



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα:

«Γενετικές αλλαγές του γονιδίου *ESR1* στον καρκίνο του μαστού»

Σαραφοπούλου Κωνσταντίνα

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιατρική

Λάρισα

Μάρτιος, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



FACULTY OF MEDICINE

POSTGRADUATE STUDIES

«CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE»

MASTER THESIS

«Genetic alterations of *ESR1* gene in breast cancer»

Sarafopoulou Konstantina

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine, School of Health Sciences,
University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Molecular Medicine

Larissa

March, 2022

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- ❖ κ. Μαρία Σαμαρά, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα)
- ❖ κ. Γεώργιος Κουκούλης, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- ❖ κ. Ματθαίος Σπελέτας, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας κύριο Ματθαίο Σπελέτα που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής».

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κύριο Γεώργιο Κουκούλη, που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, όπως και για την ερευνητική του ανατροφοδότηση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου, Επίκουρη Καθηγήτρια, κυρία Μαρία Σαμαρά, για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, τις υποψήφιες διδάκτορες του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, κυρίες Μαρία Παπαθανασίου και Μαρία Αναγνώστου, για την πολύτιμη βοήθειά τους, την καθοδήγηση που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα και την άψογη συνεργασία μας που συνέβαλλε καθοριστικά στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συμβολή και τη στήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1 Ο μαστός	9
1.1.1 Η ανατομία του μαστού.....	9
1.1.2 Η ιστολογία του μαστού.....	11
1.1.3 Η φυσιολογία του μαστού.....	16
1.2 Ο καρκίνος του μαστού	18
1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία.....	18
1.2.2 Αιτιοπαθογένεια.....	20
1.2.3 Πρόληψη.....	22
1.2.4 Ιστολογικοί υπότυποι.....	23
1.2.5 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού.....	30
1.2.6. Κλινική Εικόνα-Συμπτώματα.....	31
1.2.7 Σταδιοποίηση- Προγνωστικοί παράγοντες.....	32
1.2.8 Διάγνωση.....	37
1.2.9 Θεραπεία.....	38
1.3 Ο οιστρογονικός υποδοχέας ESR1	44
1.3.1 Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα οιστρογόνων.....	46
2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
2.1 Σκοπός.....	48
2.2 Υλικό της μελέτης.....	48
2.3 Υλικά.....	48
2.4 Μέθοδοι.....	50
2.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA.....	50
2.4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA.....	53
2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	56
2.4.4 Καθαρισμός των PCR προϊόντων.....	60
2.4.5 Αλληλούχιση DNA (Sanger Sequencing).....	62

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	65
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο στο δυτικό κόσμο και την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στα θήλεα άτομα. Τα τελευταία χρόνια, η θνησιμότητα, στο δυτικό κόσμο, έχει μειωθεί σημαντικά λόγω της έγκαιρης διάγνωσης και των στοχευμένων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Η ταξινόμηση περιλαμβάνει αρκετούς υποτύπους που διαφέρουν ως προς τη μορφολογία, τον βαθμό επιθετικότητας και το γενετικό τους προφίλ. Οι ασθενείς με ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού, θετικό για υποδοχείς οιστρογόνων (ER) ή προγεστερόνης (PR) λαμβάνουν συνήθως ενδοκρινική θεραπεία η οποία αναστέλλει την επίδραση των οιστρογόνων στα νεοπλασματικά κύτταρα. Ποσοστό της τάξης 70% των καρκίνων του μαστού είναι θετικοί στον υποδοχέα οιστρογόνων, καθιστώντας τον βασικό θεραπευτικό στόχο. Πλήθος μελετών αναφέρει μεταλλάξεις εντός της LBD περιοχής του *ESR1* γονιδίου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 30% των ER-θετικών μεταστατικών καρκίνων του μαστού (MBC). Οι συχνότερες και καλώς χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του *ESR1* γονιδίου εντοπίζονται κυρίως στο όγδοο εξόνιο, στις αμινοξικές θέσεις 536 έως 538 και στο πέμπτο εξόνιο του γονιδίου, στην αμινοξική θέση 380. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 44 θήλεα άτομα με καρκίνο μαστού και αναλύσαμε τα εξόνια 5 και 8 για την ανίχνευση των προαναφερόμενων συχνών μεταλλάξεων. Για το σκοπό αυτό απομονώσαμε γενωμικό DNA και ενισχύσαμε επιλεκτικά τμήματα των προαναφερόμενων εξονίων. Ακολούθησε ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας τους με τη μέθοδο Sanger. Όλοι οι ασθενείς έφεραν τη φυσιολογική αλληλουχία για το εξόνιο 8. Στο εξόνιο 5, ανιχνεύθηκαν 4 παραλλαγές σε 5 ασθενείς συνολικά, εκ των οποίων δύο ασθενείς έφεραν την ίδια παραλλαγή, και χαρτογραφούνται στις αμινοξικές θέσεις 371, 372, 380 και 383. Η παραλλαγή στη θέση 380 δεν αποτελεί γνωστή μετάλλαξη στη βιβλιογραφία, όμως θεωρείται σημαντική, καθώς οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό. Δεν αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις για την παρουσία μεταλλάξεων και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Χρειάζεται μελέτη σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τις πιθανές επιπτώσεις των μεταλλάξεων του *ESR1* γονιδίου στην έκφραση του ER υποδοχέα, όσο και στην ανταπόκριση στη θεραπεία.

Λέξεις-κλειδιά: καρκίνος μαστού, υποδοχέας οιστρογόνων, *ESR1* γονίδιο, αλληλούχιση κατά Sanger

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in the Western world in women and the leading cause of death from cancer in women. However, mortality rates in developed countries are decreasing due to early prognosis and advanced treatments. Breast cancer consists of a spectrum of cancer types and subtypes which differ morphologically, aggressiveness and genetic makeup. Patients with hormone-dependent breast cancer, estrogen (ER) or progesterone positive, usually receive endocrine therapy, inhibiting estrogen effects on cancer cells. About 70% of breast cancers are ER, making ER a primary therapeutic target. Several studies have identified recurrent mutations within the LBD region of the ESR1 gene in more than 30% of ER-positive metastatic breast cancers (MBCs). The most common and well-characterized ESR1 mutations are mainly found in exon 8, amino acids 536-538 and in exon 5, amino acid 380. In this thesis, we studied 44 FFPE samples from female breast cancer patients. We examined the presence of ESR1 gene variants in exons 5 and 8 through PCR amplification and Sanger sequencing. No variants of ESR1 were identified in exon 8. In exon 5, 4 different variants were identified among 5 patients. 2 of 5 patients harbored the same variant. The variants identified are mapped on amino acids 371, 372, 380 and 383 of the ESR1 gene. The variant identified on amino acid 380 has not been previously reported in literature, but it can be considered of importance, as it leads to early protein translation cessation. No statistically significant correlations were found among variant frequency and patient clinicopathological parameters. Studies of larger cohorts are required, in order to reach a safe consensus on the possible effects of ESR1 mutations on ER expression, as well as patient response to therapy.

Key words: breast cancer, estrogen receptor, ESR1 gene, Sanger sequencing

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ο μαστός

1.1.1 Η ανατομία του μαστού

Ο μαστός είναι ένας εξειδικευμένος εξωκρινής αδένας που εντοπίζεται στη πρόσθια επιφάνεια του θώρακος του ανθρώπου και εκτείνεται από τη δεύτερη έως την έκτη πλευρά. Παρουσιάζει συνήθως μία προβολή προς τη μασχάλη, την ουρά του μαζικού αδένος, γνωστή και ως ουρά του Spence. Ανάμεσα στους μαστούς σχηματίζεται ο μεσομάστιος κόλπος.

Η πρόσθια επιφάνεια του μαστού καλύπτεται από λεπτό δέρμα, λεπτότερο στα πλευρικά και ανώτερα τεταρτημόρια του μαστού ($1,38 \pm 0,24$ mm) και παχύτερο στα έσω και κάτω τεταρτημόρια του μαστού ($1,97 \pm 0,26$ mm). Στο μέσο περίπου του μαστού υπάρχουν η θηλαία άλω και η θηλή. Στην κεντρική περιοχή του μαστού, στο τέταρτο συνήθως μεσοπλευρίο διάστημα, προβάλλει προς τα εμπρός και έξω η θηλή. Η θηλή του μαστού αποτελεί ένα κυλινδροειδές ή κωνοειδές έπαρμα του δέρματος και το χρώμα της είναι καστανέρυθρο, δηλαδή πιο σκουρόχρωμο από το υπόλοιπο δέρμα εξαιτίας της αυξημένης παρουσίας μελανίνης. Στην κορυφή της θηλής καταλήγουν 15 έως 20 στόμια γαλακτοφόροι πόροι.

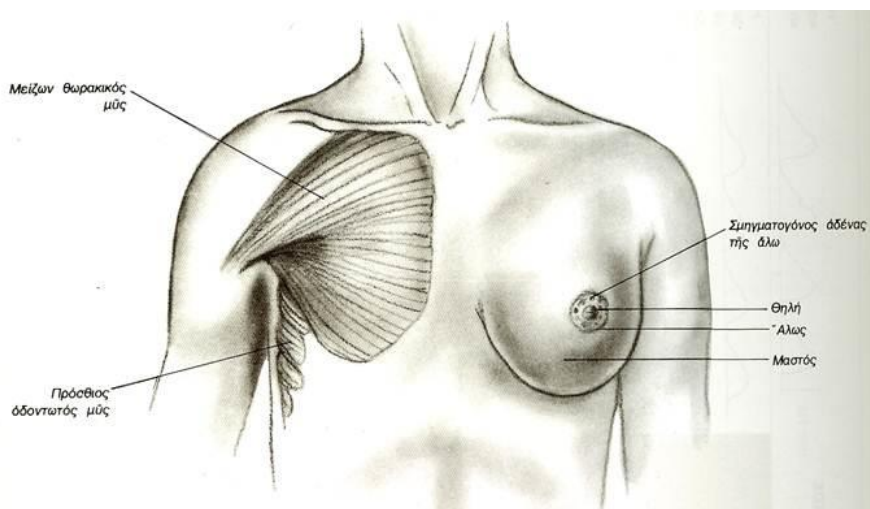
Η θηλαία άλω είναι η υποστρόγγυλη και ελαφρά επηρμένη περιοχή γύρω από τη θηλή. Το μέγεθος της διαμέτρου της θηλαίας άλω κυμαίνεται κατά κανόνα από 15 έως 60 χιλιοστά και το χρώμα της είναι επίσης καστανέρυθρο. Η εξωτερική επιφάνειά της παρουσιάζει 10 έως 15 μικρά έπαρματα που ονομάζονται αλωαία οζίδια. Τα οζίδια αυτά φέρουν τους αλωαίους οσμηγόνους και σμηγματογόνους αδένες του Montgomery.

Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού επικάθεται στην περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός. Η στήριξη του μαστού στο θωρακικό τοίχωμα παρέχεται ανατομικά από τις περιτονίες των μυών του μείζονος θωρακικού, ορθού κοιλιακού, πλάγιου κοιλιακού και μείζονος ραβδωτού.

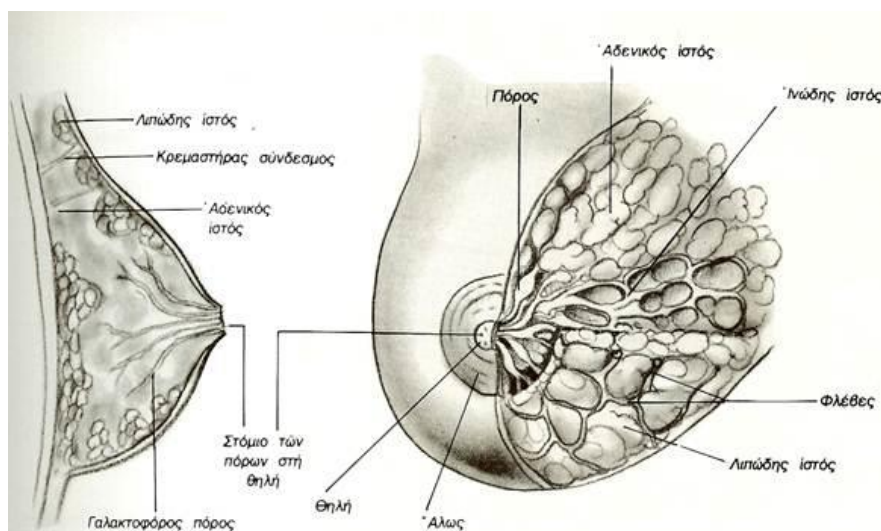
Εσωτερικά του μαστού υπάρχει αδενικός, λιπώδης και συνδετικός ιστός. Στον λιπώδη ιστό υπάρχουν λεμφαδένες, λεμφαγγεία, αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Εσωτερικά του μαστού υπάρχει το περιμαστικό λίπος που αποτελεί συνέχεια του υποδόριου λίπους και απαντάται σε μεγάλη ποσότητα στην πρόσθια περιοχή του

μαστού ανάμεσα στο δέρμα και στον μαζικό αδένα. Το διατρέχουν συνδετικές ίνες που καλούνται σύνδεσμοι του Cooper.

Ο μαζικός αδένας αποτελείται από 15-20 λειτουργικές μονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει έναν γαλακτοφόρο πόρο, ένα λόβιο και αδενοκυψέλες. Οι κυψελίδες επενδύονται από κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα τα οποία παράγουν και εκκρίνουν το γάλα (Εικόνες 1, 2).



Εικόνα 1: Ανατομία του μαστού. Πηγή: elpanosopoulos.gr



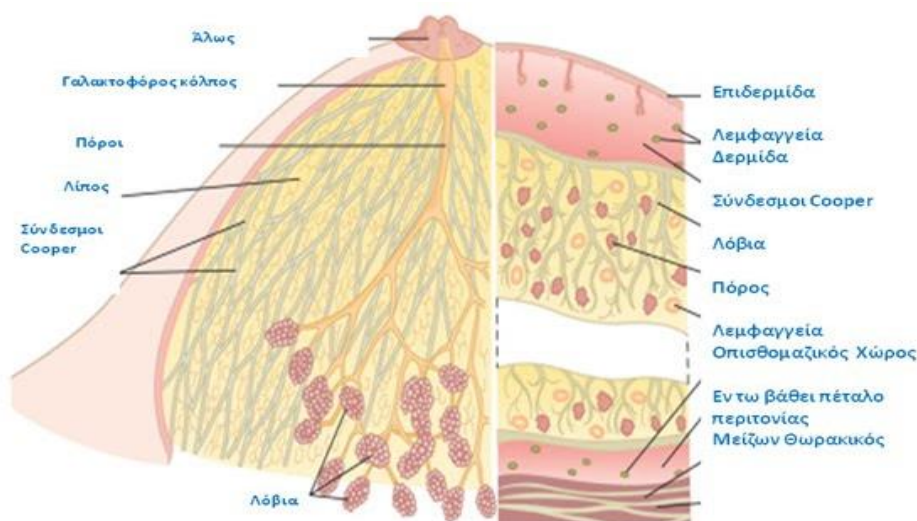
Εικόνα 2: Ανατομία του μαστού. Πηγή: elpanosopoulos.gr

Η αιμάτωση του μαστού πραγματοποιείται από την έσω μαστική, πλάγια και ανώτερη θωρακική αρτηρία, το θωρακικό κλάδο της ακρωμοθωρακικής αρτηρίας, τους διατριβίνοντες κλάδους των μεσοπλεύριων αρτηριών και την υποπλάτιο αρτηρία που αναστομώνονται μεταξύ τους και αγγειώνουν το μαστό. Το φλεβικό δίκτυο του μαστού είναι ιδιαίτερα πλούσιο και χωρίζεται σε επιπολής, που οι φλέβες εκβάλλουν

στην έσω μαστική φλέβα, και σε εν τω βάθει, που οι φλέβες αποχετεύουν προς την έσω μαστική, τη μασχαλιαία και τις μεσοπλευρίες φλέβες.

Ο μαστός διαθέτει ένα πλούσιο λεμφαγγειακό δίκτυο που αποχετεύει τη λέμφο προς τα έξω στους μασχαλιαίους λεμφαδένες και προς τα έσω στους λεμφαδένες της έσω μαστικής αρτηρίας. Οι λεμφαδένες του μαστού διακρίνονται στους: μασχαλιαίους, στους υπερκλείδιους και στους έσω μαστικής.

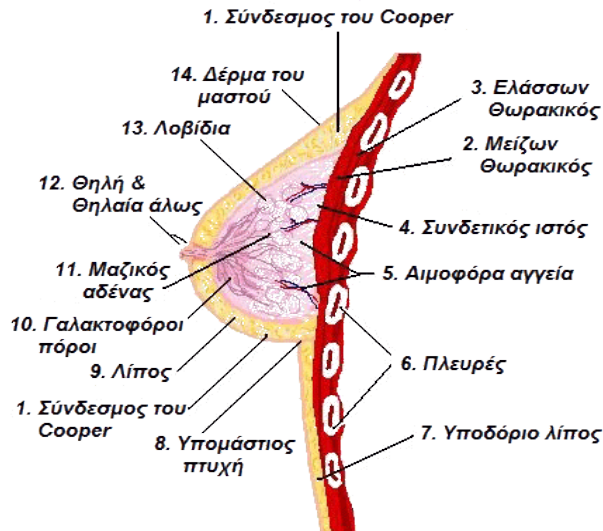
Τέλος, η νεύρωση του μαστού γίνεται από το πλευροβραχιόνιο νεύρο, το θωρακοραχιαίο, το μακρύ θωρακικό ή νεύρο του Bell και από το αυτόνομο νευρικό σύστημα [1-5].



Εικόνα 3: Ανατομία μαστού. Πηγή: 24helathnews.com

1.1.2 Η ιστολογία του μαστού

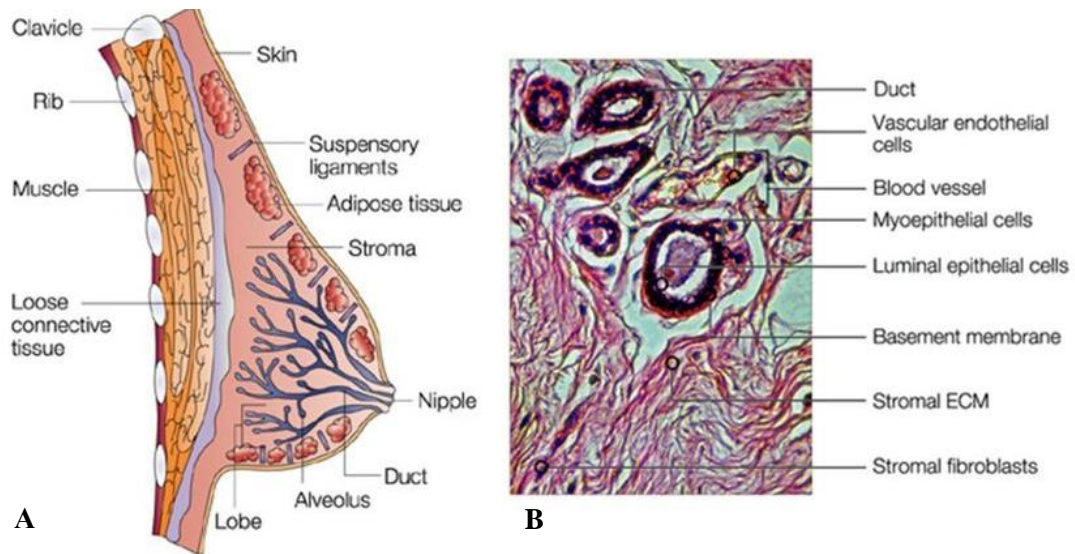
Ο μαζικός αδένας αποτελείται από 15 με 20 λοβούς διακλαδιζόμενων σωληνοκυψελοειδών αδένων, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους από ινώδεις ταινίες συνδετικού ιστού που ονομάζονται σύνδεσμοι του Cooper. Οι λοβοί υποδιαιρούνται σε πολλά λόβια μεταξύ των οποίων υπάρχει πυκνός συνδετικός ιστός και λιπώδης ιστός. Αντιθέτως, ο ενδολοβιακός συνδετικός ιστός περιέχει ελάχιστο λιπώδη ιστό (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ανατομία μαστού. Πηγή: polynoe.lib.iniwa.gr

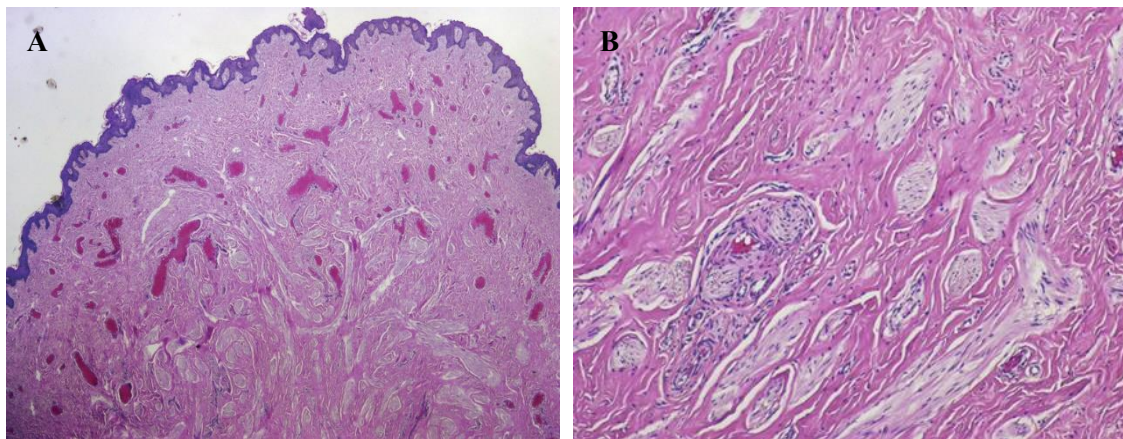
Κάθε σωληνοκυψελοειδής αδένας καταλήγει σε έναν γαλακτοφόρο πόρο στον οποίο υπάρχει ένα διατεταμένο τμήμα, ο γαλακτοφόρος κόλπος, πριν την εκβολή του στη θηλή. Οι γαλακτοφόροι πόροι κοντά στο στόμιο επενδύονται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Το επιθήλιο των γαλακτοφόρων πόρων παρουσιάζει σταδιακή μετάπτωση από πολύστιβο πλακώδες σε δίστιβο κυβικό επιθήλιο στο γαλακτοφόρο κόλπο και μονόστιβο κυβικό επιθήλιο στο υπόλοιπο σύστημα των πόρων.

Η επιδερμίδα της θηλής και της θηλαίας άλω εμφανίζει ρυτίδωση και έχει σκουρότερο χρώμα. Καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες κερατινοποιημένο επιθήλιο. Εν τω βάθει της θηλής και της θηλαίας άλω δέσμες λείων μυϊκών ινών διατάσσονται ακτινοειδώς και κυκλοτερώς εντός του πυκνού συνδετικού ιστού, ενώ έχουν επιμήκη διάταξη κατά μήκος των γαλακτοφόρων πόρων [6,7].

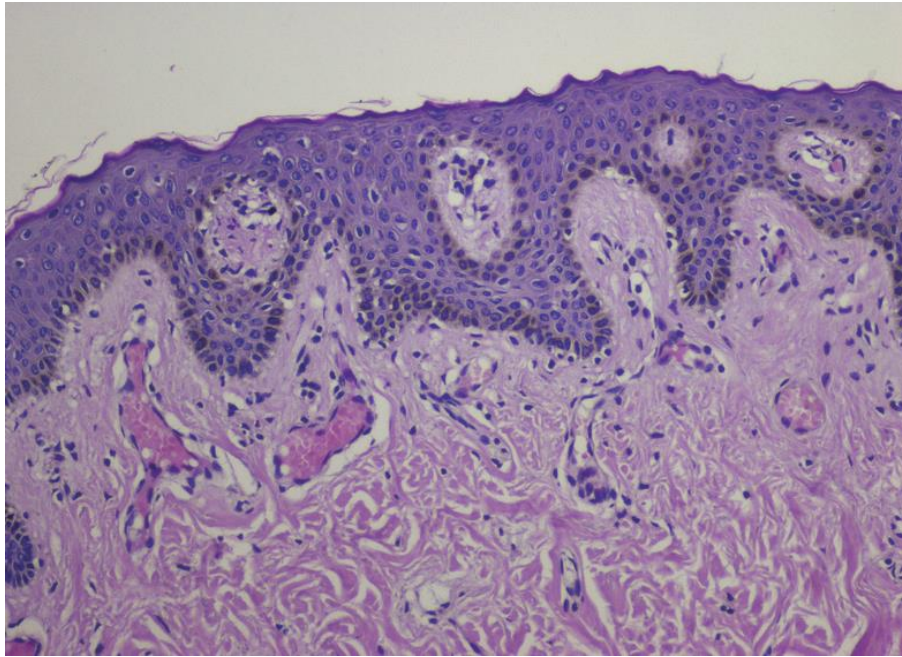


Εικόνα 5: (Α) Σχηματική και (Β) ιστολογική απεικόνιση του φυσιολογικού γυναικείου μαστού.

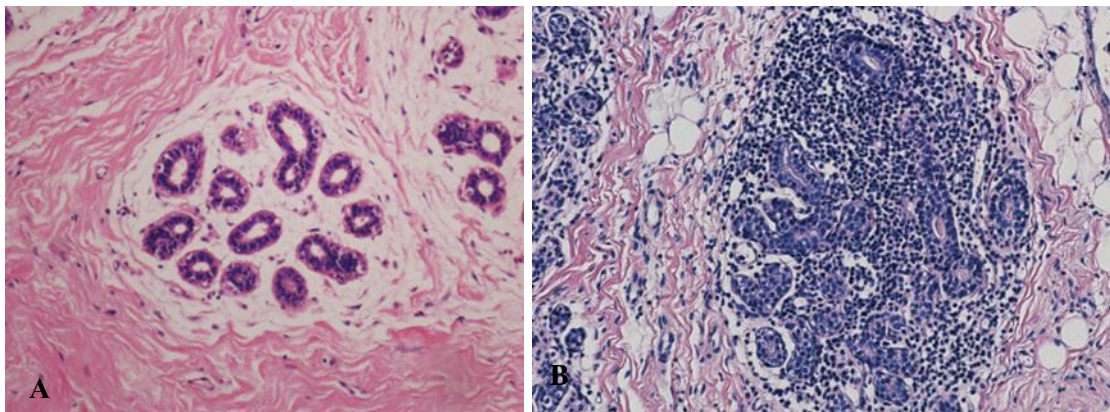
Πηγή: Douglas A. Kniss, 2011.



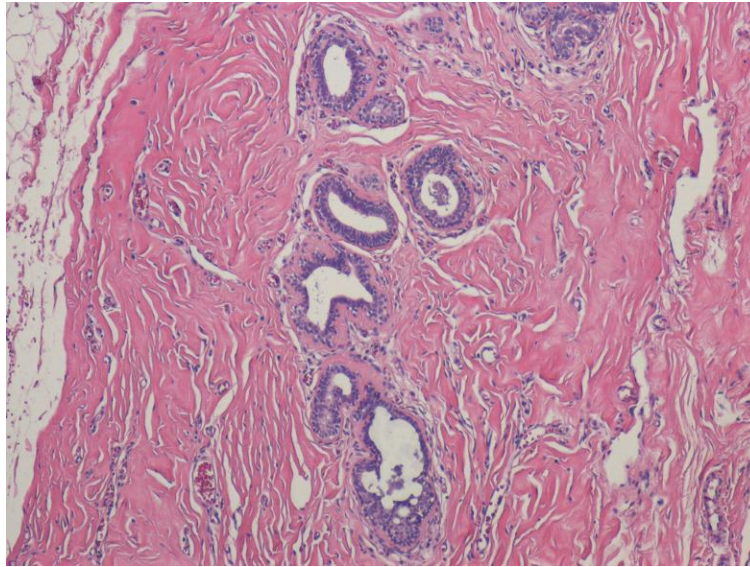
Εικόνα 6: (Α) Η θηλή μίας ενήλικης γυναίκας αποτελείται από δέσμες λείων μυϊκών ινών και ελαστικού ιστού. (Β) Οι λείες μυϊκές ίνες είναι διατεταγμένες ακτινικά και κατά μήκος. Πηγή: Stolnicu S. 2018.



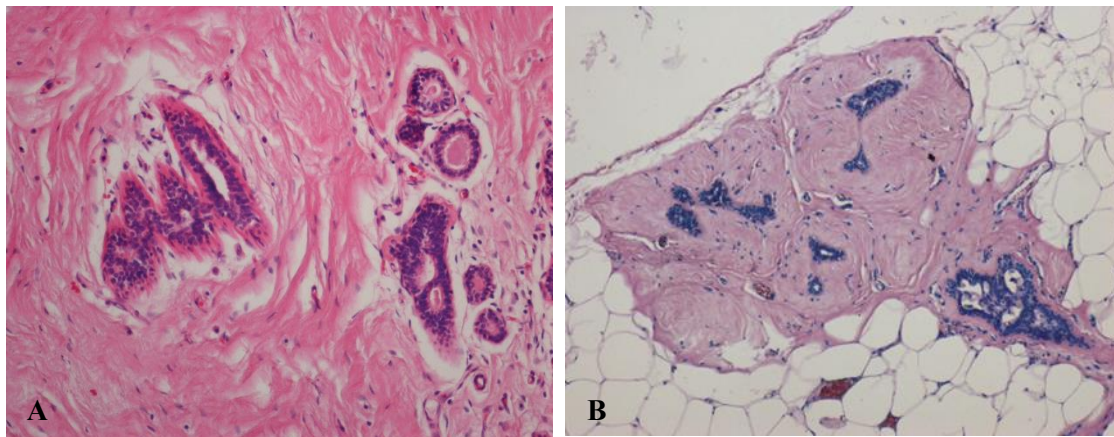
Εικόνα 7: Η επιδερμίδα που καλύπτει τη θηλή και τη θηλαία άλω αποτελείται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Πηγή: Stolnicu S. 2018.



Εικόνα 8: (A) Όλο το πορογενές σύστημα επενδύεται με δύο στρώματα κυττάρων: το εσωτερικό στρώμα των επιθηλιακών κυττάρων (πεπλατυσμένο/κυβοειδές), με ωχρο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και ομοιόμορφους ωοειδείς πυρήνες) και το εξωτερικό στρώμα των αποπλατυσμένων μυοεπιθηλιακών κυττάρων. (B) Το ενδολοβιακό στρώμα παρουσιάζει ποικίλο αριθμό λεμφοκυτταρικών ή/και πλασματικών κυττάρων. Πηγή: Stolnicu S. 2018.



Εικόνα 9: Κατά την εφηβεία, το ενδολοβιακό στρώμα είναι πυκνό και έχει παρόμοια εμφάνιση με το έξω-λοβιακό στρώμα. Πηγή: Stolnicu S. 2018.



Εικόνα 10: (A) Ατροφία του μαστού στην εμμηνόπαυση. (B) Η βασική μεμβράνη παχύνεται. Οι αγωγοί υφίστανται ατροφία σχηματίζοντας οζίδια υαλίνης. Πηγή: Stolnicu S. 2018.

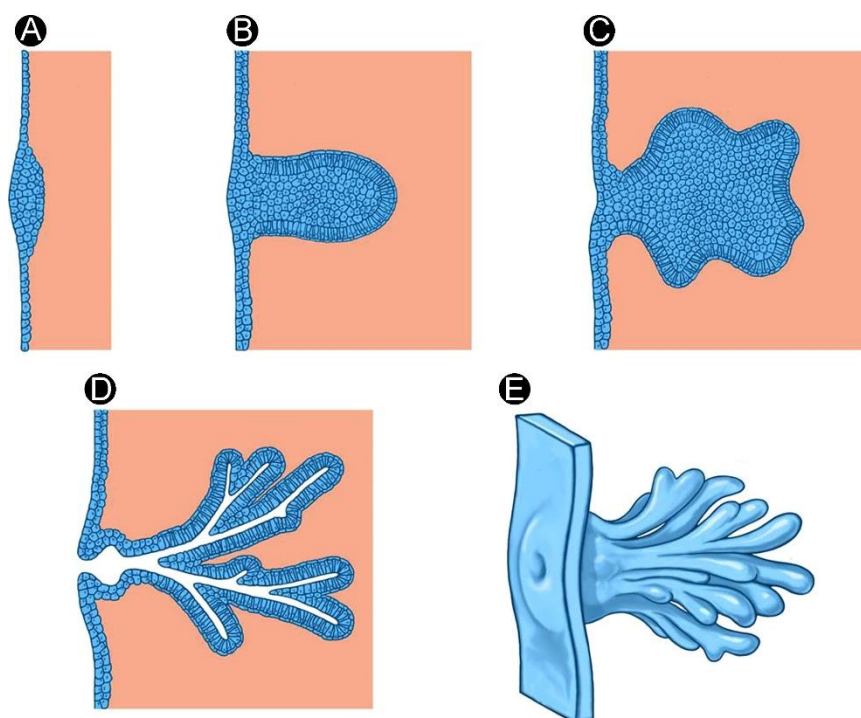
1.1.3 Η φυσιολογία του μαστού

Ο μαστός είναι όργανο που έχει ως λειτουργία τη διατροφή του νεογνού. Η ανάπτυξη του μαστού παρουσιάζει διακριτά στάδια, τα οποία είναι το εμβρυϊκό, το νεογνικό, το εφηβικό στάδιο, η εγκυμοσύνη, η γαλουχία και η εμμηνόπαυση.

Ο μαστός είναι ένα ορμονοεξαρτώμενο όργανο. Η ορμονοεξάρτηση του μαζικού αδένου αφορά στο αδενικό επιθήλιο και τον συνδετικό ιστό, που αποτελεί το ερειστικό υπόστρωμα του μαστού, και ιδιαίτερα το τμήμα εκείνο γύρω από τους γαλακτοφόρους πόρους.

Η λειτουργία του μαστού επηρεάζεται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση, τις ωοθήκες, τον θυρεοειδή αδέν, τα επινεφρίδια, τον πλακούντα και το νευρικό σύστημα.

Συγκεκριμένα, οι μαστοί στο έμβρυο σχηματίζονται την 6η περίπου εβδομάδα της εγκυμοσύνης και η ανάπτυξή τους συνεχίζεται μέχρι τη γέννηση. Προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του δέρματος (εκτόδερμα) υπό γενετική και ορμονική επίδραση. Κατά την 7η-8η εβδομάδα της κύησης, το παρέγχυμα εισβάλλει στο στρώμα, το οποίο εμφανίζεται ως ένα αυξημένο τμήμα που ονομάζεται μαζικός δίσκος. Μεταξύ 12^{ης}-16^{ης} εβδομάδας της κύησης σχηματίζεται η θηλή και η θηλαία άλω και στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης γίνεται η διαφοροποίηση του επιθηλίου των εκφορητικών πόρων.



Εικόνα 11: Η φυσιολογική εμβρυολογική ανάπτυξη του μαστού. Πηγή: Robert A. Jesinger, 2014.

Κατά τη διάρκεια της βρεφικής και νηπιακής περιόδου ο μαστικός αδένας παραμένει σε ηρεμία έως ότου δεχθεί τα κατάλληλα ορμονικά ερεθίσματα κατά την διάρκεια της εφηβείας.

Κατά την εφηβεία, η αύξηση του μεγέθους του μαστού προκαλείται κυρίως από την αυξημένη εναπόθεση λιπώδους ιστού εντός του αδένα. Η προοδευτική επιμήκυνση και διακλάδωση των πόρων δημιουργεί ένα εκτενέστερο δίκτυο. Η ανάπτυξη του μαστού στα κορίτσια σηματοδοτεί την έναρξη της εφηβείας και την εξέλιξη της και υποδηλώνει την οιστρογονική δράση.

Στην αναπαραγωγική περίοδο της γυναίκας και κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του εμμηνορρησιακού κύκλου, οι λοβοί είναι μικροί, με λίγες αδενοκυψέλες και παρατηρείται χαμηλή μιτωτική δραστηριότητα. Κατά την ωχρινική φάση, τα λόβια και οι αδενοκυψέλες αναπτύσσονται και η μιτωτική δραστηριότητα παρουσιάζει τον μέγιστο ρυθμό. Αυτό οφείλεται στις κυκλικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στον μαστό και αφορούν στην αύξηση του μεγέθους των εκφορητικών πόρων στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Η προαναφερόμενη αύξηση σε συνδυασμό με το τοπικό οίδημα και την υπεραιμία οδηγούν προεμμηνορρυσιακά στη διάταση του αδένα.

Κατά την έναρξη της εγκυμοσύνης ο μαστός αυξάνεται σε όγκο και πυκνότητα. Οι ορμόνες οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξη αυτή συμπεριλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη, την αυξητική ορμόνη, την προλακτίνη και τις ορμόνες του πλακούντα. Ο μαστός διευρύνεται, οι επιφανειακές φλέβες διαστέλλονται και η θηλή με τη θηλαία άλω σκουραίνουν. Στο πρώτο τρίμηνο της κύησης οι αδενοκυψέλες των λοβίων αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται μέχρι τον τρίτο μήνα με αποτέλεσμα ο μαστικός αδένας να αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του μαστού. Στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης αρχίζει η εκκριτική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων των αδενοκυψελών που ολοκληρώνεται στο τρίτο τρίμηνο της κύησης. Τα εκκριτικά κύτταρα είναι πλέον σε θέση να συνθέσουν και να εκκρίνουν τις πρωτεΐνες του γάλακτος.

Αμέσως μετά τον τοκετό, τα επίπεδα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται. Η προλακτίνη, μαζί με την αυξητική ορμόνη και την ινσουλίνη, επάγουν την παραγωγή και την έκκριση του γάλακτος. Η ορμόνη ωκυτοκίνη ρυθμίζει την έκκριση του γάλακτος, το οποίο απελευθερώνεται ως απάντηση στα νευρικά αντανεκλαστικά που ενεργοποιούνται κατά το θηλασμό.

Στην εμμηνόπαυση, η απουσία της ωοθηκικής λειτουργίας και η μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων, οδηγούν σε μείωση του αριθμού και του μεγέθους των

αδενοκυψελών, καθώς επίσης σε ατροφία των εκφορητικών πόρων και των λοβίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο μαστός να περιέχει κυρίως λιπώδη ιστό και στρώμα. Με την πάροδο του χρόνου, επέρχεται προοδευτική μείωση του λιπώδους ιστού και του στρώματος, γεγονός που οδηγεί στη συρρίκνωση του στήθους και στην απώλεια του περιγράμματος. Οι σύνδεσμοι του Cooper χαλαρώνουν σταδιακά και οδηγούν τελικά σε πτώση του μαστού [8-10].

1.2 Ο καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος είναι μία ομάδα μη φυσιολογικών κυττάρων που αναπτύσσονται με ανεξέλεγκτο τρόπο, προσβάλλοντας και καταστρέφοντας σταδιακά τους υγιείς ιστούς. Μια ομάδα ταχέως αναπτυσσόμενων κυττάρων σχηματίζει ένα εξόγκωμα, το οποίο καλείται όγκος. Οι όγκοι που αναπτύσσονται μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις. Οι καλοήθεις όγκοι αναπτύσσονται συνήθως αργά και δεν είναι επιβλαβείς, ενώ οι κακοήθεις όγκοι αναπτύσσονται πολύ γρήγορα, διηθούν και δίνουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Το μεταστατικό δυναμικό και το μοριακό προφίλ του όγκου διαφέρουν στους υποτύπους του καρκίνου του μαστού.

1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

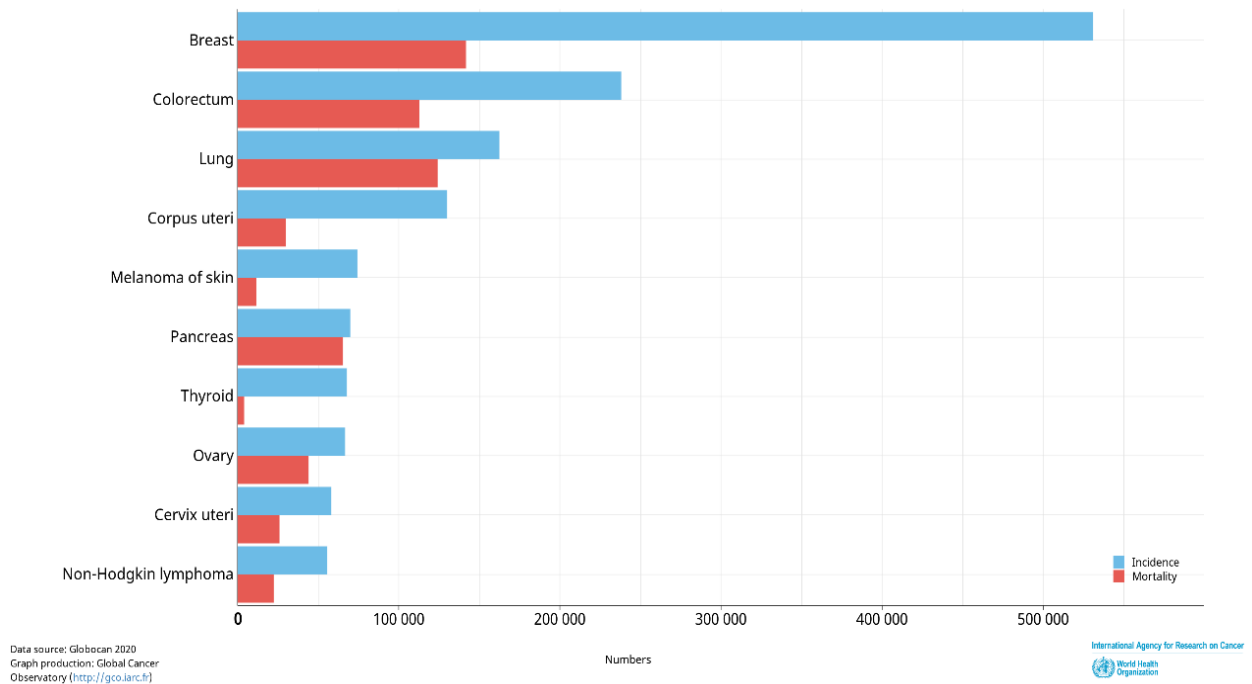
Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στα θήλεα άτομα και αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Ευθύνεται για ποσοστό της τάξης του 18% του συνόλου των καρκίνων στα θήλεα άτομα, ενώ απαντάται σπάνια στα άρρενα άτομα (<1% του συνόλου των καρκίνων του μαστού).

Η νόσος παρουσιάζει γεωγραφική ετερογένεια. Απαντάται συχνότερα στο Δυτικό κόσμο συγκριτικά με την Κίνα ή την Ιαπωνία. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής 1 στις 8 γυναίκες (12.5%) διαγιγνώσκεται με καρκίνο του μαστού, ενώ στην Ασία μόλις 1 στις 35 γυναίκες (2.9%).

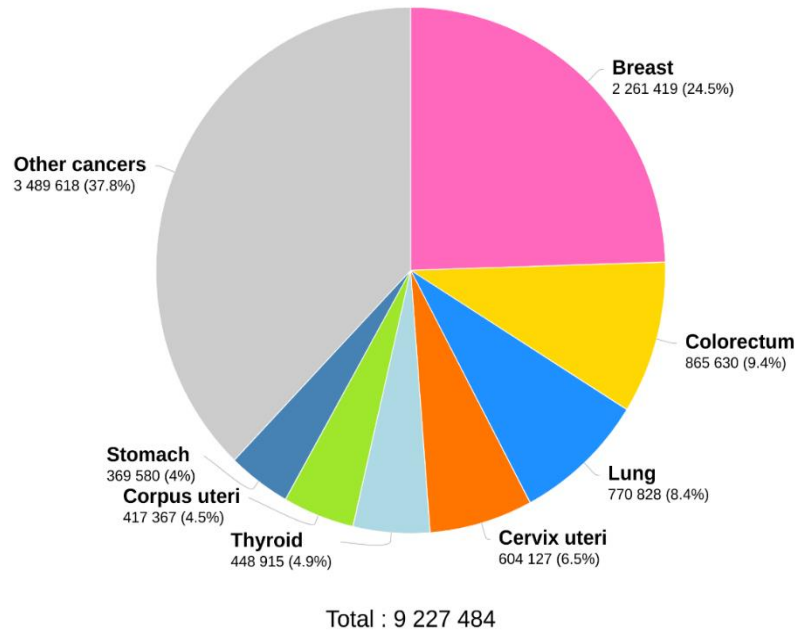
Παγκοσμίως σημειώνονται μεγάλες αποκλίσεις ως προς τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού, με εκτιμώμενη πενταετή επιβίωση περίπου 80% στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ περιορίζεται σημαντικά και δεν ξεπερνά το 40% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η απόκλιση αποδίδεται στους περιορισμούς των πόρων και των υποδομών στις αναπτυσσόμενες χώρες, που καθιστούν δυσκολότερη την έγκαιρη διάγνωση και τη θεραπεία της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια στις δυτικές χώρες παρατηρείται μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού, εξαιτίας της έγκαιρης διάγνωσης και των νέων στοχευμένων θεραπευτικών μεθόδων αλλά και της πιο έγκαιρης διάγνωσης.

Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ) το 2020 διαγνώστηκαν 2,3 εκ. γυναίκες με καρκίνο μαστού και απεβίωσαν 685.000 [11,12,13].



Εικόνα 12: Απεικονίζονται ο αριθμός των περιστατικών για διάφορους τύπους καρκίνου (μπλε μπάρες), μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του μαστού, καθώς και ο αριθμός των θανάτων σε κάθε τύπο καρκίνου (κόκκινες μπάρες) σε θήλεα άτομα ανεξαρτήτου ηλικίας στην Ευρώπη για το έτος 2020. Πηγή: Globocan 2020



Εικόνα 13: Απεικονίζεται το ποσοστό των καρκίνων παγκοσμίως σε θήλεα άτομα όλων των ηλικιών το έτος 2020. Πηγή: Globocan 2020

1.2.2 Αιτιοπαθογένεια

Τα αίτια του καρκίνου του μαστού δεν είναι πλήρως κατανοητά. Ωστόσο, διαφαίνεται ότι ποικίλοι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες συμβάλλουν στον αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Στους εν λόγω παράγοντες συγκαταλέγονται:

- ✓ Το φύλο: οι πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε θήλεα άτομα είναι 100x φορές υψηλότερες συγκριτικά με τα άρρενα άτομα.
- ✓ Η φυλή: τα θήλεα άτομα της λευκής φυλής έχουν περισσότερες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τα θήλεα άτομα της Αφρικής και της Ιαπωνίας.
- ✓ Η ηλικία: όσο αυξάνεται η ηλικία του θήλεος ατόμου τόσο αυξάνεται και η πιθανότητα να εμφανίσει καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, σημειώνεται ότι και σε μικρότερες ηλικίες εμφανίζονται επίσης νεοπλάσματα μαστού σε προχωρημένο στάδιο, με θετικούς λεμφαδένες και μικρότερα ποσοστά επιβίωσης.

- ✓ Η πρώιμη ηλικία εμμηναρχής: όσο περισσότερο διαρκεί η αναπαραγωγική ηλικία μίας γυναίκας, τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού εξαιτίας του μεγαλύτερου διαστήματος δράσης των οιστρογόνων.
- ✓ Η καθυστερημένη ηλικία εμμηνόπαυσης: γυναίκες με εμμηνόπαυση σε ηλικία άνω των 50 ετών παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού συγκριτικά με εκείνες που θα εμφανίσουν εμμηνόπαυση έως τα 45 έτη.
- ✓ Η ηλικία της πρώτης τελειόμηνης κύησης: όσο μεγαλύτερη είναι η ηλικία της πρώτης τελειόμηνης κύησης τόσο αυξάνει και ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού.
- ✓ Το οικογενειακό ιστορικό: τα θήλεα άτομα που έχουν συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού παρουσιάζουν τριπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης του εν λόγω καρκίνου σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Η εκδήλωση της νόσου σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης σε συγγενικά πρόσωπα.
- ✓ Οι γενετικοί παράγοντες: ένα ποσοστό της τάξης 10% των καρκίνων του μαστού φέρουν μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, όπως είναι τα *BRAC1* και *BRAC2* γονίδια. Οι πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού στον γενικό πληθυσμό είναι 12%, ενώ η παρουσία μεταλλάξεων στα *BRCA1, 2* γονίδια αυξάνει τον κίνδυνο σε ποσοστό έως και 60%.
- ✓ Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης: λόγω της λήψης οιστρογόνων.
- ✓ Τα αντισυλληπτικά χάπια: αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού κυρίως στις νέες γυναίκες.
- ✓ Η ατεκνία
- ✓ Η παχυσαρκία
- ✓ Η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία: η καρκινογενετική δράση της ιονίζουσας ακτινοβολίας φαίνεται να είναι ισχυρότερη κατά τη διάρκεια της εφηβείας.
- ✓ Η κατανάλωση οινοπνεύματος
- ✓ Ο θηλασμός: ενδέχεται να προσφέρει προστασία έναντι της εμφάνισης καρκίνου του μαστού.
- ✓ Εγκυμοσύνες και τοκετοί: οι πολλές ολοκληρωμένες εγκυμοσύνες μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, καθώς τα κύτταρα του μαστού

γίνονται λιγότερο ευάλωτα στη διαδικασία της καρκινογένεσης μετά την «τελική ιστολογική διαφοροποίηση» που προκαλείται από μία ή περισσότερες τελειόμηνες κυήσεις. Ειδικά για τον ER+ καρκίνο, η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού μειώνεται κατά 7% μετά από κάθε γέννα.

- ✓ Η φυσική άσκηση: μειώνει τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού [14-35].

Risk factors		Protective	Predisposing	Controversial
Demographic	Female gender		✓	
	Age		✓	
	Blood group			✓
Reproductive	Age of menarche			✓
	Late age of menopause		✓	
	Full-term pregnancy	✓		
	Abortion			✓
	Ovulatory menstrual cycle	✓		
	Pregnancy characteristics	✓	✓	
Hormonal	Hormonal contraceptive methods		✓	
	Ovulation-stimulating drugs			✓
	Postmenopausal hormone therapy		✓	
Hereditary	Genetic factors		✓	
	Positive family history of breast cancer		✓	
Breast related	Lesser lactation duration	✓		
	More breast density			✓
	Benign breast disorders		✓	
Lifestyle	Obesity and overweight		✓	
	Alcohol consumption		✓	
	Smoking		✓	
	Coffee			✓
	Diet		✓	
	More physical activity	✓		
	Vitamin D	✓		
Others	Duration of sleep			✓
	Air pollution		✓	
	Night work		✓	
	Socioeconomic status		✓	
	Diabetes		✓	
	Radiation		✓	

Εικόνα 14: Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Πηγή: Zohre Momenimovahed, Hamid Salehiniya, 2019.

1.2.3 Πρόληψη

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος (ψηλάφηση και μαστογραφία) είναι πολύ σημαντικός για τον καρκίνο του μαστού καθώς μπορεί να μειώσει την πιθανότητα θανάτου τουλάχιστον κατά 25%. Η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής, παραδείγματος χάριν η διατήρηση υγιούς σωματικού βάρους, η αποφυγή αλκοόλ και

καπνίσματος, η σωματική άσκηση και η αποφυγή έκθεσης στην ακτινοβολία, συμβάλλει σημαντικά στην πρόληψη του καρκίνου. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με μελέτες, εξίσου σημαντική είναι η αποφυγή θεραπείας υποκατάστασης μετά την εμμηνόπαυση, αποφυγή χρήσης αντισυλληπτικών χαπιών για μακρύ χρονικό διάστημα και η αποφυγή λήψης πολλαπλών θεραπειών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Σε γυναίκες με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού χορηγείται σε ορισμένες περιπτώσεις προληπτική χημειοπροφύλαξη. Πρόκειται για ουσίες, όπως η ταμοξιφαίνη, η οποίες φαίνεται να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, αποτελεί αμφιλεγόμενη μέθοδο προφύλαξης, καθώς δεν μηδενίζει τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, ενώ συνοδεύεται και από παρενέργειες [36,37].

1.2.4 Ιστολογικοί υπότυποι

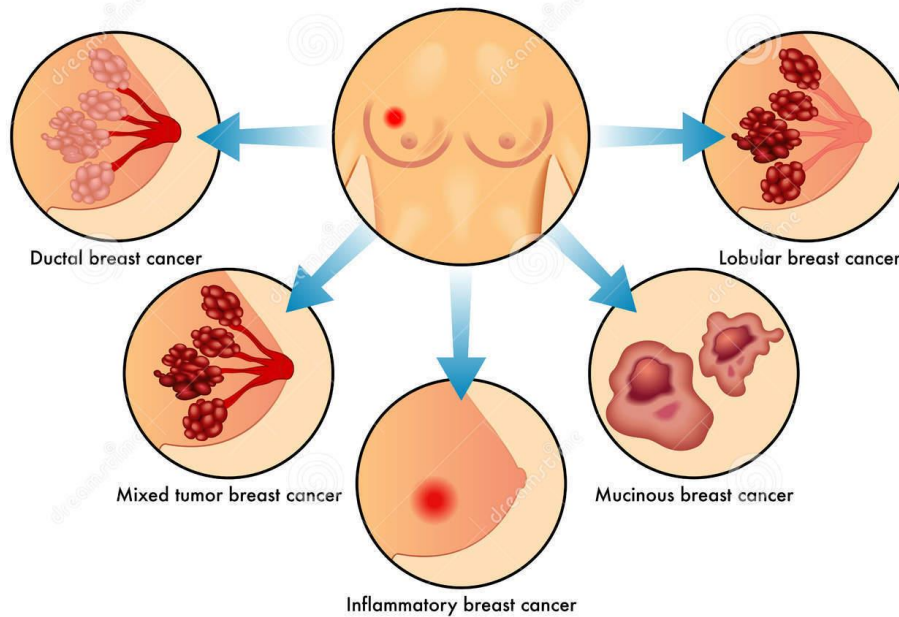
Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από διηθητικά και μη νεοπλάσματα. Οι μη διηθητικοί όγκοι είναι εντοπισμένοι, δεν επεκτείνονται έξω από τους πόρους (πορογενές καρκίνωμα *in situ*). Η λέξη "*in situ*" περιγράφει "στη θέση". Ωστόσο, αν και τα άτυπα κύτταρα δεν επεκτείνονται έξω από τους πόρους ή τους λοβούς, ενδέχεται να εξελιχθούν σε διηθητικό καρκίνο του μαστού [38].

Στην κατηγορία των μη διηθητικών νεοπλασμάτων περιλαμβάνονται το μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα *in situ* (DCIS – Ductal Carcinoma *In Situ*) και το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS – Lobular Carcinoma *In Situ*). Το πρώτο περιορίζεται στους πόρους του μαστού. Εμφανίζει συχνά έντονη υπερπλασία των κυττάρων εντός των πόρων και κεντρική νέκρωση. Η διαφοροδιάγνωσή του από τα καλοήγηθ θηλώματα των πόρων είναι αρκετές φορές δύσκολη [39].

Το μη διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα *in situ* αναπτύσσεται στους λοβούς του μαστού. Εντοπίζεται συνήθως αμφοτερόπλευρα και πολυεστιακά με συνηθέστερη ηλικία εμφάνισης τα 44-47 χρόνια [40,41,42].

Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού επεκτείνονται εκτός της αδενικής δομής, στο συνδετικό υπόστρωμα του μαστού, και διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στο πορογενές και στο λοβιακό, οι οποίες προέρχονται από την τελική πορολοβιακή μονάδα του μαζικού αδένου. Ο διηθητικός καρκίνος χαρακτηρίζεται και μεταστατικός και δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις σε όργανα όπως ο εγκέφαλος, τα οστά, οι πνεύμονες και το ήπαρ [43,44,45].

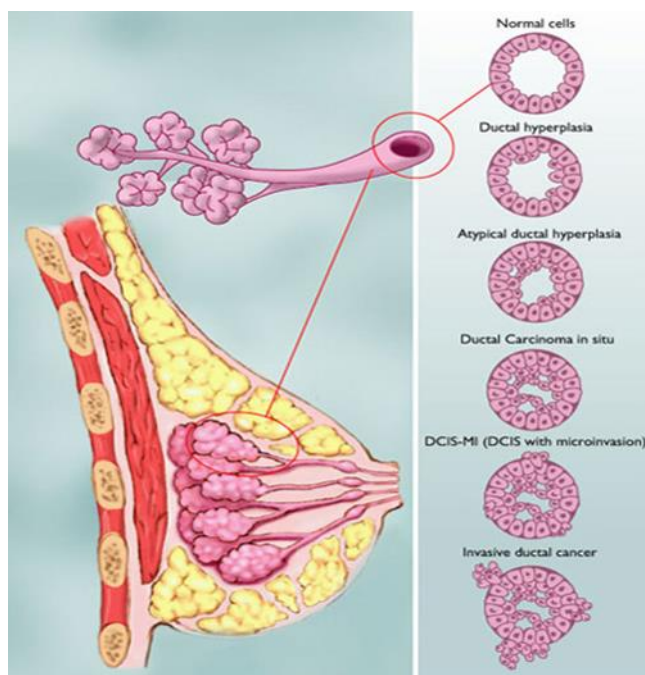
Types of Breast Cancer



Εικόνα 15: Συχνοί τύποι καρκίνου του μαστού. Πηγή: Cancer Association of Nanimbia

Το διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού μη-ειδικού τύπου (IDC – Invasive Ductal Cancer NOS) προέρχεται από τους γαλακτοφόρους πόρους του μαστού και επεκτείνεται στο τοίχωμα του πόρου, εισβάλλοντας στους λιπώδεις ιστούς του στήθους και πιθανώς σε άλλα μέρη του σώματος [46].

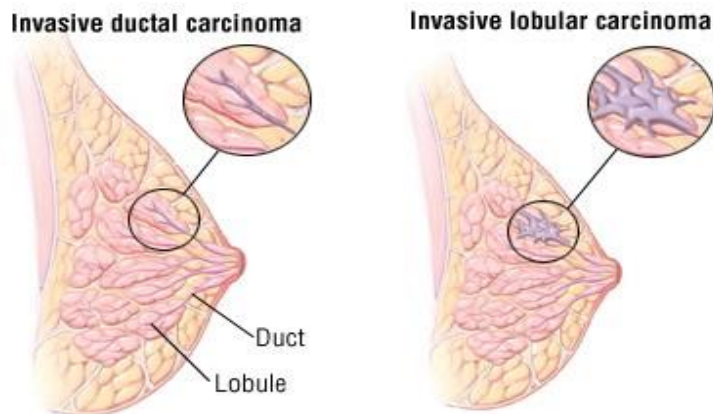
Αντιπροσωπεύει περίπου το 40-75% των καρκινωμάτων και εμφανίζεται μετά την τέταρτη δεκαετία της ζωής. Μικροσκοπικά διακρίνεται για τα ποικίλα πρότυπα ανάπτυξης, παρουσιάζει ποικίλο μέγεθος κυττάρων, λιγότερο ή περισσότερο εμφανή πυρήνια, και μικρή ή μεγάλη ατυπία. Ποσοστό της τάξης 70-80% των καρκινωμάτων αυτών έχει θετικούς ορμονικούς υποδοχείς ενώ εκφράζει, σε ποσοστό της τάξης 20-30% την πρωτεΐνη HER2. Τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα παρουσιάζουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες και κυρίως πλοειδία.



Εικόνα 16: Διάγνωση του DCIS. Πηγή: Breastcancer.org, 2018.

Το διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα μαστού (ILC – Invasive Lobular Carcinoma) αποτελεί το 5-15% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Προέρχεται από τους λοβούς του μαστού, αλλά συχνά επεκτείνεται σε άλλες περιοχές του σώματος [47]. Η μακροσκοπική εικόνα είναι ακανόνιστη, με ασαφή όρια. Ένα ποσοστό της τάξης 70-95% εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων και σε πολύ χαμηλότερο βαθμό την πρωτεΐνη HER2.

Τα λοβιακά καρκινώματα κατά κανόνα είναι διπλοειδή και φέρουν λιγότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες συγκριτικά με τα πορογενή καρκινώματα. Στην πλειοψηφία τους δεν εκφράζουν την ανοσοχρώση E-καντχερίνη, γεγονός που ενδεχομένως αποτελεί ένα πρώιμο στάδιο στην καρκινογένεσή τους, καθώς η απώλεια έκφρασης της εν λόγω πρωτεΐνης σχετίζεται με την απώλεια συνοχής των επιθηλιακών κυττάρων και με την μεταναστευτική τους ικανότητα.



Εικόνα 17: Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα του μαστού (Invasive Ductal Carcinoma, IDC).
 Πηγή: Indian Flag, 2018

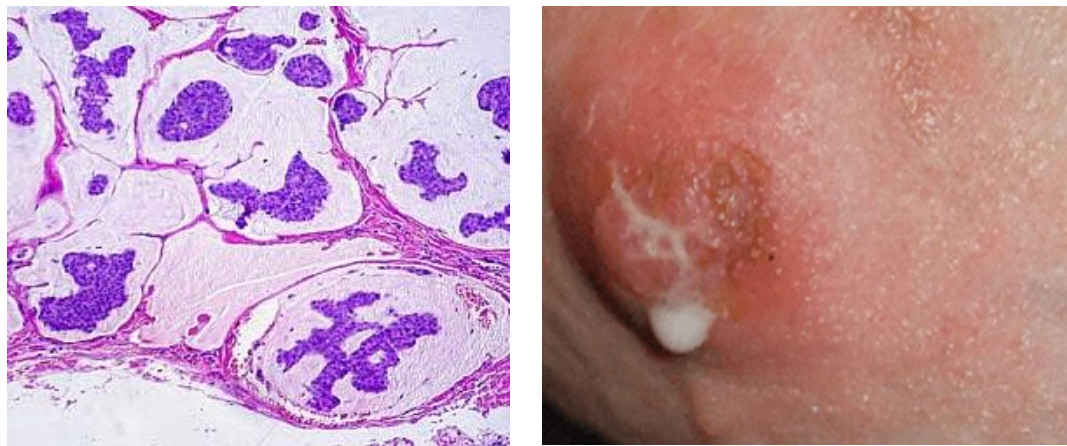
Οι άλλοι ιστολογικοί υπότυποι περιλαμβάνουν:

➤ Το μυελοειδές καρκίνωμα μαστού (medullary breast carcinoma)

Συνήθως εμφανίζεται σε νεότερες γυναίκες με μορφή στρογγυλού και μαλακού ή ελαστικού όγκου που αυξάνεται με επέκταση και δημιουργεί αιμορραγικές και νεκρωτικές εστίες [48]. Ο όγκος χαρακτηρίζεται από μάζες κυττάρων με μεγάλη πολυμορφία και ατυπία, υψηλό αριθμό μιτώσεων και πυκνή λεμφοπλασματοκυτταρική αντίδραση του υποστρώματος. Η συγκεκριμένη κατηγορία δεν εκφράζει οιστρογονικούς υποδοχείς και έχει χαμηλό ποσοστό υπερέκφρασης της πρωτεΐνης HER2. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται θήλεα άτομα φορείς μεταλλάξεων του *BRCA1* γονιδίου. Βλεννώδες ή κολλοειδές καρκίνωμα μαστού (mucinous – colloid carcinoma).

➤ Βλεννώδες ή κολλοειδές καρκίνωμα

Πρόκειται για ένα σπάνιο αδenoκαρκίνωμα του μαστού (ποσοστό 2%) και χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μεμονωμένων ή σε αθροίσεις νεοπλασματικών κυττάρων μέσα σε λίμνες βλέννης. Εμφανίζεται συνήθως σε μεγαλύτερες γυναίκες και έχει σχετικά καλή πρόγνωση [49]. Σε αντίθεση με βλεννώδη καρκινώματα άλλων οργάνων, στο συγκεκριμένο δεν παρατηρείται συνύπαρξη ενδοκυττάριας και εξωκυττάριας παραγωγής βλέννης.



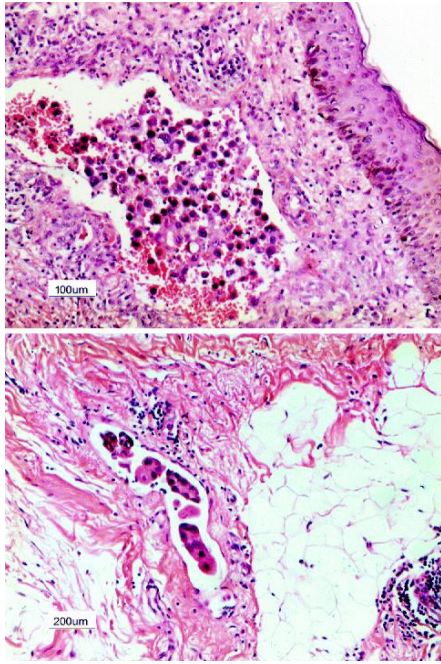
Εικόνες 18: Βλεννώδες καρκίνωμα του μαστού. Πηγή: Breast Cancer.

➤ Σωληνώδες καρκίνωμα μαστού (tubular carcinoma)

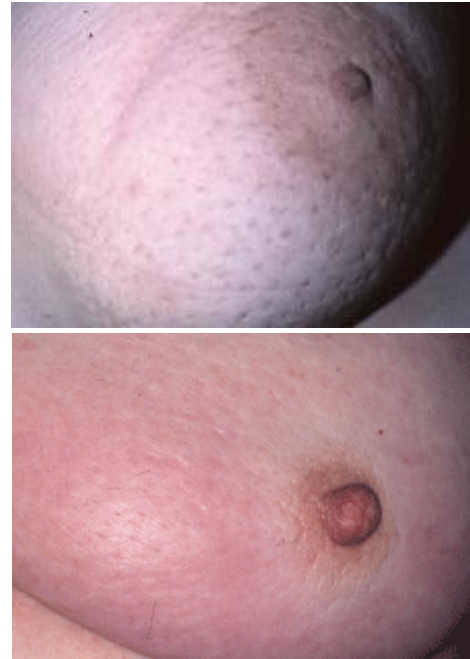
Το σωληνώδες καρκίνωμα είναι ένα ιδιαίτερο και πολύ καλά διαφοροποιημένο είδος διηθητικού καρκίνου του μαστού. Είναι συνήθως μικρού μεγέθους (0,2-2 εκ.) και αποτελείται από στρογγυλές, ωοειδείς ή γωνιώδεις βλάστες [50]. Τα νεοπλασματικά κύτταρα διατάσσονται σε στίχο και παρουσιάζουν μικρή ατυπία και σπάνιες μιτώσεις. Η πρόγνωση είναι καλή. Εκφράζει ανοσοχρώση για ορμονικούς υποδοχείς, ενώ δεν εκφράζει HER2 πρωτεΐνη.

➤ Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού

Στον φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού τα λεμφαγγεία παρουσιάζουν φλεγμονή, η οποία είναι ορατή εξωτερικά ως ερυθρότητα και οίδημα. Η φλεγμονή οφείλεται σε καρκινικά κύτταρα που εμποδίζουν τα λεμφαγγεία και κατ' επέκταση επηρεάζεται και ο ίδιος ο μαστός. Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού είναι σπάνιος αλλά είναι εξαιρετικά αναπτυσσόμενος και κακής πρόγνωσης. Υπερεκφράζει την πρωτεΐνη HER2, ενώ δεν εκφράζει τους υποδοχείς οιστρογόνων [51, 52].



Εικόνα 19: Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού, χρώση H&E. Πηγή: Pathology of Inflammatory Breast Cancer, 2013.

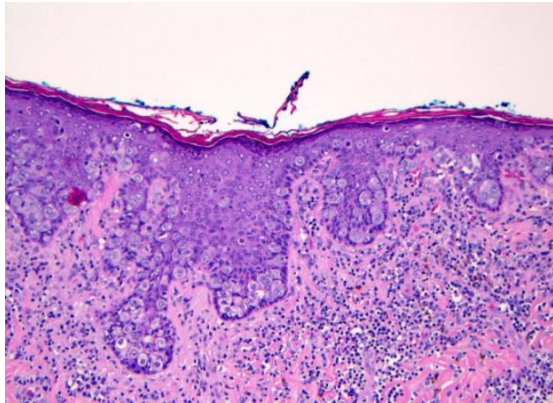


Εικόνα 20 A, B: Καρκίνος του μαστού σε εικόνες. Πηγή: Magonlineibrary.com

➤ Η νόσος Paget

Πρόκειται για έναν ασυνήθιστο τύπο καρκίνου του μαστού που συνήθως έχει ορατές αλλαγές στη θηλή και την θηλαία άλω. Αποτελεί διηθητικό πορογενές καρκίνωμα που αναπτύσσεται στους γαλακτοφόρους πόρους που βρίσκονται πολύ κοντά στην θηλή, γεγονός που αιτιολογεί την έντονη αλλαγή στην όψη της. Μορφολογικά χαρακτηρίζεται από ερυθρά εξανθήματα στην θηλή και την θηλαία άλω τα οποία προκαλούν κνησμό και καυσαλγία. Αν και μερικές φορές μοιάζει με άλλες δερματικές παθήσεις, όπως το έκζεμα και η ψωρίαση, μπορεί να διαφοροποιηθεί καθώς οι άλλες δερματικές παθήσεις επηρεάζουν συνήθως και τους δύο μαστούς και μπορούν να ξεκινήσουν από την θηλαία άλω και όχι από τη θηλή του μαστού. Όταν η νόσος χειροτερεύσει, ενδέχεται η θηλή να αιμορραγεί, να εκκρίνει έκκριμα αλλά και να

πραγματοποιηθεί εισολκή της. Η πρόγνωση είναι καλή εφόσον παραμένει εντός της θηλής [53,54].



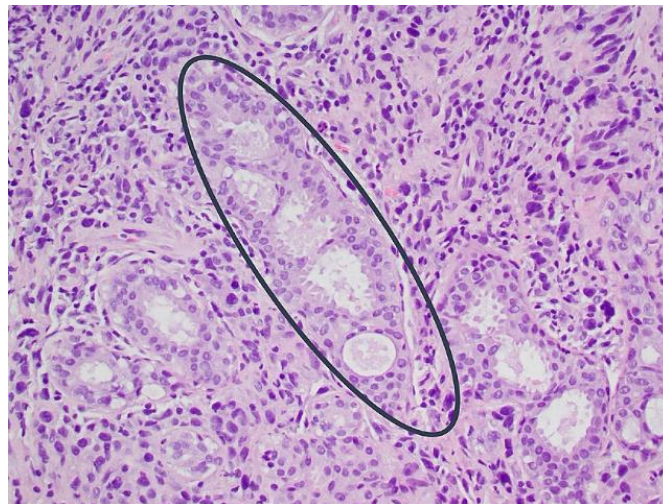
Εικόνα 21: Νόσος Paget.
Πηγή: Pathology Outlines



Εικόνα 22: Καρκίνος του μαστού σε εικόνες.
Πηγή: Magonlinelibrary.com.

➤ Φυλλοειδές κυστεοσάρκωμα μαστού

Οι φυλλοειδείς όγκοι είναι εξαιρετικά σπάνιοι και μπορεί να είναι είτε καλοήθεις είτε κακοήθεις. Αναπτύσσονται στους συνδετικούς ιστούς του μαστού και μπορούν να αντιμετωπιστούν με χειρουργική αφαίρεση [55,56,57].



Εικόνα 23: Φυλλοειδείς όγκος του μαστού σε γυναίκα 26 ετών. Πηγή: Europermc.org

➤ Θηλώδες καρκίνωμα μαστού (papillary carcinoma)

Ιδιαίτερα σπάνιος τύπος που συνιστά λιγότερο από το 1% των καρκινωμάτων μαστού. Συναντάται σε μετεμμηνοπαυσιακές, συνήθως, γυναίκες. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αποτελεί η ύπαρξη αθροίσεων στο παρακείμενο μαζικό παρέγχυμα ή στον λιπώδη ιστό. Έχει πολύ καλή πρόγνωση, καθώς δεν είναι επιθετικός [58].

➤ Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού έχει συνήθως κακή πρόγνωση και περιγράφεται από την απουσία έκφρασης υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, καθώς και απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης HER2. Παρατηρείται συνήθως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και είναι υπεύθυνος για το 10-15% των περιπτώσεων στα θήλεα άτομα της λευκής φυλής [59,60].

1.2.5 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Οι ασθενείς με παρόμοια κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν διαφορετική εξέλιξη και πρόοδο νόσου, όπως διαφορετική είναι και η πορεία των ασθενών με τα ίδια ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η διαπίστωση αυτή οδήγησε στην μελέτη του μοριακού προφίλ των όγκων, επιτρέποντας την περαιτέρω ταυτοποίηση των καρκινωμάτων του μαστού σε πέντε διαφορετικούς υποτύπους. Η ταξινόμηση έγινε με βάση την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (ER), των υποδοχέων προγεστερόνης (PR) και των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης HER2.

Σε γενικές γραμμές, οι ER θετικοί όγκοι είναι συχνότεροι από τους ER αρνητικούς όγκους. Επιπρόσθετα, οι ER θετικοί όγκοι είναι μικρότεροι, χαμηλού βαθμού, με αρνητικούς λεμφαδένες σε αντίθεση με τους ER αρνητικούς όγκους. Στην ευρύτερη κατηγορία των ER θετικών καρκινωμάτων συμπεριλαμβάνονται δύο υποομάδες, οι Luminal A και Luminal B, που εκφράζουν τους υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης. Μία κατηγορία ER αρνητικών χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 και χαρακτηρίζεται ως πλούσιος σε HER2 υπότυπος. Η δεύτερη υποκατηγορία ER-αρνητικών καρκινωμάτων εμφανίζει ποικίλο προφίλ γονιδιακής έκφρασης [61,62,63].

Υπότυποι καρκίνου του μαστού	Κατάσταση ορμονικών υποδοχέων	Κατάσταση υποδοχέα HER2	Ki-67
Luminal A	ER+ and/or PR+	HER2 αρνητικό	Χαμηλό(<14%)
Luminal B HER2 negative	ER+ and/or PR+	HER2 αρνητικό	Υψηλό
Luminal B HER2 positive	ER+ and/or PR+	HER2 θετικό	Οποιοδήποτε
HER2 positive non-luminal	ER- and PR-	HER2 θετικό	Οποιοδήποτε
Triple negative	ER- and PR-	HER2 αρνητικό	Οποιοδήποτε

Εικόνα 24: Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού. Πηγή: <https://www.hesmo.gr/images/ESMO/ESMO-ACF-Greek-Breast-Cancer-Guide-for-Patients.pdf>

1.2.6. Κλινική Εικόνα-Συμπτώματα

Η πιο συνηθισμένη κλινική εκδήλωση του καρκίνου του μαστού είναι η ψηλάφηση ενός όγκου στο μαζικό αδένα. Τα γενικά συμπτώματα είναι:

- Εξόγκωμα στο μαστό (σκληρό και μη κινητό ογκίδιο)
- Πόνος στο μαζικό αδένα
- Εισολκή της θηλής
- Έκζεμα της θηλής
- Εξέλκωση του δέρματος
- Ερυθρότητα, υπεραιμία και ανομοιόμορφο οίδημα.
- Ορώδη ή αιματηρή έκκριση από την θηλή
- Ασυμμετρία και ανύψωση του πάσχοντος μαστού
- Ακινητοποίηση του μαστού και διόγκωση μασχαλιαίων λεμφαδένων

Ορισμένες φορές η εμφάνιση της νόσου συνοδεύεται και από μεταστάσεις. Επομένως, ανάλογα με τη θέση της μετάστασης προκύπτουν και συμπτώματα, όπως:

- Βήχας και δύσπνοια εξαιτίας των πνευμονικών μεταστάσεων.
- Ίκτερος εξαιτίας των μεταστάσεων στο ήπαρ
- Οστικό άλγος και κατάγματα εξαιτίας των οστικών μεταστάσεων [64].

1.2.7 Σταδιοποίηση- Προγνωστικοί παράγοντες

Η σταδιοποίηση του όγκου επιτρέπει τη σωστή πρόγνωση και την ορθή επιλογή της θεραπείας. Η Αμερικανική Επιτροπή Καρκίνου (American Joint Committee on Cancer) ανέπτυξε το Σύστημα Σταδιοποίησης κατά TNM που χρησιμοποιείται παγκοσμίως έως και σήμερα και αποτελείται από τα γράμματα T, N, M και τους αριθμούς από 0 έως 4, που αναφέρονται στην έκταση και το μέγεθος του όγκου.

Το T (Tumor) αναφέρεται στον πρωτοπαθή όγκο, δηλαδή στον όγκο που εμφανίστηκε αρχικά. Βαθμολογείται από 1 έως 4 ανάλογα με το πόσο βαθιά έχει διηθήσει ο όγκος ή ανάλογα με το μέγεθος του όγκου σε εκατοστά. Το N (Nodes) αναφέρεται στον αριθμό ή και την εντόπιση των επιχώριων λεμφαδένων που είναι θετικοί και περιέχουν νεοπλασματικά κύτταρα. Το M (Metastasis) αναφέρεται στην ύπαρξη μεταστάσεων σε άλλα όργανα. Οι μεταστάσεις που δημιουργούνται από κύτταρα που μεταφέρονται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας (ήπαρ, πνεύμονες, οστά) αλλά και η διασπορά στην κοιλιά (περιτοναϊκές μεταστάσεις) θεωρούνται απομακρυσμένες μεταστάσεις. Ο συνδυασμός των T, N, M, βάσει της αξιολόγησης του πρωτοπαθούς όγκου (T), της παρουσίας ή απουσίας θετικών επιχώριων λεμφαδένων (N) και της πιθανής παρουσίας μεταστάσεων (M) καθορίζει το ακριβές στάδιο της νόσου (Πίνακας 1) [64,65].

T- Πρωτοπαθής όγκος	
TX	Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Ο όγκος δεν μπορεί να αποδειχθεί
Tis	Καρκίνωμα in situ <ul style="list-style-type: none"> • DCIS • LCIS • Paget
T1	Όγκος διαμέτρου <2εκ. <ul style="list-style-type: none"> • T1mi: όγκος <0,1 εκ. • T1a: όγκος >0,1εκ και <0,5εκ. • T1b: όγκος >0,5εκ. και <1εκ. • T1c: όγκος >1εκ. και <2εκ.
T2	Όγκος διαμέτρου >2εκ. και <5εκ.
T3	Όγκος διαμέτρου >5εκ.
T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή/και το δέρμα. <ul style="list-style-type: none"> • T4a: Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα • T4b: Ελκώσεις ή/και οζίδια ή/και οίδημα του δέρματος, τα οποία δεν πληρούν όμως τα κριτήρια για φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού. • T4c: T4a και T4b • T4d: Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού

L- Λεμφαδένες	
NX	Δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Καμία μετάσταση λεμφαδένων
N1	Καρκινικά κύτταρα που υπάρχουν σε 1-3 μασχαλιαίους λεμφαδένες
N1mi	Όγκος λεμφαδένων >2εκ
N2	καρκινικά κύτταρα που υπάρχουν σε 4-9 μασχαλιαίους λεμφαδένες
N3	καρκινικά κύτταρα στους υποκλείδιους ή υπερκλείδιους λεμφαδένες ή >10 μασχαλιαίους λεμφαδένες

M- Μεταστάσεις	
MX	Δεν μπορεί να βρεθεί ή να εκτιμηθεί
M0	Καμία κλινική ή ακτινογραφική απόδειξη μετάστασης
M0(i+)	Καμία κλινική ή ακτινογραφική απόδειξη απομακρυσμένης μετάστασης, αλλά με μοριακή μέθοδο ή μικροσκοπικά ανιχνευμένα καρκινικά κύτταρα σε κυκλοφορούν αίμα, μυελό των οστών ή άλλο μη περιφερειακό ιστό <0,2 mm σε ασθενή χωρίς συμπτώματα ή ενδείξεις μετάστασης
M1	Απομακρυσμένη ανιχνεύσιμη μετάσταση όπως προσδιορίζεται με κλασικά κλινικά και ακτινογραφικά μέσα ή/και ιστολογικά αποδεδειγμένη >0,2 mm

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού με το σύστημα TNM.

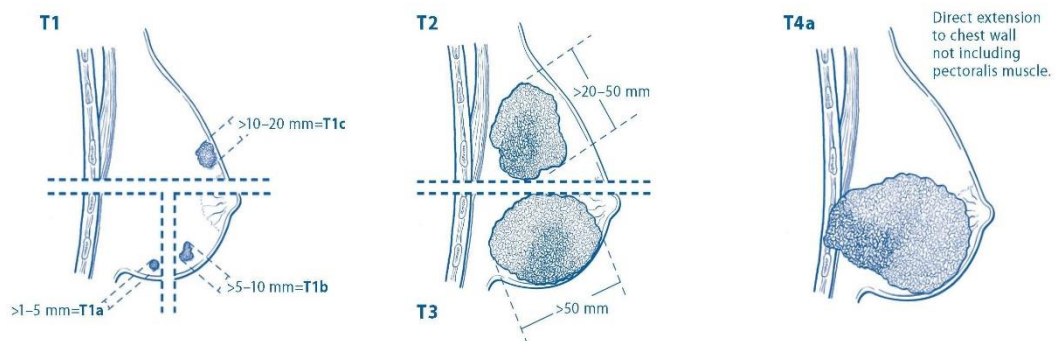
ΣΤΑΔΙΑ	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIB	T4	Οποιοδήποτε N	M0
IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

Πίνακας 2. Σταδιοποίηση των καρκινωμάτων του μαστού.

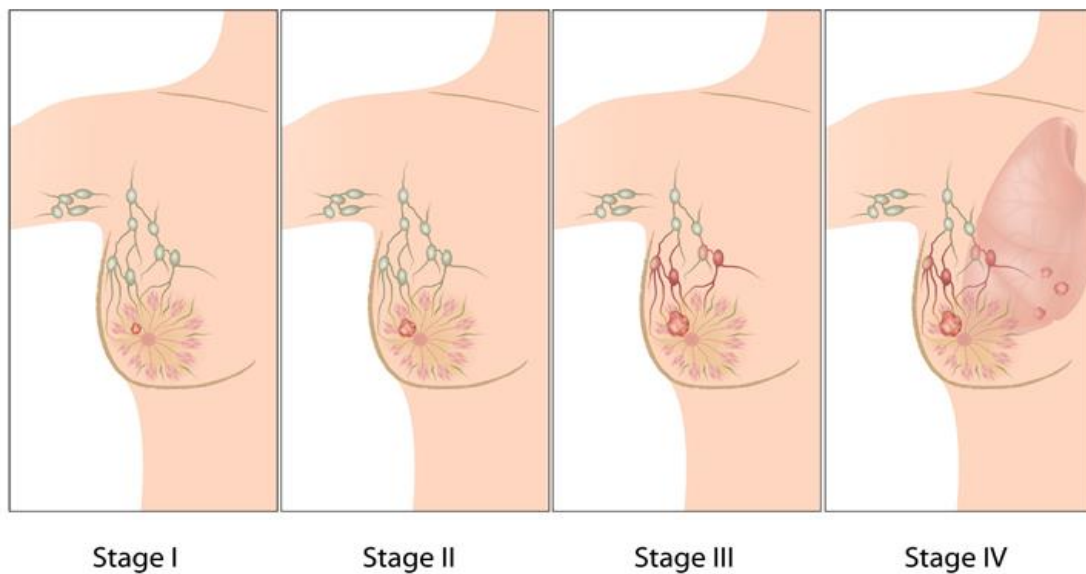
Οι προγνωστικοί παράγοντες στοχεύουν στην επιλογή της κατάλληλης επικουρικής θεραπείας σύμφωνα με την πρόγνωση, στη σύγκριση της θεραπείας μεταξύ παρόμοιων ομάδων ασθενών με κίνδυνο υποτροπής και στην κατανόηση της νόσου. Παρέχουν ενδείξεις για την χρονική εμφάνιση της νόσου και λαμβάνουν υπόψη την ηλικία, το μέγεθος του όγκου και την εκτίμηση των λεμφαδένων. Η εμφάνιση της νόσου σε μικρότερη ηλικία σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, όπως και η διάμετρος του όγκου. Σημαντική παράμετρος για την πρόγνωση αποτελεί και η εκτίμηση του αριθμού και της θετικότητας των λεμφαδένων.

Στην πρόγνωση συνεκτιμώνται επίσης και παράγοντες που σχετίζονται με την εγγενή συμπεριφορά του όγκου, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός διαφοροποίησης και η λεμφική/αγγειακή διήθηση. Ορισμένοι ιστολογικοί υπότυποι, όπως παραδείγματος χάριν ο σωληνοειδής, ο κρυσταλλοειδής, ο βλενώδης και ο θηλώδης, σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση. Ο βαθμός διαφοροποίησης καθορίζεται από τη μορφολογία των πόρων, την πυρηνική πολυμορφία και τη μιτωτική δραστηριότητα. Η εκτίμηση των παραγόντων αυτών επιτρέπει την τριβάθμια αξιολόγηση:

- Βαθμός διαφοροποίησης 1 (χαμηλός βαθμός κακοηθείας), σημαίνει ένας καλά διαφοροποιημένος όγκος
- Βαθμός διαφοροποίησης 2 (μέτριος βαθμός κακοηθείας), σημαίνει ένας όγκος μέτρια διαφοροποιημένος
- Βαθμός διαφοροποίησης 3 (υψηλός βαθμός κακοηθείας), σημαίνει ένας φτωχά διαφοροποιημένος όγκος με κακή πρόγνωση
- Όσον αφορά στη λεμφική/αγγειακή διήθηση, αυτή σημειώνεται σε ποσοστό της τάξης του 25% των χειρουργημένων καρκίνων του μαστού.



Εικόνα 25: Σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού. Πηγή: The American Joint Committee on Cancer (7th edition).



Εικόνα 26: Τα στάδια του καρκίνου του μαστού. Πηγή: ConquerBreastCancer.org.

Η μοριακή ταξινόμηση παρέχει επίσης ενδείξεις για την πρόγνωση της νόσου. Η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης είναι σημαντική, καθώς η εν λόγω έκφραση καθορίζει την ανταπόκριση στην ενδοκρινολογική θεραπεία που χορηγείται ως θεραπεία για προχωρημένο μεταστατικό καρκίνο του μαστού ή ως επικουρική θεραπεία. Η θετικότητα των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) προβλέπει 50%-70% πιθανότητα ανταπόκρισης σε ορμονική θεραπεία.

Κατά κανόνα, οι ER θετικοί όγκοι παρουσιάζουν επίσης έκφραση του υποδοχέα προγεστερόνης. Τα επίπεδα έκφρασης του HER2 υποδοχέα σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. Επιπρόσθετα, νεοπλασμάτα με μεταλλάξεις στο *BRCA1* γονίδιο παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση συγκριτικά με εκείνα που φέρουν μεταλλάξεις στο *BRCA2* γονίδιο.

Αξίζει να αναφερθεί επίσης και ο προγνωστικός δείκτης Nottingham, ο οποίος αξιολογεί συνδυαστικά το μέγεθος του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης και την κατάσταση των λεμφαδένων.

Στην πολύ καλή προγνωστική ομάδα (EPG) που περιλαμβάνει το 10% των συμπτωματικών ασθενών και το 30% των ασθενών που ελέγχονται τακτικά, οι πιθανότητες επιβίωσης είναι πολύ υψηλές. Υπάρχει πιθανότητα 70% για 5-ετή επιβίωση ασθενών μέχρι δευτέρου σταδίου και πιθανότητα 30% για 15-ετή επιβίωση ασθενών που ανήκουν στη μέτρια προγνωστική ομάδα (MPG). Πολύ κακή πρόγνωση, συνήθως 1 έτους, συναντάται στην φτωχή προγνωστική ομάδα (PPG). Σημειώνεται ότι ένας μικρός όγκος μπορεί να είναι υψηλού βαθμού κακοηθείας, δηλαδή φτωχά διαφοροποιημένος και επιθετικός. Οι προβλέψεις επιβίωσης σε ένα άτομο σχετίζονται με την επιλογή της επικουρικής συστηματικής θεραπείας [64,66-75].

1.2.8 Διάγνωση

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνει:

- Την κλινική εξέταση
- Την απεικόνιση του μαστού (μαστογραφία +/- US υπερηχογράφημα μαστών)
- Τη βιοψία

Η κλινική εξέταση είναι βασικής σημασίας καθώς συνεκτιμώνται το ιστορικό του ατόμου, τα συμπτώματα που αναφέρει και τα σημεία της φυσικής εξέτασης. Αναλόγως του σταδίου της νόσου, ποικίλει και η αξιοπιστία της εξέτασης:

- σε ασυμπτωματική νόσο με απεικονιστικά ευρήματα μόνο, η κλινική εξέταση θα είναι αρνητική
- σε συμπτωματική νόσο, θα διαμορφωθεί η υπόνοια, ανάλογα με το σύμπτωμα (π.χ. σκληρή ψηλαφητή μάζα, αιματηρό έκκριμα κλπ.)

Η μαστογραφία αποτελεί την κατεξοχήν απεικονιστική εξέταση του μαστού. Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, μεταξύ 75 και 90%, τόσο στις ψηλαφητές όσο και στις μη ψηλαφητές βλάβες. Το υπερηχογράφημα έρχεται να συμπληρώσει τη μαστογραφία, είτε διαγνωστικά όταν υπάρχει εύρημα, είτε επί αρνητικής μαστογραφίας σε πυκνούς μαστούς. Οι δύο εξετάσεις μαζί αυξάνουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της απεικόνισης σε ποσοστό της τάξης του 90%. Η ψηφιακή μαστογραφία παρουσιάζει εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία, της τάξης του 98%, στις διηθητικές βλάβες του μαστού, παρουσιάζει ωστόσο σχετικά χαμηλή ειδικότητα.

Η βιοψία αποτελεί επεμβατική μέθοδο κατά την οποία λαμβάνεται υλικό από την περιοχή που εγείρει την υπόνοια της κακοήθειας και αποστέλλεται για εξέταση ώστε να ταυτοποιηθεί η φύση της αλλοίωσης. Πραγματοποιείται όταν:

- υπάρχει εύρημα, κλινικό ή/και απεικονιστικό, με μικρή υπόνοια κακοήθειας, η οποία ωστόσο δεν μπορεί να αποκλειστεί,
- υπάρχει εύρημα με ισχυρή υπόνοια κακοήθειας, η οποία πρέπει να επιβεβαιωθεί και επιπλέον πρέπει να διευκρινιστούν τα ιστολογικά της χαρακτηριστικά που θα καθορίσουν το πλάνο της θεραπείας.

Η βιοψία μπορεί να είναι δια βελόνης, στα πλαίσια κυτταρολογικής εξέτασης ή να περιλαμβάνει την εξαίρεση ιστικού τεμαχίου [76,77].

1.2.9 Θεραπεία

Μετά τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού αρχίζει η ενημέρωση της ασθενούς σχετικά με τις υπάρχουσες θεραπείες και επιλέγεται η καταλληλότερη κατά περίπτωση. Οι θεραπείες για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν τα ακόλουθα θεραπευτικά θύματα [78]:

➤ Χειρουργική επέμβαση

Είναι η συχνότερη και πιο αποτελεσματική μορφή θεραπείας και χρησιμοποιείται με σκοπό την προφύλαξη, τη θεραπεία ή την ανακούφιση της ασθενούς. Κατά το πρώτο μισό του 20ού αιώνα, οι γυναίκες με διάγνωση καρκίνου του μαστού αντιμετωπίζονταν συνήθως με ριζική μαστεκτομή. Η χειρουργική επέμβαση διατήρησης του μαστού (BCS) πρωτοστάτησε από τους Fischer et al. και Veronesi et al., οι οποίοι ανέφεραν ότι η επιβίωση με ογκεκτομή και ακτινοβολία ήταν ισοδύναμη της ριζικής μαστεκτομής στη θεραπεία του πρώιμου καρκίνου του μαστού.

Η προφυλακτική χειρουργική επέμβαση αποτελεί επίσης επιλογή για άτομα με γενετική προδιάθεση ή οικογενειακό ιστορικό. Η δεύτερη περίπτωση χειρουργικής αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού είναι η περίπτωση που ο καρκίνος έχει ήδη αναπτυχθεί και χρειάζεται να γίνει αφαίρεση του όγκου ή να μειωθεί το μέγεθός του.

Σε προχωρημένες καταστάσεις της νόσου, που υπάρχουν ήδη μεταστάσεις, το χειρουργείο ενδέχεται να γίνει για ανακουφιστικούς λόγους. Αποτελεί παρηγορητική μορφή θεραπείας, καθώς αποσκοπεί στην ανακούφιση από τον πόνο, στη διατήρηση της λειτουργικότητας των οργάνων που έχουν προσβληθεί και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής σε τελικού σταδίου ασθενείς [79,80].

➤ Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία έχει ευρεία χρήση στην αντιμετώπιση των καρκίνων. Ωστόσο, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία ονομάζονται κυτταροστατικά, έχουν τοξική δράση η οποία δεν περιορίζεται μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά επιδρά και στα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού. Για το λόγο αυτό, η χημειοθεραπεία παρουσιάζει πολλές παρενέργειες, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται ο εμετός, η ναυτία, η καταστολή του αιμοποιητικού και του ανοσοποιητικού συστήματος, η αλωπεκία, ο πόνος και η κόπωση [81,82].

Ευνοϊκά αποτελέσματα φαίνεται να έχει η χρήση χημειοθεραπείας σε συνδυασμό με τη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής αμέσως μετά το χειρουργείο. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι μειώνονται σημαντικά οι επιπλοκές μετά το χειρουργείο με την χορήγηση της λετροζόλης [83].

Η επικουρική χημειοθεραπεία μετά από τη χειρουργική επέμβαση συνιστάται σε ασθενείς με υψηλό κίνδυνο υποτροπής. Οι παράγοντες που συνηγορούν υπέρ της χημειοθεραπείας είναι:

- ER-, PR- και HER2- απουσία έκφρασης
- HER2-θετική έκφραση
- Μεγάλο μέγεθος όγκου
- Θετικοί λεμφαδένες

Η απόφαση για χορήγηση χημειοθεραπείας θα πρέπει να συνεκτιμά το δυνητικό όφελος επιβίωσης με τις συννοσηρότητες του ασθενούς και τον κίνδυνο επιπλοκών.

➤ Ακτινοθεραπεία

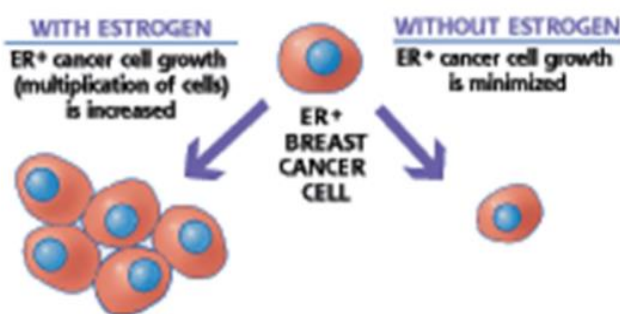
Η ακτινοθεραπεία παίζει ουσιαστικό ρόλο στη διαχείριση του καρκίνου του μαστού μετά το χειρουργείο. Η ακτινοβολία μειώνει το ποσοστό τοπικής υποτροπής και αυξάνει την επιβίωση σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο καρκίνου του μαστού μετά από BCS, καθώς και σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες που έχουν υποβληθεί σε μαστεκτομή [84].

Η ακτινοθεραπεία χορηγείται μόνη της ή συνδυαστικά με άλλη θεραπεία. Στόχος είναι η καταστροφή των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω της ακτινοβολίας, προκαλώντας τις μικρότερες δυνατές απώλειες των φυσιολογικών κυττάρων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της ακτινοθεραπείας είναι ότι δρα τοπικά στον όγκο, χωρίς να επηρεάζει τη λειτουργικότητα του οργάνου. Χρησιμοποιείται συχνά μετά το χειρουργείο, ώστε να απομακρύνει τυχόν υπολείμματα καρκινικών ιστών, τα οποία θα μπορούσαν να δώσουν μεταστάσεις. Επιλέγεται επίσης ως θεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις και πριν το χειρουργείο, ώστε να εξασφαλίσει τη συρρίκνωση του όγκου που πρόκειται να εξαιρεθεί. Οι παρενέργειες της ακτινοθεραπείας είναι η κόπωση και η διαταραγμένη αίσθηση της γεύσης [83].

➤ Ορμονοθεραπεία/Ενδοκρινική θεραπεία

Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού, που εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης, λαμβάνουν συνήθως ενδοκρινική θεραπεία, η οποία εμποδίζει την επίδραση των οιστρογόνων στα νεοπλασματικά κύτταρα του μαστού.

Τα νεοπλάσματα που εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων αφορούν σε ποσοστό της τάξης του 70% περίπου των καρκίνων του μαστού. Σε αυτά, ο υποδοχέας οιστρογόνων, αποτελεί βασικό θεραπευτικό στόχο. Αντιθέτως, οι όγκοι που δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων, ανταποκρίνονται σπάνια στην ενδοκρινική θεραπεία.



Εικόνα 27: Η ορμονική θεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

Πηγή: Heba Soffar, 2016.

Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των φυσιολογικών κυττάρων του μαστού. Η έκφραση των συγκεκριμένων υποδοχέων στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την αύξηση, επομένως και την ανάπτυξη του καρκίνου.

Η ορμονική θεραπεία βασίζεται στο γεγονός ότι πολλοί όγκοι χρησιμοποιούν τις ορμόνες του οργανισμού για να αναπτυχθούν. Αν χορηγηθεί στον ασθενή μία άλλη ορμόνη, η οποία έχει την τάση να δεσμεύει την πρώτη, ή να αναστέλλει την έκκριση ορμονών, ή να εμποδίζει τη δράση τους, τα καρκινικά κύτταρα δεν λαμβάνουν τη ζωτικής σημασίας ορμόνη και η ανάπτυξη του όγκου σταματά.

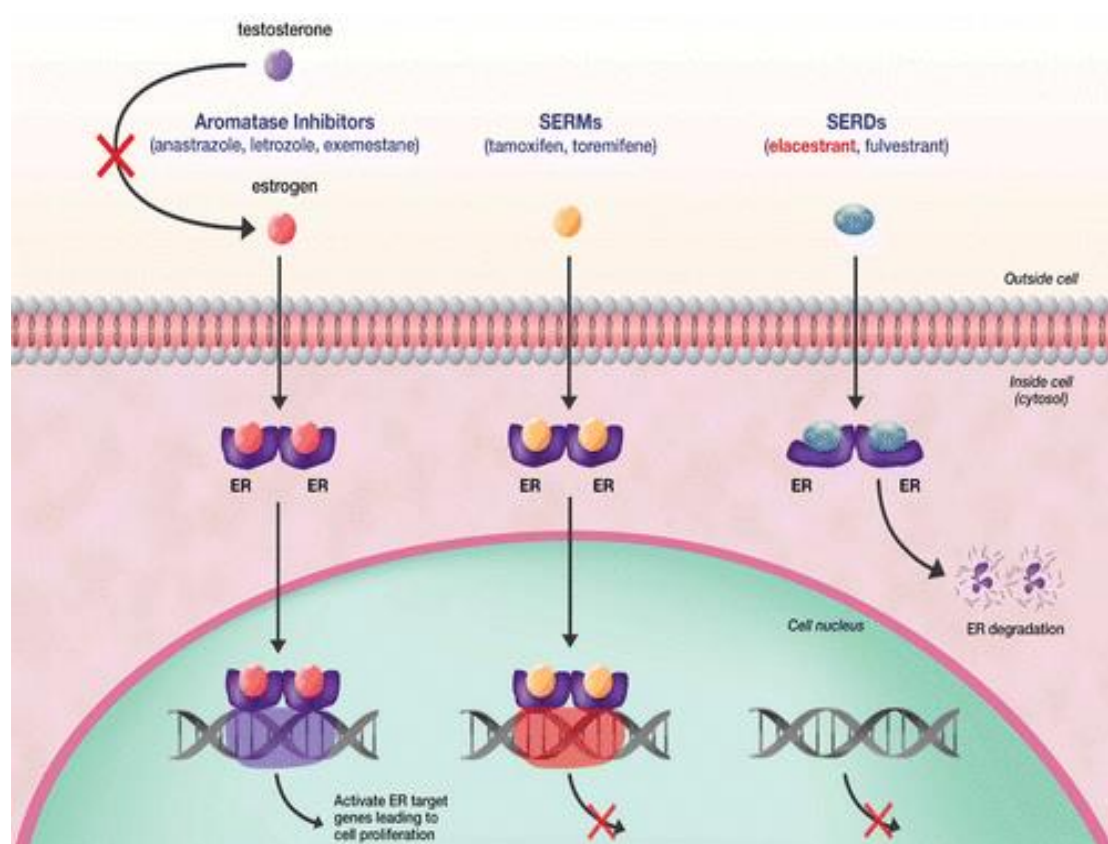
Τα συχνότερα φάρμακα της ορμονικής θεραπείας είναι:

- ✓ Ταμοξιφαίνη
- ✓ Αναστολείς αρωματάσης (αναστροζόλη, εξεμεστάνη και λετροζόλη)
- ✓ Ραλοξιφαίνη
- ✓ Φουλβεστράντη Fulvestrant

Οι ορμονικές θεραπείες στοχεύουν στην πρωτεΐνη ER ή στην περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα. Αναλυτικά, οι αναστολείς αρωματάσης (AIs), εμποδίζουν τη σύνθεση

των οιστρογόνων, αναστέλλοντας τη δράση της αρωματάσης, που μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (π.χ. λετροζόλη, αναστροζόλη).

Οι επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνων (SERMs), αναστέλλουν άμεσα το ER δεσμεύοντάς το και δημιουργώντας ένα ανενεργό σύμπλεγμα και αναστέλλοντας την ER σηματοδότηση (π.χ. ταμοξιφαίνη). Τέλος, οι επιλεκτικοί αποικοδομητές ER (SERDs), είναι ισχυρά αντι-οιστρογόνα. Προκαλούν αποδόμηση των ER πρωτεϊνών και αποτρέπουν την ER σηματοδότηση προκαλώντας υποβάθμιση του υποδοχέα. (π.χ. φουλβεστράντη).



Εικόνα 28: Τρόπος δράσης της ορμονικής θεραπείας. Πηγή: Pharmacology & Therapeutics 186 (2018) 1-24

Η ορμονοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μεταστατική νόσο, προεγχειρητικά, ως συμπληρωματική αγωγή, αλλά και ως προφύλαξη για την αποφυγή ανάπτυξης καρκίνου του μαστού [85-90].

➤ Στοχευμένη θεραπεία (αντισώματα)

Τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν σε υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Η πρόοδος στην κατανόηση των βασικών μοριακών οδών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου διευκόλυνε την ανάπτυξη των στοχευμένων θεραπειών. Τα ανασυνδυασμένα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται, στα πλαίσια της θεραπείας, σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού είναι το Trastuzumab, το Pertuzumab και το Bevacizumab. Το Trastuzumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του HER2 υποδοχέα, χρησιμοποιείται συστηματικά σε ασθενείς με HER2 θετικούς όγκους. Το Pertuzumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται σε διαφορετικό επίτοπο στο HER2, σε σχέση με το Trastuzumab, έχει αναπτυχθεί για ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ανεξαρτήτως της έκφρασης του HER2 υποδοχέα. Το Bevacizumab, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα με δράση έναντι του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) [91].

Η επιλογή της θεραπείας ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς, την κατάσταση της εμμηνόπαυσης και το στάδιο της νόσου.

Το πορογενές καρκίνωμα *in situ* αντιμετωπίζεται με ογκεκτομή και ακτινοβολία ή με μαστεκτομή. Εάν το πορογενές καρκίνωμα *in situ* είναι ER θετικό, οι ασθενείς μπορούν να λάβουν και ορμονική θεραπεία.

Τα καρκινώματα πρώιμου διηθητικού σταδίου (I, IIa, IIb) και τα τοπικά προχωρημένου σταδίου (IIIa, IIIb, IIIc) είναι μη μεταστατικά και έχουν τρεις φάσεις θεραπείας. Η προεγχειρητική φάση χρησιμοποιεί συστηματικές ενδοκρινικές θεραπείες ή ανοσοθεραπείες, υπό την προϋπόθεση ότι οι όγκοι εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων, προγεστερόνης ή HER2. Η προεγχειρητική χημειοθεραπεία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και αποτελεί τη μόνη επιλογή όταν οι όγκοι δεν εκφράζουν κανέναν από τους προαναφερόμενους υποδοχείς. Εάν ο όγκος μπορεί να εξαιρεθεί με καλά αισθητικά αποτελέσματα, τότε πραγματοποιείται συνδυασμός ογκεκτομής και ακτινοβολίας, διαφορετικά επιλέγεται η μαστεκτομή.

Η μετεγχειρητική φάση περιλαμβάνει την ακτινοβολία, την ορμονοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία και την χημειοθεραπεία.

Οι όγκοι που παρουσιάζουν τοπική υποτροπή αντιμετωπίζονται συνήθως με συστηματική χημειοθεραπεία, ενδοκρινική θεραπεία (για όγκους με έκφραση ορμονικών υποδοχέων) και Trastuzumab (για όγκους που υπερεκφράζουν την HER2

πρωτεΐνη). Η ακτινοθεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση για τη διατήρηση του μαστού μειώνει τη θνησιμότητα και την υποτροπή της νόσου. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιέχουν ανθρακυκλίνη και ταξάνη είναι επίσης δραστικά στον καρκίνο του μαστού.

Τα σταδίου III καρκινώματα του μαστού χρειάζονται συνήθως επικουρική χημειοθεραπεία για τη μείωση του όγκου και τη διευκόλυνση της χειρουργικής επέμβασης που διατηρεί το στήθος.

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού απαιτεί επικουρική χημειοθεραπεία ακολουθούμενη από μαστεκτομή, καθώς και εκτομή των μασχαλιαίων λεμφαδένων και ακτινοβολία θώρακος. Η πρόγνωση είναι κακή σε γυναίκες με υποτροπιάζον ή μεταστατικό (σταδίου IV) καρκίνο του μαστού. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας πρέπει να στοχεύει στη βελτίωση του προσδόκιμου ζωής, στη μείωση του πόνου και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών [85,92,93].

1.3 Ο οιστρογονικός υποδοχέας ESR1

Οι πυρηνικοί υποδοχείς των ορμονών (NHRs) είναι μέλη μιας μεγάλης οικογένειας πυρηνικών υποδοχέων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Κατανέμονται σε όλο το σώμα και διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στις κυτταρικές διεργασίες. Τέτοιου είδους πυρηνικοί υποδοχείς είναι οι υποδοχείς ανδρογόνων (ARs), οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GRs), οι υποδοχείς προγεστερόνης (PRs), οι υποδοχείς ορικών κορτικοειδών και οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs).

Η δραστηριότητα των NHRs ρυθμίζεται από τις στεροειδείς ορμόνες που προέρχονται από τη χοληστερόλη. Λόγω της υδρόφοβης φύσης τους, οι στεροειδείς ορμόνες διαχέονται στην πλασματική μεμβράνη, επιτρέποντας στα εξωκυττάρια σήματα να ρυθμίζουν ενδοκυτταρικές λειτουργίες [94,95].

Τα οιστρογόνα είναι μια κατηγορία στεροειδών ορμονών που περιλαμβάνουν την οιστρόνη, την οιστραδιόλη και την οιστριόλη. Η 17β-οιστραδιόλη, η πιο ισχυρή οιστρογονική ορμόνη στην κυκλοφορία, εμπλέκεται σε ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως παραδείγματος χάριν η ανάπτυξη και η διατήρηση των αναπαραγωγικών οργάνων, η ρύθμιση της ομοιόστασης του καρδιαγγειακού, του μυοσκελετικού, του ανοσοποιητικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος [96,97].

Ο υποδοχέας οιστρογόνων ταυτοποιήθηκε αρχικά στη δεκαετία του 1960. Οι μετέπειτα μελέτες ανέδειξαν τη σημασία του στην καρκινογένεση. Η αναστολή του μέσω της ενδοκρινικής στόχευσης, ενδέχεται να είναι άμεση – παραδείγματος χάριν με τη χρήση αγωνιστών οιστρογόνων (επιλεκτικοί ρυθμιστές ER) ή έμμεση, παρεμποδίζοντας τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (π.χ. αναστολείς αρωματάσης). Αποτελεί τον βασικό άξονα της ενδοκρινικής θεραπείας στον καρκίνο του μαστού [98].

Οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι πρωτεΐνες με μοναδικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Το ανθρώπινο γονίδιο *ERα* (*ESR1*) εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή q24-q27 του χρωμοσώματος 6 και έχει έκταση περίπου 300 kb. Το γονίδιο περιέχει οκτώ εξόνια τα οποία κωδικοποιούν την αντίστοιχη πρωτεΐνη μήκους 66 kDa, που αποτελείται από 595 αμινοξέα [99,100,101].

Ο οιστρογονικός υποδοχέας υποδιαιρείται σε έξι λειτουργικές περιοχές A έως F: στην περιοχή ενεργοποίησης A/B (AF-1), στην κεντρική περιοχή C που αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD), στην περιοχή D, η οποία περιέχει το σήμα πυρηνικής εντόπισης (NLS) και συνδέει την περιοχή C με την περιοχή E. Η περιοχή E ονομάζεται και LBD (Ligand-Binding Domain) και ευθύνεται για πολλές διαφορετικές λειτουργίες, οι οποίες εξαρτώνται στην πλειοψηφία τους από την παρουσία του προσδέτη. Η περιοχή F βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας του υποδοχέα.



Εικόνα 29: Η δομή του ERα υποδοχέα. Πηγή: H.K. Patel, T. Bihani. *Pharmacology & Therapeutics* 186, 1-24 2018.

Στα γονίδια των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ, το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την περιοχή A/B. Η περιοχή C και το DBD, κωδικοποιούνται από τα εξόνια 2 και 3. Το εξόνιο 4 κωδικοποιεί τμήμα της περιοχής C, όλη την περιοχή D και μέρος της περιοχής E. Η ορμονοδεσμευτική περιοχή (E/F) κωδικοποιείται από τα εξόνια 4-8 [102-105].



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ και αντιστοιχία γονιδιακής-πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Πηγή: Yaşar, P et. al., 2017.

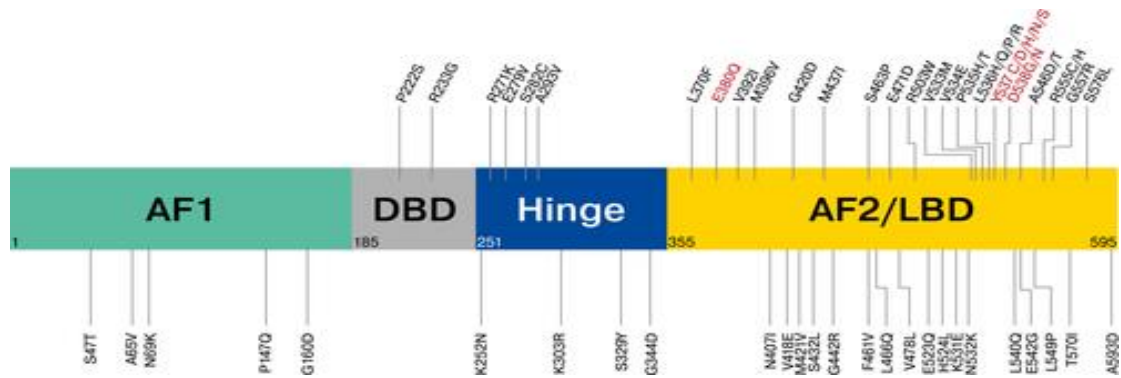
1.3.1 Μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα οιστρογόνων

Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις εντός της LBD περιοχής του *ESR1* γονιδίου σε ποσοστό μεγαλύτερο από 30% των ER-θετικών μεταστατικών καρκίνων του μαστού (MBC). Οι μεταλλάξεις εμφανίζουν μία ανεξάρτητη της σύνδεσης με τον προσδέτη δραστηριότητα, η οποία ενεργοποιεί τη λειτουργία μεταγραφής του ER, προάγοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων ανεξάρτητα από τις ορμόνες. Οι μεταλλάξεις αυτές θεωρούνται δείκτες κακής πρόγνωσης και προβλέπουν αντίσταση σε αναστολείς αρωματάσης (AIs), καθώς και μειωμένη ευαισθησία στα SERMs/SERDs.

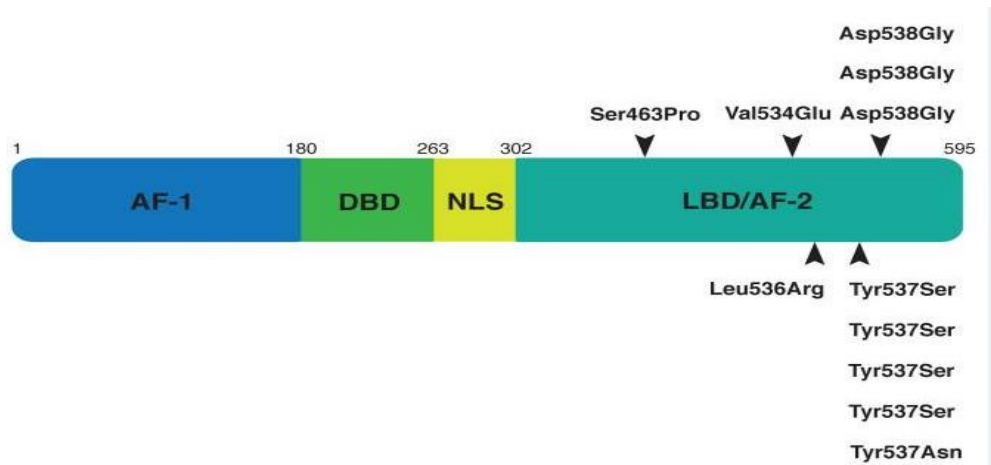
Έχουν περιγραφεί αρκετοί μηχανισμοί de novo αντίστασης, μεταξύ των οποίων είναι η απώλεια της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα, η διασταύρωση του οιστρογονικού υποδοχέα με υποδοχείς αυξητικών παραγόντων και των ενεργοποιητικών μεταλλάξεων του *ESR1* γονιδίου. Οι μεταλλάξεις που αναφέρονται εμφανίζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε μεταστατικά καρκινώματα του μαστού. Αρκετές είναι και οι μελέτες που έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ του επιπολασμού των μεταλλάξεων στην LBD περιοχή και του αριθμού των ενδοκρινικών θεραπειών.

Οι συχνότερες και καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του *ESR1* γονιδίου αφορούν στις αμινοξικές θέσεις 536, 537 και 538 στο εξόνιο 8 (p.Leu536Arg, p.Tyr537Ser, p.Tyr537Asn, p.Tyr537Cys, and p.Asp538Gly) με συνηθέστερες τις Y537S, D538G. Η μετάλλαξη που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή στη θέση 380 παρατηρείται στο εξόνιο 5. Η εν λόγω μετάλλαξη παρουσιάζει έναν διαφορετικό και ελάχιστα κατανοητό μηχανισμό ανάπτυξης του όγκου από αυτόν που παρατηρείται ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων Y537S και D538G. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί έως σήμερα εστιάζονται στην LBD περιοχή. Ορισμένες από τις μεταλλάξεις αυτές έχουν χαρακτηριστεί ως ανεξάρτητες από τη δράση ορμονών

ενεργοποιητικές μεταλλάξεις (Y537, D538), ενώ άλλες προκαλούν υπερευαισθησία στα οιστρογόνα (K303R, E380Q) [107-115].



Εικόνα 31: Χαρτογράφηση των συχνότερων μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί σε κλινικά δείγματα. Η πλειοψηφία αυτών απαντάται στην LBD περιοχή. Πηγή: Dustin et. al. ESR1 Mutations, 2019.



Εικόνα 32: Μεταλλάξεις του ESR1 που αναφέρονται σε ER+ μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Πηγή: Toy W. et.al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer., 2013.

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι μελετήσουμε την κατανομή των μεταλλάξεων στα εξόνια 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου, που χαρτογραφούνται οι περισσότερες μεταλλάξεις και να εκτιμήσουμε τον πιθανό τους ρόλο στην έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων ER.

2.2 Υλικό της μελέτης

Στην παρούσα εργασία συμπεριλάβαμε συνολικά 44 γυναίκες με καρκίνο του μαστού με μέσο όρο ηλικίας τα 64,8 έτη οι οποίες διαγνώστηκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας. Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από βιοψίες και κυρίως χειρουργικά παρασκευάσματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη. Η επεξεργασία και η διάγνωση των υλικών έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής.

Συλλέξαμε τις ιστολογικές εκθέσεις των ασθενών και καταγράψαμε τα κλινικοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά, διασφαλίζοντας την ανωνυμία των ασθενών.

2.3 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πειραματικό μέρος της εργασίας:

- ✓ Ευλόλη (mixture or isomers), VWR chemicals.
- ✓ Αιθανόλη 100% denaturated ethyl alcohol solution, Biognost.
- ✓ Ισοπροπανόλη, Amresco.
- ✓ DNA Extraction Cobas kit, Roche:
 - ✓ DNA Tissue Lysis Buffer (TLB)
 - ✓ DNA Paraffin Binding Buffer (PBB)
 - ✓ Πρωτεΐνάση K
 - ✓ DNA Wash Buffer 1 (WB1)
 - ✓ DNA Wash Buffer 2 (WB2)

- ✓ DNA Elution Buffer (DNA EB)
- ✓ Filter Tubes with caps (FT)
- ✓ Collection Tubes (CT)
- ✓ Σωληνάρια τύπου Eppendorf:
 - ✓ MicroTube 2.0ml SafeSeal, SARSTEDT.
 - ✓ PCR Tubes 0.2ml flat cap, AHN Biotechnologie GmbH.
- ✓ Tris-Borate-EDTA 10x (TBE Buffer), Grisp.
- ✓ AgaPure Agarose LE, Canvaxbiotech.
- ✓ Δις απεσταγμένο νερό 10 ml, ΒΙΟΣΕΡ.
- ✓ Χρωστική Ηλεκτροφόρησης μπλε της βρωμοφαινόλης.
- ✓ Βρωμιούχο αιθίδιο (1%), AppliChem.
- ✓ 100bp DNA Ladder, Invitrogen.
- ✓ Συσκευή UV ακτινοβολίας, DNr Bioimagine System MiniB S Pro
- ✓ Ζυγός ακριβείας, Denver Instrument APX-200.
- ✓ Εκμαγείο για πηκτή αγαρόζης.
- ✓ Κωνική Φιάλη.
- ✓ Συσκευή Ηλεκτροφόρησης, Thermo election corporation.
- ✓ Φωτόμετρο, Thermo Scientific NANODROP 2000 Spectrophotometer.
- ✓ Συσκευή έντονης ανάδευσης, FIRLABO. sa.
- ✓ Φυγόκεντρος SL8R, Thermofisher.
- ✓ Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής, Mastercycler ep gradient, Eppendorf.
- ✓ Ξηρός επωαστήρας, ThermoStat plus, Eppendorf.
- ✓ Εστία απορρόφησης πηπτικών χημικών κάθετης νηματικής ροής, Safeshood 120, BIOAIR.
- ✓ Πιπέτες άντλησης και έγχυσης:
 - ✓ Gilson P20, P100 και P1000.
 - ✓ BIOHIT PROLINE 0,1-2,5μl και 20-200μl.
- ✓ Falcon 15ml και 50ml.
- ✓ Στατώ
- ✓ Ρύγχη πιπετών:
 - ✓ Filter Tips 100ul, ClearLine.
 - ✓ Finntip 1000ul, ThermoLabsystems.
 - ✓ Aerosol Resistant Tips 10ul, Molecular BioProduct.

- ✓ Εκκνητές PCR (primers), Eurofins Genomics:
 - ✓ ESR1A1F: 5' TTG CTT GTT TTC AGG CTT TGT GGA-3'.
 - ✓ ESR1A1R: 5' AGC GCC AGA CGA GAC CAA TCA T-3'.
 - ✓ ESR1B1F: 5' ACA GCA TGA AGT GCA AGA ACG T-3'.
 - ✓ ESR1B1R: 5' TGG CTT TGG TCC GTC TCC TC-3'
 - ✓ HotFirePol 10x Buffer B2, SOLISBIODYNE.
 - ✓ 25mM MgCl₂, SOLISBIODYNE.
 - ✓ HotFirePol DNA Polymerase 5u/μl.
 - ✓ dNTPs (40 mM, Invitrogen)
- ✓ PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen:
 - ✓ Binding Buffer B2
 - ✓ PureLink Spin column
 - ✓ Δισαπεσταγμένο νερό

2.4 Μέθοδοι

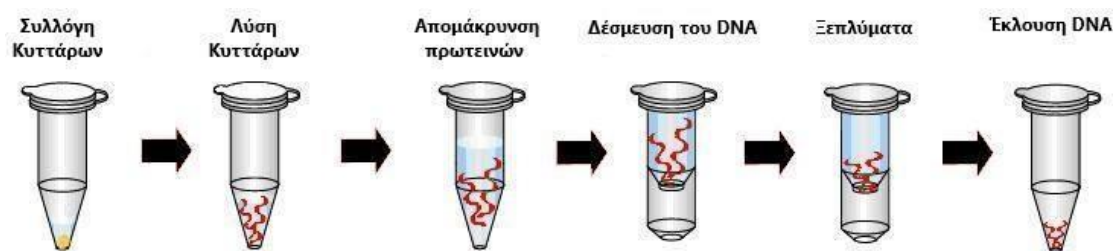
2.4.1 Απομόνωση γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού DNA από τομές παραφίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του Cobas DNA tissue kit (ROCHE HELLAS DIAGNOSTICS). Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε είναι το εξής:

- i. Τοποθέτηση 4 τομών FFPET πάχους 5μm σε σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 2ml τύπου Eppendorf με καπάκι ασφαλείας που φέρει ετικέτα με κωδικοποίηση κάθε δείγματος.
- ii. Προσθήκη 500μL διαλύματος ξυλόλης.
- iii. Καλή ανάμιξη στροβιλίζοντας για 10 δευτερόλεπτα (vortex).
- iv. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).
- v. Προσθήκη 500μL διαλύματος απόλυτης αιθανόλης.
- vi. Καλή ανάμιξη στροβιλίζοντας για 10 δευτερόλεπτα (vortex).
- vii. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

- viii. Φυγοκέντριση για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- ix. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού και απόρριψη στα χημικά απόβλητα.
- x. Αποξήρανση του ιζήματος για 10 λεπτά στους 56°C σε μονάδα θέρμανσης με το σωληνάριο ανοιχτό.
- xi. Προσθήκη 180μL διαλύματος λύσης DNA TLB.
- xii. Προσθήκη 70μL διαλύματος πρωτεΐνας K (10 mg/μl).
- xiii. Τοποθέτηση του σωληναρίου στη μονάδα ξήρανσης στους 56°C και επώαση για 60 λεπτά.
- xiv. Περιδίνηση του σωληναρίου για 10 δευτερόλεπτα (vortex).
- xv. Τοποθέτηση του σωληναρίου στη μονάδα ξήρανσης στους 90°C και επώαση για 60 λεπτά.
- xvi. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να αποκατασταθεί η θερμοκρασία του δείγματος.
- xvii. Φυγοκέντριση για σύντομο χρονικό διάστημα για τη συλλογή του υγρού από το πώμα.
- xviii. Προσθήκη 200μL διαλύματος DNA PBB στο σωληνάριο. Ανάμιξη εκτελώντας αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα 3 φορές.
- xix. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- xx. Προσθήκη 100μL διαλύματος ισοπροπανόλης. Ανάμιξη εκτελώντας αναρρόφηση και έγχυση με πιπέτα 3 φορές.
- xxi. Μεταφορά του περιεχομένου στην επισημασμένη μονάδα FT/CT.
- xxii. Φυγοκέντριση της μονάδας FT/CT για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xxiii. Τοποθέτηση του FT πάνω σε νέο CT. Απόρριψη του υγρού από το παλιό CT σε χημικά απόβλητα.
- xxiv. Προσθήκη 500μL διαλύματος πλύσης WB I στο FT.
- xxv. Φυγοκέντριση της μονάδας FT/CT για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xxvi. Απόρριψη του υγρού σε χημικά απόβλητα και τοποθέτηση του FT ξανά στο ίδιο CT.
- xxvii. Προσθήκη 500μL WB II στο FT.
- xxviii. Φυγοκέντριση της μονάδας FT/CT για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xxix. Απόρριψη του υγρού σε χημικά απόβλητα και τοποθέτηση του FT σε καινούριο CT.
- xxx. Φυγοκέντριση της μονάδας FT/CT για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.

- xxxι. Τοποθέτηση του FT σε επισημασμένο σωληνάριο έκλουσης (σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 1,5mL). Απόρριψη του υγρού από το CT σε χημικά απόβλητα.
- xxxιι. Προσθήκη 100μL διαλύματος έκλουσης DNA EB στο κέντρο της μεμβράνης FT.
- xxxιιι. Επώαση του FT με σωληνάριο έκλουσης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- xxxiv. Φυγοκέντριση του FT με σωληνάριο έκλουσης για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στο σωληνάριο έκλουσης.
- xxxv. Επανατοποθέτηση του υγρού στο κέντρο της μεμβράνης.
- xxxvi. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- xxxvii. Φυγοκέντριση του FT με σωληνάριο έκλουσης για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές ώστε να συγκεντρωθεί το υγρό στο σωληνάριο έκλουσης.
- xxxviii. Κατάλληλη απόρριψη του FT.
- xxxix. Το σωληνάριο έκλουσης περιέχει το γενωμικό DNA.



Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της μεθοδολογίας απομόνωσης γενωμικού DNA. Πηγή: GeneDirex.com

2.4.2 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός DNA

2.4.2.1 Φωτομέτρηση



Εικόνα 34: Φωτόμετρο τύπου Nanodrop του εργαστηρίου.

Με τη φωτομέτρηση του DNA υπολογίζεται η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων βάσει της ιδιότητας τους να απορροφούν ακτινοβολία μήκους 260nm. Στο φωτόμετρο μετράται η οπτική πυκνότητα (OD) του διαλύματος DNA σε μήκη κύματος 260nm και 280nm. Το όργανο ελέγχεται από λογισμικό που βασίζεται σε υπολογιστή.

Η καθαρότητα εκτιμάται από το λόγο OD_{260}/OD_{280} , καθώς η απορρόφηση στα 260nm αντιστοιχεί στο νουκλεϊκό οξύ που περιέχεται στο διάλυμα, ενώ η απορρόφηση στα 280nm αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες και άλλες προσμίξεις που έχουν παραμείνει στο διάλυμα. Οι τιμές του λόγου αυτού πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1.7-1.9, ώστε να υποδηλώνουν επαρκώς καθαρό DNA. Τιμές μικρότερες του 1.7 υποδηλώνουν πρόσμιξη με φαινόλη ή πρωτεΐνες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 1.9 πρόσμιξη με άλλα μακρομόρια.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

- i. Εκκίνηση του λογισμικού με διπλό κλικ στο εικονίδιο του φωτομέτρου στην οθόνη του υπολογιστή και επιλογή της εφαρμογής του λογισμικού από τη δεξιά στήλη.
- ii. Επιλογή "Add to report" πριν από την αρχική μέτρηση για την αποθήκευση δεδομένων στο βιβλίο εργασίας.
- iii. Τοποθέτηση 5μL δις απεσταγμένου νερού στην υποδοχή του φωτομέτρου και κλείσιμο του βραχίονα.

- iv. Καθαρισμός της υποδοχής του φωτόμετρου από το δις απεσταγμένο νερό
- v. Επανάληψη των βημάτων iii. και iv. για 3 φορές.
- vi. Πιπετάρισμα και τοποθέτηση 1,5μL διαλύματος έκλουσης EB στην υποδοχή, κλείσιμο του βραχίονα και επιλογή της ένδειξης "Blank" στο επάνω μέρος της οθόνης.
- vii. Καθαρισμός της υποδοχής του φωτομέτρου χρησιμοποιώντας ένα στεγνό πανάκι.
- viii. Πιπετάρισμα και τοποθέτηση 1,5μL δείγματος και επιλογή της ένδειξης "Measure" στο επάνω αριστερό μέρος της οθόνης.
- ix. Μετά τη μέτρηση, καθαρισμός της υποδοχής χρησιμοποιώντας ένα στεγνό πανάκι.
- x. Επανάληψη των βημάτων iii. έως v.
- xi. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα κλείνουμε το λογισμικό πρόγραμμα.

2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων

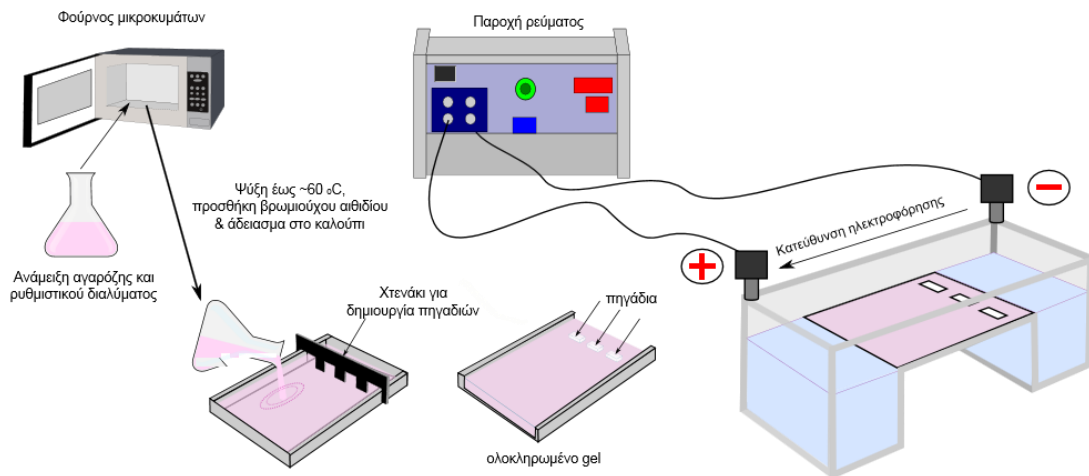
Ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των DNA δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, για τον έλεγχο της ακεραιότητας των δειγμάτων και την εκτίμησή τους με έκθεση του πηκτώματος αγαρόζης σε υπεριώδες φως (UV).

2.4.2.3 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- i. Μέτρηση 6 γραμμαρίων αγαρόζης σε ζυγό ακριβείας και μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη.
- ii. Προσθήκη 300ml ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE (Tris- Boric Edta) 1x και ανάδευση.
- iii. Τοποθέτηση της ογκομετρικής φιάλης σε φούρνο μικροκυμάτων και θέρμανση του μίγματος έως ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές το διάλυμα (\approx 7 λεπτά).

- iv. Προσθήκη 0,5μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου στο μείγμα. Η ένωση αυτή εισχωρεί στις βάσεις του DNA (γνωστός μεταλλαξιογόνος παράγοντας) και φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός (UV).
- v. Ανάδευση του μίγματος και τοποθέτηση του περιεχομένου σε κατάλληλο εκμαγείο στο οποίο έχουμε προσαρμόσει κατάλληλα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα βοηθία-πηγαδάκια για τη φόρτωση των δειγμάτων.
- vi. Παραμονή σε ανοιχτό απαγωγό έως ότου να πολυμεριστεί η αγαρόζη και να δημιουργηθεί το πήκτωμα.
- vii. Αφαίρεση του πηκτώματος από το εκμαγείο και αποθήκευσή του στο ψυγείο, μέσα σε μεμβράνη, ώστε να μην αφυδατωθεί και καλυμμένο εξωτερικά από αλουμινόχαρτο καθώς το βρωμιούχο αιθίδιο είναι φωτοευαίσθητο.



Εικόνα 35: Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση DNA. Πηγή: Γιαννακούρης, Ν., Νικολιουδάκης, Ν. 2015.

2.4.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Αναμιγνύουμε 10μL δείγματος που περιέχει το γενωμικό DNA με 7μL χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης είναι ορατή στο φυσικό φως, επομένως βοηθά στην παρακολούθηση των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση. Η χρωστική περιέχει επίσης γλυκερόλη, η οποία προσδίδει μεγαλύτερη πυκνότητα στο μίγμα και με τον τρόπο αυτό εμποδίζει τη διάχυση του διαλύματος του DNA.

Στη συνέχεια φορτώνουμε το μίγμα δείγματος-χρωστικής στο πήκτωμα αγαρόζης που έχει προηγουμένως τοποθετήσει στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης. Ταυτόχρονα με τα δείγματα φορτώνουμε και έναν μάρτυρα γνωστών ζωνώσεων και μοριακού βάρους (Ladder), προκειμένου να εκτιμήσουμε το μέγεθος των ηλεκτροφορούμενων δειγμάτων.

Η μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται προς την άνοδο (+) λόγω του αρνητικού φορτίου του DNA που του προσδίδουν οι φωσφορικές του ομάδες. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται στη συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) η οποία είναι συνδεδεμένη με σύστημα οπτικοποίησης μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή. Η εικόνα αποθηκεύεται και στη συνέχεια γίνεται η αξιολόγηση των ζωνών των δειγμάτων, προκειμένου να ελέγξουμε την ποιότητα του γενωμικού DNA που απομονώσαμε.

2.4.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

2.4.3.1 Αρχή λειτουργίας

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία εξαιρετικά ευαίσθητη *in vitro* μέθοδος που επιτρέπει τη σύνθεση μεγάλου αριθμού αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε μικρό χρονικό διάστημα, με σκοπό την περαιτέρω διερεύνησή του.

Η αντίδραση PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, που οριοθετείται δεξιά και αριστερά από δύο εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτίδια μήκους 18-24 νουκλεοτιδίων με αλληλουχίες συμπληρωματικές ως προς τη μία από τις δύο αλυσίδες του DNA.

Η PCR πραγματοποιεί συνήθως 30 έως 40 επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών σταδίων που περιλαμβάνουν:

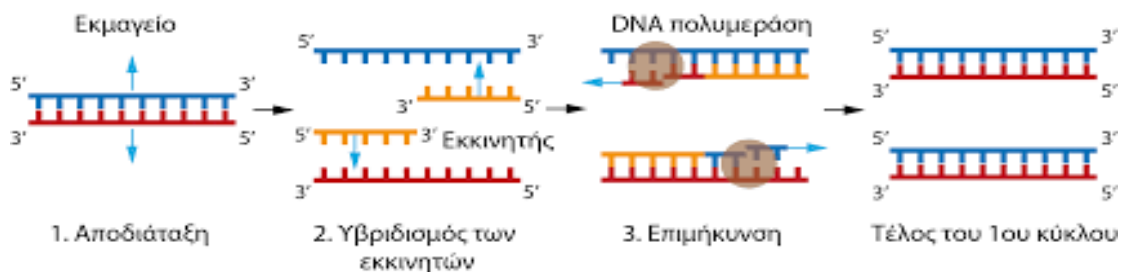
1. Την **αποδιάταξη** (denaturation) του εκμαγείου-DNA, στάδιο κατά το οποίο οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με θέρμανση. Συνήθεις συνθήκες: 94-96°C και 30-60 δευτερόλεπτα.

2. Τον **υβριδισμό** των εκκινητών (annealing), στάδιο κατά το οποίο οι εκκινητές υβριδοποιούνται ως προς στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA. Συνήθεις συνθήκες: 55-65°C και 30-60 δευτερόλεπτα.
3. Την **επιμήκυνση** (extension), στάδιο κατά το οποίο οι εκκινητές επιμηκώνονται με βάση τη συμπληρωματική τους αλληλουχία χρησιμοποιώντας το ένζυμο DNA πολυμεράση και dNTPs (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια). Συνθήκες: 72°C, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης για την πολυμεράση, για 60 περίπου δευτερόλεπτα.

Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή, καθώς η θερμαινόμενη πλάκα που έχει μπορεί να εναλλάσσει τις επιθυμητές και προγραμματισμένες θερμοκρασίες σε κάθε στάδιο με ταχύτητα και ακρίβεια [116-119].



Εικόνα 36: Αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής τύπου Eppendorf του εργαστηρίου.



Εικόνα 37: Τα στάδια της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης PCR. Πηγή: Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε., Παπανικολάου Γ. Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου. Κεφ. 7, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.

2.4.3.2 Πρωτόκολλο PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιείται *in vitro* σε σωληνάρια τύπου Eppendorf, στα οποία προστίθεται το κατάλληλο μίγμα αντιδραστηρίων που θα επιτρέψει την διεξαγωγή της αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήσαμε απεικονίζονται παρακάτω με τη σειρά που προστέθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης:

- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης Buffer B2, το οποίο ρυθμίζει το pH και το επίπεδο των αλάτων της αντίδρασης.
- ✓ Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$), το οποίο δημιουργεί διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, την αλυσίδα DNA και τους εκκινητές.
- ✓ Δεοξυ-νουκλεοτίδια dNTPs, ένα ισομοριακό μείγμα τεσσάρων νουκλεοτιδίων (ATP, TTP, CTP και GTP) που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των νέων κλώνων.
- ✓ Εκκινητές (primers), οι οποίοι είναι ολιγονουκλεοτίδια συγκεκριμένης αλληλουχίας, συμπληρωματικής ως προς την αλληλουχία στόχο, που οριοθετούν την αλληλουχία του γενωμικού DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.
- ✓ DNA πολυμεράση, το ένζυμο που συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$.

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου Eppendorf προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα δις απεσταγμένου νερού, συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος (γενωμικό DNA) και το προαναφερόμενο μίγμα (mix) με τελικό όγκο τα 50μL. Ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στον θερμικό κυκλοποιητή και ο προγραμματισμός των συνθηκών εκτέλεσης της PCR αντίδρασης.

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Master Cycler τύπου Eppendorf, χρησιμοποιώντας το ένζυμο Hot firepol DNA polymerase, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (σε μL)
10x Buffer B2	5
25mMgCl ₂	2
dNTPs 40 mM	2
10pM primer A1F	2
10pM primer A1R	2
Hot firepol DNA polymerase	0,4
Δις απεσταγμένο νερό	X (έως τελικός όγκος 50 μL)
Δείγμα (DNA)	~ 5-8

Πίνακας 3. Προετοιμασία μίγματος αντιδραστηρίων για την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 5 του *ESR1* γονιδίου.

Αντιδραστήρια	Όγκος ανά αντίδραση (σε μL)
10x Buffer B2	5
25mMgCl ₂	2
dNTPs	2
10pM primer B1F	1
10pM primer B1R	3
Hot firepol DNA polymerase	0,4
Δις απεσταγμένο νερό	X (έως τελικός όγκος 50 μL)
Δείγμα (DNA)	~ 5-8

Πίνακας 4. Προετοιμασία μίγματος αντιδραστηρίων για την ενίσχυση τμήματος του εξονίου 8 του *ESR1* γονιδίου.

Οι συνθήκες διεξαγωγής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι:

Στάδια	Θερμοκρασία	Χρόνος (σε λεπτά)	Κύκλοι
Αρχική ενεργοποίηση	95°C	12	1
Αποδιάταξη	95°C	1	35
Υβριδοποίηση	60°C	1	
Επιμήκυνση	72°C	1	
Τελική επιμήκυνση	72°C	10	1
Διατήρηση	4°C	∞	-

Πίνακας 5. Συνθήκες διεξαγωγής της PCR αντίδρασης για τα εξόνια 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών *ESR1A1F*, *ESR1A1R*, *ESR1B1F* και *ESR1B1R*, που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των εξονίων 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου απεικονίζονται παρακάτω:

ESRI γονίδιο, εξόνιο 5	
ESR1A1F: 5'	TTGCTTGTTTTTCAGGCTTTGTGGA 3'
ESR1A1R: 5'	AGCGCCAGACGAGACCAATCAT 3'

Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	Product length
24	62.13	41.67	3.00	0.00	101
22	64.32	54.55	4.00	3.00	

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξονίου 5 του *ESRI* γονιδίου.

ESRI γονίδιο, εξόνιο 8	
ESR1B1F: 5'	ACAGCATGAAGTGCAAGAACGT 3'
ESR1B1R: 5'	TGGCTTTGGTCCGTCCTCCTC 3'

Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	Product length
22	61.32	45.45	4.00	4.00	124
20	61.83	60.00	3.00	0.00	

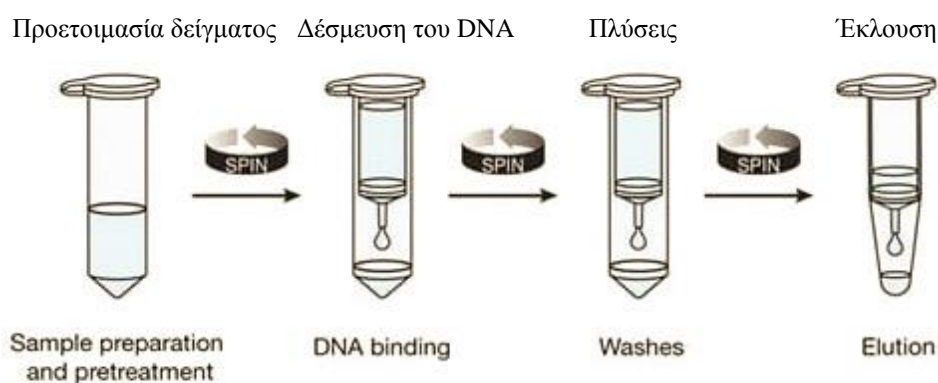
Πίνακας 7. Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του εξονίου 8 του *ESRI* γονιδίου.

2.4.4 Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Με την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης, τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης που θα επιτρέψει να ελέγξουμε εάν η ενίσχυση ήταν επιτυχής και έδωσε το επιθυμητό σε μέγεθος προϊόν. Στη συνέχεια, τα δείγματα που έχουν ενισχυθεί επιτυχώς πρέπει να καθαρισθούν από υπολείμματα και προσμίξεις προκειμένου να

ακολουθήσει η αλληλουχισή τους. Χρησιμοποιήθηκε το PureLink™ PCR Purification Kit της εταιρείας Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific και το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε παρατίθεται στη συνέχεια:

- i. Προσθήκη 160μL Binding Buffer B2 στο σωληνάριο του δείγματος.
- ii. Καλή ανάμειξη με την πιπέτα.
- iii. Μεταφορά του περιεχομένου μίγματος στην επισημασμένη στήλη.
- iv. Φυγοκέντριση 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- v. Προσθήκη 650μL διαλύματος πλύσης Wash Buffer I.
- vi. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου ($\approx 25^{\circ}\text{C}$).
- vii. Φυγοκέντριση 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- viii. Απόρριψη του εκλούμενου υγρού.
- ix. Τοποθέτηση της στήλης στο ίδιο σωληνάριο.
- x. Φυγοκέντριση 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xi. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο.
- xii. Προσθήκη 30μL δις απεσταγμένου νερού στο κέντρο της μεμβράνης.
- xiii. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($\approx 25^{\circ}\text{C}$).
- xiv. Φυγοκέντριση 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xv. Επανατοποθέτηση του υγρού στο κέντρο της μεμβράνης.
- xvi. Επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($\approx 25^{\circ}\text{C}$).
- xvii. Φυγοκέντριση 2 λεπτά στις 14.000 στροφές.
- xviii. Απόρριψη της στήλης.
- xix. Αποθήκευση του δείγματος.



Εικόνα 38: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων καθαρισμού των PCR προϊόντων.
Πηγή: ThermoFisher Scientific.

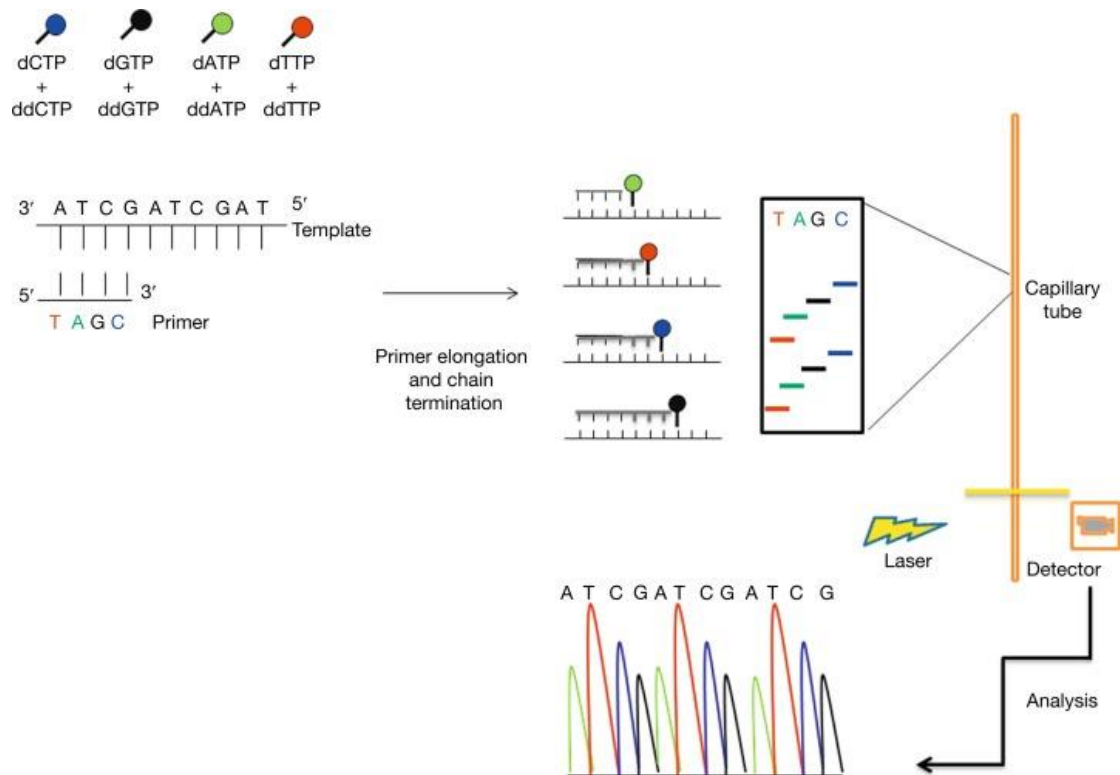
2.4.5 Αλληλούχιση DNA (Sanger Sequencing)

Η αλληλούχιση κατά Sanger αποτελεί μία στοχευμένη μέθοδο αλληλούχισης, η οποία χρησιμοποιεί κατάλληλους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για την ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας των υπό εξέταση τμημάτων. Μπορεί να ταυτοποιήσει την παρουσία γνωστών και άγνωστων μεταλλάξεων στις περιοχές που αναλύονται.

Η αλληλούχιση κατά Sanger αρχίζει με την μετουσίωση του δίκλωνου μορίου DNA. Το μονόκλωνο DNA που προκύπτει υβριδοποιείται στη συνέχεια με τους συμπληρωματικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές και επιμηκώνεται χρησιμοποιώντας ένα μίγμα τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs). Επιπλέον, προστίθεται και μία ποσότητα τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων που τερματίζουν την αλυσίδα (ddNTPs). Η αλληλουχία συνεχίζει να συντίθεται έως ότου προσαρτηθεί ένα ddNTP.

Η σύγχρονη αλληλούχιση τύπου Sanger χρησιμοποιεί ddNTPs σημασμένα με φθορισμό, η ανίχνευση των οποίων επιτυγχάνεται με τη χρήση λέιζερ, μετά από τριχοειδική ηλεκτροφόρηση. Η ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του δείγματος γίνεται με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα το οποίο παράγει ένα χρωματογράφημα αλληλούχισης με κορυφές φθορισμού.

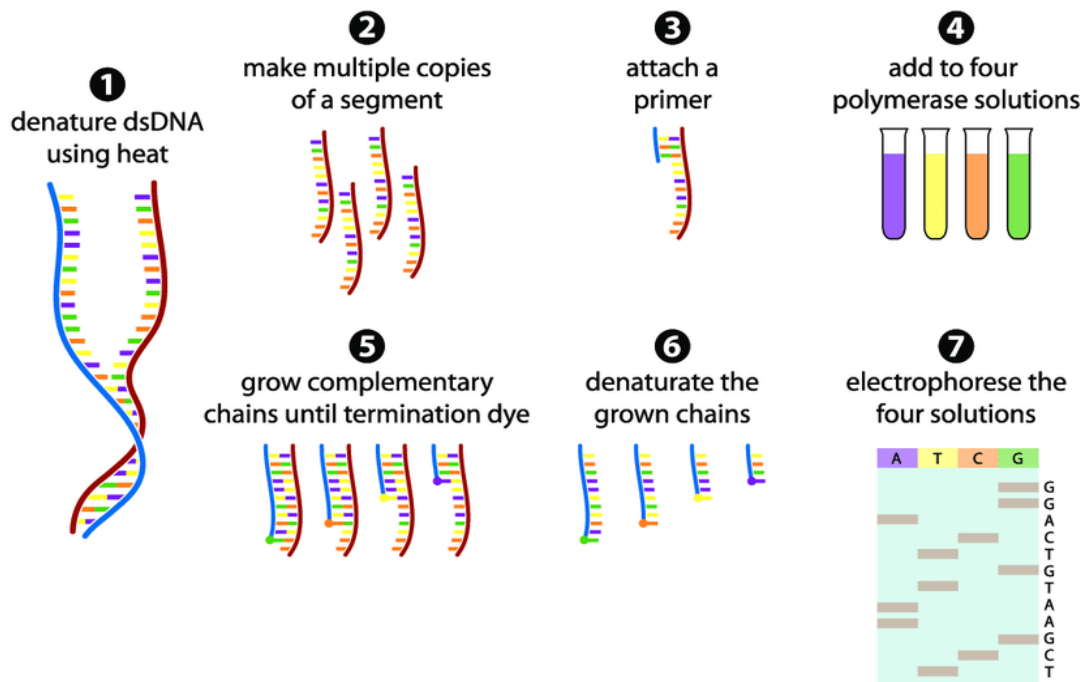
Κάθε φθορισμόχρωμα αντιστοιχεί σε ένα από τα τέσσερα σημασμένα με φθορισμό νουκλεοτίδια. Συγκεκριμένα, το νουκλεοτίδιο που φέρει την αζωτούχο βάση Αδενίνη (A) σημαίνεται με πράσινο φθορισμόχρωμα, η αζωτούχος βάση Θυμίνη (T) σημαίνεται με κόκκινο φθορισμόχρωμα, η αζωτούχος βάση Γουανίνη (G) σημαίνεται με μαύρο φθορισμόχρωμα και η αζωτούχος βάση Κυτοσίνη (C) σημαίνεται με μπλε φθορισμόχρωμα. Η εκτίμηση της πρωτοταγούς αλληλουχίας επιτυγχάνεται μέσω της σύγκρισης με την πρωτοταγή αλληλουχία του φυσιολογικού αλληλομόρφου γονιδίου που είναι καταχωρημένο σε διεθνείς βάσεις δεδομένων [120-124].



Εικόνα 39: Η μέθοδος της αλληλούχησης κατά Sanger. Πηγή: Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry. Somatic Mosaicism and Neurological Diseases, 2016.

Συνοπτικά, τα στάδια που ακολουθούνται για την αλληλούχηση κατά Sanger είναι τα ακόλουθα:

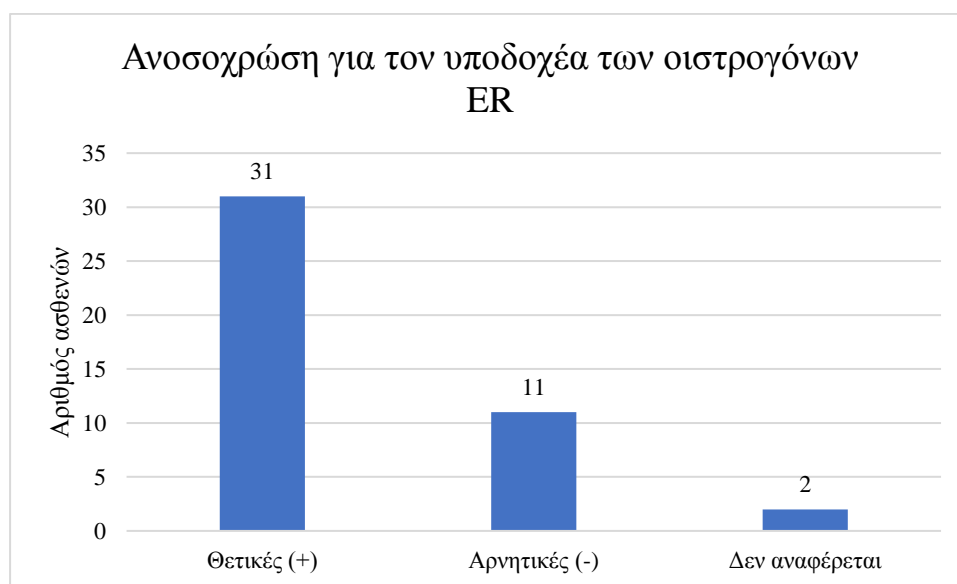
1. Το δίκλωνο μόριο DNA μετουσιώνεται και μετατρέπεται σε δύο μονόκλιωνα μόρια DNA.
2. Ένα τμήμα του μονόκλωνου DNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα.
3. Συνδέεται με κατάλληλο εκκινητή στο ένα του άκρο.
4. Τα θραύσματα προστίθενται σε τέσσερα διαλύματα πολυμεράσης. Κάθε διάλυμα περιέχει τους τέσσερις τύπους βάσεων αλλά μόνο έναν τύπο νουκλεοτιδίου τερματισμού ddNTP σημασμένου με φθοριόχρωμα.
5. Η αλυσίδα επιμηκώνεται μέχρι να προστεθεί τυχαία ένα ddNTP.
6. Τα δίκλιωνα μόρια του DNA που προκύπτουν μετουσιώνονται, ώστε να ληφθεί ένα σύνολο μονόκλωνων μορίων DNA ποικίλου μήκους.
7. Τα θραύσματα διαχωρίζονται με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση και αναλύεται η αλληλουχία.



Εικόνα 40: Η μέθοδος αλληλούχιση κατά Sanger σε 7 στάδια. Πηγή: The Sanger sequencing method in 7 steps. Michel G. Gauthier. (2007)

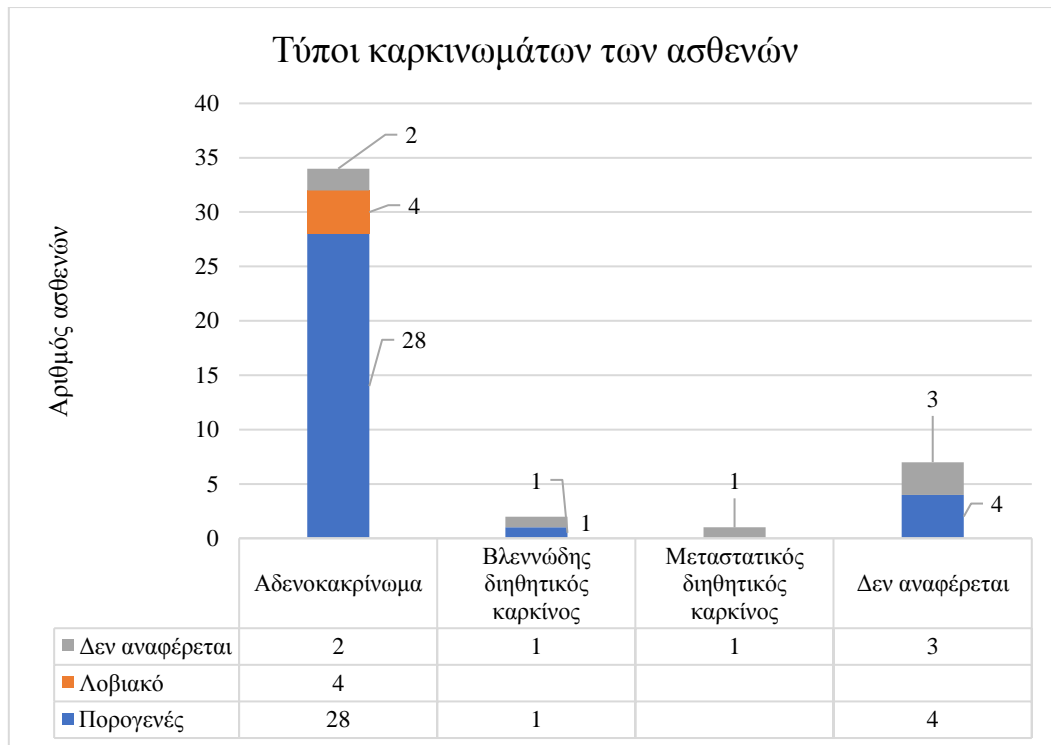
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν συνολικά 44 γυναίκες με καρκίνο του μαστού με μέσο όρο ηλικίας τα $64,8 \pm 15$ έτη και εύρος από τα 26 έως τα 88 έτη. Θετική ανοσοέκφραση για τον υποδοχέα οιστρογόνων καταγράφεται σε 31/44 γυναίκες (70.5%), ενώ σε 11/44 γυναίκες δεν σημειώνεται έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (25.0%). Σε 2/44 γυναίκες δεν αναφέρεται στην ιστολογική έκθεση (4.5%).



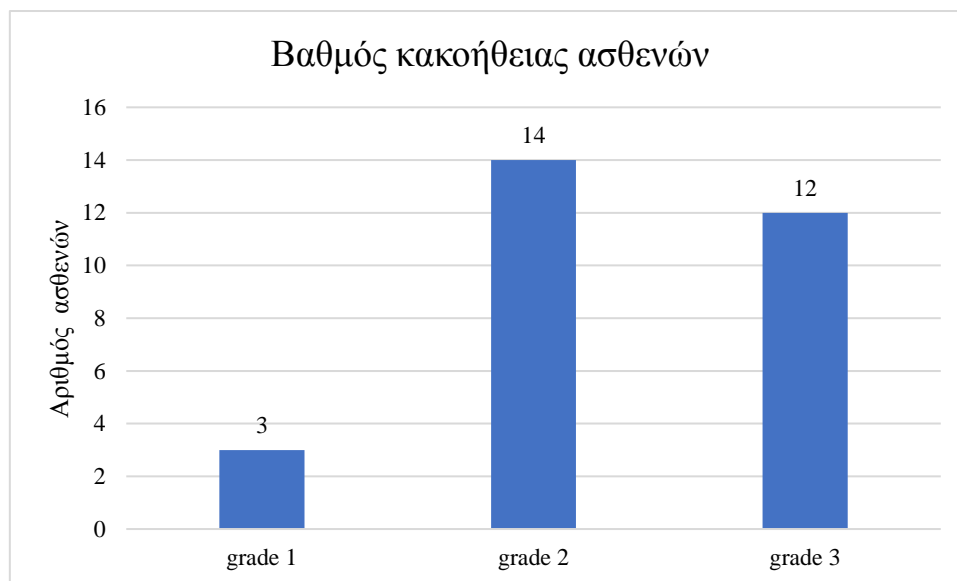
Γράφημα 1. Απεικόνιση της παρουσίας ή απουσίας έκφρασης του ER υποδοχέα στους ασθενείς της μελέτης μας. Σημειώνονται οι αριθμοί των γυναικών που είναι ER+, ER-. Σε δύο άτομα δεν αναφέρονται οι σχετικές πληροφορίες στην ιστολογική έκθεση.

Σχετικά με τους υπότυπους των καρκινωμάτων των ασθενών, 34/44 (77.3%) ασθενείς είχαν διάγνωση αδενοκαρκινώματος, 2/44 (4.5%) ασθενείς διαγνώστηκαν με βλεννώδη διηθητικό καρκίνο, 1/44 (2.3%) ασθενής είχε μεταστατικό διηθητικό καρκίνο και για 7/44 (15.9%) ασθενείς δεν αναφέρεται ο κύριος καρκινικός τύπος. Μεταξύ των ασθενών που διαγνώστηκαν με αδενοκαρκίνωμα, 28/34 (82.4%) ασθενείς διαγνώστηκαν με τον πορογενή υπότυπο, 4/34 (11.8%) ασθενείς διαγνώστηκαν με το λοβιακό υπότυπο, ενώ σε 2/34 (5.8%) ασθενείς δε αναφέρεται συγκεκριμένος υπότυπος. Στους 7 ασθενείς που δεν αναφέρεται ο κύριος τύπος του καρκίνου η πλειοψηφία αυτών (4/7, 57.1%) έχουν πορογενές καρκίνωμα.



Γράφημα 2. Κύριοι τύποι καρκινωμάτων των ασθενών της μελέτης.

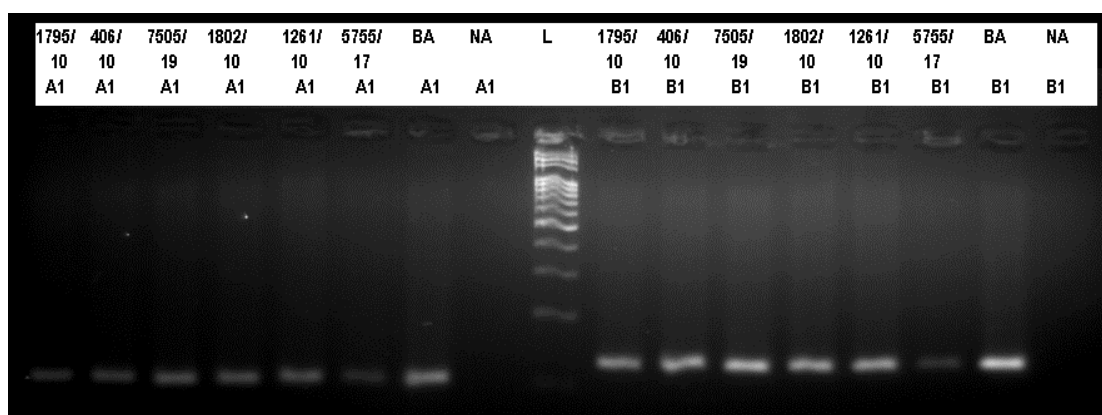
Στα δείγματα που μελετήσαμε, ο βαθμός κακοηθείας (grade) κυμαίνεται από το 1 έως το 3. Σε 15/44 ασθενείς (34.1%) δεν αναγράφεται ο βαθμός κακοηθείας. Στις υπόλοιπες 29 ασθενείς, 3/29 (10.3%) ασθενείς έχουν grade 1, 14/29 (48.3%) ασθενείς έχουν grade 2 και οι 12/29 (41.4%) γυναίκες έχουν grade 3.



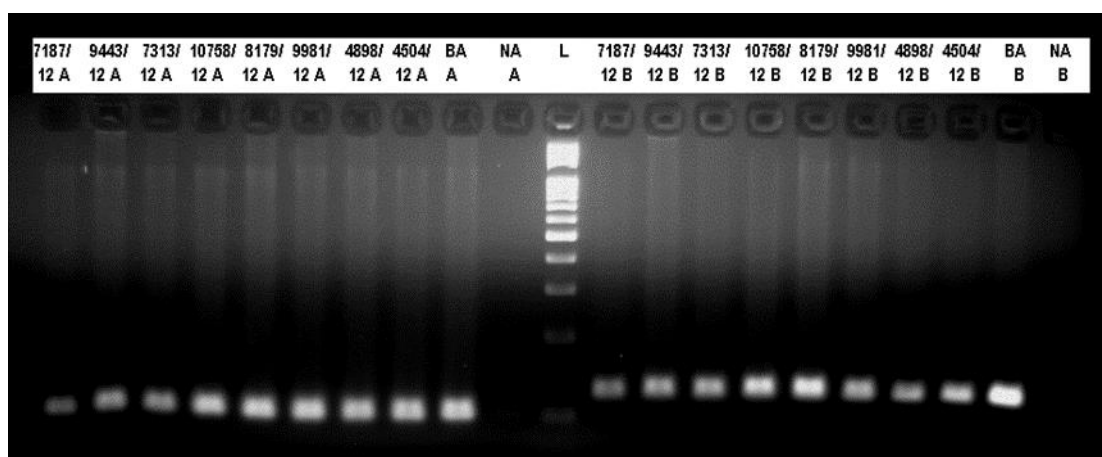
Γράφημα 3. Απεικόνιση των βαθμών κακοηθείας των ασθενών της μελέτης μας.

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από κύβους παραφίνης των ασθενών με σκοπό την αναζήτηση μεταλλάξεων στο γονίδιο *ESR1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα οιστρογόνων. Ελέγχθηκαν συγκεκριμένα τα εξόνια 5 και 8, στα οποία σημειώνονται οι συχνότερες μεταλλάξεις στη βιβλιογραφία. Για το λόγο αυτό, έγινε επιλεκτική ανίχνευση των εξεταζόμενων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τα ενισχυμένα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν και ακολούθησε ο καθαρισμός τους. Στη συνέχεια διεξήχθη η ανάλυση της πρωτοταγούς τους αλληλουχίας με αλληλούχιση κατά Sanger. Τα μεγέθη των γονιδιακών τμημάτων που ενισχύθηκαν για τα εξόνια 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου είναι 101 ζ.β. και 124 ζ.β. αντίστοιχα.

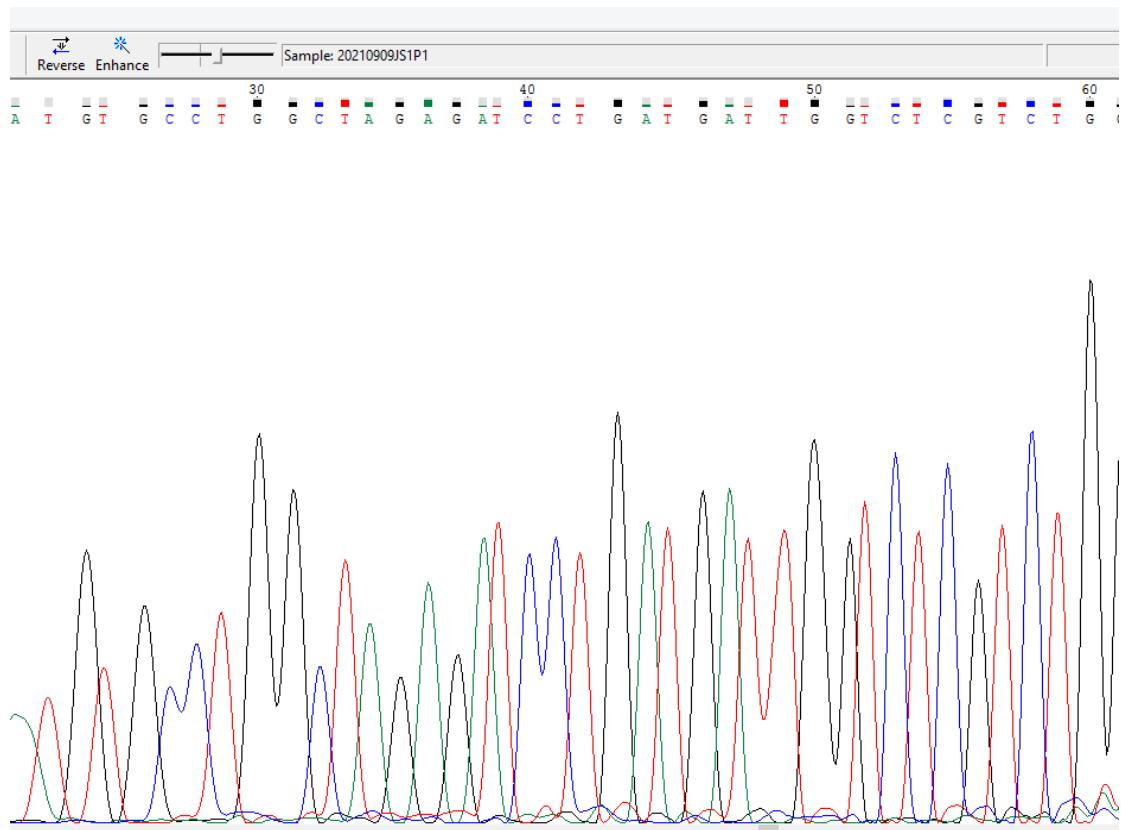
Στη συνέχεια παρατίθενται ενδεικτικές εικόνες ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων PCR προϊόντων για το κάθε εξόνιο, καθώς επίσης και χρωματογραφήματα από την αλληλούχιση Sanger.



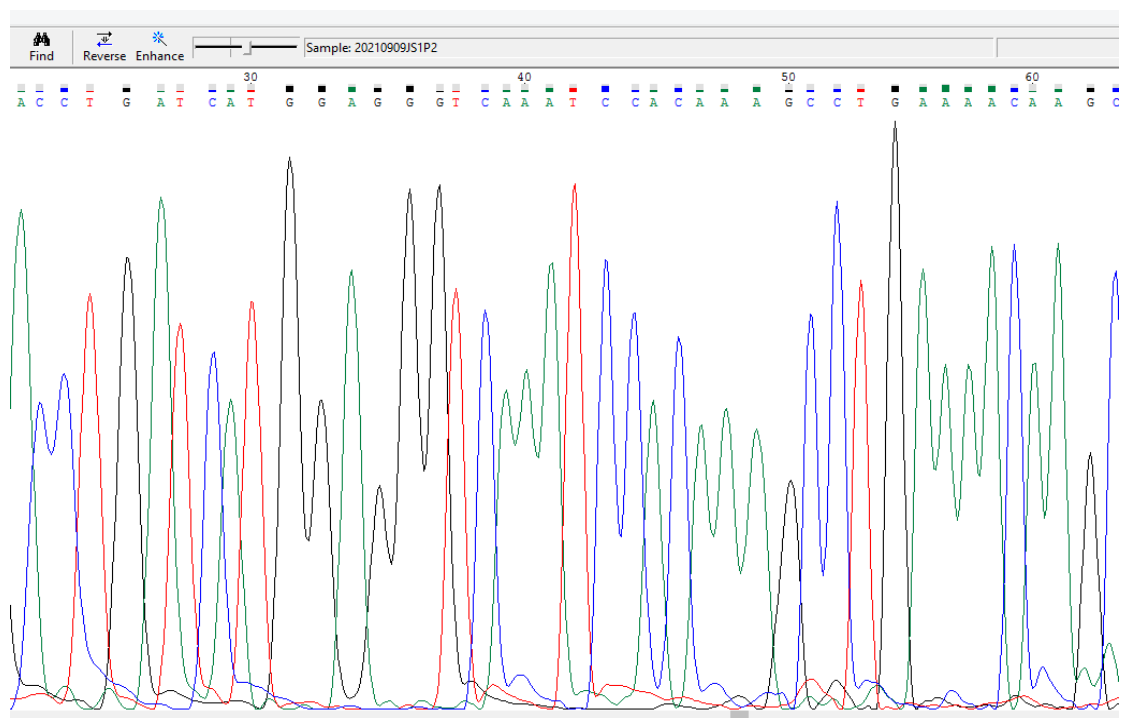
Εικόνα 41. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για τα εξόνια 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου, μήκους 101ζ.β. για το εξόνιο 5 (A) και 124 ζ.β. για το εξόνιο 8 (B). BA: θετικός μάρτυρας. NA: αρνητικός μάρτυρας. L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους.



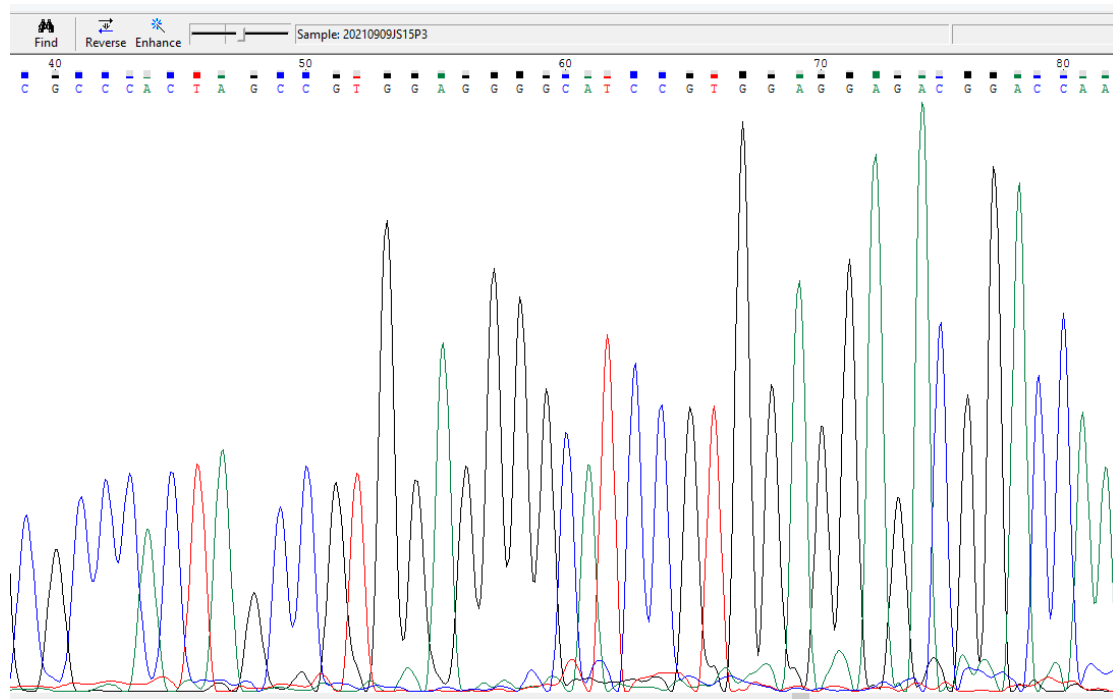
Εικόνα 42. Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων για τα εξόνια 5 και 8 του *ESR1* γονιδίου, μήκους 101ζ.β. για το εξόνιο 5 (A) και 124 ζ.β. για το εξόνιο 8 (B). BA: θετικός μάρτυρας. NA: αρνητικός μάρτυρας. L: 100bp μάρτυρας γνωστού μεγέθους.



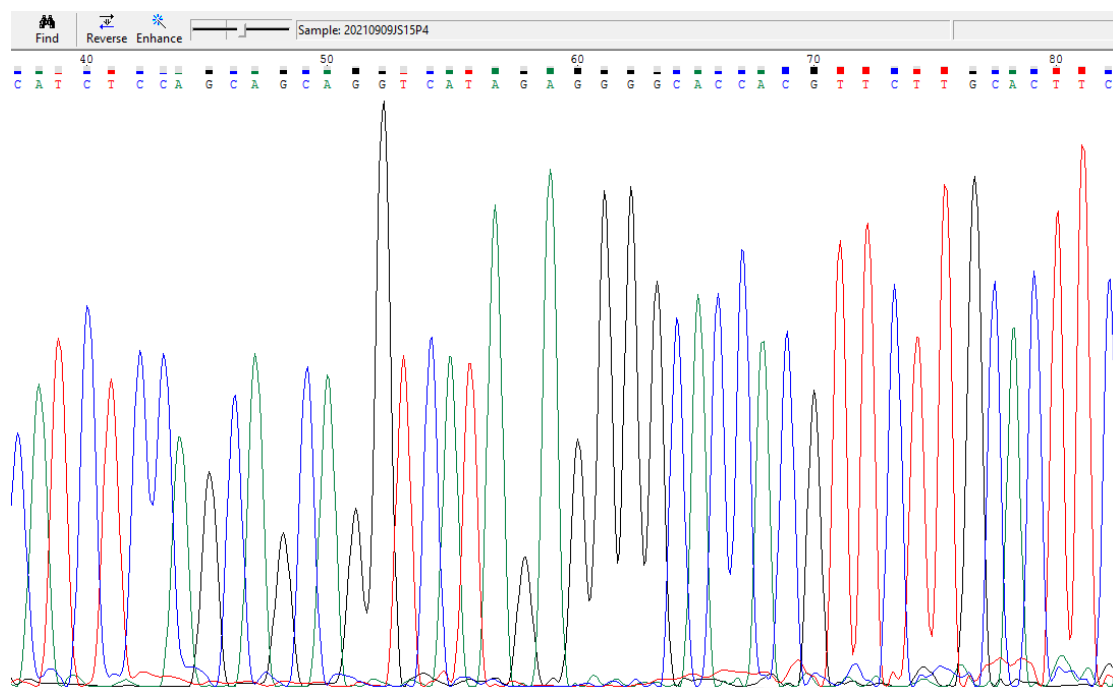
Εικόνα 43: Αλληλούχιση δείγματος με Sanger αλληλούχιση. Το συγκεκριμένο δείγμα φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία για το εξόνιο 5. Χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής ESR1A1F



Εικόνα 44: Αλληλούχιση δείγματος με Sanger αλληλούχιση. Το συγκεκριμένο δείγμα φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία για το εξόνιο 5. Χρησιμοποιήθηκε ο ανάστροφος εκκινητής ESR1A1R.



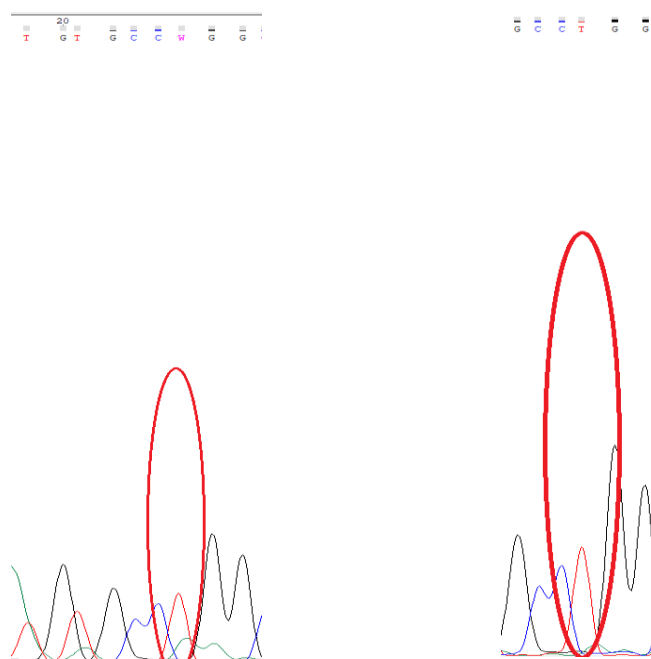
Εικόνα 45: Αλληλούχιση δείγματος με Sanger αλληλούχιση. Το συγκεκριμένο δείγμα φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία για το εξόνιο 8. Χρησιμοποιήθηκε ο πρόσθιος εκκινητής ESR1B1F.



Εικόνα 46: Αλληλούχιση δείγματος με Sanger αλληλούχιση. Το συγκεκριμένο δείγμα φέρει τη φυσιολογική αλληλουχία για το εξόνιο 8. Χρησιμοποιήθηκε ο ανάστροφος εκκινητής ESR1B1R.

Η αλληλούχιση των δειγμάτων μας για το εξόνιο 8 του *ESR1* γονιδίου δεν ανέδειξε την παρουσία μεταλλάξεων. Όλοι οι ασθενείς που ελέγχθηκαν έφεραν την φυσιολογική αλληλουχία στο εξόνιο 8. Η ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του εξονίου 5 του *ESR1* γονιδίου ανέδειξε την παρουσία παραλλαγών σε 5/44 (11.4%) ασθενείς.

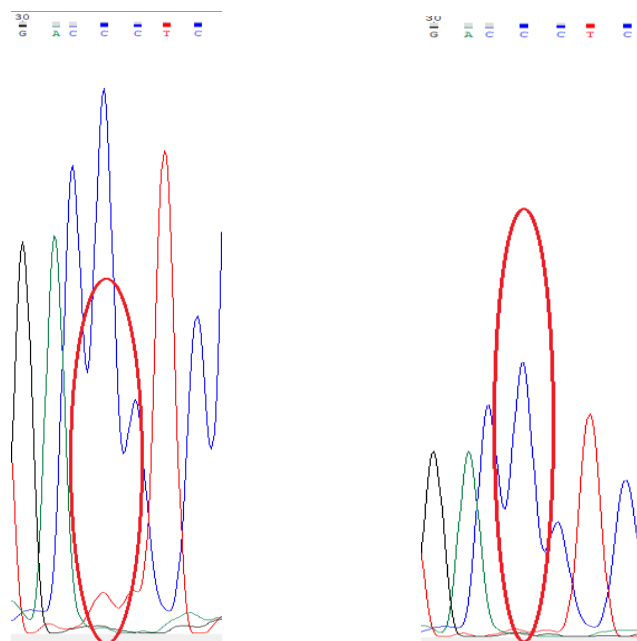
Συγκεκριμένα, η πρώτη παραλλαγή που ανιχνεύθηκε, αφορά στη νουκλεοτιδική θέση c.1147T>A (NM_001122742.1, c.1147T>A), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.383W>R. Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης θυμίνης (T) από την αδενίνη (A) στη θέση 1147, η οποία οδηγεί στην αμινοξική αντικατάσταση της τρυπτοφάνης (W) από την αργινίνη (R). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει καταγραφεί προηγουμένως στη βάση COSMIC και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=ESR1>)



Εικόνα 47. Ανίχνευση της παραλλαγής c.1147T>A (NM_001122742.1, c.1147T>A), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.383W>R στο εξόνιο 5, σε ασθενή της μελέτης. Αριστερά, η θέση της παραλλαγής και δεξιά η φυσιολογική αλληλουχία.

Η ασθενής στην οποία καταγράφεται η συγκεκριμένη παραλλαγή έχει πορογενές αδenoκαρκίνωμα του μαστού, βαθμού κακοήθειας 2 και παρουσιάζει έντονη έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων ER. Η ίδια μετάλλαξη ανιχνεύθηκε και σε δεύτερη ασθενή η οποία έχει τα ίδια ακριβώς χαρακτηριστικά.

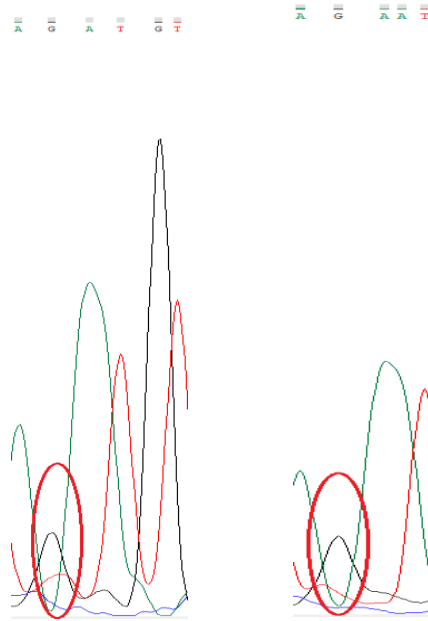
Η δεύτερη παραλλαγή που προσδιορίσαμε σε ασθενή αφορά στη θέση c.1113 του εξονίου 5. Πρόκειται για μία νουκλεοτιδική αντικατάσταση στη θέση c.1113C>T (NM_001122742.1, c.1113C>T), που δεν οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή p.371T>T. Ως εκ τούτου πρόκειται για μία συνώνυμη παραλλαγή και εφόσον προκύπτει το ίδιο αμινοξύ δεν αναμένεται να έχει κάποια δράση στην πρωτεΐνη.



Εικόνα 48. Ανίχνευση της συνώνυμης παραλλαγής c.1113C>T (NM_001122742.1, c.1113C>T), που δεν οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή. Αριστερά, η ανίχνευση της μετάλλαξης και δεξιά, η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει επίσης πορογενές αδενοκαρκίνωμα, βαθμού κακοηθείας 2 και παρουσιάζει έντονη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ER.

Η επόμενη παραλλαγή απαντάται στη θέση που κωδικοποιεί για το αμινοξύ 380 του *ESR1* γονιδίου. Στη θέση αυτή έχουν αναφερθεί συχνά παραλλαγές. Συγκεκριμένα, αφορά στη θέση c.1139G>T (NM_001122742.1, c.1139G>T), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.380E>*. Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης γουανίνη (G) από την θυμίνη (T) στη θέση 1139, η οποία οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό (*). Η συγκεκριμένη αλλαγή δεν αναφέρεται στη βάση COSMIC. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη θέση, έχουν καταγραφεί 7 διαφορετικές παραλλαγές που κωδικοποιούν για το αμινοξύ στη θέση 380 (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=178378632>), όπως και η επίσημα καταγεγραμμένη μετάλλαξη E380Q (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=126218946>).



Εικόνα 49. Ανίχνευση της μετάλλαξης c.1139G>T (NM_001122742.1, c.1139G>T), που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.380E* στο εξόνιο 5, σε ασθενή της μελέτης και προκαλεί πρόωρο τερματισμό. Αριστερά, η ανίχνευση της μετάλλαξης και δεξιά, η φυσιολογική αλληλουχία.

Η συγκεκριμένη ασθενής έχει επίσης πορογενές αδenoκαρκίνωμα, βαθμού κακοήθειας 2 και με έντονη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ER.

Τέλος, στο εξόνιο 5 του *ESR1* γονιδίου. Πρόκειται για τη θέση c.1114 του εξονίου 5. Συγκεκριμένα, αφορά σε νουκλεοτιδική αλλαγή στη θέση c.1114C>T (NM_001122742.1, c.1114C>T), που οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή στη θέση 372 (p.372L>P). Πρόκειται για μία αντικατάσταση της βάσης κυτοσίνη (C) από την θυμίνη (T) στη θέση 1114, η οποία οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή της λευκίνης (L) σε προλίνη (P). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν έχει καταγραφεί προηγουμένως στη βάση COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=ESR1>).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες και η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Η συχνότητα εμφάνισης είναι υψηλότερη στον δυτικό κόσμο. Ωστόσο, η θνησιμότητα τα τελευταία χρόνια έχει μειωθεί αρκετά λόγω της έγκαιρης πρόγνωσης και των εξελιγμένων θεραπειών [11,12,13].

Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το φύλο, η φυλή, η ηλικία πρώτης έμμηνης ρύσης, η ηλικία πρώτης τελειόμηνης κύησης και το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Το ίδιο συμβαίνει και με τη χρήση αντισυλληπτικών χαπιών για μεγάλο χρονικό διάστημα, τη θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, την παχυσαρκία, κ.α. [14-35].

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε διηθητικά και μη διηθητικά νεοπλάσματα. Οι κύριοι ιστολογικοί υπότυποι είναι το πορογενές και το λοβιακό καρκίνωμα του μαστού που απαντώνται συχνότερα. Σε μικρότερη συχνότητα απαντώνται το βλεννώδες καρκίνωμα, το σωληνώδες καρκίνωμα, το θηλώδες καρκίνωμα, η νόσος Paget και ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού [38-60].

Ο υποδοχέας οιστρογόνων ER ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και είναι πολύ σημαντικός στην διαδικασία της καρκινογένεσης. Το ανθρώπινο γονίδιο *ERα* (*ESR1*) εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση q24-q27 του χρωμοσώματος 6. Αποτελείται από οκτώ εξόνια που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη 595 αμινοξέων, μήκους 66 kDa [99,100,101].

Περίπου το 70% των καρκίνων του μαστού εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων, καθιστώντας τον ER βασικό θεραπευτικό στόχο. Πολυάριθμες μελέτες αναφέρουν μεταλλάξεις στο *ESR1* γονίδιο και ιδιαίτερα στην LBD περιοχή. Η συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών είναι υψηλότερη στα μεταστατικά καρκινώματα. Οι συχνότερες και καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του *ESR1* γονιδίου εντοπίζονται κυρίως στις αμινοξικές θέσεις 536, 537 και 538 του εξονίου 8 (p.Leu536Arg, p.Tyr537Ser, p.Tyr537Asn, p.Tyr537Cys, and p.Asp538Gly), καθώς και στο εξόνιο 5, η συχνή παραλλαγή E380Q [107-115].

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση μεταλλάξεων του *ESR1* γονιδίου ειδικότερα στα εξόνια 5 και 8, όπως αναφέρονται και στη βιβλιογραφία, και η εκτίμηση του πιθανού τους ρόλου στην έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων ER.

Εξετάσαμε συνολικά 44 γυναίκες με καρκίνο του μαστού και μέσο όρο ηλικίας τα 64.8 ± 15 έτη (εύρος: 26-88 έτη). 31/44 (70.5%) γυναίκες εκφράζουν τον οιστρογονικό υποδοχέα, ενώ σε 11/44 γυναίκες δεν σημειώνεται έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (25.0%). Συλλέξαμε δείγματα των ασθενών της μελέτης και απομονώσαμε γενωμικό DNA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ηλεκτροφόρηση και φωτομέτρηση των δειγμάτων, ώστε να εκτιμηθεί η ποιότητα και η ποσότητά τους. Ακολούθησε η ενίσχυση τμημάτων των εξονίων 5 και 8 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός των δειγμάτων, απαλλαγή από προσμίξεις και αλληλούχιση κατά Sanger.

Η ανάλυση της πρωτοταγούς αλληλουχίας ανέδειξε την εμφάνιση παραλλαγών σε 5/44 (11.4%) ασθενείς, στο εξόνιο 5 του *ESR1* γονιδίου. Η πρώτη παραλλαγή αφορά στη νουκλεοτιδική θέση c.1147T>A (NM_001122742.1, c.1147T>A) και οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.383W>R. Τη συγκεκριμένη παραλλαγή έφεραν δύο ασθενείς με ίδια χαρακτηριστικά, και συγκεκριμένα και οι δύο είχαν πορογενές αδenoκαρκίνωμα, βαθμού κακοηθείας 2 και έντονη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα. Η δεύτερη μετάλλαξη, αφορά μία συνώνυμη μετάλλαξη, στη θέση c.1113C>T (NM_001122742.1, c.1113C>T), που δεν οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή (p.371T=). Η τρίτη παραλλαγή που ανιχνεύθηκε, εντοπίζεται στη νουκλεοτιδική θέση c.1139G>T (NM_001122742.1, c.1139G>T) και οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.380E>*. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη εντοπίζεται στην αμινοξική θέση 380, στην οποία έχουν καταγραφεί οι συχνότερες μεταλλάξεις του *ESR1* γονιδίου και σχετίζονται με την αντίσταση των ασθενών σε ορμονοθεραπεία. Όμοια με τις προηγούμενες ασθενείς, η ασθενής που έφερε τη συγκεκριμένη μετάλλαξη διαγνώστηκε με πορογενές αδenoκαρκίνωμα, βαθμού κακοηθείας 2 και έντονη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα ER. Τέλος, στη θέση c.1114C>T (NM_001122742.1, c.1114C>T), ανιχνεύθηκε μία ακόμη παραλλαγή που οδηγεί στην αμινοξική αλλαγή p.372L>P. Στην συγκεκριμένη ασθενή υπήρχε απουσία έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων. Οι παραλλαγές αυτές δεν έχουν αναφερθεί ξανά στις βάσεις δεδομένων και χρειάζεται να ελεγχθούν περαιτέρω προς επιβεβαίωση.

Σε μία πρόσφατη μελέτη των Peilu Wang et. al. έγινε προσπάθεια ανίχνευσης κάποιας κλινικής συσχέτισης μεταξύ των μεταλλάξεων του εξονίου 8 του *ESR1* γονιδίου και της αντίστασης στην ορμονική θεραπεία. Σε δείγμα 43 πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού, 38 μεταστατικών καρκίνων του εγκεφάλου, 12 μεταστατικών

καρκίνων των οστών και 24 cfDNA εντοπίστηκαν 13 μεταλλάξεις για την D538G, 3 για την Y537S και 1 για την Y537C [114].

Μία ακόμη μελέτη με παρόμοια αποτελέσματα είναι αυτή των Toy W. et. al., οι οποίοι εντόπισαν μεταλλάξεις στις 9 από τις 36 ασθενείς με καρκίνο του μαστού που εμφανίζουν αντίσταση στην ορμονοθεραπεία. Οι μεταλλάξεις αφορούν την LBD περιοχή του ESR1, στο εξόνιο 8 και συγκεκριμένα στις θέσεις 537 και 538. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι 2 από τις 9 ασθενείς είχαν ελεγχθεί για τις μεταλλάξεις αυτές πριν την έναρξη της ορμονοθεραπείας και δε βρέθηκε καμία μετάλλαξη [108].

Οι Robinson D. R. et. al. πραγματοποίησαν μία μελέτη αναζητώντας μεταλλάξεις στο εξόνιο 8 του ESR1 σε 11 ασθενείς με μεταστατικό ER+ καρκίνο του μαστού. Οι 6 ασθενείς είχαν κοινές μεταλλάξεις στα κωδικόνια p.Leu536Gln, p.Tyr537Ser, p.Asp538Gly, p.Tyr537Ser, p.Asp538Gly και p.Tyr537Ser. Σε τρεις από τους ασθενείς αυτούς υπήρχε διαθέσιμο υλικό πριν την έναρξη της ενδοκρινικής θεραπείας. Η ανάλυση του συγκεκριμένου υλικού δεν ανέδειξε την παρουσία μεταλλάξεων πριν τη θεραπεία [107].

Οι Li et. al., σε δείγμα 45 ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ανέδειξαν 8 ασθενείς που έφεραν μεταλλάξεις και ως αποτέλεσμα είχαν αναπτύξει αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Οι μεταλλάξεις που καταγράφηκαν ήταν 5 στο Y537S, 1 στο Y537N, 2 στο D538G, 2 στο E380Q και μερικές σπανιότερες, όπως οι L345SfsX7, 24fs, G344delinsGC. Οι δύο εκ των ασθενών είχαν πολλαπλές μεταλλάξεις, με τον πρώτο να εμφανίζει τις Y537N/Y537S/D538G και τον δεύτερο τις L345SfsX7/24fs/E380Q [125].

Ανάλογη ήταν και η μελέτη των Takeshita et. al. που έδειξαν σημαντική διαφορά, ως προς τη συχνότητα των μεταλλάξεων, μεταξύ πρωτοπαθών και μεταστατικών καρκινωμάτων του μαστού. Συγκεκριμένα σε σύνολο 270 πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού, μόλις 7 (2.6%) εμφάνιζαν μεταλλάξεις στο ESR1 γονίδιο, ενώ σε σύνολο 55 μεταστατικών ER+ καρκίνων του μαστού, μεταλλάξεις στα ίδια κωδικόνια εμφάνιζαν 11/55 ασθενείς (20%). Ενδιαφέρον αποτελεί ότι οι δύο εκ των τεσσάρων ασθενών που είχαν μεταλλάξεις στις αμινοξικές θέσεις 537 και 538, είχαν 2 μεταλλάξεις ταυτόχρονα, ο πρώτος τις Y537N/D538G και ο δεύτερος τις Y537S/Y537C, ενώ άλλοι δύο ασθενείς είχαν 3 μεταλλάξεις ταυτόχρονα τις Y537S/Y537N/D538G [126].

Τέλος, οι Wenzhen Zhu et. al. μελέτησαν σε κινέζικο πληθυσμό με καρκίνο του μαστού τις πιθανές μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων. Σε δείγμα 297 πρωτοπαθών καρκίνων του μαστού (PBC) και 43 μεταστατικών καρκίνων του μαστού

(MBC) ανευρέθηκαν συνολικά 15 *ESR1* παραλλαγές. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό των ασθενών με πρωτοπαθή καρκινώματα που έφεραν *ESR1* μεταλλάξεις κυμάνθηκε στο 1% συγκριτικά με το ποσοστό των ασθενών με μεταστατικά καρκινώματα που έφτασε το 18.6%. Όλες οι μεταλλάξεις εντοπίστηκαν εντός της *LBD* περιοχής του *ESR1* γονιδίου. Οι παραλλαγές D538G, E380Q, και Y537S, βρέθηκαν αποκλειστικά στους ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Επιπρόσθετα, οι 2 MBC ασθενείς εμφάνισαν περισσότερες από μία μεταλλάξεις (D538G και V422 del, E380Q και Y537N). Στη συγκεκριμένη μελέτη αναδεικνύεται και πάλι η απουσία μεταλλάξεων σε δείγματα που ελήφθησαν πριν τη λήψη ορμονοθεραπείας [127].

Η μελέτη της κατανομής των μεταλλάξεων του *ESR1* γονιδίου, του συσχετισμού της έκφρασής του με την αντίσταση των ασθενών στην ορμονοθεραπεία σε διάφορους πληθυσμούς και η αξιολόγηση της κλινικής και διαγνωστικής τους χρησιμότητας αποτελεί κύριο στόχο μεγάλου αριθμού μελετών για τον καρκίνο του μαστού. Στη δική μας μελέτη γίνεται μία πρώτη καταγραφή της παρουσίας μεταλλάξεων στο *ESR1* γονίδιο σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού στον Ελληνικό πληθυσμό. Περιοριστικό παράγοντα αποτελεί ο μικρός αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν και κυρίως ο μικρός αριθμός μεταστατικών καρκίνων, καθώς όπως διαφαίνεται σε αυτούς καταγράφονται τα υψηλότερα ποσοστά μεταλλάξεων. Χρειάζεται ανάλυση σε μεγάλο αριθμό μεταστατικών καρκινωμάτων του μαστού σε συνδυασμό με συσχετίσεις ως προς την ανταπόκριση και την πιθανή ανάπτυξη αντίστασης στην ορμονική θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Deirdre E McGhee, Julie R Steele. Physiology. Breast Biomechanics: What Do We Really Know? Vol.35, Issue 2, σελ. 144-156. DOI: [10.1152/physiol.00024.2019](https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2019)
2. Susan M. Love, Sanford H. Barsky. Cancer. Anatomy of the nipple and breast ducts revisited Vol: 101, Issue 9, σελ.1947-57, 2004. DOI: [10.1002/cncr.20559](https://doi.org/10.1002/cncr.20559)
3. Robert A. Jesinger. Techniques in Vascular and Interventional Radiology. Breast Anatomy for the Interventionalist. Vol. 17, Issue 1, σελ. 3-9, 2014.
4. Donna T. Geddes. Journal of Midwifery & Women's Health. Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research. Vol. 52, Issue 6, σελ. 556-563, 2007.
5. Χατζημπούγιας Ι. Το σύστημα των αισθητήριων οργάνων. Στοιχεία Ανατομικής του Ανθρώπου, σελ.267-275, 2002. Εκδόσεις GM Design, Αθήνα.
6. Stolnicu S. Histology of the Normal Breast, Normal Changes, and Abnormalities of Breast Development. Practical Atlas of Breast Pathology, P.1-25, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93257-6_1
7. Ross M. H., Pawlina W. Ιστολογία με έγχρωμο άτλαντα. Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 2013.
8. Φύσσας Γ. Ο μαστός και οι παθήσεις του. Εκδόσεις: Λιβάνης-Νέα Σύνορα. 2016.
9. Jesinger R. A. Breast Anatomy for the Interventionalist. Techniques in Vascular and Interventional Radiology. Vol. 17, Issue 1, P.3-9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>
10. Donna T. Geddes Inside the Lactating Breast: The Latest Anatomy Research Journal of Midwifery & Women's Health. Vol. 52, Issue 6, P. 556-563, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2007.05.004>
11. Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. CA: A Cancer Journal for Clinicians. Global Cancer Statistics, 2002. 2005;55(2):74-108. DOI: [10.3322/canjclin.55.2.74](https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74)

12. Coleman P. Michel et al. The Lancet Oncology. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Vol.9, Issue:8, σελ.730–756. [doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70179-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70179-7)
13. Lagiou. Epidemiology and prevention of breast cancer. Archives of Hellenic Medicine, 25(6):742–748, 2008.
14. Livia Emi Inumaru et al., Risk and Protective Factors for Breast Cancer in Midwest of Brazil. Journal of Environmental and Public Health, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/356851>
15. S. Eva Singletary. Rating the Risk Factors for Breast Cancer. Annals of Surgery 2003 Apr; 237(4): 474–482. doi: [10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87](https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87)
16. Hussein A. Assi, Katia E. Khoury, Haifa Dbouk et al. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. Journal of Thoracic Disease, 2013 Jun; 5(Suppl 1): S2–S8. doi: [10.3978/j.issn.2072-1439.2013.05.24](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.05.24)
17. Smigal C., Jemal A., Ward E. et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: Update 2006. CA A Cancer Journal for Clinicians, Vol.56, P168–183, 2006.
18. Qiong Dai, Bei Liu, Yukai Du. Meta-analysis of the risk factors of breast cancer concerning reproductive factors and oral contraceptive use. Frontiers of Medicine in China, Vol. 3, P452–458, 2009.
19. Giordano SH, Buzdar AU, Hortobagyi GN. Breast Cancer in Men. Annals of Internal Medicine. 2002;137(8):678–687. DOI: [10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00013](https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-8-200210150-00013)
20. Kim Y, Yoo K-Y, Goodman MT. Differences in Incidence, Mortality and Survival of Breast Cancer by Regions and Countries in Asia and Contributing Factors. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015;16(7):2857–2870. DOI: [10.7314/apjcp.2015.16.7.2857](https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.7.2857)
21. Thakur P, Seam RK, Gupta MK, Gupta M, Sharma M, Fotedar V. Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case–control study and comparison with the Western World. South Asian Journal of Cancer. 2017;6(3):106–109. DOI: [10.4103/sajc.sajc_157_16](https://doi.org/10.4103/sajc.sajc_157_16)
22. Beaber EF, Buist DSM, Barlow WE, Malone KE, Reed SD, Li CI. Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. Cancer Research. 2014;74(15):4078–4089. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-13-3400](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3400)

23. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 2002;346(26):2025–2032. DOI: [10.1056/NEJMoa013202](https://doi.org/10.1056/NEJMoa013202)
24. Zolfaroli I, Tarín JJ, Cano A. Hormonal contraceptives and breast cancer: Clinical data. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2018, Vol 230, P212-216. DOI: [10.1016/j.ejogrb.2018.03.058](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.03.058)
25. Beral V, Bull D, Doll R, Key T, Peto R, Reeves G. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52, 705 women with breast cancer and 108, 411 women without breast cancer. *Lancet*. 1997;350(9084):1047–1059.
26. Cobain EF, Milliron KJ, Merajver SD. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. *Seminars in Oncology*. 2016;43(5):528–535. DOI: [10.1053/j.seminoncol.2016.10.001](https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.10.001)
27. Godet I, Gilkes DM. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*. 2017;4(1):1–17. doi: [10.15761/ICST.1000228](https://doi.org/10.15761/ICST.1000228)
28. Metcalfe KA, Finch A, Poll A, et al. Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. *British Journal of Cancer*. 2009;100(2):421–425. doi: [10.1038/sj.bjc.6604830](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604830)
29. Miller ER, Wilson C, Chapman J, et al. Connecting the dots between breast cancer, obesity and alcohol consumption in middle-aged women: ecological and case control studies. *BMC Public Health*. 2018;18(1):460. DOI: [10.1186/s12889-018-5357-1](https://doi.org/10.1186/s12889-018-5357-1)
30. Kerlikowske K, Gard CC, Tice JA, et al. Breast Cancer Surveillance Consortium Risk Factors That Increase Risk of Estrogen Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2017;109(5): djw276. DOI: [10.1093/jnci/djw276](https://doi.org/10.1093/jnci/djw276)
31. John EM, Phipps AI, Knight JA, et al. Medical radiation exposure and breast cancer risk: findings from the Breast Cancer Family Registry. *International Journal of Cancer*, 2007;121(2):386–394. DOI: [10.1002/ijc.22668](https://doi.org/10.1002/ijc.22668)
32. McTiernan A, Kooperberg C, White E, et al. Women’s Health Initiative Cohort Study Recreational physical activity and the risk of breast cancer in

- postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *JAMA*. 2003;290(10):1331–1336. DOI: [10.1001/jama.290.10.1331](https://doi.org/10.1001/jama.290.10.1331)
33. Mei-Hsuan Wu et al. Hormonal and Body-Size Factors in Relation to Breast Cancer Risk: A Prospective Study of 11,889 Women in a Low-Incidence Area. *Annals of Epidemiology*, Vol. 16, Issue 3, P223-229, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.02.015>
 34. Zohre Momenimovahed, Hamid Salehiniya. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer - Targets and Therapy* 2019;11 151–164. doi: [10.2147/BCTT.S176070](https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070)
 35. Nelson, H. D., Zakher, B. et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, Vol.156, P635–648, 2012.
 36. Edward R. Sauter. Breast Cancer Prevention: Current Approaches and Future Directions. *Eur J Breast Health*. Vo.2, P. 64–71, 2018. doi: [10.5152/ejbh.2018.3978](https://doi.org/10.5152/ejbh.2018.3978)
 37. Brad M. Keller, Jinbo Chen, Emily F. Conant, Despina Kontos. Breast density and parenchymal texture measures as potential risk factors for Estrogen-Receptor positive breast cancer. *Proc SPIE.*, 2014. doi: [10.1117/12.2043710](https://doi.org/10.1117/12.2043710)
 38. West A, Wullkopf L, Christensen A, Leijnse N, Tarp JM, Mathiesen J, et al. Division induced dynamics in non-Invasive and invasive breast cancer. *Biophysical Journal*, 2017;112:123–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.687>
 39. Nakhlis F, Morrow M. Ductal carcinoma in situ. *Surgical Clinics of North America*, 2003;83:821–39. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(03\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(03)00072-0)
 40. Inoue M, Nakagomi H, Nakada H, Furuya K, Ikegame K, Watanabe H. Specific sites of metastases in invasive lobular carcinoma: a retrospective cohort study of metastatic breast cancer. *Breast Cancer*, 2017 Sep;24(5):667-672. DOI: [10.1007/s12282-017-0753-4](https://doi.org/10.1007/s12282-017-0753-4)
 41. Clauser P, Marino MA, Baltzer PA, Bazzocchi M, Zuiani C. Management of atypical lobular hyperplasia, atypical ductal hyperplasia, and lobular carcinoma in situ. *Expert Review of Anticancer therapy*. 2016;16:335–6. <https://doi.org/10.1586/14737140.2016.1143362>
 42. Chuba P, Hamre M, Yap J, Severson R, Lucas D, Shamsa F. Bilateral risk for subsequent breast cancer after lobular carcinoma-in-situ: analysis of

- surveillance, epidemiology, and end results data. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23:5534–41. DOI: [10.1200/JCO.2005.04.038](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.038)
43. Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, et al. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol.34, Issue 10, 2016.
 44. Ziperstein MJ, Guzman A, Kaufman LJ. Evaluating breast cancer cell morphology as a predictor of invasive capacity. *Biophysical Journal*. 2016;110:621–5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.3333>
 45. Stevanovic A, Lee P, Wilcken N. Metastatic breast cancer. *Australian Family Physician*. 2006;35:309–11.
 46. Somiari R, Sullivan A, Russell S et. al. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*. 2003;3(10):1863–73. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300560>
 47. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Research*, 2004;6:149–52. <https://doi.org/10.1186/bcr767>
 48. Mateo A, Pezzi T, Sundermeyer M, Kelley C, Klimberg V, Pezzi C. Chemotherapy significantly improves survival for patients with T1c-T2N0M0 medullary Breast cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2017;24:1050–6. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5649-6>
 49. Anuradha D, Lakshmi A. Mucinous carcinoma of breast with neuroendocrine differentiation: a rare case report with review of literature. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2017;2:1751–4.
 50. Priya V, Prasaad P. Tubulo-lobular carcinoma: a rare mixed invasive carcinoma of breast. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2017; 5:2818–20. DOI: <http://dx.doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20172496>
 51. Joglekar-Javadekar M, Van Laere S, Bourne M, et al. Characterization and targeting of platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) in inflammatory breast cancer (IBC). *Neoplasia*. Vol.19, Issue 7, P564–73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.03.002>
 52. Perez-Sanchez V. M, Maldonado-Martinez H. A, Juarez-Sanchez P, Meneses-Garcia A. Pathology of Inflammatory Breast Cancer, *Inflammatory Breast Cancer* pp 29-50, 2013. https://doi.org/10.1007/978-0-85729-991-8_3

53. Errichetti E, Avellini C, Pegolo E, De Francesco V. Dermoscopy as a supportive instrument in the early recognition of erosive adenomatosis of the nipple and mammary paget's disease. *Annals of Dermatology*, 2017;29:365–7.
54. Merrill A, White A, Howard-McNatt M. Paget's disease of the breast: an institutional review and surgical management. *The American Surgeon*. 2017;83:96–8.
55. Strode M, Khoury T, Mangieri C, Takabe K. Update on the diagnosis and management of malignant phyllodes tumors of the breast. *The Breast*. 2017;33:91–6.
56. Sera T, Kashiwagi S, Takashima T, et al. Multiple metastatic malignant phyllodes tumor of the breast with tonsillar metastasis: a case report. *BMC Research Notes*. 2017;10:55–60. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2375-5>
57. Nozad S, Sheehan C, Gay L, Elvin J, et al. Comprehensive genomic profiling of malignant phyllodes tumors of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2017;162:597–602. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4156-1>
58. Sumanta Kumar Pal, Sean K. Lau, Laura Kruper, et. al. Papillary carcinoma of the breast: an overview. *Breast Cancer Research and Treatment*. Vol.122, P637–645, 2010. doi: [10.1007/s10549-010-0961-5](https://doi.org/10.1007/s10549-010-0961-5)
59. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26:1275–81.
60. Foulkes W, Smith I, Reis-Filho J. Triple-negative breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363:1938–48. DOI: [10.1056/NEJMra1001389](https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389)
61. Anderson, W. F., Chatterjee, N., Ershler, W. B., & Brawley, O. W. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Breast Cancer Research and Treatment*, 76, 27–36, 2002.
62. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., et. al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406, 747–752, 2000.
63. ZiQi Tao, Aimin Shi, Cuntao Lu, et. al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochemistry and Biophysics*. Vol. 72, P333–338, 2015.

64. Elroy Patrick Weledji1, Joshua Tambe. Breast Cancer Detection and Screening. Medical & Clinical Reviews, Vol.4 No.2:8, 2018. DOI:[10.21767/2471299X.1000071](https://doi.org/10.21767/2471299X.1000071)
65. Armando E. Giuliano, James L. Connolly, Stephen B. Edge. Breast Cancer—Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: A Cancer Journal for Clinicians, Vol.67, Issue 4, P.290-303, 2017. <https://doi.org/10.3322/caac.21393>
66. Stephen B Edge, Carolyn C Compton. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. Annals of Surgical Oncology volume 17, pages1471–1474, 2010. DOI: [10.1245/s10434-010-0985-4](https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4)
67. Galea M. H., Blamey R. W., Elston C. E., Ellis I. O. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, Vol. 22, P207–219, 1992. DOI: [10.1007/BF01840834](https://doi.org/10.1007/BF01840834)
68. Veronesi U., Galimberti V., Zurrada S., et. al. Prognostic significance of number and level of axillary node metastases in breast cancer. The Breast, Vol. 2, Issue 4, P224-228, 1993. [https://doi.org/10.1016/0960-9776\(93\)90004-Y](https://doi.org/10.1016/0960-9776(93)90004-Y)
69. Elston C. W., Ellis I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology, Vol.5, P403-10, 1991. DOI: [10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x)
70. Dalton W. L., Page D. L., Dupont W. D., Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. Cancer, Vol.73(11):2765-70, 1994. DOI: [10.1002/1097-0142\(19940601\)73:11<2765::aid-cncr2820731119>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19940601)73:11<2765::aid-cncr2820731119>3.0.co;2-k)
71. Baum M., J Houghton J. Contribution of randomised controlled trials to understanding and management of early breast cancer. BMJ 1999;319:568 DOI: [10.1136/bmj.319.7209.568](https://doi.org/10.1136/bmj.319.7209.568)
72. Shapiro CL, Henderson IC. Adjuvant therapy of breast cancer. Hematology/Oncology Clinics of North America. 1994 Feb;8(1):213-31.
73. Fisher B. From Halsted to prevention and beyond: advances in the management of breast cancer during the twentieth century. European Journal of Cancer, Vol.14, Issue 14, P.1963-73, 1999. DOI: [10.1016/s0959-8049\(99\)00217-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(99)00217-8)

74. Langston A. A., Malone K. E., Thompson D. J., BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 334(3):137-42
DOI: [10.1056/NEJM199601183340301](https://doi.org/10.1056/NEJM199601183340301)
75. Stafford Michahial, Bindu A Thomas. A Novel Algorithm to Select a Seed Point Automatically in Breast Ultrasound Image. *Indian Journal of Science and Technology* 10(1):1-8, 2017. DOI:[10.17485/ijst/2017/v10i1/110288](https://doi.org/10.17485/ijst/2017/v10i1/110288)
76. Jan M., Mattoo J.A., Salroo N.A. et al. Triple assessment in the diagnosis of breast cancer in Kashmir. *Indian J Surg* Vol.72, P.97–103, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s12262-010-0030-7>
77. Stevens A., Lowe J. Νόσος του μαστού, κεφ.18, σελ 396. Παθολογική Ανατομική. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 1998.
78. Adrienne G. Waks, Eric P. Winer. Breast Cancer Treatment. *JAMA*. 2019;321(3):316 doi:[10.1001/jama.2018.20751](https://doi.org/10.1001/jama.2018.20751)
79. Fischer JP, Wes AM, Tuggle CT, et. al. Mastectomy with or without immediate implant reconstruction has similar 30-day perioperative outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014;**67**:1515–1522.
80. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. *N Engl J Med*. 1981;**305**:6–11
81. William J Gradishar, Benjamin Olney Anderson, Ronald Balassanian, et. al. Breast Cancer, Version 4.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2018;16:310–320 doi: [10.6004/jnccn.2018.0012](https://doi.org/10.6004/jnccn.2018.0012)
82. Χαρατσή-Γιωτάκη, Ε. (2014). Σύγχρονη Εσωτερική Παθολογία. Ιωάννινα
83. Νοσηλευτική Φροντίδα Γυναικών με Διαταραχές του Αναπαραγωγικού Συστήματος και των Μαστών. Στο Ρ. Κ. LeMone, Παθολογική - Χειρουργική Νοσηλευτική Τόμος Β' (σσ. 2011-2017), 2014. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λαγός Δημήτριος
84. T. Jonathan Yang, Alice Y. Ho. Radiation Therapy in the Management of Breast Cancer. *Surg Clin N Am* 93, P.455–471, 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2013.01.002>

85. Elizabeth S. McDonald, Amy S. Clark, Julia Tchou. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* February 2016, 57 (Supplement 1) 9S-16S. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>
86. Osborne et al. The Value of Estrogen and Progesterone Receptors in the Treatment of Breast Cancer. *Steroid receptors in breast Cancer, Cancer*, 46:2884-2888, 1980.
87. Robert I. Nicholson, Stephen R. Johnston. Endocrine therapy – current benefits and limitations. *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 93, P.3–10, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9036-4>
88. H.K. Patel, T. Bihani. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics* 186, 1–24, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.012>
89. J. M. Dixon. Endocrine Resistance in Breast Cancer. *New Journal of Science*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/390618>
90. Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research* 50, 33, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
91. Bernard-Marty, C., Lebrun, F., Awada, A. et al. Monoclonal Antibody-Based Targeted Therapy in Breast Cancer. *Drugs* 66, 1577–1591, 2006. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666120-00004>
92. Karen I. Maughan, Mark A. Lutterbie, Peter S. Ham. Treatment of Breast Cancer. *Am Fam Physician*. 2010 Jun 1;81(11):1339-1346
93. Sarah E.H. Cokenakes. Cancer Treatment. *American Family Physician*. 2021 Aug ;104(2):171-178
94. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889–895.
95. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med*. 1995;46:443–453
96. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*. 2002;346:340–352

97. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:S116–S124
98. Ian O. Ellis, Andrew H.S. Lee, Sarah E. Pinder et. al. *Diagnostic Histopathology of Tumors*, Chapter 16, 1119-1210, 2021.
99. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* 1988;7:3385–3388.
100. Sand P, Luckhaus C, Schlurmann K, Götz M, Deckert J. Untangling the human estrogen receptor gene structure. *J Neural Transm.* 2002;109:567–583.
101. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol.* 2001;15:2057–2063.
102. Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol.* 2010;24:1703–1714
103. Haldosén L-A, Zhao C, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382:665–672
104. Green S, Kumar V, Krust A, Walter P, Chambon P. Structural and functional domains of the human estrogen receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:751–758.
105. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4258–4265.
106. Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G. and Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16: 4–20. doi: [10.1002/rmb2.12006](https://doi.org/10.1002/rmb2.12006)
107. Robinson D. R., Wu Y., Vats P et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 2013; 45(12): 1446–1451
108. Toy W, Shen Y, Won H et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 2013; 45(12): 1439–1445.
109. Jeselsohn R., Yelensky R., Buchwalter G. et. al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced

- estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2014, 20, 1757–1767.
110. Hartmaier R.J., Trabucco S.E., Priedigkeit N. et. al. Recurrent hyperactive ESR1 fusion proteins in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Ann. Oncol.* 2018, 29, 872-880.
111. Chung J.H., Pavlick D., Hartmaier R. et. al. Hybrid capture-based genomic profiling of circulating tumor DNA from patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 2017, 28, 2866–2873
112. Derek Dustin, Guowei Gu and Suzanne A. W. Fuqua. ESR1 Mutations in Breast Cancer. *Cancer* 2019;125:3714-3728
113. Toy, W., Shen, Y., Won, H. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 45, 1439–1445 (2013). <https://doi.org/10.1038/ng.2822>
114. Peilu Wang, Amir Bahreini, Rekha Gyanchandani et. al. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*; 22(5) March 1, 2016. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-15-1534](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1534)
115. Reinert Tomas et.al. Clinical Implications of ESR1 Mutations in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Front. Oncol.* 7:26, 2017. DOI=[10.3389/fonc.2017.00026](https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00026)
116. Ramesh R., Munshi A., Panda S.K.. Polymerase chain reaction. *The National Medical Journal of India.* Vol.5, no.3, σελ. 115-9, 1992.
117. Lilit Garibyan, Nidhi Avashia. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Investigative Dermatology.* Vol.133, Issue 3, σελ 1-4, 2013. doi: [10.1038/jid.2013.1](https://doi.org/10.1038/jid.2013.1)
118. Todd C. Lorenz. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63): 3998, 2012. doi: [10.3791/3998](https://doi.org/10.3791/3998)
119. Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε. και Παπανικολάου Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενετικής του Ανθρώπου.* Κεφ.7. σελ.129-152.
120. Saumya S. Jamuar, Alissa M. D'Gama, Christopher A. Walsh. Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry. Κεφ.12: Somatic Mosaicism and Neurological Diseases. Σελ.179-199. 2016.

121. Alicia Gomes, Bruce Korf. Pediatric Cancer Genetics. Κεφ.5: Genetic Testing Techniques. Σελ.47-64. 2018
122. David A. Solomon. Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach (Second Edition). Σελ.71-89. 2018
123. Gauthier, Michel G. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach. Diss. University of Ottawa (Canada), 2008.
124. Zhang P., Seth A., Fernandes H.. Pathobiology of Human Disease. Κεφ.: Other Post-PCR Detection Technologies. Σελ.4074-4088. 2014
125. Li et al. Monitoring ESR1 Mutations Predicts Endocrine Resistance of ER+ MBC. Translational Oncology, Vol.13, No.2. 2020
126. Takeshita et. al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens. Translational Research, Vol.166, No. 6. 2015
127. Wenzhen Zhu et. al. Prevalence of ESR1 Mutation in Chinese ER-Positive Breast Cancer OncoTargets and Therapy. 13: 615–621. 2020. doi: [10.2147/OTT.S233662](https://doi.org/10.2147/OTT.S233662)