

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Υπερηχογράφημα με σκιαγραφικό μέσο και μοριακή ανάλυση στον καρκίνο του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι παγκοσμίως ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις γυναίκες, με μεγάλη διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης από τον δεύτερο. Ωστόσο, οι διακυμάνσεις της θνησιμότητας, μεταξύ των διαφορετικών περιοχών παγκοσμίως, είναι μικρότερες από τις διακυμάνσεις στην επίπτωση της νόσου, εξ αιτίας της ευνοϊκότερης επιβίωσης των γυναικών των ανεπτυγμένων χωρών, όπου η επίπτωση της νόσου είναι σημαντικά μεγαλύτερη. Στην ερμηνεία του φαινομένου αυτού, κομβικό ρόλο διαδραματίζουν η πρώιμη διάγνωση της νόσου και η έγκαιρη χορήγηση της κατάλληλης χημειοθεραπευτικής αγωγής, εξειδικευμένης ως προς τα ιδιαίτερα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε όγκου. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχουν λάβει χώρα σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της παθολογοανατομικής ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού, η οποία, για πολλά χρόνια, βασίστηκε αποκλειστικά σε ιστολογικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος και ο ιστολογικός τύπος του όγκου, ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειάς του και η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας προέκυψαν νέοι προγνωστικοί παράγοντες επιθετικότητας των όγκων, όπως οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) και η έκφραση των πυρηνικών πρωτεϊνών Ki-67 και p53. Με την ένταξη των τελευταίων στη χάραξη της θεραπευτικής στρατηγικής, η χημειοθεραπευτική αγωγή προσαρμόστηκε ακόμη περισσότερο στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του όγκου, ώστε να παρατηρείται σημαντική αύξηση της αποτελεσματικότητάς της και ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Από την άλλη πλευρά, η εφαρμογή του σκιαγραφικού μέσου στην υπερηχογραφική απεικόνιση έχει αυξήσει σημαντικά τις πληροφορίες που λαμβάνονται από τη συγκεκριμένη εξέταση, καθώς καθίσταται πλέον δυνατή η ανάδειξη της τριχοειδικής κυκλοφορίας και κατ'επέκταση η χαρτογράφηση της αγγειογένεσης στο εσωτερικό των απεικονιζόμενων αλλοιώσεων. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, το υπερηχογράφημα με σκιαγραφικό μέσο έχει χρησιμοποιηθεί ήδη στην προεγχειρητική διαφορική διάγνωση των καλοήθων από τις κακοήθεις αλλοιώσεις. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία έχουν αρχίσει να δημοσιεύονται μελέτες οι οποίες ασχολούνται με την ανάδειξη πιθανής σχέσης μεταξύ των ποιοτικών και των ποσοτικών χαρακτηριστικών των υπερηχογραφημάτων με σκιαγραφικό μέσο και των παθολογοανατομικών προγνωστικών παραγόντων. Η επιβεβαίωση τέτοιων συσχετίσεων θα καθιστούσε το υπερηχογράφημα ένα σημαντικό, μη επεμβατικό, προεγχειρητικό διαγνωστικό εργαλείο για την έγκαιρη επιλογή του κατάλληλου εξατομικευμένου θεραπευτικού πρωτοκόλλου.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι παγκοσμίως ο δεύτερος σε συχνότητα εμφάνισης τύπος καρκίνου, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, και ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις γυναίκες, με μεγάλη διαφορά ως προς τη συχνότητα εμφάνισης από τον δεύτερο.¹ Εκτιμάται ότι 1.670.000 νέες περιπτώσεις

καρκίνου του μαστού διαγνώστηκαν το 2012, περιπτώσεις που αντιστοιχούν στο 25% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού ποικίλλει σημαντικά, με τιμές από 27 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους στη μέση Αφρική και στην ανατολική Ασία, έως 92 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους στη

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2020, 37(5):612-624
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2020, 37(5):612-624

Ε. Βράκα,¹
Π. Γαλάνης²

¹Εργαστήριο Ακτινολογίας, «Αρεταίειο» Νοσοκομείο, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Τμήμα Νοσηλευτικής, Εργαστήριο Οργάνωσης και Αξιολόγησης Υπηρεσιών Υγείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Contrast-enhanced ultrasound and histopathological prognostic factors in breast cancer

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Καρκίνος του μαστού
Μοριακή ανάλυση
Προγνωστικοί παράγοντες
Υπερηχογράφημα με σκιαγραφικό μέσο

Υποβλήθηκε 4.5.2020
Εγκρίθηκε 10.5.2020

βόρεια Αμερική. Το 2016, το 14,6% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) αφορούσε στον καρκίνο του μαστού, ενώ το 6,8% των θανάτων από κακοήθειες οφείλονταν στη νόσο αυτή.²

Τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο της νόσου, κατά την αρχική διάγνωση. Στις ΗΠΑ, το 61,4% των γυναικών διαγιγνώσκονται με εντοπισμένη και όχι εκτεταμένη μεταστατική νόσο, με αποτέλεσμα η πενταετής επιβίωση να είναι εξαιρετικά υψηλή (99%). Εν τούτοις, τα αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης για περιπτώσεις με τοπική επέκταση της νόσου είναι 85% και μόλις 26% για γυναίκες με γενικευμένη νόσο τη στιγμή της διάγνωσης.³

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών σημειώθηκαν σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της παθολογοανατομικής ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού.⁴⁻¹³ Με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας προέκυψαν νέοι προγνωστικοί παράγοντες επιθετικότητας των όγκων, όπως οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα 2 και η έκφραση των πυρηνικών πρωτεϊνών Ki-67 και p53. Με την ένταξη των τελευταίων στη χάραξη της θεραπευτικής στρατηγικής, η χημειοθεραπευτική αγωγή προσαρμόστηκε ακόμη περισσότερο στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του όγκου, οδηγώντας σε σημαντική αύξηση της αποτελεσματικότητας της αγωγής και σε ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών.

Από την πλευρά της απεικονιστικής διερεύνησης, η εφαρμογή του σκιαγραφικού μέσου στην υπερηχογραφική απεικόνιση έχει αυξήσει σημαντικά τις πληροφορίες που λαμβάνονται από τη συγκεκριμένη εξέταση, καθώς καθίσταται πλέον δυνατή η ανάδειξη της τριχοειδικής κυκλοφορίας και κατ' επέκταση η χαρτογράφηση της αγγειογένεσης στο εσωτερικό των απεικονιζόμενων αλλοιώσεων. Στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού, το υπερηχογράφημα με σκιαγραφικό μέσο έχει χρησιμοποιηθεί ήδη στην προεγχειρητική διαφορική διάγνωση των καλοήθων από τις κακοήθεις αλλοιώσεις και ακολούθως στη διερεύνηση πιθανών σχέσεων μεταξύ των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών, μετά τη χρήση του σκιαγραφικού μέσου, και των ως άνω καθιερωμένων πλέον παθολογοανατομικών προγνωστικών παραγόντων.¹⁴⁻²²

2. ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΑ ΜΕΣΑ ΥΠΕΡΗΧΩΝ

2.1. Τεχνικά χαρακτηριστικά

Το συμβατικό υπερηχογράφημα B-mode, καθώς και το ασπρόμαυρο, το έγχρωμο ή το δυναμικό Doppler υπε-

ρηχογράφημα, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατεύθυνση και την ταχύτητα της αιματικής ροής. Ωστόσο, δεν είναι εφικτή η συλλογή πληροφοριών όσον αφορά στη βραδεία τριχοειδική αιματική ροή, κυρίως λόγω της ασθενούς ηχοανακλαστικής ικανότητας του αίματος. Οι συχνότητες του τελευταίου είναι μικρότερες από εκείνες των ιστών και συνεπώς οι τεχνικές Doppler, οι οποίες βασίζονται αποκλειστικά στην κίνηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, προκειμένου να διαφοροδιαγνώσουν το αίμα από τους υπόλοιπους ιστούς, δεν βοηθούν προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση.²³ Το υπερηχογράφημα με τη χρήση ειδικού ενδοφλέβιου σκιαγραφικού μέσου χρησιμοποιεί τη συμβατική υπερηχογραφική απεικόνιση προκειμένου να απεικονίσει τα σκιαγραφικά μέσα στα ειδικά επιθυμητά σημεία-στόχους, να σκιαγραφήσει και να καθορίσει τη δομική ανατομική, καθώς επίσης να ποσοτικοποιήσει τη διάχυση των σκιαγραφικών μέσων στους ιστούς, ακόμη και σε τριχοειδικό επίπεδο, με διάμετρο αγγείων <100 μm.²⁴ Ο εξοπλισμός του μηχανήματος των υπερήχων δεν χρησιμοποιεί ιονίζουσα ακτινοβολία και βασίζεται αποκλειστικά στην ακουστική ενέργεια, προκειμένου η απεικόνιση να γίνει διαδραστικά και σε πραγματικό χρόνο. Επιπρόσθετα, το υπερηχογράφημα είναι οικονομικό, φορητό, μη νεφροτοξικό και ήδη ευρέως διαδεδομένο, με πολύ μικρή επίπτωση ανεπιθύμητων ενεργειών.^{25,26}

Τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων αποτελούνται από μικροσφαιρίδια αέρα, διαμέτρου 1–10 μm, γνωστά ως μικροφουσαλίδες. Με δεδομένο το γεγονός ότι δεν διαχέονται, χρησιμεύουν ως αληθείς ενδαγγειακοί δείκτες και απεικονίζουν την ενδογενή χωρική και χρονική ετερογένεια της διάχυσης στους ιστούς.^{27,28} Οι συγκεκριμένες μικροφουσαλίδες είναι ικανές να επιβιώσουν της διέλευσης από την πνευμονική κυκλοφορία, με αποτέλεσμα να κυκλοφορήσουν ξανά και να δημιουργήσουν χρήσιμη σκιαγραφική ενίσχυση στη συστηματική κυκλοφορία, δρώντας ως δείκτης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, μολονότι είναι μεγαλύτερα μόρια και παραμένουν ενδαγγειακά.²⁹ Η ηχογένεια που παράγεται από το σκιαγραφικό μέσο οφείλεται στην ικανότητά του να αντανakλά τα υπερηχητικά κύματα, λόγω του αέρα εντός των μικροφουσαλίδων, ενώ το περίβλημα παρέχει την απαραίτητη σταθερότητα και καθορίζει το μέγεθος των μικροφουσαλίδων, το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Οι μεγάλες φουσαλίδες είναι περισσότερο ηχογενείς, αλλά δεν είναι ικανές να διέλθουν από τα τριχοειδή. Αντίθετα, οι μικροφουσαλίδες, διαμέτρου 2–4 μm, οι οποίες είναι μικρότερες ακόμη και από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, φαίνεται να λειτουργούν καλύτερα στην απεικόνιση, ενώ διατηρούνται για λίγα λεπτά, ώστε να προκαλούν σκιαγραφική ενίσχυση των ασπρόμαυρων αγγείων και αυξημένη ένταση σήματος Doppler.³⁰⁻³³ Συνήθως απαιτούνται 1–2 mL σκιαγραφικού

μέσου για την πραγματοποίηση της εξέτασης, ποσότητα η οποία είναι πολύ μικρότερη από εκείνη την οποία λαμβάνει ο ασθενής κατά τη διενέργεια αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας.

Τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων πρώτης γενιάς απαιτούσαν υψηλό μηχανικό δείκτη, προκειμένου να καταστρέψουν τις φυσαλίδες και να δημιουργήσουν την εικόνα. Η διάρκεια ζωής τους στην κυκλοφορία ήταν λίγα μόλις δευτερόλεπτα, καθώς στερούνταν σταθεροποιητικών περιβλημάτων και δεν μπορούσαν να διέλθουν από τα τριχοειδή λόγω του μεγάλου μεγέθους τους.³⁴ Επί πλέον, δεν μπορούσαν να εισέλθουν στις αριστερές καρδιακές κοιλότητες, παρά μόνο με απ' ευθείας έγχυση.

Τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων δεύτερης γενιάς, τα οποία διέρχονται της πνευμονικής κυκλοφορίας, έχουν υψηλό μοριακό βάρος, αποτελούνται από αέρια χαμηλής διαλυτικής ικανότητας και από σταθεροποιητικό περίβλημα από πρωτεΐνη, πολυμερές ή επιφανειοδραστικό παράγοντα, με σκοπό την παρατεταμένη *in vivo* αντοχή.^{27,35} Τα συγκεκριμένα σκιαγραφικά μέσα αποδείχθηκαν ασφαλή, επαρκή και οικονομικά.^{23,35,36}

Τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων τρίτης γενιάς συστούν τη νεότερη, περισσότερο εκλεπτυσμένη αρμονική απεικόνιση, με χαμηλότερο μηχανικό δείκτη απεικόνισης, ώστε να ληφθούν παρατεταμένες και ανθεκτικές αναλογίες σήματος-θορύβου *in vivo*. Ο αεριούχος πυρήνας έχει αντικατασταθεί από αέρια περιορισμένης διαλυτότητας στο αίμα και παθοφυσιολογικά αδρανή. Με τον τρόπο αυτόν, ο χρόνος ημίσειας ζωής της εν λόγω γενιάς μικροφυσαλίδων έχει υπερβεί τα 15 min. Τα συγκεκριμένα σκιαγραφικά μέσα είναι ειδικά σεσημασμένα και σχεδιασμένα, ώστε να παρέχουν ποσοτικά παθοφυσιολογική εντόπιση ή μοριακή απεικόνιση της φλεγμονής και των λοιπών σχετικών παθήσεων, χάρη στην αυξημένη σταθερότητά τους.²⁷

Τέλος, τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων τέταρτης γενιάς έχουν σχεδιαστεί ως κατευθυνόμενα από τους υπερήχους, εξειδικευμένα ως προς τη θέση, φάρμακα ή συστήματα γονιδιακής θεραπείας και αποτελούν αντικείμενο μελέτης.^{34,37-39}

2.2. Ασφάλεια

Τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων θεωρούνται σε γενικές γραμμές πολύ ασφαλή, με πολύ μικρή επίπτωση ανεπιθύμητων ενεργειών. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα σκιαγραφικά μέσα που περιέχουν ιώδιο, οι μικροφυσαλίδες δεν είναι νεφροτοξικές και δεν επιδρούν στον θυρεοειδή. Η επίπτωση σοβαρής αντίδρασης υπερευαισθησίας ή αλλεργικής αντίδρασης είναι μικρότερη από εκείνη των

ιωδιούχων και των παραμαγνητικών σκιαγραφικών μέσων. Το αναφερόμενο ποσοστό απειλητικών για τη ζωή αναφυλακτικών αντιδράσεων προκαλούμενων από το σκιαγραφικό μέσο των υπερήχων είναι <0,001%,²⁵ ενώ το 0,01% των ασθενών αναφέρει αγγειακές ή ήπιες αλλεργικές αντιδράσεις, λίγα λεπτά μετά τη χορήγησή του.²³

Παρά το χαμηλό ποσοστό κινδύνου εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών, η χρήση των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων οφείλει να γίνεται πάντα με προσοχή και με την παρουσία των απαραίτητων μηχανισμών ασφάλειας, όπως η διαθεσιμότητα μηχανημάτων καρδιοαναπνευστικής αναζωογόνησης. Έχουν υπάρξει αναφορές περιστατικών απειλητικών για τη ζωή σε μικρό αριθμό βαρέως πασχόντων με μειωμένη ικανότητα ανοχής ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες θεωρούνται ήπιες υπό φυσιολογικές συνθήκες.⁴⁰ Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες^{41,42} οι οποίες αμφισβητούν την ασφάλεια των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων, αναφέροντας ότι οφείλει κάποιος να είναι ιδιαίτερα προσεκτικός κατά τη χορήγησή τους σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιακή ανεπάρκεια, λόγω της αύξησης του όγκου του αίματος που προκαλούν. Επιπρόσθετα, σημειώθηκαν >190 περιπτώσεις σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών, οι οποίες περιλάμβαναν πρώιμες κοιλιακές συστολές και την υποκλινική απελευθέρωση βιολογικών δεικτών του μυοκαρδίου,^{30,43,44} καθώς και 4 θάνατοι σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη χορήγηση σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων. Επίσης, οι συγκεκριμένες ανεπιθύμητες ενέργειες ταυτοποιήθηκαν σε μελέτες σε ζώα και ομοίαζαν με τις σοβαρές καρδιοαναπνευστικές αντιδράσεις που παρατηρήθηκαν στους ανθρώπους.

Οι Piscaglia και Bolondi²⁵ ανέλυσαν 23.188 εξετάσεις με τη χρήση σκιαγραφικού μέσου υπερήχων, στην πλειοψηφία τους υπερηχογραφήματων καρδιακών κοιλιών (92%), οι οποίες διενεργήθηκαν σε 28 κέντρα στην Ιταλία. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης δεν περιλάμβαναν κάποια θανατηφόρα ανεπιθύμητη ενέργεια και μόλις 4 ανεπιθύμητες ενέργειες οι οποίες έρχονταν θεραπευτικής αντιμετώπισης, με αποτέλεσμα το ποσοστό των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών να είναι 0,0086%, ποσοστό μικρότερο από εκείνο των λοιπών σκιαγραφικών μέσων, των αναλγητικών και των αντιβιοτικών.

2.3. Καρκίνος του μαστού

Σήμερα, η χρήση των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων καθιερώνεται σε όλο και περισσότερες απεικονιστικές εφαρμογές, σε διαφορετικά όργανα του ανθρώπινου σώματος, όπως η καρδιά, τα αγγεία, το ήπαρ και το χοληφόρο δένδρο, ο σπλήνας, το πάγκρεας, οι νεφροί, ο προστάτης, ο μαστός και οι ενδοκρινείς αδένες, τα γεννητικά όργανα

θήλεος, η ουροδόχος κύστη και οι όρχεις, καθώς και σε μια μεγάλη ποικιλία παθήσεων, όπως το αμβλύ κοιλιακό τραύμα και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Τα τελευταία έτη, ο ρόλος των σκιαγραφικών μέσων δεν περιορίζεται στη διάγνωση, αλλά επεκτείνεται και στη θεραπεία παθήσεων, ως φορείς παραγόντων σε όργανα-στόχους, υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση.

Ειδικότερα, η εφαρμογή των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων στη διαφορική διάγνωση αλλοιώσεων του μαστού έχει αρκετά πλεονεκτήματα.⁴⁵⁻⁴⁷ Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τη μέθοδο είναι ποικίλες, καθώς αφορούν στους χαρακτήρες συμπεριφοράς πρόσληψης του σκιαγραφικού μέσου, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα σημαντικοί, με δεδομένο το βασικό διαφορικό διαγνωστικό ερώτημα για την καλοήγη ή την κακοήγη φύση μιας αλλοίωσης. Για παράδειγμα, η ανάδειξη εσωτερικής νέκρωσης αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα κακοήθειας, ενώ η αύξηση της διαμέτρου της αλλοίωσης μετά τη χορήγηση του σκιαγραφικού μέσου υποδηλώνει διήθηση του περιβάλλοντος ιστού και αναδεικνύει την ανάγκη ευρύτερης εκτομής της μελετώμενης αλλοίωσης. Παράλληλα, ο ακριβής υπολογισμός της διαμέτρου της αλλοίωσης βοηθά στον καλύτερο υπολογισμό της πιθανότητας λεμφαδενικής προσβολής, η οποία μπορεί να αναδειχθεί απεικονιστικά με την ανομοιογενή σκιαγραφική ενίσχυση του λεμφαδένα. Ακόμη, τα χαρακτηριστικά της καμπύλης πρόσληψης του σκιαγραφικού μέσου φαίνεται να σχετίζονται με την απάντηση στη χημειοθεραπεία. Τα τελευταία έτη έχει γίνει προσπάθεια συσχέτισης των απεικονιστικών χαρακτήρων των αλλοιώσεων του μαστού με ορισμένους παθολογοανατομικούς προγνωστικούς παράγοντες, μια προοπτική η οποία είναι ιδιαίτερης σημασίας για την έγκαιρη προεγχειρητική αντιμετώπιση των ασθενών με κακοήθεις αλλοιώσεις του μαστού.

Τα πλεονεκτήματα της σκιαγραφικής μελέτης των αλλοιώσεων του μαστού με τη χρήση σκιαγραφικού μέσου σχετίζονται με την ίδια τη φύση της μεθόδου. Το υπερηχογράφημα είναι μια εξέταση σχετικά εύκολα υλοποιήσιμη, παρέχει άμεση απάντηση στον ασθενή, ενώ με τη βοήθεια της συνεχώς εξελισσόμενης τεχνολογίας των μηχανημάτων των υπερήχων η ποιότητα των λαμβανομένων εικόνων έχει βελτιωθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα την αύξηση της αξιοπιστίας της μεθόδου. Επί πλέον, αυτή η τεχνολογική εξέλιξη καθιστά όλο και πιο εύκολη την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων και την αξιολόγηση των εικόνων, μειώνοντας την επίδραση παραγόντων που περιορίζουν τη διαγνωστική της αξία, όπως τεχνικών σφαλμάτων τα οποία οφείλονται στις αναπνευστικές κινήσεις, με τη χρήση ειδικών λογισμικών παρακολούθησής τους. Τέλος, είναι

ιδιαίτερης αξίας η δυνατότητα επανάληψης της μεθόδου στην περίπτωση που, για τον οποιονδήποτε λόγο, η πρώτη χορήγηση του σκιαγραφικού μέσου δεν ήταν ικανοποιητικά διαγνωστική.

Συγκριτικά με την απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό, η οποία σήμερα αποτελεί την καθιερωμένη απεικονιστική μέθοδο αξιολόγησης των αλλοιώσεων του μαστού με τη βοήθεια σκιαγραφικού μέσου, η αντίστοιχη υπερηχογραφική μελέτη υπερτερεί σε ορισμένους τομείς. Αρχικά, είναι μια μέθοδος τεχνικά πολύ πιο εύκολα και ταχύτερα πραγματοποιήσιμη, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί σε αλλοιώσεις διαμέτρου <1 cm, οι οποίες δεν αξιολογούνται δυναμικά στον μαγνητικό συντονισμό. Ιδιαίτερης μνείας χρήζει το γεγονός ότι η φαρμακοκινητική των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων είναι διαφορετική εκείνης του μαγνητικού συντονισμού, καθώς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα τελευταία διαχέονται στον διάμεσο ιστό, με αποτέλεσμα να αντικατοπτρίζουν τόσο την αγγείωση της απεικονιζόμενης αλλοίωσης όσο και τη διάχυση, σε αντίθεση με τα σκιαγραφικά μέσα των υπερήχων, τα οποία αναδεικνύουν αποκλειστικά την αγγείωση των ελεγχόμενων ιστών, χαρακτηριστικό ιδιαίτερα σημαντικό για την ογκολογική προσέγγιση. Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν την εναπόθεση γαδολίνιου στον εγκέφαλο ασθενών μετά από επαναλαμβανόμενη λήψη των σκιαγραφικών μέσων του μαγνητικού συντονισμού.⁴⁸

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συμβολή της εν λόγω υπερηχογραφικής μεθόδου και στην περίπτωση διενέργειας βιοψίας, όπου η σκιαγραφική μελέτη της αλλοίωσης μπορεί να υποδείξει την ύπαρξη περιοχών νέκρωσης εντός των αλλοιώσεων, οι οποίες πρέπει να αποφεύγονται προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.^{49,50} Παράλληλα, η ίδια η υπερηχογραφική μελέτη με σκιαγραφικό μέσο περιορίζει την ανάγκη πραγματοποίησης αυτών των βιοψιών, καθώς συχνά οι λαμβανόμενες πληροφορίες είναι ικανές για τη διαφορική διάγνωση των αλλοιώσεων.

Τέλος, η υπερηχογραφική μελέτη με σκιαγραφικό μέσο έχει εφαρμογή και κατά τη μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών, αναδεικνύοντας περιοχές ύποπτες υποτροπής, τα χαρακτηριστικά των οποίων μπορούν να συσχετιστούν με εκείνα του προεγχειρητικού ελέγχου.

Από τα παραπάνω καθίσταται εμφανές ότι η χρήση των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων διευρύνεται με ιδιαίτερα ταχείς ρυθμούς, σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της ιατρικής επιστήμης, με αποτέλεσμα την καθιέρωσή τους πέρα από τους διαγνωστικούς σκοπούς για τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν αρχικά.

3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών και καθώς προσεγγίζουμε την εποχή της εξατομικευμένης Ιατρικής, σημειώθηκαν σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της διάγνωσης και της ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού, η οποία, για πολλά έτη, βασίστηκε σε κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, όπως το μέγεθος και ο ιστολογικός τύπος του όγκου, η διήθηση των λεμφαδένων και ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.

Εν τούτοις, ο καρκίνος του μαστού περιλαμβάνει μια ετερογενή ομάδα όγκων, οι οποίοι ποικίλλουν σημαντικά όσον αφορά στην απάντησή τους στη θεραπεία, στον τρόπο εμφάνισής τους και στη βιολογία τους. Δεν είναι σπάνιο ιστολογικά παρόμοιοι όγκοι να έχουν διαφορετική κλινική συμπεριφορά και ανταπόκριση στη θεραπεία. Οι σημαντικές εξελίξεις των τελευταίων ετών στον τομέα της εξατομικευμένης θεραπείας οφείλονται στην ολοκλήρωση της ανάλυσης του γονιδιώματος, η οποία κατέστησε δυνατή τη μοριακή μελέτη και την ταξινόμηση των όγκων και παρέχει πλέον τη δυνατότητα δημιουργίας βιολογικά στοχευμένων φαρμάκων, όπως η τρασουζουμάμπη, στην περίπτωση ασθενών με καρκίνο του μαστού θετικού για τον υποδοχέα human epidermal growth factor receptor 2 (HER2).⁵¹ Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες βιολογικές παράμετροι είναι οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ο υποδοχέας HER2, καθώς και οι πρωτεΐνες Ki-67 και p53, τιμές οι οποίες προκύπτουν από την ανοσοϊστοχημική ανάλυση, η οποία έχει πλέον καταστεί ρουτίνα στην παθολογοανατομική μελέτη των όγκων. Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση επιτρέπει την ημιποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης μιας πρωτεΐνης αποκλειστικά στο επίπεδο του ιστού του όγκου και πραγματοποιείται συστηματικά κατά τη διαδικασία παθολογοανατομικής διάγνωσης του διηθητικού καρκίνου του μαστού.⁵² Ωστόσο, η βιολογική ετερογένεια των όγκων συνεχίζει να δημιουργεί προβλήματα, καθώς μόνο ένα υποσύνολο ασθενών με συγκεκριμένο ιστολογικό τύπο θα επωφεληθεί ή θα ανταποκριθεί θετικά στη στοχευμένη θεραπεία.

3.1. Κλασικές μέθοδοι

Παραδοσιακά, ο καρκίνος του μαστού κατηγοριοποιείτο με τη χρήση του ιστολογικού βαθμού κακοήθειας. Το σύστημα ταξινόμησης του Elston ή αλλιώς σύστημα ταξινόμησης του Nottingham, το οποίο αποτελεί τροποποίηση του συστήματος ταξινόμησης των Bloom-Richardson, είναι αυτό που χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως. Ωστόσο, παρατηρείται μεταβλητότητα μεταξύ των ερευνητών και σημαντικά χαμηλή επαναληψιμότητα μεταξύ των παθολο-

γοανατόμων, όσον αφορά στη σταδιοποίηση του όγκου.⁵³ Εν τούτοις, αυτή καθ' εαυτή η σταδιοποίηση του όγκου διαδραματίζει κάποιον ρόλο στη διάγνωση και στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού, καθώς η αξία της ως ανεξάρτητου προγνωστικού παράγοντα στο ποσοστό συνολικής επιβίωσης, ανεξαρτήτως του μεγέθους του όγκου και της διήθησης των λεμφαδένων, έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες.⁵⁴⁻⁵⁶

Παράλληλα με τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, οι παθολογοανατόμοι παραδοσιακά ταξινομούν τον καρκίνο του μαστού σε ιστολογικούς τύπους. Είναι κοινά αποδεκτό ότι συγκεκριμένοι τύποι καρκίνου του μαστού σχετίζονται με ξεχωριστά βιολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία συνδέονται με την κλινική τους συμπεριφορά.⁵⁷ Ωστόσο, τα κριτήρια ταξινόμησης και διάγνωσης για τον κάθε ιστολογικό τύπο ποικίλλουν στη διάρκεια των ετών. Η επιλογή ειδικού ιστολογικού τύπου καρκινώματος είναι ασυνήθης, με αποτέλεσμα αυτά να μην μπορούν να συμπεριληφθούν πάντα σε μακροπρόθεσμες ή μοριακές μελέτες.⁵⁸

3.2. Υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι δείκτες του όγκου, οι οποίοι έχουν άμεση επίδραση στις συστηματικές θεραπευτικές αποφάσεις των ασθενών με καρκίνο του μαστού. Οι ανωτέρω υποδοχείς είναι συχνότερα θετικοί σε χαμηλού και μέτριου βαθμού κακοήθειας όγκους, καθώς και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Θεωρούνται προγνωστικοί δείκτες περιορισμένης αξίας, αλλά ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες της απάντησης του όγκου στην ορμονοθεραπεία (π.χ. με ταμοξιφαίνη).^{13,59} Παράλληλα, ο υποδοχέας της προγεστερόνης αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα απάντησης στη θεραπεία, εξ αιτίας του γεγονότος ότι οι ασθενείς που είναι θετικές ως προς αμφότερους τους ανωτέρω υποδοχείς εμφανίζουν καλύτερη απάντηση στη θεραπεία, συγκριτικά με εκείνες οι οποίες είναι θετικές ως προς τους υποδοχείς των οιστρογόνων και αρνητικές ως προς τους υποδοχείς της προγεστερόνης.^{4,59}

Η παρουσία υποδοχέων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης επιβεβαιώνεται με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας, η οποία αποτελεί την εφαρμοζόμενη μέθοδο μέτρησης, λόγω της ευρείας διαθεσιμότητάς της και της ευκολίας στη χρήση της.⁴ Εν τούτοις, εκτιμάται ότι περίπου το 20% των συνολικών δοκιμασιών μέτρησης των υποδοχέων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μπορεί να μην είναι ακριβείς,⁵ με αποτέλεσμα να διατυπώνονται επιφυλάξεις σχετικά με τις δοκιμασίες, την επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων και τα ψευδώς θετικά και αρνητικά αποτελέσματα.^{4,59} Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την ακρίβεια

των δοκιμασιών για τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, περιλαμβανομένων του ιστολογικού τύπου του δείγματος, του τρόπου και του χρόνου στερέωσης, της απασβέστωσης του ιστού, της αυτοματοποιημένης συγκριτικά με τη χειροκίνητη διαδικασία, της επιλογής αντισωμάτων, καθώς και της ποιότητας ασφάλειας και ελέγχου.⁶⁰ Για τη δοκιμασία μέτρησης των υποδοχέων των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ο ιστός είναι αναγκαίο να τέμνεται σε τομές πάχους 5 mm και να σταθεροποιείται σε ικανή ποσότητα διαλύματος φορμόλης 10%, για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 6 ωρών, αλλά όχι >72 ωρών. Το χρονικό διάστημα ψυχρής ισχαιμίας δεν πρέπει να είναι >1 ώρα. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση που παρατηρείται πυρηνική χρώση σε ποσοστό $\geq 1\%$ των κυττάρων, τα αποτελέσματα είναι θετικά. Τέλος, κάθε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για τους υποδοχείς των οιστρογόνων και της προγεστερόνης είναι απαραίτητο να περιλαμβάνει θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές.⁵

3.3. Υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα 2

Η οργανική πρωτεΐνη του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των HER, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *ERBB2*.⁶⁷ Ο υποδοχέας HER2 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε πολλά φυσιολογικά επιθήλια, περιλαμβανομένου του μαστού. Η ενίσχυση του υποδοχέα HER2 και η υποκείμενη υπερέκφραση της πρωτεΐνης λαμβάνουν χώρα στο 15–20% των καρκίνων του μαστού.^{4,8} Η υπερέκφραση του υποδοχέα HER2, η διέγερση του γονιδίου ή και τα δύο αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες του κλινικού αποτελέσματος. Παράλληλα, ο υποδοχέας HER2 αποτελεί προγνωστικό δείκτη της απάντησης του όγκου σε διάφορους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Η κατάστασή του αξιολογείται προκειμένου να καθοριστεί η καταλληλότητα του ασθενούς για τη λήψη θεραπείας με αντισώματα κατά του υποδοχέα HER2. Τα στοχευμένα φάρμακα στον υποδοχέα HER2 έχουν βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης και απάντησης στη θεραπεία, όταν χρησιμοποιούνται ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα ή χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.^{61,62}

Η κατάσταση του υποδοχέα HER2 μπορεί να καθοριστεί σε ιστό σταθεροποιημένο σε φορμόλη και εμβαπτισμένο σε παραφίνη, εκτιμώντας την έκφραση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημική ανάλυση ή εκτιμώντας τον αριθμό των αντιγράφων του υποδοχέα HER2, με τη χρήση *in situ* υβριδισμού. Για να είναι επαρκής η δοκιμασία, η διαδικασία

σταθεροποίησης είναι απαραίτητο να αρχίσει εντός μίας ώρας από την αφαίρεση του όγκου και ο συνολικός χρόνος της σταθεροποίησης πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 6 και 72 ωρών. Στην ανοσοϊστοχημική ανάλυση, οι τιμές 0 και 1+ θεωρούνται αρνητικές, η τιμή 3+ θεωρείται θετική, ενώ η τιμή 2+ συνιστά μια «γκρίζα ζώνη», για την οποία η δοκιμή με κάποια εναλλακτική δοκιμασία κρίνεται απαραίτητη.^{8,9}

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια της δοκιμασίας προσδιορισμού του υποδοχέα HER2 και την απάντηση του όγκου στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Στην περίπτωση παρουσίας μεταστάσεων, τα ποσοστά ανταπόκρισης στην τραστουζουμάμπη είναι <50% και πολλές ασθενείς, οι οποίες αρχικά ανταποκρίνονται στη θεραπεία, στη συνέχεια αναπτύσσουν υποτροπή του όγκου και φαρμακοαντοχή.^{63–65} Μολονότι οι ποικίλες απαντήσεις στην τραστουζουμάμπη δεν σχετίζονται στο σύνολό τους με σφάλματα κατά τη δοκιμασία ελέγχου, η τυποποίηση της μεθοδολογίας που εφαρμόζεται στο εκάστοτε εργαστήριο είναι προβληματική. Επί πλέον, το 20% των δοκιμασιών για τον υποδοχέα HER2 μπορεί να είναι εσφαλμένες.^{63–65}

Οι συνηθέστεροι παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της δοκιμασίας περιλαμβάνουν την παρατεταμένη σταθεροποίηση στη φορμόλη και σε λοιπούς σταθεροποιητικούς παράγοντες, καθώς και την απασβέστωση του ιστού, με πιθανό αποτέλεσμα την εκφύλιση του DNA.^{8,9} Στον καρκίνο του μαστού μπορεί να παρατηρηθεί παράλληλη ενίσχυση του ανιχνευτή απαρτίθμησης του χρωμοσώματος 17 (CEP 17) και του υποδοχέα HER2, με αποτέλεσμα τη λανθασμένη μέτρηση του λόγου HER2:CEP17 και την επακόλουθη υποεκτίμηση της ενίσχυσης του υποδοχέα HER2.⁶⁶ Επιπρόσθετα, μερικοί όγκοι επιδεικνύουν ετερογένεια στο εσωτερικό τους ως προς την ενίσχυση του υποδοχέα HER2. Μολονότι ο παρακάτω ορισμός έχει αμφισβητηθεί,⁶ η ετερογένεια ως προς τον υποδοχέα HER2 αντιστοιχεί σε έναν όγκο ο οποίος έχει τουλάχιστον 5%, αλλά όχι >50% των μη συγκεντρωμένων πυρήνων του και έναν λόγο HER2:CEP17 >2,2.⁶⁷ Η ετερογένεια του όγκου ως προς τον υποδοχέα HER2 κυμαίνεται μεταξύ του 5% και του 15% του συνόλου των περιστατικών που έχουν ελεγχθεί, ενώ η συγκεκριμένη ετερογένεια μπορεί να είναι πιο συχνή (έως 27%) στα καρκινώματα του μαστού με αμφιλεγόμενη τιμή του υποδοχέα HER2 (2+).^{67,68}

Απαραίτητη είναι η ομοφωνία μεταξύ ανοσοϊστοχημείας του υποδοχέα HER2 (της έκφρασης της πρωτεΐνης) και του *in situ* υβριδισμού (ενίσχυση του γονιδίου) τουλάχιστον στο 95% των περιπτώσεων.⁶⁴ Η ασυμφωνία αποτελεσμάτων ανέρχεται περίπου στο 4% των περιπτώσεων.⁶⁹ Τα συγκεκριμένα ευρήματα μπορεί να αποδοθούν σε ενίσχυση, χωρίς υπερέκφραση του γονιδίου, σε σημαντική ανομοιογένεια

στο εσωτερικό του όγκου ή σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης, χωρίς ενίσχυση. Η απάντηση των συγκεκριμένων περιπτώσεων στη θεραπεία με αντισώματα εναντίον του υποδοχέα HER2 δεν είναι γνωστή.^{8,9,64}

3.4. Πρωτεΐνη Ki-67

Η πυρηνική πρωτεΐνη Ki-67 εκφράζεται κατά τη διάρκεια των φάσεων G1, S, G2 και M του κυτταρικού κύκλου, αλλά όχι κατά τη φάση ηρεμίας του κυττάρου G0.⁷⁰ Το επίπεδο της έκφρασης της μπορεί να αξιολογηθεί από το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που έχουν σημαδευτεί από αντι-Ki-67 αντισώματα στην ανοσοϊστοχημεία. Προφανώς, ο υπολογισμός του επιπέδου έκφρασης αυτής της πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τον μιτωτικό δείκτη. Επομένως, η πρωτεΐνη Ki-67 αποτελεί έναν τρόπο αξιολόγησης του πολλαπλασιασμού του όγκου του καρκίνου του μαστού.¹⁰

Μελέτες επικυρώνουν την προγνωστική αξία της πρωτεΐνης Ki-67 στον καρκίνο του μαστού, με μια προγνωστική δυνατότητα εξαιρετικά ευνοϊκή, συγκριτικά με τη χαμηλή της τιμή.⁷¹ Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη Ki-67, σε συνδυασμό με την ανάλυση της έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων και του υποδοχέα HER2, επιτρέπει τη μοριακή ταξινόμηση των καρκίνων του μαστού στην κλινική πράξη, συνδράμει στον καθορισμό της πρόγνωσης τους, αλλά και στη λήψη της απόφασης χορήγησης χημειοθεραπείας. Ωστόσο, η προγνωστική της αξία ως προς την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία δεν έχει καθοριστεί ακόμη. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των ασθενών οι οποίες λαμβάνουν προεγχειρητική θεραπεία, η πρωτεΐνη Ki-67 σχετίζεται θετικά με πλήρη κλινική ή ιστολογική ανταπόκριση, αλλά στην περίπτωση συμπληρωματικής μετεγχειρητικής θεραπείας⁷² η προγνωστική της αξία είναι λιγότερο σαφής.^{73,74}

Ο υπολογισμός της πρωτεΐνης Ki-67 έχει πολλούς περιορισμούς, οι οποίοι οφείλονται κυρίως στη μεταβλητότητα της εξ αιτίας της ενδογενούς χωρικής και χρονικής ετερογένειας του όγκου, καθώς και στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημείας μεταξύ των ερευνητών και των εργαστηρίων.⁷⁵ Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια δημιουργίας διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών προκειμένου να τυποποιηθεί η ανάλυση της πρωτεΐνης Ki-67, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της επαναληψιμότητάς της, αν και όχι σε ικανοποιητικό βαθμό προς το παρόν.^{11,75,76} Εξ άλλου, με δεδομένο το γεγονός ότι η τιμή της πρωτεΐνης Ki-67 αποτελεί μια συνεχή μεταβλητή μεταξύ του 0% και του 100%, καταβλήθηκε προσπάθεια ορισμού ενός συναινετικού διαχωριστικού ορίου, το οποίο θα έχει εφαρμογή στην κλινική πράξη. Για παράδειγμα, το 2009 ορίστηκαν τρεις κατηγορίες τιμών της πρωτεΐνης Ki-67, με τιμές $\leq 15\%$ να ορίζονται ως ασθενείς,

τιμές μεταξύ 16–30% να ορίζονται ως ενδιάμεσες και τιμές $>30\%$ να ορίζονται ως υψηλές.⁷⁷ Το 2011 προτάθηκε και ένα διαχωριστικό όριο της τάξης του 14% για τη διάκριση των καρκίνων αυλικού τύπου A από εκείνους του αυλικού τύπου B.⁷⁸ Στη συνέχεια, το ως άνω όριο επαναξιολογήθηκε και ανήλθε στο 20%,⁷⁷ ενώ, τελικά, δόθηκε η σύσταση υιοθέτησης του ορίου του 20% ως ενδιάμεσου επιπέδου τιμής της πρωτεΐνης Ki-67, όπως αυτό παρατηρείται σε κάθε εργαστήριο.¹²

Αναμφίβολα, παραμένουν κάποιες δυσκολίες ως προς την προτυποποίηση των τεχνικών ανοσοϊστοχημείας και τον καθορισμό ενός ορίου της τιμής της πρωτεΐνης Ki-67, καθώς και τη λήψη σημαντικών αποφάσεων με γνώμονα πιθανές μικρές διακυμάνσεις της ανωτέρω τιμής, γύρω από ένα δεδομένο όριο. Εν τούτοις, η πρωτεΐνη Ki-67 αντιπροσωπεύει ένα μείζον εργαλείο για τον χαρακτηρισμό του καρκίνου του μαστού, τόσο σε επίπεδο μοριακής ταξινόμησης του όγκου, όσο και σε επίπεδο πρόγνωσης και θεραπείας.¹⁰

3.5. Πρωτεΐνη p53

Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *TP53*, απουσιάζει στις νεοπλασίες σε ποσοστό περίπου 50–55%.⁷⁹ Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 είναι χαμηλά και σε μερικές περιπτώσεις δεν ανιχνεύονται καθόλου. Ωστόσο, τα σήματα stress προς το κύτταρο, όπως η καταστροφή του DNA, η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και η υποξία, σταθεροποιούν την πρωτεΐνη και αυξάνουν την ενδογενή παραγωγή της. Οι δράσεις της είναι ποικίλες, όπως η διακοπή του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σημαντικού φραγμού εναντίον της δημιουργίας όγκου.^{79,80} Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι ο ρόλος της επεκτείνεται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του κυττάρου, καθώς και στην ομοιόσταση αυτού, με αποτέλεσμα η απουσία της να κατέχει κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου.⁸¹ Ο ιδιαίτερος ρόλος της στο μικροπεριβάλλον του όγκου δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ωστόσο, πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη p53 αποτελεί αναστολέα της αρωματάσης και με τον τρόπο αυτόν επηρεάζει την παραγωγή οιστρογόνων στο μικροπεριβάλλον του όγκου.⁸²

Οι αναστολείς της αρωματάσης και τα αντιοιστρογόνα αποτελούν τις πλέον συνήθεις θεραπείες για τους οιστρογονοεξαρτώμενους καρκίνους, με τους αναστολείς της αρωματάσης να θεωρούνται ως πλέον αποτελεσματικοί συγκριτικά με τη θεραπεία με ταμοξифαίνη.⁸² Περίπου το 30% των όγκων του μαστού φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της πρωτεΐνης p53, οι οποίες σχετίζονται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και ταχεία επέκταση της νόσου.⁸³ Πρόσφατες μελέτες ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος κατέδειξαν

ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης p53 σχετίζονται σημαντικά με την αντίσταση στον αναστολέα της αρωματάσης.⁸⁴ Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης p53 σχετίζεται με την αντίσταση στους αναστολείς της αρωματάσης και η συσσώρευσή της στον πυρήνα υποδηλώνει την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53*.⁸² Η πρωτεΐνη p53 θεωρείται προγνωστικός βιολογικός δείκτης στην Ογκολογία, με την υπερέκφραση αυτής να συνδέεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου, καθώς και με πρώιμη και όψιμη υποτροπή σε μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με καρκίνο του μαστού και θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, οι οποίες λαμβάνουν ως θεραπεία αναστολείς της αρωματάσης.¹³ Συμπερασματικά, η έκφραση της πρωτεΐνης p53 έχει πιθανή προγνωστική αξία στην περίπτωση του οιστρογονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.⁸²

3.6. Προφίλ γονιδιακής έκφρασης

Το προφίλ γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε για χρονικό διάστημα πλέον της δεκαετίας στην εκπόνηση κλινικών δοκιμών, ώστε να ληφθούν κλινικά αποτελέσματα ακριβή, εξατομικευμένα και καλύτερης προγνωστικής αξίας, συγκριτικά με τα παραδοσιακά παθολογικά και κλινικά πρότυπα. Ο πλέον εύκολος υπολογισμός των μοριακών υποτύπων ταυτοποιείται με τη χρήση των βιολογικών δεικτών που χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη και περιλαμβάνει την παρουσία ή την απουσία των υποδοχέων των ορμονών (οιστρογόνων και προγεστερόνης) (HR+/HR-), καθώς και την υπερπαραγωγή του υποδοχέα HER2, με αποτέλεσμα τον ορισμό 4 υποτύπων για τον καρκίνο του μαστού, ως εξής: (α) *Αυλικός τύπος A (HR+/HER2-)*. Η πλειοψηφία των καρκίνων του μαστού (74%) είναι θετική ως προς την έκφραση των υποδοχέων των οιστρογόνων (ER+) ή και της προγεστερόνης (PR+), αλλά όχι και του υποδοχέα HER2 (HER2-). Οι συγκεκριμένοι καρκίνοι αναπτύσσονται αργά και λιγότερο επιθετικά από τους υπόλοιπους υποτύπους. Έτσι, σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση, ειδικά βραχυπρόθεσμη, εν μέρει λόγω του γεγονότος ότι η έκφραση των ορμονικών υποδοχέων προδικάζει την ευνοϊκή απάντηση στην ορμονοθεραπεία.^{85,86} (β) *Τριπλός αρνητικός τύπος (HR-/HER2-)*. Αντιπροσωπεύει περίπου το 12% των καρκίνων του μαστού και ο συγκεκριμένος χαρακτηρισμός οφείλεται στο γεγονός ότι είναι αρνητικοί ως προς όλες τις παραμέτρους (ER-, PR-, HER2-). Οι συγκεκριμένοι καρκίνοι είναι περίπου δύο φορές πιο συχνόι στις γυναίκες της μαύρης φυλής, συγκριτικά με τις γυναίκες της λευκής φυλής στις ΗΠΑ. Επίσης, είναι περισσότερο συνήθεις στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε εκείνες οι οποίες φέρουν τη μετάλλαξη BRCA1.⁸⁷ Η πλειοψηφία του συγκεκριμένου υποτύπου καρκίνου (75%

περίπου) μεταπίπτει στον βασικοκυτταρικό υπότυπο. Εμφανίζουν πτωχότερη βραχυπρόθεσμη πρόγνωση, συγκριτικά με τους υπόλοιπους υποτύπους καρκίνου του μαστού, εν μέρει επειδή προς το παρόν δεν υπάρχουν στοχευμένες θεραπείες για τη συγκεκριμένη ομάδα όγκων.^{86,88} (γ) *Αυλικός τύπος B (HR+/HER2+)*. Όπως ακριβώς και οι αυλικοί καρκίνοι του μαστού τύπου A, οι τύπου B είναι θετικοί ως προς τους ορμονικούς υποδοχείς (ER+ και ή PR+), ενώ διαχωρίζονται από τους πρώτους επειδή είναι υψηλά θετικοί ως προς την πρωτεΐνη Ki-67 (δείκτης υψηλού κυτταρικού διπλασιασμού) ή τον υποδοχέα HER2. Περίπου το 10% των καρκίνων του μαστού ανήκουν σε αυτόν τον υπότυπο και έχουν την τάση να είναι υψηλότερου βαθμού κακοήθειας και περισσότερο επιθετικοί από εκείνους του αυλικού τύπου A.⁸⁹ (δ) *Εμπλουτισμένος με τον υποδοχέα HER2 τύπος (HR-/HER2+)*. Αντιστοιχεί στο 4% των καρκίνων του μαστού. Οι συγκεκριμένοι όγκοι υπερπαραγωγή του υποδοχέα HER2 και δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς. Έχουν την τάση να αυξάνουν και να επεκτείνονται περισσότερο επιθετικά από τους υπόλοιπους καρκίνους του μαστού, ενώ συνδυάζονται με πτωχότερη βραχυπρόθεσμη πρόγνωση, συγκριτικά με εκείνους που είναι θετικοί ως προς τους υποδοχείς των οιστρογόνων.⁸⁶ Ωστόσο, η πρόσφατη εκτεταμένη χρήση των στοχευμένων θεραπειών για τους καρκίνους που είναι θετικοί ως προς τον υποδοχέα HER2 έχει αναστρέψει σε σημαντικό βαθμό τη δυσμενή προγνωστική επίδραση της υπερέκφρασης του υποδοχέα HER2.

Μολονότι η παραπάνω ταξινόμηση έτυχε ευρείας αποδοχής, η αρχική μεθοδολογική δοκιμασία χρησιμοποίησε την ανάλυση έκφρασης του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) σε νωπούς κατεψυγμένους ιστούς, παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτόν την εισαγωγή της στην κλινική πράξη. Έχουν μελετηθεί και άλλες εναλλακτικές, προκειμένου να ταυτοποιηθούν υπότυποι με τη χρήση πρότυπων ιστών, σταθεροποιημένων σε φορμόλη και εμβάπτισμένων σε παραφίνη. Μολονότι οι ενδογενείς υπότυποι προσεγγίζονται με τη χρήση βαφών ανοσοϊστοχημείας, όπως των οιστρογονικών υποδοχέων, των προγεστερονικών υποδοχέων, του υποδοχέα HER2, της πρωτεΐνης Ki-67 και των κυτοκερατινών 5/6, 7, 8, 17, 18 και 19, η εφαρμογή της ανοσοϊστοχημείας για τον σκοπό αυτόν δεν έτυχε ευρείας αποδοχής, εξ αιτίας της ασυμφωνίας με άλλες μοριακές μεθόδους και της πολυπλοκότητας που παρουσιάζεται με τη χρήση πολλαπλών ανοσοϊστοχημικών δεικτών σε περιορισμένη ποσότητα ιστού.^{90,91}

Ο καθορισμός του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης βοηθά στην ταυτοποίηση των γονιδίων, με προοπτική χρησιμοποίησής τους ως μοριακή σφραγίδα στην κατευθυνόμενη θεραπεία και στον καθορισμό της πρόγνωσης

των ασθενών.⁹² Οι πλέον δημοφιλείς πλατφόρμες πολυγονιδιακών προγνωστικών δοκιμών για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν ανοσοϊστοχημική ανάλυση, φασματοσκοπία, *in situ* υβριδισμό, αναστροφή της αλυσιδωτής αντίδρασης τρανσκριπτάσης-πολυμεράσης (RT-PCR) και τεχνολογία μικροσυστοιχιών.

4. ΣΧΕΣΗ ΥΠΕΡΗΧΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΜΕ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΟ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Η σχέση μεταξύ των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών μιας κακοήθους αλλοίωσης στον μαστό, όπως αυτοί προκύπτουν από την προεγχειρητική μελέτη της αλλοίωσης με τη χρήση των σκιαγραφικών μέσων των υπερήχων, με τους παθολογοανατομικούς προγνωστικούς παράγοντες της αλλοίωσης, οι οποίοι προκύπτουν από τη μετεγχειρητική αξιολόγηση του εξαιρεθέντος όγκου, είναι ένα θέμα μελέτης το οποίο έχει απασχολήσει πρόσφατα τους ερευνητές.¹⁴⁻²² Το ενδιαφέρον αυτό είναι εύλογο, δεδομένου του σημαντικού οφέλους που μπορεί να προκύψει από την εύρεση μιας τέτοιας συσχέτισης. Με την εξέλιξη της θεραπευτικής στρατηγικής κατά του καρκίνου του μαστού, η πρωιμότερη γνώση του βαθμού επιθετικότητας του όγκου, αλλά και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της κακοήθους συμπεριφοράς του, καθιστούν εφικτή την έγκαιρη εφαρμογή του ιδανικού και άκρως εξατομικευμένου θεραπευτικού πρωτοκόλλου για την εκάστοτε ασθενή, από τη στιγμή ακόμη της πρωτοδιάγνωσης, πριν ακόμη εκείνη οδηγηθεί στην αίθουσα του χειρουργείου και σίγουρα πολύ νωρίτερα από την εξαγωγή των τελικών ιστολογικών αποτελεσμάτων. Είναι προφανές ότι, παράλληλα με τον χρόνο που μπορεί να κερδηθεί, η ασθενής επωφελείται από την αποφυγή της πρόσθετης ταλαιπωρίας μιας πιθανής προεγχειρητικής βιοψίας ή λήψης αρχικής χημειοθεραπευτικής αγωγής λιγότερο εξειδικευμένης ως προς τους ιδιαίτερους χαρακτήρες της δικής της κακοήθειας.

Και οι 9 μελέτες¹⁴⁻²² που έχουν διεξαχθεί κατέληξαν σε σχέσεις μεταξύ των υπερηχογραφικών χαρακτηριστικών με σκιαγραφικό και των παθολογοανατομικών προγνωστικών παραγόντων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Ο αριθμός των κακοήθων αλλοιώσεων στις μελέτες αυτές ποικίλλει από 34–167, ενώ η μέση ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 49,4–60,9 έτη. Οι περισσότερες σχέσεις που βρέθηκαν στις μελέτες αυτές αφορούσαν στα ποιοτικά και λιγότερο στα ποσοτικά υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά.

Αναλυτικότερα, αναφορικά με τα ποιοτικά υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά, η ετερογενής σκιαγραφική ενίσχυση των αλλοιώσεων,¹⁵ η απουσία σκιαγραφικής ενίσχυσης εντός του όγκου,^{15,17,19} η κεντρομόλος σκιαγραφική ενίσχυση των

αλλοιώσεων¹⁵ και η παρουσία διατιτραίνοντων αγγείων¹⁷ φαίνεται να εμφανίζονται συχνότερα στους μεγαλύτερους σε μέγεθος όγκους. Επί πλέον, η ετερογενής σκιαγραφική ενίσχυση,^{14,15,17} η απουσία σκιαγραφικής ενίσχυσης,^{14,15} η κεντρομόλος σκιαγραφική ενίσχυση των αλλοιώσεων,¹⁵ η παρουσία διατιτραίνοντων αγγείων^{17,19} και η ασαφопоίηση των ορίων της αλλοίωσης²² έχουν σχετιστεί με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας. Η ετερογενής σκιαγραφική ενίσχυση των αλλοιώσεων έχει σχετιστεί με την ανίχνευση διήθησης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες²² και με όγκους θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2,^{19,20} ενώ η απουσία σκιαγραφικής ενίσχυσης έχει σχετιστεί με την απουσία υποδοχέων οιστρογόνων,^{15,17,19} με όγκους θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2^{15,17,19,20} και όγκους με θετική έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67.^{17,19} Επί πλέον, η κεντρομόλος σκιαγραφική ενίσχυση των αλλοιώσεων έχει σχετιστεί με την απουσία υποδοχέων οιστρογόνων,¹⁷⁻¹⁹ η παρουσία διατιτραίνοντων αγγείων¹⁵ έχει σχετιστεί με την ανίχνευση διήθησης στους μασχαλιαίους λεμφαδένες¹⁵ και με όγκους θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2,²⁰ η ασαφопоίηση των ορίων της αλλοίωσης φαίνεται να σχετίζεται με την απουσία υποδοχέων οιστρογόνων,²² και η σκιαγραφική ενίσχυση του άμεσα περιβάλλοντος ιστού έχει σχετιστεί με όγκους με θετική έκφραση των πρωτεϊνών Ki-67²² και p53.¹⁵

Αναφορικά με τα ποσοτικά υπερηχογραφικά χαρακτηριστικά, τα ευρήματα είναι αρκετά λιγότερα και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις δίστανται, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματα να είναι ασαφή. Αναλυτικότερα, η μέση τιμή μέγιστης σκιαγραφικής ενίσχυσης (peak intensity, PEAK) φαίνεται ότι είναι μικρότερη σε όγκους με διήθηση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες¹⁶ και μεγαλύτερη σε όγκους με απουσία υποδοχέων οιστρογόνων²¹ και προγεστερόνης²¹ και με θετική έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67.¹⁵ Επί πλέον, η μέση τιμή του χρόνου μέχρι τη μέγιστη σκιαγραφική ενίσχυση (time to peak, TTP) φαίνεται να είναι μεγαλύτερη²¹ ή μικρότερη^{16,20} σε όγκους με υψηλότερο βαθμό κακοήθειας και μικρότερη σε όγκους με διήθηση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες,¹⁶ με απουσία υποδοχέων οιστρογόνων¹⁶ και προγεστερόνης¹⁶ και όγκους θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2.²⁰ Τέλος, ο αυξημένος όγκος του σκιαγραφικού-αίματος που διέρχεται από την περιοχή του ενδιαφέροντος (regional blood volume, RBV) φαίνεται να σχετίζεται με διήθηση στους μασχαλιαίους λεμφαδένες,¹⁶ με όγκους θετικούς ως προς τον υποδοχέα HER2²⁰ και θετική έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67.¹⁵

5. ΣΥΝΟΨΗ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία υπάρχει ένδειξη για την παρουσία σχέσεων μεταξύ των υπερηχογραφικών χαρα-

κτηριστικών, μετά τη χρήση του σκιαγραφικού μέσου, και των καθιερωμένων παθολογοανατομικών προγνωστικών παραγόντων. Η θεμελίωση μιας τέτοιας σχέσης θα βοηθούσε ιδιαίτερα τόσο στον προεγχειρητικό σχεδιασμό, όσο και στην έγκαιρη εφαρμογή της κατάλληλα εξατομικευμένης προεγχειρητικής θεραπείας, με σημαντικό όφελος τόσο για τις ασθενείς, όσο και για τις ιατρικές και φαρμακευτικές δαπάνες. Η χρήση υπερηχογραφήματος με σκιαγραφικό μέσο έχει τα εχέγγυα ώστε να αποτελέσει μια χρήσιμη, μη επεμβατική και μη δαπανηρή διαγνωστική προσέγγιση, μεταξύ των καθιερωμένων διαγνωστικών τεχνικών στο συγκεκριμένο πεδίο, σε μια σύγχρονη πραγματικότητα, όπου η θεραπεία του καρκίνου καθίσταται όλο και πιο στοχευμένη, οπότε οι αξιόπιστες προεγχειρητικές πληροφορίες είναι

πολύτιμες και βοηθητικές για την καθοδήγησή της τόσο προεγχειρητικά όσο και μετεγχειρητικά στη διαχείριση των πιθανών μελλοντικών υποτροπών. Φυσικά, οι διαγνωστικοί περιορισμοί της εκάστοτε απεικονιστικής μεθόδου είναι δεδομένοι και πρέπει να συνυπολογίζονται, καθώς σε καμιά περίπτωση η διάγνωση της οποιασδήποτε κακοήθειας και γενικότερα η συνολική διαχείριση του ογκολογικού ασθενούς δεν στηρίζονται αποκλειστικά στις πληροφορίες που μπορεί να αντληθούν από το υπερηχογράφημα. Ωστόσο, τα παρόντα δεδομένα καθιστούν την εκτενέστερη έρευνα σε αυτόν τον τομέα απόλυτα δικαιολογημένη και επιτακτική, με μοναδικό απώτερο σκοπό τη βέλτιστη διαχείριση των ασθενών με καρκίνο του μαστού.

ABSTRACT

Contrast-enhanced ultrasound and histopathological prognostic factors in breast cancer

I. VRAKA,¹ P. GALANIS²

¹Department of Radiology, "Aretaieion" Hospital, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ²Department of Nursing, Center for Health Services Management and Evaluation, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2020, 37(5):612–624

Breast cancer is by far the most frequent cancer among women worldwide. The range in mortality rates between world regions is less than the range of the incidence of the disease, because of the more favorable survival of breast cancer in the high-incidence developed regions. This can be explained by the early diagnosis of the disease and timely administration of appropriate chemotherapy adapted to tumor-specific pathological characteristics. In the last decades, important advances have been made in breast cancer pathological classification, which for a long time had been based on the histological characteristics, namely the tumor size, its histological type and grade, and the axillary lymph nodes status. With the introduction of immunohistochemistry, new prognostic factors, indicative of the tumor's aggressiveness, can also be identified, namely estrogen and progesterone receptors, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and expression of Ki-67 and p53 core proteins. Taking these factors into account, chemotherapy has become even better adapted to the special tumor characteristics, maximizing its effectiveness and minimizing its side effects. In addition, the introduction of contrast media in ultrasound (US) imaging has increased the information provided, making it possible to demonstrate the tumor microcirculation and thus to map angiogenesis. Contrast-enhanced (US) in breast cancer had been used to differentiate between benign and malignant lesions, before the surgery, but in the last decade new studies have evaluated the possible correlation between qualitative and quantitative characteristics of contrast-enhanced US and pathological prognostic factors in breast cancer, which could render US an important, non-invasive diagnostic tool in the selection of the ideal specialized protocol, before surgery.

Key words: Breast cancer, Contrast-enhanced ultrasound, Molecular analysis, Prognostic factors

Βιβλιογραφία

- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (assessed 11.9.2019)
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Female breast cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (assessed 11.9.2019)
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast cancer facts and figures. Available at: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html> (assessed 11.9.2019)
- GOWN AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008, 21(Suppl 2):S8–S15
- HAMMOND MEH, HAYES DF, DOWSETT M, ALLRED DC, HAGERTY KL,

- BADVE S ET AL. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010, 134:e48–e72
6. CHANG MC, MALOWANY JI, MAZURKIEWICZ J, WOOD M. "Genetic heterogeneity" in HER2/neu testing by fluorescence *in situ* hybridization: A study of 2,522 cases. *Mod Pathol* 2012, 25:683–688
 7. SAPINO A, GOIA M, RECUPERO D, MARCHIÒ C. Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: State of the art and controversial issues. *Front Oncol* 2013, 3:129
 8. WOLFF AC, HAMMOND MEH, HICKS DG, DOWSETT M, McSHANE LM, ALLISON KH ET AL. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014, 138:241–256
 9. FITZGIBBONS PL, DILLON DA, ALSABEH R, BERMAN MA, HAYES DF, HICKS DG ET AL. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 2014, 138:595–601
 10. ZEMMOURI Y, DE CROZE D, VINCENT SALOMON A, ROUZIER R, BONNEAU C. Molecular characterization of breast cancer in clinical practice. *Gynecol Obstet Fertil* 2016, 44:285–292
 11. POLLEY MYC, LEUNG SCY, GAO D, MASTROPASQUA MG, ZABAGLO LA, BARTLETT JM ET AL. An international study to increase concordance in Ki67 scoring. *Mod Pathol* 2015, 28:778–786
 12. COATES AS, WINER EP, GOLDBIRSCHE A, GELBER RD, GNANT M, PICCART-GEBHART M ET AL. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015. *Ann Oncol* 2015, 26:1533–1546
 13. YAMAMOTO M, HOSODA M, NAKANO K, JIA S, HATANAKA KC, TAKAKUWA E ET AL. p53 accumulation is a strong predictor of recurrence in estrogen receptor-positive breast cancer patients treated with aromatase inhibitors. *Cancer Sci* 2014, 105:81–88
 14. WANG X, XU P, WANG Y, GRANT EG. Contrast-enhanced ultrasonographic findings of different histopathologic types of breast cancer. *Acta Radiol* 2011, 52:248–255
 15. WAN CF, DU J, FANG H, LI FH, ZHU JS, LIU Q. Enhancement patterns and parameters of breast cancers at contrast-enhanced US: Correlation with prognostic factors. *Radiology* 2012, 262:450–459
 16. SZABÓ BK, SARACCO A, TÁNCZOS E, ASPELIN P, LEIFLAND K, WILCZEK B ET AL. Correlation of contrast-enhanced ultrasound kinetics with prognostic factors in invasive breast cancer. *Eur Radiol* 2013, 23:3228–3236
 17. CAO XL, BAO W, ZHU SG, WANG LH, SUN MH, WANG L ET AL. Contrast-enhanced ultrasound characteristics of breast cancer: Correlation with prognostic factors. *Ultrasound Med Biol* 2014, 40:11–17
 18. ZHAO LX, LIU H, WEI Q, XU G, WU J, XU HX ET AL. Contrast-enhanced ultrasonography features of breast malignancies with different sizes: Correlation with prognostic factors. *Biomed Res Int* 2015, 2015:613831
 19. ZHAO YX, LIU S, HU YB, GE YY, LV DM. Diagnostic and prognostic values of contrast-enhanced ultrasound in breast cancer: A retrospective study. *Onco Targets Ther* 2017, 10:1123–1129
 20. WANG XY, HU Q, FANG MY, HE Y, WEI HM, CHEN XX ET AL. The correlation between HER-2 expression and the CEUS and ARFI characteristics of breast cancer. *PLoS One* 2017, 12:e0178692
 21. JI CL, LI XL, HE YP, LI DD, GU XG, XU HX. Quantitative parameters of contrast-enhanced ultrasound in breast invasive ductal carcinoma: The correlation with pathological prognostic factors. *Clin Hemorheol Microcirc* 2017, 66:333–345
 22. VRAKA I, PANOURGIAS E, SIFAKIS E, KOUREAS A, GALANIS P, DELLAPORTAS D ET AL. Correlation between contrast-enhanced ultrasound characteristics (qualitative and quantitative) and pathological prognostic factors in breast cancer. *In Vivo* 2018, 32:945–954
 23. DINDYAL S, KYRIAKIDES C. Ultrasound microbubble contrast and current clinical applications. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2011, 6:27–41
 24. LEEN E, MOUG SJ, HORGAN P. Potential impact and utilization of ultrasound contrast media. *Eur Radiol* 2004, 14(Suppl 8):P16–P24
 25. PISCAGLIA F, BOLONDI L; ITALIAN SOCIETY FOR ULTRASOUND IN MEDICINE AND BIOLOGY (SIUMB) STUDY GROUP ON ULTRASOUND CONTRAST AGENTS. The safety of SonoVue in abdominal applications: Retrospective analysis of 23,188 investigations. *Ultrasound Med Biol* 2006, 32:1369–1375
 26. JAKOBSEN JA, OYEN R, THOMSEN HS, MORCOS SK; MEMBERS OF CONTRAST MEDIA SAFETY COMMITTEE OF EUROPEAN SOCIETY OF UROGENITAL RADIOLOGY (ESUR). Safety of ultrasound contrast agents. *Eur Radiol* 2005, 15:941–945
 27. FEINSTEIN SB, COLL B, STAUB D, ADAM D, SCHINKEL AFL, ten CATE FJ ET AL. Contrast enhanced ultrasound imaging. *J Nucl Cardiol* 2010, 17:106–115
 28. FEINSTEIN SB. The powerful microbubble: From bench to bedside, from intravascular indicator to therapeutic delivery system, and beyond. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 287:H450–H457
 29. GRANADA JF, FEINSTEIN SB. Imaging of the vasa vasorum. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008, 5(Suppl 2):S18–S25
 30. BLOMLEY M, COSGROVE D. Microbubble echo-enhancers: A new direction for ultrasound? *Lancet* 1997, 349:1855–1856
 31. COSGROVE D. Future prospects for SonoVue and CPS. *Eur Radiol* 2004, 14(Suppl 8):P116–P124
 32. CORREAS JM, BRIDAL L, LESAVRE A MÉJEAN A, CLAUDON M, HÉLÉNON O. Ultrasound contrast agents: Properties, principles of action, tolerance, and artifacts. *Eur Radiol* 2001, 11:1316–1328
 33. NIHOYANNOPOULIS P. Contrast echocardiography. *Clin Radiol* 1996, 51(Suppl 1):28–30
 34. TINKOV S, BEKEREDJIAN R, WINTER G, COESTER C. Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *J Pharm Sci* 2009, 98:1935–1961
 35. SCHNEIDER M. Characteristics of SonoVue trade mark. *Echocardiography* 1999, 16:743–746
 36. LINDNER JR. Microbubbles in medical imaging: Current applications and future directions. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3:527–532
 37. PITT WG, HUSSEINI GA, STAPLES BJ. Ultrasound drug delivery – a general review. *Expert Opin Drug Deliv* 2004, 1:37–56

38. UNGER EC, HERSH E, VANNAN M, MATSUNAGA TO, McCREERY T. Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis* 2001, 44:45–54
39. SHOHET RV, CHEN S, ZHOU YT, WANG Z, MEIDELL RS, UNGER RH ET AL. Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery through myocardium. *Circulation* 2000, 101:2554–2556
40. CLAUDON M, COSGROVE D, ALBRECHT T, BOLONDI L, BOSIO M, CALIADA F ET AL. Guidelines and good clinical practice recommendations for Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS) – update 2008. *Ultraschall Med* 2008, 29:28–44
41. JUNG P, RIEBER J, SOHN HJ, HOYER C, ERHARDT I, NOWOTNY A ET AL. Safety of first- and second-time application of transpulmonary ultrasound contrast agents during stress echocardiography. *Eur J Echocardiogr* 2007, 8:707
42. TIMPERLEY J, MITCHELL ARJ, THIBAUT H, MIRZA IH, BECHER H. Safety of contrast dobutamine stress echocardiography: A single center experience. *J Am Soc Echocardiogr* 2005, 18:163–167
43. BARNETT SB, DUCK F, ZISKIN M. Recommendations on the safe use of ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol* 2007, 33:173–174
44. VANCRAEYNEST D, KEFER J, HANET C, FILLEE C, BEAULOYE C, PASQUET A ET AL. Release of cardiac bio-markers during high mechanical index contrast-enhanced echocardiography in humans. *Eur Heart J* 2007, 28:1236–1241
45. JIA K, LI L, WU XJ, HAO MJ, XUE HY. Contrast-enhanced ultrasound for evaluating the pathologic response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019, 98:e14258
46. MORI N, MUGIKURA S, MIYASHITA M, KUDO Y, SUZUKI M, LI L ET AL. Perfusion contrast-enhanced ultrasound to predict early lymph-node metastasis in breast cancer. *Jpn J Radiol* 2019, 37:145–153
47. LEE YJ, KIM SH, KANG BJ, KIM YJ. Contrast-enhanced ultrasound for early prediction of response of breast cancer to neoadjuvant chemotherapy. *Ultraschall Med* 2019, 40:194–204
48. ROGOSNITZKY M, BRANCH S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: A review of known and proposed mechanisms. *Bio-metals* 2016, 29:365–376
49. NIELSEN MOODY A, BULL J, CULPAN AM, MUNYOMBWE T, SHARMA N, WHITAKER M ET AL. Preoperative sentinel lymph node identification, biopsy and localisation using contrast enhanced ultrasound (CEUS) in patients with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clin Radiol* 2017, 72:959–971
50. ZHONG J, SUN DS, WEI W, LIU X, LIU J, WU X ET AL. Contrast-enhanced ultrasound-guided fine-needle aspiration for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *Ultrasound Med Biol* 2018, 44:1371–1378
51. KALIA M. Personalized oncology: Recent advances and future challenges. *Metabolism* 2013, 62(Suppl 1):S11–S14
52. SENKUS E, KYRIAKIDES S, PENNAULT-LLORCA F, POORTMANS P, THOMPSON A, ZACKRISSON S ET AL. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013, 24(Suppl 6):vi7–vi23
53. ROBBINS P, PINDER S, DE KLERK N, DAWKINS H, HARVEY J, STERRETT G ET AL. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995, 26:873–879
54. RAKHA EA, EL-SAYED ME, LEE AHS, ELSTON CW, GRAINGE MJ, HODI Z ET AL. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008, 26:3153–3158
55. ELSTON CW, ELLIS IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19:403–410
56. SCHWARTZ AM, HENSON DE, CHEN D, RAJAMARTHANDAN S. Histologic grade remains a prognostic factor for breast cancer regardless of the number of positive lymph nodes and tumor size: A study of 161,708 cases of breast cancer from the SEER program. *Arch Pathol Lab Med* 2014, 138:1048–1052
57. ROSA M. Advances in the molecular analysis of breast cancer: Pathway toward personalized medicine. *Cancer Control* 2015, 22:211–219
58. WEIGELT B, REIS-FILHO JS. Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009, 6:718–730
59. DIAZ LK, SNEIGE N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: Current issues and keys to increasing testing accuracy. *Adv Anat Pathol* 2005, 12:10–19
60. RHODES A, JASANI B, BALATON AJ, BARNES DM, MILLER KD. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7,016 breast carcinomas: Correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol* 2000, 53:688–696
61. BASELGA J, CORTÉS J, KIM SB, IM SA, HEGG R, IM YH ET AL. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2012, 366:109–119
62. VERMA S, MILES D, GIANNI L, KROP IE, WELSLAU M, BASELGA J ET AL. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012, 367:1783–1791
63. DE ALAVA E, OCAÑA A, ABAD M, MONTERO JC, ESPARIS-OGANDO A, RODRÍGUEZ CA ET AL. Neuregulin expression modulates clinical response to trastuzumab in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007, 25:2656–2663
64. WOLFF AC, HAMMOND MEH, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ ET AL. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007, 131:18–43
65. PAIK S, BRYANT J, TAN-CHIU E, ROMOND E, HILLER W, PARK K ET AL. Real-world performance of HER2 testing – national surgical adjuvant breast and bowel project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94:852–854
66. VARGA Z, TUBBS RR, WANG Z, SUN Y, NOSKE A, KRADOLFER D ET AL. Co-amplification of the *HER2* gene and chromosome 17 centromere: A potential diagnostic pitfall in HER2 testing in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 132:925–935
67. VANCE GH, BARRY TS, BLOOM KJ, FITZGIBBONS PL, HICKS DG, JENKINS RB ET AL. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: Panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med* 2009, 133:611–612
68. OHLSCHEGEL C, ZAHLE K, KRADOLFER D, HELL M, JOCHUM W. HER2 genetic heterogeneity in breast carcinoma. *Clin Pathol* 2011,

- 64:1112–1116
69. PEREZ EA, SUMAN VJ, DAVIDSON NE, MARTINO S, KAUFMAN PA, LINGLE WL ET AL. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 2006, 24:3032–3038
 70. STARBORG M, GELL K, BRUNDELL E, HÖÖG C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 1996, 109:143–153
 71. LUPORSI E, ANDRÉ F, SPYRATOS F, MARTIN PM, JACQUEMIER J, PENNAULT-LLORCA F ET AL. Ki-67: Level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: Analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 2012, 132:895–915
 72. YERUSHALMI R, WOODS R, RAVDIN PM, HAYES MM, GELMON KA. Ki67 in breast cancer: Prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 2010, 11:174–183
 73. PENNAULT-LLORCA F, ANDRÉ F, SAGAN C, LACROIX-TRIKI M, DENOUX Y, VERRIELE V ET AL. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27:2809–2815
 74. DUMONTET C, KRAJEWSKA M, TREILLEUX I, MACKEY JR, MARTIN M, RUPIN M ET AL. BCIRG 001 molecular analysis: Prognostic factors in node-positive breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2010, 16:3988–3997
 75. POLLEY MYC, LEUNG SCY, McSHANE LM, GAO D, HUGH JC, MASTROPASQUA MG ET AL. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105:1897–1906
 76. DOWSETT M, CUZICK J, WALE C, FORBES J, MALLON EA, SALTER J ET AL. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: A TransATAC study. *J Clin Oncol* 2010, 28:1829–1834
 77. GOLDBIRSCHE A, WINER EP, COATES AS, GELBER RD, PICCART-GEBHART M, THÜRLIMANN B ET AL. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol* 2013, 24:2206–2223
 78. GOLDBIRSCHE A, WOOD WC, COATES AS, GELBER RD, THÜRLIMANN B, SENN HJ ET AL. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 2011, 22:1736–1747
 79. VOUSDEN KH, LU X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:594–604
 80. VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000, 408:307–310
 81. SCHWARTZENBERG-BAR-YOSEPH F, ARMONI M, KARNIELI E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters *GLUT1* and *GLUT4* gene expression. *Cancer Res* 2004, 64:2627–2633
 82. WANG X, SIMPSON ER, BROWN KA. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* 2015, 75:5001–5007
 83. FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM ET AL. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124:966–978
 84. ELLIS MJ, DING L, SHEN D, LUO J, SUMAN VJ, WALLIS JW ET AL. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature* 2012, 486:353–360
 85. ANDERSON WF, ROSENBERG PS, PRAT A, PEROU CM, SHERMAN ME. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? *J Natl Cancer Inst* 2014, 106:dju165
 86. BLOWS FM, DRIVER KE, SCHMIDT MK, BROEKS A, VAN LEEUWEN FE, WESSELING J ET AL. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010, 7:e1000279
 87. PEROU CM, BØRRESEN-DALE AL. Systems' biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3:a003293
 88. ADRADA BE, MIRANDA RN, RAUCH GM, ARRIBAS E, KANAGAL-SHAMANNA R, CLEMENS MW ET AL. Breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma: Sensitivity, specificity, and findings of imaging studies in 44 patients. *Breast Cancer Res Treat* 2014, 147:1–14
 89. PARISE CA, CAGGIANO V. Breast cancer survival defined by the ER/ PR/HER2 subtypes and a surrogate classification according to tumor grade and immunohistochemical biomarkers. *J Cancer Epidemiol* 2014, 2014:469251
 90. SOTIRIOU C, WIRAPATI P, LOI S, HARRIS A, FOX S, SMEDS J ET AL. Gene expression profiling in breast cancer: Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98:262–272
 91. NIELSEN TO, PARKER JS, LEUNG S, VODUC D, EBBERT M, VICKERY T ET AL. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010, 16:5222–5232
 92. KITTANEH M, MONTERO AJ, GLÜCK S. Molecular profiling for breast cancer: A comprehensive review. *Biomark Cancer* 2013, 5:61–70
- Corresponding author:*
- P. Galanis, 123 Papadiamantopoulou street, 115 27 Athens, Greece
e-mail: pegalan@nurs.uoa.gr