



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Miodrag N. Đorđević**

**UTICAJ MOLEKULARNIH KARAKTERISTIKA  
INVAZIVNOG DUKTALNOG KARCINOMA DOJKE  
NA POJAVU LOKOREGIONALNIH METASTAZA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Miodrag N. Đorđević**

**IMPACT OF MOLECULAR CHARACTERISTICS  
OF INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER ON  
THE OCCURRENCE OF LOCOREGIONAL METASTASES**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	<b>Prof. dr Aleksandar Karanikolić,</b> specijalista opšte hirurgije, subspecijalista onkologije, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	<b>UTICAJ MOLEKULARNIH KARAKTERISTIKA INVAZIVNOG DUKTALNOG KARCINOMA DOJKE NA POJAVU LOKOREGIONALNIH METASTAZA</b>
Rezime:	<p>Karcinom dojke je najčešći maligni tumor u ženskoj populaciji, a istovremeno i najčešći uzrok smrti od malignih bolesti kod žena. Najnoviji literaturni podaci ukazuju na postojanje male subpopulacije kancerskih matičnih ćelija koje čine manje od 1% primarnih tumora, a odgovorne su za razvoj metastaza i progresiju bolesti. BCSCs (breast cancer stem cells) imaju sposobnost da se samoobnavljaju dajući kancerske matične ćelije ćerke i da se diferentuju dajući dominantnu populaciju kancerskih ćelija. BCSCs fenotip je specifičan i karakteriše se ekspresijom nuklearnih i membranskih pluripotentnih faktora (molekularnih markera). U ovom istraživanju ispitivana je ekspresija markera sa svojstvima matičnosti (KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44, CD117) u kancerskim ćelijama invazivnog duktalnog karcinoma dojke i njihova povezanost sa kliničko-patološkim parametrima i molekularnim podtipom karcinoma, sa ciljem da se utvrdi njihov uticaj na pojavu lokoregionalnih metastaza. Rezultati ove studije su pokazali da na lokoregionalno širenje karcinoma značajan uticaj imaju: veličina tumora (T4), više vrednosti Ki-67 indeksa, visoka ekspresija OCT3/4 i EZH2, veći broj nuklearnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, kao i veći broj alterisanih markera. Prediktivni uticaj na pojavu metastaza u aksili ima visoka ekspresija OCT3/4 i EZH2 u invazivnom duktalnom karcinomu dojke. Povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama značajno je povezano sa smanjenjem ER i PR skora, visokom ekspresijom OCT3/4, EZH2 i SOX2 markera, većim brojem nuklearnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, koekspresijom svih nuklearnih markera, koekspresijom membranskih markera CD44 i CD117 i većim brojem alterisanih markera. Prediktivni uticaj na povećan broj aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama ima koekspresija svih nuklearnih markera, kao i koekspresija CD44 i CD117. Na povećanje procenta zahvaćenih limfnih nodusa aksile značajan uticaj ima T4 stadijum tumora, smanjenje ER i PR skora, visoka ekspresija OCT3/4, EZH2 i SOX2, kao i veći broj nuklearnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, koekspresija svih nuklearnih markera, koekspresija membranskih markera i veći broj alterisanih markera. Prediktivni uticaj na povećanje procenta metastatski izmenjenih limfnih nodusa ima T4 stadijum, veći broj nuklearnih markera visoke ekspresije, kao i koekspresija CD44 i CD117 markera. S obzirom na to da je ključni događaj u progresiji karcinoma dojke razvoj metastaza u aksilarnim limfnim nodusima, produbljivanjem saznanja o heterogenosti primarnog tumora, uz primenu standardnih i novih molekularnih markera, važno je identifikovati pacijentkinje kod kojih postoji rizik za razvoj metastaza.</p>

Naučna oblast:	Medicina
Naučna disciplina:	Hirurgija
Ključne reči:	invazivni duktalni karcinom dojke, lokoregionalne metastaze, ekspresija markera KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44, CD117
UDK:	618.19-006.6:577.2 (043.3)
CERIF klasifikacija:	<b>V 600 Hirurgija, ortopedija, traumatologija</b>
Tip licence Kreativne zajednice:	<b>CC BY-NC-ND</b>

## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor: **Prof. dr Aleksandar Karanikolić, M.D., Ph.D.**, surgeon-oncologist  
Faculty of Medicine, University of Niš

Title: **IMPACT OF MOLECULAR CHARACTERISTICS OF INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER ON THE OCCURRENCE OF LOCOREGIONAL METASTASES**

Abstract: Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor in female population and the most common cause of death from malignant diseases in women. The most recent literature data have suggested that there is a small population of cancer stem cells, comprising less than 1% of primary tumors, which are responsible for the development of metastases and disease progression. Breast cancer stem cells (BCSCs) have the ability to self-renew and to create a dominant population of cancer cells. The BCSCs phenotype is specific and characterized by the expression of nuclear and membrane pluripotency factors (molecular markers). In this paper we investigated the expression of markers with stem cell properties (KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44, CD117) in the cancer cells of invasive ductal breast cancer and their association with clinical-pathological parameters and molecular tumor subtype, aiming to evaluate their impact on the occurrence of locoregional metastases. The results of this study showed that tumor size (T4), higher Ki-67 index, high OCT3/4 and EZH2 expression, increased number of highly expressed nuclear markers, and increased number of altered markers were significantly associated with locoregional disease spread. A high expression of OCT3/4 and EZH2 in invasive ductal breast cancer was predictive of axillary metastases. An increased number of metastatic axillary lymph nodes was significantly associated with reduced ER and PR scores, high expression of OCT3/4, EZH2 and SOX2, with an increased number of nuclear markers with high expression, coexpression of all nuclear markers, coexpression of membrane markers CD44 and CD117, and the increased number of altered markers. Coexpression of all nuclear, as well as CD44 and CD117 markers, was predictive of the increased number of metastatic axillary lymph nodes. T4 stage, reduced ER and PR scores, increased expression of OCT3/4, EZH2 and SOX2 had a significant impact on the increased percentage of metastatic axillary lymph nodes, as well as a greater number of nuclear markers with high expression, coexpression of all nuclear markers, coexpression of highly expressed membrane markers, and a greater number of altered markers. Tumor size, increased number of highly expressed nuclear markers, and CD44 and CD117 coexpression were predictive of a greater percentage of metastatic lymph nodes. Since the development of lymphonodal metastases is a key event in the progression of breast cancer, with a deeper knowledge of primary tumor heterogeneity and using standard and new molecular markers, it is important to identify the patients at risk for the development of metastases.

Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Surgery
Key Words:	invasive ductal breast cancer, locoregional metastases, expression of markers KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44, CD117
UDC:	618.19-006.6:577.2 (043.3)
CERIF Classification:	<b>V 600 Surgery, orthopaedics, traumatology</b>
Creative Commons License Type:	<b>CC BY-NC-ND</b>

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	9
2. KARCINOM DOJKE.....	11
2.1. Epidemiologija.....	11
2.2. Faktori rizika i mere prevencije za nastanak karcinoma dojke.....	12
2.3. Dijagnostičke procedure.....	13
2.3.1. Klinički pregled.....	13
2.3.2. Imidžing tehnike i biohemijska ispitivanja.....	14
2.3.3. Hirurške dijagnostičke procedure.....	14
2.3.4. Patohistološka ispitivanja.....	15
2.4. Patohistološke forme i određivanje stadijuma karcinoma dojke.....	16
2.4.1. Histološki tipovi karcinoma dojke.....	16
2.4.2. Molekularni podtipovi karcinoma dojke.....	17
2.4.3. Određivanje kliničkog stadijuma karcinoma dojke.....	17
2.5. Osnovni terapijski principi u lečenju karcinoma dojke.....	20
2.6. Prognostički faktori.....	22
3. KANCERSKE MATIČNE ĆELIJE I MOLEKULARNI MARKERI KARCINOMA DOJKE.....	23
3.1. Kancerske matične ćelije i molekularni podtipovi karcinoma dojke.....	23
3.2. Molekularni markeri karcinoma dojke.....	25
3.2.1. KLF4.....	25
3.2.2. SOX2.....	27
3.2.3. OCT3/4.....	28
3.2.4. EZH2.....	30
3.2.5. CD44.....	31
3.2.6. CD117.....	33
4. NAUČNA HIPOTEZA.....	35
5. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	36
6. MATERIJAL I METODE.....	38
6.1. PACIJENTKINJE.....	38
6.2. METODE RADA.....	38
6.2.1. Patohistološka analiza.....	38
6.2.2. Imunohistohemijska analiza.....	39
6.2.3. Statističke metode.....	43
7. REZULTATI.....	44
7.1. Kliničko-patološke karakteristike karcinoma i status aksilarnih limfnih nodusa.....	44
7.2. Ekspresija molekularnih markera karcinoma i status aksilarnih limfnih nodusa.....	46
7.3. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije molekularnih markera.....	48

7.3.1. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije KLF4 .....	48
7.3.2. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije SOX2 .....	52
7.3.3. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije OCT3/4.....	56
7.3.4. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije EZH2 .....	60
7.3.5. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije CD44 .....	64
7.3.6. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije CD117 .....	67
7.3.7. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i koekspresije nuklearnih i membranskih markera.....	70
7.4. Komparativna analiza molekularnih podtipova karcinoma dojke u odnosu na kliničko-patološke parametre i ekspresiju molekularnih markera .....	77
7.5. Povezanost kliničko-patoloških parametara, molekularnog podtipa karcinoma i ekspresije molekularnih markera sa lokoregionalnim širenjem invazivnog dukalnog karcinoma dojke.....	82
8. DISKUSIJA .....	89
9. ZAKLJUČAK.....	106
10. LITERATURA .....	109
11. BIOGRAFIJA AUTORA .....	127



# 1. UVOD

Dojka ili mlečna žlezda je parna akcesorna kožna žlezda koja može biti zahvaćena brojnim patološkim procesima, od kojih karcinom zauzima dominantno mesto i najčešći je uzrok smrti kod žena. Interesovanje za ovo oboljenja doseže u daleku prošlost, a tretman je uglavnom zavisio od ličnih, kulturnih ili verskih ubeđenja.

Najstariji zapis o raku dojke datira još iz 1600. godine p.n.e. na papirusu *Edwina Smitha* (Teba, 1862) na kojem se nalazi 48 hirurških prikaza, od kojih se 8 odnosi na bolesti dojke. Pretpostavlja se da je ovaj papirus delo *Imhotepa* koji je zbog svojih zasluga proglašen bogom u starom Egiptu. Bez obzira na to što autor ovog prikaza konstatuje da nema uspešnog lečenja raka dojke, on je opisao tretman spaljivanjem tumora uz pomoć žarača. Grčki istoričar *Herodot* dao je opis promene na dojci koju je imala slavna kraljica *Atosa*, Darijeva žena, u 6. veku p.n.e. Iz ovog opisa ne može se sa sigurnošću tvrditi da ta promena ima sličnosti sa rakom dojke. Verovatno se radi o nekoj dobroćudnoj promeni koju je persijski lekar *Democedes* iz Kritona uspeo da sanira. *Herodot* je 525. godine p.n.e. opisao i slučaj *Alase*, *Cyrus-ove* ćerke, koja je krila prisustvo čvora u dojci sve dok nije došlo do formiranja "žive rane". *Herodot* dalje navodi da je čuveni lekar (ime nepoznato) uspeo da reši ovaj slučaj vađenjem tumora.

U *Corpusu Hippocraticu*-usu *Hipokrat* (oko 460. g.p.n.e.) diferencira tumore na "dobroćudne" i "zloćudne", ali navodi da je rak dojke neizlečiv. *Galen* (130–200. g.p.n.e.) je generalno svoje stavove bazirao na Hipokratovoj školi, te je tvrdio da je rak dojke uzrokovan poremećajem "crne žuči" i preporučivao je intezivno čišćenje organizma. Ukoliko je pored tumora postajalo i crvenilo dojke, on je smatrao da se radi o poremećaju krvi, pa je preporučivao "ispuštanje krvi". Elementi teorije koju je zastupao *Galen* biće dominantni i tokom srednjeg veka.

U starom Rimu, početkom novog veka, slavljena je sveta *Agata* kao zaštitnica žena od bolesti dojke. *Agata* je, prema legendi, bila veoma lepa devojka iz ugledne porodice koja je živela u Kataniji na Siciliji, u vreme vladavine rimskog cara *Decija (Decius)*. Prelepa *Agata*, koja je bila hrišćanka, završila je u tamnici u najvećim mukama zbog neposlušnosti prema namesniku *Kvintijanu (Quintianus)*. Prisiljavali su je da bosa hoda po užerenom pepelu, a kulminacija svirepog mučenja bila je kidanje dojki užeranim klještima. Hrabra *Agata* je nakon ovog čina hrabro izgovorila: "Zar te nije stid kidati ono čime te je majka dojila?" Nakon toga

je izdahnula. Ona se danas slavi kao svetica i zaštitnica žena od bolesti dojke. Njeno mučenje je na platnu ovekovečio čuveni slikar *Giovanni Battista Tiepolo* (1696–1770)

U periodu od 15. do 19. veka načinjen je izvestan pomak u shvatanju prirode raka dojke jer je počelo da se veruje da je ovo oboljenje sistemskog karaktera, a ne samo lokalno. Prvi opis operacije dojke datira iz 1. veka n.e. *Leonidus* iz Aleksandrije je opisao detaljan tok operacije koji se sastojao iz reza kože i postepenog uklanjanja tumora i tkiva dojke primenom postupne hemostaze koja se izvodila paljenjem tkiva i stvaranjem kruste.

U 17. i 18. veku poraslo je interesovanje za tumore dojke, a samim tim se razvijao i način lečenja. Definiciju tumora dojke obrazložio je engleski lekar *Thomas Willis* (1621–1675). Njegova definicija je veliki pomak u razumevanju rasta tumora: "tumor je poremećaj rasta koji se primarno sastoji od prekomernog, neprestanog i potpuno nesvrshodnog umnožavanja ćelija u odnosu na fiziološke potrebe organa." Holandski anatom, *Andreas Vesalius*, preporučivao je mastektomiju kao metodu lečenja raka dojke, a umesto paljenja (kauterizacije) zalagao se za primenu ligatura u kontroli krvarenja. *Le Dran* (1685-1770) je prvi izneo teoriju da rak dojke nije samo lokalno oboljenje i da se može širiti u regionalne limfne čvorove pazušne jame. On je čak opisao i bolesnice koje su imale lošiju prognozu bolesti zbog širenja procesa u regionalne limfne čvorove. Ipak je u 17. i 18. veku hirurško lečenje bilo veoma ograničeno zbog velike učestalosti infekcija, nemogućnosti adekvatnog kupiranja bola i loših definitivnih rezultata. Tek u 19. veku, uvođenjem metoda antiseptike, razvojem anestezije i korišćenjem mikroskopa, počinje savremeno doba u razvoju hirurgije (1).

*William Halsted* (1852–1922) postavio je temelje razvoja savremene hirurgije raka dojke. Paralelna sa *Meyer*-om, *Halsted* je 1894. godine objavio svoj metod hirurškog lečenja raka dojke i izneo prve rezultate lečenja. Halstedova procedura sastojala se od kompletnog uklanjanja tkiva dojke, uklanjanja oba pektoralna mišića i kompletne disekcije limfnih čvorova aksile. Dugo je hirurško lečenje bilo jedini oblik lečenja raka dojke. Međutim, primenom i drugih metoda lečenja, kao što je zračna, hormonska ili citostatska terapija znatno je izmenjen pristup lečenju raka dojke. Tome su posebno doprineli: napredak u razumevanju biologije tumora, dijagnostikovanje veoma malih lezija, razvoj opreme za radioterapiju, znatno efikasnija citostatska sredstva, kao i ciljana "target" terapija (2). Danas se prednost daje pošteđenim hirurškim intervencijama u lečenju raka dojke prema jasnim indikacijama (3). Veliki napredak učinjen je i u domenu rekonstruktivnih hirurških zahvata nakon hirurškog uklanjanja tkiva dojke.

## **2. KARCINOM DOJKE**

### **2.1. EPIDEMIOLOGIJA**

Karcinom dojke je najčešći maligni tumor kod žena koji čini 25% svih malignih bolesti u ženskoj populaciji, kako u svetu tako i u našoj zemlji. Na godišnjem nivou registruje se oko 1,7 miliona novih slučajeva karcinoma dojke i preko 500.000 smrtnih ishoda. U Evropi godišnje oboli preko 460.000 žena, sa smrtnim ishodom kod preko 130.000 žena (4). Procenjuje se da broj novoobolelih žena od karcinoma dojke u Srbiji iznosi između 3900 i 4500, a da godišnje umre oko 1.300 žena (5,6).

Kumulativna verovatnoća oboljevanja od karcinoma dojke iznosi 12,5%, a to znači da jedna od osam žena može da oboli od ove bolesti tokom svog života (7).

U svetu se incidenca karcinoma dojke povećava za 3,1% na godišnjem nivou. U SAD i Evropskoj uniji, uprkos rastu broja obolelih, broj smrtnih ishoda od karcinoma dojke zadnjih decenija opao je za 35% zahvaljujući sistematskom skrining programu za rano otkrivanje karcinoma dojke i primeni ciljane terapije. U zemljama Evropske unije i SAD karcinom dojke u ranoj fazi otkriva se kod više od 60% obolelih žena (8–12).

U Republici Srbiji zadnjih decenija raste broj novoobolih od karcinoma dojke, ali i broj umrlih. Zastupljenost novootkrivenih slučajeva u ranoj fazi bolesti u našoj zemlji je oko 30%. Ostale dve trećina žena ima regionalno proširenu bolest, a 10% žena ima i udaljene metastaze (2,12). Rano otkrivanje karcinoma dojke je od presudnog značaja za prognozu bolesti.

## 2.2. FAKTORI RIZIKA I MERE PREVENCIJE ZA NASTANAK KARCINOMA DOJKE

Glavni faktori rizika za razvoj karcinoma dojke kod žena su: godine starosti, rana menarha, kasna menopauza, nerađanje ili prva trudnoća nakon 30. godine starosti, upotreba kontraceptivnih sredstava, dugotrajna substitucionna hormonska terapija u menopauzi, benigna patološka stanja u dojci (atipična duktalna hiperplazija), genetski faktori, izloženost zračenju i životni stil (13–24).

Oko 5–10% svih karcinoma dojke je genetski uslovljeno. Najčešće su prisutne mutacije BRCA1 ili BRCA2 gena. Rizik za razvoj karcinoma dojke kod nosioca mutacije BRCA1 gena iznosi 50–87%. Kod muškaraca karcinom dojke je uslovljen mutacijom BRCA 2 gena koja je identifikovana kod polovine muškaraca sa karcinomom dojke (2, 16–20).

Žene koje su prethodno lečene od karcinoma dojke imaju visok rizik od pojave karcinoma u kontralateralnoj dojci. Visok rizik postoji i kod žena sa pozitivnom porodičnom anamnezom i mlađim životnim dobom u vreme dijagnostikovanja karcinoma dojke. Češća pojava karcinoma dojke zabeležena je i kod nekih naslednih sindroma, kao što su: *Cowden* sindrom, *Li-Fraumeni* sindrom, *Lynch II* sindrom, *Peutz-Jeghers* sindrom i drugi (25).

Prevenција karcinoma dojke može biti primarna i sekundarna. Primarna prevencija karcinoma dojke odnosi se na eliminaciju faktora rizika koji spadaju u kategoriju životnog stila. Sekundarna prevencija zasniva se na organizovanom skrining programu i ranom otkrivanju karcinoma dojke.

Skrining karcinoma dojke je organizovan program otkrivanja ovog oboljenja u određenoj populaciji ili u rizičnim grupama. Skriningu obično prethode edukativna predavanja o značaju ranog otkrivanja karcinoma dojke sa preporukama o samopregledu i periodičnim pregledima ordinirajućih lekara. Prema preporukama međunarodnih komisija za praćenje karcinoma dojke, skrining karcinoma dojke bi trebalo sprovoditi u populaciji žena između 50 i 69 godina, jednom u dve godine, primenom kliničkog i mamografskog pregleda. Svrha skrining programa je rano otkrivanje karcinoma dojke i smanjenje smrtnosti od ovog oboljenja (9, 26).

## 2.3. DIJAGNOSTIČKE PROCEDURE

Osnovni postupci u dijagnostici karcinoma dojke obuhvataju: fizički pregled, radiološki pregled (ultrazvuk i mamografija), hirurške dijagnostičke procedure i patohistološki pregled tumora. Dodatne dijagnostičke procedure su: radiografija ili CT pluća, ultrazvuk ili MR abdomena, radiografija ili scintigrafija koštanog sistema i drugo.

### 2.3.1. Klinički pregled

Simptomi i znaci koji se mogu utvrditi fizičkim pregledom (inspekcija i palpacija dojke i aksile) prikazani su u tabeli 1.

**Tabela 1.** Simptomi i znaci karcinoma dojke

<b>Simptomi</b>	osetljivost ili bol u dojci bol u ipsilateralnoj ruci kod postojanja edema bol u grudima kod infiltracije zida grudnog koša
<b>Inspekcija dojke</b>	promena oblika i veličine dojke promena položaja bradavice retrakcija kože dojke retrakcija bradavice crvenilo kože otok kože – izgled "kore od pomarandže" proširene potkožne vene egzulceracija na površini dojke sukrvičava sekrecija iz bradavice lentikularne metastatske promene na koži dojke
<b>Palpacija dojke</b>	prisustvo tumefakta u dojci tumefakt nepravilnog oblika, neravnih površina, čvrste konzistencije nepokretni tumefakt, fiksira kožu i potkožno tkivo, pektoralnu fasciju, grudni mišić ili zid grudnog koša palpabilni limfni nodusi u ipsilateralnoj ili kontralateralnoj aksili palpabilni supraklavikularni limfni nodusi

### 2.3.2. Imidžing tehnike i biohemijska ispitivanja

Imidžing tehnike i njihove karakteristike, kao i biohemijska ispitivanja kod pacijentkinja sa karcinomom dojke (27–29) prikazani su u tabeli 2.

**Tabela 2.** Imidžing tehnike i biohemijske dijagnostičke procedure

Ehosonografija	metoda inicijalnog skrininga, neinvazivna, neškodljiva, korisna za diferencijaciju solidnih od cističnih promena; primenjuje se i za pregled abdomena
Digitalna mamografija	omogućava dijagnostiku tumora manjih od 1 cm i mikrokalifikacija; nije metoda izbora za žene mlađe od 40 godina
Magnetna rezonanca	pogodna za žene mlađe od 40 godina; ima senzitivnost 90–100%; korisna je i za pregled abdomena
Kompjuterizovana tomografija	metoda za otkrivanje sekundarnih depozita na plućima i drugim organima
Radiografija	metoda za pregled koštanog sistema
Scintigrafija	metoda za pregled koštanog sistema
Ispitivanje periferne krvi	kompletna krvna slika, uključujući leukocitarnu formulu i sedimentaciju
Biohemijske analize	urea, kreatinin, hepatogram, transaminaze, alkalna fosfataza, gama GT, kalcijum i drugo
Nivo serumskih biomarkera	CA15-3, CEA

### 2.3.3. Hirurške dijagnostičke procedure

Metode hirurške dijagnostike odnose se na odstranjivanje palpabilnog tumora ili uzimanje uzoraka tumora za patohistološki pregled. Hirurške dijagnostičke metode (30, 31) prikazane su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Hirurške dijagnostičke procedure

Metode hirurške dijagnostike
Punkcija tankom iglom ( <i>fine needle aspiration-FNA</i> )
Biopsija širokom iglom ( <i>core needle biopsy-core biopsy</i> )
Vakum asistirana biopsija (VAB)
Ekscizionna biopsija

### 2.3.4. Patohistološka ispitivanja

Patohistološka ispitivanja karcinoma dojke obuhvataju sledeće parametre:

- a) Histološki tip tumora;
- b) Step en histološke diferentovanosti tumora – histološki gradus, koji ukazuje na step en agresivnosti tumora (gradiranje po Elston-u i Ellis-u).

Određivanje histološkog gradusa (G) zasniva se na proceni tri osobine tumora (skor 1–3): 1. formiranje tubula, 2. nuklearni polimorfizam i 3. broj mitoz a. Histološki gradus izračunava se kao zbir bodova, na osnovu čega su definisani gradusi (32):

G1 (dobro diferentovani) – 3 do 5 bodova

G2 (umereno diferentovani) – 6 do 7 bodova

G3 (slabo diferentovani) – 8 do 9 bodova;

- c) Nottingham prognostički indeks koji se izračunava na osnovu veličine tumora, statusa limfnih nodusa i histološkog gradusa (skor 3–9) (33):

$NPI = (0,2 \times \text{veličina tumora u cm}) + \text{histološki gradus} + \text{status limfnih nodusa};$

- d) Širenje tumora;
- e) Ekscizione ivice;
- f) Limfovaskularna invazija;
- g) Udruženost DCIS sa invazivnom komponentom;
- h) Status limfnih nodusa;
- i) Status estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora;
- j) HER2 status;
- k) Proliferativni indeks Ki-67 koji ukazuje na step en proliferacije u tumoru: nizak 15%, intermedijarni 16–30% i visok 30% (34–37).

## 2.4. PATOHISTOLOŠKE FORME I ODREĐIVANJE STADIJUMA KARCINOMA DOJKE

### 2.4.1. Histološki tipovi karcinoma dojke

Svetska zdravstvena organizacija 2019. godine izdala je novu klasifikaciju karcinoma dojke koja je prikazana u tabeli 4 (38).

**Tabela 4.** Histološki tipovi karcinoma dojke

Neinvazivne lobularne neoplazme	Lobularni karcinom <i>in situ</i> (LCIS)
Duktalni karcinom <i>in situ</i> (DCIS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DCIS niskog nuklearnog gradusa</li> <li>▪ DCIS srednjeg nuklearnog gradusa</li> <li>▪ DCIS visokog nuklearnog gradusa</li> </ul>
Invazivni karcinom dojke	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ invazivni karcinom nespecifičnog tipa</li> <li>▪ invazivni lobularni karcinom</li> <li>▪ mikroinvazivni karcinom</li> <li>▪ tubularni karcinom</li> <li>▪ kribriformni karcinom</li> <li>▪ mucinozni karcinom</li> <li>▪ mucinozni cistadenokarcinom</li> <li>▪ invazivni mikropapilarni karcinom</li> <li>▪ karcinom sa apokrinom diferencijacijom</li> <li>▪ metaplastični karcinom</li> </ul>
Neuroendokrine neoplazme	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ neuroendokrini tumor gradusa 1 i 2</li> <li>▪ neuroendokrini karcinom</li> </ul>
Papilarne neoplazme	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ papilarni DCIS</li> <li>▪ inkapsulisani papilarni karcinom</li> <li>▪ solidni papilarni karcinom</li> <li>▪ invazivni papilarni karcinom</li> </ul>
Epitelne-mioepitelne neoplazme	
Tumori muške dojke	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>in situ</i> karcinomi</li> <li>▪ invazivni karcinomi</li> </ul>



## 2.4.2. Molekularni podtipovi carcinoma dojke

Prema konsenzusu sa *St Gallen* konferencije (2015) i preporukama ESMO, definisani su molekularni podtipovi carcinoma dojke (39) koji su prikazani u tabeli 5.

**Tabela 5.** Molekularni podtipovi carcinoma dojke

Podtip	Kliničko-patohistološka definicija	Komentar
<b>Luminalni A</b>	Luminal A-like ER pozitivan HER2 negativan Ki-67 nizak PR visok	Preporučene vrednosti za PR i Ki-67 su 20% i mogu se razlikovati između referentnih laboratorija.
<b>Luminalni B</b>	Luminal B-like ER pozitivan HER2 negativan Ki67>20% ili PR nizak Luminal B-like ER pozitivan HER2 pozitivan Bilo koji Ki67 Bilo koji PR	
<b>HER2 pozitivni</b>	HER2 pozitivan (neluminalni) HER2 pozitivan ER i PR negativan	
<b>Basal-like</b>	Trostruko negativan (duktalni) ER i PR negativan HER2 negativan	Oko 80% trostruko negativnih su basal-like; Trostruko negativni uključuju i neke specifične histološke tipove (tipični medularni, adenoidni cistični karcinom) sa niskim rizikom za nastanak udaljenih metastaza.

## 2.4.3. Određivanje kliničkog stadijuma carcinoma dojke

Za određivanje kliničkog stadijuma carcinoma dojke najčešće se koristi TNM klasifikacija koja uključuje veličinu tumora (T), status regionalnih limfnih nodusa (N) i prisustvo udaljenih metastaza (M) (40) (Tabela 6).

**Tabela 6.** TNM klasifikacija karcinoma dojke

<b>T- Primarni tumor</b>	
TX	primarni tumor se ne može proceniti
T0	primarni tumor nije dokazan
Tis	karcinom <i>in situ</i>
Tis(DCIS)	duktalni karcinom <i>in situ</i>
Tis(LCIS)	lobularni karcinom <i>in situ</i>
Tis(Paget)	Pagetova bolest bradavice bez tumora
T1	tumor $\leq 2$ cm
T1mic	mikroinvazija $\leq 0,1$ cm
T1a	tumor $>0,1$ cm, ali ne veći od 0,5cm
T1b	tumor $>0,5$ cm, ali ne veći od 1cm
T1c	tumor $>1$ cm, ali ne veći od 2cm
T2	tumor $>2$ cm, ali ne veći od 5cm
T3	tumor $>5$ cm
T4	tumor bilo koje veličine sa direktnom ekstenzijom na kožu i zid grudnog koša
T4a	ekstenzija u zid grudnog koša, isključujući pektoralni mišić
T4b	edem sa fenomenom „kore od pomarandže”, ili ulceracija na koži dojke, ili istostrani satelitski nodusi u koži
T4c	T4a i T4b
T4d	inflamatorni karcinom
<b>Regionalni limfni nodusi (N)</b>	
NX	regionalni limfni nodusi se ne mogu proceniti
NO	nema regionalnih limfonodalnih metastaza
N1	metastaza u pokretnom istostranom limfnom nodusu/nodusima (1–3 nodusa), ili u limfnom nodusu/nodusima duž unutrašnje mamarne arterije
N2	metastaze u istostranim limfnim nodusima (4–9 nodusa) koji su fiksirani ili spojeni, ili, u odsustvu aksilarnih metastaza, klinički vidljiv metastatski limfni nodus/nodusi duž unutrašnje mamarne arterije
N2a	metastaza u istostranom limfnom nodusu/nodusima fiksirane međusobno ili za okolne strukture
N2b	metastaza samo u klinički evidentnom istostranom nodusu/nodusima oko unutrašnje mamarne arterije, u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim nodusima
N3	metastaza u istostranom infraklavikularnom ili supraklavikularnom limfnom nodusu/nodusima, sa ili bez zahvatanja aksilarnih limfnih nodusa, ili u limfnom nodusu/nodusima duž mamarne arterije, uz metastaze u aksilarnim limfnim nodusima
N3a	metastaza u istostranom infraklavikularnom limfnom nodusu/nodusima
N3b	metastaza u istostranom limfnom nodusu/nodusima aksile i duž unutrašnje mamarne arterije
N3c	metastaza u istostranom supraklavikularnom limfnom nodusu/nodusima
<b>M</b>	
Mx	udaljene metastaze se ne mogu proceniti
M0	nema udaljenih metastaza
M1	prisutne udaljene metastaze

Patohistološka klasifikacija regionalnih limfnih nodusa (pN) prikazana je u tabeli 7.

**Tabela 7.** Patohistološka klasifikacija regionalnih limfnih nodusa (pN)

pNX	regionalni limfni nodusi se ne mogu proceniti (nisu uklonjeni radi ispitivanja ili su prethodno uklonjeni)
pN0	regionalni limfni nodusi bez metastaze
pN1	mikrometastaze ili metastaza u 1 do 3 istostrana aksilarna limfna nodusa, odnosno istostranim unutrašnjim nodusima dojke sa metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog nodusa, ali klinički nije očigledna
pN1mi	mikrometastaza (veća od 0,2 mm i/ili više od 200 ćelija, ali ne veće od 2 mm)
pN1a	metastaza u 1 do 3 aksilarna limfna nodusa, uključujući bar jedan čija najveća dimenzija prelazi 2 mm
pN1b	unutrašnji limfni nodusi dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog nodusa, ali koja klinički nije očigledna;
pN1c	metastaza u 1 do 3 limfna nodusa, a unutrašnji limfni nodusi dojke sadrže mikroskopsku metastazu otkrivenu disekcijom stražarskog limfnog nodusa, koja nije klinički očigledna;
pN2	metastaza u 4–9 istostranih aksilarnih limfnih nodusa, ili klinički očigledan limfni nodus duž mamarije interne u odsustvu aksilarnih limfonodalnih metastaza
pN2a	metastaza u 4–9 aksilarnih limfnih nodusa, uključujući bar jedan koji je veći od 2 mm
pN2b	metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom nodusu/nodusima dojke, u odsustvu metastaze aksilarnog limfnog nodusa
pN3	metastaze opisane kao:
pN3a	metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih nodusa (od kojih je bar jedan veći od 2 mm) ili metastaza u infraklavikularnim limfnim nodusima;
pN3b	metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom nodusu/nodusima dojke u prisustvu pozitivnog aksilarnog limfnog nodusa, ili metastaza u više od 3 aksilarna limfna nodusa i u unutrašnjim limfnim nodusima dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog nodusa, a koja nije klinički očigledna
pN3c	metastaza u supraklavikularnom limfnom nodusu/nodusima.

Stadijumi karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji (41) prikazani su u tabeli 8.

**Tabela 8.** Stadijumi karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji

Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I A	T1	N0	M0
Stadijum I B	T0, T1	N0mi	M0
Stadijum II A	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	
Stadijum II B	T2	N1	M0
	T3	N0	
Stadijum III A	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	
Stadijum III B	T4	N0, N1, N2	M0
Stadijum III C	bilo koji T	N3	M0
Stadijum IV	bilo koji T	bilo koji N	M1

## 2.5. OSNOVNI TERAPIJSKI PRINCIPI U LEČENJU KARCINOMA DOJKE

Lečenje karcinoma dojke je multidisciplinarno, a odluku o načinu lečenja treba da donese tim lekara koji čine: hirurg, onkolog, patolog i radioterapeut na Konzilijuzmu za karcinom dojke. Dugo je osnovni oblik lečenja karcinoma dojke bilo hirurško lečenje uz primenu mutilantnih operacija, kao što je bila klasična radikalna mastektomija po Halstedu ili proširene radikalne hirurške intervencije. Zahvaljujući brojnim saznanjima o biološkim karakteristikama tumora, razvoju novih dijagnostičkih procedura, unapređenju hemioterapije, razvoju radioterapijske opreme i ciljanom "target" pristupu, danas je znatno unapređeno lečenje pacijentkinja sa karcinomom dojke. Osnovni oblici lečenja karcinoma dojke su: hirurška terapija, radioterapija, hemioterapija i hormonoterapija.

Primarni oblik lečenja karcinoma dojke je hirurško lečenje. Osnovne principe hirurškog lečenja karcinoma dojke postavio je Halsted još krajem 19. veka, a radikalna mastektomija po Halstedu dugo je bila osnovni vid hirurškog lečenja karcinoma dojke. Danas se prednost daje modifikovanim radikalnim mastektomijama kod invazivnih karcinoma dojke uz disekciju istostrane pazušne jame.

Osnovne indikacije za mastektomiju su: difuzni ili multicentrični karcinom dojke, kontraindikacije za primenu radioterapije, neadekvatan odgovor na preoperativno primenjenu radioterapiju, trudnoća, očekivani loš estetski efekat poštedne procedure i drugo.

Razvoj tzv. poštedne hirurgije (*Breast Conserving Treatment BCT*), zadnje decenije, znatno je izmenio principe hirurškog lečenja karcinoma dojke. Osnovna strategija poštednih hirurških procedura je uklanjanje tumorske mase uz poštovanje linije resekcije i primenu umerenih doza radioterapije u svrhu eradikacije eventualno prisutnog rezidualnog karcinoma. Poštedne hirurške procedure mogu se izvesti kod nepalpabilnih tumora (T0, Tis, N0, M0), odnosno u nultom stadijumu, zatim kod T1a, T1b, T1c, N0, M0 (prvi stadijum), kao i kod T1 N1 M0, i malih T2 tumora (manjih od 30 mm) (3, 12). Pored uklanjanja primarnog tumora, ova procedura podrazumeva i biopsiju sentinel limfnih nodusa (SLN) i disekciju limfnih nodusa istostrane aksile. Poštedna hiruška intervencija može se izvesti i kod većih tumora (preko 30 mm), nakon sprovođenja neoadjuvantne terapije i adekvatnog odgovora, sa smanjenjem primarnog tumora za 50% volumena (12).

Radioterapija se primenjuje za lokalni tretman karcinoma dojke nakon poštednih operacija i mastektomija, kao i kod lokalno uznapredovalih tumora i metastatske bolesti. U novije vreme primenjuje se i u početnim stadijumima bolesti. Zračenje može biti usmereno na zid grudnog koša i regionalne limfne noduse. Sa povećanjem broja žena kod kojih je karcinom dojke otkriven u ranijem stadijumu, povećao se i broj poštednih hirurških procedura nakon kojih sledi lokalna radioterapija.

Oko 70% karcinoma dojke je hormonski zavisno, tako da hormonska terapija zauzima značajno mesto u lečenju karcinoma dojke. Hormonska senzitivnost se procenjuje na osnovu statusa estrogenskih (ER) i progesteronskih receptora (PR). Primarna hormonska terapija podrazumeva korišćenje Tamoxifena, koji predstavlja standard u primeni hormonoterapije kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Tamoxifen smanjuje rizik od relapsa bolesti za oko 50%, smanjuje pojavljivanje karcinoma u kontralateralnoj dojci za 37% i rizik od smrtnog ishoda za oko 26%. Poseban efekat ima kod pacijentkinja u premenopauzi (2).

Koriste se i drugi oblici hormonoterapije kao što su anti-estrogeni, inhibitori aromataze, progestageni i drugi (2, 12).

Adjuvantna hemioterapija (AHT) koristi se u kliničkoj praksi radi poboljšanja stope preživljavanja operisanih pacijentkinja sa ciljem izlečenja ili odlaganja pojave udaljenih metastaza. Efikasnost adjuvantne hemioterapije (terapijski odgovor) procenjuje se na osnovu trajanja preživljavanja bez bolesti (slobodni interval) i trajanja ukupnog preživljavanja. Da bi se primenila AHT potrebno je znati koliki je desetogodišnji rizik za relaps bolesti. Prema

zbirnim podacima, desetogodišnje preživljavanje bez bolesti u nodus negativnoj grupi iznosi 60–90%, a u nodus pozitivnoj grupi 10–60%, bez obzira na životno doba i status steroidnih receptora. Opšte je prihvaćen stav da adjuvantnu sistemsku terapiju treba primeniti kod svih pacijenkinja kod kojih je desetogodišnji rizik za pojavu relapsa bolesti viši od 10%.

Postoje različiti protokoli za primenu AHT, kao što su CMF, CEF, FAC, CAF i drugi. Sa napretkom u razumevanju biologije tumora otvaraju se i nove mogućnosti u adjuvantnom lečenju ranog karcinoma dojke. Veliki napredak učinjen je primenom humanizovanog monoklonskog antitela na HER2/neu. Anti HER2 terapija danas ima široku primenu i predstavlja model za primenu "ciljanih agenasa" u adjuvantnoj terapiji karcinoma dojke. Mnogo se očekuje i od istraživanja efekata drugih agenasa u terapiji karcinoma dojke, kao što su tirozin-kinaza modulatori, modulatori receptora epidermalnog faktora rasta, substance koje inhibiraju angiogenezu i drugi (12, 42).

## 2.6. PROGNOŠTIČKI FAKTORI

Prognoštički faktori su od posebnog značaja za procenu agresivnosti tumora i opšte prognoze bolesti. Mogu imati i prediktivni značaj u izboru najbolje terapijske opcije.

U standardne prognoštičke faktore spadaju: faktori vezani za pacijentkinju (na primer starost ili menopauzni status), faktori vezani za tumor (veličina tumora, histološki tip tumora, status aksilarnih limfnih nodusa, histološki i nuklearni gradus tumora, status estrogenskih i progesteronskih receptora (ER/PR), ekspresija receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2) i proliferativni Ki-67 indeks.

U novije prognoštičke faktore, koji su još uvek predmet istraživanja, spadaju: indeksi ćelijske proliferacije (indeks obeležavanja timidina, frakcija ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa određena *flow* citometrijom), faktori rasta i receptori (receptor epidermalnog faktora rasta – EGFR, IGF-IR, somatostatinski receptor), tumor-supresor geni (p53, nm23) i ostali faktori (*heat shock* proteini-hsp 27, pS2, cathepsin D, plazminogen aktivatori i inhibitori, laminin receptor i angiogeneza) (12, 43).

### **3. KANCERSKE MATIČNE ĆELIJE**

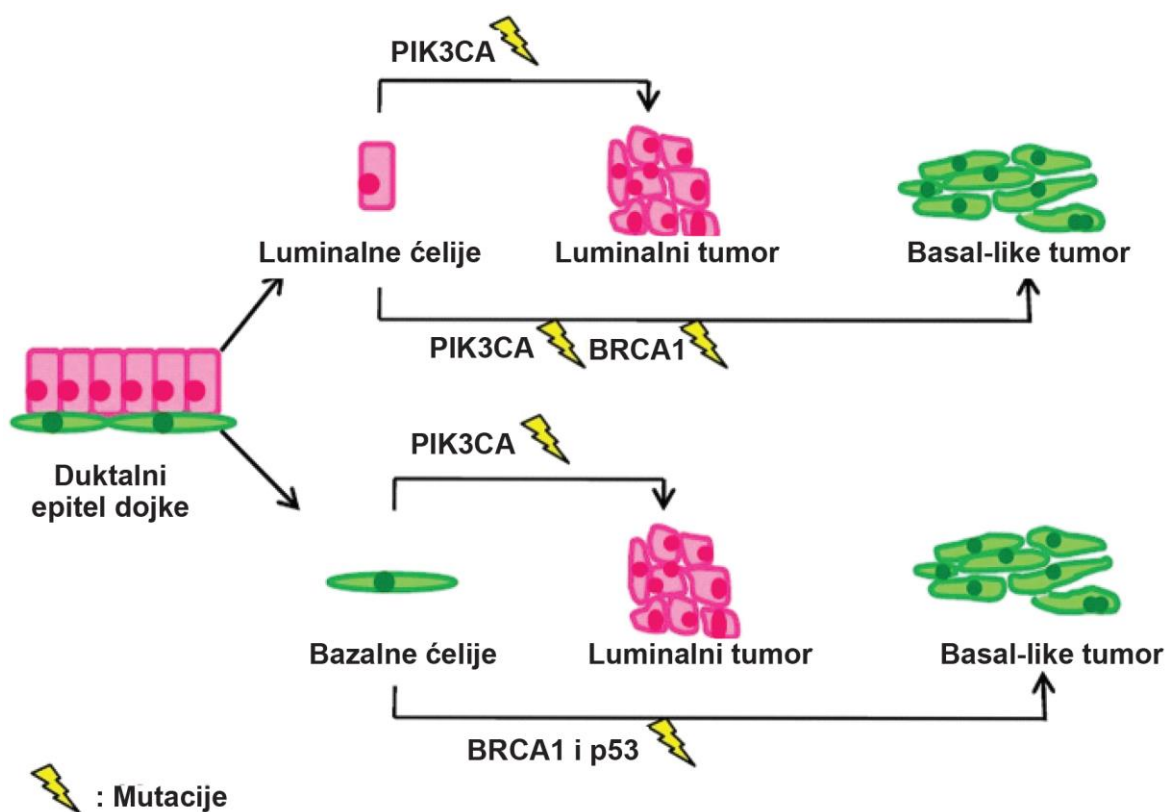
#### **I MOLEKULARNI MARKERI KARCINOMA DOJKE**

##### **3.1. KANCERSKE MATIČNE ĆELIJE I MOLEKULARNI PODTIPOVI KARCINOMA DOJKE**

Najnoviji literaturni podaci ukazuju na postojanje male subpopulacije kancerskih matičnih ćelija (eng. *Cancer stem cells* – CSCs) koje čine manje od 1% primarnih tumora. CSCs u različitim primarnim tumorima imaju sposobnost da se samoobnavljaju dajući kancerske matične ćelije ćerke i da se diferentuju dajući dominantnu populaciju kancerskih ćelija bez svojstava matičnosti (*non-stem cells*) (44, 45). CSCs se, kao ćelije sa svojstvima matičnosti, mogu razmatrati kao prave matične ćelije. Normalne matične ćelije u adultnim tkivima održavaju integritet tkiva i one su od esencijalnog značaja za regeneraciju tkiva. Takođe, CSCs predstavljaju populaciju ćelija odgovornu za regeneraciju kancerskog tkiva. Iako CSCs ekspimiraju pojedine gene, odnosno sintetišu proteine koji su poput onih u normalnim stem ćelijama, njihova deoba i sposobnost da se diferentuju značajno se razlikuje (46–48). U uslovima hipoksije, deficita hranljivih materija i oksidativnog stresa, CSCs pokazuju izmenjenu ekspresiju gena što doprinosi tome da postanu jako mobilne, invazivne i rezistentne na prateće stresove. U dojci ćelije sa svojstvima matičnosti nazivaju se “*breast cancer stem cells*” (BCSCs). BCSCs imaju sposobnost da stvaraju nove ćelije ćerke sa svojstvima matičnosti i da se diferentuju u kancerske ćelije (49, 45). BCSCs fenotip je specifičan i karakteriše se ekspresijom glavnih pluripotentnih faktora (molekularnih markera), uključujući OCT4, KLF4, SOX2 i NANOG (50).

Karcinom dojke je kompleksna bolest i uprkos primeni kombinovanog lečenja, kao što je hirurško lečenje, radioterapija i hemoterapija, mnoge pacijentkinje će na kraju razviti metastatsku bolest. Još uvek nema efikasne strategije kako bi se prevenirala pojava metastaza (49). Podaci iz literature ukazuju na sposobnost BCSCs da formiraju sekundarni (rekurentni ili metastatski) tumor. Razumevanje molekularnih mehanizama koji regulišu BCSCs je neophodno kako bi se bolje razumela pojava metastaza i kako bi se odredio efikasniji terapijski protokol. Iako je u mnogim studijama identifikovano prisustvo BCSCs na osnovu ekspresije molekularnih markera, konsenzus o njihovom fenotipskom profilu još uvek nije

postignut. Ovo nije iznenađujuće s obzirom na to da je karcinom dojke heterogena bolest, uzrokovana tumorima različitih histoloških podtipova, sa različitim molekularnim potpisom i različitom kliničkom prezentacijom. Na osnovu globalne ekspresije gena, karcinom dojke je podeljen u pet glavnih molekularnih podtipova: luminalni A, luminalni B, HER2 +, bazalni i normalni *breast like* podtip karcinoma dojke (Slika 1). Svaki molekularni podtip pokazuje specifičan klinički tok i terapijski odgovor (51).



**Slika 1.** Molekularni podtipovi karcinoma dojke  
Prizeto iz Jiaojiao Z. et al. Front Oncol. 2019; 9: 820 (45)

Pored intertumorske heterogenosti, postoji i visok stepen intratumorske raznolikosti. Jedan tumor u bilo kom trenutku može da sadrži populacije tumorskih ćelija sa različitim molekularnim profilima i biološkim svojstvima. Intratumorska heterogenost je već prisutna u fazi dukalnog karcinoma *in situ* (52). U karcinomu dojke utvrđena je heterogenost i u populaciji BCSCs. To je potvrdilo istraživanje Park-a i saradnika koji je analizirao 12 molekularnih markera u gotovo 400 dukalnih karcinoma dojke. Istraživanjem su obuhvaćeni invazivni dukalni karcinomi (IDC), IDC sa dukalnim karcinomom *in situ* (DCIS), DCIS sa mikroinvazijom i čisti DCIS. Utvrđeno je da su karcinomi dojke često pozitivni na markere stem ćelija i da njihova ekspresija varira u zavisnosti od podtipa tumora i stadijuma. Tako je ekspresija CD44 i EPCR bila niža u IDC u poređenju sa *in situ* tumorima, naročito u podtipu luminal A. ALDH1 pozitivne ćelije su češće detektovane u bazalnom i HER2+ podtipu nego u luminalnom podtipu karcinoma



dojke. CD44+/CD24- ćelije su detektovane u 69% svih tumora, sa 100% zastupljenošću u bazalnom podtipu i 52% u HER2+ tumorima (51).

BCSCs su znatno zastupljenije u podtipovima trostruko-negativnih karcinoma dojke (eng. *triple negative breast cancer* – TNBC) i HER2 pozitivnom. TNBC sadrže najveći udeo BCSCs, što doprinosi lošoj prognozi (53). Luminalni karcinom dojke ima najmanju zastupljenost BCSCs među svim podtipovima karcinoma dojke i najbolju prognozu. Ipak, prisustvo BCSCs se smatra glavnim uzrokom rezistencije na hormonsku terapiju kod luminalnog podtipa karcinoma dojke (54).

HER2 je ključni regulator BCSCs. Nedavna ispitivanja su pokazala da regulacija BCSCs od strane HER2 nije zapažena samo kod HER2+ karcinoma dojke, već kod svih podtipova. Do izvesne mere, izvanredna klinička efikasnost inhibitora HER-2 (npr. trastuzumab, pertuzumab, lapatinib i TDM-1) pripisana je ciljanoj terapiji na BCSCs (55).

Glavni signalni putevi koji regulišu BCSCs uključuju Vnt, Notch i Hedgehog. Inhibitori koji blokiraju ove signalne puteve poznati su kao BCSCs target terapija (45). Takođe je utvrđeno da BCSCs pokazuju rezistenciju na hemoterapiju ili radioterapiju i da predstavljaju rezidualnu ćelijsku populaciju koja je odgovorna za pojavu recidiva i metastaziranje tumora. Terapija karcinoma dojke karboplatinom, gemcitabinom ili paclitaksolom u *in vitro* ili *in vivo* uslovima povećava procenat BCSCs među ćelijama koje prežive (56, 57).

## 3.2. MOLEKULARNI MARKERI KARCINOMA DOJKE

### 3.2.1. KLF4

KLF4 je član porodice *Kruppel-like* transkripcionih faktora (KLFs) koji ima značajnu ulogu u brojnim biološkim procesima kao što su samoobnavljanje embrionalnih stem (ES) ćelija, ćelijska diferencijacija, reprogamiranje diferenciovanih ćelija u indukovane pluripotentne stem ćelije (iPSCs), apoptoza, onkogeneza i tumorska supresija (58,59). Uočeno je da KLF4 deluje zajedno sa drugim transkripcionim faktorima, uključujući OCT4, SOX2 i c-Mic, čija zajednička aktivnost dovodi somatske ćelije u stanje indukovanih pluripotentnih stem ćelija (iPSCs) (60).

Uloga KLF4 u karcinomu dojke ostaje kontraverzna. Xiang Song i saradnici su otkrili da karcinom dojke ima značajno niže vrednosti KLF4 proteina u odnosu na prekancerozne lezije, sugerišući da visoka ekspresija KLF4 ima inhibitorski uticaj na proliferaciju (61). U istraživanju Nagate i saradnika pacijenti sa TNBC i visokom ekspresijom KLF4 imali su bolje ukupno preživljavanje i preživljavanje bez simptoma bolesti u odnosu na pacijente sa nižom ekspresijom KLF4 (62).

Antiproliferativna funkcija KLF4 povezana je sa inhibicijom ciklina D1 koji je pozitivni regulator ćelijskog ciklusa i aktivacijom inhibitora ćelijskog ciklusa p21/Cip1 (63, 64). Suprotno tome, KLF4 suprimira ekspresiju tumor supresornog p53 direktno delujući na njegov promotor i uzrokujući rezistenciju na apoptozu zavisnu od p53 nakon oštećenja DNK. Deplecijom KLF4 iz ćelija karcinoma dojke dolazi do obnavljanja funkcije p53 i aktiviranja apoptoze zavisne od p53. Ovi rezultati rasvetljavaju ulogu KLF4 kao regulatora tumor supresornog p53, koji učestvuje u onkogenoj transformaciji u zavisnosti od statusa p21/Cip1. Iako status p21/Cip1 poput “prekidača” može odrediti supresorsku ili onkoproteinsku funkciju KLF4, tačan mehanizam još nije rasvetljen (65). Prema tome, uloga KLF4 u karcinomu je kompleksna. Interakcijom sa različitim ciljnim genima, KLF4 može funkcionisati kao onkogen, ali i kao tumor supresor, što je dokazano u različitim tumorima (66–68).

KLF4 je jedan od esencijalnih transkripcionih faktora koji je ključan za očuvanje BCSCs, kao i za proces ćelijske migracije i invazije. F Yu i saradnici otkrili su visoku ekspresiju KLF4 u populaciji CSCs primarnog tumora dojke miša i u ćelijskoj liniji karcinoma dojke. “Isključenje” KLF4 u ćelijskoj liniji (MCF-7 i MDA-MB-231) rezultiralo je smanjenjem broja stem/progenitorskih ćelija i supresijom ćelijske migracije i invazije. Pored toga, utvrđeno je da KLF4 pozitivno reguliše migraciju i invaziju kancerskih ćelija tako što aktivira Notch signalni put (69). I rezultati drugih autora ukazuju na to da CSCs podstiču formiranje krvnih sudova i da prekomerna ekspresija KLF4 može da pokrene migraciju i invaziju ćelija (70, 71).

Takođe, Klf4 ima antiapoptotsku funkciju u mnogim ćelijskim linijama karcinoma, tako da je moguće da smanjenje populacije CSCs nakon pada KLF4 može biti rezultat povećane apoptoze uzrokovane redukcijom KLF4 (70, 71).

Istraživanja su takođe pokazala da KLF4 može pospešiti epitelno-mezenhimnu tranziciju u karcinomu dojke. KLF4 interaguje sa transformišućim faktorom rasta-beta (TGF- $\beta$ ), dobro poznatim regulatorom EMT i beta-kateninom (72, 73). EMT dovodi do dediferencijacije kancerskih ćelije, uz povećanje njihove invazivnosti i diseminacije. Tokom EMT povećana je sekrecija ekstracelularnih proteaza, a redukovana ekspresija proteina ekstracelularnog matriksa, što dalje doprinosi invaziji kancerskih ćelija (74). Fedele i saradnici naglašavaju da se pojava mezenhimnog fenotipa u metastatskom karcinomu dojke uglavnom sreće kod bazalnog i *claudin low* podtipa koji pripada TNBC (75).

Utvrđeno je da KLF4 ima pozitivnu regulatornu ulogu u proliferaciji koju indukuje estrogen (76). Međutim, drugi istraživači ukazuju da KLF4 suprimira rast hormon zavisnog karcinoma dojke (77).

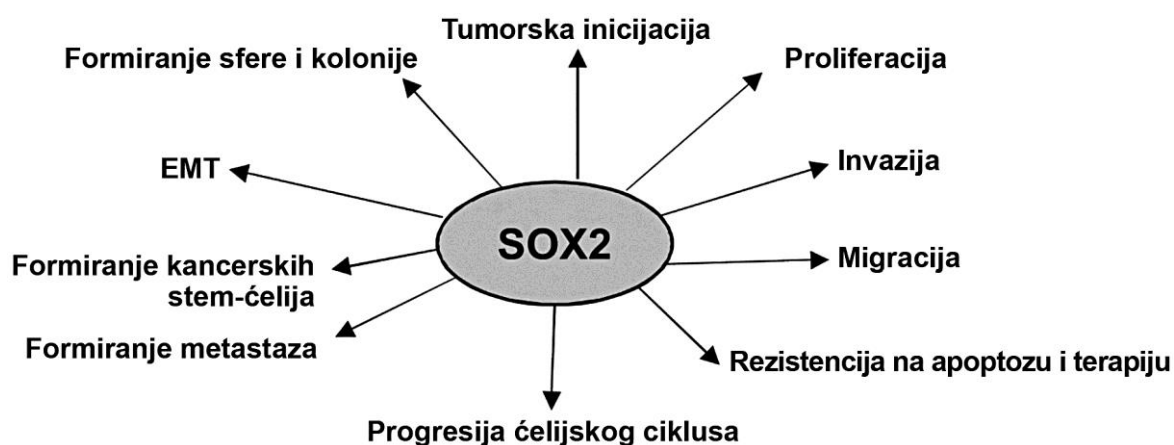
Iako tačan mehanizam delovanja KLF4 nije poznat, dosadašnja istraživanja ukazuju na njegovu ulogu u nastanku karcinoma dojke i prognozi ovog oboljenja.

### 3.2.2. SOX2

SOX2 je transkripcioni faktor koji pripada familiji SOX proteina, koja sadrži više od 20 članova. Oni regulišu specifične biološke procese, dok poremećaj njihove genske ekspresije može dovesti do razvoja karcinoma. Visoka ekspresija SOX2, SOX4, SOX5, SOX8, SOX9 i SOX18 otkrivena je u različitim karcinomima. Utvrđeno je da je njihova visoka ekspresija povezana sa lošom prognozom, dok je visoka ekspresija SOX11 i SOX30 indikator povoljnog ishoda kod pojedinih karcinoma (78).

Transkripcioni faktor SOX2 je esencijalan za razvoj tokom embriogeneze i ima presudnu ulogu u održavanju svojstava matičnosti embrionalnih ćelija i različitih populacija matičnih ćelija odraslih. Gen koji kodira ovaj protein nalazi se u polno determinišućem regionu Y (Sry) koji je vezan za HMG grupu gena, poznatijih kao grupa domena visoke mobilnosti (79). Humani SOX2 gen smešten je na hromozomu 3, na položaju q26.3–27 i kodira protein od 317 aminokiselina (80). Među svim SOX genima, SOX2 je verovatno najpoznatiji zbog svoje uloge u reprogramiranju somatskih ćelija u indukovane pluripotentne stem ćelije (81).

Pluripotentne matične ćelije zadržavaju svojstva matičnosti zahvaljujući transkripcionom jezgru kojeg čine SOX2, OCT4 i NANOG. Ova tri transkripciona faktora funkcionalno sarađuju, aktiviraju ekspresiju gena koji su povezani sa pluripotentnošću i suprimiraju ekspresiju gena povezanih sa diferencijacijom ćelija (82). Gubitak SOX2 može se donekle nadoknaditi prekomernom ekspresijom OCT4, što ukazuje na njihovu usku funkcionalnu povezanost (83).



**Slika 2.** Uloga SOX2 u karcinomu. SOX2 utiče na ćelije na različite načine i podstiče tumorogenezu i progresiju karcinoma. (EMT = epitelno-mezenhimna tranzicija).

Preuzeto iz Novak D, et al. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *J Mol Cell Biol*, 2020; 12: 85–98 (84).

Analiza ekspresije pluripotentnih gena u tumorima dojke pokazala je da prekomerna ekspresija SOX2 utiče na povećano formiranje mammosfere u kulturi tkiva. „Isključivanje” SOX2 sprečilo je stvaranje mammosfere i odložilo je stvaranje tumora u modelima pokretanja ksenografta. Uticaj drugih transkripcijskih faktora, OCT4 ili Nanog, na formiranje mammosfere u kulturi nije utvrđen. Ovi nalazi ukazuju da reaktivacija SOX2 predstavlja rani događaj u inicijaciji tumora dojke i da se stvaranje tumora može dogoditi u bilo kojoj ćeliji tokom diferencijacije dojke (85, 86). Pored toga, SOX2 ima ulogu u nastanku CSCs, proliferaciji, migraciji, invaziji, EMT, rezistenciji na apoptozu i razvoju metastaza (slika 2).

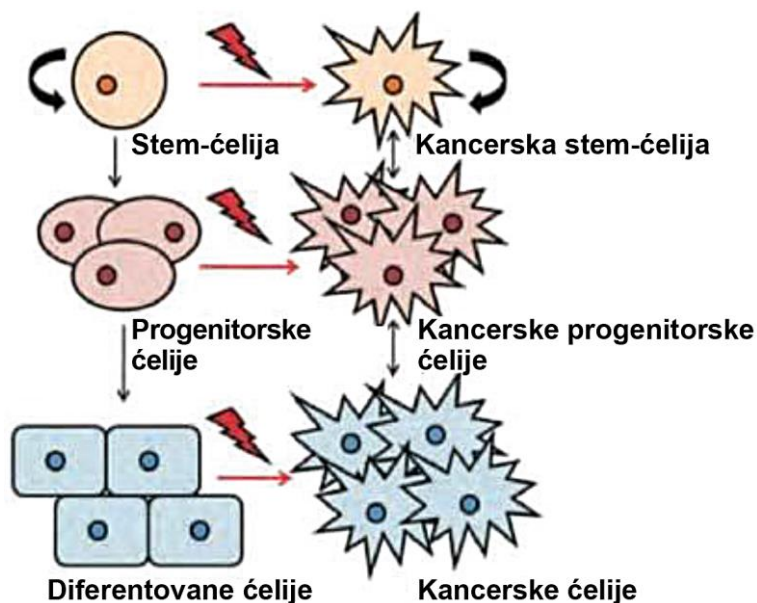
Peng Liu i saradnici utvrdili su povezanost visoke ekspresije SOX2 sa kraćim ukupnim preživljavanjem i intervalom bez simptoma bolesti kod pacijentkinja sa TNBC. Inhibicijom SOX2 suprimira se ćelijska proliferacija i invazija, pokreće ćelijska apoptoza *in vitro* i suprimira tumorogenost i pojava metastaza *in vivo*. Utvrđeno je da SOX2 promovira nastanak tumora u TNBC i da je SOX2 dragoceni prognostički i terapijski biomarker, gde se inhibicija SOX2 može koristiti kao potencijalna target terapija u TNBC (87).

### 3.2.3. OCT3/4

OCT (OCT3/4 ili POU5F1) je član POU familije transkripcijskih faktora, koji ima ključnu ulogu tokom rane embriogeneze sisara zbog svoje uloge u regulaciji samoobnavljanja i pluripotentnosti embrionalnih stem ćelija (ESCs). Održavanje stanja nediferentovanosti pluripotentnih matičnih ćelija obezbeđuje se ushodnom regulacijom OCT3/4, dok se nishodnom regulacijom ESCs diferencijuju u somatske ćelije diferentovanog tkiva (88–90). Istraživanja su pokazala da je nivo ekspresije proteina OCT3/4 u ESCs važan za održavanje diferencijacije specifičnih ESCs i njihov dalji razvoj. Dvostruko povećanje ekspresije OCT3/4 dovodi do konverzije ESCs u primitivna endodermalna i mezodermalna tkiva, dok povećanje ekspresije OCT3/4 za 50% može dovesti do diferencijacije ESCs u trofoderm (91). De Jong i saradnici su otkrili da ektopična ekspresija OCT3/4 dovodi do povećanog malignog potencijala ESCs, čime je dokazana uloga OCT3/4 u ćelijskoj transformaciji (92). I drugi autori smatraju da matične ćelije odraslih mogu da predstavljaju mete karcinogeneze zbog suštinske uloge OCT4 u njihovim biološkim procesima (93).

Istraživanja su pokazala da BCSCs koje ekspimiraju OCT3/4, a koje su izolovane iz kancerskog tkiva, pokazuju svojstva stem/progenitornih ćelija. Istraživanje uticaja ektopične ekspresije OCT3/4 na somatska tkiva odraslih miševa pokazalo je da OCT3/4 dovodi do inhibicije diferencijacije ćelija na način koji je primećen u embrionalnim ćelijama, što dovodi do

displazije epitela tankog creva i epidermisa. Displastični rast zavisi od kontinuirane ekspresije OCT3/4, a displastične lezije pokazuju povećanje broja progenitorskih ćelija i povećanu transkripciju beta-kenina, što znači da i progenitorske ćelije mogu biti pokretači tumorogeneze. Takođe, aberantna ekspresija OCT3/4 u adultnim somatskim ćelijama može indukovati tumorogenezu (94, 95). Prema tome, meta tumorogeneze mogu biti normalne stem ćelije, progenitorske i diferentovane ćelije (slika 3) (96).



**Slika 3.** Neoplastična transformacija normalnih stem ćelija u kancer stem ćelije.

Kancerogeni inzulti mogu pogoditi ćeliju u bilo kom stadijumu diferencijacije ili pravcu razvoja. Ako pogode stem-ćeliju, novonastala kancerska stem-ćelija još uvek će biti sposobna da se obnavlja, uzrokujući rast populacije rezistentnijih kancerskih stem-ćelija. Ako do mutacija dođe u progenitorskim ili diferentovanim ćelijama, novonastale kancerske ćelije mogu ponovo steći kapacitet da se samoobnavljaju.

Preuzeto iz Federici G, et al. Breast Cancer Stem Cells: A New Target for Therapy. *Oncology Journal* 2011; (96).

Prognostički značaj OCT3/4 u karcinomu dojke proistekao je iz saznanja da tumori sa visokom ekspresijom OCT3/4 češće daju metastaze i da su povezani sa kraćim vremenom preživljavanja u poređenju sa tumorima koji su imali nisku ekspresiju ovog transkripcionog faktora. Takođe, prekomerna ekspresija OCT3/4 praćena je pojavom kasnih recidiva nakon primene hemo i zračne terapije (97–99). Ponovna ekspresija OCT3/4 u matičnim ćelijama različitih karcinoma dovodi do ekspanzije tumorskih matičnih ćelija koje su rezistentne na hemoterapiju i dolazi do pojave recidiva. Precizno razumevanje molekularnih mehanizama regulacije OCT3/4, a posebno njegovog “uključenja” ili “isključenja” u tkivima, u zavisnosti od

mikrosredine, i dalje je izazov za fundamentalna istraživanja u regenerativnoj medicini i terapiji karcinoma (91).

Beltran i saradnici su otkrili da prekomerna ekspresija OCT4 cDNK u normalnom epitelu dojke dovodi do stvaranja klonalnih ćelija sa tumor inicirajućim svojstvima i sposobnošću samoobnavljanja. Tumor-inicirajuće ćelije pokazuju prekomernu ekspresiju onkogenih i gubitak tumor supresorne funkcije. Kada se te ćelije daju *NUDE* miševima nastaje trostruko negativan karcinom dojke, koji je slabo diferentovan. Ovakav genetski potpis je naročito prisutan kod *claudin low* podtipa karcinoma dojke. Ovo istraživanje ukazuje da OCT4 dovodi do ekspanzije ranih stem/progenitorskih ćelija i da aktivira embrionalne transkripcione faktore (100).

DNK sekvenciranjem otkriveno je više OCT4 genskih transkriptata na hromozomu 6 (POU5F1) u normalnom tkivu dojke i nemalignim ćelijskim linijama MCF-10. Za razliku od toga, tumori dojke i kancerske ćelijske linije dojke MCF-7 dominantno su ekspimirale transkripciju OCT4-like gena (POU5F1B) sa hromozoma 8, što je označeno kao Oct3. Podudarnost aminokiselinskog sastava lanaca OCT3 i OCT4 prisutna je u 96%. Rezultati su pokazali da se OCT3, umesto OCT4, može koristiti kao novi klinički marker i potencijalni target specifične genske terapije karcinoma dojke (101). Pojava metastaza u sentinel limfnom nodusu (SLN) ili nesentinel limfnim nodusima (non-SLNs), nakon kompletne disekcije aksile, značajno je povezana sa nivoom ekspresije OCT3/4. Verovatnoća pojave non-SLNs bila je veća u grupi sa višom ekspresijom OCT3/4 u odnosu na grupu sa negativnim nalazom OCT3/4. Univarijantna i multivarijantna analiza je pokazala da je nivo ekspresije OCT3/4 značajno povezan sa pojavom non-SLNs metastaza. Pacijenti sa višom ekspresijom POU5F1/Oct-4 imali su i veću verovatnoću pojave metastaza, što ukazuje na prediktivnu vrednost ovog markera u karcinomu dojke (102).

### 3.2.4. EZH2

EZH2, Enhancer of Zeste Homolog 2, je histonska metiltransferaza (HMTaza), koja je sastavni deo polycomb represivnog kompleksa (PRC) 2. EZH2 katalizuje formiranje trimetil grupa na lizinima, na poziciji 27 u histonu H3 (H3K27), što dovodi do utišavanja velikog seta gena. Svoju katalitičku aktivnost EZH2 ostvaruje putem SET domena, a da bi bio aktivan neophodna mu je kooperacija sa ostalim podjedinicama PRC2 kompleksa, EED i SUZ12. Pored svoje HMTazne aktivnosti, SET domen može da se vezuje i za duge nekodirajuće RNA (lncRNA) molekule. Formiranje EZH2-RNA kompleksa je od suštinskog značaja za ciljnu specifičnost PRC2 (103–105). EZH2 saraduje i sa DNK metiltransferazom, pa na taj način dovodi do trajnog utišavanja ekspresije gena putem metilacije, kao i sa histonskim deacetilazama, što

omogućava specifičnu modifikaciju histona. Zajednička aktivnost ovih epigenetskih regulatora u utišavanju ekspresije gena uključena je u procese ćelijske diferencijacije i zastoj ćelijskog ciklusa, kao i održavanje svojstava matičnosti u stem ćelijama tkiva i organa. Funkcionalna povezanost EZH2 sa DNK metilacijom i PRC1 je kritični događaji u obezbeđivanju dugotrajne epigenetske memorije (106–108).

Humani EZH2 gen nalazi se na hromozomu 7q35 i sadrži 20 egzona. EZH2 je obično lokalizovan u jedru, ali se može naći i u citoplazmi (109). EZH2 je usko povezan sa proliferacijom i nalazi se samo u ćelijama koje se dele (110). Deplecija EZH2 u kancerskim ćelijama indukuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa i inhibira proliferaciju ćelija (111, 112).

Brojna istraživanja su pokazala da EZH2 stimuliše razvoj i progresiju karcinoma, s obzirom na to da je prekomerna ekspresija prisutna u različitim karcinomima, kao što su karcinom prostate, dojke, bešike, želuca, jetre, pluća i pankreasa (111, 112, 113–117).

Koliko je kompleksna uloga EZH2 u tumorigenezi dojke pokazuju podaci da visoka ekspresija EZH2 izaziva izlazak BRCA1 tumor supresorskog proteina iz jedra i da indukuje pojavu aberantnih mitozama i genomsku nestabilnost. Mehanizam kojim EZH2 kontroliše intraćelijsku lokalizaciju BRCA1 proteina (u jedru ili citoplazmi) i genomsku stabilnost je aktiviranje Akt-1. Smanjenje nivoa EZH2 u ćelijama karcinoma dojke indukuje nuklearnu lokalizaciju BRCA1 i smanjenje mitotskih poremećaja (118).

### 3.2.5. CD44

CD44 je tip I transmembranskih glikoproteina koji deluje kao receptor za hijaluronsku kiselinu (HK) ekstracelularnog matriksa. Smatra se da je vezivanje CD44 za HK odgovorno za ćelijsku signalizaciju i regulisanje ostalih bioloških procesa unutar ćelija. CD 44, kao adhezioni molekul, posreduje u prenosu signala za receptor humanog epidermalnog faktora rasta (HER), tirozin kinase, heparan sulfat proteoglikana, kao i za neke faktore rasta. Ovaj protein je široko eksprimiran u gotovo svim ćelijama organizma. Može se naći u leukocitima, fibroblastima, epitelnim, mezodermalnim i neuroektodermalnim ćelijama (119). CD44 je receptor za razne stimule iz mikrookoline i utiče na ekspresiju gena koji regulišu procese kao što su ćelijska diferencijacija, adhezija (ćelija-matriks) i proces migracije, a koji su značajni za progresiju karcinoma. Sve navedeno svrstava glikoprotein CD44 u ćelijski multifunkcionalni adhezioni molekul (120, 121). CD44 ima više od 20 izoformi. Izoforme su poznate i kao varijante CD44 i označavaju se slovom "v" (CD44v). Varijante CD44 su prisutne u normalnim, ali i u patološkim ćelijama i mogu da učestvuju u regulisanju procesa ćelijske diferencijacije. Opisane su specifične varijante

CD44 u određenim metastatskim kancerskim ćelijama. Npr. CD44v6 je značajna u karcinomu dojke i kolorektalnom karcinomu (119). Rezultati studije u kojoj je ispitivan uticaj CD44 na karcinogenezu dojke i progresiju tumora, pokazali su prisustvo kvalitativne i kvantitativne promene u ekspresiji CD44 u ranom stadijumu karcinogeneze dojke (122).

Ekspresija CD44 je prisutna kako u normalnim stem ćelijama (SCs), tako i u CSCs. Upravo interakcija CD44-a sa njegovim glavnim ligandom HK utiče na funkciju ćelija sa svojstvima matičnosti. U koštanoj srži visoka ekspresija CD44 u mezenhimnim stem ćelijama olakšava kretanje ćelija preko ekstracelularnog vezivanja za HK. Nakon vezivanja CD44/HK najčešće dolazi do interakcije sa ekstracelularnim heparan sulfatom, što omogućava vezivanje CD44v3 sa faktorima rasta (npr. fibroblastni faktor rasta 2). CD44 učestvuje u prenošenju ćelijskog signala posredstvom vezivanja faktora rasta (123). Sa druge strane, CD44 može da interaguje sa integrinom, koji povezuje ekstracelularne adhezivne molekule sa intracelularnim aktinskim citoskeletom. Integrin generalno ima ulogu u signalizaciji između ćelija, diferencijaciji, proliferaciji i migraciji ćelija. Povezanost CD44 i integrina u ovim interakcijama navodi na pretpostavku da CD44 posreduje u funkciji integrina (124).

Istraživanja su pokazala da tumor supresori, kao što su p53 i microRNA 34a, u karcinomu dojke i prostate inhibiraju pojavu metastaza tako što deluju represivno na ekspresiju CD44 (125).

Većina autora smatra da interakcija CD44-a sa HK ima presudnu ulogu u kancerskoj invaziji. Antitela prema CD44 inhibiraju invaziju kancerskih ćelija u *in vitro* uslovima. Mehanizam kako HK utiče na invaziju nije jasan. Pronađena je povećana koncentrisanija HK u premalignim i malignim ćelijama u poređenju sa normalnim ćelijama, što podržava teoriju da CD44 ima ulogu u kancerskoj invaziji (126).

U studiji Olsson-a i saradnika, korišćenjem RT-PCR i Western blot tehnike, utvrđena je povezanost između ekspresije mRNA CD44 izoformi i CSCs fenotipa. Ovom tehnikom mereni su nivoi različitih izoformi CD44 u CSCs dojke i otkrivena je heterogena ekspresija u različitim ćelijskim linijama karcinoma dojke. Detektovana je visoka ekspresija izoforme CD44s u mezenhimskim ćelijskim linijama. Pored toga, utvrđeno je da CD44 remeti ekspresiju dobro poznatih onkogenih markera, kao što su HER2, ER i PR (127).

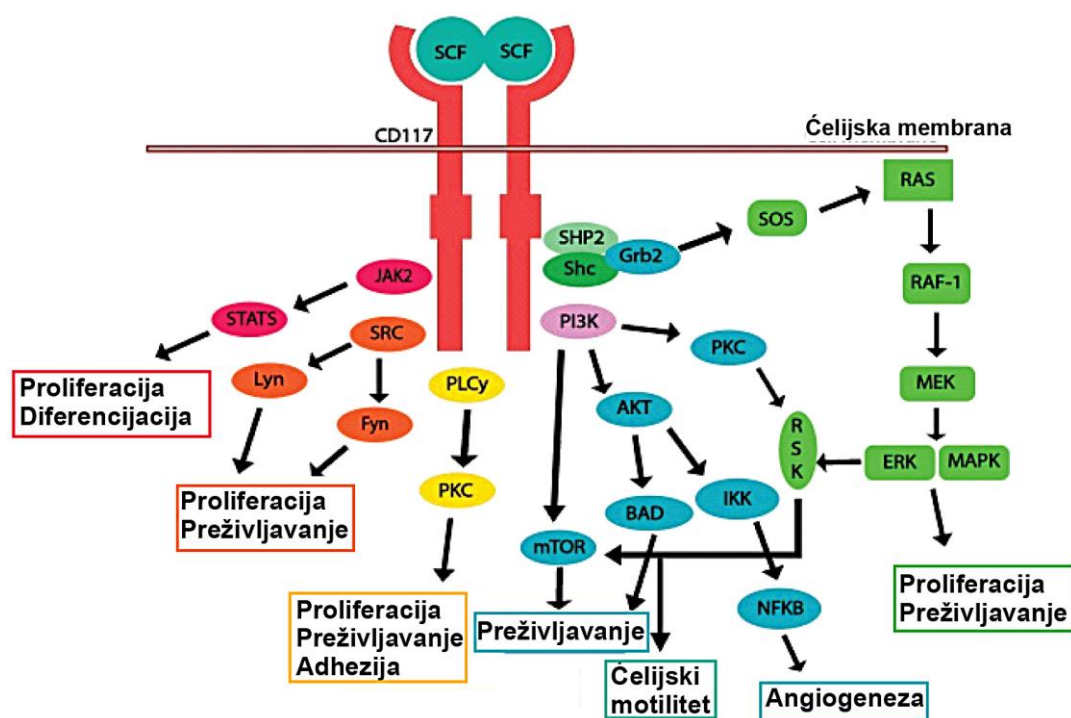
Najnovija istraživanja ukazuju da inflamatorni citokin OSM, koji pripada porodici IL-6, doprinosi ekspresiji CD44 u ER+ karcinomima dojke. Pored toga, izgleda da CD44 ima centralnu ulogu u OSM-indukovanom odvajanju tumorskih ćelija, ali ne i u EMT. Ovi rezultati ukazuju da je regulacija CD44 posredstvom OSM značajna za metastatsku kaskadu ER+ karcinoma dojke (128).



### 3.2.6. CD117

Gen CD117 poznat je kao "KIT proto-onkogeni receptor tirozin kinaze", c-kit, ili receptor stem ćelijskog faktora (SCF). Gen CD117 sastoji se od jedne kopije koja je smeštena na hromozomu 4 (4k12) i kodira protein od 976 aminokiselina. Protein CD117 je član porodice receptora tirozin kinaze tipa III (129–131).

CD117 se fiziološki eksprimira u hematopoetskim matičnim ćelijama, tkivnim mastocitima, germinativnim ćelijama, melanocitima, intersticijskim ćelijama Cajala i epitelu dojke. Aktivacija CD117 ostvaruje se vezivanjem njegovog vanćelijskog domena sa svojim ligandom, SCF. Neaktivni CD117 nalazi se na površini ćelije kao monomer, dok se SCF nalazi ekstracelularno kao dimer (132). Nakon vezivanja sa SCF, receptor CD117 formira homodimer, što rezultira autofosforilacijom specifičnih ostataka tirozina u intraćelijskom domenu i započinjanjem kaskadne signalizacije nekoliko puteva (JAK/STAT, RAS/MAP kinazni put, PI3 kinasu, PLC $\gamma$ , SRC put). Nakon autofosforilacije, CD117 se brzo ubikvitinizuje, što vodi do njegove degradacije (133–137).



**Slika 4.** Stimulacija signalnih puteva nakon aktivacije CD117

Preuzeto iz Brittni et al. *Biomedicines*. 2018; 6(1): 31 (131).

Ligand SCF, koji se vezuje za receptor CD117, indukuje dimerizaciju i nishodnu signalizaciju koja rezultira proliferacijom, diferencijacijom, opstankom, adhezijom, motilitetom i angiogenezom (slika 4). Onkogeni uticaj CD117 ostvaruje se prekomernom aktivacijom ili

mutacijama koje su nezavisne od liganda. Mutacije se najčešće javljaju u tirozin kinaznom domenu. Mutacije mogu nastati na različite načine, ali tumori retko kad pokazuju prisustvo više od jedne mutacije (131).

Ekspresija CD117 otkrivena je u različitim tumorima, uključujući gastrointestinalni stromalni tumor (GIST), karcinom dojke, jajnika, debelog creva, sitnoćelijski karcinom pluća, maligne tumore germinativnih ćelija, sarkome i melanom (138).

U istraživanju Medingera i saradnika ekspresija CD117 otkrivena je u karcinomu dojke (21%), kolorektalnom karcinomu (17%), sarkomu (35%), karcinomu bubrežnih ćelija (36%), karcinomu jajnika (17%) i hepatocelularnom karcinomu (17%). Kod ovih pacijenata prisutan je trend ka lošijoj prognozi, iako statistička značajnost nije dobijena (139).

Rezultati drugih istraživanja pokazuju da se CD117 nalazi u normalnom epitelu dojke, u proliferativnim lezijama i u karcinomu (1–13%). Utvrđeno je da sa malignom transformacijom epitela dojke dolazi do redukcije CD117 i veruje se da CD117 ima ulogu u karcinogenezi dojke (140, 141). Takođe, pojedina istraživanja ukazuju na to da ekspresija CD117 u invazivnom karcinomu dojke, bilo da je negativna ili pozitivna, mora biti prisutna u rutinskom izveštaju, s obzirom na to da negativan nalaz ima prognostičke implikacije, dok će pozitivan nalaz identifikovati pacijentkinje sa karcinomom dojke kod kojih se potencijalno može primeniti terapija inhibitorima tirozin kinase (142).

Luo i saradnici otkrili su da ekspresija CD117, mutacije tumorskog proteina TP53, kao i CD117 + / TP53 mutacija imaju uticaj na ukupno preživljavanje kod pacijentkinja sa TNBC podtipom karcinoma dojke. Međutim, ekspresija CD117 i mutacija TP53 zajedno u primarnom tumoru bile su nezavisni prognostički faktori preživljavanja pacijentkinja sa TNBC (143).

## 4. NAUČNA HIPOTEZA

Analiza ekspresije molekularnih markera predstavlja savremeni pristup u istraživanju karcinoma dojke, čiji bi rezultati bili od značaja za identifikaciju pacijenkinja sa visokim rizikom od lokoregionalnog širenja karcinoma i progresije bolesti. Iako rezultati dosadašnjih istraživanja molekularnih markera sa svojstvom matičnosti, KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44 i CD117, ukazuju na njihovu važnu ulogu u patogenezi i evoluciji karcinoma dojke, njihova precizna uloga i značaj još nisu u potpunosti razjašnjeni, a ponekad su i kontradiktorni. Na osnovu dosadašnjih saznanja i dostupnih literaturnih podataka o ulozi molekularnih markera (transkripcionih faktora i površinskih proteina) sa svojstvima matičnosti u patofiziološkim procesima invazivnog dukalnog karcinoma dojke, postavljena je sledeća radna hipoteza:

- Postoji značajna povezanost lokoregionalnog širenja invazivnog dukalnog karcinoma dojke i visoke ekspresije jednog ili više molekularnih markera (KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44, CD117) u kancerskim ćelijama;
- Postoji značajna povezanost molekularnog podtipa invazivnog dukalnog karcinoma dojke i visoke ekspresije određenih molekularnih markera;
- Visoka ekspresija većeg broja ispitivanih molekularnih markera, odnosno koekspresija molekularnih markera značajno korelira sa pojavom metastaza u limfnim nodusima aksile i/ili povećanjem broja i procentualne zastupljenosti metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa.

## 5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu visoku učestalost karcinoma dojke u kliničkoj praksi i značaj identifikacije faktora rizika za progresiju bolesti kod pacijentkinja sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke, kao najčešćim histološkim tipom, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati status limfnih nodusa aksile (prisustvo/odsustvo metastaza) i njegovu povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: starost pacijentkinja, lokalizacija i veličina tumora, histološki gradus tumora, Nottingham scor, proliferativni K-67 indeks (nizak/visok), kao i status ER (negativan/pozitivan), PR (negativan/pozitivan) i HER2 (negativan/pozitivan) receptora;
2. Ispitati status limfnih nodusa aksile (prisustvo/odsustvo metastaza) i njegovu povezanost sa molekularnim podtipovima invazivnog dukalnog karcinoma dojke – luminalnim A, HER2 pozitivnim i bazalnim;
3. Ispitati status limfnih nodusa aksile (prisustvo/odsustvo metastaza) i njegovu povezanost sa ekspresijom molekularnih markera – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44 i CD117 (niska/visoka) u kancerskim ćelijama invazivnog dukalnog karcinoma dojke;
4. Ispitati ekspresiju molekularnih markera – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44 i CD117 u kancerskim ćelijama invazivnog dukalnog karcinoma dojke (niska/visoka) i njenu povezanost sa kliničko-patološkim parametrima: starost pacijentkinja, lokalizacija i veličina tumora, status aksilarnih limfnih nodusa (negativan/pozitivan), pN stadijum aksilarnih limfnih nodusa, prosečan broj metastazama zahvaćenih limfnih nodusa aksile, procenat zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na broj pregledanih, histološki gradus tumora, Nottingham scor, proliferativni K-67 indeks (nizak/visok), kao i status ER (negativan/pozitivan), PR (negativan/pozitivan) i HER2 (negativan/pozitivan) receptora;
5. Ispitati koekspresiju pojedinačnih nuklearnih markera – KLF4, SOX2, OCT3/4 i EZH2 u kancerskim ćelijama invazivnog dukalnog karcinoma dojke (niska/visoka) i njenu povezanost sa kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma;
6. Ispitati koekspresiju membranskih markera – CD44 i CD117 u kancerskim ćelijama invazivnog dukalnog karcinoma dojke (niska/visoka) i njenu povezanost sa kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma;

7. Ispitati kliničko-patološke karakteristike i ekspresiju molekularnih markera u odnosu na molekularni podtip invazivnog dukalnog karcinoma dojke;
8. Ispitati uticaj kliničko-patoloških i molekularnih karakteristika (ekspresije molekularnih markera sa svojstvima matičnosti) invazivnog dukalnog karcinoma dojke kao prognostičkih parametara progresije bolesti i pojave metastaza u limfnim nodusima aksile.

## **6. MATERIJAL I METODE**

### **6.1. PACIJENTKINJE**

Istraživanjem je obuhvaćeno 136 pacijentkinja sa primarnim invazivnim duktalnim karcinomom dojke kod kojih je urađena radikalna mastektomija, u periodu od januara 2016. godine do decembra 2019. godine, na Klinici za endokrinu hirurgiju i hirurgiju dojke Kliničkog centra u Nišu. Patohistološka ispitivanja obavljena su u Centru za patologiju Kliničkog centra u Nišu.

Bazu podataka, koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem, činile su istorija bolesti ovih pacijentkinja i medicinska dokumentacija sa konzilijarnim odlukama Klinike za onkologiju Kliničkog centra u Nišu.

Pacijentkinje uključene u istraživanje nisu imale multicentrične i multifokalne tumore, udaljene metastaze, niti su dobijale neoadjuvantnu onkološku terapiju preoperativno. Sve pacijentkinje svrstane su u dve grupe na osnovu prisustva metastaza u aksilarnim limfnim nodusima (metastaze prisutne/odsutne), a na osnovu broja pozitivnih aksilarnih limfnih nodusa definisani su stadijumi aksilarnih limfnih nodusa (pN): pN0 (odsustvo metastaza), pN1 (prisustvo metastaza u 1–3 limfna nodusa), pN2,3 (prisustvo metastaza u 4 i više pregledanih limfnih nodusa). U grupi pacijentkinja sa metastazama izračunat je prosečan broj i procenat metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa. Procenat pozitivnih aksilarnih limfnih nodusa dobijen je kao odnos broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i ukupnog broja pregledanih limfnih nodusa.

### **6.2. METODE RADA**

Nakon hirurške intervencije, tkivo dojke i sadržaj aksile dostavljani su na patohistološku obradu.

#### **6.2.1. Patohistološka analiza**

Patohistološkom analizom biopsijskih uzoraka definisani su:

- histološki tip karcinoma;
- molekularni podtip karcinoma;
- stepen histološke diferentovanosti karcinoma – histološki gradus (G);
- pN stadijum aksilarnih limfnih nodusa;
- Nottingham scor;
- status estrogenskih (ER) i progesteronskih (PR) receptora;
- HER2 status;
- proliferativni Ki-67 indeks.

Patohistološka dijagnostika izvršena je na uzorcima tkiva dojke koji su fiksirani u 10% neutralnom formalinu, obrađeni u aparatu za automatsku obradu tkiva, ukalupljeni u parafin i sečeni na mikrotomu debljine 4 mikrometara. Histološki preseći celokupnog ukalupljenog materijala tumora i limfnih nodusa aksile bojeni su klasičnom hematoksilin-eopzin (HE) metodom i histopatološki analizirani. HE preseći primarnog dukalnog invazivnog karcinoma dojke korišćeni su za analizu stepena diferentovanosti tumora – histološki i nuklearni gradus, kao i za utvrđivanje Nottingham skora. Takođe, HE preseći limfnih nodusa iz aksile korišćeni su za utvrđivanje prisustva metastaza, kao i za određivanje broja pozitivnih limfnih nodusa (pN stadijum).

Nakon dijagnostike, dukalni invazivni karcinomi dojke su, na osnovu statusa ER, PR, HER-2 i proliferativnog Ki-67 indeksa, klasifikovani u tri molekularna podtipa: (1) luminalni A, tj. hormon zavisna grupa (ER+, PR+, Ki-67 indeks nizak); (2) HER2 pozitivni (pojačana ekspresija receptor 2 humanog epidermalnog faktora rasta, Ki-67 indeks visok); (3) bazalni podtip (ER-, PR-, HER2-, Ki-67 indeks visok). U navedenim molekularnim podtipovima invazivnog dukalnog karcinoma dojke ispitivan je status aksilarnih limfnih nodusa, kao i ostali predviđeni parametri.

### 6.2.2. Imunohistohemijska analiza

Sa odabranog reprezentativnog parafinskog kalupa primarnog invazivnog dukalnog karcinoma dojke svakog pojedinačnog slučaja, uzeti su preseći debljine 4 mikrometara na kojima je rađena imunohistohemijska analiza. Urađeni preseći su deparafinisani u ksilolu i rehidratirani u seriji etil alkohola opadajuće koncentracije. Proces demarkacije antigena za sva bojenja urađen je zagrevanjem histoloških preseka u rastvoru citratnog pufera (pH 6,0) ili u alkalnom rastvoru (pH 9,0), u zavisnosti od antitela, u mikrotalasnoj pećnici u trajanju od 20 minuta. Blokada aktivnosti endogene peroksidaze postignuta je nanošenjem rastvora 3% vodonik peroksida na svaki tkivni presek. Nakon detaljnog ispiranja u 0,01M fosfatnom puferu (PBS), preseći su inkubirani sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na +4°C u frižideru. Posle ispiranja u PBS-u, tkivo je inkubirano sa sekundarnim antitelom u trajanju od 10 minuta. Nakon ponovnog ispiranja u PBS-u sledila je inkubacija sa tercijalnim antitelom u trajanju od 15 minuta. Za vizualizaciju reakcije korišćen je tečni di-amino-benzidin-tetra-hlorid (DAB), a nakon toga izvršeno je kontrastiranje preseka bojenjem histoloških preseka Majerovim hematoksilinom. U sve imunohistohemijske procedure bile su uključene negativne kontrole gde je umesto primarnog antitela korišćen PBS pufer, dok su pojedine normalne strukture korišćene kao pozitivna interna kontrola.

Antitela koja su korišćena za imunohistohemijska ispitivanja prikazana su u tabeli 9.

**Tabela 9.** Karakteristike antitela korišćenih za imunohistohemijsku analizu

Antitela	Klon	Tip	Proizvođač	Razblaženje	Celularna lokalizacija
KLF4	ab215036	Zečje monoklonalno	Abcam	1:200	nuklearna
SOX2	ab97959	Zečje poliklonalno	Abcam	1:100	nuklearna
OCT3/4	ab181557	Zečje monoklonalno	Abcam	1:1000	nuklearna
EZH2	ab84989	Zečje poliklonalno	Abcam	1:250	nuklearna
CD44	Anti-Human CD44	Mišje monoklonalno	Dako	1:50	membranska
CD117	Anti-Human CD117, c-kit	Zečje poliklonalno	Dako	1:200	membranska

### Interpretacija i skoriranje imunohistohemijskih bojenja

Analiza i interpretacija imunohistohemijskih bojenja izvršena je pomoću svetlosnog mikroskopa Leica DM 1000. Pozitivan nalaz predstavlja braonkasto membransko i nuklearno prebojavanje. Za svaki od analiziranih markera određivan je procenat pozitivnih ćelija, odnosno broj tumorskih ćelija sa pozitivnom reakcijom u odnosu na celokupan broj tumorskih ćelija na svakom preseku. Intenzitet bojenja braon pigmenta gradiran je skalom od 0–3, gde je 0–odsustvo reakcije, 1–slabo prebojavanje, 2–bojenje umerenog intenziteta i 3–bojenje jakog intenziteta. Finalni skor imunohistohemijske analize ekspresije molekularnih markera dobijen je kao proizvod proporcije obojenog tumorskog tkiva i intenziteta bojenja.

Na osnovu literaturnih podataka, za ekspresiju svakog od ispitivanih markera određena je granična vrednost ekspresije, na osnovu koje su tumori klasifikovani u grupu sa visokom ili niskom ekspresijom markera. Tako je ekspresija KLF4, OCT3/4 i CD117 okarakterisana kao grupa sa visokom ekspresijom ako je tumor pokazivao ekspresiju navedenih markera u više od 10% tumorskih ćelija sa intermedijernim ili jakim intenzitetom bojenja. Ekspresija SOX2 definisana je kao visoka ukoliko je više od 1% kancerskih ćelija pokazivalo imunoreaktivnost (144, 145).

Ekspresija EZH2 određena je kombinovanim skorom procenta i intenziteta bojenja. Na osnovu srednje vrednosti skora za celokupnu ispitivanu grupu, tumori su podeljeni u grupu sa niskom i visokom ekspresijom (146).

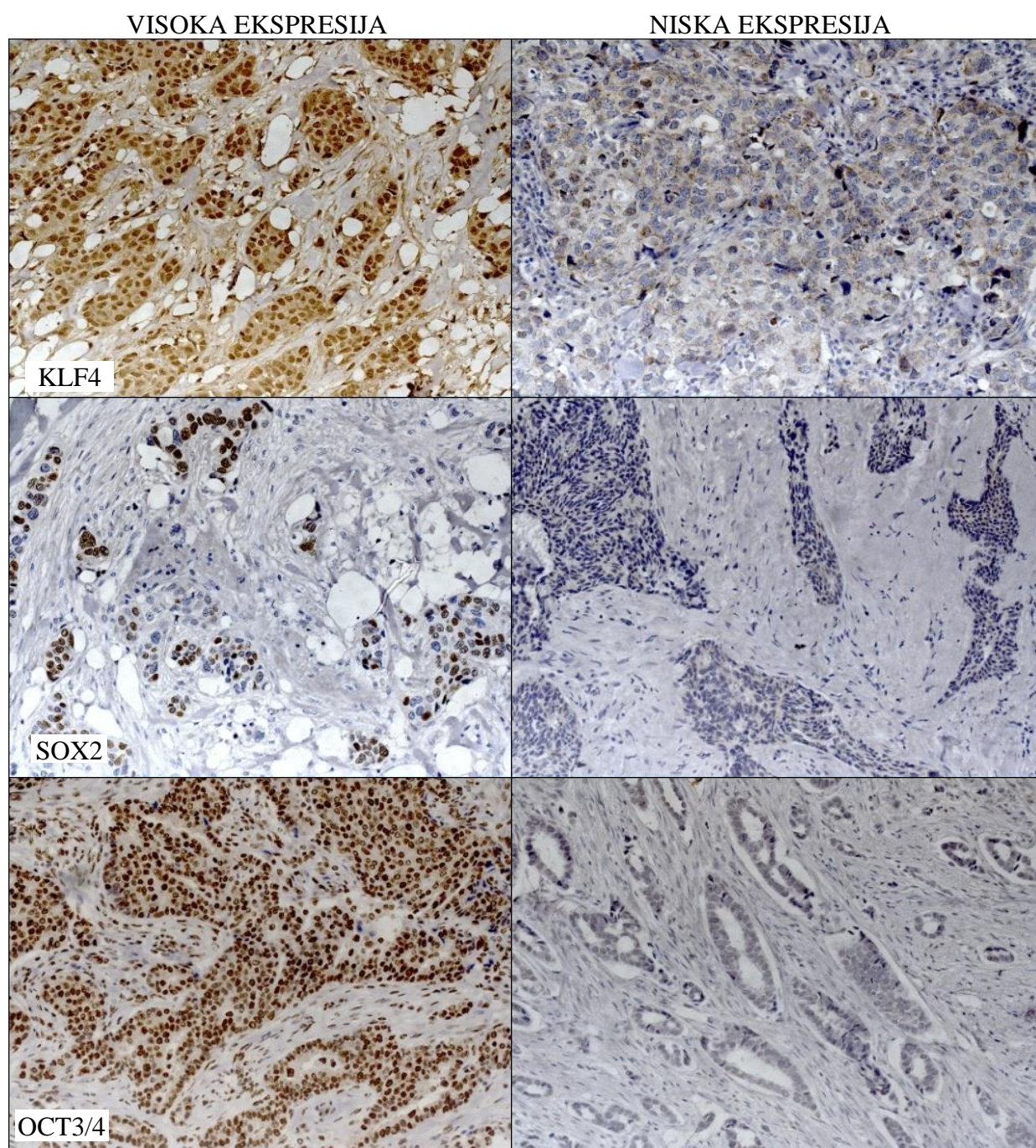
Ekspresija CD44 okarakterisana je kao visoka ako je tumor pokazivao ekspresiju u 50% ili više kancerskih ćelija, sa intermedijernim ili jakim intenzitetom bojenja (147).

Tumori sa niskom ekspresijom ispitivanih markera pokazivali su odsustvo imunohistohemijske reakcije (negativan nalaz) ili je pozitivnost bila manja od definisane granične vrednosti za svaki pojedinačni marker.



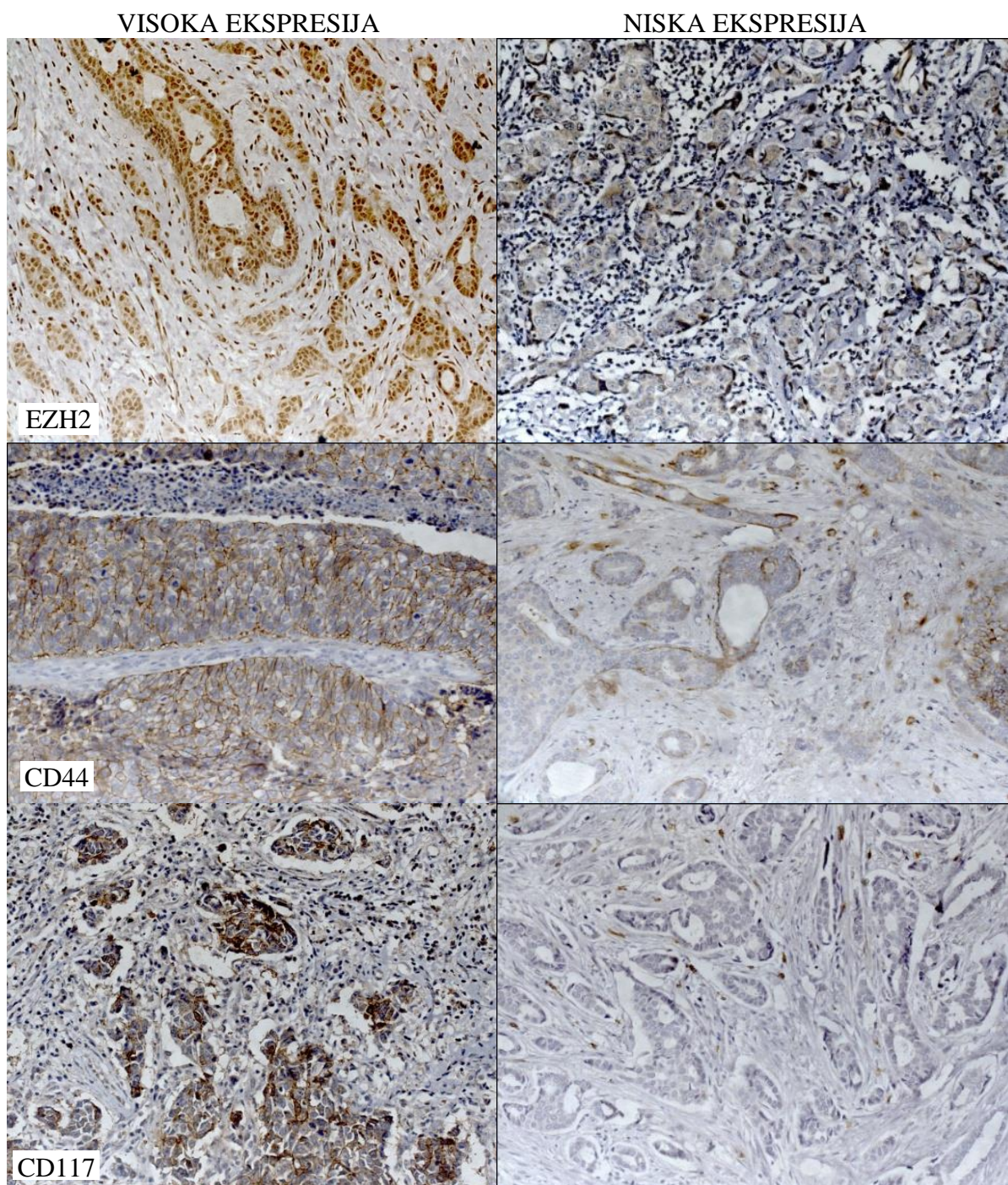
Broj alterisanih markera podrazumevao je prisustvo dva ili vise markera visoke ekspresije koji pripadaju nuklearnim i membranskim markerima.

Na slikama 5 i 6 prikazane su visoka i niska ekspresija KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2, CD44 i CD117 koje su detektovane imunohistochemijskim bojenjem.



**Slika 5.** Ekspresija KLF4, SOX2 i OCT3/4 u duktalnom karcinomu dojke.

Visoka nuklearna ekspresija KLF4, SOX2 i OCT3/4 prikazana je u levoj koloni  
(Originalno uvećanje  $\times 200$ ).



**Slika 6.** Ekspresija EZH2, CD44 i CD117 u duktalnom karcinomu dojke. Visoka nuklearna ekspresija EZH2 i visoka membranska ekspresija CD44 i CD117 prikazane su u levoj koloni (Originalno uvećanje  $\times 200$ ).

### 6.2.3. Statističke metode

Kvantitativna statistička analiza sprovedena je na računaru. Za upisivanje, rangiranje, grupisanje, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka korišćen je Excel program iz Microsoft Office 2010 programskog paketa. Proračuni su vršeni korišćenjem SPSS programa u verziji 18.0. U svim analizama je, kao granica statističke značajnosti, podrazumevana greška procene od 0,05 ili 5%.

Poređenje zastupljenosti pojedinih kategorija atributivnih obeležja između grupa vršeno je Hi kvadrat testom (Chi square test), ili Fišerovim testom (Fisher test) u slučajevima kada je neka od očekivanih frekvencija bila manja od 5.

Univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom ispitivana je povezanost pojedinih faktora sa verovatnoćom zahvaćenosti aksilarnih limfnih nodusa. Izračunavane su vrednosti odnosa verovatnoća za zahvaćenost i nezahvaćenost aksilarnih limfnih nodusa (odds ratio – OR) i granice njihovih 95% intervala poverenja (95% IP). U multivarijantnu analizu uključivani su svi ispitivani faktori, a zatim su primenom Valdove metode korak po korak unazad (Backward: Wald), iz modela isključivani oni faktori čija statistička značajnost nije potvrđena.

Univarijantnom i multivarijantnom linearnom regresionom analizom ispitivana je povezanost pojedinih faktora sa brojem i procentualnom zastupljenošću metastazama zahvaćenih limfnih nodusa. Izračunavane su vrednosti koeficijenata linearne korelacije (B) i granice njihovih 95% intervala poverenja (95% IP).

## 7. REZULTATI

### 7.1. KLINIČKO-PATOLOŠKE KARAKTERISTIKE KARCINOMA I STATUS AKSILARNIH LIMFNIH NODUSA

Ovim istraživanjem obuhvaćeno je 136 pacijentkinja sa invazivnim duktalnim karcinomom kojima je urađena radikalna mastektomija, prosečne starosti  $64,01 \pm 11,92$  (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija).

Karcinom je najčešće bio lokalizovan u gornjem spoljnom kvadrantu-GSK (55,1%), a zatim u gornjem unutrašnjem – GUK (17,6%) i centralnom kvadrantu – CK (17,6%). Većina pacijentkinja imala je karcinom T2 stadijuma, veličine od 20–50mm (50%). Karcinom T1 stadijuma, veličine do 20mm, otkriven je kod 32,4%, T4 kod 15,4%, a T3 stadijuma, veličine iznad 50mm, kod 2,2% pacijentkinja. Kod dve trećine pacijentkinja (66,2%) dijagnostikovano je karcinom umerenog stepena diferentovanosti – histološkog gradusa G2. Prosečna vrednost Nottingham scora iznosila je  $6,88 \pm 1,12$ , proliferativnog Ki-67 indeksa  $28,50 \pm 15,30$ , Er skora  $3,81 \pm 3,80$ , a PR skora  $3,43 \pm 3,51$ . Pozitivan status aksile, odnosno prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim nodusima utvrđeno je kod 56,6% pacijentkinja. Pacijentkinje sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima najčešće su imale tumor stadijuma T2 (50,6%), a zatim stadijuma T1 (26%) i T4 (23,4%).

Ispitivanjem statusa receptora (ER, PR, HER2) i proliferativnog Ki-67 indeksa kod pacijentkinja sa lokoregionalnim širenjem karcinoma dojke u aksilu dobijeni su sledeći rezultati: prosečna vrednost ER skora iznosila je  $3,71 \pm 3,83$ , PR skora  $3,31 \pm 3,48$ , a HER2+ ekspresija u tumoru otkrivena je kod 23,4% pacijentkinja. Prosečna vrednost proliferativnog Ki-67 indeksa iznosila je  $31,44 \pm 16,88$ .

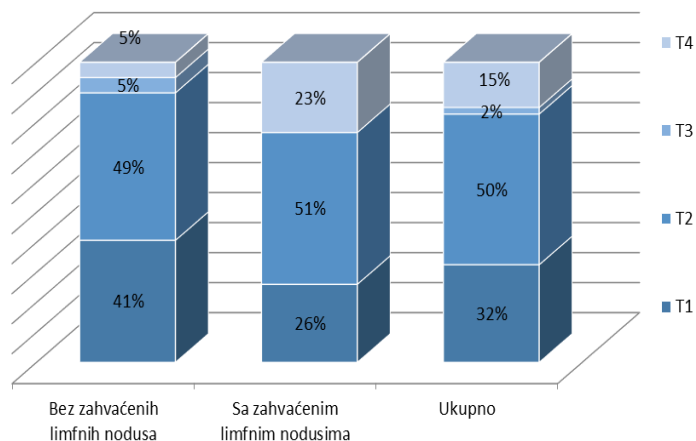
Komparativnom analizom kliničko-patoloških karakteristika karcinoma sa statusom aksilarnih limfnih nodusa, utvrđeno je da postoji značajna povezanost prisustva metastaza i tumora stadijuma T4 (23,4:5,1%; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ). Proliferativni Ki-67 indeks imao je značajno više vrednosti kod pacijentkinja sa pozitivnim statusom aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na one bez metastaza ( $31,44 \pm 16,88:26,25 \pm 13,66$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,049$ ). U odnosu na ostale ispitivane parametre, statistička značajnost nije dobijena.

Luminalni A podtip karcinoma dojke otkriven je kod 50,7%, bazalni podtip kod 26,5%, a HER2+ karcinom kod 22,8% pacijentkinja. Nije utvrđena statistički značajna korelacija molekularnog podtipa karcinoma i pojave metastaza u limfnim nodusima aksile (tabela 10, grafikoni 1 i 2).

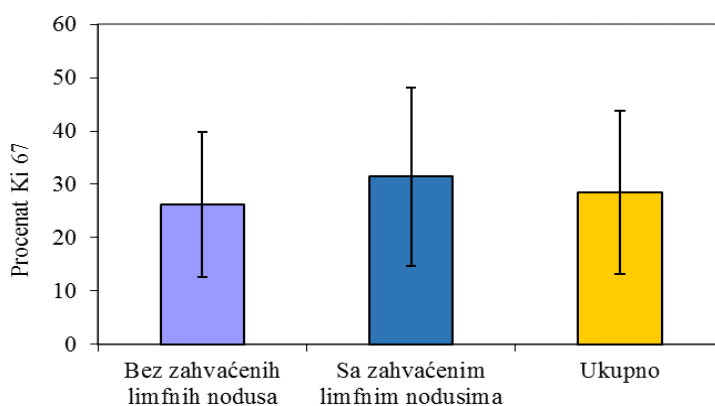
**Tabela 10.** Kliničko-patološke karakteristike karcinoma u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa

Karakteristika	Status ALN		Ukupno	P	
	Negativan (n=59)	Pozitivan (n=77)			
<b>Starost</b>	62,14±11,76	65,45±11,91	64,01±11,92	0,108	
<b>Lokalizacija</b>	CK	10 (16,9%)	14 (18,2%)	24 (17,6%)	0,852
	DSK	5 (8,5%)	5 (6,5%)	10 (7,4%)	0,661
	DUK	1 (1,7%)	2 (2,6%)	3 (2,2%)	0,722
	GSK	32 (54,2%)	43 (55,8%)	75 (55,1%)	0,852
	GUK	11 (18,6%)	13 (16,9%)	24 (17,6%)	0,789
<b>Veličina</b>	T1	24 (40,7%)	20 (26,0%)	44 (32,4%)	0,069
	T2	29 (49,2%)	39 (50,6%)	68 (50,0%)	0,863
	T3	3 (5,1%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,079
	T4	3 (5,1%)	18 (23,4%)	21 (15,4%)	0,003
<b>Histološki gradus</b>	G1	4 (6,8%)	3 (3,9%)	7 (5,1%)	0,451
	G2	37 (62,7%)	53 (68,8%)	90 (66,2%)	0,455
	G3	18 (30,5%)	21 (27,3%)	39 (28,7%)	0,679
<b>Nottingham scor</b>	6,98±1,06	6,81±1,17	6,88±1,12	0,362	
<b>ER scor</b>	3,93±3,81	3,71±3,83	3,81±3,80	0,742	
<b>PR scor</b>	3,59±3,57	3,31±3,48	3,43±3,51	0,645	
<b>HER2</b>	Negativan	46 (78,0%)	59 (76,6%)	105 (77,2%)	0,853
	Pozitivan	13 (22,0%)	18 (23,4%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>	26,25±13,66	31,44±16,88	28,50±15,30	0,049	
<b>Molekularni tip</b>	Basal-like	15 (25,4%)	21 (27,3%)	36 (26,5%)	0,809
	HER2+	13 (22,0%)	18 (23,4%)	31 (22,8%)	0,853
	Luminal A	31 (52,5%)	38 (49,4%)	69 (50,7%)	0,712

ALN – Aksilarni limfni nodusi



**Grafikon 1.** Veličina tumora (T stadijum) u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa



**Grafikon 2.** Procent Ki-67 indeksa u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa

## 7.2. EKSPRESIJA MOLEKULARNIH MARKERA KARCINOMA I STATUS AKSILARNIH LIMFNIH NODUSA

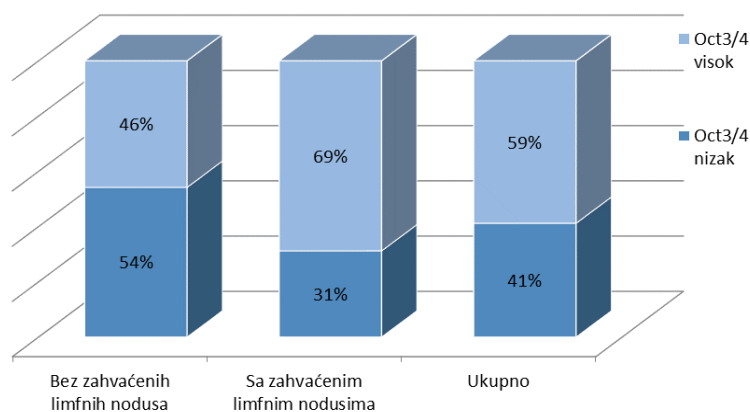
Analizom ekspresije molekularnih markera nuklearne ekspresije – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 i proteina sa membranskom ekspresijom – CD44 i CD117 u karcinomu dojke u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa dobijeni su sledeći rezultati:

- utvrđena je statistički značajna povezanost visoke ekspresije OCT3/4 u karcinomu i prisustva metastaza u aksilarnim limfnim nodusima (68,8:45,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,007$ );
- visoka ekspresija EZH2 značajno korelira sa pozitivnim statusom aksilarnih limfnih nodusa (58,4:30,5% ; Hi kvadrat test:  $p=0,001$ );
- koekspresija 2 i 3 nuklearna molekularna markera visoke ekspresije značajno je povezana sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima (33,8:6,8%; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ );
- veći broj alterisanih markera značajno korelira sa pozitivnim statusom aksilarnih limfnih nodusa ( $2,66\pm 1,4$ : $1,97\pm 1,22$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ) (tabela 11, grafikoni 3, 4, 5, 6).

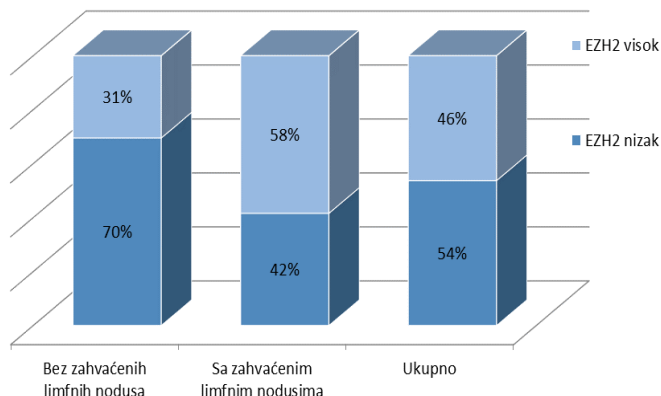
**Tabela 11.** Ekspresija molekularnih markera u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa

Karakteristika		Status ALN		Ukupno	P
		Negativan (n=59)	Pozitivan (n=77)		
<b>KLF4</b>	Niska	38 (64,4%)	43 (55,8%)	81 (59,6%)	0,313
	Visoka	21 (35,6%)	34 (44,2%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska	35 (59,3%)	45 (58,4%)	80 (58,8%)	0,918
	Visoka	24 (40,7%)	32 (41,6%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	32 (54,2%)	24 (31,2%)	56 (41,2%)	0,007
	Visoka	27 (45,8%)	53 (68,8%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska	41 (69,5%)	32 (41,6%)	73 (53,7%)	0,001
	Visoka	18 (30,5%)	45 (58,4%)	63 (46,3%)	
<b>CD44</b>	Niska	42 (71,2%)	54 (70,1%)	96 (70,6%)	0,893
	Visoka	17 (28,8%)	23 (29,9%)	40 (29,4%)	
<b>CD117</b>	Niska	48 (81,4%)	59 (76,6%)	107 (78,7%)	0,504
	Visoka	11 (18,6%)	18 (23,4%)	29 (21,3%)	
<b>Broj nuklearnih molekularnih markera visoke ekspresije</b>	0	9 (15,3%)	6 (7,8%)	15 (11,0%)	0,169
	1	18 (30,5%)	18 (23,4%)	36 (26,5%)	0,350
	2	26 (44,1%)	20 (26,0%)	46 (33,8%)	0,027
	3	4 (6,8%)	26 (33,8%)	30 (22,1%)	<0,001
	4	2 (3,4%)	7 (9,1%)	9 (6,6%)	0,299
<b>Broj membranskih proteina visoke ekspresije</b>	0	35 (59,3%)	44 (57,1%)	79 (58,1%)	0,799
	1	20 (33,9%)	25 (32,5%)	45 (33,1%)	0,860
	2	4 (6,8%)	8 (10,4%)	12 (8,8%)	0,462
<b>Broj alterisanih markera</b>		1,97±1,22	2,66±1,41	2,36±1,37	0,003

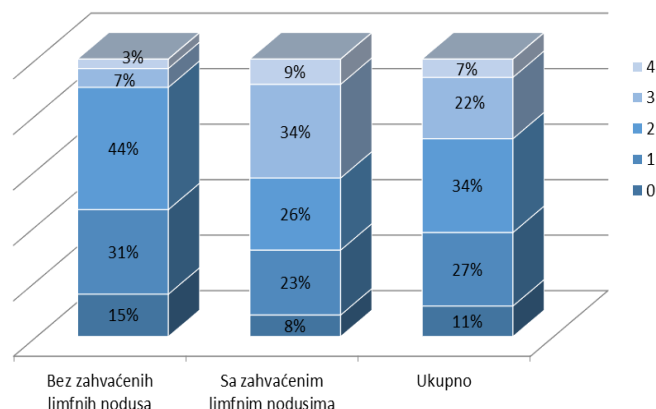
ALN – Aksilarni limfni nodusi



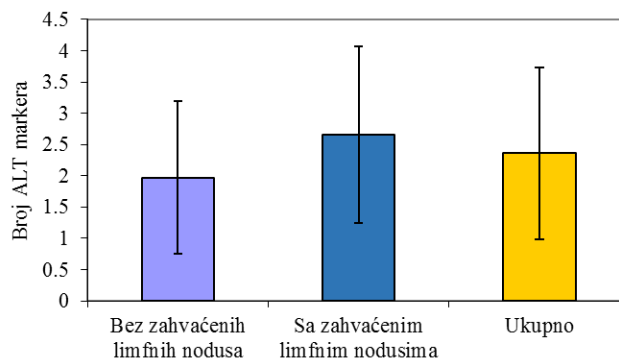
**Grafikon 3.** Ekspresija OCT3/4 u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa



**Grafikon 4.** Ekspresija EZH2 u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa



**Grafikon 5.** Broj nuklearnih markera visoke ekspresije u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa



**Grafikon 6.** Broj alterisanih markera u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa

### 7.3. KORELACIJA KLINIČKO-PATOLOŠKIH KARAKTERISTIKA KARCINOMA I EKSPRESIJE MOLEKULARNIH MARKERA

#### 7.3.1. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije KLF4

Pacijentkinje sa tumorom visoke ekspresije KLF4 bile su značajno mlađe u odnosu na pacijentkinje sa tumorom niske ekspresije ovog markera ( $60,38 \pm 12,32 : 66,48 \pm 11,04$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ). Visoka ekspresija KLF4 značajno korelira sa višim vrednostima ER ( $4,69 \pm 3,75 : 3,21 \pm 3,74$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,025$ ) i PR skora ( $4,35 \pm 3,55 : 2,81 \pm 3,37$ ;  $\chi^2$  test:  $p=0,012$ ),

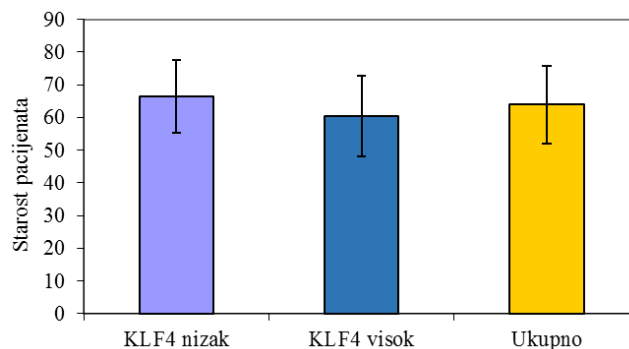


**Tabela 12.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju KLF4

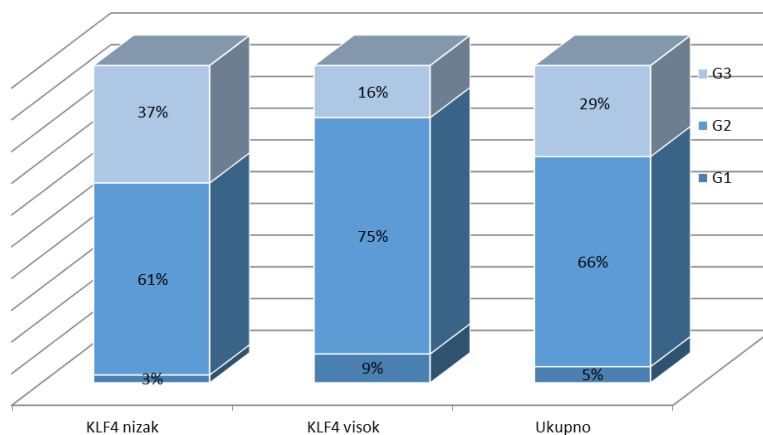
Karakteristika	KLF4		Ukupno	P	
	Niska	Visoka			
<b>Starost</b>			64,01±11,92	0,003	
		66,48±11,04	60,38±12,32		
<b>Lokalizacija</b>	CK	17 (21,0%)	7 (12,7%)	24 (17,6%)	0,215
	DSK	4 (4,9%)	6 (10,9%)	10 (7,4%)	0,190
	DUK	1 (1,2%)	2 (3,6%)	3 (2,2%)	0,349
	GSK	43 (53,1%)	32 (58,2%)	75 (55,1%)	0,558
	GUK	16 (19,8%)	8 (14,5%)	24 (17,6%)	0,434
<b>Veličina tumora</b>	T1	25 (30,9%)	19 (34,5%)	44 (32,4%)	0,652
	T2	42 (51,9%)	26 (47,3%)	68 (50,0%)	0,600
	T3	2 (2,5%)	1 (1,8%)	3 (2,2%)	0,800
	T4	12 (14,8%)	9 (16,4%)	21 (15,4%)	0,806
<b>Status ALN</b>	Negativan	38 (46,9%)	21 (38,2%)	59 (43,4%)	0,313
	Pozitivan	43 (53,1%)	34 (61,8%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	38 (46,9%)	21 (38,2%)	59 (43,4%)	0,313
	pN1	35 (43,2%)	27 (49,1%)	62 (45,6%)	0,499
	pN2,3	8 (9,9%)	7 (12,7%)	15 (11,0%)	0,602
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>		1,93±3,24	2,51±3,61	2,16±3,39	0,327
<b>% metastatskih ALN</b>		13,48±21,05	18,99±24,13	15,71±22,43	0,161
<b>Histološki gradus</b>	G1	2 (2,5%)	5 (9,1%)	7 (5,1%)	0,086
	G2	49 (60,5%)	41 (74,5%)	90 (66,2%)	0,089
	G3	30 (37,0%)	9 (16,4%)	39 (28,7%)	0,009
<b>Nottingham scor</b>		7,04±1,13	6,65±1,08	6,88±1,12	0,051
<b>ER skor</b>		3,21±3,74	4,69±3,75	3,81±3,80	0,025
<b>PR skor</b>		2,81±3,37	4,35±3,55	3,43±3,51	0,012
<b>HER2</b>	Negativan	60 (74,1%)	45 (81,8%)	105 (77,2%)	0,291
	Pozitivan	21 (25,9%)	10 (18,2%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>		30,44±15,18	25,64±15,16	28,50±15,30	0,072
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	25 (30,9%)	11 (20,0%)	36 (26,5%)	0,159
	HER2+	21 (25,9%)	10 (18,2%)	31 (22,8%)	0,291
	Luminalni A	35 (43,2%)	34 (61,8%)	69 (50,7%)	0,033
<b>SOX2</b>	Niska	46 (56,8%)	34 (61,8%)	80 (58,8%)	0,559
	Visoka	35 (43,2%)	21 (38,2%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	28 (34,6%)	28 (50,9%)	56 (41,2%)	0,057
	Visoka	53 (65,4%)	27 (49,1%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska	54 (66,7%)	19 (34,5%)	73 (53,7%)	<0,001
	Visoka	27 (33,3%)	36 (65,5%)	63 (46,3%)	
<b>CD44</b>	Niska	58 (71,6%)	38 (69,1%)	96 (70,6%)	0,752
	Visoka	23 (28,4%)	17 (30,9%)	40 (29,4%)	
<b>CD117</b>	Niska	66 (81,5%)	41 (74,5%)	107 (78,7%)	0,332
	Visoka	15 (18,5%)	14 (25,5%)	29 (21,3%)	

ALN – Aksilarni limfni nodusi

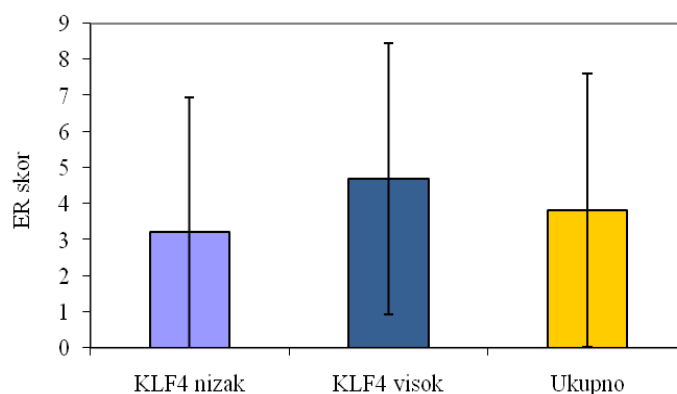
a luminalni A podtip tumora je značajno češći nego kod pacijentkinja sa niskom ekspresijom ovog markera (61,8:43,2%; Hi kvadrat test:  $p=0,033$ ). Takođe, visoka ekspresija KLF4 značajno korelira sa visokom ekspresijom EZH2 (65,5:33,3%; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ ). Niska ekspresija KLF4 značajno je povezana sa histološkim gradusom G3 (37,0:16,4%; Hi kvadrat test:  $p=0,009$ ) (tabela 12, grafikoni 7, 8, 9, 10, 11, 12).



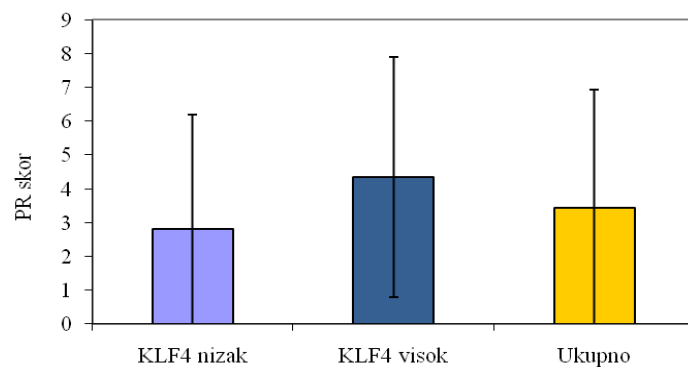
**Grafikon 7.** Starost pacijentkinja u odnosu na ekspresiju KLF4



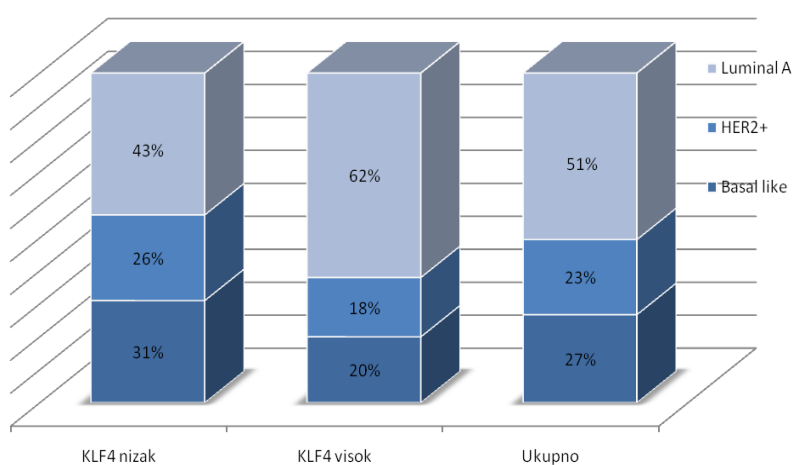
**Grafikon 8.** Histološki gradus tumora u odnosu na ekspresiju KLF4



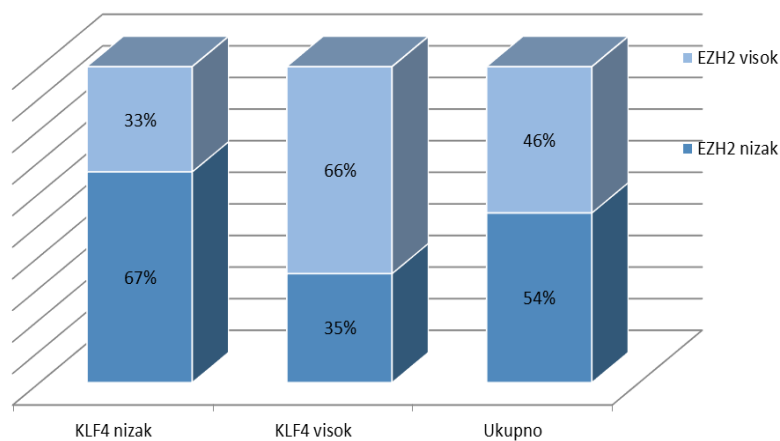
**Grafikon 9.** ER skor u odnosu na ekspresiju KLF4



**Grafikon 10.** PR skor u odnosu na ekspresiju KLF4



**Grafikon 11.** Molekularni podtip tumora u odnosu na ekspresiju KLF4



**Grafikon 12.** Ekspresija EZH2 u odnosu na ekspresiju KLF4

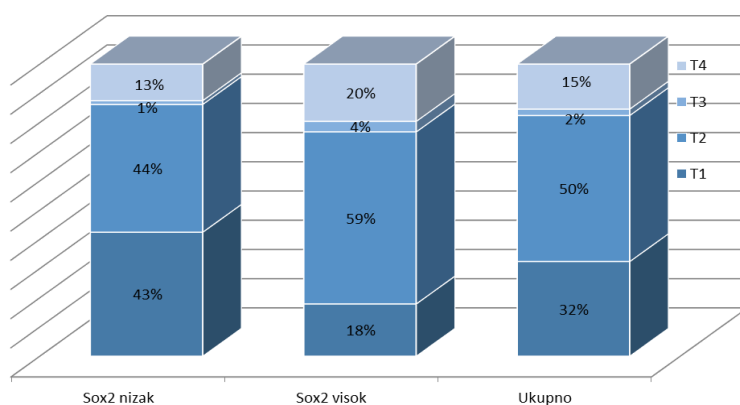
### 7.3.2. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije SOX2

Uporednom analizom kliničko-patoloških parametara u grupi pacijentkinja sa tumorom visoke i grupi pacijentkinja sa tumorom niske ekspresije SOX2, dobijeni su sledeći rezultati:

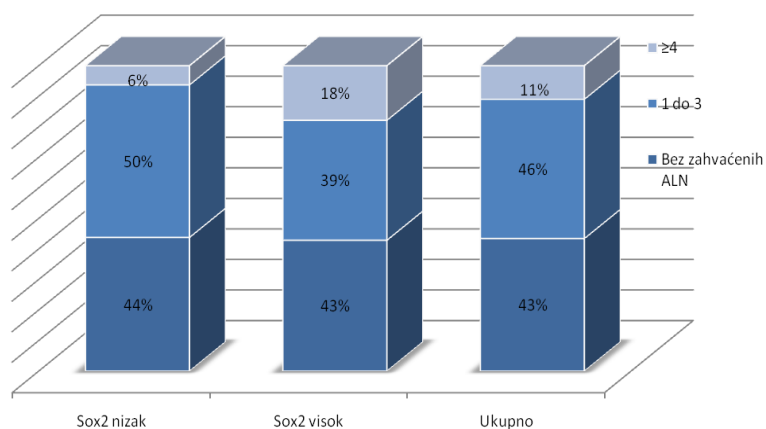
- učestalost tumora T1 stadijuma značajno je bila povezana sa niskom ekspresijom SOX2 (17,9:42,5%; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ );
- stadijumi pN2,3 aksilarnih limfnih nodusa, odnosno zastupljenost 4 i više metastazama zahvaćenih limfnih nodusa, značajno je korelirala sa visokom ekspresijom SOX2 (17,9:6,3%; Hi kvadrat test:  $p=0,033$ ).
- pacijentkinje sa tumorom visoke ekspresije SOX2 imale su značajno veći broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa ( $2,98\pm 4,34:1,59\pm 2,39$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,018$ ) i viši procenat metastazama zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj analiziranih ( $20,70\pm 27,10:12,22\pm 17,84$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,029$ );
- kod karcinoma sa visokom ekspresijom SOX2 prisutne su značajno više vrednosti Nottingham skora ( $7,20\pm 1,17:6,66\pm 1,04$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,006$ ) i proliferativnog Ki-67 indeksa ( $33,11\pm 15,07:25,28\pm 14,71$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ), dok su značajno niže vrednosti ER ( $2,73\pm 3,72: 4,56\pm 3,70$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,005$ ) i PR skora ( $2,48\pm 3,42:4,10\pm 3,44$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,008$ );
- u odnosu na molekularni podtip, visoka ekspresija SOX2 markera značajno je češće bila povezana sa bazalnim podtipom karcinoma (37,5:18,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,015$ ), a značajno ređe sa luminalnim A podtipom (35,7:61,3%; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ) u odnosu na nisku ekspresiju SOX2 (tabela 13, grafikoni 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Tabela 13. Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju SOX2

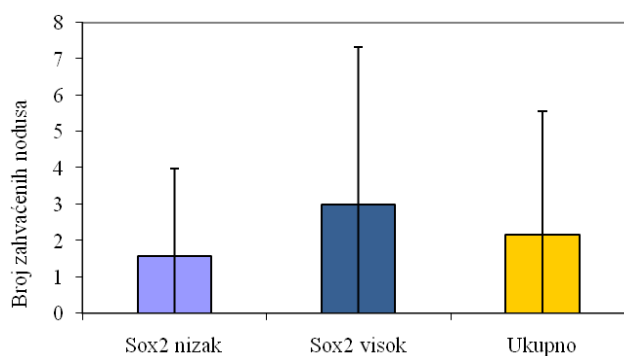
Karakteristika	SOX2		Ukupno	P		
	Niska	Visoka				
<b>Starost</b>			63,98±12,35	64,07±11,38	64,01±11,92	0,963
<b>Lokalizacija</b>	CK		17 (21,3%)	7 (12,5%)	24 (17,6%)	0,188
	DSK		4 (5,0%)	6 (10,7%)	10 (7,4%)	0,209
	DUK		0 (0,0%)	3 (5,4%)	3 (2,2%)	0,068
	GSK		45 (56,3%)	30 (53,6%)	75 (55,1%)	0,757
	GUK		14 (17,5%)	10 (17,9%)	24 (17,6%)	0,957
<b>Veličina tumora</b>	T1		34 (42,5%)	10 (17,9%)	44 (32,4%)	0,003
	T2		35 (43,8%)	33 (58,9%)	68 (50,0%)	0,081
	T3		1 (1,3%)	2 (3,6%)	3 (2,2%)	0,568
	T4		10 (12,5%)	11 (19,6%)	21 (15,4%)	0,257
<b>Status ALN</b>	Negativan		35 (43,8%)	24 (42,9%)	59 (43,4%)	0,918
	Pozitivan		45 (56,3%)	32 (57,1%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0		35 (43,8%)	24 (42,9%)	59 (43,4%)	0,918
	pN1		40 (50,0%)	22 (39,3%)	62 (45,6%)	0,217
	pN2,3		5 (6,3%)	10 (17,9%)	15 (11,0%)	0,033
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>			1,59±2,39	2,98±4,34	2,16±3,39	0,018
<b>% metastatskih ALN</b>			12,22±17,84	20,70±27,10	15,71±22,43	0,029
<b>Histološki gradus</b>	G1		6 (7,5%)	1 (1,8%)	7 (5,1%)	0,138
	G2		55 (68,8%)	35 (62,5%)	90 (66,2%)	0,448
	G3		19 (23,8%)	20 (35,7%)	39 (28,7%)	0,129
<b>Nottingham scor</b>			6,66±1,04	7,20±1,17	6,88±1,12	0,006
<b>ER skor</b>			4,56±3,70	2,73±3,72	3,81±3,80	0,005
<b>PR skor</b>			4,10±3,44	2,48±3,42	3,43±3,51	0,008
<b>HER2</b>	Negativan		64 (80,0%)	41 (73,2%)	105 (77,2%)	0,353
	Pozitivan		16 (20,0%)	15 (26,8%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>			25,28±14,71	33,11±15,07	28,50±15,30	0,003
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni		15 (18,8%)	21 (37,5%)	36 (26,5%)	0,015
	HER2+		16 (20,0%)	15 (26,8%)	31 (22,8%)	0,353
	Luminalni A		49 (61,3%)	20 (35,7%)	69 (50,7%)	0,003
<b>KLF4</b>	Niska		46 (57,5%)	35 (62,5%)	81 (59,6%)	0,559
	Visoka		34 (42,5%)	21 (37,5%)	55 (40,4%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska		37 (46,3%)	19 (33,9%)	56 (41,2%)	0,151
	Visoka		43 (53,8%)	37 (66,1%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska		42 (52,5%)	31 (55,4%)	73 (53,7%)	0,742
	Visoka		38 (47,5%)	25 (44,6%)	63 (46,3%)	
<b>CD117</b>	Niska		64 (80,0%)	43 (76,8%)	107 (78,7%)	0,652
	Visoka		16 (20,0%)	13 (23,2%)	29 (21,3%)	
<b>CD44</b>	Niska		59 (73,8%)	37 (66,1%)	96 (70,6%)	0,333
	Visoka		21 (26,3%)	19 (33,9%)	40 (29,4%)	



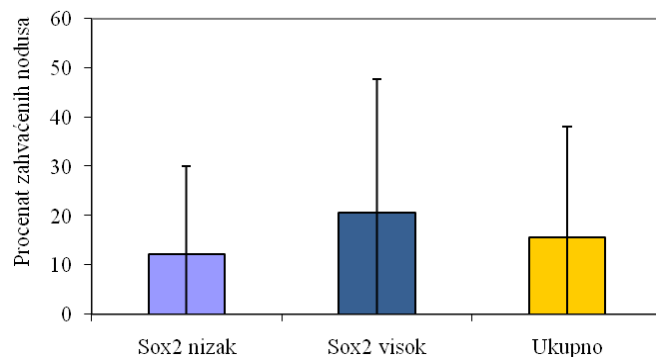
**Grafikon 13.** Veličina tumora (T stadijum) u odnosu na ekspresiju SOX2



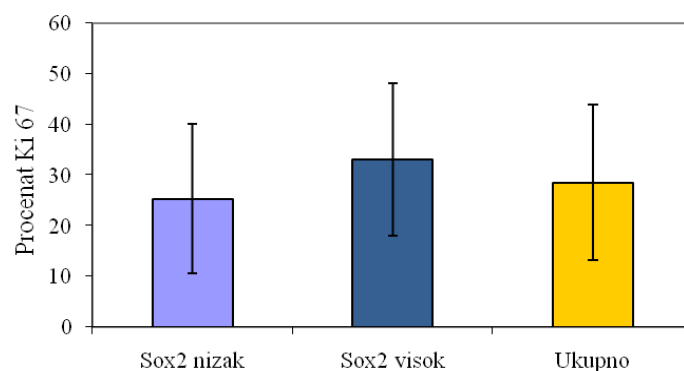
**Grafikon 14.** Stadijum aksilarnih limfnih nodusa (pN) u odnosu na ekspresiju SOX2



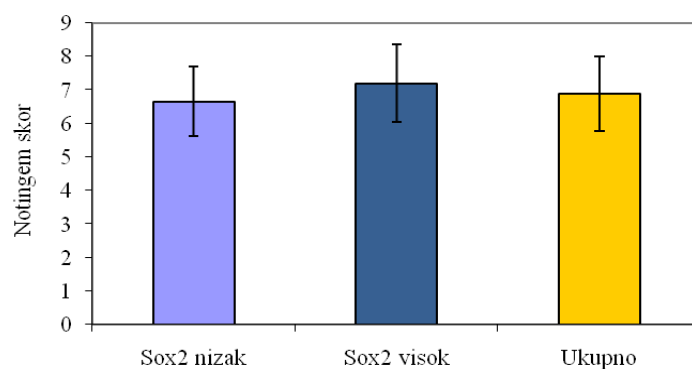
**Grafikon 15.** Prosečan broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju SOX2



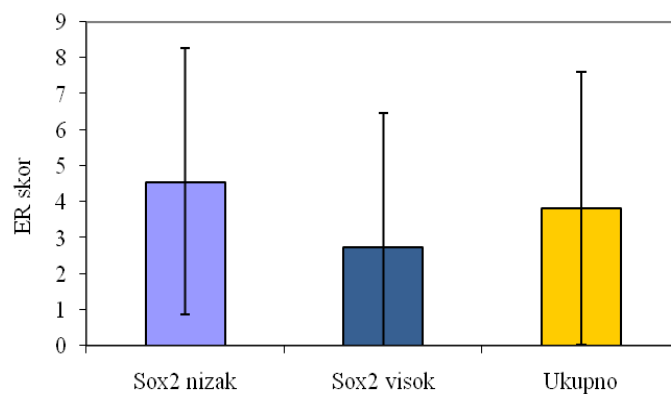
**Grafikon 16.** Procenat metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju SOX2



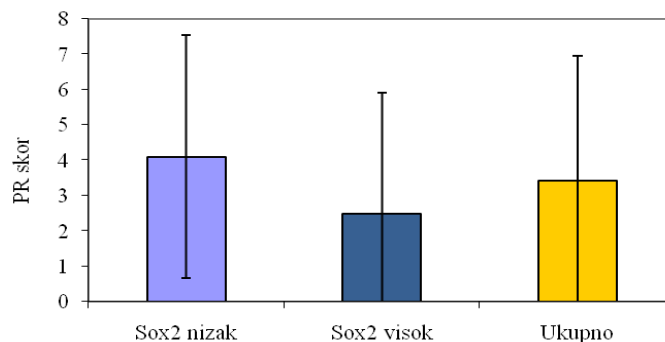
**Grafikon 17.** Proliferativni Ki-67 indeks u odnosu na ekspresiju SOX2



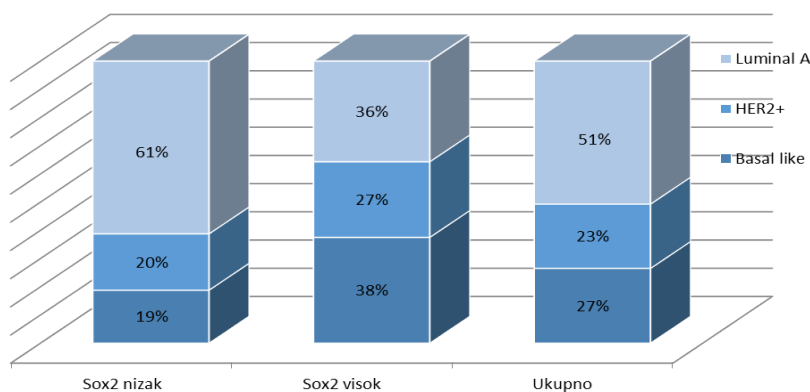
**Grafikon 18.** Nottingham skor u odnosu na ekspresiju SOX2



**Grafikon 19.** ER skor u odnosu na ekspresiju SOX2



**Grafikon 20.** PR skor u odnosu na ekspresiju SOX2



**Grafikon 21.** Molekularni podtip tumora u odnosu na ekspresiju SOX2

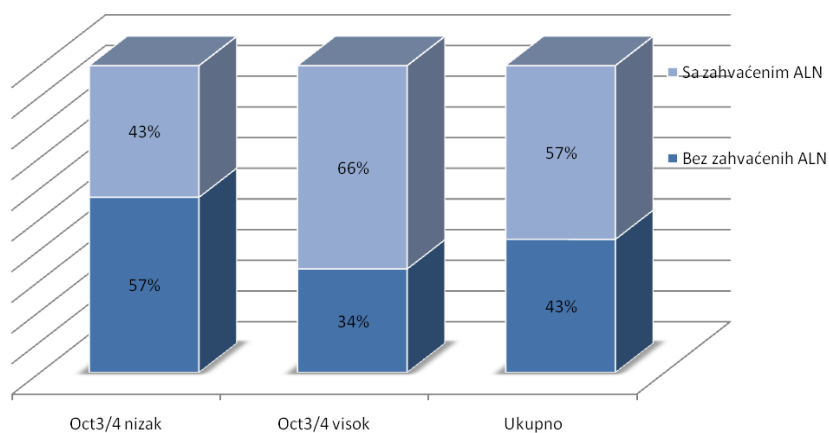
### 7.3.3. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije OCT3/4

Visoka ekspresija OCT3/4 značajno je korelirala sa: metastazama u aksilarnim limfnim nodusima (66,3:33,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,007$ ), pN1 stadijumom aksilarnih limfnih nodusa (53,8:33,9%; Hi kvadrat test:  $p=0,022$ ), G3 histološkim gradusom (36,3:17,9%; Hi kvadrat test:  $p=0,020$ ), većim brojem metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa ( $2,79 \pm 3,95$ :  $1,27 \pm 2,12$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,010$ ), višom procentualnom zastupljenošću metastazama zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj analiziranih ( $19,54 \pm 24,28$ :  $10,24 \pm 18,32$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,017$ ) i visokom ekspresijom EZH2 (55,0:33,9%; Hi kvadrat test:  $p=0,015$ ) i CD117 (27,5:12,5%; Hi kvadrat test:  $p=0,036$ ) markera (tabela 14, grafikoni 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28).

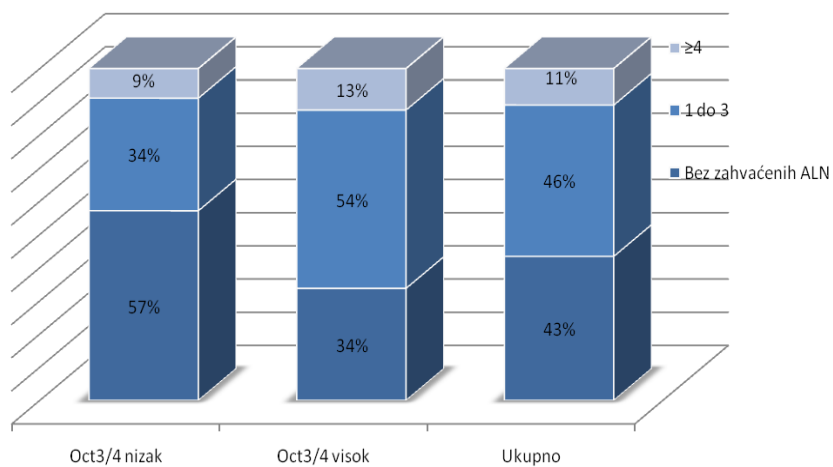


**Tabela 14.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju OCT3/4

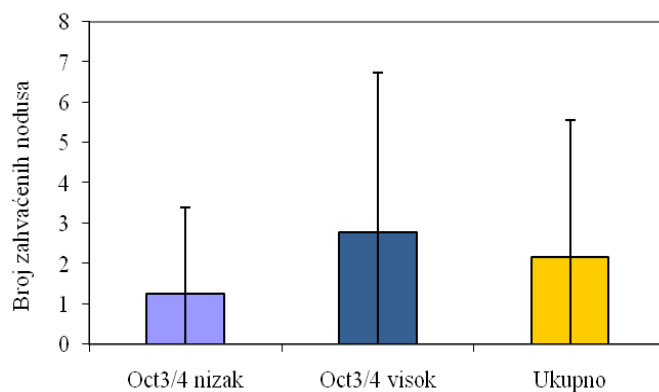
Karakteristika	OCT3/4		Ukupno	P		
	Niska	Visoka				
<b>Starost</b>			64,30±11,01	63,81±12,58	64,01±11,92	0,814
<b>Lokalizacija</b>	CK		11 (19,6%)	13 (16,3%)	24 (17,6%)	0,609
	DSK		4 (7,1%)	6 (7,5%)	10 (7,4%)	0,937
	DUK		0 (0,0%)	3 (3,8%)	3 (2,2%)	0,143
	GSK		32 (57,1%)	43 (53,8%)	75 (55,1%)	0,695
	GUK		9 (16,1%)	15 (18,8%)	24 (17,6%)	0,387
<b>Veličina tumora</b>	T1		22 (39,3%)	22 (27,5%)	44 (32,4%)	0,148
	T2		25 (44,6%)	43 (53,8%)	68 (50%)	0,296
	T3		3 (5,4%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,068
	T4		6 (10,7%)	15 (18,8%)	21 (15,4%)	0,202
<b>Status ALN</b>	Negativan		32 (57,1%)	27 (33,8%)	77 (56,6%)	0,007
	Pozitivan		24 (42,9%)	53 (66,3%)	59 (43,4%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0		32 (57,1%)	27 (33,8%)	59 (43,4%)	0,007
	pN1		19 (33,9%)	43 (53,8%)	62 (45,6%)	0,022
	pN2,3		5 (8,9%)	10 (12,5%)	15 (11,0%)	0,513
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>			1,27±2,12	2,79±3,95	2,16±3,39	0,010
<b>% metastatskih ALN</b>			10,24±18,32	19,54±24,28	15,71±22,43	0,017
<b>Histološki gradus</b>	G1		4 (7,1%)	3 (3,8%)	7 (5,1%)	0,378
	G2		42 (75%)	48 (60,0%)	90 (66,2%)	0,069
	G3		10 (17,9%)	29 (36,3%)	39 (28,7%)	0,020
<b>Nottingham scor</b>			6,73±1,05	6,99±1,16	6,88±1,12	0,193
<b>ER skor</b>			4,43±3,77	3,38±3,79	3,81±3,8	0,112
<b>PR skor</b>			3,96±3,46	3,06±3,52	3,43±3,51	0,141
<b>HER2</b>	Negativan		47 (83,9%)	58 (72,5%)	105 (77,2%)	0,118
	Pozitivan		9 (16,1%)	22 (27,5%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>			26,75±16,54	29,73±14,35	28,50±15,3	0,266
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni		14 (25%)	22 (27,5%)	36 (26,5%)	0,745
	HER2+		9 (16,1%)	22 (27,5%)	31 (22,8%)	0,118
	Luminalni A		33 (58,9%)	36 (45,0%)	69 (50,7%)	0,110
<b>KLF4</b>	Niska		28 (50%)	53 (66,3%)	81 (59,6%)	0,057
	Visoka		28 (50%)	27 (33,8%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska		37 (66,1%)	43 (53,8%)	80 (58,8%)	0,151
	Visoka		19 (33,9%)	37 (46,3%)	56 (41,2%)	
<b>EZH2</b>	Niska		37 (66,1%)	36 (45,0%)	73 (53,7%)	0,015
	Visoka		19 (33,9%)	44 (55,0%)	63 (46,3%)	
<b>CD44</b>	Niska		42 (75,0%)	54 (67,5%)	96 (70,6%)	0,345
	Visoka		14 (25,0%)	26 (32,5%)	40 (29,4%)	
<b>CD117</b>	Niska		49 (87,5%)	58 (72,5%)	107 (78,7%)	0,036
	Visoka		7 (12,5%)	22 (27,5%)	29 (21,3%)	



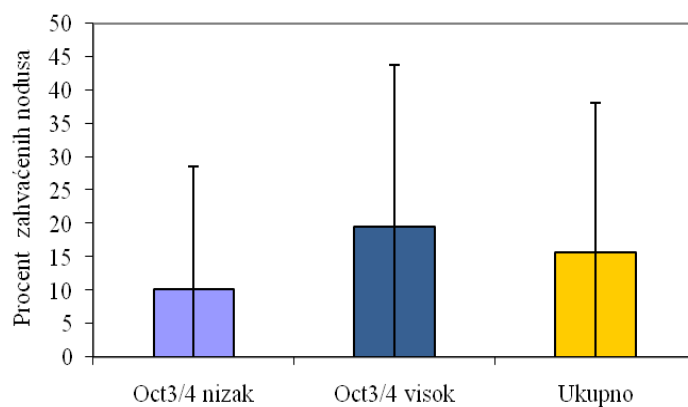
**Grafikon 22.** Status aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju OCT3/4



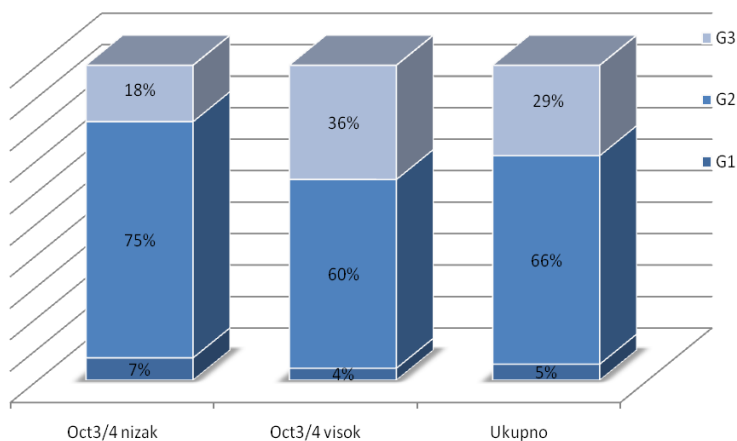
**Grafikon 23.** Stadijum limfnih nodusa (pN) u odnosu na ekspresiju OCT3/4



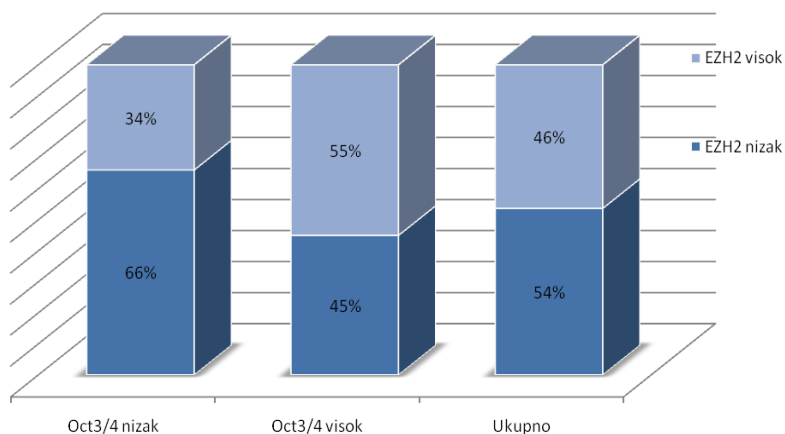
**Grafikon 24.** Prosečan broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju OCT3/4



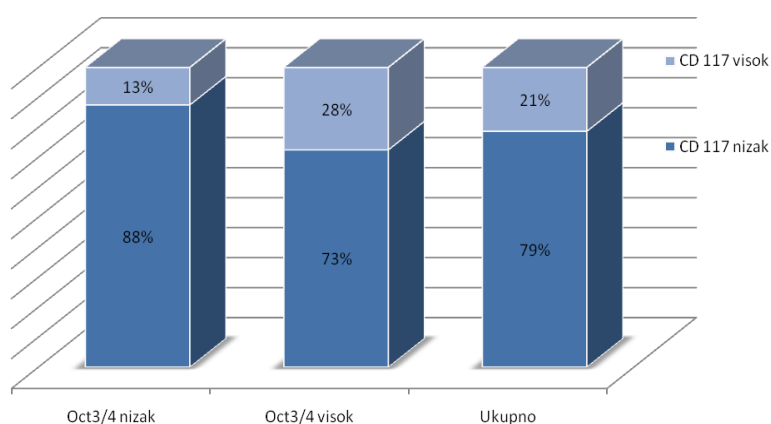
**Grafikon 25.** Procenat metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju OCT3/4



**Grafikon 26.** Histološki gradus tumora u odnosu na ekspresiju OCT3/4



**Grafikon 27.** Ekspresija EZH2 u odnosu na ekspresiju OCT3/4



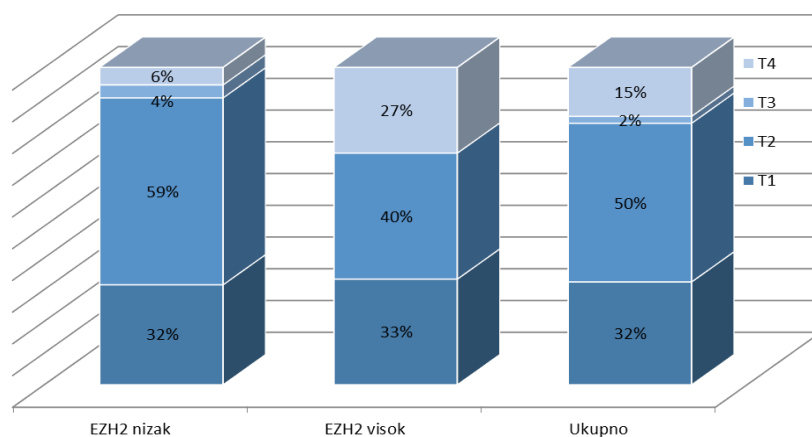
**Grafikon 28.** Ekspresija CD117 u odnosu na ekspresiju OCT3/4

### 7.3.4. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije EZH2

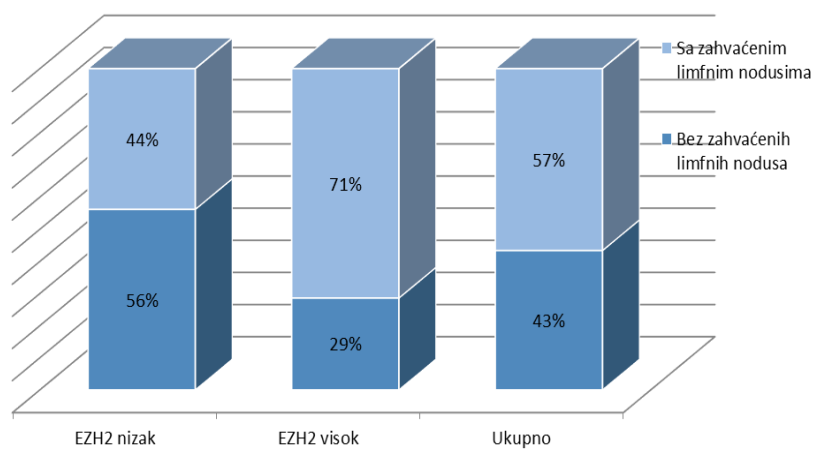
Pacijentkinje sa visokom ekspresijom EZH2, u odnosu na one sa niskom ekspresijom ovog markera, imale su značajno češće tumor T4 stadijuma (27,0:5,5%; Hi kvadrat test:  $p=0,001$ ), metastaze u aksilarnim limfnim nodusima (71,4:28,6%; Hi kvadrat test:  $p=0,001$ ), pN1 stadijum aksilarnih limfnih nodusa (57,1:35,6%; Hi kvadrat test:  $p=0,012$ ), veći broj aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom ( $2,84\pm 3,50:1,58\pm 3,20$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,029$ ), kao i viši procenat zahvaćenih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih ( $21,18\pm 22,66:10,99\pm 21,26$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,008$ ). Takođe, visoka ekspresija EZH2 značajno je korelirala sa visokom ekspresijom KLF4 (57,1:26,0%; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ ) i OCT3/4 (69,8:49,3%; Hi kvadrat test:  $p=0,015$ ) (tabela 15, grafikoni 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35).

**Tabela 15.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju EZH2

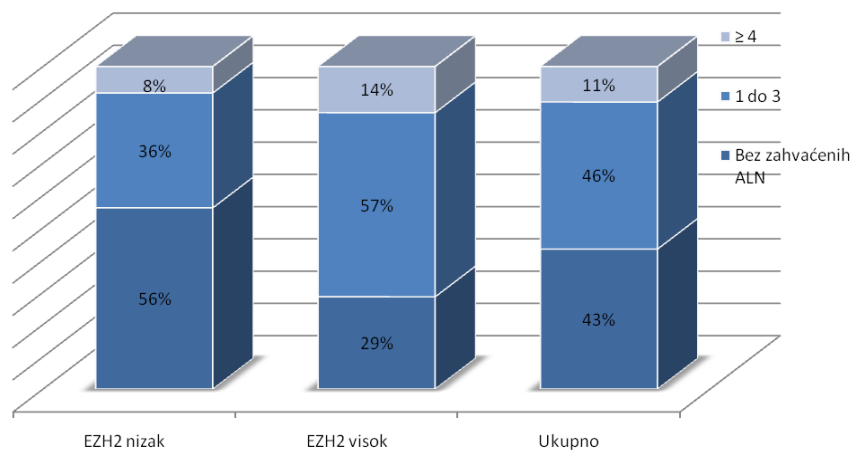
Karakteristika	EZH2		Ukupno	P	
	Niska	Visoka			
<b>Starost</b>	64,92±11,26	62,97±12,65	64,01±11,92	0,343	
<b>Lokalizacija</b>	CK	15 (20,5%)	9 (14,3%)	24 (17,6%)	0,339
	DSK	3 (4,1%)	7 (11,1%)	10 (7,4%)	0,187
	DUK	0 (0,0%)	3 (4,8%)	3 (2,2%)	0,097
	GSK	43 (58,9%)	32 (50,8%)	75 (55,1%)	0,343
	GUK	12 (16,4%)	12 (19%)	24 (17,6%)	0,691
<b>Veličina tumora</b>	T1	23 (31,5%)	21 (33,3%)	44 (32,4%)	0,812
	T2	43 (58,9%)	25 (39,7%)	68 (50%)	0,025
	T3	3 (4,1%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,249
	T4	4 (5,5%)	17 (27,0%)	21 (15,4%)	0,001
<b>Status ALN</b>	Negativan	41 (56,2%)	18 (28,6%)	59 (43,4%)	0,001
	Pozitivan	32 (43,8%)	45 (71,4%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	41 (56,2%)	18 (28,6%)	59 (43,4%)	0,001
	pN1	26 (35,6%)	36 (57,1%)	62 (45,6%)	0,012
	pN2,3	6 (8,2%)	9 (14,3%)	15 (11,0%)	0,260
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>	1,58±3,20	2,84±3,50	2,16±3,39	0,029	
<b>% metastatskih ALN</b>	10,99±21,26	21,18±22,66	15,71±22,43	0,008	
<b>Histološki gradus</b>	G1	4 (5,5%)	3 (4,8%)	7 (5,1%)	0,999
	G2	46 (63%)	44 (69,8%)	90 (66,2%)	0,401
	G3	23 (31,5%)	16 (25,4%)	39 (28,7%)	0,432
<b>Nottingham scor</b>	6,95±1,19	6,81±1,05	6,88±1,12	0,484	
<b>ER skor</b>	3,58±3,79	4,08±3,83	3,81±3,8	0,443	
<b>PR skor</b>	3,16±3,44	3,75±3,59	3,43±3,51	0,337	
<b>HER2</b>	Negativan	58 (79,5%)	47 (74,6%)	105 (77,2%)	0,501
	Pozitivan	15 (20,5%)	16 (25,4%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>	30,73±16,93	25,92±12,82	28,5±15,3	0,068	
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	23 (31,5%)	13 (20,6%)	36 (26,5%)	0,152
	HER2+	15 (20,5%)	16 (25,4%)	31 (22,8%)	0,501
	Luminalni A	35 (47,9%)	34 (54%)	69 (50,7%)	0,484
<b>KLF4</b>	Niska	54 (74,0%)	27 (42,9%)	81 (59,6%)	<0,001
	Visoka	19 (26,0%)	36 (57,1%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska	42 (57,5%)	38 (60,3%)	80 (58,8%)	0,742
	Visoka	31 (42,5%)	25 (39,7%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	37 (50,7%)	19 (30,2%)	56 (41,2%)	0,015
	Visoka	36 (49,3%)	44 (69,8%)	80 (58,8%)	
<b>CD117</b>	Niska	61 (83,6%)	46 (73,0%)	107 (78,7%)	0,134
	Visoka	12 (16,4%)	17 (27,0%)	29 (21,3%)	
<b>CD44</b>	Niska	51 (69,9%)	45 (71,4%)	96 (70,6%)	0,842
	Visoka	22 (30,1%)	18 (28,6%)	40 (29,4%)	



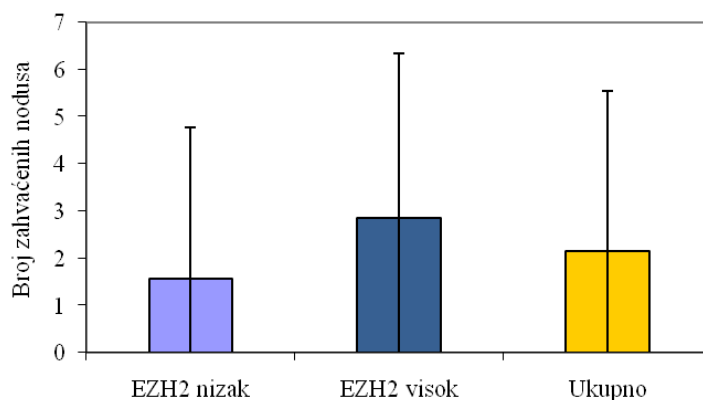
**Grafikon 29.** Veličina tumora (T stadijum) u odnosu na ekspresiju EZH2



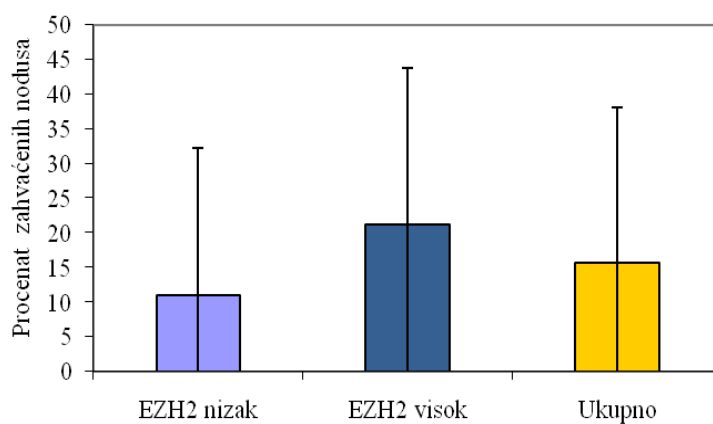
**Grafikon 30.** Status aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju EZH2



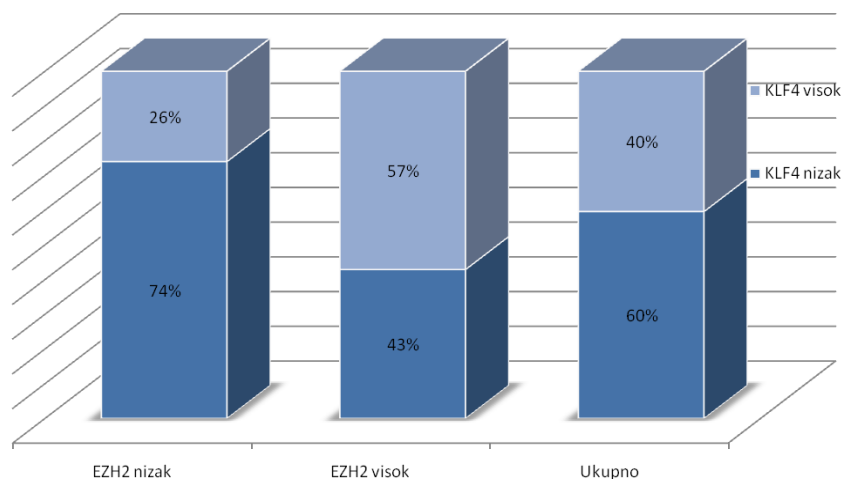
**Grafikon 31.** Stadijum aksilarnih limfnih nodusa (pN) u odnosu na ekspresiju EZH2



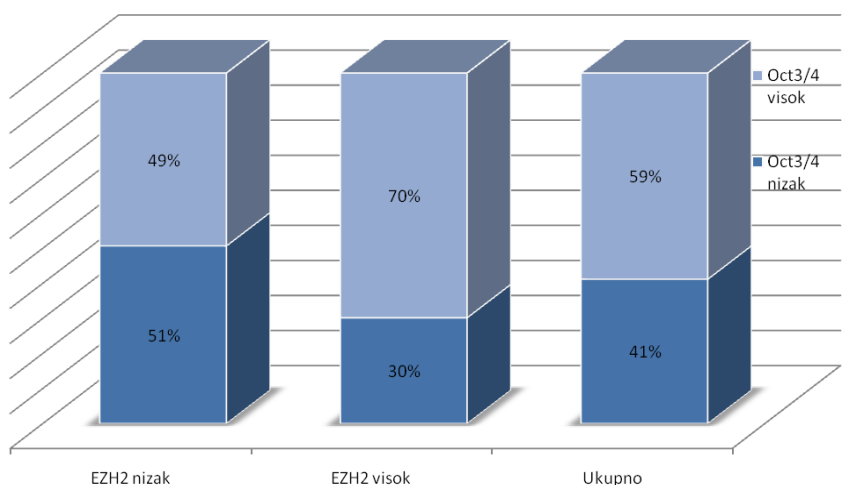
**Grafikon 32.** Prosečan broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju EZH2



**Grafikon 33.** Procent metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na ekspresiju EZH2



**Grafikon 34.** Ekspresija KLF4 u odnosu na ekspresiju EZH2



**Grafikon 35.** Ekspresija OCT3/4 u odnosu na ekspresiju EZH2

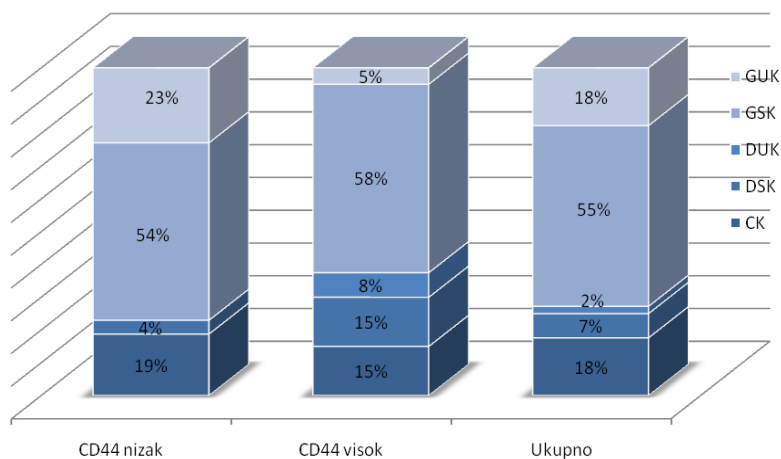
### 7.3.5. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije CD44

Karcinomi sa visokom ekspresijom CD44 značajno su češće bili lokalizovani u donjem unutrašnjem kvadrant – DUK (7,5:0,00%; Hi kvadrat test:  $p=0,024$ ), a ređe u gornjem unutrašnjem kvadrantu dojke-GUK (5,0:22,9%; Hi kvadrat test:  $p=0,013$ ) nego tumori sa niskom ekspresijom CD44. Tumori sa visokom ekspresijom CD44 imali su značajno višu vrednost proliferativnog Ki-67 indeksa ( $33,23 \pm 17,84; 26,53 \pm 13,73$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,020$ ), dok su vrednosti ER ( $2,68 \pm 3,71; 4,28 \pm 3,76$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,024$ ) i PR skora ( $2,28 \pm 3,23; 3,92 \pm 3,52$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,012$ ) bile značajno niže. U odnosu na molekularni podtip karcinoma, kod pacijentkinja sa tumorom visoke ekspresije CD44 markera učestalost bazalnog podtipa karcinoma bila je statistički značajno viša (45,0:18,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,002$ ), a luminalnog A podtipa značajno niža (35,0:57,3%; Hi kvadrat test:  $p=0,018$ ) nego kod pacijentkinja sa niskom ekspresijom CD44 (tabela 16, grafikoni 36, 37, 38, 39, 40).

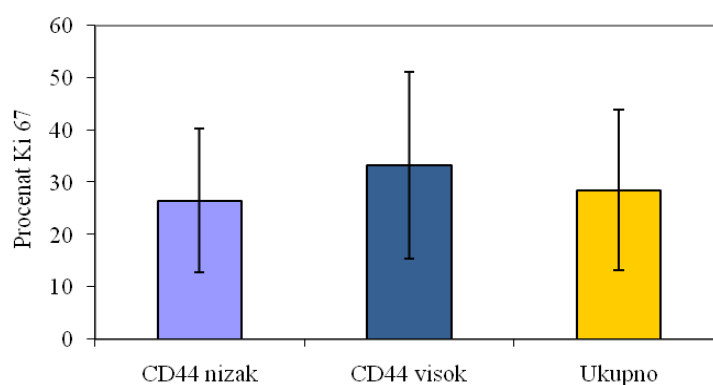


**Tabela 16.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju CD44

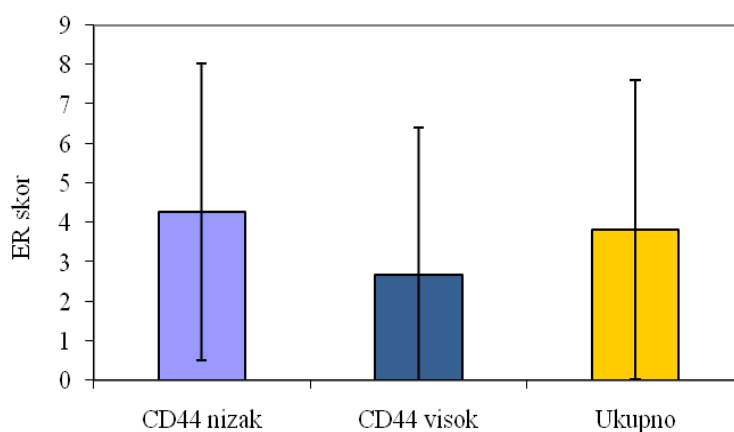
Karakteristika	CD44		Ukupno	P	
	Niska	Visoka			
<b>Starost</b>	63,85±12,07	64,4±11,67	64,01±11,92	0,809	
<b>Lokalizacija</b>	CK	18 (18,8%)	6 (15,0%)	24 (17,6%)	0,601
	DSK	4 (4,2%)	6 (15,0%)	10 (7,4%)	0,064
	DUK	0 (0,0%)	3 (7,5%)	3 (2,2%)	0,024
	GSK	52 (54,2%)	23 (57,5%)	75 (55,1%)	0,722
	GUK	22 (22,9%)	2 (5,0%)	24 (17,6%)	0,013
<b>Veličina tumora</b>	T1	32 (33,3%)	12 (30,0%)	44 (32,4%)	0,705
	T2	46 (47,9%)	22 (55,0%)	68 (50,0%)	0,452
	T3	3 (3,1%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,258
	T4	15 (15,6%)	6 (15,0%)	21 (15,4%)	0,927
<b>Status ALN</b>	Negativan	42 (43,8%)	17 (42,5%)	59 (43,4%)	0,893
	Pozitivan	54 (56,3%)	23 (57,5%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	42 (43,8%)	17 (42,5%)	59 (43,4%)	0,893
	pN1	44 (45,8%)	18 (45,0%)	62 (45,6%)	0,929
	pN2,3	10 (10,4%)	5 (12,5%)	15 (11,0%)	0,724
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>	1,84±2,49	2,93±4,89	2,16±3,39	0,090	
<b>% metastatskih ALN</b>	14,37±18,75	18,92±29,49	15,71±22,43	0,283	
<b>Histološki gradus</b>	G1	5 (5,2%)	2 (5,0%)	7 (5,1%)	0,999
	G2	66 (68,8%)	24 (60,0%)	90 (66,2%)	0,326
	G3	25 (26,0%)	14 (35,0%)	39 (28,7%)	0,293
<b>Nottingham scor</b>	6,90±1,12	6,85±1,15	6,88±1,12	0,829	
<b>ER skor</b>	4,28±3,76	2,68±3,71	3,81±3,80	0,024	
<b>PR skor</b>	3,92±3,52	2,28±3,23	3,43±3,51	0,012	
<b>HER2</b>	Negativan	73 (76,0%)	32 (80,0%)	105 (77,2%)	0,616
	Pozitivan	23 (24,0%)	8 (20,0%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>	26,53±13,73	33,23±17,84	28,50±15,30	0,020	
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	18 (18,8%)	18 (45,0%)	36 (26,5%)	0,002
	HER2+	23 (24,0%)	8 (20,0%)	31 (22,8%)	0,616
	Luminani l A	55 (57,3%)	14 (35,0%)	69 (50,7%)	0,018
<b>KLF4</b>	Niska	58 (60,4%)	23 (57,5%)	81 (59,6%)	0,752
	Visoka	38 (39,6%)	17 (42,5%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska	59 (61,5%)	21 (52,5%)	80 (58,8%)	0,333
	Visoka	37 (38,5%)	19 (47,5%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	42 (43,8%)	14 (35,0%)	56 (41,2%)	0,345
	Visoka	54 (56,3%)	26 (65,0%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska	51 (53,1%)	22 (55,0%)	73 (53,7%)	0,842
	Visoka	45 (46,9%)	18 (45,0%)	63 (46,3%)	
<b>CD117</b>	Niska	79 (82,3%)	28 (70,0%)	107 (78,7%)	0,111
	Visoka	17 (17,7%)	12 (30,0%)	29 (21,3%)	



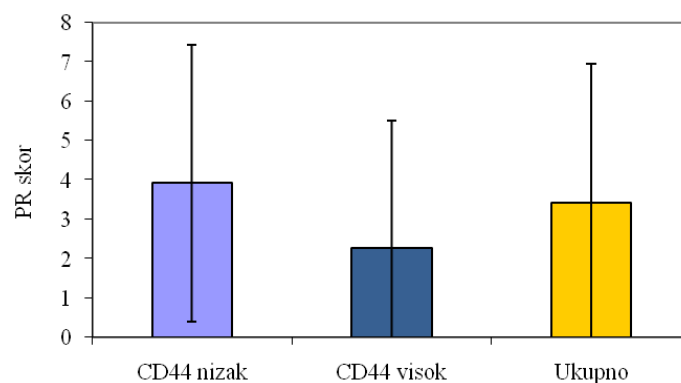
**Grafikon 36.** Lokalizacija karcinoma dojke u odnosu na ekspresiju CD44



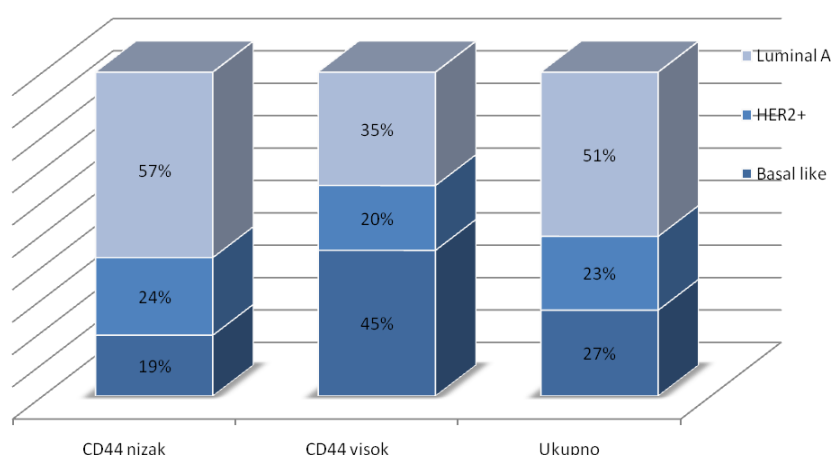
**Grafikon 37.** Proliferativni Ki-67 indeks u odnosu na ekspresiju CD44



**Grafikon 38.** ER skor u odnosu na ekspresiju CD44



**Grafikon 39.** PR skor u odnosu na ekspresiju CD44



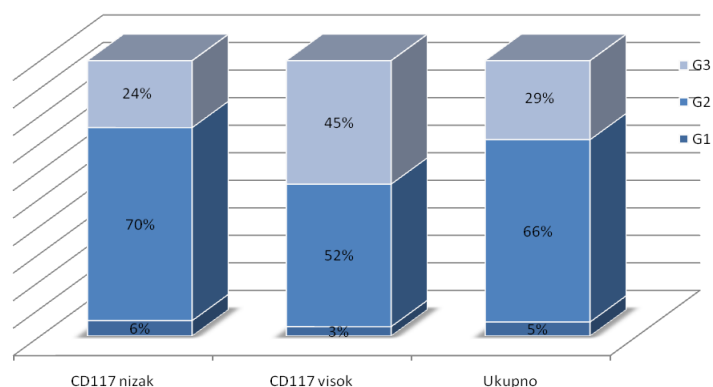
**Grafikon 40.** Molekularni podtip tumora u odnosu na ekspresiju CD44

### 7.3.6. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i ekspresije CD117

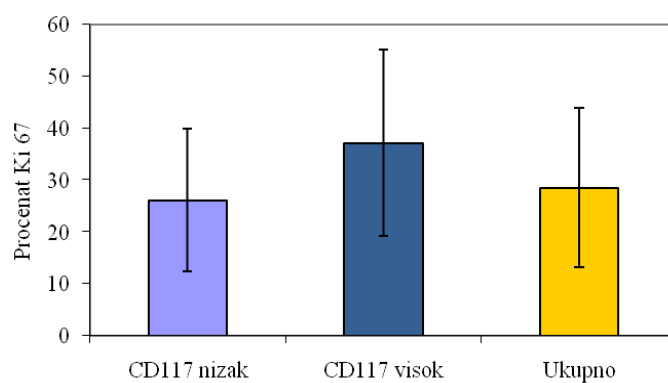
Karcinomi sa visokom ekspresijom CD117 imali su statistički značajno više vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa ( $37,17 \pm 17,90; 26,15 \pm 13,69$ ; Hi kvadrat test:  $p < 0,001$ ), a značajno niže vrednosti ER ( $1,59 \pm 3,17; 4,41 \pm 3,75$ ; Hi kvadrat test:  $p < 0,001$ ) i PR ( $1,31 \pm 2,66; 4,01 \pm 3,50$ ; Hi kvadrat test:  $p < 0,001$ ) skora u odnosu na karcinome sa niskom ekspresijom CD117. Bazalni podtip karcinoma značajno je češće korelirao sa visokom membranskom ekspresijom CD117 ( $65,5; 15,9\%$ ; Hi kvadrat test:  $p < 0,001$ ), kao i G3 gradus ( $44,8; 24,3\%$ ; Hi kvadrat test:  $p = 0,030$ ), dok je luminal A podtip značajno češće bio zastupljen kod pacijentkinja sa tumorom niske ekspresije CD117 ( $58,9; 20,7\%$ ; Hi kvadrat test:  $p < 0,001$ ). U odnosu na ekspresiju ostalih molekularnih markera sa karakteristikama matičnosti, značajna je korelacija visoke ekspresije CD117 i OCT3/4 ( $75,9; 54,2\%$ ; Hi kvadrat test:  $p = 0,036$ ) u karcinomu dojke (tabela 17, grafikoni 41, 42, 43, 44, 45, 46).

**Tabela 17.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na ekspresiju CD117

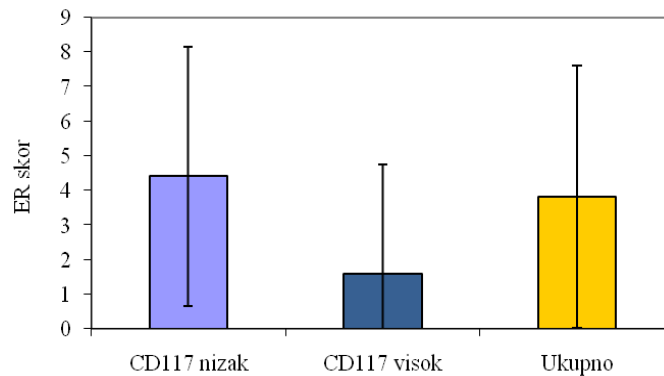
Karakteristika	CD117		Ukupno	P	
	Niska	Visoka			
<b>Starost</b>	63,81±11,85	64,76±12,34	64,01±11,92	0,706	
<b>Lokalizacija</b>	CK	19 (17,8%)	5 (17,2%)	24 (17,6%)	0,948
	DSK	7 (6,5%)	3 (10,3%)	10 (7,4%)	0,486
	DUK	2 (1,9%)	1 (3,4%)	3 (2,2%)	0,608
	GSK	62 (57,9%)	13 (44,8%)	75 (55,1%)	0,208
	GUK	17 (15,9%)	7 (24,1%)	24 (17,6%)	0,301
<b>Veličina tumora</b>	T1	33 (30,8%)	11 (37,9%)	44 (32,4%)	0,469
	T2	55 (51,4%)	13 (44,8%)	68 (50,0%)	0,530
	T3	2 (1,9%)	1 (3,4%)	3 (2,2%)	0,608
	T4	17 (15,9%)	4 (13,8%)	21 (15,4%)	0,782
<b>Status ALN</b>	Negativan	48 (44,9%)	11 (37,9%)	59 (43,4%)	0,504
	Pozitivan	59 (55,1%)	18 (62,1%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	48 (44,9%)	11 (37,9%)	59 (43,4%)	0,504
	pN1	48 (44,9%)	14 (48,3%)	62 (45,6%)	0,743
	pN2,3	11 (10,3%)	4 (13,8%)	15 (11,0%)	0,592
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>	1,88±2,74	3,21±5,07	2,16±3,39	0,061	
<b>% metastatskih ALN</b>	14,35±20,11	20,73±29,34	15,71±22,43	0,175	
<b>Histološki gradus</b>	G1	6 (5,6%)	1 (3,4%)	7 (5,1%)	0,641
	G2	75 (70,1%)	15 (51,7%)	90 (66,2%)	0,064
	G3	26 (24,3%)	13 (44,8%)	39 (28,7%)	0,030
<b>Nottingham scor</b>	6,79±1,14	7,24±0,99	6,88±1,12	0,052	
<b>ER skor</b>	4,41±3,75	1,59±3,17	3,81±3,80	<0,001	
<b>PR skor</b>	4,01±3,50	1,31±2,66	3,43±3,51	<0,001	
<b>HER2</b>	Negativan	80 (74,8%)	25 (86,2%)	105 (77,2%)	0,193
	Pozitivan	27 (25,2%)	4 (13,8%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>	26,15±13,69	37,17±17,90	28,50±15,3	<0,001	
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	17 (15,9%)	19 (65,5%)	36 (26,5%)	<0,001
	HER2+	27 (25,2%)	4 (13,8%)	31 (22,8%)	0,193
	Luminalni A	63 (58,9%)	6 (20,7%)	69 (50,7%)	<0,001
<b>KLF4</b>	Niska	66 (61,7%)	15 (51,7%)	81 (59,6%)	0,332
	Visoka	41 (38,3%)	14 (48,3%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska	64 (59,8%)	16 (55,2%)	80 (58,8%)	0,652
	Visoka	43 (40,2%)	13 (44,8%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	49 (45,8%)	7 (24,1%)	56 (41,2%)	0,036
	Visoka	58 (54,2%)	22 (75,9%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska	61 (57,0%)	12 (41,4%)	73 (53,7%)	0,134
	Visoka	46 (43,0%)	17 (58,6%)	63 (46,3%)	
<b>CD44</b>	Niska	79 (73,8%)	17 (58,6%)	96 (70,6%)	0,112
	Visoka	28 (26,2%)	12 (41,4%)	40 (29,4%)	



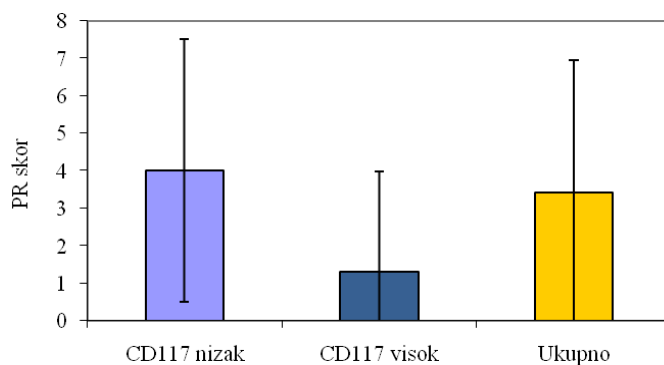
**Grafikon 41.** Histološki gradus tumora u odnosu na ekspresiju CD117



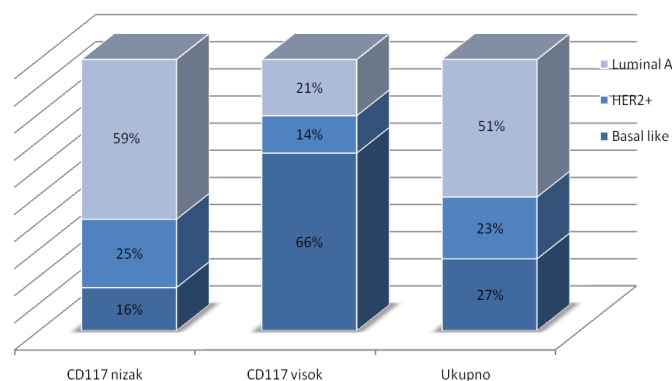
**Grafikon 42.** Proliferativni Ki-67 indeks u odnosu na ekspresiju CD117



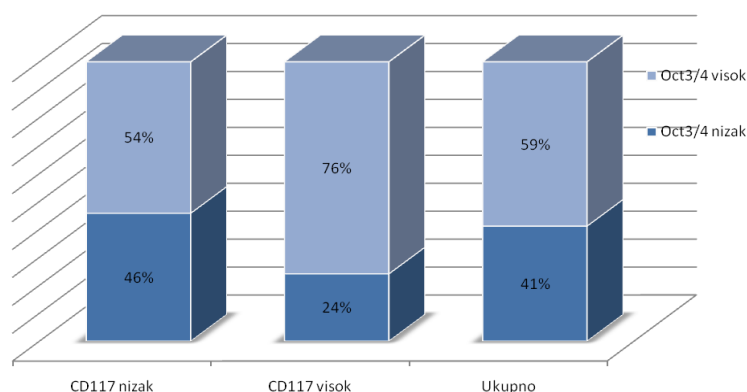
**Grafikon 43.** ER skor u odnosu na ekspresiju CD117



**Grafikon 44.** PR skor u odnosu na ekspresiju CD117



**Grafikon 45.** Molekularni podtip tumora u odnosu na ekspresiju CD117



**Grafikon 46.** Ekspresija OCT3/4 u odnosu na ekspresiju CD117

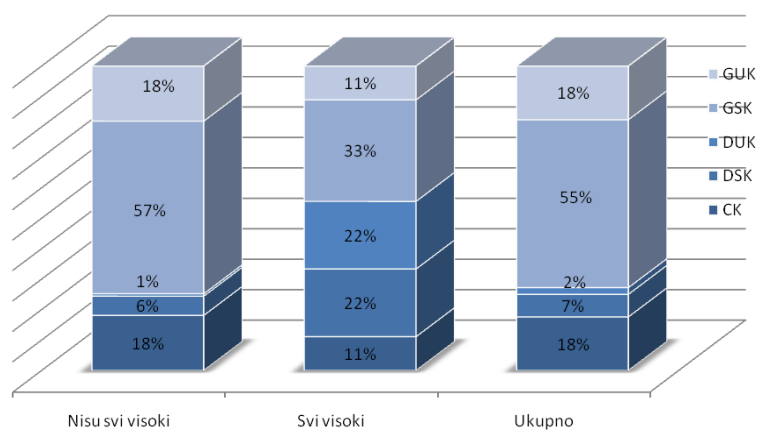
### 7.3.7. Korelacija kliničko-patoloških karakteristika karcinoma i koekspresije nuklearnih i membranskih markera

Analizom pacijentkinja čiji su tumori pokazivali visoku ekspresiju sva četiri nuklearna molekularna markera sa svojstvima matičnosti – KLF4, SOX2, OCT3/4 i EZH2 u odnosu na pacijentkinje čiji su tumori ekspimirali manji broj markera (1–3), dobijeni su sledeći rezultati:

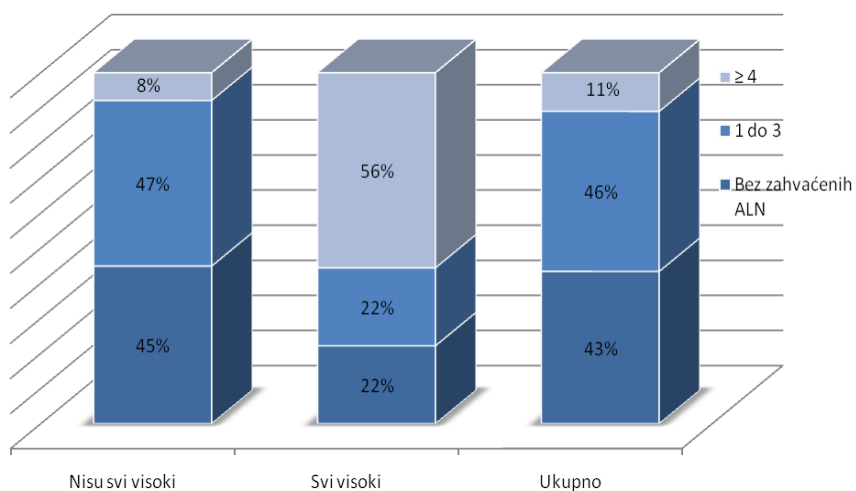
- lokalizacija tumora koji su pokazali visoku ekspresiju sva četiri nuklearna molekularna markera značajno je češća u DUK (22,2:0,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,011$ );
- visoka ekspresija sva četiri nuklearna molekularna markera značajno je korelirala sa pN2,3 stadijumima (55,6:7,9%; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ ), većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom ( $6,00\pm 6,02:1,89\pm 2,98$ ; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ ) i višim procentom zahvaćenih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih ( $37,09\pm 32,75:14,2\pm 20,88$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ );
- koekspresija nuklearnih molekularnih markera značajno je korelirala sa visokom ekspresijom oba membranskih proteina – CD44 i CD117 (33,3:7,1%; Hi kvadrat test:  $p=0,007$ ) (tabela 18, grafikoni 47, 48, 49, 50, 51).

**Tabela 18.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera

Karakteristika	Visoka ekspresija nuklearnih markera		Ukupno	P	
	1–3 markera	4 markera			
<b>Starost</b>		64,31±12,05	59,89±9,47	64,01±11,92	0,284
<b>Lokalizacija</b>	CK	23 (18,1%)	1 (11,1%)	24 (17,6%)	0,595
	DSK	8 (6,3%)	2 (22,2%)	10 (7,4%)	0,077
	DUK	1 (0,8%)	2 (22,2%)	3 (2,2%)	0,011
	GSK	72 (56,7%)	3 (33,3%)	75 (55,1%)	0,298
	GUK	23 (18,1%)	1 (11,1%)	24 (17,6%)	0,595
<b>Veličina tumora</b>	T1	42 (33,1%)	2 (22,2%)	44 (32,4%)	0,501
	T2	62 (48,8%)	6 (66,7%)	68 (50,0%)	0,301
	T3	3 (2,4%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,641
	T4	20 (15,7%)	1 (11,1%)	21 (15,4%)	0,710
<b>Status ALN</b>	Negativan	57 (44,9%)	2 (22,2%)	59 (43,4%)	0,185
	Pozitivan	70 (55,1%)	7 (77,8%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	57 (44,9%)	2 (22,2%)	59 (43,4%)	0,185
	pN1	60 (47,2%)	2 (22,2%)	62 (45,6%)	0,145
	pN2,3	10 (7,9%)	5 (55,6%)	15 (11,0%)	<0,001
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>		1,89±2,98	6,00±6,02	2,16±3,39	<0,001
<b>% metastatskih ALN</b>		14,20±20,88	37,09±32,75	15,71±22,43	0,003
<b>Histološki gradus</b>	G1	7 (5,5%)	0 (0,0%)	7 (5,1%)	0,470
	G2	83 (65,4%)	7 (77,8%)	90 (66,2%)	0,447
	G3	37 (29,1%)	2 (22,2%)	39 (28,7%)	0,658
<b>Nottingham scor</b>		6,87±1,11	7,00±1,41	6,88±1,12	0,746
<b>ER skor</b>		3,84±3,81	3,33±3,97	3,81±3,80	0,699
<b>PR skor</b>		3,46±3,51	3,11±3,79	3,43±3,51	0,777
<b>HER2</b>	Negativan	99 (78,0%)	6 (66,7%)	105 (77,2%)	0,435
	Pozitivan	28 (22,0%)	3 (33,3%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>		28,6±15,53	27,11±12,27	28,5±15,30	0,779
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	34 (26,8%)	2 (22,2%)	36 (26,5%)	0,765
	HER2+	28 (22,0%)	3 (33,3%)	31 (22,8%)	0,435
	Luminalni A	65 (51,2%)	4 (44,4%)	69 (50,7%)	0,696
<b>Visoka ekspresija membranskih proteina</b>	0-1	118 (92,9%)	6 (66,7%)	124 (91,2%)	0,007
	2	9 (7,1%)	3 (33,3%)	12 (8,8%)	

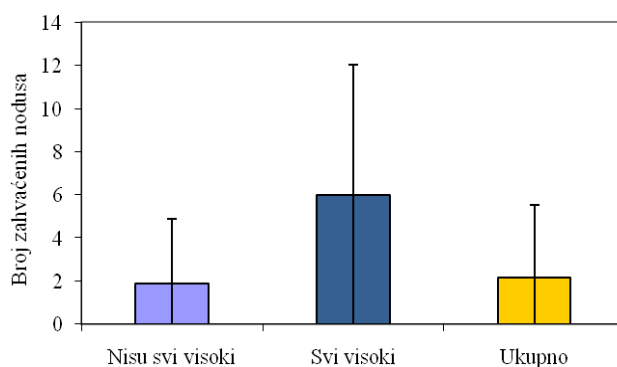


**Grafikon 47.** Lokalizacija tumora u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera

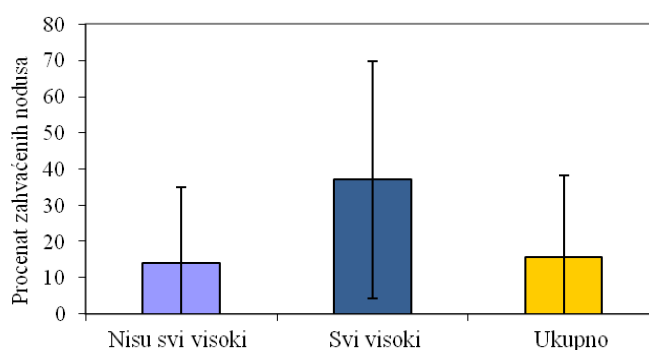


**Grafikon 48.** Stadijum aksilarnih limfnih nodusa (pN) u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera

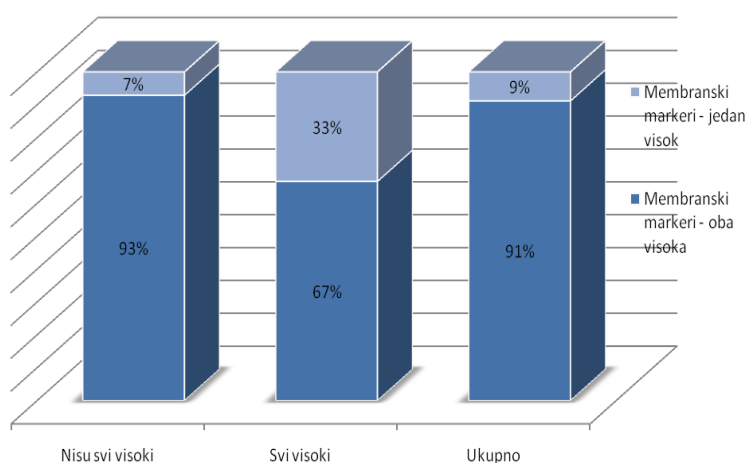




**Grafikon 49.** Prosečan broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera



**Grafikon 50.** Procenat metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera



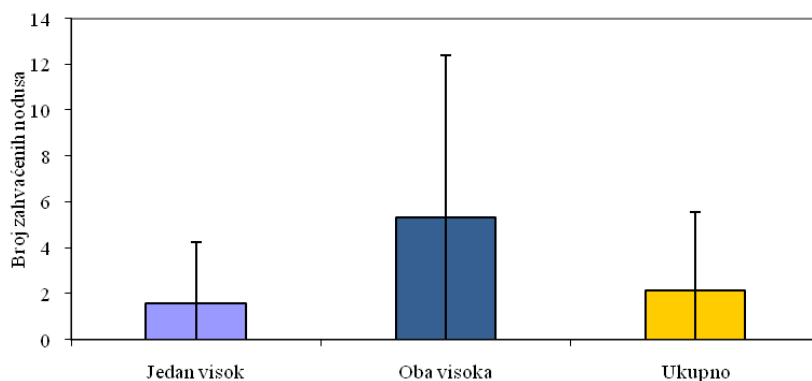
**Grafikon 51.** Visoka ekspresija membranskih proteina u odnosu na visoku ekspresiju nuklearnih molekularnih markera

Pacijentkinje kod kojih je prisutna visoka ekspresija oba membranskih proteina – CD44 i CD117 u karcinomu imale su statistički značajno veći broj metastazama zahvaćenih limfnih nodusa aksile ( $5,33 \pm 7,06; 1,85 \pm 2,66$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,001$ ) i viši procenat zahvaćenih nodusa u odnosu na ukupan broj analiziranih ( $31,37 \pm 40,54; 14,20 \pm 19,46$ ; Hi kvadrat test:  $p=0,011$ ) nego pacijentkinje čiji su tumori pokazivali nisku ekspresiju ovih proteina ili je samo jedan molekularni

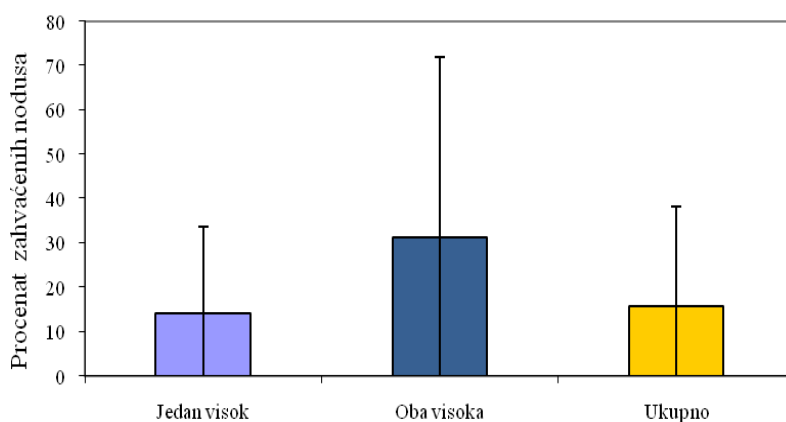
marker (CD44 /ili CD117) pokazivao visoku ekspresiju. Kod njih je značajno češće bio zastupljen tumor G3 gradusa (58,3:25,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,038$ ). Visoka ekspresija CD44 i CD117 bila je značajno povezana sa nižim vrednostima ER (0,58±2,02:4,12±3,80; Hi kvadrat test:  $p=0,002$ ) i PR skora (0,42±1,44:3,73±3,52; Hi kvadrat test:  $p=0,002$ ), višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa (41,00±18,12:27,29±14,52; Hi kvadrat test:  $p=0,003$ ) i višom učestalošću bazalnog podtipa (83,3:21,0%; Hi kvadrat test:  $p<0,001$ ) karcinoma dojke, a značajno nižom učestalošću luminalnog A podtipa (8,3:54,8%; Hi kvadrat test:  $p=0,002$ ) (tabela 19, grafikoni 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58).

**Tabela 19.** Kliničko-patološki parametri u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117

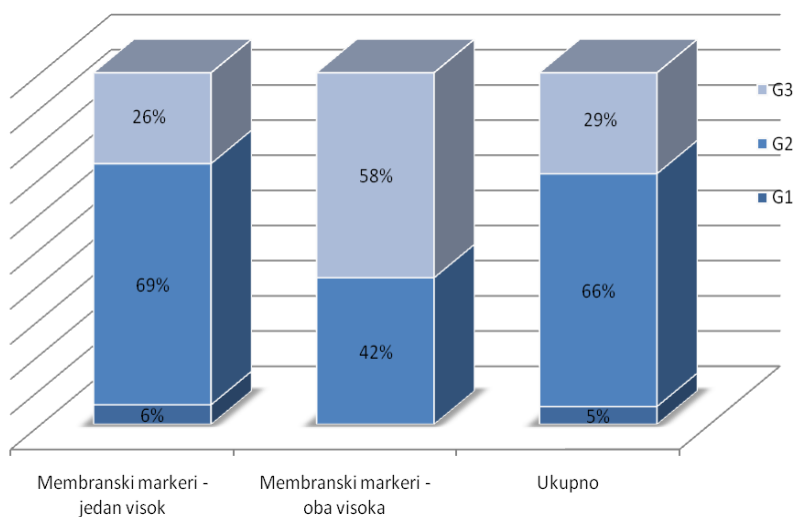
Karakteristika	Visoka ekspresija membranskih proteina		Ukupno	P	
	0 ili 1 marker	2 markera			
<b>Starost</b>	64,09±11,62	63,25±15,19	64,01±11,92	0,817	
<b>Lokalizacija</b>	CK	23 (18,5%)	1 (8,3%)	24 (17,6%)	0,375
	DSK	8 (6,5%)	2 (16,7%)	10 (7,4%)	0,195
	DUK	2 (1,6%)	1 (8,3%)	3 (2,2%)	0,130
	GSK	68 (54,8%)	7 (58,3%)	75 (55,1%)	0,816
	GUK	23 (18,5%)	1 (8,3%)	24 (17,6%)	0,375
<b>Veličina tumora</b>	T1	40 (32,3%)	4 (33,3%)	44 (32,4%)	0,939
	T2	61 (49,2%)	7 (58,3%)	68 (50,0%)	0,545
	T3	3 (2,4%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)	0,586
	T4	20 (16,1%)	1 (8,3%)	21 (15,4%)	0,475
<b>Status ALN</b>	Negativan	55 (44,4%)	4 (33,3%)	59 (43,4%)	0,462
	Pozitivan	69 (55,6%)	8 (66,7%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	55 (44,4%)	4 (33,3%)	59 (43,4%)	0,462
	pN1	57 (46,0%)	5 (41,7%)	62 (45,6%)	0,775
	pN2,3	12 (9,7%)	3 (25,0%)	15 (11,0%)	0,106
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>	1,85±2,66	5,33±7,06	2,16±3,39	0,001	
<b>% metastatskih ALN</b>	14,20±19,46	31,37±40,54	15,71±22,43	0,011	
<b>Histološki gradus</b>	G1	7 (5,6%)	0 (0,0%)	7 (5,1%)	0,398
	G2	85 (68,5%)	5 (41,7%)	90 (66,2%)	0,060
	G3	32 (25,8%)	7 (58,3%)	39 (28,7%)	0,038
<b>Nottingham scor</b>	6,84±1,11	7,33±1,16	6,88±1,12	0,146	
<b>ER skor</b>	4,12±3,80	0,58±2,02	3,81±3,80	0,002	
<b>PR skor</b>	3,73±3,52	0,42±1,44	3,43±3,51	0,002	
<b>HER2</b>	Negativan	94 (75,8%)	11 (91,7%)	105 (77,2%)	0,211
	Pozitivan	30 (24,2%)	1 (8,3%)	31 (22,8%)	
<b>Ki-67 indeks</b>	27,29±14,52	41,00±18,12	28,50±15,30	0,003	
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	26 (21,0%)	10 (83,3%)	36 (26,5%)	<0,001
	HER2+	30 (24,2%)	1 (8,3%)	31 (22,8%)	0,211
	Luminalni A	68 (54,8%)	1 (8,3%)	69 (50,7%)	0,002



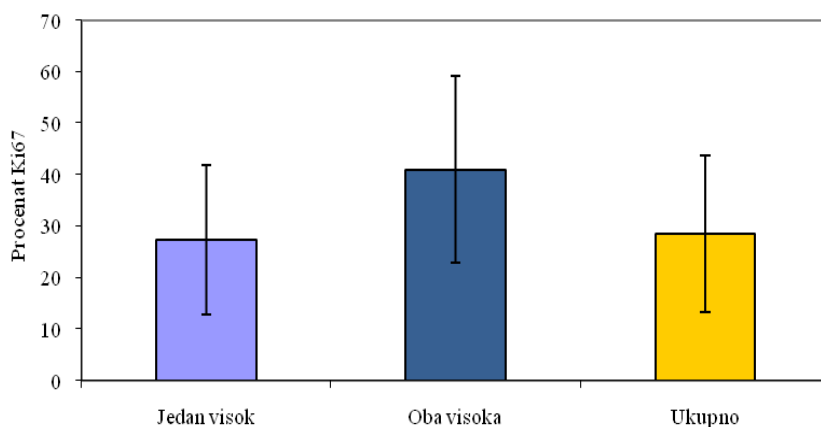
**Grafikon 52.** Prosečan broj metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



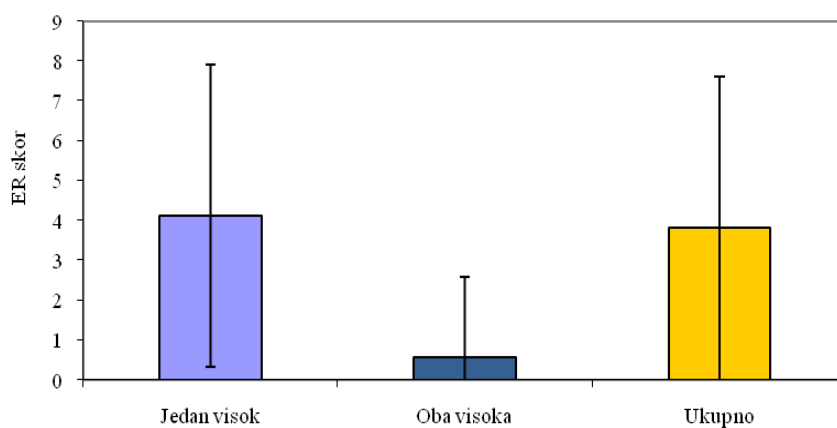
**Grafikon 53.** Procenat metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



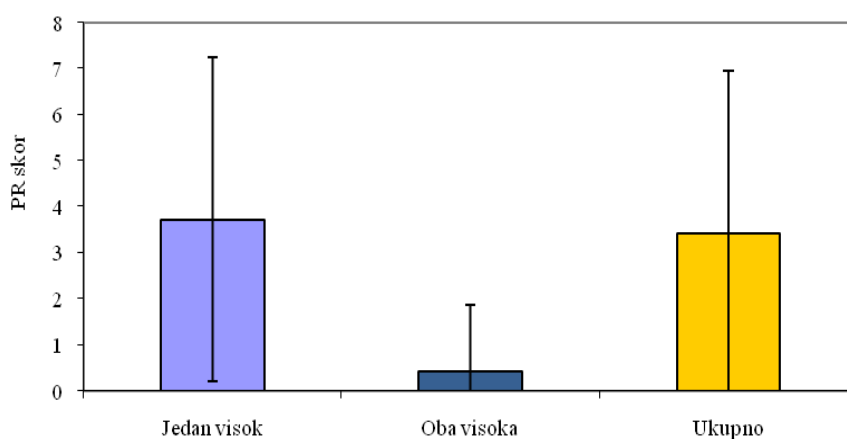
**Grafikon 54.** Histološki gradus tumora u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



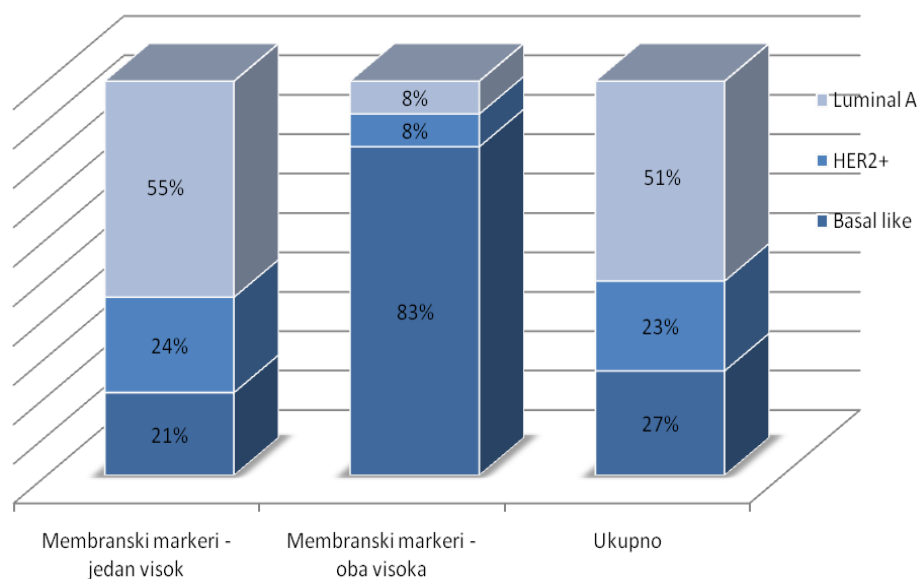
**Grafikon 55.** Proliferativni Ki-67 indeks u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



**Grafikon 56.** ER skor u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



**Grafikon 57.** PR skor u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117



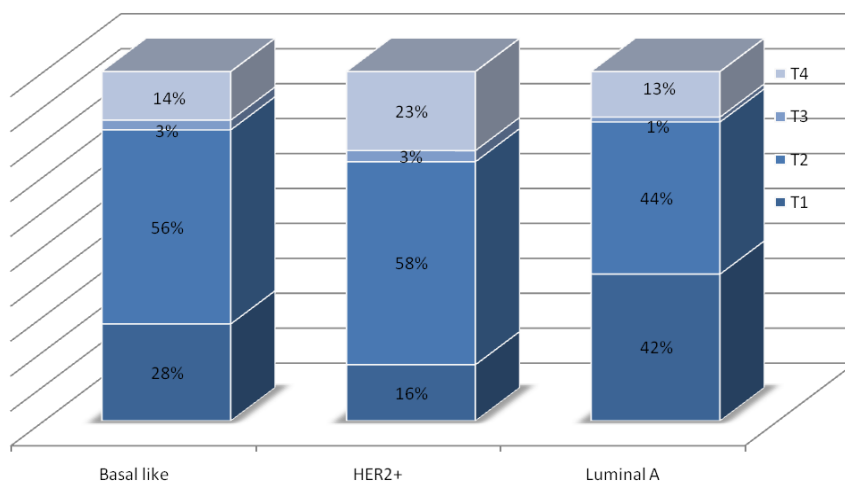
**Grafikon 58.** Molekularni podtip tumora u odnosu na visoku ekspresiju membranskih proteina CD44 i CD117

#### **7.4. KOMPARATIVNA ANALIZA MOLEKULARNIH PODTIPOVA KARCINOMA DOJKE U ODNOSU NA KLINIČKO-PATOLOŠKE PARAMETRE I EKSPRESIJU MOLEKULARNIH MARKERA**

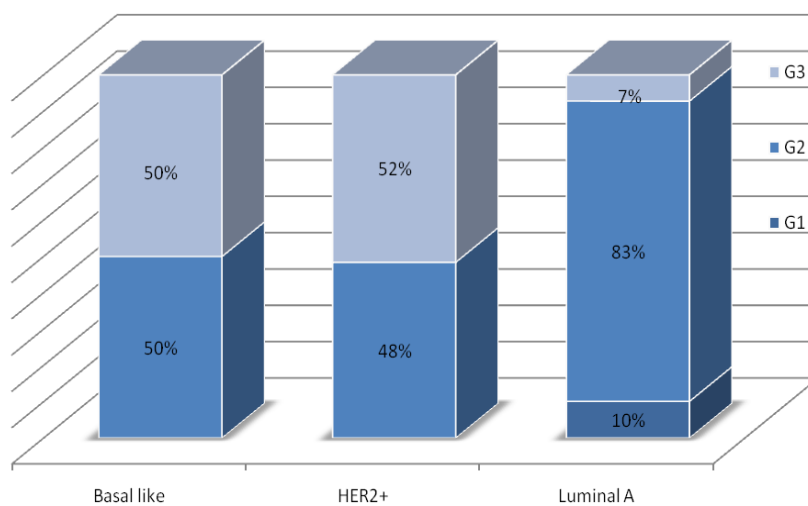
Luminalni A molekularni podtip karcinoma dojke značajno je bio povezan sa T1 stadijumom (42,0%), dobrom (10,1%) i umerenom (82,6%) diferencijacijom tumora, odnosno G1 i G2 histološkim gradusom u odnosu na ostala dva podtipa. Luminalni A molekularni podtip imao je značajno niže vrednosti Nottingham skora ( $6,20 \pm 0,98$ ) i proliferativnog Ki-67 indeksa ( $17,16 \pm 5,90$ ) i najmanji broj alterisanih molekularnih markera sa svojstvima matičnosti koji su pokazivali visoku ekspresiju ( $2,07 \pm 1,33$ ) u odnosu na ostala dva podtipa. Bazalni podtip tumora značajno je bio povezan sa visokom ekspresijom CD117 (52,8%), CD44 markera (50,0%) i visokom ekspresijom oba membranska markera (CD44 i CD117: 27,8%) u odnosu na ostala dva podtipa karcinoma. Bazalni i HER2 pozitivni podtipovi karcinoma pokazali su značajnu korelaciju sa visokom ekspresijom SOX2 u odnosu na luminalni A podtip (58,3%:48,4%:29,0% Hi kvadrat test:  $p=0,010$ ) (tabela 20, grafikoni 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67).

**Tabela 20.** Molekularni podtipovi karcinoma dojke u odnosu na kliničko-patološke parametre i ekspresiju molekularnih markera

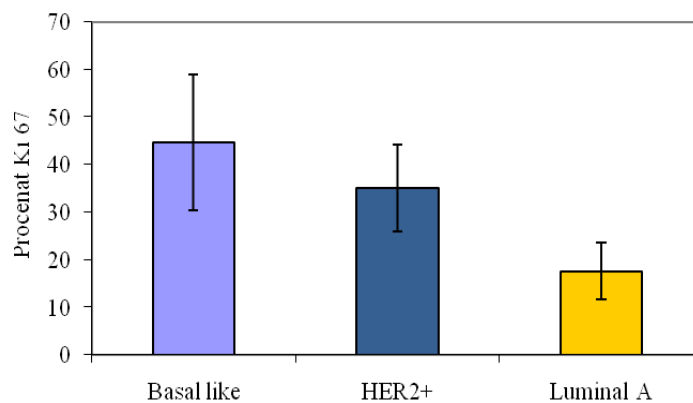
Karakteristike	Molekularni podtip			Ukupno	P	
	Basalni	HER2+	Luminalni A			
<b>Starost</b>		64,86±12,21	61,68±12,73	64,62±11,42	64,01±11,92	0,463
<b>Lokalizacija</b>	CK	5 (13,9%)	5 (16,1%)	14 (20,3%)	24 (17,6%)	0,694
	DSK	4 (11,1%)	5 (16,1%)	1 (1,4%)	10 (7,4%)	0,020
	DUK	1 (2,8%)	0 (0,0%)	2 (2,9%)	3 (2,2%)	0,635
	GSK	18 (50,0%)	16 (51,6%)	41 (59,4%)	75 (55,1%)	0,591
	GUK	8 (22,2%)	5 (16,1%)	11 (15,9%)	24 (17,6%)	0,703
<b>Veličina tumora</b>	T1	10 (27,8%)	5 (16,1%)	29 (42,0%)	44 (32,4%)	0,030
	T2	20 (55,6%)	18 (58,1%)	30 (43,5%)	68 (50,0%)	0,297
	T3	1 (2,8%)	1 (3,2%)	1 (1,4%)	3 (2,2%)	0,824
	T4	5 (13,9%)	7 (22,6%)	9 (13,0%)	21 (15,4%)	0,454
<b>Status ALN</b>	Negativan	15 (41,7%)	13 (41,9%)	31 (44,9%)	59 (43,4%)	0,934
	Pozitivan	21 (58,3%)	18 (58,1%)	38 (55,1%)	77 (56,6%)	
<b>pN stadijum ALN</b>	pN0	15 (41,7%)	13 (41,9%)	31 (44,9%)	59 (43,4%)	0,934
	pN1	15 (41,7%)	13 (41,9%)	34 (49,3%)	62 (45,6%)	0,681
	pN2,3	6 (16,7%)	5 (16,1%)	4 (5,8%)	15 (11,0%)	0,141
<b>Broj zahvaćenih ALN</b>		2,97±4,49	2,42±3,01	1,62±2,79	2,16±3,39	0,137
<b>% metastatskih ALN</b>		21,52±30,52	17,42±19,90	11,91±17,62	15,71±22,43	0,101
<b>Histološki gradus</b>	G1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	7 (10,1%)	7 (5,1%)	0,028
	G2	18 (50,0%)	15 (48,4%)	57 (82,6%)	90 (66,2%)	<0,001
	G3	18 (50,0%)	16 (51,6%)	5 (7,2%)	39 (28,7%)	<0,001
<b>Nottingham scor</b>		7,47±0,81	7,71±0,74	6,20±0,98	6,88±1,12	<0,001
<b>Ki-67 indeks</b>		44,64±14,30	35,00±9,16	17,16±5,90	28,50±15,30	<0,001
<b>KLF4</b>	Niska	25 (69,4%)	21 (67,7%)	35 (50,7%)	81 (59,6%)	0,102
	Visoka	11 (30,6%)	10 (32,3%)	34 (49,3%)	55 (40,4%)	
<b>SOX2</b>	Niska	15 (41,7%)	16 (51,6%)	49 (71,0%)	80 (58,8%)	0,010
	Visoka	21 (58,3%)	15 (48,4%)	20 (29,0%)	56 (41,2%)	
<b>OCT3/4</b>	Niska	14 (38,9%)	9 (29,0%)	33 (47,8%)	56 (41,2%)	0,199
	Visoka	22 (61,1%)	22 (71,0%)	36 (52,2%)	80 (58,8%)	
<b>EZH2</b>	Niska	23 (63,9%)	15 (48,4%)	35 (50,7%)	73 (53,7%)	0,350
	Visoka	13 (36,1%)	16 (51,6%)	34 (49,3%)	63 (46,3%)	
<b>CD44</b>	Niska	18 (50,0%)	23 (74,2%)	55 (79,7%)	96 (70,6%)	0,006
	Visoka	18 (50,0%)	8 (25,8%)	14 (20,3%)	40 (29,4%)	
<b>CD117</b>	Niska	17 (47,2%)	27 (87,1%)	63 (91,3%)	107 (78,7%)	<0,001
	Visoka	19 (52,8%)	4 (12,9%)	6 (8,7%)	29 (21,3%)	
<b>Broj nuklearnih markera visoke ekspresije</b>	0	6 (16,7%)	1 (3,2%)	8 (11,6%)	15 (11,0%)	0,211
	1	7 (19,4%)	8 (25,8%)	21 (30,4%)	36 (26,5%)	0,478
	2	11 (30,6%)	14 (45,2%)	21 (30,4%)	46 (33,8%)	0,316
	3	10 (27,8%)	5 (16,1%)	15 (21,7%)	30 (22,1%)	0,516
	4	2 (5,6%)	3 (9,7%)	4 (5,8%)	9 (6,6%)	0,373
<b>Broj membranskih markera visoke ekspresije</b>	0	9 (25,0%)	20 (64,5%)	50 (72,5%)	79 (58,1%)	<0,001
	1	17 (47,2%)	10 (32,3%)	18 (26,1%)	45 (33,1%)	0,091
	2	10 (27,8%)	1 (3,2%)	1 (1,4%)	12 (8,8%)	<0,001
<b>Broj alterisanih markera</b>		2,86±1,53	2,42±1,09	2,07±1,33	2,36±1,37	0,018



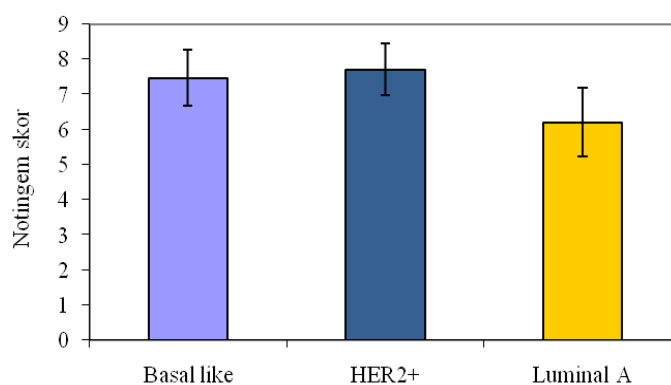
**Grafikon 59.** Veličina tumora (T) u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke



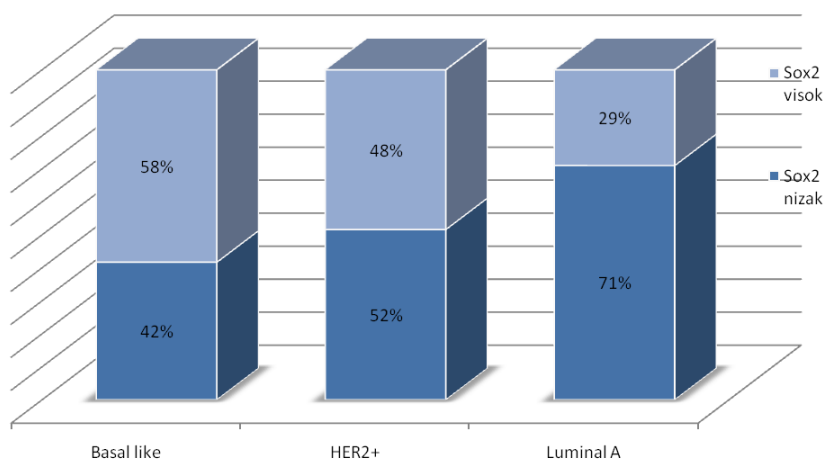
**Grafikon 60.** Histološki gradus tumora u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke



**Grafikon 61.** Proliferativni Ki-67 indeks u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke

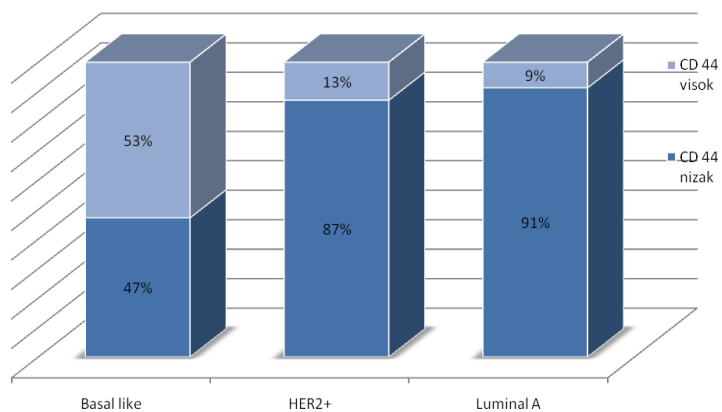


**Grafikon 62.** Nottingham skor u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke

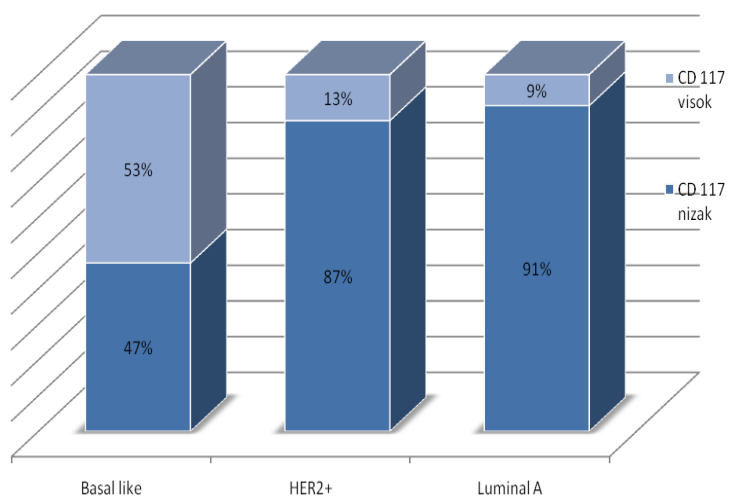


**Grafikon 63.** Ekspresija SOX2 u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke

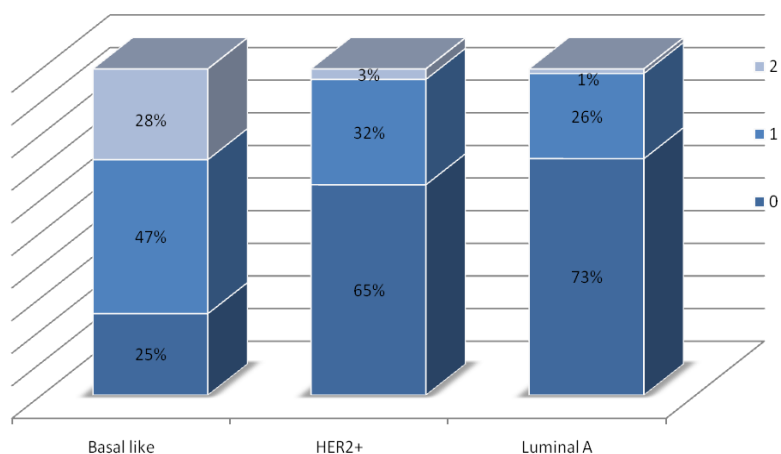




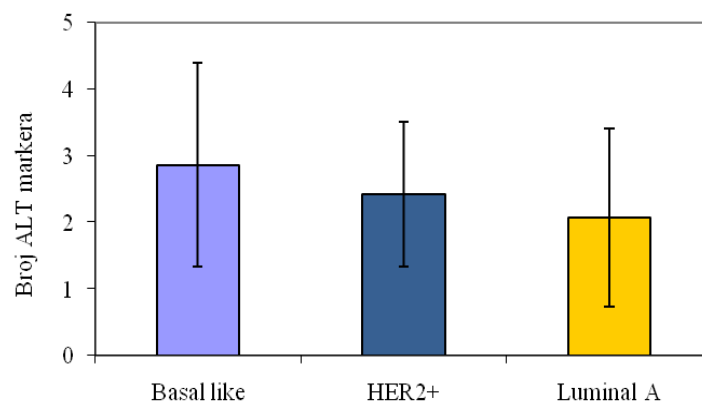
**Grafikon 64.** Ekspresija CD44 u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke



**Grafikon 65.** Ekspresija CD117 u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke



**Grafikon 66.** Broj membranskih markera visoke ekspresije u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke



**Grafikon 67.** Broj alterisanih markera u odnosu na molekularni podtip karcinoma dojke

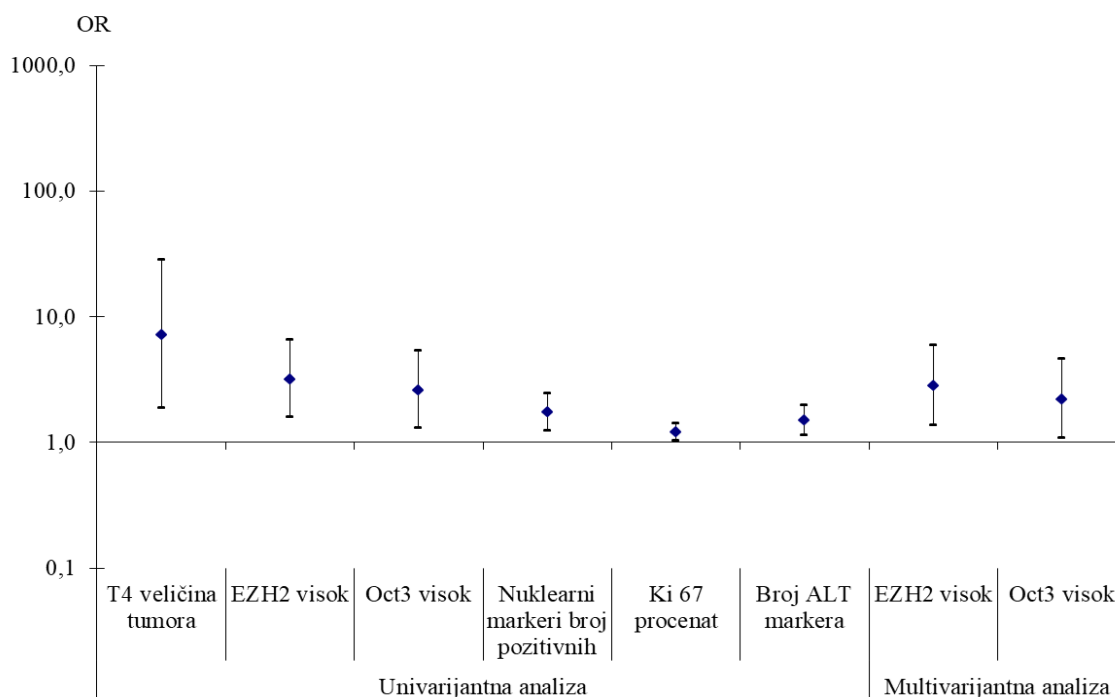
### **7.5. POVEZANOST KLINIČKO-PATOLOŠKIH PARAMETARA, MOLEKULARNOG PODTIPA KARCINOMA I EKSPRESIJE MOLEKULARNIH MARKERA SA LOKOREGIONALNIM ŠIRENJEM INVAZIVNOG DUKTALNOG KARCINOMA DOJKE**

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da je povećana verovatnoća za prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim nodusima povezana sa T4 stadijumom tumora (OR=7,200; 95%IP: 1,850-28,016; p=0,004), višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa (OR=1,022; 95%IP: 1,001-1,044; p=0,049), visokom ekspresijom OCT3/4 (OR=2,617; 95%IP: 1,295-5,289; p=0,007) i EZH2 (OR=3,203; 95%IP: 1,566-6,554; p=0,001), većim brojem nuklearnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju (OR=1,733; 95%IP: 1,228-2,448; p=0,002), kao i većim brojem alterisanih markera (OR=1,499; 95%IP: 1,136-1,977; p=0,004).

Multivarijantna logistička regresiona analiza, kao značajne prediktore za pozitivan status aksilarnih limfnih nodusa, odnosno pojavu metastaza, izdvojila je visoku ekspresiju OCT3/4 (OR=2,219; 95%IP: 1,069-4,602; p=0,032) i EZH2 (OR=2,821; 95%IP: 1,356-5,872; p=0,006) (tabela 21, grafikon 68).

**Tabela 21.** Povezanost kliničko-patoloških parametara, molekularnog podtipa karcinoma i ekspresije molekularnih markera sa pozitivnim statusom aksilarnih limfnih nodusa, rezultati logističke regresione analize

Karakteristika	OR	Granice 95% IP za OR		P	
		Donja	Gornja		
<b><i>Univarijantna analiza</i></b>					
<b>Starost</b>	1,024	0,995	1,054	0,109	
	CK	referenca			
	DSK	0,714	0,162	3,143	0,656
<b>Lokalizacija</b>	DUK	1,429	0,113	18,004	0,783
	GSK	0,960	0,378	2,437	0,931
	GUK	0,844	0,270	2,644	0,771
	T1	referenca			
<b>Veličina tumora</b>	T2	1,614	0,752	3,463	0,219
	T3	0,001	0,000	10,033	0,999
	T4	7,200	1,850	28,016	0,004
	G1	referenca			
<b>Histološki gradus</b>	G2	0,643	0,127	3,261	0,594
	G3	1,228	0,576	2,617	0,595
<b>Nottingham skor</b>		0,866	0,637	1,178	0,360
<b>ER skor</b>		0,985	0,901	1,077	0,740
<b>PR skor</b>		0,977	0,887	1,077	0,642
<b>HER2 +</b>		1,080	0,480	2,429	0,853
<b>Ki-67 indeks</b>		1,022	1,001	1,044	0,049
	Basalni	referenca			
<b>Molekularni podtip</b>	HER2+	0,989	0,374	2,618	0,982
	Luminani A	0,876	0,388	1,978	0,749
<b>KLF4 visoka ekspresija</b>		1,431	0,712	2,874	0,314
<b>SOX2 visoka ekspresija</b>		1,037	0,520	2,066	0,918
<b>OCT3 visoka ekspresija</b>		2,617	1,295	5,289	0,007
<b>EZH2 visoka ekspresija</b>		3,203	1,566	6,554	0,001
<b>CD44 visoka ekspresija</b>		1,052	0,499	2,217	0,893
<b>CD117 visoka ekspresija</b>		1,331	0,574	3,088	0,505
<b>Broj nuklearnih markera visoke ekspresije</b>		1,733	1,228	2,448	0,002
<b>Broj membranskih markera visoke ekspresije</b>		1,147	0,679	1,935	0,609
<b>Koekspresija svih nuklearnih markera</b>		2,850	0,570	14,257	0,202
<b>Koekspresija membranskih markera</b>		1,594	0,456	5,572	0,465
<b>Broj alterisanih markera</b>		1,499	1,136	1,977	0,004
<b><i>Multivarijantna analiza</i></b>					
<b>OCT3/4 visoka ekspresija</b>		2,219	1,069	4,602	0,032
<b>EZH2 visoka ekspresija</b>		2,821	1,356	5,872	0,006



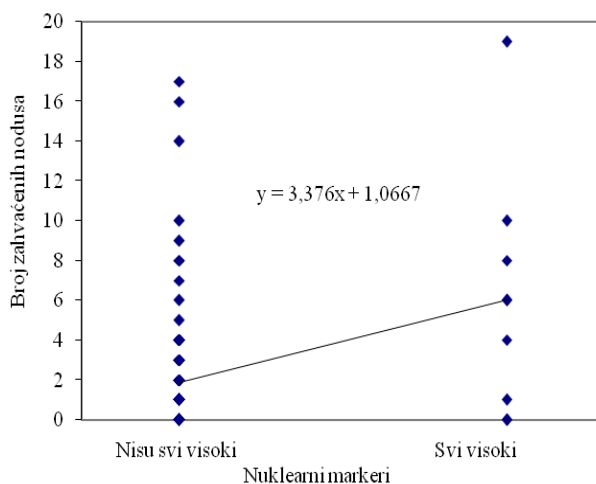
**Grafikon 68.** Povezanost ispitivanih parametara i verovatnoće za pozitivni status aksilarnih limfnih nodusa

Univarijantna linearna regresiona analiza broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom pokazala je da povećanje broja zahvaćenih limfnih nodusa korelira sa smanjenjem vrednosti ER ( $B=-0,151$ ; 95%IP: -0,302 do -0,001;  $p=0,048$ ) i PR skora ( $B=-0,189$ ; 95%IP: -0,351 do -0,027;  $p=0,022$ ), kao i visokom ekspresijom SOX2 ( $B=1,395$ ; 95%IP: 0,246-2,543;  $p=0,018$ ), OCT3/4 ( $B=1,520$ ; 95%IP: 0,376-2,663;  $p=0,010$ ) i EZH2 markera ( $B=1,266$ ; 95%IP: 0,129-2,403;  $p=0,029$ ). Takođe, na povećanje broja metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa uticaj ima povećanje broja nuklearnih markera koji su pokazivali visoku ekspresiju – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 (OR=0,989; 95%IP: 0,484-1,495;  $p<0,001$ ), kao i koekspresija svih nuklearnih markera ( $B=4,110$ ; 95%IP: 1,897-6,324;  $p<0,001$ ). Značajan uticaj pokazala je i visoka ekspresija membranskih markera CD44 i CD117, gde je broj zahvaćenih limfnih nodusa aksile korelirao sa brojem membranskih proteina ( $B=1,049$ ; 95%IP: 0,183-1,915;  $p=0,018$ ), odnosno sa koekspresijom CD44/CD117 ( $B=3,478$ ; 95%IP: 1,532-5,425;  $p=0,001$ ). Povećanje broja alterisanih molekularnih markera imalo je uticaj na povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama ( $B=0,881$ ; 95%IP: 0,485-1,276;  $p<0,001$ ).

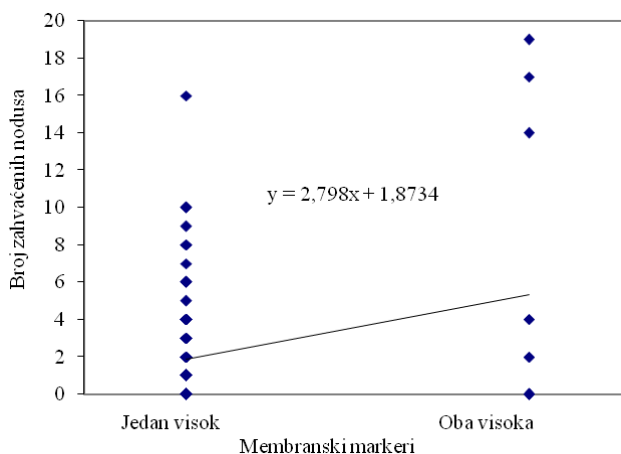
Multivarijantna linearna regresiona analiza izdvojila je koekspresiju KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 ( $B=3,376$ ; 95%IP: 1,159-5,592;  $p=0,003$ ) i koekspresiju CD44 i CD117 ( $B=2,798$ ; 95%IP: 0,855-4,740;  $p=0,005$ ) kao snažne indikatore da će pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke imati povećan broj metastazama zahvaćenih limfnih nodusa aksile (tabela 22, grafikon 69, 70).

**Tabela 22.** Povezanost kliničko-patoloških parametara, molekularnog podtipa karcinoma i ekspresije molekularnih markera sa brojem zahvaćenih limfnih nodusa, rezultati linearne regresione analize

Karakteristika	B	Granice 95% IP za B		P	
		Donja	Gornja		
<i>Univarijantna analiza</i>					
<b>Starost</b>	0,014	-0,034	0,063	0,560	
<b>Lokalizacija</b>	CK	-0,196	-1,710	1,317	0,798
	DSK	1,768	-0,423	3,959	0,113
	DUK	0,175	-3,755	4,106	0,930
	GSK	0,174	-0,986	1,335	0,767
	GUK	-0,955	-2,461	0,550	0,212
<b>Veličina tumora</b>	T1	-0,709	-1,937	0,518	0,255
	T2	0,029	-1,125	1,184	0,960
	T3	-2,211	-6,123	1,702	0,266
	T4	1,498	-0,079	3,075	0,062
<b>Histološki gradus</b>	G1	-1,225	-3,829	1,379	0,354
	G2	0,113	-1,107	1,333	0,855
	G3	0,169	-1,107	1,445	0,794
<b>Nottingham skor</b>	0,045	-0,471	0,561	0,865	
<b>ER skor</b>	-0,151	-0,302	-0,001	0,048	
<b>PR skor</b>	-0,189	-0,351	-0,027	0,022	
<b>HER2 +</b>	0,334	-1,041	1,709	0,632	
<b>Ki-67 indeks</b>	0,016	-0,022	0,054	0,396	
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	1,102	-0,193	2,397	0,095
	HER2+	0,334	-1,041	1,709	0,632
	Luminalni A	-1,093	-2,233	0,046	0,060
<b>KLF4 visoka ekspresija</b>	0,583	-0,589	1,755	0,327	
<b>SOX2 visoka ekspresija</b>	1,395	0,246	2,543	0,018	
<b>OCT3 visoka ekspresija</b>	1,520	0,376	2,663	0,010	
<b>EZH2 visoka ekspresija</b>	1,266	0,129	2,403	0,029	
<b>CD44 visoka ekspresija</b>	1,081	-0,172	2,335	0,090	
<b>CD117 visoka ekspresija</b>	1,328	-0,063	2,719	0,061	
<b>Broj nuklearnih markera visoke ekspresije</b>	0,989	0,484	1,495	<0,001	
<b>Broj membranskih markera visoke ekspresije</b>	1,049	0,183	1,915	0,018	
<b>Koekspresija svih nuklearnih markera</b>	4,110	1,897	6,324	<0,001	
<b>Koekspresija membranskih markera</b>	3,478	1,532	5,425	0,001	
<b>Broj alterisanih markera</b>	0,881	0,485	1,276	<0,001	
<i>Multivarijantna analiza</i>					
<b>Koekspresija svih nuklearnih markera</b>	3,376	1,159	5,592	0,003	
<b>Koekspresija svih membranskih markera</b>	2,798	0,855	4,740	0,005	



**Grafikon 69.** Povezanost broja metastazama zahvaćenih limfnih nodusa i koekspresije nuklearnih markera KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2



**Grafikon 70.** Povezanost broja metastazama zahvaćenih limfnih nodusa i koekspresije membranskih markera CD44, CD117.

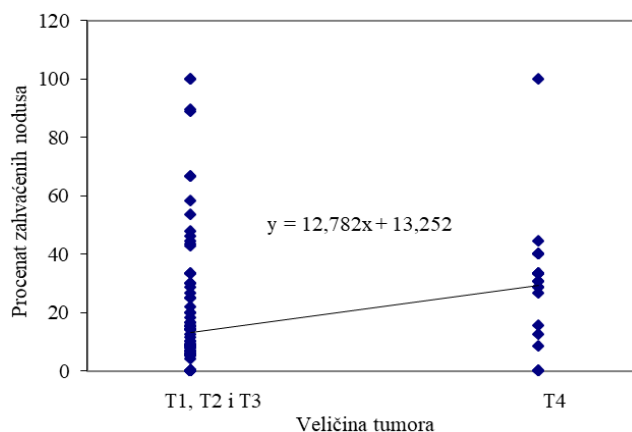
Univarijantna linearna regresiona analiza procentualne zastupljenosti aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama u odnosu na ukupan broj analiziranih, pokazala je da na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa značajan uticaj ima T4 stadijum tumora (B=15,923; 95%IP: 5,715-26,132; p=0,002), kao i smanjenje vrednosti ER (B=-1,066; 95%IP: -2,057 do -0,075; p=0,035) i PR skora (B=-1,257; 95%IP: -2,327 do -0,187; p=0,022). Pacijentkinje sa luminalnim A molekularnim podtipom tumora imaju značajno niži procenat limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom (B=-7,710; 95%IP: -15,231 do -0,189; p=0,045). Takođe, na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa značajan uticaj ima visoka ekspresija SOX2 (B=8,484; 95%IP: 0,864-16,104; p=0,029), OCT3/4 (B=9,293; 95%IP: 1,700-16,885; p=0,017) i EZH2 (B=10,181; 95%IP: 2,725-17,636; p=0,008), kao i povećanje broja nuklearnih molekularnih markera – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 (OR=6,956; 95%IP: 3,639-10,274; p<0,001), uključujući i koekspresiju svih ispitivanih nuklearnih markera (B=22,894; 95%IP: 8,044-37,745; p=0,003). Koekspresija membranskih markera – CD44 i CD117

(B=17,170; 95%IP: 4,034-30,306; p=0,011), kao i povećanje broja alterisanih molekularnih markera (B=5,589; 95%IP: 2,960-8,218; p<0,001) bili su povezani sa povećanjem procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa aksile.

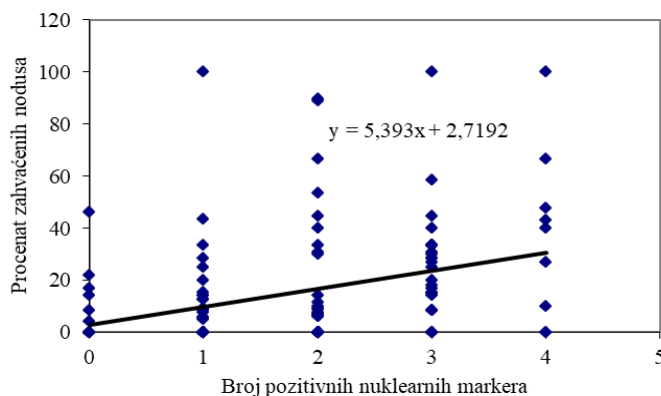
**Tabela 23.** Povezanost kliničko-patoloških parametara, molekularnog podtipa karcinoma i ekspresije molekularnih markera sa procentom zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na broj analiziranih, rezultati linearne regresione analize

Karakteristika	B	Granice 95% IP za B		P	
		Donja	Gornja		
<b>Univarijantna analiza</b>					
<b>Starost</b>	0,209	-0,110	0,529	0,197	
CK	-1,773	-11,783	8,236	0,727	
DSK	7,854	-6,711	22,419	0,288	
DUK	-1,863	-27,853	24,127	0,887	
GSK	2,547	-5,116	10,211	0,512	
GUK	-5,967	-15,929	3,995	0,238	
<b>Veličina tumora</b>	T1	-4,828	-12,947	3,290	0,242
	T2	-2,703	-10,324	4,918	0,484
	T3	-16,065	-41,912	9,782	0,221
	T4	15,923	5,715	26,132	0,002
<b>Histološki gradus</b>	G1	-7,694	-24,921	9,534	0,379
	G2	-0,146	-8,215	7,923	0,972
	G3	1,996	-6,438	10,431	0,640
<b>Nottingham skor</b>		1,096	-2,313	4,504	0,526
<b>ER skor</b>		-1,066	-2,057	-0,075	0,035
<b>PR skor</b>		-1,257	-2,327	-0,187	0,022
<b>HER2 +</b>		2,213	-6,880	11,305	0,631
<b>Ki-67 indeks</b>		0,130	-0,119	0,380	0,304
<b>Molekularni podtip</b>	Basalni	7,900	-0,647	16,448	0,070
	HER2+	2,213	-6,880	11,305	0,631
	Luminalni A	-7,710	-15,231	-0,189	0,045
<b>KLF4 visoka ekspresija</b>		5,509	-2,212	13,231	0,161
<b>SOX2 visoka ekspresija</b>		8,484	0,864	16,104	0,029
<b>OCT3 visoka ekspresija</b>		9,293	1,700	16,885	0,017
<b>EZH2 visoka ekspresija</b>		10,181	2,725	17,636	0,008
<b>CD44 visoka ekspresija</b>		4,549	-3,793	12,891	0,283
<b>CD117 visoka ekspresija</b>		6,386	-2,871	15,642	0,175
<b>Broj nuklearnih markera visoke ekspresije</b>		6,956	3,639	10,274	<0,001
<b>Broj membranskih markera visoke ekspresije</b>		4,727	-1,063	10,517	0,109
<b>Koekspresija svih nuklearnih markera</b>		22,894	8,044	37,745	0,003
<b>Koekspresija membranskih markera</b>		17,170	4,034	30,306	0,011
<b>Broj alterisanih markera</b>		5,589	2,960	8,218	<0,001
<b>Multivarijantna analiza</b>					
<b>T4</b>		12,782	2,829	22,735	0,012
<b>Broj nuklearnih markera visoke ekspresije</b>		5,393	2,050	8,737	0,002
<b>Koekspresija membranskih markera</b>		15,412	2,991	27,833	0,015

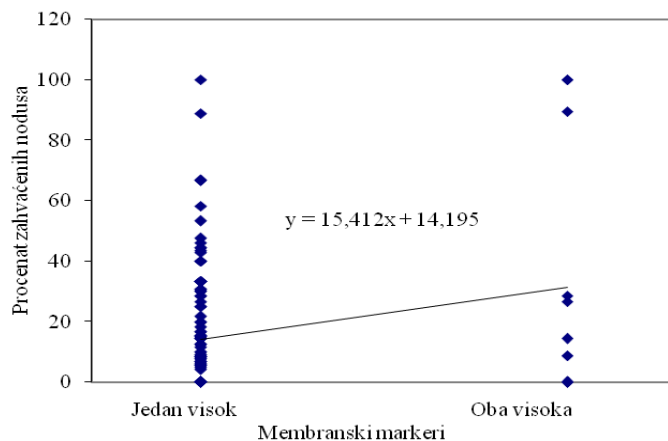
Multivarijantna linearna regresiona analiza je, kao značajne prediktore za povećanje procentualne zastupljenosti limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom u odnosu na ukupan broj pregledanih, izdvojila T4 stadijum tumora ( $B=12,782$ ; 95%IP: 2,829-22,735;  $p=0,012$ ), veći broj nuklearnih markera visoke ekspresije ( $OR=5,393$ ; 95%IP: 2,050-8,737;  $p=0,002$ ) i koekspresiju membranskih markera CD44/CD117 ( $B=15,412$ ; 95%IP: 2,991-27,833;  $p=0,015$ ) (tabela 23, grafikoni 71, 72, 73).



**Grafikon 71.** Povezanost procenta metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa i veličine tumora



**Grafikon 72.** Povezanost procenta metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa i broja nuklearnih markera visoke ekspresije



**Grafikon 73.** Povezanost procenta metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa i koekspresije membranskih markera visoke ekspresije



## 8. DISKUSIJA

Karcinom dojke je najzastupljeniji maligni tumor u ženskoj populaciji koji ima izuzetno veliki medicinski značaj zbog stalnog porasta incidence i mortaliteta kao posledice razvoja metastatske bolesti. Imajući u vidu da je glavni događaj u progresiji karcinoma dojke razvoj metastaza u aksilarnim limfnim nodusima, veoma je važno proceniti značaj standardnih kliničko-patoloških parametara, a posebno novih nestandardnih parametara, kao prognostičkih faktora za pojavu metastaza u aksili.

Ovo istraživanje obuhvatilo je 136 pacijentkinja sa primarnim duktalnim karcinomom dojke, kao najčešćim histološkim tipom karcinoma, gde su obuhvaćeni glavni molekularni podtipovi (luminalni A, bazalni, Her2+). U ispitivanoj grupi bilo je 77 (56,61%) pacijentkinja sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima, a 59 (43,38%) bez metastaza u vreme postavljanja dijagnoze karcinoma dojke, odnosno hirurške intervencije.

Komparativna analiza kliničko-patoloških parametara ove dve grupe pacijentkinja obuhvatila je: starost, lokalizaciju i veličinu tumora, histološki gradus, Nottingham scor, proliferativni Ki-67 indeks i status receptora (ER, PR, HER2).

Od ukupnog broja novootkrivenih karcinoma dojke u ženskoj populaciji, 48% je dijagnostikovano kod žena starosne dobi preko 65 godina. Prosečna zastupljenost karcinoma dojke kod žena starosne dobi od 65 godina i starijih iznosi 1400 na 100.000, a kod žena starosti 50 do 65 godina 750 slučajeva na 100.000 (148).

Na osnovu podataka Hospitalnog registra Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, prosečna starost pacijentkinja u trenutku postavljanja dijagnoze karcinoma dojke je 56 godina, a 30% žena je mlađe od 50 godina (6% ispod 40 godina, 24% starosti 40–49 godina) (5, 149). U ovom istraživanju prosečna starost pacijentkinja iznosila je  $64,01 \pm 11,92$  (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) i nije bilo statistički značajne razlike u godinama starosti između pacijentkinjama sa metastazama i onih bez metastaza.

Prema statističkim podacima, karcinom dojke najčešće je lokalizovan u gornjem spoljašnjem kvadrantu i retroareolarnoj regiji (148, 150). U ovom istraživanju tumor je najčešće bio lokalizovan u gornjem spoljašnjem kvadrantu (kod 55% pacijentkinja), što je u saglasnosti sa podacima iz literature.

Prema podacima Hospitalnog registra Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, samo 1% pacijentkinja dolazi sa nepalpabilnim, odnosno *in situ* tumorima dojke otkrivenim mamografski. Od palpabilnih tumora, prema kliničkoj TNM klasifikaciji, petina tumora je veličine do 2 cm (5).

U ovom istraživanju primarni tumor veličine do 2 cm (T1) otkriven je kod 32,4% pacijentkinja, tumor dijametra od 2 do 5 cm (T2) kod 50,0%, a tumor T4 stadijuma kod 15,4% pacijentkinja. Tumor T4 stadijuma statistički značajno korelira sa pojavom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima.

Na povezanost veličine tumora i lokoregionalnog širenja karcinoma dojke upućuju i istraživanja drugih autora koji ukazuju na linearnu korelaciju veličine tumora između 7 i 60 mm i verovatnoće pojave metastaza. Međutim, za vrlo male i vrlo velike karcinome postoje značajna odstupanja. Za tumore ispod 10 mm, stopa pozitivnosti aksilarnih limfnih čvorova i smrtnosti od karcinoma dojke je relativno konstantna. Za velike tumore (60–90 mm), stopa prisustva metastaza u aksilarnim limfnim nodusima i smrtnosti od karcinoma dojke takođe je relativno konstantna (oko 75% za metastaze u limfnim nodusima i 60% smrtnosti od karcinoma dojke) (151–153).

Stepen histološke diferentovanosti tumora, odnosno histološki gradus, ukazuje na manju ili veću agresivnost tumora i predstavlja jedan od standardnih prognostičkih parametara (33). Dve trećine pacijentkinja imalo je umereno diferentovan tumor histološkog gradusa G2 (66,2%), a oko trećine slabo diferentovan tumor histološkog gradusa G3 (28,7%). Nije otkrivena statistički značajna razlika u histološkom gradusu tumora u odnosu na prisustvo i odsustvo lokoregionalnih metastaza. Rezultati istraživanja Barinoff-a i saradnika pokazali su da je histološki gradus G3 faktor rizika za pojavu udaljenih metastaza kod pacijentkinja sa karcinomom dojke T3 i T4 stadijuma (154).

Prosečna vrednost Nottingham skora iznosila je  $6,88 \pm 1,12$ , ER skora  $3,81 \pm 3,80$ , a PR skora  $3,43 \pm 3,51$ . Ekspresija receptora HER2 bila je prisutna kod 22,8 %, a odsutna kod 77,2% tumora. Ni jedan od ovih parametara nije korelirao sa pojavom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima.

Ki-67 je nuklearni proliferativni marker koji je eksprimiran u svim fazama ćelijskog ciklusa, osim u G<sub>0</sub> fazi. Prema konsenzusu sa *St. Gallen* konferencije iz 2015 godine, proliferativni Ki-67 indeks sa vrednostima višim od 20% može da bude parametar za identifikaciju pacijentkinja visokog rizika za loš ishod bolesti (39). Ovo istraživanje je pokazalo da proliferativni Ki-67 indeks, sa prosečnom vrednošću  $31,44 \pm 16,88$ , značajno korelira sa lokoregionalnim širenjem karcinoma dojke.

Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da je povećana verovatnoća za prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim nodusima povezana sa T4 stadijumom tumora (OR=7,200; 95%IP: 1,850-28,016; p=0,004) i sa višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa (OR=1,022; 95%IP: 1,01-1,044; p=0,049).

Prema kriterijumu AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*), najznačajniji parametri za prognozu karcinoma dojke su veličina tumora u dojci, status regionalnih limfnih nodusa i udaljene metastaze. Međutim, rezultati istraživanja, objavljenih u poslednjih nekoliko godina, ukazuju na to da broj zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa metastatskim procesom može biti značajan parametar u proceni prognoze karcinoma dojke. Pacijentkinje sa četiri ili više pozitivnih limfnih nodusa imaju lošiju prognozu u poređenju sa onima koje imaju tri ili manje histološki potvrđenih pozitivnih limfnih nodusa. Pored toga, rezultati skorašnjih studija pokazuju da procenat pozitivnih limfnih nodusa, koji se dobija kao odnos apsolutnog broja pozitivnih limfnih nodusa i ukupnog broja ispitivanih, može biti od većeg prognostičkog značaj kod pacijentkinja sa različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke. Do sada nije postignut konsenzus po ovom pitanju (155–157).

U ovom istraživanju, univarijantna linearna regresiona analiza broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama pokazala je da povećanje broja zahvaćenih limfnih nodusa korelira sa smanjenjem vrednosti ER ( $B=-0,151$ ; 95%IP:  $-0,302$  do  $-0,001$ ;  $p=0,048$ ) i PR skora ( $B=-0,189$ ; 95%IP:  $-0,351$  do  $-0,027$ ;  $p=0,022$ ).

Univarijantna linearna regresiona analiza procentualne zastupljenosti aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama u odnosu na ukupan broj pregledanih, pokazala je da na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa značajan uticaj ima T4 stadijum tumora ( $B=15,923$ ; 95%IP:  $5,715-26,132$ ;  $p=0,002$ ), kao i smanjenje vrednosti ER ( $B=-1,066$ ; 95%IP:  $-2,057$  do  $-0,075$ ;  $p=0,035$ ) i PR skora ( $B=-1,257$ ; 95%IP:  $-2,327$  do  $-0,187$ ;  $p<0,001$ )

Status aksilarnih limfnih nodusa je jedan od fundamentalnih prognostičkih faktora kod karcinoma dojke i od presudnog je značaja za primenu adjuvantne, lokalne ili sistemske terapije (158, 159). Takođe, status limfnih nodusa aksile, kao prognostički faktor, ima značaja i u izboru hirurške metode lečenja. Wasuthit i saradnici predlažu sagledavanje kliničkog, radiološkog i patološkog nalaza za predikciju statusa aksilarnih limfnih nodusa i selektovanje pacijentkinja sa karcinomom dojke za kompletnu disekciju aksile (160).

Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije, a na osnovu histološkog izgleda i molekularnih alteracija, definisano je 30 morfoloških tipova karcinoma dojke. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke, na osnovu genskih ekspresionih profila, obuhvata luminalni A, luminalni B, bazalni i HER2 pozitivni podtip karcinoma dojke. Luminalni podtip karcinoma dojke potiče od diferentovanih luminalnih ćelija koje su ER pozitivne i HER2 negativne. Bazalni podtip karcinoma dojke vodi poreklo od luminalnih progenitornih ćelija i to je podtip koji najčešće pokazuje povezanost sa mutacijama BRCA1 gena. Ovaj podtip karcinoma je

dvostruko negativan (ER i HER2 negativan). HER 2 pozitivan podtip karcinoma dojke može voditi poreko od kasnih progenitornih ćelija koje su pretrpele amplifikaciju HER2 gena (161).

Luminalni podtip karcinoma čini više od 40% svih podtipova karcinoma dojke (162).

I u ovom istraživanju luminalni A podtip karcinoma bio je najzastupljeniji, sa učestalošću od 50,7%. Drugi po učestalosti bio je bazalni podtip karcinoma (26,5%), a zatim HER2 pozitivan (22,8%). Nije bilo statistički značajne razlike u distribuciji molekularnih podtipova karcinoma kod pacijentkinja sa i onih bez metastaza u aksilarnim limfnim nodusima. Međutim, univarijabilna logistička regresiona analiza je pokazala da pacijentkinje sa luminalnim A molekularnim podtipom karcinoma imaju značajno niži procenat aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom ( $B=-7,710$ ; 95%IP: -15,231 do -0,189;  $p=0,045$ ). Literaturni podaci ukazuju na to da luminalni molekularni podtip karcinoma ima nižu stopu lokoregionalnog recidiva nakon konzervativne hirurgije i mastektomije i ona se kreće oko 5% (163).

Kod pacijentkinja sa luminalnim A molekularnim podtipom karcinoma dojke histološki gradusi G1 i G2, kao i T1 stadijum bili su statistički značajno više zastupljeni nego kod drugih podtipova karcinoma. Vrednosti Nottingham skora i proliferativnog Ki-67 indeksa bile su značajno niža kod ovog podtipa karcinoma u odnosu na ostala dva podtipa. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji navode da luminalni A podtip karcinoma karakteriše niski histološki gradus i nizak nivo ekspresije markera proliferacije (162, 164).

Bazalni podtip karcinoma bio je značajno češće povezan sa G3 histološkim gradusom u odnosu na luminalni podtip, ali ne i u odnosu na HER2 pozitivan tumor. Vrednosti Nottingham skora i proliferativnog Ki-67 indeksa statistički su značajno više u odnosu na luminalni podtip, ali ne i u odnosu na HER2 pozitivan tumor. I rezultati drugih autora govore o tome da su bazalni karcinomi pretežno loše diferentovani tumori (165–167).

HER2 pozitivni karcinomi imali su značajno češće histološki gradus G3, značajno više vrednosti Nottingham skora i proliferativnog Ki67 indeksa u odnosu na luminalni, ali ne i u odnosu na bazalni podtip. I drugi autori ukazuju na to da ovaj podtip karcinoma karakteriše visok histološki gradus i indeks proliferacije (162, 164).

Novija istraživanja u humanoj karcinogenezi pokazala su da mala populacija tumorskih matičnih ćelija – *Cancer stem cells (CSCs)* može modifikovati prirodu malignih tumora, što doprinosi njihovoj agresivnosti i utiče na terapijski odgovor (44). CSCs, kao i embrionalne matične ćelije, sintetišu proteine sa karakteristikama matičnosti koji se mogu nalaziti u jedru (transkripcioni faktori) ili na površini ćelije (168). Transkripcioni faktori obezbeđuju kancer-skim stem ćelijama da se samoobnavljaju dajući kancer stem ćelije ćerke i da se diferentuju dajući dominantnu populaciju kancerskih ćelija bez svojstava matičnosti (44). Osim toga,

transkripcioni faktori mogu da učestvuju i u preusmeravanju humanih diferentovanih ćelija (dediferencijacija) u indukovane pluripotentne ćelije (iPSC ćelije), odnosno da diferentovane ćelije tumora dobiju karakteristike stem ćelija. Na ovaj način transkripcioni faktori regulišu odnos između non-CSCs i CSCs. Ova reorganizacija u odnosu non-CSCs i CSCs ćelija je glavni uzrok fenotipske i funkcionalne heterogenosti tumora i progresije bolesti, odnosno pojave metastaza i rezistencije na terapiju (169). Slično transkripcionim faktorima povezanim sa matičnošću, mnogi površinski markeri koji su visoko ekspimirani u matičnim ćelijama, takođe su ekspimirani i u CSCs humanih karcinomima (168). U dojci ćelije sa svojstvima matičnosti definišu se kao “*breast cancer stem cells*” (BCSCs) (51). BCSCs su rezistentne na hemioterapiju i mogu da predstavljaju rezidualnu ćelijsku populaciju odgovornu za razvoj sekundarnog (rekurentnog ili metastatskog) tumora. Dosadašnja istraživanja ukazuju da je BCSCs fenotip specifičan i da produkuje glavne pluripotentne proteine (nuklearnih molekularnih markera), uključujući OCT4, KLF4, SOX2 i NANOG (52). Membranski protein koji je najviše proučavan u karcinomu dojke je CD44.

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je da se odredi prognostički značaj i uticaj novih nestandardnih molekularnih markera karcinoma dojke na pojavu lokoregionalnih metastaza kao prvog koraka u razvoju metastatske bolesti. Sa tim ciljem analiziran je uticaj nuklearnih molekularnih markera KLF4, SOX2, OCT3/4 i EZH2 i membranskih proteina – CD44 i CD117 na pojavu lokoregionalnih metastaza kod pacijentkinja sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke.

Analizom ekspresije nuklearnih molekularnih markera – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 i membranskih proteina – CD44 i CD117 u invazivnom duktalnom karcinomu dojke u odnosu na status aksilarnih limfnih nodusa (prisustvo/odsustvo metastaza), otkrivena je statistički značajna povezanost visoke ekspresije OCT3/4 (68,8:45,8%) i EZH2 (58,4:30,5%) u karcinomu sa prisustvom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima. Takođe, koekspresija 3 nuklearna molekularna markera visoke ekspresije, kao i veći broja alterisanih markera, značajno su povezani sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima ( $33,8:6,8\% - 2,66 \pm 1,41:1,97 \pm 1,22$ ).

Istraživanja su pokazala da KLF4 ima značajnu ulogu u biološkim procesima matičnih ćelija, kao što su samoobnavljanje i pluripotentnost embrionalnih matičnih ćelija (60). Istovremeno, KLF4 je jedan od esencijalnih transkripcionih faktora koji je ključan za očuvanje BCSCs, učestvujući u njihovom samoobnavljanju, njihovom diferentovanju u kancerske ćelije bez svojstava matičnost, ali i u preusmeravanju humanih diferentovanih ćelija u indukovane pluripotentne ćelije, kao i u procesu ćelijske migracije i invazije (69, 169). Istraživanja su pokazala da je KLF4 potreban za održavanje CSCs dojke jer “isključenje” KLF4 može značajno

smanjiti samoobnavljanje CSCs (70, 71). Uočeno je da KLF4 deluje zajedno sa drugim transkripcionim faktorima, uključujući OCT4, SOX2 i c-Mic, čija zajednička aktivnost dovodi somatske ćelije u stanje indukovanih pluripotentnih stem ćelija (60). Utvrđena je visoka ekspresija KLF4 u populaciji CSCs primarnog tumora dojke miša i u ćelijskoj liniji karcinoma dojke (69). Međutim, tačan mehanizam kojim KLF4 utiče na nastanak karcinoma još uvek nije poznat.

Najnovija istraživanja pokazuju da KLF4, interakcijom sa različitim ciljnim genima, može funkcionisati kao onkogen, ali i kao tumor supresor, u zavisnosti od tkiva (66–68).

Pandya i saradnici su otkrili da je KLF4 prekomerno eksprimiran u više od 70% karcinoma dojke i da funkcioniše uglavnom kao onkogen. Visoka ekspresija KLF4 bila je povezana sa agresivnijim fenotipom kancerskih ćelija u ranom stadijumu infiltrativnog dukalnog karcinoma dojke (170).

Nasuprot tome, rezultati brojnih istraživanja sugerišu da visoka ekspresija KLF4 suprimira ćelisku proliferaciju. Xiang Song i saradnici dokazali su uticaj KLF4 na proliferaciju ispitivanjem kancerskog tkiva dojke, prekanceroza dojke i u eksperimentalnim uslovima, transfekcijom gena KLF4 u ćelijsku liniju karcinoma dojke MDA-MB-231 (eksperimentalna grupa). Ekspresija KLF4 proteina bila je niža u karcinomu dojke nego u prekancerozama. Redukcija KLF4 proteina korelirala je sa patološkim tipom carcinoma dojke, histološkim gradusom i limfogenim metastazama. Proliferativni kapacitet ćelijske linije karcinoma dojke MDA-MB-231 takođe je bio značajno smanjen, što ukazuje da transfekcija gena KLF4 inhibira proliferaciju ćelijske linije karcinoma dojke. Istovremeno, ovi rezultati sugerišu da je KLF4 gen važan u nastanku i progresiji karcinoma dojke (61).

Imunohistohemijsko ispitivanje 319 invazivnih karcinoma dojke je takođe pokazalo da ekspresija KLF4 inverzno korelirala sa agresivnošću karcinoma dojke (144).

Ispitivanje koje je urađeno na 100 pacijentkinja sa karcinomom dojke i gde je praćena ekspresija KLF4, c-Myc, Nanog, OCT4 i SOX2 pokazalo je da pacijentkinje sa tumorom visoke ekspresije Nanog gena imaju kraće preživljavanje bez simptoma bolesti i ukupno preživljavanje. Nasuprot tome, pacijentkinje sa tumorom visoke ekspresije KLF4 imaju duži period bez simptoma bolesti. Autori zaključuju da je visoka ekspresija Nanog indikator loše prognoze u karcinomu dojke jer stimuliše rast kancerskih ćelija i metastaziranje, dok je visoka ekspresija KLF4, kao inhibitor rasta i metastaziranja, povoljan prognostički indikator (171).

Nagata i saradnici su pokazali da ekspresija članova KLF familije transkripcionih faktora može uticati na prognozu pacijentkinja sa bazalnim podtipom karcinoma dojke. Pacijentkinje sa bazalnim podtipom karcinoma i visokom ekspresijom KLF4 imale su bolje ukupno pre-

življavanje i preživljavanje bez simptoma bolesti u odnosu na pacijentkinje sa nižom ekspresijom KLF4 (62).

Utvrđeno je da KLF4 ima pozitivnu regulatornu ulogu u proliferaciji koju indukuje estrogen (76). Međutim, Akaogi i saradnici ukazuju da KLF4 suprimira rast hormon zavisnog karcinoma dojke (77).

U ovom istraživanju visoka ekspresija KLF4 otkrivena je kod 55 (40,44%), a niska kod 81 (59,55%) tumora. Nije utvrđena povezanost visoke ekspresije KLF4 sa pojavom metastaza, pN stadijumom aksilarnih limfnih nodusa, niti sa brojem i procentualnom zastupljenošću metastazama zahvaćenih limfnih nodusa. Istovremeno, ova studija je pokazala statistički značajnu razliku u prevalenci G3 histološkog gradusa kod tumora sa niskom ekspresijom KLF4 u odnosu na tumore sa visokom ekspresijom, (37,0%:16,4), odnosno da niska ekspresija ovog proteina značajno korelira sa slabo diferentovanim karcinomom dojke.

Nottingham skor bio je viši kod tumora sa niskom ekspresijom KLF4, a uticaj niske ekspresije na vrednost Nottingham scora imao je graničnu vrednost ( $7,04 \pm 1,13$ ;  $6,65 \pm 1,08$ ;  $p=0,051$ ). Takođe, rezultati ove studije ukazuju na to da visoka ekspresija KLF4 ima tendenciju da suprimira proliferativnu aktivnost u duktalnom karcinomu dojke, s obzirom na to da je prosečna vrednost proliferativnog Ki-67 indeksa u grupi karcinoma sa visokom KLF4 ekspresijom bila niža ( $25,64 \pm 15,16$ ) nego u grupi tumora sa niskom ekspresijom ( $30,44 \pm 15,18$ ), ali bez statističke značajnosti ( $p=0,072$ )

Visoka ekspresija KLF4 značajno je bila povezana sa višim vrednostima ER i PR skora, dok povezanost sa HER2 ekspresijom nije uočena. Visoka ekspresija KLF4 bila je značajno povezana sa luminalnim A podtipom karcinoma. Ovi rezultati pokazuju da su visoke vrednosti KLF4 povezane sa hormon zavisnim tumorom. Rezultati ovog istraživanja koji ukazuju na više vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa u tumoru sa niskom ekspresijom KLF4 i značajnu povezanost histološkog gradusa G3 i niske ekspresije KLF4, u saglasnosti su sa rezultatima Xiang Song-a i drugih autora koji iznose stav da je niska ekspresija KLF4 povezana sa agresivnijim profilom tumora, odnosno da predstavlja nepovoljan prognostički faktor.

Sox transkripcioni faktori imaju važnu ulogu u patogenezi karcinoma, uključujući tumorigenezu, promene u tumorskoj mikrookolini i metastaziranje. Pojedini Sox proteini su potencijalni prognostički markeri kod karcinoma i mogući potencijalni terapijski target, ali su potrebna dalja ispitivanja kako bi se razumele njihove fiziološke funkcije (78).

Nedavno je opisana amplifikacija SOX2 u različitim karcinomima, uključujući karcinom dojke, pluća, jednjaka, debelog creva, prostate i jajnika. Utvrđeno je da prekomerna ekspresija SOX2 promovira progresiju karcinoma ubrzavajući proliferaciju ćelija, stvaranje koloni-

ja, migraciju, invaziju i formiranje sfere. Pored toga, utvrđeno je da je SOX2 povezan sa razvojem rezistencije kancerskih ćelija na hemoterapiju, radioterapiju i target terapiju kod različitih karcinoma, verovatno zbog svoje sposobnosti da doprinese očuvanju kancerskih ćelija sa svojstvima matičnosti, koje su sposobne da prežive lečenje i pokrenu progresiju tumora (172).

Rezultati istraživanja ekspresije SOX2 i angiogeneze u karcinomu dojke ukazuju da SOX2 može da pokrene angiogenezu, podstičući na taj način invazivnost tumora i metastaziranje. Poznato je da vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF) ima značajnu ulogu u angiogenezi tumora i moguće je da SOX2 može da reguliše sekreciju VEGF, uzrokujući promene u angiogenezi tumora. Tumori sa višom ekspresijom SOX2 imali su značajno veću gustinu krvnih sudova. Autori su zaključili da je visoka ekspresija SOX2 indikator visoko malignih tumora i da SOX2 može olakšati metastaziranje u aksilarne limfne noduse stimulišući angiogenezu u karcinomu dojke (173).

Istraživanja su pokazala da postoji povezanost između visoke ekspresije SOX2 i karcinoma dojke. U istraživanju Lengerke i saradnika detektovana je visoka ekspresija SOX2 u 28% invazivnih karcinoma dojke i u 44% duktalnih karcinoma in situ (DCIS). Visoka ekspresija SOX2 bila je značajno povezana sa većim dimenzijama tumora i pozitivnim statusom aksilarnih limfnih nodusa. Odgovarajući metastatski limfni nodusi pokazali su višu ekspresiju i značajno češću pozitivnost na SOX2 u odnosu na primarni tumor (85, 174).

U ovom istraživanju visoka ekspresija SOX2 u karcinomu otkrivena je kod 56 (41,17%), a niska kod 80 (58,82%) pacijentkinja. Značajna razlika u ekspresiji ovog transkripcionog faktora u odnosu na prisustvo i odsustvo metastaza nije utvrđena. Međutim, visoka ekspresija SOX2 u primarnom duktalnom karcinomu dojke značajno je korelirala sa većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i višim procentom zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih. Univarijantna linearna regresiona analiza broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama pokazala je da na povećanje broja zahvaćenih limfnih nodusa značajan uticaj ima visoka ekspresijom SOX2 ( $B=1,395$ ; 95%IP: 0,246-2,543;  $p=0,018$ ). Univarijantna linearna regresiona analiza procentualne zastupljenosti aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom u odnosu na ukupan broj pregledanih, pokazala je da na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa značajan uticaj ima visoka ekspresija SOX2 ( $B=8,484$ ; 95%IP: 0,864-16,104;  $p=0,029$ ).

Na kliničko-patološki značaj ekspresije SOX2 u karcinomu dojke upućuju rezultati istraživanja metaanalize koji ukazuju na značajnu povezanost između visoke ekspresije SOX2 i veličine tumora, histološkog gradusa, metastaza u limfnim nodusima aksile i bazalnog podtipa karcinoma dojke. Povezanost visoke ekspresije SOX2 i TNM stadijuma, ER, PR i HER2



statusa nije utvrđena. Rezultati ove meta-analize ukazuju na to da nuklearni molekularni marker SOX2 može imati prognostički značaj kod karcinoma dojke (175).

Peng Liu sa saradnicima objavio je slične rezultate. Pacijentkinje sa bazalnim podtipom karcinoma dojke i visokom ekspresijom SOX2 imale su kraće ukupno preživljavanje i interval bez simptoma bolesti. Pored toga, autori su utvrdili da se inhibicijom SOX2 suprimira ćelijska proliferacija i invazija, pokreće ćelijska apoptoza u *in vitro* uslovima i suprimira tumorogenost i pojava metastaza *in vivo*. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su zaključili da SOX2 ima ulogu u nastanak bazalnog podtipa karcinoma dojke i da predstavlja značajan prognostički parametar i terapijski target (87).

Pojedina istraživanja su pokazala da je povećana ekspresija SOX2 u karcinomu dojke povezana sa agresivnijim profilom tumora, koji podrazumeva visok histološki gradus i visok proliferativni Ki-67 indeks, u svim molekularnim podtipovima karcinoma dojke, kao i sa lošijim ishodom bolesti kod pacijentkinja sa višim pN stadijumom aksilarnih limfnih nodusa (144, 176).

U ovom istraživanju pacijentkinje sa visokom ekspresijom SOX2 imale su značajno ređe tumor T1 stadijuma u odnosu na one sa niskom ekspresijom. (17,9:42,5%), a T2 i T4 stadijumi bili su zastupljeniji nego kod pacijentkinja sa tumorom niske ekspresije. Bazalni podtip karcinoma bio je statistički značajno povezan sa visokom ekspresijom SOX2 (37,5:18,8). Tumori sa visokom ekspresijom SOX2 značajno su korelirali sa pN2,3 stadijumima aksilarnih limfnih nodusa, većim brojem i višom procentualnom zastupljenošću aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama, višim vrednostima Nottingham scora i proliferativnog Ki-67 indeksa, a značajno nižim vrednostima ER i PR skora. Za razliku od navedenih istraživanja drugih autora, nije dokazana povezanost visoke ekspresije SOX2 i histološkog gradusa tumora.

SOX2 i OCT4 su usko funkcionalno povezani, tako da se gubitak SOX2 može donekle nadoknaditi prekomernom ekspresijom OCT4 (83).

Ispitivanjem ekspresije transkripcionih faktora OCT3 i SOX2 u planocelularnom karcinomu ezofagusa otkrivena je visoka ekspresija OCT3 u 17,9% i SOX2 u 22,84% planocelularnih karcinoma, kao i povezanost visoke ekspresije ovih markera sa visokim histološkim gradusom i kratkim preživljavanjem pacijenata. Pored toga, utvrđena je koekspresija ovih transkripcionih faktora u kancerskoj ćelijskoj liniji, dok je u normalnoj ćelijskoj liniji otkrivena niska ekspresija ili njeno odsustvo (177).

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna korelacija koekspresije SOX2 sa ostalim ispitivanim molekularnim markerima – OCT3/4, KLF4, EZH2, CD117, CD44.

OCT3/4 nuklearni molekularni marker je značajan ne samo tokom embriogeneze, već može imati uticaj na razvoj karcinoma u različitim tkivima, tako što ektopična ekspresija OCT3/4 dovodi do povećanog malignog potencijala CSCs. Istraživanja su pokazala da su regulatorni poremećaji u ekspresiji OCT3/4 u BCSCs odgovorni za nastanak epitelno-mezenhimske transformacije i nastanak značajne subpopulacije kancerskih ćelija koje imaju metastatski potencijal (92, 178).

Uloga OCT3/4 u nastanku metastaza karcinoma dojke još uvek nije razjašnjena. Wang i saradnici su pokazali da prekomerna ekspresija OCT4 povećava spontanu ekspresiju gena odgovornih za epitelno-mezenhimsku transformaciju u CSCs i doprinosi invazivnosti CSCs, a ukoliko se uticaj OCT4 "isključuje" dolazi do inhibicije ovih gena i inhibicije migracije CSCs (179).

Karcinomi dojke sa visokom ekspresijom OCT3/4 češće pokazuju metastaze, kraće vreme preživljavanja i pojavu kasnih recidiva nakon primene hemo i zračne terapije. Iz svega iznetog proizilazi da ovaj transkripcioni faktor ima prognostički značaj i da je marker nepovoljne prognoze karcinoma dojke (97–99).

Shouliang Cai i saradnici otkrili su da je pojava metastaza u *non-SLNs* značajno povezana sa višom ekspresijom OCT3/4. Univarijantna i multivarijantna analiza je pokazala da su pacijentkinje sa tumorom više ekspresije OCT3/4 imale veću verovatnoću za pojavu metastaza, što ukazuje na prediktivnu vrednost ovog markera (102).

Jae Moon Gwak i saradnici ispitivali su ulogu transkripcionih faktora OCT4, SOX2, Nanog, Bmi1 i KLF4 kod pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke i utvrdili povezanost ekspresije OCT4 sa visokim histološkim gradusom, visokim proliferativnim Ki-67 indeksom i hormon pozitivnim receptorskim statusom. Ekspresija OCT4 bila je nezavisni faktor loše prognoze u čitavoj grupi, podgrupi hormon pozitivnih, ali ne i u podgrupi hormon negativnih karcinoma dojke. Ekspresija OCT4 bila je povezana sa lošim kliničkim ishodom kod pacijentkinja sa hormon pozitivnim tumorima i koje su primale tamoksifen. Rezultati ove studije su pokazali da se OCT4 može koristiti kao prognostički marker u podgrupi karcinoma dojke sa pozitivnim statusom receptora (144).

Na značajnu ulogu OCT3/4 u duktalnom karcinomu dojke ukazuju i rezultati ovog istraživanja. Visoka ekspresija OCT3/4 u tumoru otkrivena je kod 66,3% pacijentkinja sa metastazama i kod 33,8% ispitanica bez metastaza u aksili. Visoka ekspresija OCT3/4 značajno je korelirala sa metastazama u aksilarnim limfnim nodusima. Takođe, visoka ekspresija OCT3/4 bila je značajno povezana sa G3 histološkim gradusom, pN1 stadijumom aksilarnih limfnih nodusa, brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom i procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj analiziranih. Uni-

varijantna analiza pokazala je da visoka ekspresija ovog transkripcionog faktora ima uticaj na lokoregionalno širenje karcinoma (OR=2,617; 95%IP: 1,295-5,289; p=0,007), na povećanje broja metastazama zahvaćenih limfnih nodusa (B=1,520; 95%IP: 0,376-2,663; p=0,010) i na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa (B=9,293; 95%IP: 1,700-16,885; p=0,017). U odnosu na ekspresiju ostalih ispitivanih markera, utvrđena je značajna korelacija visoke ekspresije OCT3/4 i visoke ekspresije EZH2 i CD117.

EZH2, član *Polycomb* represivnog kompleksa (PRC), je jedan od najbolje proučenih epigenetskih regulatora koji „utišava” ekspresiju gena. Polikomb proteini su organizovani u dva kompleksa koji indukuju modifikacije (PRC1) i metilaciju (PRC2) histona. EZH2 svoju ulogu „utišivača” ekspresije gena najčešće ostvaruje preko PRC2 kompleksa, ali i nezavisno od ovog kompleksa, tj. metilacijom nehistskih proteina (108).

Izmene u regulaciji PRC2 u humanim karcinomima, sa prekomernom ekspresijom PRC2, često koreliraju sa lošom prognozom bolesti (180).

S obzirom na to da je visoka ekspresija PRC2 prisutna u stem ćelijama, povećana ekspresija PRC2 u ćelijama karcinoma može proisteći iz povećanog proliferativnog kapaciteta i/ili dediferencijacije ćelija karcinoma. Zbog toga je teško proceniti da li su povećani nivoi ekspresije PRC2 uzrok ili posledica onkogeneze. Istraživanja su pokazala da su geni koji kodiraju članove PRC2 mutirani u mnogim karcinomima. Identifikovane su mutacije koje dovode do “gubitka” i “dobitka” funkcije, što ukazuje da PRC2 deluje kao tumor supresor kod nekih karcinoma, dok kod drugih ima funkciju onkogen (181).

Istraživanja ukazuju da je EZH2 povezan sa većom proliferativnom aktivnošću tumorskih ćelija, lokalnom invazijom i udaljenim metastazama. U ćelijama karcinoma dojke, EZH2 podstiče tumorsku invaziju preko transkripcione represije tumor supresornog gena i održavanjem ćelija u stanju matičnosti (182, 183).

U istraživanju Kleer-a i saradnika utvrđeno je da prekomerna ekspresija EZH2 indukuje enzimsku aktivnost histonske deacetilaze (HDAC) tipa 1 u epitelnim ćelijama dojke i da je za ćelijsku invaziju posredovanu EZH2 neophodna enzimaska aktivnost HDAC (114). Croker i saradnici objavili su rezultate koji ukazuju da je aktivnost ALDH u CSCs povezana sa ćelijskom invazijom i metastaziranjem (184).

Studije na humanim tumorima su pokazale da prekomerna ekspresija EZH2 može biti marker agresivnosti tumora i ishoda bolesti. U karcinomu prostate i dojke, visoka ekspresija EZH2 povezana je sa pojavom metastaza i lošom prognozom (113, 114, 185).

Iako EZH2 ima značajnu ulogu u progresiji dukalnog karcinoma dojke, precizan mehanizam njegovog delovanja još uvek nije utvrđen. Nedavno publikovani rezultati Yomtoubian-

a i saradnika pokazuju da specifična farmakološka ili genetska inhibicija katalitičke aktivnosti EZH2 smanjuje pojavu udaljenih metastaza kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke (186).

Istraživanja nekoliko autora su pokazala da je ektopična ekspresija EZH2 prisutna u različitim solidnim tumorima i da korelira sa parametrima agresivnog karcinoma dojke, kao što su viši histološki gradus, povećana ćelijska proliferacije i invazija limfnih nodusa (187–190).

Rezultati ove studije ukazuju na agresivni tok invazivnog dukalnog karcinomima dojke sa visokom ekspresijom EZH2. Visoka ekspresija EZH2 u tumoru otkrivena je kod 63 (46,32%), a niska kod 73 (56,67%) pacijentkinja. Visoka ekspresija EZH2 značajno je povezana sa veličinom tumora, tj. tumori višeg stadijuma (T4) pokazuju statistički značajnu korelaciju sa visokom ekspresijom EZH2. Karcinom sa visokom ekspresijom EZH2 i lokoregionalnim širenjem u aksilarne limfne noduse otkriven je kod 71,4% pacijentkinja, a tumori koji pokazuju visoku ekspresiju EZH2 bez metastaza kod 28,6% pacijentkinja. Ovi rezultati ukazuju na značajnu korelaciju visoke ekspresije ovog proteina i pojave metastaza. Pored toga, visoka ekspresija EZH2 značajno je povezana sa pN1 stadijumom aksilarnih limfnih nodusa, brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama, kao i procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih. Univarijantna analiza pokazala je da visoka ekspresija ovog transkripcionog faktora ima uticaj na lokoregionalno širenje karcinoma (OR=3,203; 95%IP: 1,566-6,554; p=0,001), na povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama (OR=1,266; 95%IP: 0,129-2,403; p=0,029), kao i na povećanje procentualne zastupljenosti zahvaćenih nodusa (B=10,181; 95%IP: 2,725-17,636; p=0,008). Rezultati ove studije, koji ukazuju na povezanost visoke ekspresije EZH2 sa metastazama u limfnim nodusima, u saglasnosti su sa istraživanjima drugih autora.

U odnosu na ekspresiju ostalih ispitivanih markera, utvrđena je značajna korelacija visoke ekspresije EZH2 i visoke ekspresije OCT3/4 i KLF4.

CD44, transmembranski glikoprotein, ekspimiraju normalne stem ćelije, kancer stem ćelije i karcinomi. Hijaluronska kiselina ekstracelularnog matriksa je glavni ligand za CD44. Vezivanjem hijaluronske kiseline za CD44 dolazi da aktivacije CD44, a time i aktivacije signalnih puteva. Aktivacija signalnih puteva indukuje ćelijsku proliferaciju, promene u ćelijskom citoskeletu i povećanje ćelijskog motiliteta (119, 169).

CD44 je poznat kao protein koji ima ulogu u tumorogenezi karcinoma dojke, uključujući neoplastičnu transformaciju, rast, ćelijsku invaziju i motilitet. Pojedine studije ukazuju da multifunkcionalna ćelijska adheziona molekula CD44 ima snažan uticaj na tumorsku progresiju i može favorizovati pojavu udaljenih metastaza (191, 192).

Tokom poslednjih godina, istraživana je korelacija kliničko-patoloških parametara i visoke ekspresije CD44 na površini ćelija kod pacijentkinja sa karcinomom dojke. Bänkfalvi i saradnici ukazuju na povezanost visoke ekspresije CD44 u karcinomu dojke sa lošom prognozom i pojavom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima, a Looi i saradnici ističu da CD44 ima ulogu u progresiji karcinoma dojke (122, 193).

Međutim, mnogi autori tvrde da nema statistički značajne povezanosti između prekomerne ekspresije CD44 i razvoja metastaza kod karcinoma dojke. Jang i saradnici ukazuju da je ekspresija CD44 u korelaciji sa tumorogenezom HER-2 negativnih karcinoma dojke. Korelacija između ekspresije CD44 i starosti pacijenata, veličine tumora, prisustva metastaza u aksilarnim limfnim nodusima, stadijuma tumora, histološkog gradusa i statusa ER i PR nije utvrđena. Nije bilo razlike u kliničkom ishodu i preživljavanju pacijentkinja u odnosu na ekspresiju CD44. Autori zaključuju da je CD44 povezan sa tumorogenezom karcinoma dojke, ali da značajno ne utiče na prognozu invazivnog karcinoma dojke (121).

Fillmore i Kupervasser su takođe utvrdili korelaciju CD44 proteina i bazalnog podtipa karcinoma dojke, te da CD44 može biti marker loše prognoze kod ovog molekularnog podtipa karcinoma (194).

Meta-analiza, koja je obuhvatila 23 publikovane databaze genske ekspresije CD44 mRNA, kliničko-patoloških karakteristika i prognoze pacijentkinja sa karcinomom dojke, pokazala je povezanost povećane ekspresije CD44 sa histološkim gradusom, statusom ER, PR i HER2 receptora, kao i značajno kraćim ukupnim preživljavanjem. Povećana ekspresija CD44 (utvrđena merenjem mRNA i nivoa proteina) otkrivena je kod bazalnog podtipa karcinoma dojke i korelirala je sa eptelno-mezenhimnom transformacijom i CSCs genskim profilom. Ova studija je pokazala da CD44 može biti potencijalni prognostički marker i terapijski target za bazalni podtip karcinoma dojke (195).

U ovom istraživanju visoka ekspresija CD44 u tumoru otkrivena je kod 40 (29,41%), a niska kod 96 (70,58%) pacijentkinja sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke. Nije utvrđena povezanost visoke ekspresije CD44 sa lokoregionalnim širenjem karcinoma dojke i pN stadijumom aksilarnih limfnih nodusa, niti sa brojem i procentualnom zastupljenošću limfnih nodusa zahvaćenih metastatskim procesom. Međutim, visoka ekspresija CD44 bila je značajno povezana sa molekularnim podtipom karcinoma dojke. Kod pacijentkinja sa bazalnim podtipom karcinoma, visoka ekspresija CD44 bila je statistički značajno više zastupljena u odnosu na nisku ekspresiju (45%:18,8%,  $p=0,002$ ). Takođe, bazalni podtip karcinoma dojke statistički je značajno češće pokazivao visoku ekspresiju CD44 u odnosu na druge podtipove karcinoma, a luminalni A podtip značajno češće nisku ekspresiju ovog markera. Visoka ekspre-

sija CD44 praćena je znaćajno višom vrednošću proliferativnog Ki-67 indeksa, a nižim vrednostima ER i PR skora. Rezultati ove studije pokazali su da visoka ekspresije CD44 utiće na ćelijsku proliferaciju i smanjenje ili gubitak ER i PR receptora, kao i da je povezana sa bazalnim podtipom dukalnog karcinoma dojke, dok uticaj na HER2 ekspresiju nije uoćen. Rezultati ove studije, koji se odnose na znaćajnu povezanost visoke ekspresije CD44 i bazalnog podtipa karcinoma dojke, u saglasnosti su sa rezultatima objavljenim u literaturi.

Istraživanja su pokazala da se vezivanjem hijaluronske kiseline za CD44 aktivira signalni put koji povećava aktivnost razlićitih proteaza (matriks metaloproteinaza i uroplakin plasminogen aktivatora) ćime se olakšala invazija kancerskih ćelija u bazalnom podtipu, pružajući uvid u molekularne osnove invazije kancerskih ćelija posredovane CD44 proteinom. Inhibicija aktivnosti ovih glavnih proteaza doprinosi sprećavanju invazije i metastaziranja kancerskih ćelija u bazalnom podtipu karcinoma dojke (196).

Proto-oncogeni c-kit (CD117) je transmembranski receptor tirozin kinase. Aktivisani CD117 stimuliše brojne signalne puteve što dovodi do ćelijske proliferacije, diferencijacije, opstanka, adhezije, motiliteta i angiogeneze. Onkogeni potencijal CD117 ostvaruje se prekomernom aktivacijom ili mutacijama koje se najćešće javljaju u tirozin kinaznom delu (131).

Protein CD117 prisutan je u normalnom epitelu dojke, u proliferativnim lezijama i u karcinomu. Sa malignom transformacijom epitela dojke dolazi do redukcija CD117 i veruje se da CD117 ima ulogu u karcinogenezi dojke (141).

Amin i saradnici analizirali su povezanost ekspresije CD117 u tumoru sa starošću pacijentkinja, gradusom i velićinom tumora, brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama, gustinom malih krvnih sudova i ekspresijom ER i PR receptora. Gubitak ekspresije CD117 u invazivnom karcinomu dojke bio je povezan sa parametrima agresivnosti tumora, kao što su veća gustina malih krvnih sudova, veće dimenzije tumora, viši gradus tumora, veći broj limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i negativni status ER i PR receptora. U multivarijantnoj analizi, najvažniji prediktor gubitka ekspresije CD117 bila je velićina tumora i broj zahvaćenih limfnih nodusa (197).

Slićne rezultate dobio je Maha sa saradnicima, koji smatra da je CD117 indikator karcinoma dojke visokog gradusa, koji često obuhvata karcinome sa mezenhivskom i / ili mioepitelnom diferencijacijom (bazalni podtip), a koji imaju lošu prognozu. U ovom istraživanju, koje je obuhvatilo pacijentkinje sa razlićitim histološkim tipovima i gradusima invazivnog karcinoma dojke, visoka ekspresija CD117 otkrivena je kod oko 29% karcinoma. Odsustvo CD117 bilo je povezano sa karakteristikama agresivnijih tumora dojke, kao što su povećanje gustine krvnih sudova, veće dimenzije tumora, viši histološki gradus, veći broj metastazama

zahvaćenih limfnih nodusa i negativan status ER i PR. Multivarijantna analiza je pokazala da je najznačajniji prediktor negativnog nalaza CD117 bila veličina tumora i prisustvo metastaza u limfnim nodusima (198).

Nasuprot tome, Simon i saradnici otkrili su prekomernu ekspresiju CD117 u karcinomu dojke koja je bila značajno povezana sa visokim histološkim gradusom tumora, ali ne i sa veličinom tumora i pN stadijumom aksilarnih limfnih nodusa ili preživljavanjem pacijentkinja (199).

I u ovom istraživanju tumori većine pacijentkinja pokazali su nisku ekspresiju CD117 (78,7%), sto je u saglasnosti sa rezultatima Maha i saradnika. Visoka ekspresija ovog proteina otkrivena je u tumoru kod 21,3% pacijentkinja. Značajna povezanost visoke ekspresije CD117 i pojave metastaza u aksili kod pacijentkinja sa duktalnim karcinomom dojke nije dokazana. Visoka ekspresija CD117 značajno je korelirala sa bazalnim podtipom karcinoma dojke, višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa i nižim vrednostima ER i PR skora. Naši rezultati, koji se odnose na korelaciju visoke ekspresije CD117 i bazalnog karcinoma, u saglasnosti su sa rezultatima Shamsa i saradnika koji su takođe potvrdili visoku ekspresiju CD117 u bazalnom podtipu karcinoma dojke (200).

U odnosu na druge molekularne markere, otkrivena je značajna povezanost visoke ekspresije CD117 i OCT3/4.

Analizom rezultata korelacije kliničko-patoloških karakteristika karcinoma dojke u odnosu na udruženu visoku ekspresiju više nuklearnih markera, uočeno je da udružena visoka ekspresija sva 4 nuklearna markera, odnosno koekspresija KLF4, SOX2, OCT3-4 i EZH2 značajno korelira sa pN2,3 stadijumima aksilarnih limfnih nodusa, većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i većom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih, kao i sa visokom ekspresijom oba membranska proteina CD117 i CD44. Univarijantna logistička regresiona analiza je pokazala da je povećana verovatnoća za prisustvo metastaza u aksilarnim limfnim nodusima povezana sa većim brojem nuklearnih transkripcionih markera koji pokazuju visoku ekspresiju (OR=1,733; 95%IP: 1,228-2,448; p=0,002). Univarijantna linearna regresiona analiza broja limfnih nodusa aksile zahvaćenih metastazama pokazala je da na povećanje broja limfnih nodusa zahvaćenih metastazama uticaj ima povećanje broja molekularnih markera sa svojstvima matičnosti koji su pokazivali visoku nuklearnu ekspresiju – KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 (OR=0,989; 95%IP: 0,484-1,495; p<0,001), kao i koekspresija svih ispitivanih nuklearnih markera (B=4,110; 95%IP: 1,897-6,324; p<0,001). Takođe, povećanje broja molekularnih markera sa svojstvima matičnosti koji su pokazivali visoku nuklearnu ekspresiju (OR=6,956; 95%IP: 3,639-10,274; p<0,001), kao i koekspresija svih ispitivanih nuklearnih markera (B=22,894; 95%IP: 8,044-

37,745;  $p=0,003$ ) imali su uticaj na procentualnu zastupljenost aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama u odnosu na ukupan broj pregledanih.

Rezultati korelacije kliničko-patoloških karakteristika karcinoma dojke u odnosu na udruženu visoku ekspresiju membranskih proteina ukazuju na to da je visoka ekspresija oba membranska markera značajno udružena sa većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i većom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa, G3 gradusom, višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa i nižim vrednostima ER i PR skora.

Visoka ekspresija oba membranska markera značajno korelira sa bazalnim podtipom karcinoma, a istovremeno je značajno više zastupljena kod bazalnog u odnosu na druga dva podtipa. Nasuprot tome, visoka ekspresija oba membranska markera značajno je ređe zastupljena kod luminalnog A karcinoma. Univarijantna logistička regresiona analiza broja limfnih nodusa aksile zahvaćenih metastatskim procesom pokazala je da na povećanje broja zahvaćenih limfnih nodusa uticaj ima koekspresija CD44/CD117 ( $B=3,478$ ; 95%IP: 1,532-5,425;  $p=0,001$ ). Takođe, koekspresija markera sa membranskom ekspresijom – CD44 i CD117 ima uticaj i na povećanjem procentualne zastupljenosti zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih ( $B=17,170$ ; 95%IP: 4,034-30,306;  $p=0,011$ ).

Broj alterisanih markera (udruženih nuklearnih i membranskih markera visoke ekspresije) značajno je korelirao sa prisustvom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima, brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj analiziranih. Univarijantna logistička regresiona analiza pokazala je da broj alterisanih molekularnih markera ima uticaj na pojavu metastaza u aksilarnim limfnim nodusima ( $OR=1,499$ ; 95%IP: 1,136-1,977;  $p=0,004$ ), na povećanje broja metastazama zahvaćenih limfnih nodusa aksile ( $B=0,881$ ; 95%IP: 0,485-1,276;  $p<0,001$ ) i na procentualnu zastupljenost zahvaćenih limfnih nodusa ( $B=5,589$ ; 95%IP: 2,960-8,218;  $p<0,001$ ).

Prema tome, rezultati ovog istraživanja pokazali su da sinergističko delovanje ispitivanih nuklearnih i membranskih markera određuje fenotipske karakteristike duktnog karcinoma dojke koji pokazuje agresivniji klinički tok, sa lokoregionalnim širenjem i pojavom metastaza u aksilarnim limfnim nodusima.

I rezultati drugih autora ukazuju na značajnu ulogu koekspresije molekularnih markera u progresiji karcinoma. Poznato je da postoji funkcionalna povezanost SOX2 i OCT3/4 koja je značajna za funkciju OCT3/4, ali je i KLF4 jedan od transkripcionih faktora koji je uključen u aktivaciju gena OCT3/4 (201).

Rezultati istraživanja Wei i saradnika podržavaju tezu da je direktna interakcija između KLF4, OCT4 i SOX2 ključna za reprogramiranje somatskih ćelija (202). Borong Chen i saradnici



su dokazali da prekomerna ekspresija SOX2 i OCT3/4 menja biološke i onkološke karakteristike ćelija carcinoma želuca, poboljšavajući proliferaciju, migraciju i sposobnost invazije matičnih kancerskih ćelija (203). Takođe, objavljeni su rezultati koji ukazuju na to da ćelije koje pokazuju koekspresiju CD44/CD117 u poređenju sa CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>-</sup> ćelijama imaju veći potencijal da eksprimiraju transkripcione faktore koji su povezani sa matičnošću, kao što su Nanog, SOX2 i OCT4 (204).

Ovim istraživanjem obuhvaćena je i analiza kliničko-patoloških parametara u odnosu na molekularni podtip karcinoma. Tumori T1 stadijuma i histološki gradus G1 i G2 značajno su zastupljeniji kod luminalnog u odnosu na druga dva podtipa karcinoma. G3 histološki gradus, više vrednosti proliferativnog Ki-67 indeksa i Nottingham skora značajno koreliraju sa bazalnim i HER2<sup>+</sup> karcinomom u odnosu na luminalni podtip. Visoka ekspresija membranskih markera CD44 i CD117 i njihova koekspresija značajno koreliraju sa bazalnim podtipom karcinoma, a niska ekspresija CD117 povezana je sa luminalnim i HER2 pozitivnim karcinomima. Visoka ekspresija SOX2 i broj alterisanih markera značajno koreliraju sa bazalnim i HER2<sup>+</sup> u odnosu na luminalni podtip karcinoma.

Multivarijantna logistička regresiona analiza, kao značajne prediktore za pozitivan status aksilarnih limfnih nodusa, odnosno pojavu metastaza, izdvojila je visoku ekspresiju OCT3/4 (OR=2,219; 95%IP: 1,069-4,602; p=0,032) i EZH2 (OR=2,821; 95%IP: 1,356-5,872; p=0,006).

Multivarijantna linearna regresiona analiza izdvojila je koekspresiju nuklearnih markera KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 (B=3,376; 95%IP: 1,159-5,592; p=0,003) i koekspresiju membranskih proteina CD44, CD117 (B=2,798; 95%IP: 0,855-4,740; p=0,005) kao snažne indikatore da će pacijentkinje sa invazivnim duktalnim karcinomom dojke imati veći broj aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama.

Multivarijantna linearna regresiona analiza je, kao značajne prediktore za povećanje procentualne zastupljenosti limfnih nodusa aksile zahvaćenih metastatskim procesom u odnosu na ukupan broj pregledanih, izdvojila T4 stadijum tumora (B=12,782; 95%IP: 2,829-22,735; p=0,012), veći broj nuklearnih markera visoke ekspresije (OR=5,393; 95%IP: 2,050-8,737; p=0,002) i koekspresiju membranskih markera CD44/CD117 (B=15,412; 95%IP: 2,991-27,833; p=0,015)

Rezultati ovog istraživanja, u kojem su identifikovani nestandardni markeri kao prediktivni faktori za lokoregionalno širenje invazivnog duktalnog karcinoma dojke, mogu doprijeti boljem sagledavanju toka i ishoda bolesti, a istovremeno mogu biti osnova za buduća istraživanja u oblasti karcinogeneze.

## 9. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Na lokoregionalno širenje invazivnog dukalnog karcinoma dojke značajan uticaj ima T4 stadijum tumora. Starost pacijentkinja i lokalizacija tumora nisu imale uticaja na lokoregionalno širenje karcinoma;
2. Lokoregionalno širenje karcinoma značajno je povezano sa višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa. Histološki gradus, Nottingham skor, ER skor, PR skor, HER2 status i molekularni podtip (luminalni A, HER2+, basalni) nisu imali uticaj na lokoregionalno širenje karcinoma.
3. Na lokoregionalno širenje karcinoma značajan uticaj imala je visoka ekspresija OCT3/4 i EZH2, veći broj nuklearnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, kao i veći broj alterisanih markera.
4. Prediktivni uticaj na pojavu metastaza u aksili imala je visoka ekspresija OCT3/4 i EZH2 u kancerskim ćelijama.
5. Povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama značajno je povezano sa smanjenjem vrednosti ER i PR skora, visokom ekspresijom SOX2, OCT3/4 i EZH2 markera, povećanjem broja nuklearnih molekularnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, koekspresijom sva četiri nuklearna markera, koekspresijom CD44 i CD117 i povećanjem broja alterisanih markera.
6. Prediktivni uticaj na povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama ima koekspresija nuklearnih, kao i koekspresija membranskih markera.
7. Na povećanje procentualne zastupljenosti aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama u odnosu na ukupan broj pregledanih značajan uticaj ima T4 stadijum, smanjenje ER i PR skora, povećana ekspresija SOX2, OCT3/4 i EZH2, kao i povećanje broja molekularnih markera koji pokazuju visoku ekspresiju, uključujući i koekspresiju sva četiri molekularna markera, koekspresija membranskih markera sa visokom ekspresijom i povećanje broja alterisanih markera.
8. Prediktivni uticaj na povećanje procentualne zastupljenosti aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama u odnosu na ukupan broj pregledanih ima T4 stadijum tumora, veći broj nuklearnih molekularnih markera visoke ekspresije, kao i koekspresija CD44 i CD117.

9. Visoka ekspresija nuklearnog markera KLF4 značajno je povezana sa mladjim životnim dobom, višim vrednostima ER i PR skora, luminalnim A karcinomom i sa visokom ekspresijom EZH2. Niska ekspresija KLF4 značajno je povezana sa slabo diferentovanim karcinomom.
10. Visoka ekspresija nuklearnog markera SOX2 značajno korelira sa nižim vrednostima ER i PR skora, a sa višim vrednostima Nottingham skora i proliferativnog Ki-67 indeksa, pN2,3 stadijumima aksilarnih limfnih nodusa, većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenim metastazama, višom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih i bazalnim podtipom karcinomom.
11. Visoka ekspresija nuklearnog markera OCT3/4 značajno je povezana sa pojavom metastaza, većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i višom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih, pN1 stadijumom aksilarnih limfnih nodusa, G3 histološkim gradusom tumora i visokom ekspresijom EZH2 i CD117.
12. Visoka ekspresija nuklearnog markera EZH2 značajno je povezana sa T4 stadijumom tumora, pojavom metastaza, većim brojem aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama i višom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih, pN1 stadijumom aksilarnih limfnih nodusa i visokom ekspresijom KLF4 i OCT3-4.
13. Visoka ekspresija membranskog markera CD44 značajno korelira sa lokalizacijom tumora u donjem unutrašnjem kvadrantu, niskim vrednostima ER i PR skora, visokim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa i bazalnim podtipom karcinomom.
14. Visoka ekspresija membranskog markera CD117 značajno je povezana sa nižim vrednostima ER i PR skora, višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa, G3 histološkim gradusom, bazalnim podtipom karcinoma i visokom ekspresijom OCT3/4.
15. Visoka ekspresija sva četiri nuklearna markera, odnosno njihova koekspresija značajno korelira sa lokalizacijom tumora u donjem unutrašnjem kvadrantu, pN2,3 stadijumima aksilarnih limfnih nodusa, većim brojem metastazama zahvaćenih limfnih nodusa, višom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih i visokom ekspresijom oba membranska proteina.

16. Visoka ekspresija oba membranska markera značajno je povezana sa većim brojem metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa i višom procentualnom zastupljenošću zahvaćenih limfnih nodusa u odnosu na ukupan broj pregledanih, G3 histološkim gradusom, višim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa, nižim vrednostima ER i PR skora i bazalnim podtipom karcinoma.
17. Luminalni A podtip karcinoma dojke značajno je bio povezan sa T1 stadijumom, G1 i G2 histološkim gradusom, nižim vrednostima Nottingham skora i proliferativnog Ki-67 indeksa, niskom ekspresijom SOX2, CD117 i CD44 markera i manjim brojem alterisanih molekularnih markera.
18. Bazalni podtip karcinoma dojke značajno korelira sa visokom ekspresijom membranskih markera CD44 i CD117, kao i sa koekspresijom ovih markera.
19. Usporedna analiza glavnih molekularnih podtipova invazivnog dukalnog karcinoma dojke pokazala je da su bazalni i HER2 pozitivni podtipovi karcinoma, u odnosu na luminalni, značajno povezani sa G3 histološkim gradusom, višim vrednostima Nottingham skora i proliferativnog Ki-67 indeksa, visokom ekspresijom SOX2 nuklearnog markera i većim brojem alterisanih markera.

#### Opšti zaključak:

U ovom istraživanju nuklearni molekularni markeri OCT3/4 i EZH2 identifikovani su kao prognostički faktori lokoregionalnog širenja invazivnog dukalnog karcinoma u aksilarne limfne noduse. Koekspresija nuklearnih transkripcionih faktora KLF4, SOX2, OCT3/4, EZH2 i koekspresija membranskih proteina CD44 i CD117 imala je prediktivni uticaj na povećanje broja aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama. Na povećanje procentualne zastupljenosti metastazama zahvaćenih aksilarnih limfnih nodusa zahvaćenih metastazama prediktivni uticaj imao je T4 stadijum tumora, povećanje broja nuklearnih molekularnih markera sa visokom ekspresijom, kao i koekspresija CD44 i CD117.

U ovom istraživanju identifikovani su nestandardni molekularni markeri, kao prognostički faktori lokoregionalnog širenja invazivnog dukalnog karcinoma dojke, čija bi rutinska primena u kliničkoj praksi doprinela boljem sagledavanju toka i ishoda bolesti.

## 10. LITERATURA

1. Sanders-Goebel P. Crisis and controversy: historical patterns in breast surgery. *Can Bull Med Hist.* 1991; 8(1):77-90. doi: 10.3138/cbmh.8.1.77.
2. Filipović S. Osnovi kliničke onkologije. Niš: Prosveta; 1996.
3. Morris AD, Morris RD, Wilson JF, White J, Steinberg S, Okunieff P, Arriagada R, Lê MG, Blichert-Toft M, van Dongen JA. Breast-conserving therapy vs mastectomy in early-stage breast cancer: a metaanalysis of 10-year survival. *Cancer J Sci Am.* 1997; 3(1):6-12.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: source, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5):E358-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
5. Izveštaj Hospitalnog registra za rak za 2015. godinu. Odeljenje epidemiologije i prevencije, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, 2016.
6. Vukićević A, Miljuš D, Živković S. Incidenca i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji 2000. Beograd: Registar za rak u Centralnoj Srbiji, Institut za zaštitu zdravlja Srbije; 2004.
7. Pekmezović T. Epidemiologija raka dojke. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013. s.5-7.
8. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJ, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systemic analysis. *Lancet.* 2011; 378(9801):1461-1484. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61351-2.
9. Broeders M, Moss S, Nyström L, Njor S, Jonsson H, Paap E, Massat N, Duffy S, Lynge E, Paci E; EUROSCREEN Working Group. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *J Med Screen.* 2012; 19(Supl.1):14-25. doi: 10.1258/jms.2012.012078.
10. Moss SM, Nyström L, Jonsson H, Paci E, Lynge E, Njor S, Broeders M; Euroscreen Working Group. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of trend studies. *J Med Screen.* 2012; 19(Supl.1):26-32. doi: 10.1258/jms.2012.012079.
11. Haukka J, Byrnes G, Boniol M, Autier P. Trends in breast cancer mortality in Sweden before and after implementacion of mammography screening. *PLoS One.* 2011; 6(9):e22422. doi: 10.1371/journal.pone.0022422.
12. Filipović S, Filipović A, Stojiljković V, Mišić I, Vrbić S, Pejčić I, Stanojević Z. Karcinom dojke – kliničke implikacije. *JMB.* 2007; 26(2):134-143. DOI: 10.2478/v10011-007-0017-5.

13. Collaborative group on hormonal factors in breast cancer. Menarche, menopause and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol.* 2012; 13(11):1141-1151. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70425-4.
14. Msolly A, Gharbi O, Ben Ahmed S. Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Tunisia: a case-control study. *Med Oncol.* 2013; 30(1):480. doi: 10.1007/s12032-013-0480-4.
15. Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Warren Andersen S, Greenberg ER, Willett WC. Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer.* 2011; 117(9):1946-1956. doi: 10.1002/cncr.25728.
16. Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9:321-345. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164339.
17. Claus EB, Petruzzella S, Matoff E, Carter D. Prevalence of BRCA 1 and BRCA 2 mutations in women diagnosed with ductal carcinoma in situ. *JAMA.* 2005; 293(8):964-969. doi: 10.1001/jama.293.8.964.
18. Li CI, Malone KE, Porter PL, Daling JR. Epidemiologic and molecular risk factor for contralateral breast cancer among women. *Br J Cancer.* 2003; 89(3):513-518. doi: 10.1038/sj.bjc.6601042.
19. Worsham MJ, Raju U, Lu M, Kapke A, Botttrel A, Cheng J, Shah V, Savera A, Wolman SR. Risk factors for breast cancer from benign disease in a diverse population. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 118(1):1-7. doi: 10.1007/s10549-008-0198-8.
20. Cuneo KC, Dash RC, Wilke LG, Horton JK, Koontz BF. Risk of invasive breast cancer and ductal carcinoma in situ in women with atypical papillary lesions of the breast. *Breast J.* 2012; 18(5):475-478. doi: 10.1111/j.1524-4741.2012.01276.x.
21. Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.* 2007; 8(4):292-293. doi: 10.1016/s1470-2045(07)70099-2.
22. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA.* 2001; 286:2143-2151. doi: 10.1001/jama.286.17.2143.
23. Rohan TE, Jain M, Howe GR, Miller AB. Alcohol consumption and risk of breast cancer: a cohort study. *Cancer Causes Control.* 2000; 11(3):239-247. doi: 10.1023/a:1008933824645.

24. Kruk J. Lifetime physical activity and risk of breast cancer: a case control study. *Cancer Detect Prev.* 2007; 31(8):18-28. doi: 10.1016/j.cdp.2006.12.003.
25. Arun BK, Strong LC. Breast Cancer Genetic Syndromes. In: Singletary ES, Robb GL, Hortobagay GN, editors. *Advanced Therapy of Breast Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Hanilton, Ontario: BC Decker Inc; 2004. p.75-83.
26. Independet UK Panel on Breast Cancer Screening. The benefits and harms of breast cancer screening: an independet review. *Lancet.* 2012; 380(9855):1778-1786. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61611-0.
27. Lewin JM. Digital mammography. In: Singletary ES, Robb GL, Hortobagay GN, editors. *Advanced Therapy of Breast Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Hanilton, Ontario: BC Decker Inc; 2004. p.213-222.
28. Rosen MA, Orez SG. Magnetic resonance imaging. In: Singletary ES, Robb GL, Hortobagay GN, editors. *Advanced Therapy of Breast Disease*. 2<sup>nd</sup> ed. Hanilton, Ontario: BC Decker Inc; 2004. p.236-246.
29. Guo R, Lu G, Qin B, Fei B. Ultrasound imaging technologies for Breast cancer detection and management: a review. *Ultrasound Med Biol.* 2018; 44(1):37-70. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2017.09.012.
30. Rovera F, Dionigi G, Marelli M, Ferrari A, Limonta G, Corben AD, Boni L, Piscopo C, De Berardinis V, Dionigi R. Breast cancer diagnosis: The role of stereotactic vacuum-assisted aspiration biopsy. *Int J Surgery.* 2008; 6:104-108. doi: 10.1016/j.ijisu.2008.12.009.
31. Iwuagwu O, Drew P. Vacuum-assisted biopsy device-diagnostic and therapeutic application in breast surgery. *Breast.* 2004; 13(6):483-487. doi: 10.1016/j.breast.2004.06.004.
32. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosing in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957; 11(3):359-377. doi: 10.1038/bjc.1957.43.
33. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology (CD-ROM)*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
34. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Törnberg S, Holland R, von Karsa L, editors. *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis*. 4th ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2006.
35. *Pathology reporting of breast disease*. NHSBSP Publication No 58. Sheffield: NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists; 2005.
36. Ellis I, editor. *Quality assurance guidelines for breast pathology services*. 2nd edition. Sheffield: NHS Cancer Screening Programmes; 2011.

37. Rosen PP. *Rosen's Breast Pathology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009.
38. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica* 2020; 112(1):25-41. doi: 10.32074/1591-951X-1-20.
39. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel Members. Tailoring therapies improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015; 26(8):1533-1546. doi: 10.1093/annonc/mdv221.
40. Marković I. TNM klinička klasifikacija. U: Milašinović G, urednik. *Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke*. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013. s58-65.
41. Edge B, Byrd R, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
42. Stamatović Lj. Adjuvantna hemioterapija raka dojke. U: *Maligni tumori dojke-UOHS*; 2005.
43. Nicolini A, Carpi A, Tarro G. Biomolekular Markers of Breast Cancer. *Front Biosci*. 2006; 11:1811-1843. doi: 10.2741/1926.
44. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014; 6;14(3):275-291. doi: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
45. Zhou J, Chen Qishan, Zou Y, Chen H, Qi L, Chen Y. Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications. *Front Oncol*. 2019; 9: 820. doi: 10.3389/fonc.2019.00820.
46. Moore N, Lyle S. Quiescent, Slow-Cycling Stem Cell Populations in Cancer: A Review of the Evidence and Discussion of Significance. *J Oncol*. 2011; 2011:396076, doi: 10.1155/2011/396076.
47. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, Chomienne C, Ishikawa F, Schuringa JJ, Stassi G, Huntly B, Herrmann H, Soulier J, Roesch A, Schuurhuis GJ, Wöhrer S, Arock M, Zuber J, Cerny-Reiterer S, Johnsen HE, Andreeff M, Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(11): 767-775. doi: 10.1038/nrc3368.
48. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the Cancer Stem Cells - What Challenges Do They Pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(7):497-512. doi: 10.1038/nrd4253.
49. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*. 2009; 69(4):1302-1313.



50. Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, Zhang LS. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncol Lett.* 2012; 4(6):1264-1268. doi: 10.3892/ol.2012.916.
51. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Canc Res.* 2010; 16(3):876-887. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1532.
52. Park SY, Gönen M, Kim HJ, Michor F, Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. *J Clin Invest.* 2010; 120(2):636-644. doi: 10.1172/JCI40724.
53. Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME, Gianni L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:674-690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
54. Piva M, Domenici G, Iriando O, Rábano M, Simões BM, Comaills V, Barredo I, López-Ruiz JA, Zabalza I, Kypta R, Vivanco Md. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2014; 6:66-79. doi: 10.1002/emmm.201303411.
55. Korkaya H, Wicha MS. HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. *Cancer Res.* 2013; 73:3489-3493. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0260..
56. Geng S-Q, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett.* 2014; 349(1):1-7. doi: 10.1016/j.canlet.2014.03.036.
57. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(9):672-679. doi: 10.1093/jnci/djn123.
58. Zhang J, Li G, Feng L, Lu H, Wang X. Krüppel-like factors in breast cancer: Function, regulation and clinical relevance. *Biomed Pharmacother.* 2020; 123:109778. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109778.
59. Vangapandu H, Ai W. Kruppelike factor 4(KLF4): a transcription factor with diverse context-dependent functions. *Gene Ther Mol Biol.* 2009; 13:194-203.
60. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 383(2):157-162. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.02.156.
61. Song X, Xing YM, Wu W, Cheng GH, Xiao F, Jin G, Liu Y, Zhao X. Expression of Krüppel-like factor 4 in breast cancer tissues and its effects on the proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Exp Ther Med.* 2017; 13(5): 2463-2467. doi: 10.3892/etm.2017.4262.

62. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Moriyama M, Hashimoto I, Matsui K, Okumura T, Hori T, Imura J, Tsukada K. KLF4 and NANOG are prognostic biomarkers for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer*. 2017; 24:326-335. doi: 10.1007/s12282-016-0708-1.
63. Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(15):2969-2976. doi: 10.1093/nar/28.15.2969.
64. Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem*. 2000; 275(24):18391-18398. doi: 10.1074/jbc.C000062200.
65. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*. 2005; 7(11):1074-1078. doi: 10.1038/ncb1314.
66. Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(1):11-23. doi: 10.1038/nrc1780
67. Lin ZS, Chu HC, Yen YC, Lewis BC, Chen YW. Correction: Krüppel-like factor 4, a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells reverts epithelial mesenchymal transition by suppressing slug expression. *PLoS One*. 2016; 11:e0154168. doi: 10.1371/journal.pone.0154168
68. Li H, Wang J, Xiao W, Xia D, Lang B, Yu G, Guo X, Guan W, Wang Z, Hu Z, Liu J, Ye Z, Xu H. Epigenetic alterations of Krüppel-like factor 4 and its tumor suppressor function in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2013; 34(10):2262–2270. doi: 10.1093/carcin/bgt189.
69. Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Zheng H, Ai W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*. 2011; 30(18):2161-2172. doi: 10.1038/onc.2010.591.
70. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008; 75(2):75-84. doi: 10.1159/000123845.
71. Lawson JC, Blatch GL, Edkins AL. Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 2009; 118(2):241-254. doi: 10.1007/s10549-009-0524-9.
72. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994; 127(6 Pt 2):2021-2036. doi: 10.1083/jcb.127.6.2021
73. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, Chambon P, Huber M, Hohl D, Cano A, Birchmeier W, Huelsken J. Cutaneous cancer stem cell maintenance is

- dependent on beta-catenin signalling. *Nature*. 2008; 452(7187):650-653. doi: 10.1038/nature06835.
74. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(2): 52. doi: 10.3390/cancers10020052..
  75. Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer: Focus on Basal-Like Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2017; 9(10):134. doi: 10.3390/cancers9100134.
  76. Hu D, Zhou Z, Davidson NE, Huang Y, Wan Y. Novel insight into KLF4 proteolytic regulation in estrogen receptor signaling and breast carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2012; 287(17):13584-13597. doi: 10.1074/jbc.M112.343566.
  77. Akaogi K, Nakajima Y, Ito I, Kawasaki S, Oie SH, Murayama A, Kimura K, Yanagisawa J. KLF4 suppresses estrogen-dependent breast cancer growth by inhibiting the transcriptional activity of ERalpha. *Oncogene*. 2009; 28(32):2894-2902. doi: 10.1038/onc.2009.151.
  78. Grimm D, Bauer J, Wise P, Krüger M, Simonsen U, Wehland M, Infanger M, Corydon TJ. The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2020; 67(Pt 1):122-153. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.03.004.
  79. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990; 346(6281):245-250. doi: 10.1038/346245a0. PMID: 2374589.
  80. Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P. The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. *Mamm Genome*. 1994; 5(10):640-642. doi: 10.1007/BF00411460.
  81. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126 (4):663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
  82. Chan YS, Yang L, Ng HH. Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells. *Prog Drug Res*. 2011; 67:239-252. doi: 10.1007/978-3-7643-8989-5\_12.
  83. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol*. 2007; 9(6):625-635. doi: 10.1038/ncb1589.
  84. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. *Semin Cancer Biol*. 2020; 67(Pt 1):74-82. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.007.

85. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, Pandiella A, Rezola R, Martin AG. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*. 2012;31(11):1354-1365. doi: 10.1038/onc.2011.338.
86. Mamun MA, Mannoor K, Cao J, Qadri F, Song X. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *J Mol Cell Biol*. 2020; 12(2):85-98. doi: 10.1093/jmcb/mjy080.
87. Liu P, Tang H, Song C, Wang J, Chen B, Huang X, Pei X, Liu L. SOX2 Promotes Cell Proliferation and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer. *Front Pharmacol*. 2018; 9:942. doi: 10.3389/fphar.2018.00942.
88. Zhao FQ. Octamer-binding transcription factors: Genomics and functions. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2013; 18:1051-1071. doi: 10.2741/4162.
89. Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25(2):500-510. doi: 10.1634/stemcells.2006-0426.
90. Pesce M, Schöler HR. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55(4):452-457. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S.
91. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells*. 2014; 3(2):74–82.
92. De Jong J, Looijenga LH. Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: History and future. *Crit Rev Oncog*. 2006; 12(3-4):171-203. doi: 10.1615/critrevoncog.v12.i3-4.10.
93. Aguilar-Gallardo C, Simón C. Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin Reprod Med*. 2013; 31(1):5-13. doi: 10.1055/s-0032-1331792.
94. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005; 65(13):5506-5511. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.
95. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 2005; 121(3):465-477. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.018.
96. Federici G, Espina V, Liotta L, Edmiston KH. Breast cancer stem cells: a new target for therapy. *Oncology (Williston Park)*. 2011; 25(1):25-28.

97. Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, Bae WJ, Kang HJ, Kim YS, Moon JH, Lim YC. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2015; 34(18):2317-2324. doi: 10.1038/onc.2014.174.
98. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499-507. doi: 10.1038/ng.127.
99. Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res*. 2008; 68:6533-40.
100. Beltran AS, Rivenbark AG, Richardson BT, Yuan X, Quian H, Hunt JP, Zimmerman E, Graves LM, Blancafort P. Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription factor. *Breast Cancer Res*. 2011; 13(5):R94. doi: 10.1186/bcr3019.
101. Zhao FQ, Misra Y, Li DB, Wadsworth MP, Krag D, Weaver D, Tessitore J, Li DW, Zhang G, Tian Q, Buss K. Differential expression of Oct3/4 in human breast cancer and normal tissues. *Int J Oncol*. 2018; 52(6):2069-2078. doi: 10.3892/ijo.2018.4341.
102. Cai S, Geng S, Jin F, Liu J, Qu C, Chen B. POU5F1/Oct-4 expression in breast cancer tissue is significantly associated with non-sentinel lymph node metastasis. *BMC Cancer*. 2016;16:175. doi 10.1186/s12885-015-1966-6.
103. Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 2004;15(1):57-67. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.020.
104. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 2008;322(5902):750-756. doi: 10.1126/science.1163045.
105. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 2010; 329(5992):689-693. doi: 10.1126/science.1192002.
106. Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(10):697-708.
107. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006; 439(7078):871-874. doi: 10.1038/nrm2763.
108. Han Li C, Chen Y. Targeting EZH2 for Cancer Therapy: Progress and Perspective. *Curr Protein Pept Sci*. 2015; 16(6):559-570. doi: 10.2174/1389203716666150409100233.
109. Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavaraj A, Marqueron R, Viale A, Reinberg D, Wülfing C, Tarakhovsky A. Polycomb group protein ezh2 controls actin

- polymerization and cell signaling. *Cell*. 2005; 121(3):425-436. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.029.
110. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 2008; 32(4):503-518. doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.004.
  111. Watanabe H, Soejima K, Yasuda H, Kawada I, Nakachi I, Yoda S, Naoki K, Ishizaka A. Dereglulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int*. 2008; 8:15. doi: 10.1186/1475-2867-8-15.
  112. Chen Y, Xie D, Li Y.W, Cheung C.M, Yao H, Chan CY, Xu FP, Liu YH, Sung JJY, Kung HF. RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer *in vivo*. *Cancer Lett*. 2010; 297(1):109-116. doi: 10.1016/j.canlet.2010.05.003.
  113. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002; 419(6907):624-629. doi: 10.1038/nature01075.
  114. Klier CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins S.A, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes ID, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(20):11606-11611. doi: 10.1073/pnas.1933744100.
  115. Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ. Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24 Pt 1):8570-8576. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1047.
  116. Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H. Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci*. 2006; 97(6):484-491. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00203.x.
  117. Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M. Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2005; 92(9):1754-1758. doi: 10.1038/sj.bjc.6602531.
  118. Gonzalez ME, DuPrie ML, Krueger H, Merajver SD, Ventura AC, Toy KA, Klier CG. Histone Methyltransferase EZH2 Induces Akt-Dependent Genomic Instability and BRCA1 Inhibition in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2011; 71(6):2360-2370. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1933.

119. Gee K, Kryworuchko M, Kumar A. Recent advances in the regulation of CD44 expression and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004;52(1):13-26.
120. Herrera-Gayol A, Jothy S. Adhesion proteins in the biology of breast cancer: contribution of CD44. *Exp Mol Pathol*. 1999; 66:149-156. doi: 10.1006/exmp.1999.2251.
121. Jang MH, Kang HJ, Jang KS, Paik SS, Kim WS. Clinicopathological analysis of CD44 and CD24 expression in invasive breast cancer. *Oncol Lett*. 2016; 12(4):2728-2733. doi: 10.3892/ol.2016.4987.
122. Bänkfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pschadka G, Krech R, Böcker W. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumour progression. *Histopathology*. 1998; 33(2):107-116. doi: 10.1046/j.1365-2559.1998.00472.x.
123. Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B, Stamenkovic I, Plowman G, Aruffo A. CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol*. 1995; 128(4):687-698. doi: 10.1083/jcb.128.4.687.
124. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013; 238(3):324-338. doi: 10.1177/1535370213480714.
125. Guo W, Frenette PS. Alternative CD44 splicing in intestinal stem cells and tumorigenesis. *Oncogene*. 2014; 33(5):537-538. doi: 10.1038/onc.2013.260.
126. Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol*. 2009; 86(2):95-100. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.003.
127. Olsson E, Honeth G, Bendahl PO, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Holm K, Lövgren K, Fernö M, Grabau D, Borg A, Hegardt C. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer*. 2011; 11:418. doi: 10.1186/1471-2407-11-418.
128. Covert H, Mellor LF, Wolf CL, Ankenbrandt N, Emathing JM, Tawara K, Oxford JT, Jorcyk CL. OSM-induced CD44 contributes to breast cancer metastatic potential through cell detachment but not epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Manag Res*. 2019; 11:7721-7737. doi: 10.2147/CMAR.S208721.
129. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010; 141(7):1117-1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
130. Ke H, Kazi J.U, Zhao H, Sun J. Germline mutations of KIT in gastrointestinal stromal tumor (GIST) and mastocytosis. *Cell Biosci*. 2016; 6:55. doi: 10.1186/s13578-016-0120-8.

131. Foster BM, Zaidi D, Young TR, Mobley ME, Kerr BA. CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and Therapeutic Resistance. *Biomedicines*. 2018; 6(1):31. doi: 10.3390/biomedicines6010031.
132. Philo JS, Wen J, Wypych J, Schwartz MG, Mendiaz EA, Langley KE. Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor. *J Biol Chem*. 1996; 271(12):6895-6902. doi: 10.1074/jbc.271.12.6895.
133. Gibson PC, Cooper K. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Adv Anat Pathol*. 2002; 9(1):65-69. doi: 10.1097/00125480-200201000-00007.
134. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Takeuchi H, Nishizaki T, Higashi H, Era S. A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 2006; 94(12):1874-1878. doi: 10.1038/sj.bjc.6603183.
135. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005;13(3):205-220. doi: 10.1097/01.pai.0000173054.83414.22.
136. Mei L, Smith SC, Faber AC, Trent J, Grossman SR, Stratakis CA, Boikos SA. Gastrointestinal Stromal Tumors: The GIST of Precision Medicine. *Trends Cancer*. 2018; 4(1):74-91. doi: 10.1016/j.trecan.2017.11.006.
137. Martín-Broto J, Rubio L, Alemany R, López-Guerrero JA. Clinical implications of KIT and PDGFRA genotyping in GIST. *Clin Transl Oncol*. 2010; 12(10):670-676. doi: 10.1007/s12094-010-0576-7.
138. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med*. 2002; 347(7):472-480. doi: 10.1056/NEJMoa020461.
139. Medinger M, Kleinschmidt M, Mross K, Wehmeyer B, Unger C, Schaefer H-E, Weber R, Azemar M. c-kit (CD117) expression in human tumors and its prognostic value: An immunohistochemical analysis. *Pathol Oncol Res*. 2010;16(3):295-301. doi: 10.1007/s12253-010-9247-9.
140. Tsuura Y, Suzuki T, Honma K, Sano M. Expression of c-kit protein in proliferative lesions of human breast: sexual difference and close association with phosphotyrosine status. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002; 128:239-246. <https://doi.org/10.1007/s00432-002-0329-2>.
141. Talaiezhadeh A, Jazayeri SN, Nateghi J. Expression of c-kit protein in cancer versus normal breast tissue. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2012; 16(4):306-309. doi: 10.5114/wo.2012.30058.



142. Raikar P, Kumar DB, Murthy VS. CD 117 Immunoexpression in Invasive Breast Carcinoma: Association with Various Prognostic Parameters. *APLM* 2018; 5(12):A984-A990. doi: <https://doi.org/10.21276/apalm.2229>.
143. Luo Y, Huang W, Zhang H, Liu G. Prognostic significance of CD117 expression and TP53 missense mutations in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2018; 5(5):6161-6170. doi: 10.3892/ol.2018.8104.
144. Gwak JM, Kim M, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget.* 2017; 8(22):36305-36318. doi: 10.18632/oncotarget.16750.
145. Ulivi P, Zoli W, Medri L, Amadori D, Saragoni L, Barbanti F, Calistri D, Silvestrini R. c-kit and SCF Expression in Normal and Tumor Breast Tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 83(1):33-42. doi: 10.1023/B:BREA.0000010694.35023.9e.
146. Dong M, Fan XJ, Chen ZH, Wang TT, Li X, Chen J, Lin Q, Wen JY, Ma XK, Wei L, Ruan DY, Lin ZX, Liu Q, Wu XY, Wan XB. Aberrant expression of enhancer of zeste homologue 2, correlated with HIF-1 $\alpha$ , refines relapse risk and predicts poor outcome for breast cancer. *Oncol Rep.* 2014; 32(3):1101-1107. doi: 10.3892/or.2014.3322
147. Xu H, Yu S, Yuan X, Xiong J, Kuang D, Pestell GR, Wu K. DACH1 suppresses breast cancer as a negative regulator of CD44. *Sci Rep.* 2017; 7:4361. doi: 10.1038/s41598-017-04709-2.
148. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013; 49(6):1374-1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.
149. Incidencija i mortalitet od raka u Centralnoj Srbiji. <http://www.batut.org.rs/>
150. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; 25(1):16-27. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
151. Silverstein MJ, Skinner KA, Lomis TJ. Predicting axillary nodal positivity in 2282 patients with breast carcinoma. *World J Surg.* 2001; 25(6):767-772. doi: 10.1007/s00268-001-0003-x.
152. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989; 63(1):181-187. doi: 10.1002/1097-0142(19890101)63:1<181::aid-cnrcr2820630129>3.0.co;2-h.
153. Yu KD, Jiang YZ, Shao ZM. Difference between observed and expected number of involved lymph nodes reflects the metastatic potential of breast cancer independent to intrinsic subtype. *Oncotarget.* 2015; 6(18):16686-16697. doi: 10.18632/oncotarget.3647.

154. Barinoff J, Hils R, Bender A, Groß J, Kurz C, Tauchert S, Mann E, Schwidde I, Ipsen B, Sawitzki K, Heitz F, Harter P, Traut A, du Bois A. Clinicopathological differences between breast cancer in patients with primary metastatic disease and those without: A multicenter study. *Eur J Cancer*. 2013; 49(2):305-311. doi: 10.1016/j.ejca.2012.07.027.
155. Liu C, Li H, Zhuo R, Wang L, He L, Ruan Q, Luan X, Mo X, Sun Y. Grade lymph node ratio predicts the survival of breast cancer in different molecular types. A surveillance, epidemiology, and end results population-based analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(28): e16436. doi: 10.1097/MD.00000000000016436.
156. Xiao XS, Tang HL, Xie XH, Li LS, Kong YN, Wu MQ, Yang L, Gao J, Wei WD, Xie X. Metastatic axillary lymph node ratio (LNR) is prognostically superior to pN staging in patients with breast cancer--results for 804 Chinese patients from a single institution. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14(9):5219-5223. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.9.5219.
157. Tonello F, Bergmann A, Abrahão SK, Aguiar SS, Bello AM, Thuler LCS. Impact of number of positive lymph nodes and lymph node ratio on survival of women with node-positive breast cancer. *Eur J Breast Health*. 2019;15(2):76-84. doi: 10.5152/ejbh.2019.4414.
158. Verheuel NC, Ooms HW, Tjan-Heijnen VC, Roumen RM, Voogd AC. Predictors for extensive nodal involvement in breast cancer patients with axillary lymph node metastases. *Breast*. 2016; 27:175-181. doi: 10.1016/j.breast.2016.02.006.
159. Tsai J, Bertoni D, Hernandez-Boussard T, Telli ML, Wapnir IL. Lymph node ratio analysis after neoadjuvant chemotherapy is prognostic in hormone receptor-positive and triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23(10):3310-3316. doi: 10.1245/s10434-016-5319-8.
160. Wasuthit Y, Kongdan Y, Suvikapakornkul R, Lertsithichai P, Chirappapha P. Predictive factors of axillary lymph node metastasis in breast cancer. *J Med Assoc Thai*. 2011; 94(1):65-70.
161. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018; 27(1):95-120. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005.
162. Pusztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:S11. doi: 10.1186/bcr2430
163. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365(9472):1687-1717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
164. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Eng J Med*. 2009; 360(8):790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289.

165. Ivković-Kapicl T, Panjković M, Nikolić I, Đilas-Ivanović D, Knežević Usaj S. Expression of cytokeratins 5/6 and cytokeratin 17 in invasive breast carcinoma. *Vojnosanit Pregl.* 2012; 69(12):1031-1038. doi: 10.2298/vsp1212031i. [in Serbian]
166. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerzz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of breast cancer revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol.* 2008; 61(5):553-560. doi: 10.1136/jcp.2008.055475.
167. Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S, Singh L. Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. *APMIS.* 2012; 120(12):1008-1019. doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02933.x.
168. Zhao W, Li Y, Zhang X. Stemness-Related Markers in Cancer. *CancerTransl Med.* 2017; 3(3):87-95. doi: 10.4103/ctm.ctm 69\_16.
169. Karagonlar ZF, Akbari S, Karabicici M, Sahin E, Avci ST, Ersoy N, Ates KE, Balli T, Karacicek B, Kaplan KN, Celiker C, Atabey N, Erdal E. A novel Function for KLF4 in Nodulating and De-differentiation of Ep Cam-/CD33- nonstem Cells into Ep Cam+/CD33+ Liver Cancer Stem Cells in HCC Cell Line Hu H7. *Cells.* 2020; 9(5):1198. doi: 10.3390/cell 9051198.
170. Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, Chhieng DC, Grizzle WE, Engler JA, Krontiras H, Bland KI, LoBuglio AF, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin Canc Res.* 2004; 10(8): 2709-2719. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-03-0484.
171. Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K. Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer.* 2014; 21(1):96-101. doi: 10.1007/s12282-012-0357-y
172. Zhang S, Sun Y. Targeting oncogenic SOX2 in human cancer cells: therapeutic application. *Protein Cell.* 2020; 11(2):82-84. doi: 10.1007/s13238-019-00673-x.
173. Wang H, Xie J. The role of SOX2 in angiogenesis in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018; 11(5):2805-2810.
174. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, Schneider F, Petersen K, Wallwiener D, Kanz L, Fend F, Perner S, Bareiss PM, Staebler A. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2011; 11:42. doi: 10.1186/1471-2407-11-42.
175. Zheng Y, Qin B, Li F, Xu S, Wang S, Li L. Clinicopathological significance of Sox2 expression in patients with breast cancer: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(12):22382-22392.

176. Huang YH, Luo MH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. *Histopathology*. 2014; 64(4):494-503. doi: 10.1111/his.12257.
177. Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE, Nesland JM, Suo Z. Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009; 29(4):1233-1242.
178. Scioli MG, Storti G, D'Amico F, Gentile P, Fabbri G, Cervelli V, Orlandi A. The Role of Breast Cancer Stem Cells as a Prognostic Marker and a Target to Improve the Efficacy of Breast Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(7):1021. doi: 10.3390/cancers11071021.
179. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, Gao J, Zhao Z, Liu C. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014; 5(21):10803-10815.
180. Jiang T, Wang Y, Zhou F, Gao G, Ren S, Zhou C. Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget*. 2016; 7(4):4584-4597. doi: 10.18632/oncotarget.6612.
181. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*. 2003; 22: 5323-5335. doi: 10.1093/emboj/cdg542.
182. Ren G, Baritaki S, Marathe H, Feng J, Park S, Beach S, Bazeley PS, Beshir AB, Fenteany G, Mehra R, Daignault S, Al-Mulla F, Keller E, Bonavida B, de la Serna I, Yeung KC. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res*. 2012; 72(12):3091-3104. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3546.
183. Saeg F, Anbalagan M. Breast cancer stem cells and the challenges of eradication: a review of novel therapies. *Stem Cell Investig*. 2018; 5:39. doi: 10.21037/sci.2018.10.05.
184. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(8B):2236-2252. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x.
185. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*. 2006; 24(2):268-273. doi:10.1200/JCO.2005.01.5180.
186. Yomtoubian S, Lee SB, Verma A, Izzo F, Markowitz G, Choi H, Cerchietti L, Vahdat L, Brown KA, Andreopoulou E, Elemento O, Chang J, Inghirami G, Gao D, Ryu S,

- Mittal V. Inhibition of EZH2 catalytic activity selectively targets a metastatic subpopulation in triple-negative breast cancer. *Cell Reports*. 2020; 30(3):755-770. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.056.
187. Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(4):1168-1174. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1533.
188. Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E, Gonidi M, Nicolopoulou-Stamati P, Chelidonis G, Athanassiadou P. Enhancer of zeste homologue 2 expression in breast carcinoma smears in relationship with p53, Ki-67 and other prognostic parameters. *Acta Cytol*. 2011; 55(2):180-186. doi: 10.1159/000320790.
189. Jianchun W, Crowe DL. The histone methyltransferase EZH2 promotes mammary stem and luminal progenitor cell expansion, metastasis and inhibits estrogen receptor-positive cellular differentiation in a model of basal breast cancer. *Oncol Rep*. 2015; 34(1):455-460. doi: 10.3892/or.2015.4003.
190. Hirukawa A, Smith HW, Zuo D, Dufour CR, Savage P, Bertos N, Johnson RM, Bui T, Bourque G, Basik M, Giguère V, Park M, Muller WJ. Targeting EZH2 reactivates a breast cancer subtype-specific anti-metastatic transcriptional program. *Nat Commun*. 2018; 9(1):2547. doi: 10.1038/s41467-018-04864-8.
191. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(3):1154-1159.
192. Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, Sugimoto M, Naito Y, Hayashi Y, Ueno T, Ohno S, Funata N, Kuroi K, Tomita M, Eishi Y. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. *J Med Dent Sci*. 2010; 57(2):165-175.
193. Looi LM, Cheah PL, Zhao W, Ng MH, Yip CH. CD44 expression and axillary lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Malays J Pathol*. 2006; 28(2):83-86.
194. Fillmore C, Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res*. 2007; 9(3):303. doi: 10.1186/bcr1673.
195. Xu H, Tian Y, Yuan X, Liu Y, Wu H, Liu Q, Wu GS, Wu K. Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *Onco Targets Ther*. 2016; 9:431–444. doi: 10.2147/OTT.S97192.
196. Montgomery N, Hill A, McFarlane S, Neisen J, O'Grady A, Conlon S, Jirstrom K, Kay EW, Waugh DJ. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by

- upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(3):R84. doi: 10.1186/bcr3199.
197. Amin MM, El-Hawary AK, Farouk O. Relation of CD117 immunoreactivity and microvascular density in invasive breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012; 55(4):456-460.
198. Amin MM, El-Hawary AK, Farouk O. Relation of CD117 immunoreactivity and microvascular density in invasive breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012; 55(4):456-460. doi: 10.4103/0377-4929.107780.
199. Simon R, Panussis S, Maurer R, Spichtin H, Glatz K, Tapia C, Mirlacher M, Ruffle A, Torhorst J, Sauter G. KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(1 Pt 1):178-183. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-0597-3.
200. Shams TM, Shams ME. Overexpression of c-KIT (CD117) in triple-negative breast cancer. *Egypt J Pathol.* 2011; 31(2):113-117. doi: 10.1097/01.XEJ.0000406601.42226.2d.
201. Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, Yagi K, Miyazaki J, Matoba R, Ko MS, Niwa H. Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the *Lefty1* Core Promoter in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(20):7772-7782. doi: 10.1128/MCB.00468-06.
202. Wei Z, Yang Y, Zhang P, Andrianakos R, Hasegawa K, Lyu J, Chen X, Bai G, Liu C, Pera M, Lu W. Klf4 Directly Interacts with Oct4 and Sox2 to Promote Reprogramming. *Stem Cells.* 2009; 27(12):2969-2678. doi: 10.1002/stem.231.
203. Chen B, Zhu Z, Li L, Ye W, Zeng J, Gao J, Wang S, Zhang L, Huang Z. Effect of overexpression of Oct4 and Sox2 genes on the biological and oncological characteristics of gastric cancer cells. *Onco Targets Ther* 2019; 12: 4667-4682. doi: 10.2147/OTT.S209734.
204. Pagotto A, Pilotto G, Mazzoldi EL, Nicoletto MO, Frezzini S, Pastò A, Amadori A. Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death Dis.* 2017; 8(7):e2943; doi: 10.1038/cddis.2017.327.

## 11. BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Miodrag Đorđević rođen je 18.11.1989. godine u Nišu. Nakon završene gimnazije 2008. godine, upisao je Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, a diplomirao je na studijskom programu Integrisane akademske studije medicine u predviđenom roku, 27.06. 2014. godine, sa prosečnom ocenom 9,94.

Doktorske akademske studije upisao je školske 2014/15. godine i položio programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10.

U toku studija bio je stipendista Fonda za mlade talente Republike Srbije, kao jedan od najboljih studenata završnih godina studija, i stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije koje dodeljuje stipendiju najboljim studentima doktorskih studija.

Kao student doktorski studija, dr Miodrag Đorđević proveo je 5 meseci u Centru za minimalno invazivnu hirurgiju Kliničkog centra Niš u svrhu naučnog i stručnog usavršavanja.

Nakon toga, nastavio je stručno usavršavanje u KBC Bežanijska kosa u Beogradu, na Odeljenju onkološke hirurgije. Radni odnos zasnovao je u KBC Bežanijska kosa, a zatim je prešao u Klinički centar Niš, na Kliniku za opštu hirurgiju.

Specijalizaciju iz Opšte hirurgije, koju je započeo na Medicinskom fakultetu u Beogradu, nastavio je na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Danas radi na Klinici za endokrinu hirurgiju i hirurgiju dojke Kliničkog centra Niš kao lekar na specijalizaciji iz opšte hirurgije, pred specijalističkim ispitom. Juna 2019. godine izabran je u zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Hirurgija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Objavio je 21 rad, od toga 11 radova u časopisima na SCI listi. Jedan je od autora u monografiji međunarodnog značaja (M12) i u stručnoj monografiji nacionalnog značaja (M42). Istraživač je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Preventivni, terapijski i etički pristup pretkliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije” ( ev.br. III 41018).

Govori, piše i čita engleski jezik.

**Izjava 1.**

**IZJAVA O AUTORSTVU**

Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom

**UTICAJ MOLEKULARNIH KARAKTERISTIKA INVAZIVNOG DUKTALNOG  
KARCINOMA DOJKE NA POJAVU LOKOREGIONALNIH METASTAZA**

koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivao/la na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredio/la autorska prava, niti zloupotrebio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

\_\_\_\_\_  
dr Miodrag N. Đorđević



**Izjava 2.**

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije:

**UTICAJ MOLEKULARNIH KARAKTERISTIKA INVAZIVNOG DUKTALNOG  
KARCINOMA DOJKE NA POJAVU LOKOREGIONALNIH METASTAZA**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predao/la za unošenje u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu**, istovetan štampanom obliku.

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

\_\_\_\_\_  
dr Miodrag N. Đorđević

### Izjava 3.

#### IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Nikola Tesla“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom:

<b>UTICAJ MOLEKULARNIH KARAKTERISTIKA INVAZIVNOG DUKTALNOG KARCINOMA DOJKE NA POJAVU LOKOREGIONALNIH METASTAZA</b>
--

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (**CC BY**)

2. Autorstvo – nekomercijalno (**CC BY-NC**)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade ( <b>CC BY-NC-ND</b> )
--

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (**CC BY-NC-SA**)

5. Autorstvo – bez prerade (**CC BY-ND**)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (**CC BY-SA**)

U Nišu, \_\_\_\_\_

Potpis autora disertacije:

\_\_\_\_\_  
dr Miodrag N. Đorđević