm^{-1} δείχνουν μεταβολές της μοριακής δομής του DNA στους στερεούς καρκίνους. Η μεταβολή αυτή είναι συνάρτηση και του Grade του καρκίνου.

Από την μελέτη των καρκινικών ιστών φαίνεται ότι η micro-FT-IR φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προδιαγνωστική και διαγνωστική μέθοδος της ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του μαστού σε μοριακό επίπεδο.

ABSTRACT

In the present study micro- Fourier transform infrared spectroscopy, micro-FT-IR, was used in order to study the molecular structure of various breast cancers tissues. 17 samples from the Metaxas Anticancer Hospital Bank were used.

From this study it has been found that micro-FT-IR spectroscopy is a method that can be used to study complex biological systems such as tissues, cells, bones, etc.

With micro-FT-IR spectroscopy information relative to the changes of the organic molecules that constitute cancerous tissues can be received. The classification of the spectra was based on the original histopathological classification of tumor tissues.

In general, the observed differences in spectra, concerned healthy and neoplastic tissues. Although the differences were significant throughout the range of the spectrum $4000-700\text{ cm}^{-1}$, in this study the spectrum was demerged into smaller zones, which included the characteristics vibrational bands of known chemical groups of biological molecules. The aim is to use these zones as diagnostic areas for pre-diagnosis of breast cancer.

The spectra of tumor tissue were compared to the corresponding spectra of healthy tissue, using the regions where the stretching and bending vibrations bands of the following chemical groups absorb: νNH (δNI), $\nu\text{C} = \text{O}$, νCH_3 (δCH_3), νCH_2 (δCH_2), Amide I, Amide II and DNA. The bands of these groups also give information about the secondary structure of proteins and DNA helix.

Comparison between the representative spectra of cancer (K) and connective (C) tissues in the region $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ shows that there is no any hypomethylation effect of proteins in cancer tissues and higher membrane fluidity in connective tissues. From the above it is concluded that one can distinguish between pre-cancerous (neoplasia) cells and tumor cells (cancer).

The shift of the absorption bands of amide I and II at 1651 cm^{-1} and 1547 cm^{-1} respectively, in lower wavenumbers implies that cancer cells altered their secondary structure of proteins. In invasive cancer those bands are shifted towards higher wavenumbers.

Changes in the region $1300-1200\text{ cm}^{-1}$ are used to distinguish healthy from cancerous tissues. The small but significant difference in the displacement of the absorption band of C-OH group, from 1161 cm^{-1} for the connective tissue (C) at 1172 cm^{-1} for cancer tissue (K), should rather be associated with increased phosphorylation during carcinogenesis. Finally,

changes in the bending vibrations of O-P-O at 950 cm^{-1} show changes in the molecular structure of DNA of solid cancers. This change is associated with the grade of the cancer.

From the study of tumor tissue it has been clear that micro-FT-IR spectroscopy can be used as a pre-diagnostic and diagnostic method for the development and progression of breast cancer at a molecular level.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 1:</u> Ανατομία φυσιολογικού γυναικείου μαστού.....	9
<u>Εικόνα 2:</u> Πορογενές καρκίνωμα <i>in situ</i>	13
<u>Εικόνα 3:</u> Λοβιακό καρκίνωμα <i>in situ</i>	14
<u>Εικόνα 4:</u> Πορογενές καρκίνωμα , μη ειδικού τύπου grade II.....	15
<u>Εικόνα 5:</u> Μυελοειδές καρκίνωμα.....	16
<u>Εικόνα 6:</u> Μικροσκοπική απεικόνιση βλεννώδους ή κολλοειδούς καρκινώματος.....	17
<u>Εικόνα 7:</u> Απεικόνιση Διηθητικού λοβιακού καρκινώματος.....	18
<u>Εικόνα 8:</u> Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	22
<u>Εικόνα 9:</u> Σχηματική παράσταση συμβολομέτρου Michelson.....	27
<u>Εικόνα 10:</u> Α: Επιταχυντής σύγχροτρον παραγωγής δέσμης. Β: Σύγχροτρον micro-FT-IR φασματοφωτόμετρο.....	29
<u>Εικόνα 11:</u> Σύγκριση της έντασης του υπερύθρου φωτός σε συνάρτηση.....	30
<u>Εικόνα 12:</u> Πορογενής καρκίνος μαστού Grade II και Grade III.....	36
<u>Εικόνα 13:</u> Πλήρης micro-FT-IR χαρτογράφηση καρκινικού ιστού.....	37
<u>Εικόνα 14:</u> Μικροτομή λοβιακού καρκίνου: Grade III δ.1.....	38
<u>Εικόνα 15:</u> Μικροτομή λοβιακού <i>in situ</i> καρκίνου Grade III (δ.1).....	39
<u>Εικόνα 16:</u> Απεικόνιση πεπτιδικού δεσμού.....	44
<u>Εικόνα 17:</u> Σχηματική παράσταση της μεθυλίωσης της βάσης της γουανίνης.....	45
<u>Εικόνα 18:</u> Micro-FT-IR φάσματα <i>in situ</i> λοβιακού καρκινώματος σε διάφορες θέσεις της επιφάνειας της μικροτομής.....	48
<u>Εικόνα 19:</u> Κατανομή σύμφωνα με τα υπέρυθρα φάσματα των υγιών και καρκινικών κυττάρων στον εξεταζόμενο ιστό.....	49
<u>Εικόνα 20:</u> Πορογενής <i>in situ</i> καρκίνος.....	51
<u>Εικόνα 21:</u> Πορογενής <i>in situ</i> καρκίνος Grade I και Grade II.....	51
<u>Εικόνα 22:</u> Διηθητός πορογενής καρκίνος.....	52
<u>Εικόνα 23:</u> Απορρόφηση και δεύτερη παράγωγος στερεού καρκίνου, διηθητού καρκίνου και νεοπλασίας στην περιοχή $1350-800\text{ cm}^{-1}$	54
<u>Εικόνα 24:</u> mico-FT-IR φάσματα Αδενοκαρκινώματος.....	57
<u>Εικόνα 25:</u> mico-FT-IR φάσματα οστεοσαρκώματος Περιοχή $1800-800\text{ cm}^{-1}$	59
<u>Εικόνα 26:</u> Φωτογραφία video-φωτογραφία του πορογενούς <i>in situ</i> καρκινικού ιστού.....	62
<u>Εικόνα 27:</u> Α: video-φωτογραφία του μικροσκοπίου διηθητού αδενοκαρκινώματος.....	69
<u>Εικόνα 28:</u> Α: video-φωτογραφία του μικροσκοπίου.....	70
<u>Εικόνα 29:</u> Video απεικόνιση ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III.....	72
<u>Εικόνα 30:</u> Εικόνα του μικροσκοπίου του micro-FT-IR φασματοφωτομέτρου ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III.....	73
<u>Εικόνα 31:</u> Κατανομή των φασμάτων του καρκινικού ιστού με άτυπο μυελοειδές Grade III σε δύο στενές περιοχές Grade I και Grade II.....	74
<u>Εικόνα 32:</u> Δείγμα καρκινικού καρκίνου μαστού(δ.16).....	76
<u>Εικόνα 33:</u> Ιστός λοβιακού καρκίνου Grade II (δ.5).....	80
<u>Εικόνα 34:</u> Μικροφωτογραφία δείγματος (10.000 mm_7000 mm) πορογενούς καρκίνου Grade II.....	84
<u>Εικόνα 35:</u> Χαρτογράφηση των φασμάτων του ιστού της Εικόνας 34.....	88

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. site Αλμα ζωής <http://www.breastcancerhellas.gr>
2. Huabei Jiang, PhD, Nicusor V. Iftimia, PhD, Yong Xu, PhD Julia A. Eggert, PhD, Laurie L. Fajardo, MD, Karen L. Klove. Near-Infrared Optical Imaging of the Breast with Model-based Reconstruction. *Acad Radiol* **2002**; 9:186–19
3. Zhixiong Guo, Siew KanWan, David A. August, JinpinYing, Stanley M. Dunn, John L. Semmlow. Optical imaging of breast tumor through temporal log-slope difference mappings. *Comput Biol Med.* 2006 Feb;36(2):209-23.
4. Mamarelis I, Pissaridi K, Dritsa V, Kotileas P, Tsiligiris V, Tzilalis V and Anastassopoulou J, Oxidative Stress and Atherogenesis. An FT-IR Spectroscopic Study, *In Vivo*, , 24 (2010) 883-888.
5. Conti C, Ferraris P, Giorgini E, et al. FT-IR Microimaging Spectroscopy: Discrimination between healthy and neoplastic human colon tissues. *J Mol Struct.* 2008; 881: 46-51.
6. J. Anastassopoulou, E. Boukaki, C. Conti, P. Ferraris, E.Giorgini, C. Rubini, S. Sabbatini, T. Theophanides, G. Tosi, Microimaging FT-IR spectroscopy on pathological breast tissues, *Vibr. Spectr.*, 51 (2009)270-275,
7. Petra M, Anastassopoulou J, Theologis T et al. Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone. *J Mol Struct.* 2005; 78: 101-116.
8. Anastassopoulou J, Kolovou P, Mavrogenis A. Bone and Cancer. A synchrotron micro- infrared study. In: Ph Collery et al, editors. *Metal Ions in Biology and Medicine*. Paris: Eurotext, John Libbey; 2008. p. 210-213.
9. Kolovou P, Anastassopoulou J. Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. In: Tsakanov V, Wiedemann H, editors. *The effect of aging. Brilliant Light in Life and Material Sciences*. Springer; 2007. p. 267-272.
10. Theophanides T. *Infrared and Raman spectroscopy of biological molecules*. NATO Advanced Study Institute. Dodrecht: D Reidel Publishing Co; 1978.

11. M Beekes , P Lasch , D Naumann. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Veterinary Microbiology* 123 (2007) 305–319
12. Farid Moinfar. Essentials of diagnostic breast pathology, a practical approach. Springer books, 2007.
13. <http://www.eurocytology.eu/static/eurocytology/gre/breast/mod5contA.html>
14. Gamal Mostafa, Lamont Cathey, Frederick Greene. Review of Surgery: Basic science and clinical topics for Absite. Springer books,2006.
15. Michael R. Davis. Mammary Anatomy. Mastopexy and Breast Reduction: Principles and Practise. M.A. Shiffman (ed), Springer, 2009.
16. Γ. Σγουράκης, Ανατομία και φυσιολογία του μαστού: Ελληνική Χειρουργική Εταιρεία 2006
17. M. Guray, A. A. Sahin. Bening Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management. *The Oncologist* 2006;11:435-449
18. A. C Bateman. Pathology of benign breast disease. Women’s Health medicine 3:1. Elsevier, 2006.
19. Jack Cuzick. Epidemiology of breast cancer-selected highlights. *The breast* (2003) 12, 405-411
20. J.Richard Smith, Giuseppe Del Prisle. Women’s Cancers: Pathways to healing. A patient’s guide to dealing with cancer and abnormal smear. Springer books, 2009.
21. Patricia T. Kelly. Hereditary Breast Cancer:Risk assessment is the easy part. *The Breast Journal* 1999;5(1):52-58
22. Elinor Washbrook. Risk factors and epidemiology of breast cancer. Women’s Health medicine 3:1. Elsevier, 2006.
23. H.-O. Adami, I. Persson, A. Ekblom, A. Wolk, J. Ponten, D. Trichopoulos. The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutation Research* 333 (1995); 29-35
24. Breast Cancer etiology. Chapter II. Report of a working party for the Nordic Cancer Union. *Int. J. Cancer* (1990); Supplement 5, 22-39.
25. Erminia Manfrin et al. Benign breast lesions at risk of developing cancer- a challenging problem in breast cancer screening programs. *Cancer* 2009; 499-507
26. Erin L. Ashbeck, Robert D. Rosenberg, Patricia M. Stauber, Charles R. Key. Benign Breast Biopsy Diagnosis and Subsequent Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(3): 467-472

27. John V. Kiluk, Geza Acs, Susan J. Hoover. High-risk benign breast lesions: current strategies in management. *Cancer control*. 2007;14(4):321-329
28. Michael Baum. Epidemiology versus scare mongering: The case for the Humane interpretation of statistics and breast cancer. *The Breast Journal* 2000;6(5):331-334
29. Jennifer L. Kelsey, Marilie D. Gammon. The Epidemiology of Breast Cancer. *Ca-A cancer journal for clinicians* 1991;41(3)146-165
30. Jan Ponten et al. Chapter I: Biology and Natural history of breast cancer. *Int. J. Cancer* 1990;5:5-21
31. Ε Σιβρίδη. Παθολογική Ανατομική .Τόμος Δεύτερος. Εκδόσεις Πασχαλίδη, 2007:706-731
32. <http://www.flickr.com/photos/jian-hua-qiao-md/sets/72157622418599415/>
33. <http://ccm.ucdavis.edu/bcancercd/312/lcis.html>
34. <http://www.webpathology.com/image.asp?case=290&n=3>
35. <http://tgmouse.compmed.ucdavis.edu/jensen-mamm2000/BRCA-3/BRCA-3.HTML>
36. <http://www.surgicalpathologyatlas.com>
37. <http://www.webpathology.com/>
38. <http://www.anastasakou.gr/wmt/index.php?lid=1&pid=11&s=10>
39. Papanicolaou GN, Holmquist DG, Bader FM, Falk EA: Exfoliative cytology of the human mammary gland and its value in the diagnosis of cancer and other diseases of the breast. *Cancer* 1: 377-409, ,1958
40. Papanicolaou GN, New procedure for staining vaginal smears, *Science* 95 (1942) 438-439
41. Buehring GC, Letscher A, et al. Presence of epithelial cells in nipple aspirate fluid is associated with subsequent breast cancer: a 25-year prospective study *Breast Cancer Research and Treatment* 2006, 98, 63–70
42. Σ.Ξυνόγαλος Σύστημα σταδιοποίησης TNM / <http://www.onco.gr/documents/Xinogalos.pdf>
43. Φασματοχημικές, Φασματοσκοπικές και Βιοχημικές μέθοδοι στη Βιοανόργανη Χημεία. Υπέυθυνος καθηγητής: Νικόλαος Χατζηλιάδης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1999, κεφάλαιο 1.
44. Θεοφανίδης Θ., Αναστασοπούλου Ι., *Φασματοσκοπία Δονήσεων – Συμμετρία*, ΕΜΠ, Αθήνα, 1997

45. Αθανάσιου Βαλαβανίδη. Φασματοσκοπία Οργανικών ενώσεων. Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
46. Μ. Πετρά, Μελέτη της εξέλιξης και γήρανσης των οστών με υπέρυθρη φασματοσκοπία και μικρο-φασματοσκοπία. Σύγκριση με παθολογικά οστά και υποκατάστατα οστών, Διδακτορική διατριβή. ΕΜΠ, Αθήνα, 2003.
47. Π. Κολοβού, Επίδραση των ακτινοβολιών στην γήρανση των οστών. Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα 2008
48. M. Petra, J. Anastassopoulou, A. Dovas, D. Yfantis and T. Theophanides, “Aging of human bones. An infrared study”, *Metal Ion Biol. Med.* 6, 736 (2000)
49. Petra M., Anastassopoulou J., Theologis T., Theophanides T., Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone, *J. Mol Struct*, 78 (2005) 101-116
50. Petra M., Anstassopoulou J., Yfantis D., Theophanides T., FT-IR spectra of human Bones, in: *Spectroscopy of biological molecules: New Directions*, eds.
51. J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999, pp 55. Kolovou P., Anastassopoulou J., Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. The effect of aging. In *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Eds. V. Tsakanov and H. Wiedemann, Springer, 2007, pp.267-272
52. Mamarelis I., Pissaridi K., Dritsa V., Kotileas P., Tsiligiris V., Tzilalis V. and Anastassopoulou J., Oxidative Stress and Atherogenesis. An FT-IR Spectroscopic Study, *In Vivo*, 24 (2010) 883-888
53. Mamarelis I., Pissaridi K., Dritsa V., Koutoulakis E., Cotoulas C., Kotileas P., Tsiligiris V., Tzilalis V., Xaplanteris P., Lazaridis K., Anastassopoulou J., The effect of molybdenoenzymes on atherosclerotic hyperuricaemic patients, In *Coronary Artery Disease: Up 2011*, Eds. B.S. Lewis, M.Y. Flugelman, D. A. Halon, Medimond, International Proceedings, Bologna, Italy 2011, pp.83-90
54. Μαμαρέλης Ι., Κοτιλέας Π., Τσιλιγγίρης Β., Τζιλαλής Β., Πισσαρίδη Κ., Δρίτσα Β. Και Αναστασοπούλου Ι., Υπεροξειδωση των καρωτίδων αρτηριών κατά το οξειδωτικό στρες. FT-IR φασματοσκοπική μελέτη, *Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση*, 52 (2011) 117-123.
55. K. Pissaridi, V. Dritsa, I. Mamarelis. E. Koutoulakis, Ch. Kotulas and J. Anastassopoulou, The role of molybdenum on atheromatic plaque formation, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 11 (2011) 219-224.

56. T. Theophanides Metal ion-nucleic acid interactions as studied by Fourier transform infrared spectroscopy, in: Spectroscopy of inorganic bioactivators. Theory, applications-chemistry, Physics, Biology & Medicine, T. Theophanides, ed., Kluwer Academic Publishers, pp. 265-272- 1989
57. M. Ghomi, R. Letellier, J. Liquier, E. Taillandier, Interpretation of DNA vibrational spectra by normal coordinate analysis, *Int. J. Biochem.* (22) (1990) 691–699
58. X Yang, L Yan and N E Davidson DNA methylation in breast cancer *Endocrine-Related Cancer* (2001) 8 115–127
59. Balaña C, Ramirez JL, Taron M, Roussos Y, Ariza A, Ballester R, Sarries C, Mendez P, Sanchez JJ, Rosell R. O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res.* 2003 Apr;9(4):1461-8.
60. Metellus P, Coulibaly B, Nanni I, Fina F, Eudes N, Giorgi R, Barrie M, Chinot O, Fuentes S, Dufour H, Ouafik L, Figarella-Branger D. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort, *Cancer.* 2009 Oct 15;115(20):4783-94.
61. M Khanmohammadi, A B Garmarudi, Infrared spectroscopy provides a green analytical chemistry tool for direct diagnosis of cancer *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 6, 2011
62. A. Tajmir-Riahi and T. Theophanides, “An FT-IR Study of DNA and RNA Conformational Transitions at Low Temperatures”, *J. Biomol. Struct. and Dynamics*, 3, 537-542 (1985)
63. T. Theophanides and H.A. Tajmir-Riahi, “Flexibility of DNA and RNA upon binding to different Metal Cations. An Investigation of the B to A to Z Conformational Transition by Fourier Transform Infrared Spectroscopy” *J. Biomolecular Structure and Dynamics* Vo 2, 995-1004 (1985).
64. T. Theophanides and J. Anastassopoulou, “Nucleic Acid-Metal Ion Interactions and Helix Inversion”, *XV in Equilibri in soluzione, Aspetti teorici, sperimentali ed applicativi*, (Eds. C. La Mesa, A. Napoli, N. Russo & M. Toscano), Mara Editore,

- Italy, (1988).
65. A. Pacifico, L.A. Chiriboga, P. Lasch, M. Diem, *Vibrat. Spectrosc.* 32 (2003) 107
 66. J. Anastassopoulou, E. Boukaki, P. Arapantoni, C. Valavanis, S. Konstadoudakis, C. Conti, P. Ferraris, E. Giorgini, S. Sabbatini, G. Tosi, Micro-FT-IR spectroscopy of breast adenocarcinoma, in: V. Tsakanov, H. Wiedemann (Eds.), *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Springer, 2007, p. 273
 67. T. Theophanides, P. Angiboust, M. Manfait, Protein and Nucleic Acid Conformational Changes”, *Spectroscopic and Structural Studies of Biomaterials, I. Proteins* Twardowski (Eds.), *Spectroscopic and Structural Studies of Biomaterials, I. Proteins*, Sigma Press, Wilmslow, UK, 1988, p. 3., Recent Advances of the Application of Raman Spectroscopy to the Study of Biologically Important Molecules”, *Proceedings of 6th International Conference on Raman Spectroscopy in Biochemistry Section*, (Eds. E.D. Schmid et al), Heyden, London, Vo 1, p. 115-130 (1978)
 68. B. Rigas, P.T. Wong, *Cancer Res.* 52 (1992) 84.
 69. F.S. Parker, *Application of Infrared Spectroscopy in Biochemistry. Biology and Medicine*, Plenum Press, New York, 1971.
 70. A.A. Ismail, H.H. Mantsch, P.T.T. Wong, *Biochim. Biophys. Acta* 1121 (1992) 183
 71. B. Rigas, S. Morgello, I.S. Goldman, P.T.T. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 8140P.T.T.
 72. Wong, S. Lacelle, H.M. Yazdi, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 1830. P.T.T. Wong, R.K. Wong, M. Fung Kee Fung, *Appl. Spectrosc.* 47 (1993) 1058.
 73. T. Theophanides and H.A.. Tajmir-Riahi. “Spectroscopic Properties of Metal-Nucleotide and Metal Nucleic Acid Interactions”, in *Spectroscopy of Biological Molecules*, Eds., C. Sandorfy and T. Theophanides, R. Ridel, Holland, p. 137 –152. (1984)
 74. T. Theophanides, “FT-IR Spectra of Nucleic Acids and the Effect of Metal Ions”, in *Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Industrial and Medical*, Ed. T. Theophanides, R. Reidel, Holland, p. 105-124.(1984)