



Univerzitet u Novom Sadu
Medicinski fakultet
Doktorske akademske studije

Klinička vrednost određivanja Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Tatjana Ivković-Kapicel

Doc. dr Lazar Popović

Kandidat:

Asist. dr Tanja Lakić

Novi Sad, 2018. godina

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Tanja Lakić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Tatjana Ivković-Kapicl, vanredni profesor Doc. dr Lazar Popović, docent
Naslov rada: NR	Klinička vrednost određivanja Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Medicinski fakultet u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad

Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja / XVII + 122 stranice / 23 slike / 21 grafikon / 24 tabele/ 213 referenci)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Patologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	neoplazme dojke; Ki-67 antigen; receptor epidermalnog faktora rasta; tumorski biomarkeri; stadijum neoplazmi; prognoza; estrogenski receptori; progesteronski receptori; lokalni recidiv neoplazmi; preživljavanje
UDK	618.19-006.6-091.8
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	/
Izvod: IZ	<p>Uvod: Karcinom dojke je heterogena bolest koju karakterišu različita morfologija, imunohisto-hemijski profil, klinički tok i terapijski odgovor. Ki-67 proliferativni indeks je jedan od markera sa prognostičkim i prediktivnim značajem, čije metodološko određivanje i analiza još uvek nisu standardizovani.</p> <p>Cilj: Utvrditi graničnu (“cut-off”) prognostičku vrednost Ki-67 indeksa, kao i povezanost vrednosti Ki-67 u ranom luminalnom karcinomu dojke sa prognostičkim i prediktivnim parametrima karcinoma dojke, kao što su životna dob bolesnica, veličina tumora, histološki gradus (HG) i nivo tumorske ekspresije receptora estrogena (ER) i progesterona (PR). Takođe, cilj istraživanja je i utvrđivanje značajnosti razlike u vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa u odnosu na pojavu lokalnog recidiva, udaljenih metastaza i dužinu preživljavanja u toku petogodišnjeg perioda praćenja pacijentkinja.</p> <p>Metode: Retrospektivno je analizirano 120 patohistoloških izveštaja bolesnica kojima je u periodu od 01.01.2009. godine do 31.12.2011. godine na Institutu za onkologiju Vojvodine imunohistohemijskom analizom dokazan luminalni karcinom dojke (pozitivan ER i PR, negativan HER2), bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.</p>

	<p>Rezultati: Metodama deskriptivne statistike prosečna starost pacijentkinja je iznosila 57,42±10,17 godina; prosečna veličina tumora 17,98±6,97mm; recidiv je registrovan kod 8 (6,7%) pacijentkinja uz prosečan vremenski period do pojave recidiva od 49±20,23 meseci. Vrednost “cut off” indeksa Ki-67 od prognostičkog značaja za vremenski period bez recidiva je iznosio 20,75%. Nije dokazana signifikantna veza između vrednosti Ki-67 i godina starosti pacijentkinja (p=0,401, odnosno p=0,293), kao i jačine ekspresije ER (p=1,00, p=0,957) i PR (p=0,273, p=0,189). Ustanovljena je signifikantna povezanost Ki-67 postoji sa veličinom (p=0,035, p=0,20) i HG tumora (p=0,041, p=0,20). Prosečan period praćenja bolesnica iznosio je 72,92±8,38 meseci; nije registrovana pojava udaljenih metastaza, kao ni smrtni ishod. U odnosu na pojavu lokalnog recidiva, Kaplan-Majerovom analizom i Koksovom regresionom analizom proliferativni indeks Ki-67 se pokazao kao signifikantan prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti, lokalnog recidiva (Log rank (df = 1) = 2,73; p=0,045). Takođe je ustanovljeno da je statistički značajan prediktor za procenu recidiva bolesti i starosna dob bolesnica (Log rank (df = 1) = 6,885; p=0,009). Intenzitet pozitivnosti ER i PR, veličina tumora i histološki gradus se nisu pokazali kao prediktori za pojavu recidiva luminalnih karcinoma dojke (p > 0,05).</p> <p>Zaključak: Zbog heterogene prirode oboljenja, korišćenjem standardnih histopatoloških faktora i biomarkera teško je predvideti tok i ishod karcinoma dojke. Ki-67 je proliferativni marker, čija visoka vrednost korelira sa faktorima loše prognoze.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	08.09.2016.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član:</p>
---	--

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF MEDICINE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Tanja Lakic
Mentor: MN	Associate Professor Tatjana Ivkovic-Kapicl Assistant Professor Lazar Popovic
Title: TI	Clinical value of determination of Ki-67 proliferative index in carcinomas with positive hormone receptors
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Province of Vojvodina
Publication year: PY	2018
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Faculty of Medicine Novi Sad, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad

Physical description: PD	7 chapters / XVII + 122 pages / 23 pictures / 21 graphics/ 24 tables / 213 references
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Pathology
Subject, Key words SKW	Breast Neoplasms; Ki-67 Antigen; Receptor, Epidermal Growth Factor; Biomarkers, Tumor; Neoplasm Staging; Prognosis; Receptors, Estrogen; Receptors; Progesterone; Neoplasm Recurrence, Local; Survival
UC	618.19-006.6-091.8
Holding data: HD	University od Novi Sad Library of the Faculty of Medicine Novi Sad Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	/
Abstract: AB	<p>Introduction: Breast cancer is a heterogeneous disease characterized by different morphology, immunohistochemical profile, clinical course and response to applied therapy. Ki-67 proliferative index is one of the prognostic and predictive factors, whose methodological determination and analysis are still unstandardized.</p> <p>Objective: Determination of cut-off value for Ki-67 index, its corelation in luminal breast carcinoma with patient's age, tumor size, histological grade (HG) and expression of estrogen (ER) and progesterone (PR). Also, the aim of the study was to determine the significance of the difference in the value of the Ki-67 proliferative index in relation to the occurrence of local relapse, distant metastases and survival rates during the five-year follow-up period of the patient.</p> <p>Methods: Retrospectively, we analysed 120 pathohistological reports of patients who were treated in the period from 01.01.2009 until 31.12.2011 at the Oncology Institute of Vojvodina, and to whom immunohistochemically was proven luminal breast cancer (positive ER and PR, negative HER2), without axillary lymph node metastases.</p> <p>Results: The average patient's age was 57.42±10.17 years; average tumor size 17.98±6.97mm; recurrence was registered in 8 (6.7%) patients with</p>

	<p>average recurrence time of 49 ± 20.23 months. "Cut off" Ki-67 value of prognostic significance for period without recurrence was 20.75%. Test didn't show significant relationship between Ki-67 and patient's age ($p=0.401$ and $p=0.293$), as well as the strength of expression ER ($p=1.00$, $p=0.957$) and PR ($p=0.273$, $p=0.189$). Significant correlation was present for Ki-67 with size ($p=0.035$, $p=0.20$) and tumor's HG ($p=0.041$, $p=0.20$). The average follow-up period for patients was 72.92 ± 8.38 months; there was no registered occurrence of distant metastases or fatal outcome. In relation to the occurrence of local relapse, Kaplan-Meier analysis and Cox regression analysis, the proliferative index Ki-67 proved to be a significant predictor for the assessment of recurrence of the disease, local relapse (Log rank (df = 1) = 2.73; $p = 0.045$). Also, it was founded that a statistically significant predictor for assessing the recurrence of the disease is the age of the patients (Log rank (df = 1) = 6.885; $p = 0.009$). The intensity of ER and PR expression, tumor size and histological grade have not been shown to be predictors of the recurrence of luminal breast carcinoma ($p > 0.05$).</p> <p>Conclusion: Breast carcinoma is heterogeneous disease, so it is difficult to predict its course and outcome using standard histopathological factors and biomarkers. Ki-67 is proliferative marker whose high value correlates with factors of bad prognosis.</p>
Accepted on Senate on: AS	8 th of September 2016.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: member: member:

Sadržaj

UVOD.....	1
1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI.....	1
1.2. KANCEROGENEZA.....	2
1.3. FAKTORI RIZIKA ZA OBOLJEVANJE OD KARCINOMA DOJKE.....	5
1.3.1. Faktori rizika koje ne možemo promeniti.....	5
1.3.2. Faktori rizika povezani sa životnim stilom.....	7
1.3.3. Faktori rizika sa nejasnim uticajem i kontroverzni faktori rizika za nastanak karcinoma dojke..	7
1.4. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI PARAMETRI KARCINOMA DOJKE.....	8
1.4.1. Veličina tumora	9
1.4.2. Histološki tip tumora	11
1.4.3. Histološki gradus karcinoma	16
1.4.4. Limfovaskularna i perineuralna invazija	18
1.4.5. Status regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza.....	19
1.4.6. Određivanje stadijuma tumorske bolesti	22
1.4.7. Ekspresija estrogenih i progesteronskih receptora.....	26
1.4.8. Ekspresija HER2 receptora.....	28
1.4.9. PROLIFERATIVNI INDEKS KI-67 (MIB-1).....	30
1.4.10. Molekularna klasifikacija invazivnog karcinoma dojke.....	33
1.4.11. Nekroza (Slika 13).....	34
1.4.12. Angiogeneza	35
1.4.13. Inflammatorni ćelijski odgovor organizma	35
1.4.14. Tumor-supresorski geni i onkogeni kod tumora dojke.....	37
1.4.15. Parametri domaćina tumora – godine i status menopauze.....	37
1.5. IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE KARCINOMA DOJKE.....	38
1.5.1. Citokeratini	38
1.5.2. Mioepitelni markeri	40
1.5.3. Basal-like markeri	40
1.5.4. Markeri lobularne neoplazije.....	40

1.5.5. Neuroendokrini markeri (NE)	40
1.5.6. Markeri koji ukazuju na diferencijaciju tkiva dojke.....	41
1.5.7. KIT (CD117)	42
1.5.8. Epitelni membranski antigen (EMA)	42
1.6. ZNAČAJ PROLIFERATIVNOG INDEKSA KI-67 ZA KARCINOM DOJKE.....	43
CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE	46
2.1. Ciljevi rada	47
2.2. Hipoteze istraživanja	47
MATERIJAL I METODE.....	49
3.1. Način izbora, veličina i konstrukcija uzorka	49
3.2. Metode koje su bile primenjene	51
REZULTATI.....	55
4.1. Deskriptivna statistika i frekvencija kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima	55
4.2. Step en Ki-67 indeksa tumorske proliferacije u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima u područjima “hot spot” i invazivnog tumorskog ruba	63
4.3. Utvrđivanje granične (cut off) vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa uz pomoć roc krive	67
4.4. Povezanost vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa sa kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma dojke	69
4.5. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – indeks Ki-67.....	76
4.6. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – intenzitet bojenja ER.....	78
4.7. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – intenzitet bojenja PR	80
4.8. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – veličina tumora	82
4.9. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – starosne grupe	84
4.10. Koksova regresiona analiza – histološki gradus.....	86
4.11. Koksova regresiona analiza – primenjena terapija	87
4.12. Prosek Ki-67 u hot spot po T stadijumima bolesti	88
4.13. Prosek Ki-67 u hot spotu po histološkim gradusima karcinoma dojke.....	89
DISKUSIJA	90
ZAKLJUČCI.....	102
LITERATURA.....	104

Lista slika

Slika 1. Stem ćelijski i stohastićki model kacerogeneze.....	3
Slika 2. Makroskopski izgled i velićina amputirane dojke.....	9
Slika 3. Makroskopsko merenje velićine tumorskog ćvora u dojci	10
Slika 4. Najćešći histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke.	13
Slika 5. Specijalni histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke sa predominantno pozitivnim hormonskim receptorima.....	14
Slika 6. Specijalni histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke sa predominantno negativnim hormonskim receptorima.....	15
Slika 7. Stepen diferentovanosti tumora.....	16 - 17
Slika 8. Limfovaskularna invazija karcinoma dojke	18
Slika 9. Perineuralna invazija karcinoma dojke.	19
Slika 10. Mapiranje sentinel limfnog nodusa tumora dojke.....	20
Slika 11. Metastaza karcinoma dojke u limfnom ćvoru.	21
Slika 12. Metastaza karcinoma dojke u kožu poglavine.	22
Slika 13. Hormon-receptorska negativnost karcinoma dojke.	26
Slika 14. Hormon-receptorska slaba pozitivnost karcinoma dojke.	26
Slika 15. Hormon-receptorska izrazita (jaka) pozitivnost karcinoma dojke.....	27
Slika 16. HER2 receptorska ekspresija	29 - 30
Slika 17. Ekspresija proliferativnog indeksa Ki-67.	32
Slika 18. Podrućje nekroze u duktalnom karcinomu dojke.....	34
Slika 19. Inflamatorni odgovor organizma na invazivni karcinom dojke.....	36
Slika 20. Imunohistohemijska ekspresija CK7 u karcinomu dojke.....	39
Slika 21. Imunohistohemijska ekspresija GCDFP u metastatskom karcinomu dojke.	42
Slika 22. Faze ćelijskog ciklusa i ekspresija Ki-67.	44
Slika 23. Ekspresija Ki-67 u razlićitim fazama ćelijskog ciklusa.	45

Lista tabela

Tabela 1.1. Anatomski stadijumi/prognostičke grupe karcinoma dojke.....	25
Tabela 1.2. Molekularna klasifikacija invazivnog karcinoma dojke, St. Galen 2011.godine.....	33
Tabela 4.1.1. Deskriptivna statistika kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima.....	56
Tabela 4.2.1. Deskriptivna statistika vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa.....	64
Tabela 4.2.2. Hot spot vrednost Ki-67 po starosnim grupama pacijentkinja.....	65
Tabela 4.2.3. Vrednost Ki-67 na rubu tumora po starosnim grupama pacijentkinja.....	66
Tabela 4.4.1. Povezanost Ki-67 proliferativnog indeksa i kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke.....	69
Tabela 4.4.2. Prosečna vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 u hot spot područjima invazivnog dukalnog i lobularnog karcinoma dojke.....	76
Tabela 4.5.1. Značajnost regresionog modela.....	77
Tabela 4.5.2. Doprinos Ki-67 proliferativnog indeksa kao prediktora u regresionom modelu....	78
Tabela 4.6.1. Značajnost regresionog modela.....	79
Tabela 4.6.2. Doprinos intenziteta bojenja ER kao prediktora u regresionom modelu.....	80
Tabela 4.7.1. Značajnost regresionog modela.....	81
Tabela 4.7.2. Doprinos intenziteta bojenja PR kao prediktora u regresionom modelu.....	82
Tabela 4.8.1. Značajnost regresionog modela.....	83
Tabela 4.8.2. Doprinos veličine tumora kao prediktora u regresionom modelu.....	84
Tabela 4.9.1. Značajnost regresionog modela.....	85
Tabela 4.9.2. Doprinos starosnih grupa pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu.....	86
Tabela 4.10.1. Značajnost regresionog modela.....	86
Tabela 4.10.2. Doprinos histološkog gradusa tumora pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu.....	87
Tabela 4.11.1. Značajnost regresionog modela.....	87
Tabela 4.11.2. Doprinos histološkog gradusa tumora pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu.....	88
Tabela 4.12.1. Prosek vrednosti Ki-67 u hot spot po T stadijumima bolesti.....	88
Tabela 4.13.1. Prosek vrednosti Ki-67 u hot spot po histološkim gradusima karcinoma dojke....	89

Lista grafikona

<i>Grafikon 4.1.1.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u zavisnosti od veličine tumora.....	57
<i>Grafikon 4.1.2.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na histološku diferentovanost tumora.....	58
<i>Grafikon 4.1.3.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na T stadijum bolesti.....	59
<i>Grafikon 4.1.4.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na anatomski stadijum bolesti.....	60
<i>Grafikon 4.1.5.</i> Procentualna zastupljenost histološkog tipa invazivnog karcinoma dojke.....	61
<i>Grafikon 4.1.6.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na jačinu ekspresije estrogenskih receptora po Allred scor-u.....	62
<i>Grafikon 4.1.7.</i> Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na jačinu ekspresije progesteronskih receptora po Allred scor-u.....	63
<i>Grafikon 4.2.1.</i> Vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 u hot spot područjima posmatrano po starosnim grupama pacijentkinja.....	65
<i>Grafikon 4.2.2.</i> Vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 na rubu tumora posmatrano po starosnim grupama pacijentkinja.....	66
<i>Grafikon 4.3.1.</i> ROC kriva za određivanje graničnih (cut off) vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa kod analiziranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima.....	67
<i>Grafikon 4.4.1.</i> Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od starosti.....	70
<i>Grafikon 4.4.2.</i> Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od veličine tumora.....	71
<i>Grafikon 4.4.3.</i> Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od histološkog gradusa tumora.....	72
<i>Grafikon 4.4.4.</i> Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od intenziteta ekspresije estrogenih receptora.....	73
<i>Grafikon 4.4.5.</i> Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od intenziteta ekspresije progesteron receptora.....	74
<i>Grafikon 4.4.6.</i> Procentualna zastupljenost niskog i visokog indeksa Ki-67 u hot spot područjima tumora.....	75
<i>Grafikon 4.5.1.</i> Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na nivo Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima.....	77

<i>Grafikon 4.6.1.</i> Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na intenzitet bojenja ER po Allred-u u karcinomima dojke.....	79
<i>Grafikon 4.7.1.</i> Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na intenzitet bojenja PR po Allred-u u karcinomima dojke.....	81
<i>Grafikon 4.8.1.</i> Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na veličinu tumora u karcinomima dojke.....	83
<i>Grafikon 4.9.1.</i> Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na starosne grupe kod karcinoma dojke.....	85

Lista skraćénica

ASCO – *engl. American Society of Clinical Oncology*; Američko udruženje kliničkih onkologa

ATM gen – *engl. ataxia-teleangiectasia mutated gene*; ataksija-teleangiektazija mutirani gen

BCL-2 gen – *engl. B-cell lymphoma-2 gene*; gen 2 B-ćelijskog limfoma

BRCA1/BRCA2 gen – *engl. breast cancer gen 1 and 2*; gen 1 i gen 2 vezan za karcinom dojke

CD – *engl. cluster od differentiation*; obeleživač limfocita

CDH1 gen – *engl. cadherin-1 gene*; kadherin-1 gen

CDI – *lat. carcinoma ductale infiltrativum*; duktalni karcinom dojke

CISH – *engl. chromogenic in situ hybridization*; hromogena in situ hibridizacija

CK – *engl. cytokeratin*; citokeratini

CLI – *lat. carcinoma lobulare infiltrativum*; lobularni karcinom dojke

CNB – *engl. core needle biopsy*; iglena biopsija

CSC – *engl. cancer stem cell*; stem ćelijski model kancerogeneze

DCIS – *lat. carcinoma ductale in situ*; neinvazivni (“in situ”) karcinom dojke

DFS – *engl. disease-free-survival*; preživljavanje bez znakova bolesti (recidiva)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DNK repair gene – gen koji kodira protein koji popravljaju oštećenu DNK

EGFR – *engl. epidermal growth factor receptor*; receptor epidermalnog faktora rasta

ER– estrogen receptor

FGF – *engl. fibroblast growth factor*; faktor rasta fibroblasta

FISH – *engl. fluorescent in situ hybridization*; fluorescentna in situ hibridizacija

G - gradus

HE – hematoksilin-eozin bojenje

HER-2 – *engl. human epidermal growth factor receptor-2*; receptor-2 humanog epidermalnog faktora rasta

HG – histološki gradus

HR – hormonski receptori

IHC - imunohistohemija

ITC – izolovane tumorske ćelije

Kendal τ -b – Kendal tau-b test

LVI – limfovaskularna invazija

NCCN – *engl. National Comprehensive Cancer Network*; Nacionalni registar za kancer

NGS – *engl. Nottingham grading system*; Notingamski sistem za gradiranje

NST Ca – *engl. no special type carcinoma*; karcinom neodređenog specifičnog ćelijskog tipa

OS - *engl. overall survival*; sveukupno preživljavanje

PALB- gen – *engl. partner and localizer of BRCA2 gene*; partner lokalizujući gen BRCA2 gena

PR – progesteron receptor

PTEN gen – *engl. phosphatase and tensin homolog gene*; fosfataza-tenzin homolog gen

SISH – *engl. silver in situ hybridization*; in situ hibridizacija srebrom

STK gen – *engl. stem cell tyrosine kinase 1 gene*; stem ćelijski tirozin-kinaza-1 gen

SZO – Svetska zdravstvena organizacija

TMA – *engl. tissue microarray*; tkivni mikroniz

TP53 – tumor supresorni gen 53

VEGF – *engl. vascular endothelial growth factor*; vaskularni endotelni faktor rasta

WS – *engl. whole section*; operativni materijal

χ^2 – Hi kvadrat test

Reč autora:

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na nesebičnoj i bezuslovnoj podršci, pomoći i osloncu na ovom i svakom mom putu... Bez njih ne bih bila ovde gde sam sada.

Takođe, beskrajno se zahvaljujem svojim mentorima na stručnim i praktičnim sugestijama i uputstvima tokom izrade ove disertacije, posebno mentorki Tanji.

Ogromno hvala i mojim najbližim prijateljima na stalnoj i nesebičnoj podršci i podsticaju tokom dostizanja mojih ciljeva.

1

UVOD

1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI

Karcinom dojke je jedan od najčešćih tumora ženske populacije, te zbog velike incidencije vodeći je uzrok smrti među malignim tumorima, iako se leči u preko 80% obolelih slučajeva. U manje razvijenim zemljama predstavlja najčešći uzrok smrti žena, dok se u razvijenim zemljama nalazi na drugom mestu, posle karcinoma pluća. Shodno podacima Svetske zdravstvene organizacije, karcinom dojke predstavlja javno-zdravstveni problem globalnih razmera sa oko 1,67 miliona novih slučajeva registrovanih 2012. godine, čineći $\frac{1}{4}$ svih maligniteta, odnosno sa preko milion novodijagnostikovanih slučajeva godišnje. Posmatrajući oba pola, karcinom dojke je drugi najčešće dijagnostikovani tumor, dok je u ženskoj populaciji na prvom mestu. U muškoj populaciji ova maligna bolest je izuzetno retka (1-3% svih karcinoma dojke odnose se na pripadnike muške populacije) (1, 2, 3). Godišnje se u svetu registruje preko 1,5 miliona novih slučajeva bolesti (u Evropi preko 360.000) i preko 500.000 smrtnih ishoda sa ovom dijagnozom (u Evropi oko 92.000) (4). Broj novo otkrivenih slučajeva karcinoma dojke u Srbiji iznosi oko 4500 na godišnjem nivou, a od istog umre oko 1500 žena. Oko 23000 žena u Srbiji živi sa ovom bolešću. Prosečna standardizovana stopa incidencije karcinoma dojke u centralnoj Srbiji u periodu od 1999. do 2009. godine iznosila je 60,8/100.000, a mortalitetna stopa 20,2/100.000 (5). Kumulativna verovatnoća obolevanja iznosi oko 12,5%, odnosno jedna od osam žena može očekivati da će tokom svog života oboleti od ove bolesti (6).

Od 1990. godine, naša zemlja beleži pad stope mortaliteta zahvaljujući unapređenju dijagnostike i kvaliteta lečenja ove bolesti, te se, shodno tome, u Vojvodini zapaža porast broja novootkrivenih slučajeva karcinoma dojke uz pad broja umrlih od istog. Globalno posmatrano, geografska distribucija karcinoma dojke je neravnomerna. Najveća učestalost bolesti je prisutna u Zapadnoj Evropi, Severnoj Americi, Australiji, Novom Zelandu i nekim zemljama Južne Amerike (Argentina), što se pripisuje višoj prevalenciji poznatih faktora rizika za ovu bolest u pomenutim područjima. Nešto niži rizik od pojave oboljenja postoji u manje razvijenim regionima subsaharske Afrike, Južne i Istočne Azije, uključujući i Japan, gde je verovatnoća za pojavu karcinoma dojke trostruko manja nego u zemljama Evrope i Amerike. U Evropi, najviše stope incidencije tumora dojke beleže se u zapadnoj i severnoj, dok su u južnoj i istočnoj stope obolevanja niže (7).

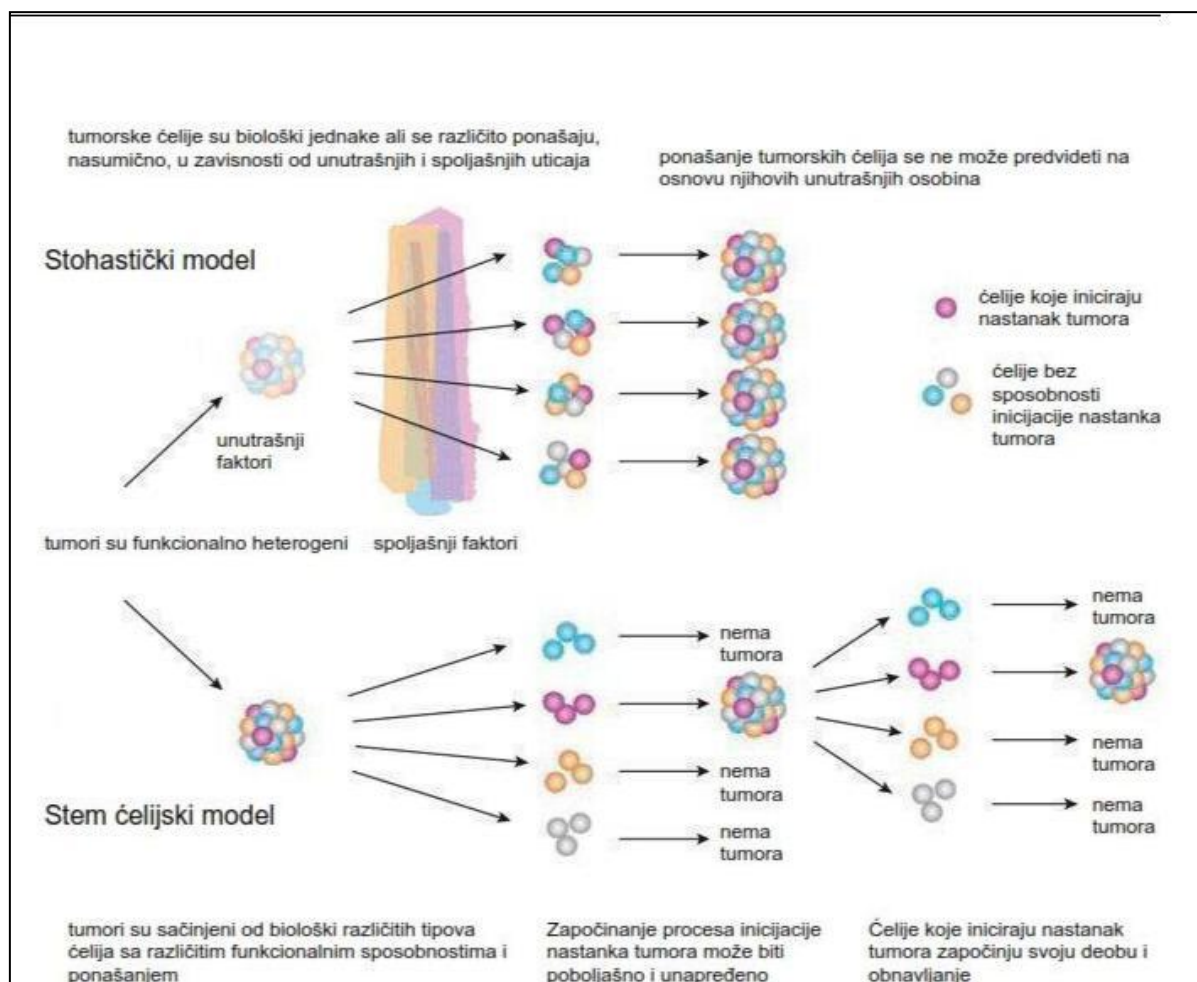
1.2. KANCEROGENEZA

Aktuelno shvatanje nastanka tumora datira još iz davne 1858. godine, kada je Rudolf Virchow postavio revolucionarnu tezu “*somnis cellula e cellula*”, koja označava da sve ćelije nastaju iz ćelija. Kasnije, iz ove teorije je nastala ideja da ćelije karcinoma nastaju iz normalnih ćelija kod kojih je došlo do somatskih mutacija. Danas je opšte prihvaćeno da je tumor genetska bolest koja nastaje usled ekspanzivnog klonalnog rasta jedne neoplastične ćelije, što upućuje da tumor predstavlja nekontrolisan rast abnormalnih ćelija, tj. nekontrolisanu ćelijsku proliferaciju u okviru tumora (8). Godine 1963, na eksperimentalnim miševima primećeno je da samo frakcija limfomskih ćelija ima sposobnost klonogenog rasta (9), a tim biologa je ustanovio da je u eksperimentalne životinje potrebno ubrizgati veliki broj ćelija, najmanje 10^4 do 10^5 , kako bi započeo tumorski rast, te da će od ovog broja samo mali procenat ćelija biti sposoban da formira metastaze (10, 11, 12).

Predložene su dve glavne teorije koje pokušavaju da objasne zašto od svake tumorske ćelije ne može da nastane novi tumor i koje objašnjavaju heterogenost tumora, a to su stohastički i hijerarhijski model (12).

Prema stohastičkoj teoriji, sve tumorske ćelije su biološki ekvivalentne, ali spoljašnji faktori (odbrambeni mehanizmi domaćina, koncentracije faktora rasta, mikrosredina rasta tumora) i/ili

unutrašnji faktori (vreme u toku ćelijskog ciklusa) sprečavaju da se svaka ćelija isto ponaša. Stoga je ponašanje svake ćelije potpuno nepredvidivo i nasumično, i pod uticajem je nekih ili čak i svih unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Kao rezultat toga, tumor će biti sačinjen od ćelija sa različitim proliferativnim kapacitetom. Glavna karakteristika ovog modela je ta da svaka ćelija ima podjednak potencijal za inicijaciju i održivost tumorskog rasta, ali većina ćelija neće nastaviti proliferaciju zbog male kumulativne verovatnoće za ostvarivanje pogodnih unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Teorija pretpostavlja da je tumor sastavljen od homogene populacije ćelija i da su tumorogeni mehanizmi funkcionalni u svim ćelijama (Slika 1).



Slika 1. Stem ćelijski i stohastički model kacerogeneze.

(Preuzeto iz: De Vita, Hellman, Rosenber. *Cancer principles and practice of oncology*, 9th ed 2011 Lipincott Williams and Wilkins.)

Drugi model je hijerarhijski model, koji je zasnovan na modelu biologije normalnog somatskog tkiva. Ovaj model objašnjava da većinu ćelija u normalnom tkivu čine neproliferišuće odrasle ćelije koje se neprekidno zamenjuju brzo proliferišućim mladim ćelijama, a te brzo proliferišuće mlade ćelije potiču od retkih stem ćelija na vrhu hijerarhijske lestvice. Prema ovoj teoriji, samo ograničen broj ćelija u okviru heterogenog tumora je sposoban da inicira tumorogeni rast, te ova fenotipski različita populacija tumorogenih ćelija predstavlja ćelije slične “stem” ćelijama, odnosno “stem” ćelije kancera (CSCs) (13-18). “Stem” ćelija kancera je definisana kao ćelija kancera koja ima sposobnost i da se samostalno obnovi i da bude prekursor ostalim tumorogenim ćelijama, ali i da pretrpi diferencijaciju kako bi od nje nastala fenotipski raznovrsna (netumorogena) populacija ćelija koja čini ostatak tumora (19, 20). Ipak, definitivno ćelijsko poreklo CSC ostaje nejasno. Ukoliko ove ćelije potiču od normalne “stem” ćelije, onda bi ćelije kancera mogle da preuzmu postojeće regulatorne puteve “stem” ćelije za samostalno obnavljanje. Sa druge strane, ako ove ćelije potiču od zrelih, diferencovanih ćelija, potrebne su onkogene mutacije za dediferencijaciju i samostalno obnavljanje. Diskutabilno je to što zrele ćelije imaju veoma ograničen životni ciklus i, stoga, nije verovatno da bi sve potrebne mutacije mogle da se dogode tokom relativno kratkog života ovih ćelija. Nasuprot tome, neograničen kapacitet normalne “stem” ćelije za samoobnavljanje znači da ove ćelije mogu da budu jedine ćelije koje su prisutne dovoljno dugo da bi akumulirale potrebne mutacije (12-20).

Iako većina normalnih ćelija u dojci ima ograničen kapacitet za samoobnavljanje, nedavne studije su pokazale da mlečna žlezda može u celosti da bude rekonstruisana pomoću jedne epitelne “stem” ćelije (21).

Pored samoobnavljanja, nekoliko drugih, klasičnih karakteristika normalne “stem” ćelije u velikoj meri podseća na uočeno eksperimentalno i kliničko ponašanje malignih ćelija kancera dojke, uključujući aktivaciju antiapoptotskih puteva, povećan kapacitet za rezistenciju na lekove i potreba za tzv. “utočištem” ili mikro-okruženjem za rast tumora.

1.3. FAKTORI RIZIKA ZA OBOLJEVANJE OD KARCINOMA DOJKE

Faktore rizika čini sve ono što utiče i povećava mogućnost obolevanja od bolesti, pa tako i od karcinoma dojke. Međutim, prisustvo jednog ili više faktora rizika ne uslovljava obavezno nastajanje bolesti.

Pokazano je da postoji više faktora koji su udruženi sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke. Najznačajniji među njima su ženski pol, starosna dob, genetski i hormonalni faktori (22).

Svi faktori rizika za oboljevanje od karcinoma dojke mogu se podeliti u četiri velike grupe i to: faktori rizika na koje ne možemo uticati/ koje ne možemo promeniti, faktori rizika povezani sa životnim stilom, faktori rizika sa nejasnim uticajem i kontroverzni faktori rizika za nastanak karcinoma dojke.

1.3.1. Faktori rizika koje ne možemo promeniti

1. Ženski pol – glavni faktor rizika za nastanak karcinoma dojke; muškarci takode mogu da obole od karcinoma dojke, ali ova bolest se oko 100 puta češće javlja kod osoba ženskog pola.
2. Starosna dob – sa porastom starosne dobi raste i mogućnost nastanka karcinoma dojke; najveći deo karcinoma dojke se razvija kod starijih od 55 godina.
3. Genetska predispozicija – za oko 5-10% karcinoma dojke se smatra da su hereditarni, odnosno da su rezultat mutiranog gena koji je nasleđen od roditelja. Najznačajniji među tim genima su BRCA1 i BRCA2, koji u normalnim ćelijama doprinose sintezi proteina koji učestvuju u popravci oštećene DNK (DNK-repair gene), dok mutirani oblici ovih gena mogu da vode rastu i proliferaciji abnormalnih ćelija, što može rezultirati razvojem karcinoma (22). Bolesnice koje poseduju mutirane BRCA1 i BRCA2 gene imaju lošiju prognozu i kraće preživljavanje od onih koje nemaju mutaciju ovih gena (23). Mutacije u BRCA1/2 genu mogu biti uzrok razvoja i drugih tumora, kao što su karcinom jajnika, pankreasa, prostate i melanoma. Potomci nosilaca mutacije u BRCA1/2 genima imaju 50% verovatnoću da naslede mutirani genski alel od jednog od roditelja (24, 25). Dokazane su i mutacije na drugim genima koje imaju uticaja na nastanak karcinoma dojke, međutim mnogo su ređe prisutni i njihov uticaj je znatno slabiji u poređenju sa BRCA1/2 genima. U toj grupi gena se nalazi ATM gen (DNK-repair gene; nasleđena jedna

abnormalna kopija ovog gena je povezana sa povećanom učestalošću karcinoma dojke u pojedinim porodicama, dok nasleđene dve abnormalne kopije ATM gena uzorkuju nastanak ataksija-telangiektazije). Mutacija tumor-supresornog TP53 gena je retko uzrok karcinoma dojke, ali dovodi do razvoja Li-Fraumeni sindroma koji se karakteriše povećanim rizikom za nastanak tumora dojke, leukemije, sarkoma i tumora mozga. Mutacije PTEN gena (koji normalno kontroliše ćelijski rast) mogu uzrokovati nastanak Cowden sindroma koji se manifestuje povećanim rizikom od nastanka benignih i malignih tumora dojke, digestivnog trakta, štitaste žlezde, materice i jajnika. Nasleđenost mutiranog CDH1 gena uzorkuje hereditarni difuzni karcinom želuca, a žene sa prisutnom mutacijom ovog gena imaju povećan rizik od razvoja invazivnog lobularnog karcinoma dojke. Mutacija STK11 gena dovodi do nastanka Peutz-Jeghers-ovog sindroma. Ovi bolesnici imaju pigmentne mrlje na usnama i oko usta, polipe digestivnog i urinarnog trakta, kao i povećan rizik od nastanka mnogih karcinoma uključujući i karcinom dojke. Gen PALB2 dovodi do sinteze proteina koji reaguje sa proteinom koji je produkovan od strane BRCA2 gena, te mutacije ovog gena povećavaju rizik od nastanka karcinoma dojke (22).

4. Porodična istorija karcinoma dojke – iako manje od 15% pacijentkinja sa karcinomom dojke navodi pozitivnu porodičnu istoriju, pokazano je da prisustvo karcinoma dojke kod srodnika prve linije (sestra, majka i kćerka) udvostručuje mogućnost nastanka ove bolesti.

5. Lična istorija karcinoma dojke – žene koje su imale karcinom jedne dojke imaju povećan rizik od razvoja karcinoma dojke u drugom delu te iste dojke ili u drugoj dojci.

6. Rasa – žene bele rase imaju nešto veći rizik od nastanka karcinoma dojke, dok u grupi žena koje su mlađe od 45 godina češće obolevaju crnkinje.

7. Gusto (denzno) tkivo dojke- osobe ženskog pola kojima se mamografijom dokaže denzno tkivo dojke (veći procenat žlezdanog i fibroznog tkiva i manji procenat masnog tkiva u dojkama) imaju 1,5 do 2 puta veći rizik od nastanka karcinoma dojke u odnosu na žene sa normodenznim dojkama.

8. Benigne bolesti dojke – proliferativne lezije bez atipije (obična duktalna hiperplazija, fibroadenom, sklerozirajuća adenoza, papilomatoza dojke i radijalni ožiljak) neznatno povećavaju rizik za nastanak karcinoma dojke, dok lezije sa atipijom (atipična duktalna i atipična lobularna hiperplazija) povećavaju ovaj rizik za čak 4 do 5 puta u odnosu na žene koje nemaju ove lezije.

9. Hormonalni uticaji – rana menarha (pre 12. godine) i kasna menopauza (posle 55. godine) blago povećavaju rizik od razvoja karcinoma dojke, što se pripisuje najverovatnije produženom uticaju estrogena i progesterona. Takođe, ekspozicija dietilstilbestrolu (lek sličan estrogenu) ima isti efekat.

10. Radijaciona terapija u predelu grudnog koša – povećava opasnost od nastanka karcinoma dojke, ali samo ukoliko je radijacija vršena u mlađoj životnoj dobi (pre 40. godine).

1.3.2. Faktori rizika povezani sa životnim stilom

Konзумiranje alkohola je jasno povezano sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma dojke. Povećani rizik od karcinoma je doznao zavisao, te svakodnevno unošenje 2-3 ili više alkoholnih pića povećava ovaj rizik za oko 20%. Kako masno tkivo proizvodi estrogen, zaključuje se da gojaznost povećava rizik od nastanka karcinoma dojke, što je naročito značajno u menopauzi kada je najveći deo nivoa estrogena porekla iz masnog tkiva (smatra se da ova tvrdnja ne važi za osobe koje su gojazne od detinjstva). Fizička neaktivnost takođe povećava rizik od nastanka karcinoma dojke. Žene koje nisu rađale, prvorođene starije od 30 godina, kao i žene koje nisu dojile imaju povećanu mogućnost obolevanja od ove bolesti, dok trudnoća povećava rizik od razvoja tripl-negativnih karcinoma dojke. Upotreba oralnih kontraceptiva u reproduktivnom dobu kao i upotreba estrogenske terapije u menopauzi povećavaju rizik od ove bolesti.

1.3.3. Faktori rizika sa nejasnim uticajem i kontroverzni faktori rizika za nastanak karcinoma dojke

Ishrana bogata životinjskim mastima, pušenje cigareta, kao i rad u noćnim smenama spadaju u faktore koji su najverovatnije povezani sa nešto većom mogućnošću za razvoj karcinoma dojke, međutim njihov uticaj nije jasno naučno potvrđen. No, postoje studije koje ukazuju da žene pušači, naročito one koje puše u mlađoj životnoj dobi, pre menopauze, imaju veći rizik za pojavu raka dojke. Ishrana obogaćena voćem i povrćem smanjuje rizik od pojave karcinoma dojke (22, 26, 27). Kontroverzni faktori, za koje ne postoji naučna potpora povećanom riziku od nastanka karcinoma dojke, ali koji eventualno potkrepljuju ovu tvrdnju, jesu: upotreba antiperspirantskih

dezodoranasa, nošenje brushaltera, indukovani abortusi, implanti u dojka. Mehanizam koji ide u prilog pozitivne korelacije ovih faktora i karcinoma dojke jeste opstrukcija protoka limfne cirkulacije (22).

1.4. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI PARAMETRI KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke predstavlja klinički i patološki heterogenu bolest. Postoje brojni pokušaji koji su na osnovu kliničkih i patoloških parametara probali da utvrde prognozu pacijenata obolelih od karcinoma dojke. Kako se kod gotovo trećine pacijenata radi o invazivnom dutalnom karcinomu dojke, ovaj tip tumora dojke je i imao značajan uticaj na laboratorijske, kliničke i patološke studije o karcinomu dojke (28).

Progresija karcinoma dojke je uslovljena različitim prediktivnim i prognostičkim faktorima. Prognostički faktori su kliničke ili biološke karakteristike koje su objektivno merljive i koje pružaju informacije o verovatnom ishodu bolesti netretiranih pacijenata i, u tom smislu, predstavljaju marker značajan za relaps bolesti, dok prediktivni faktori pružaju informacije o mogućoj koristi od tretmana (bilo u smislu preživljavanja ili smanjenja tumora), te se mogu koristiti za identifikaciju subpopulacije pacijenata koji će najverovatnije imati koristi od date terapije (29). Prediktivni faktori zavise od karakteristika samog tumora, kao i karakteristika bolesnika, a njihova identifikacija može pomoći u određivanju najboljeg terapijskog modaliteta za svakog bolesnika individualno, pri čemu je naročito važna identifikacija visokorizične grupe bolesnika.

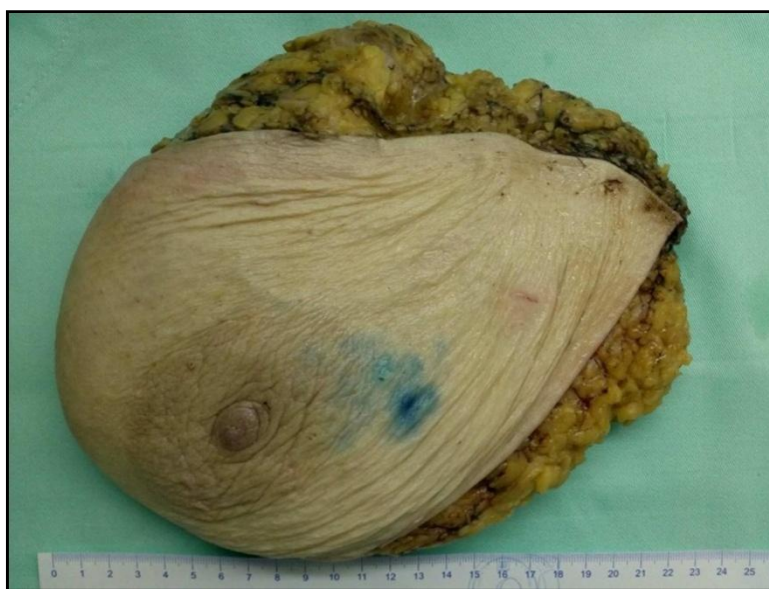
Dakle, u svakodnevnoj praksi ovi faktori služe za stratifikaciju bolesnika u dve grupe: prvu, sa bolesnicima za koje se očekuje da će imati korist od adjuvantne sistemske terapije, u koju su uključeni i bolesnici sa limfonodalnim metastazama, kao i podgrupa bolesnika sa negativnim limfnim nodusima; i drugu, sa bolesnicima kod kojih rizik i troškovi adjuvantne terapije prevazilaze očekivanu korist od iste (30). U tom smislu treba razlikovati ova dva pojma.

U najznačajnije prediktivno-prognostičke parametre karcinoma dojke koji se koriste u rutinskoj kliničkoj praksi spadaju: veličina tumora, histološki podtip tumora, histološki stepen tumorske diferencijacije, nivo ekspresije hormonskih receptora i HER2 receptora, prisustvo

limfovaskularne invazije, kao i status regionalnih limfnih čvorova i prisustvo udaljenih metastaza (31). Govoreći o karcinomu dojke, pojedini faktori su ujedno prognostički i prediktivni, uključujući ER i PR status, kao i HER2 ekspresiju. U prognostičke faktore karcinoma dojke spadaju: histološki tip tumora, broj zahvaćenih limfnih čvorova u trenutku dijagnostikovanja tumora, veličina tumora, histološki gradus, status proliferativnog Ki-67 markera, starosna dob pacijenta i menopauzni status bolesnice (32). Međutim, pobrojani faktori ne zadovoljavaju u potpunosti potrebe za adekvatnom terapijom pojedinca i za predviđanje toka i ishoda bolesti. Usled postojanja molekularnih razlika među tumorima iste vrste, pacijentkinje koje su obolele od karcinoma dojke istih histomorfoloških karakteristika mogu da imaju različit tok bolesti (33).

1.4.1. Veličina tumora

Veličina tumora je jedna od važnijih prognostičkih faktora tumora i predstavlja brzinu rasta tumorske mase u jedinici vremena. Označava najveću dimenziju tumora, pri makroskopskom merenju u najmanje dva pravca (34) (Slika 2, Slika 3).



Slika 2. Makroskopski izgled i veličina amputirane dojke.



Slika 3. Makroskopsko merenje veličine tumorskog čvora u dojci.

Veličina tumora je u direktnoj povezanosti sa verovatnoćom za nastanak regionalnih metastaza, kao i sa brojem zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova (35, 36). Takođe, i broj udaljenih metastaza raste sa povećanjem veličine tumora, te je veličina tumora u direktnoj korelaciji sa verovatnoćom za pojavu relapsa bolesti i smrtni ishod (37). Veličina tumora je pogotovo važna u grupi bolesnica koje nemaju metastatski izmenjene pazušne limfne čvorove. Petogodišnjim praćenjem, u grupi bolesnica sa tumorskim čvorom manjim od 10 milimetara stopa recidiva bila je približno 10%, dok je u grupi bolesnica sa tumorom od 50 milimetara i više ova stopa iznosila 30-50% (38). Za sve tumore koji su veličine 10 milimetara i manji, novije studije su ukazale na potrebu detekcije eventualnog DCIS, rasprostranjenosti te in situ komponente tumora, kao i njen histološki gradus (HG). Zaključeno je da invazivni tumor udružen sa ekstenzivnom DCIS gradusa III komponentom ima lošiju prognozu od istih tumora bez komponente DCIS ili sa DCIS gradusa I (39). Govoreći o multifokalnim tumorima dojke, još uvek ne postoje jasni dokazi da li prognoza korelira sa promerom najvećeg žarišta ili zavisi od ukupne veličine svih žarišta. Prema jednoj studiji, promer najvećeg žarišta je najpouzdanija mera za određivanje stadijuma bolesti, ali je prognoza multifokalnih tumora ipak lošija od unifokalnih tumora sličnih dimenzija jer su učestalije pazušne metastaze (40).

Veličina tumora predstavlja prediktivni faktor za status aksilarnih limfnih čvorova, ali i nezavisan prognostički faktor kod pacijenata sa negativnim statusom limfnih čvorova. Rutinski se koristi prilikom selekcije bolesnica koje su kandidatkinje za primenu adjuvantne sistemske terapije. Pri postojanju negativnih aksilarnih limfnih čvorova i tumora veličine 10 mm ili manje, identifikuje se grupa bolesnica koje imaju najpovoljniju prognozu bolesti i koje ne bi imale značajne koristi od primene adjuvantne sistemske terapije (41). Međutim, u grupi bolesnica sa tumorom veličine 10-20 mm uvek treba pažljivo razmotriti primenu adjuvantne terapije, jer kod njih u preko 20% slučajeva postoji rizik za pojavu udaljenih metastaza (42). U slučaju pozitivnog statusa limfnih čvorova pazušne jame, veličina tumora nije nezavisan parametar prognoze (43).

1.4.2. Histološki tip tumora

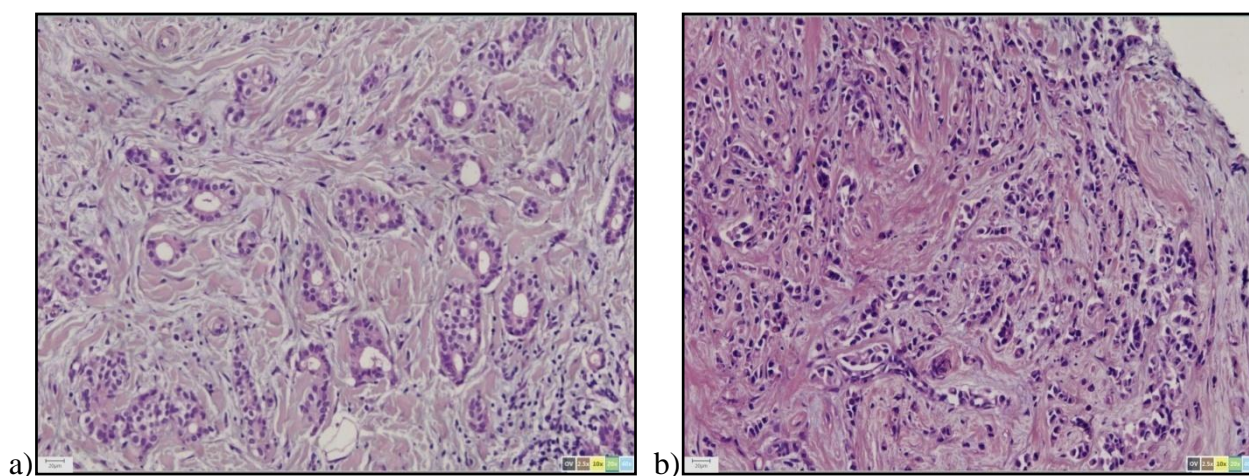
Kada se govori o tumoru dojke, prećutno se podrazumeva da se radi o invazivnom tumoru. Kao i u svim organima, i u dojci se razvijaju i neinvazivni (in situ) tumori, tj. tumori čiji rast i proliferativni ćelijski potencijal nije narušio integritet bazalne membrane. Neki od histoloških tipova invazivnih karcinoma dojke su prikazani na Slici 4, Slici 5 i Slici 6.

Prema histološkom tipu, godine 2012. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) vrši određene izmene u postojećoj, i predlaže sledeću podelu invazivnih karcinoma dojke (44):

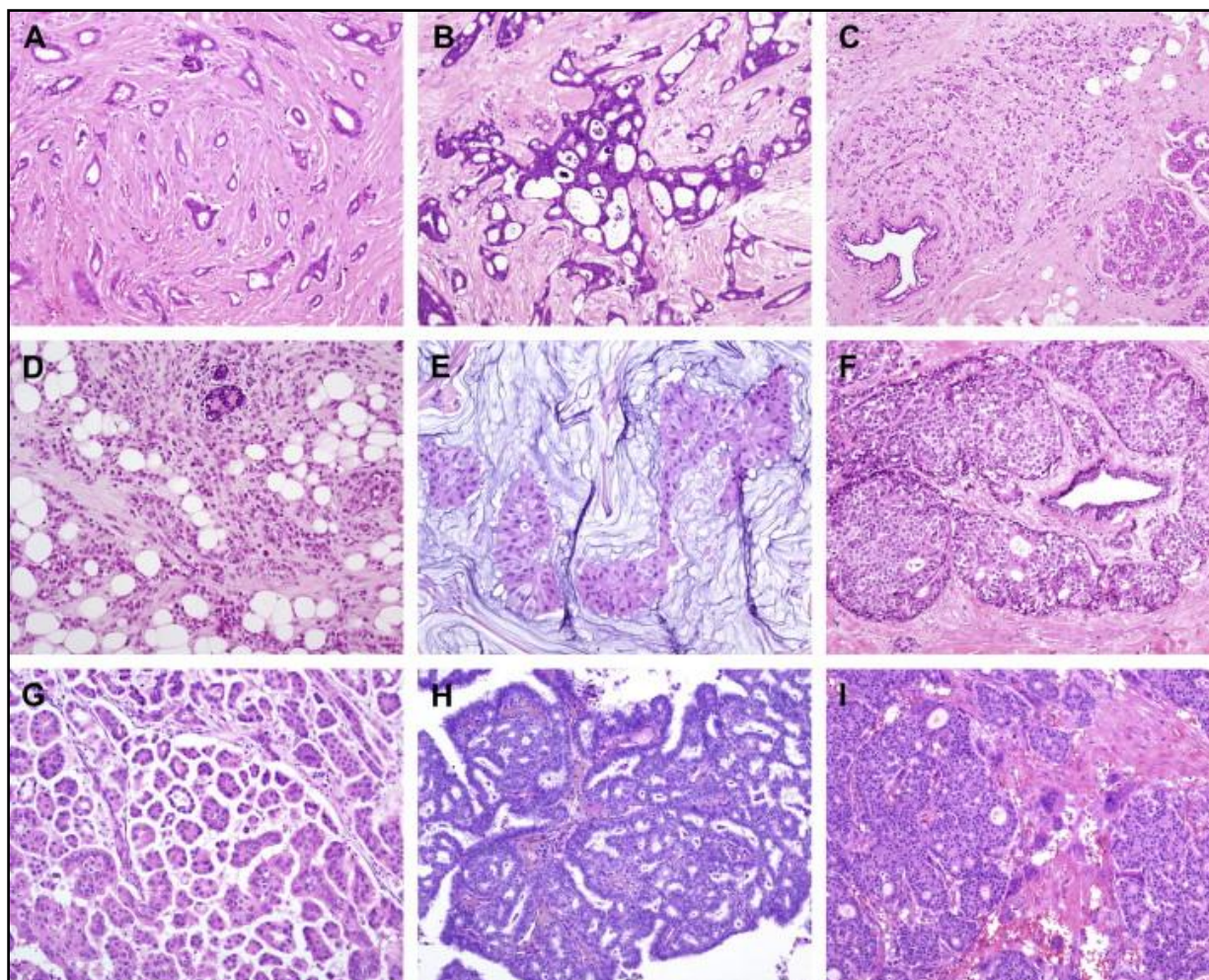
1. Invazivni karcinom, neodređenog specijalnog ćelijskog tipa (no special type- NST)
 - Pleomorfni karcinom
 - Karcinom sa stromalnom džinovsko-ćelijskom reakcijom izgleda osteoklasta
 - Karcinom sa karakteristikama horiokarcinoma
 - Karcinom sa melanotičnim karakteristikama
2. Invazivni lobularni karcinom
 - Klasični lobularni karcinom
 - Solidni lobularni karcinom
 - Alveolarni lobularni karcinom
 - Pleomorfni lobularni karcinom
 - Tubulolobularni karcinom
 - Mešoviti lobularni karcinom

3. Tubularni karcinom
4. Kribiformni karcinom
5. Mucinozni karcinom
6. Karcinom sa medularnim karakteristikama
 - Medularni karcinom
 - Atipični medularni karcinom
 - Invazivni karcinom “NST” sa medularnim karakteristikama
7. Karcinom sa apokrinom diferencijacijom
8. Karcinom sa ćelijama izgleda prstena pečatnjaka (“signet ring” diferencijacija)
9. Invazivni mikropapilarni karcinom
10. Metaplastični karcinom “NST”
 - Niskogradusni (low-grade) adenoskvamozni karcinom
 - Metaplastični karcinom izgleda fibromatoze
 - Karcinom skvamoznih ćelija
 - Vretenastoćelijski karcinom
 - Metaplastični karcinom sa mezenhimalnom diferencijacijom
 - Hrskavičava diferencijacija
 - Koštana diferencijacija
 - Drugi tipovi mezenhimalne diferencijacije
 - Mioepitelni karcinom
11. Retki tipovi
 - Karcinom sa neuroendokrinim karakteristikama
 - Neuroendokrini tumor, dobro diferentovan
 - Neuroendokrini karcinom, slabo diferentovan (sitnoćelijski karcinom)
 - Karcinom sa neuroendokrinom diferencijacijom
 - Sekretorni karcinom
 - Invazivni papilarni karcinom
 - Karcinom seroznih ćelija
 - Mukoepidermoidni karcinom
 - Polimorfni karcinom
 - Onkocitni karcinom

- Karcinom bogat mastima
- Svetloćelijski karcinom bogat glikogenom
- Sebacealni karcinom
- Tumori tipa pljuvačne žlezde / adneksa kože
 - Cilindrom
 - Svetloćelijski hidradenom

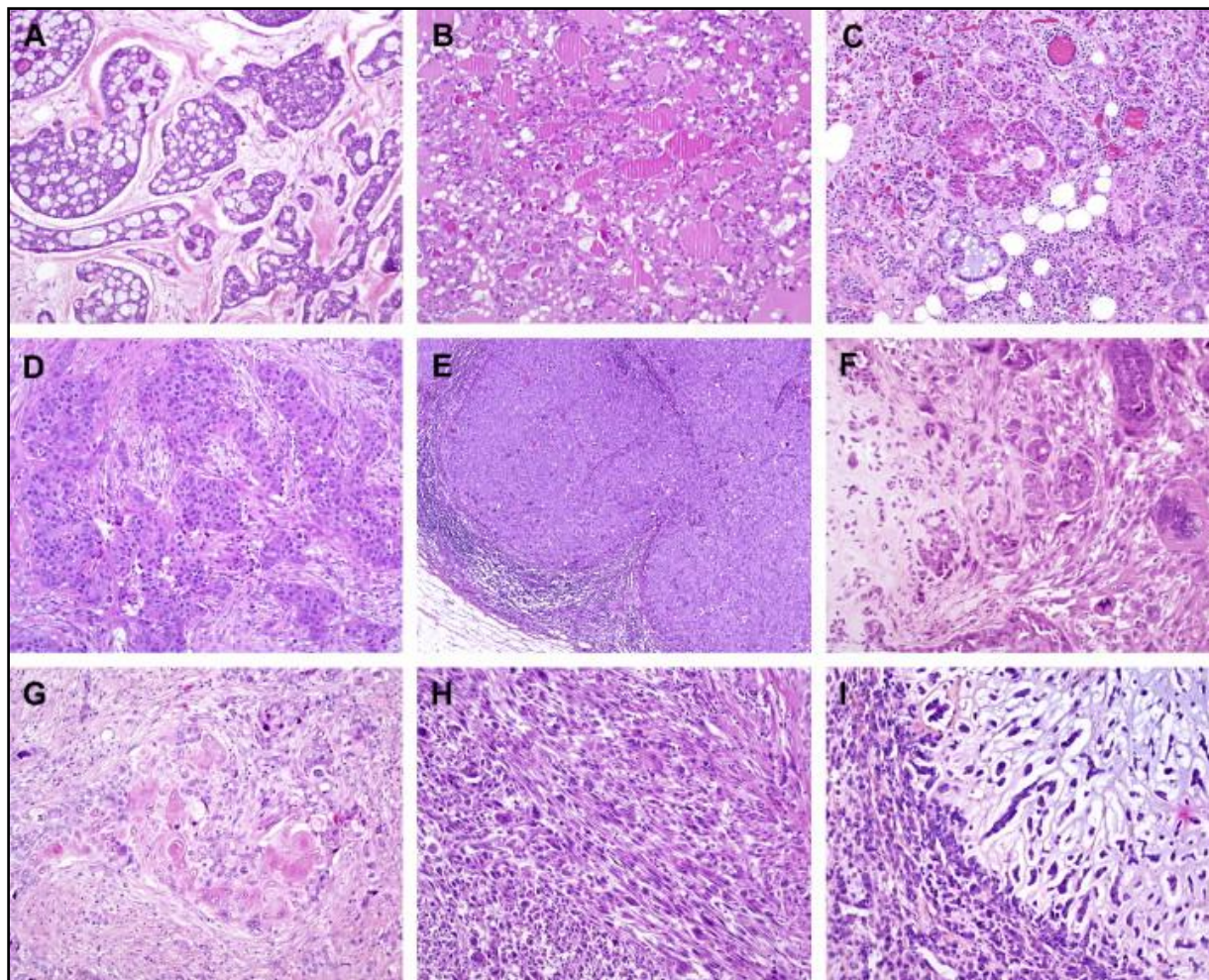


Slika 4. Najčešći histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke: a) invazivni duktalni karcinom NST, HE, 20x; b) invazivni lobularni karcinom dojke, HE, 20x.



Slika 5. Specijalni histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke sa predominantno pozitivnim hormonskim receptorima: a) tubularni karcinom, b) kribriformni karcinom, c) klasični invazivni lobularni karcinom, d) pleomorfni invazivni lobularni karcinom, e) mucinozni karcinom, f) neuroendokrini karcinom, g) mikropapilarni karcinom, h) papilarni karcinom, i) niskogradusni invazivni duktalni karcinom sa džinovsko-ćelijskom reakcijom izgleda osteoklasta.

(Preuzeto iz: Weigelt B, Geyer FC, Reis-filho JS. Histological types of breast cancer : How special are they ? Mol Oncol [Internet]. 2010;4(3):192–208.)



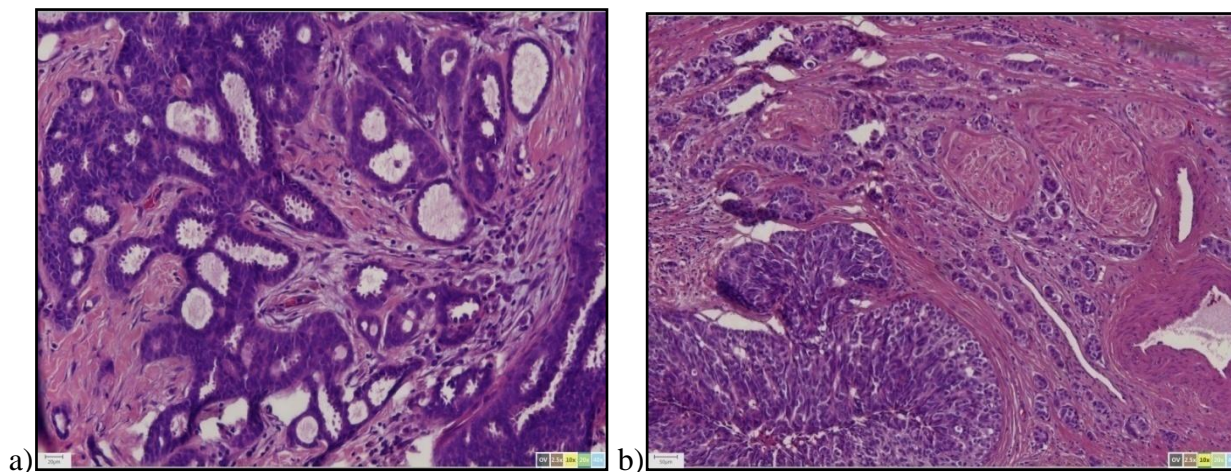
Slika 6. Specijalni histološki tipovi invazivnih karcinoma dojke sa predominantno negativnim hormonskim receptorima: a) adenoid cistični karcinom, b) sekretorni karcinom, c) serozni karcinom, d) apokrini karcinom, e) medularni karcinom, f) metaplastični karcinom sa heterolognim elementima, g) metaplastični karcinom sa skvamoznom metaplazijom, h) metaplastični vretenastoćelijski karcinom, i) metaplastični matriks-produkujući karcinom.

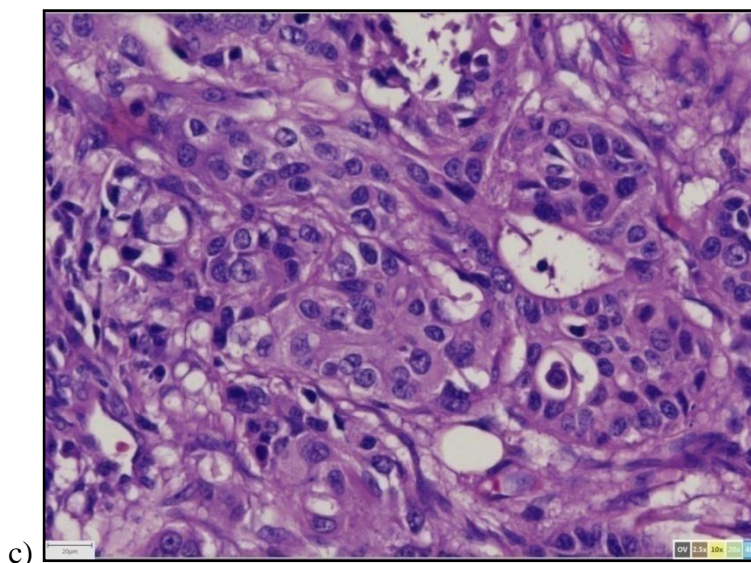
(Preuzeto iz: Weigelt B, Geyer FC, Reis-filho JS. Histological types of breast cancer : How special are they ? Mol Oncol [Internet]. 2010;4(3):192–208.)

Histološki tip tumora je jedan od osnovnih prognostičkih faktora karcinoma dojke. Najveći broj (do 75%) invazivnih karcinoma dojke pripada invazivnom duktalnom karcinomu neodređenog specijalnog ćelijskog tipa (no special type- NST). Specifični tumori, kao što su tubularni, kribriformni, medularni, papilarni i mucinozni infiltrativni karcinom, imaju veoma dobru prognozu, sa desetogodišnjim preživljavanjem od preko 80% (45).

1.4.3. Histološki gradus karcinoma

Histološki gradus predstavlja jednostavan i prilično precizan morfološki kriterijum koji prikazuje stepen tumorske diferentovanosti, odnosno stepen morfološke sličnosti tumora sa normalnim tkivom. Iako se ovaj parametar još početkom dvadesetog veka prepoznao kao značajan, danas se najčešće koristi Nottingham sistem gradiranja (46) koji predstavlja Elston-Ellis modifikaciju Scarff-Bloom-Richardson sistema gradiranja (47). Nottingham sistem gradiranja (NGS) se odnosi na semikvantitativnu procenu tri morfološke karakteristike tumora, i to: formiranje tubula, jedarni pleomorfizam i mitotsku aktivnost (mera proliferacije), i veoma je jednostavna i jeftina metoda koja zahteva samo hematoksilin-eozin (HE) pripremljen preparat uz iskusnog patologa. Svaka od navedene tri tumorske karakteristike se boduje sa 1, 2 ili 3, i krajnji zbir čini Nottingham skor koji ukazuje na stepen diferentovanosti karcinoma dojke (48) (Slika 7).





Slika 7. Stepen diferentovanosti tumora: a) dobro diferentovani invazivni duktalni karcinom dojke, G1, HE, 20x; b) srednje diferentovani invazivni duktalni karcinom dojke, G2, HE, 10x; c) slabo diferentovani invazivni duktalni karcinom dojke, G3, HE, 40x.

Formiranje tubula: Tubuli čine većinu tumorske mase (>75 %) – bod 1

Tubuli čine umeren deo tumorske mase (10-75 %) – bod 2

Tubuli čine mali deo tumorske mase ili ih nema (<10 %) – bod 3

Jedarni pleomorfizam: Male, pravilne uniformne ćelije – bod 1

Ćelije umereno uvećane i pleomorfne – bod 2

Izražen pleomorfizam – bod 3

Mitotska aktivnost: 0-9 mitoz / 10 HPF – bod 1

10-19 mitoz / 10 HPF – bod 2

>20 mitoz / 10 HPF – bod 3

Nottingham score 3-5 → Gradus 1 (dobro diferentovan tumor)

6-7 → Gradus 2 (umereno, srednje diferentovan tumor)

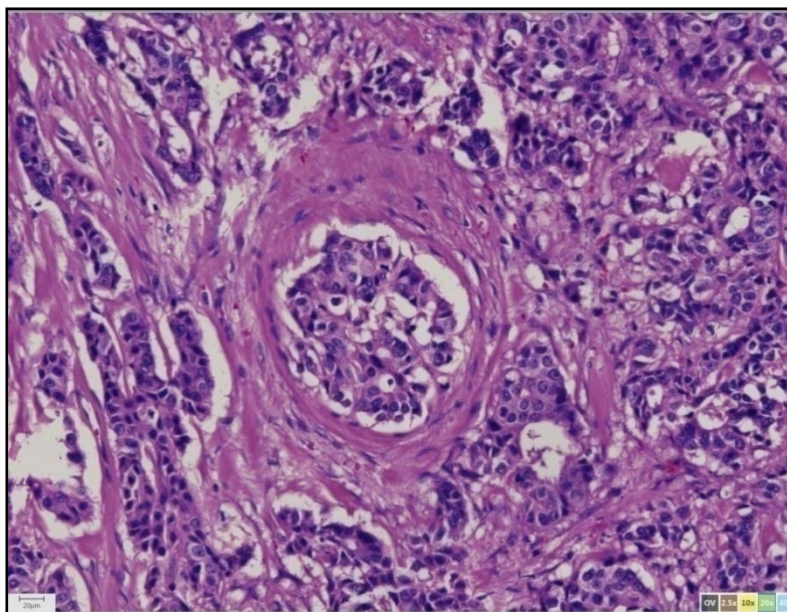
8-9 → Gradus 3 (slabo diferentovan tumor)

Određivanje histološkog gradusa je značajan prognostički faktor jer su ranije studije pokazale da oko 75% bolesnica obolelih od dobro diferentovanog tumora preživi petogodišnji period, a deset

godina preživi 47% bolesnica. Sa umereno diferentovanim tumorima (gradus 2), pet godina preživi 53% bolesnica, a deset godina 27% bolesnica. Iz grupa bolesnica sa slabo diferentovanim tumorom (gradus 3) pet godina preživi 31%, a deset godina 18% bolesnica (47).

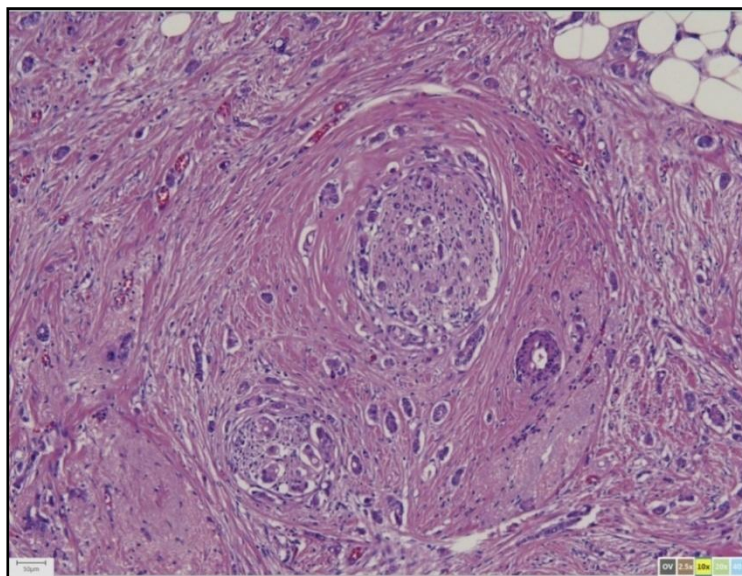
1.4.4. Limfovaskularna i perineuralna invazija

Limfovaskularna invazija označava prodor tumorskih ćelija u lumen arterije ili vene i skoro uvek je prisutna i koegzistirajuća limfna invazija (Slika 8). Za razliku od vaskularnih prostora, zid limfnog suda je obložen endotelom bez niželežeg glatkomišićnog sloja i elastične lamine. Takođe, u lumenu limfnog suda nisu prisutni eritrociti, pa je često veoma teško razlikovati invaziju ovih struktura od praznih prostora (artefakti usled retrakcije tkiva) koji se formiraju oko malih grupa tumorskih ćelija (28). Iako kvantifikacija limfovaskularne invazije (LVI) nije standardizovana, generalno gledano, ona je pouzdan prediktor metastatskih depozita u limfnim čvorovima pazušne jame. Još davne 1992. godine, objavljena je studija koja je pokazala da oko 10% pacijenata bez LVI ima metastaze u limfnim čvorovima pazušne jame, odnosno 52% pacijenata kod kojih je potvrđena LVI.



Slika 8. Limfovaskularna invazija karcinoma dojke, HE, 20x.

Perineuralna invazija označava invaziju tumorskih ćelija oko i unutar nervnih vlakana i nije parametar koji se često detaljno posmatra u karcinomima dojke, najverovatnije što se u tkivu dojke ne nalaze nervi značajnijeg kalibra kao što je to u prostatičnom ili pankreatičnom tkivu. Perineuralna invazija je prisutna u oko 1% invazivnih karcinoma dojke (50) (Slika 9).

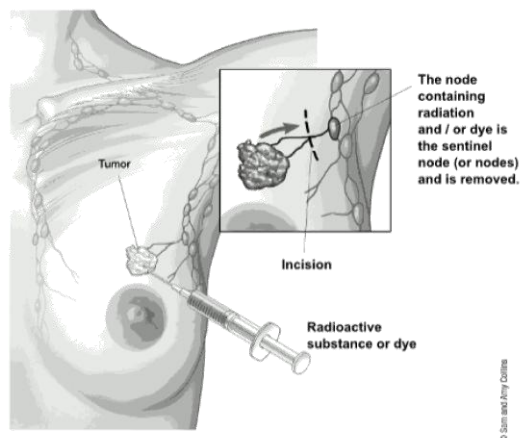


Slika 9. Perineuralna invazija karcinoma dojke, HE, 10x.

1.4.5. Status regionalnih limfnih čvorova i udaljenih metastaza

Pojedinačno posmatrano, status regionalnih limfnih čvorova je jedan od važnijih prognostičkih faktora za bolesnice sa karcinomom dojke (39, 51). Brojne studije pokazale su da bolesnice sa histološki potvrđenim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima imaju signifikantno lošiju prognozu od onih bez nodalnog zahvatanja. Prosečno desetogodišnje preživljavanje za bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima iznosi 75%, u poređenju sa 25-30% za one sa limfonodalnom diseminacijom (52). Broj metastatski izmenjenih limfnih čvorova je takođe značajan za prognozu bolesti, te je u prognostičke i terapijske svrhe sačinjena podela na grupu do tri pozitivna čvora i grupu sa više od tri pozitivna čvora (53). Široko rasprostranjen princip procene limfonodalnog statusa na osnovu pregleda sentinel limfnog nodusa (limfni čvor „stražar“) doveo je do značajne redukcije disekcija aksila i, samim tim, postoperativnih komplikacija (51, 54). „Sentinel lymph node“ je procedura koja se sastoji od ubrizgavanja plave boje i/ili radioizotopa u tkivo dojke, u

cilju identifikacije prvog limfnog čvora (sentinel nodusa) koji drenira limfu u aksilu iz peritumorskog područja, i u kojem će se prvo pojaviti metastaze ukoliko je došlo do propagacije bolesti (Slika 10).



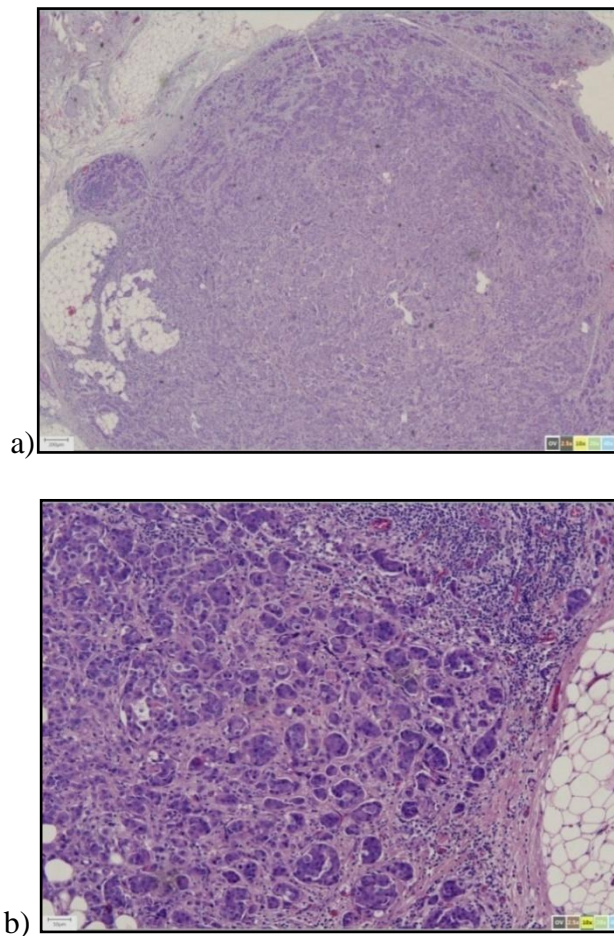
Slika 10. Mapiranje sentinel limfnog čvora tumora dojke.

(Preuzeto iz: h American Cancer Society; *Breast Cancer, Treatment, Surgery for breast cancer, Lymph node surgery for breast cancer.* American Cancer Society, Atlanta, Georgia 2015.)

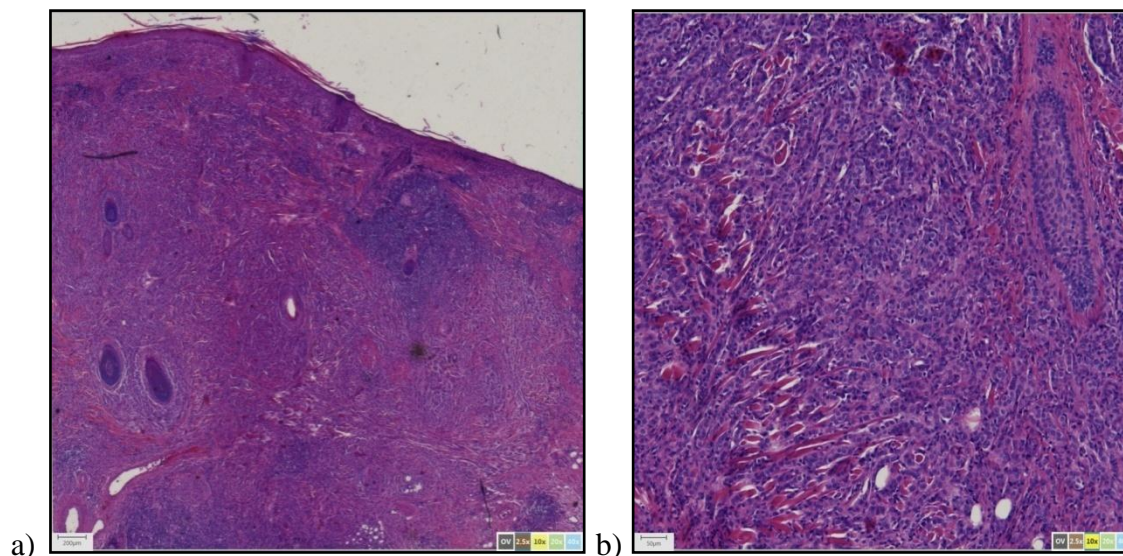
U slučaju negativnog sentinel limfnog čvora, sa velikom verovatnoćom se može tvrditi da preostali limfni nodusi ne sadrže metastatske depozite, te se izbegava ekscizija istih (54). Stopa lažno negativnih rezultata je veoma mala i bilo kakav efekat na preživljavanje nije ustanovljen. Međutim, kod 10-20% bolesnica sa negativnim nalazom sentinel limfnog čvora, posle pregleda konvencionalnom metodom sa serijskim sečenjem parafinskog kalupa, tumorske ćelije se ipak detektuju. Tada se govori o mikrometastazama. Veličina metastatskih depozita u limfnom čvoru definiše se kao izolovane tumorske ćelije (ITC, ako su metastaze $\leq 0,2$ mm), mikrometastaze (veličina $>0,2$ mm, a ≤ 2 mm) i makrometastaze (veličina >2 mm). Objavljene studije ukazale su da je prisustvo mikrometastaza udruženo sa malim ali značajnim smanjenjem perioda preživljavanja, te je neophodna detaljna i pažljiva analiza sentinel limfnog čvora (51) (Slika 11).

Dokazano je da su udaljene metastaze najznačajniji prognostički faktor (39). Hematogenom diseminacijom nastaju generalizovane metastaze karcinoma dojke u kosti, pluća, jetru, jajnike, nadbubrežne žlezde, pleuru, kožu i druga mesta (Slika 12). Najčešće zahvaćene kosti su rebra, kosti lobanje, kičmeni pršljenovi, humerus i klavikula. Koštane metastaze su najčešće

osteolitičkog tipa, dok su u oko 10% slučajeva osteoblastičnog tipa. Detekcija koštanih metastaza kaudalno od lumbosakralnog zgloba smarta se predznakom visceralnih metastaza (55).



Slika 11. Metastaza karcinoma dojke u limfnom čvoru, HE: a) 2,5x; b)10x.



Slika 12. Metastaza karcinoma dojke u kožu poglavine, HE: a) 2,5x; b)10x.

1.4.6. Određivanje stadijuma tumorske bolesti

U cilju procene prognoze bolesti, kao i izbora najoptimalnijeg terapijskog modaliteta, a u zavisnosti od proširenosti bolesti, neophodno je bolesnice svrstati u određene grupe, odnosno odrediti stadijum bolesti (Tabela 1.1.). Način za određivanje stadijuma bolesti je predstavljen još davne 1954. godine, nakon čega su sledile brojne remodelacije, a danas je u upotrebi sedmo izdanje TNM klasifikacije. TNM klasifikacija uključuje veličinu primarnog tumora (T), proširenost tumora u regionalne limfne čvorove (N) i udaljene metastaze (M) (56, 57).

TNM klasifikacija tumora dojke (58):

T - primarni tumor:

TX - primarni tumor se ne može odrediti

T0 - primarni tumor nije dokazan

Tis - karcinom in situ

T1 - tumor \leq 20 mm: T1mi: tumor \leq 1 mm

T1a: tumor $>$ 1 mm, ali jednak ili manji od 5 mm

T1b: tumor $>$ 5 mm, ali jednak ili manji od 10 mm

T1c: tumor $>$ 10 mm, ali jednak ili manji od 20 mm

T2 - tumor $>$ od 20 mm, ali jednak ili manji od 50 mm

T3 - tumor > 50 mm

T4 - tumor bilo koje veličine sa direktnim širenjem na zid grudnog koša ili kožu

T4a: širenje u zid grudnog koša

T4b: ulceracija kože dojke, istostrani satelitski čvorovi u koži ili edem kože (uključujući peau d'orange)

T4c: 4a i 4b

T4d: inflamatorni karcinom

Klinička klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (N):

NX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (npr. prethodno su uklonjeni);

N0 - regionalni limfni čvor bez metastaze;

N1 - metastaza u pokretnom istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II;

N2 - metastaze u istostranom aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima nivoa I i II, klinički fiksirani ili sliveni ili klinički evidentnom istostranom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima;

N2a - metastaze u aksilarnom limfnom čvoru/čvorovima fiksirane međusobno (slivene) ili za druge strukture;

N2b - metastaze samo u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) u odsustvu klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima;

N3 - metastaze u istostranom infraklavikularnom (nivo III aksile) limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja limfnih čvorova nivoa I i II aksile ili u klinički evidentnom limfnom čvoru/čvorovima oko arterije mamarije interne (ili unutrašnje mamarne arterije) sa klinički evidentnim metastazama u aksilarnim limfnim čvorovima ili metastaza u istostranom supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima sa ili bez zahvatanja aksilarnih ili limfnih čvorova oko arterije mamarije interne;

N3a - metastaze u infraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima;

N3b - metastaze u limfnom čvoru/čvorovima aksile ili oko arterije mamarije interne;

N3c - metastaze u supraklavikularnom limfnom čvoru/čvorovima.

Patohistološka klasifikacija regionalnih limfnih čvorova (pN):

pNX - regionalni limfni čvorovi se ne mogu proceniti (nisu uklonjeni radi ispitivanja ili su prethodno uklonjeni);

pN0 - regionalni limfni čvor bez metastaze;

pN1 - mikrometastaze ili metastaza u 1 do 3 istostrana aksilarna limfna čvora, odnosno istostranim unutrašnjim čvorovima dojke sa metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, 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 čvora, uključujući bar jedan čija najveća dimenzija prelazi 2 mm;

pN1b - unutrašnji limfni čvorovi dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, ali koja klinički nije očigledna;

pN1c - metastaza u 1 do 3 limfna čvora, a unutrašnji limfni čvorovi dojke sadrže mikroskopsku metastazu otkrivenu disekcijom stražarskog limfnog čvora, koja nije klinički očigledna;

pN2 - metastaze u 4-9 istostranih aksilarnih limfnih čvorova, ili klinički očigledan limfni čvor duž mamarije interne u odsustvu aksilarnih limfonodalnih metastaza;

pN2a - metastaza u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova, uključujući bar jedan koji je veći od 2 mm;

pN2b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima dojke, u odsustvu metastaze aksilarnog limfnog čvora;

pN3 - metastaze opisane kao:

pN3a - metastaza u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova (od kojih je bar jedan veći od 2 mm) ili metastaza u infraklavikularnim limfnim čvorovima;

pN3b - metastaza u klinički očiglednom unutrašnjem limfnom čvoru/čvorovima dojke u prisustvu pozitivnog aksilarnog limfnog čvora/čvorova ili metastaza u više od 3 aksilarna limfna čvora i u unutrašnjim limfnim čvorovima dojke sa mikroskopskom metastazom otkrivenom disekcijom stražarskog limfnog čvora, a koja nije klinički očigledna;

pN3c - metastaza u supraklavikularnom limfnom čvoru (čvorovima).

M - udaljene metastaze:

MX - postojanje udaljenih metastaza ne može se odrediti;

M0 - nema udaljenih metastaza;

M1 - udaljene metastaze.

Tabela 1.1. Anatomski stadijumi/prognostičke grupe karcinoma dojke.

Anatomski stadijum / Prognostičke grupe

Stadijum bolesti

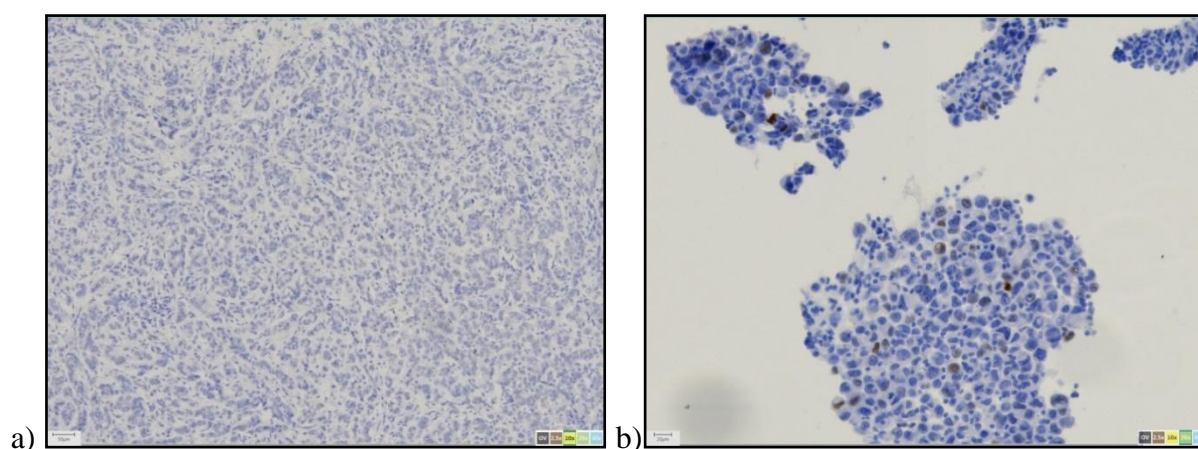
0	Tis	N0	M0
I	T1*	N0	M0
	T0	N1	M0
IIA	T1*	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
IIIA	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	svaki T	N3	M0
IV	svaki T	svaki N	M1

* uključuje i T1mi

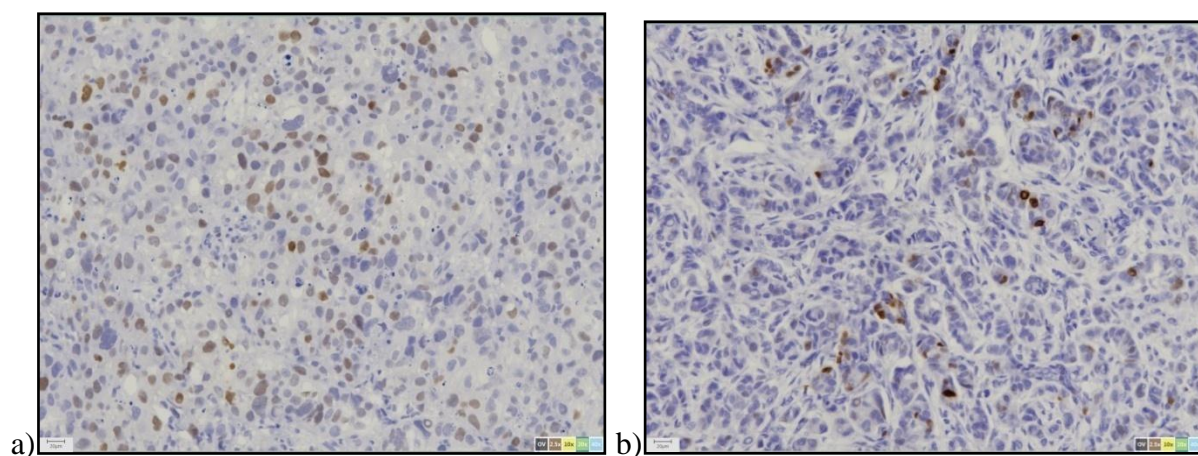
1.4.7. Ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora

U predikciji odgovora na planiranu hormonsku terapiju najveći značaj ima određivanje hormonskog receptorskog statusa tumora dojke (ER i PR), te predstavlja krucijalni element svakog patohistološkog izveštaja za karcinom dojke, uz preporuku za rutinsku analizu u svakom primarnom karcinomu u dojci (59).

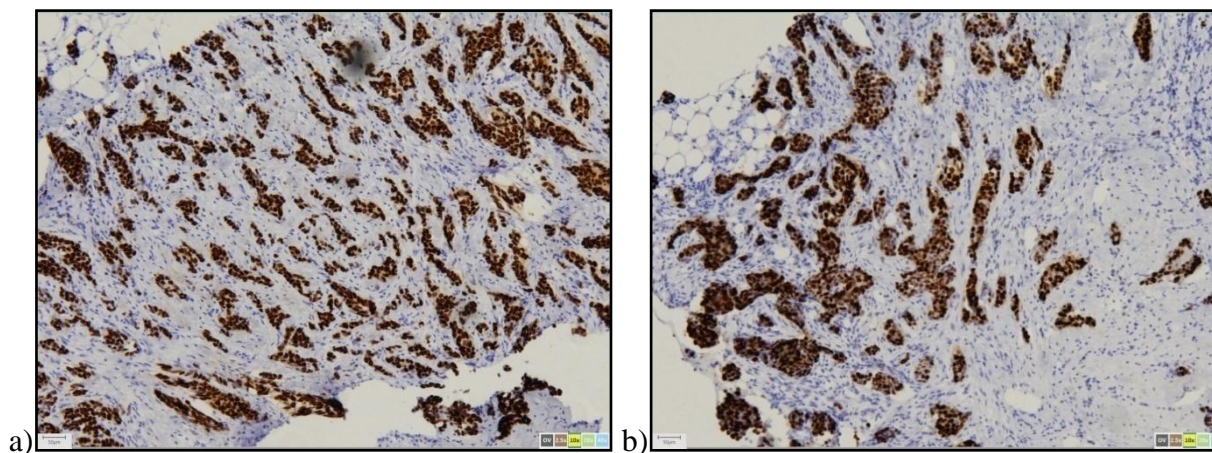
Većina karcinoma dojke je hormonski pozitivno (najpribližnije oko 75%), pri čemu je nešto veći broj ER pozitivnih tumora u odnosu na PR pozitivne tumore dojke (Slika 13, Slika 14 i Slika 15).



Slika 13. Hormon-receptorska negativnost karcinoma dojke: a) ER, 10x; b) PR, 20x.



Slika 14. Hormon-receptorska slaba pozitivnost karcinoma dojke: a) ER, 20x; b) PR, 20x.



Slika 15. Hormon-receptorska izrazita (jaka) pozitivnost karcinoma dojke: a) ER, 10x; b) PR, 10x.

Oko 50% svih invazivnih karcinoma dojke koji su ER pozitivni, takođe su i PR pozitivni, dok je oko 25% ER pozitivno, a PR negativno, i oko 20% invazivnih tumora dojke su i ER i PR negativni (60, 61, 62). Estrogenska negativnost uz PR pozitivnost je izuzetno retka, te je potrebno ponoviti testiranje. Dobro diferentovani tumori dojke su obično uvek ER i PR pozitivni, kao i većina srednje diferentovanih tumora. Ekspresija ER/PR (naročito ER) su relativno slabi prognostički faktori, ali su značajni prediktivni faktori koji ukazuju na efikasnost adjuvantne hormonske terapije (tamoksifen ili inhibitori aromataza). Pacijentkinje sa pozitivnim statusom ER u tumoru imaju duži interval do pojave recidiva bolesti nakon primarne terapije, duže preživljavanje nakon pojave recidiva, kao i značajno bolje ukupno preživljavanje, u poređenju sa pacijentkinjama koje imaju tumore sa negativnim ER statusom. Tumori koji pored ER eksprimiraju i PR receptor, u oko 75-80% slučajeva imaju benefit od neke vrste adjuvantne hormonske terapije (35). Značaj PR kao nezavisnog prognostičkog faktora je vrlo mala, jer je progesteronski receptor protein čija je sinteza pod kontrolom estrogenskih receptora. Međutim, oko 5% karcinoma dojke su ER negativni, a PR pozitivni, što se može objasniti ili lažno negativnim rezultatom u određivanju ER ili time da sinteza PR ipak može biti indukovana nezavisno od estrogenskih receptora (63). Dosadašnja literatura daje podatak da je oko 50-80% primarnih karcinoma dojke ER i PR pozitivno, te imaju i relativno dobar odgovor na primenjenu hormonsku terapiju (50-75%). Nasuprot tome, ER i PR negativni tumori dojke reaguju na hormonsku terapiju u manje od 10% slučajeva, te se spram iznetih stavki antiestrogenska terapija

gotovo nikada i ne koristi (64, 65). Međutim, usled razvoja de novo rezistencije, ne dolazi do pozitivnog odgovora na terapiju kod svih karcinoma dojke pozitivnih na hormonske receptore, kao što se dešava i da kod određenog broja pacijentkinja koje su reagovala na primenjenu endokrinu terapiju dolazi do progresije bolesti ili recidiva (stečena rezistencija). Uprkos tome što endokrina terapija smanjuje rizik za pojavu recidiva bolesti, 28% pacijentkinja sa luminal A i 43% pacijentkinja sa luminal B podtipom karcinoma dojke steći će rezistenciju na lek i razviti udaljene metastaze unutar 15 godina od početka terapije (66, 67, 68).

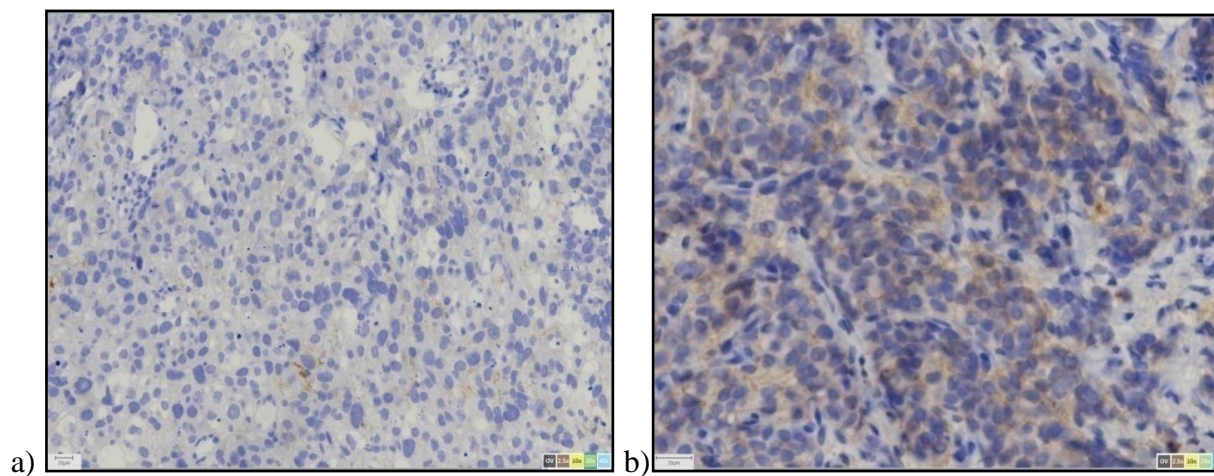
Ekspresija receptora ER i PR se analizira kao nuklearna imunoreaktivnost prilikom reagovanja sa odgovarajućim antitelima i vrednuje se kao procentualna zastupljenost pozitivnih ćelija ili kao kombinacija intenziteta i procenta imunoreaktivnih ćelija (H-skor ili pojednostavljeni Allred skor). Mnogo češće se upotrebljava Allred skor (28).

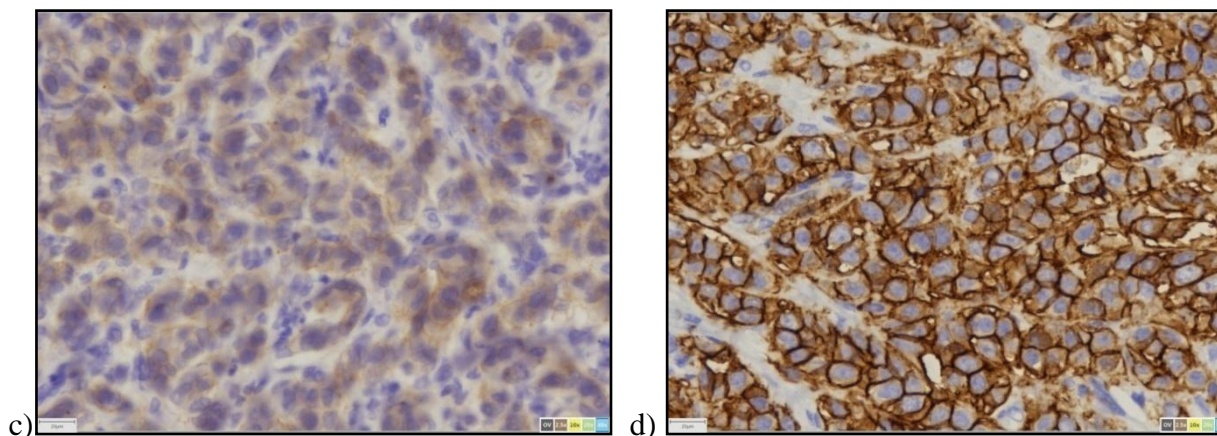
Značajno je napomenuti da je ER izrazito labilan protein, i za tačnost rezultata, pre svega, neophodna je blagovremena tkivna fiksacija (69, 70).

1.4.8. Ekspresija HER2 receptora

Karcinom dojke je rezultat genetskih alteracija koje su nasledene ili stečene, a rast i preživljavanje karcinomskih ćelija su uslovljeni takvim promenama, pa su upravo te promene i terapijski cilj. Dostupni literaturni podaci navode postojanje četiri HER membranska receptora (*human epidermal growth factor*): HER1/EGFR, HER2, HER3 i HER4. Svaki se sastoji iz tri dela: ekstracelularno područje za koje se ligand vezuje, deo u kome se receptor vezuje za ćelijsku membranu i intracelularni deo koji ima aktivnost tirozin kinaze. U inaktivnom stanju HER receptori su monomeri, međutim, vezivanjem liganda dolazi do aktivacije receptora i njihove homo i heterodimerizacije, uz aktivaciju enzima tirozin kinaze. Opisana reakcija rezultira aktivacijom kaskadnog mehanizma biohemijskih promena u samoj ćeliji, što dovodi do ćelijske proliferacije, apoptoze, angiogeneze, promena u adhezivnosti i motilitetu ćelija (71, 72). Poremećajem bilo koje od faza ovog mehanizma dolazi do prekomerne ćelijske proliferacije, migracije i metastaziranja (72). Amplifikacija HER2 onkogen (c-erbB-2) je najvažniji primer stečene molekularne alteracije koja promovise rast i preživljavanje ćelija karcinoma, a lokalizovan je na lokusu 17q21 (28). Glavni klinički razlog određivanja HER2 receptorskog statusa jeste selekcija bolesnica sa karcinomom dojke koje bi imale benefit od terapije

monoklinalnim atitelom na HER2 receptor- trastuzamabom (Herceptin). Zbog dokazane efikasnosti pomenute terapije kod HER2 pozitivnih karcinoma dojke, HER2 receptorski status je značajan prognostički faktor i uveden je u rutinsku paletu markera za primarne karcinome dojke, zajedno sa ER i PR (73). Oko 20% svih invazivnih karcinoma dojke pokazuje HER2 ekspresiju. Amplifikacija HER2 gena predstavlja loš prognostički marker, njegova ekspresija je povezana sa lošim tokom i ishodom bolesti ukoliko se ne primeni hemioterapija, bez obzira na status regionalnih limfnih čvorova, veličinu tumora, histološki gradus i ekspresiju ER i PR. Takođe je povezan sa većom učestalošću metastaza, skraćenjem vremena do pojave recidiva bolesti, kao i kraćim ukupnim preživljavanjem bolesnica (74, 75, 76). Dve najčešće metode HER2 analize su imunohistohemijska metoda i fluorescentna in situ hibridizacija (FISH). Nakon imunohistohemijske metode, dobijena reakcija se ocenjuje skorom 0, 1+, 2+ ili 3+, pri čemu skor 0 i 1+ označavaju negativnu reakciju, 3+ označava jasno pozitivnu reakciju, dok skor 2+ označava inkonkluzivnu reakciju, te je u ovom slučaju neophodno dodatno FISH testiranje (Slika 16). Zbog tumorske heterogenosti, neophodno je imati na umu da više od 5%, a manje od 50% invazivnih karcinoma dojke pokazuje nekonstantan nalaz intratumorske HER2 ekspresije (77).





Slika 16. HER2 receptorska ekspresija: a) nema ekspresije, skor je nula, 20x;

b) skor je 1+ 40x; c) skor je 2+, 40x; d) skor je 3+, 40x.

1.4.9. PROLIFERATIVNI INDEKS KI-67 (MIB-1)

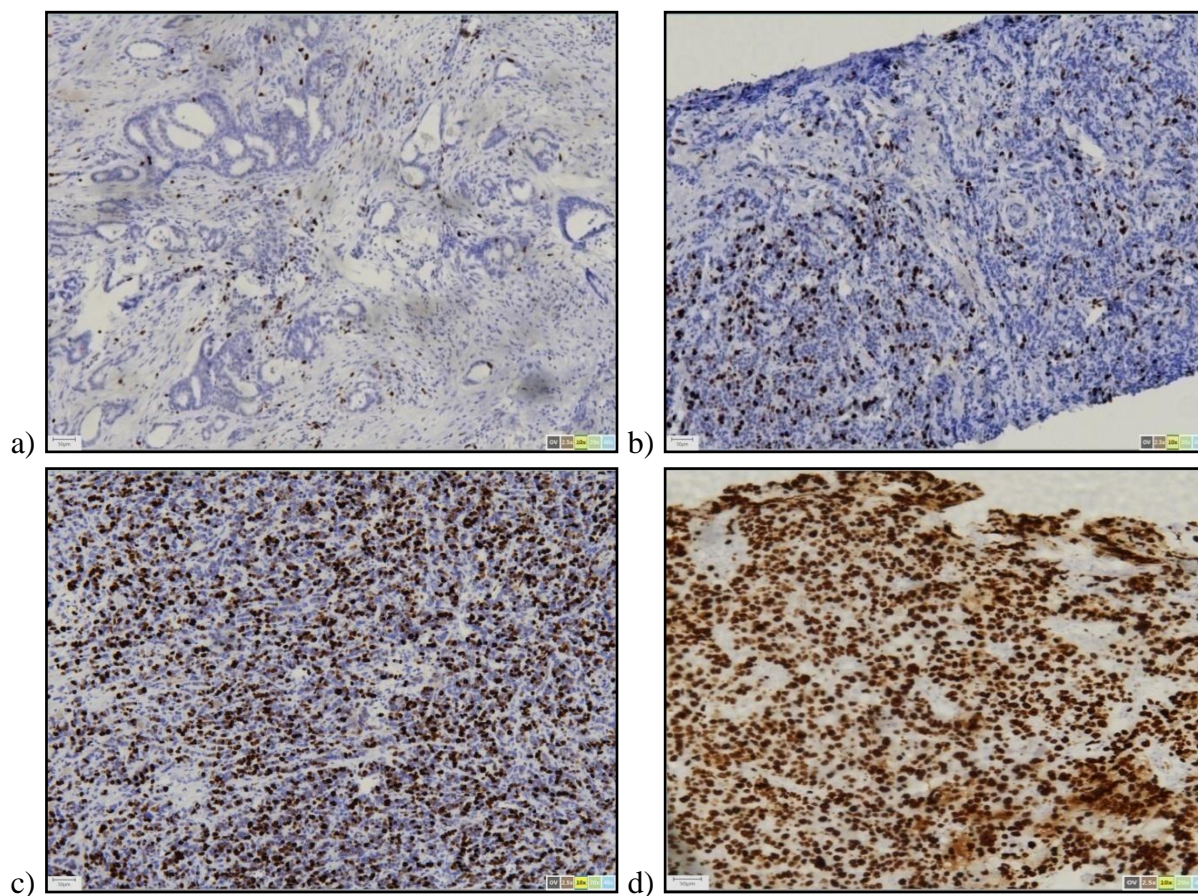
Zbog multifaktorijelne etiopatogeneze odnosno heterogene prirode oboljenja, uz korišćenje standardnih histopatoloških faktora i biomarkera, vrlo je teško predvideti tok i ishod karcinoma dojke. Kako su genske analize u većini slučajeva nedostupne, pored osnovnih hormonskih analiza, u prognostičke i prediktivne svrhe neophodno je uvrstiti i nove biomarkere. Marker Ki-67 predstavlja proliferativni indeks tumorskih ćelija, a na njegov značaj kao prognostičkog faktora za procenu preživljavanja u posljednje vreme se sve više ukazuje (78, 79). Ovaj jedarni protein je otkriven tokom ranih osamdesetih godina dvadesetog veka, od strane Gerdes-a i saradnika, koji su koristili mišja monoklonska antitela usmerena protiv jedarnih antigena ćelijske linije Hodgkinovog limfoma (80). Ki-67 je jedarni marker ćelijske proliferacije koji pokazuje ekspresiju u svim fazama ćelijskog ciklusa, izuzev u G0 stadijumu (81, 82). U uzorcima normalnog tkiva dojke Ki-67 se eksprimira u niskom procentu (<3% ćelija) kod ER negativnih ćelija (83).

Proliferativni indeks Ki-67 je bio predmet istraživanja mnogih studija (84, 85, 86, 87). Pokazana je značajna razlika u vrednosti ovog markera kod karcinoma dojke u poređenju sa benignim lezijama, te statistički značajna korelacija visokih vrednosti ovog markera i rizika od recidiva

bolesti i smrti od karcinoma dojke. Stepem ćelijske proliferacije je značajan prognostički faktor karcinoma dojke za procenu preživljavanja (78, 79). Takođe je potvrđeno postojanje značajne pozitivne korelacije visokih vrednosti Ki-67 markera sa višim histološkim gradusom tumora i terapijskom rezistencijom (31). Objavljene studije ukazuju na udruženost visokih vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i slabo diferenciranih tumora, tumora velikih dimenzija, tumora sa zahvaćenim limfnim čvorovima i tumora koji pripadaju trostruko negativnim ili HER2 pozitivnim podtipovima (84, 85). Druge studije pak ukazuju na Ki-67 kao ključni činilac u predikciji tumorskog odgovora na adjuvantnu sistemsku terapiju, kao što je hemioterapija (86) i inhibitori aromataze (87). Cheang et al. ukazuju da Ki-67 indeks i HER2 ekspresija mogu da ukažu na postojanje rizika od recidiva i smrti pacijentkinja sa hormon receptor pozitivnim karcinomom dojke koje su lečene tamoksifenom i tradicionalnom hemioterapijom (88). Svakako, nivo ekspresije markera Ki-67 ima najveći uticaj na terapijske izbore za bolesnice sa hormon-pozitivnim tumorom dojke, jer tumori sa višim stepenom ekspresije Ki-67 nose viši rizik od pojave recidiva bolesti (83, 89, 90), te se za takve bolesnice savetuje adjuvantna hemioterapija (91).

Postoje mnoge kontroverze vezane za određivanje Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomu dojke (Slika 17). Prve su vezane za analitičku metodologiju i podrazumevaju različite pristupe pri brojanju Ki-67 pozitivnih ćelija: „hot spot“ vs. čitav tumor, različit broj ćelija na osnovu kojeg se proračunava srednja vrednost, kao i manualno vs. automatizovano brojanje. „Hot spot“ predstavlja područje tumora u kojem se nalazi najveći broj tumorskih ćelija u procesu deobe, tj. najviše obojenih jedara (92). Drugi problem, naročito sa stanovišta onkologa, odnosi se na procenu granične vrednosti Ki-67 indeksa, kojom se karcinomi dojke mogu svrstati u grupu sa niskim i grupu sa visokim Ki-67 proliferativnim indeksom (89, 93). Pojedine studije koriste 10% ili 20% kao „cut-off“ vrednosti, dok ostale koriste dihotomnu skalu oko srednje vrednosti („cut-off“ je 14% ili 15%) (88). Usled prisustva ovog labiliteta, postoje teškoće u definisanju standarda za upotrebu u svakodnevnoj praksi. Neki autori iznose činjenice da izbor „cut-off“ vrednosti zavisi od kliničkog cilja: ukoliko se Ki-67 koristi da bi se pacijentkinje sa sporo proliferišućim tumorom isključile iz hemioterapijskih protokola, tada bi kao „cut-off“ vrednost trebalo koristiti vrednost od 10% u cilju sprečavanja prekomernog medikamentnog tretmana (overdose). Suprotno od iznetog, ukoliko se Ki-67 marker koristi za identifikaciju pacijentkinja senzitivnih na hemioterapijske protokole, preferira se upotreba vrednosti od 25% kao „cut-off“ vrednost (89,

93). Najrasprostranjeniji način procene Ki-67 markera je imunohistohemijska analiza. Imunohistohemijskim bojenjem sa monoklonskim antitelom Ki-67 (MIB-1) moguće je proceniti stepen proliferativnosti populacije neoplastičnih ćelija, i to određivanjem procenta imunoreaktivnih ćelija na 200 tumorskih ćelija. Takođe, veoma važno je napomenuti često i presudan izbor fiksativa, kao i uticaj dužine fiksacije tkiva na procenat imunoreaktivnih tumorskih ćelija. Arima i saradnici u svojoj studiji su jasno ukazali da upotrebom 10% pufferisanog formalina ekspresija Ki-67 je bila znatno viša. Ista grupa autora je utvrdila i da nedovoljna fiksacija, 16-časovna odložena fiksacija, kao i produžena fiksacija značajno redukuju nivo ekspresije Ki-67, pri čemu je prolongirana fiksacija vremenski zavisna (94). Postoje studije koje su dokazale da je prolongirana fiksacija manje kritična u redukciji Ki-67 ekspresije u poređenju sa nedovoljnom fiksacijom, ali takođe može dovesti do lažno negativnih rezultata (59).



Slika 17. Ekspresija proliferativnog indeksa Ki-67, 10x: a) 5%; b) 20%; c) 60%; d) 90%.

1.4.10. Molekularna klasifikacija invazivnog karcinoma dojke

Invazivni karcinom dojke predstavlja heterogenu grupu tumora, uključujući brojne podtipove različitog molekularnog mehanizma nastanka, biološkog ponašanja, terapijskog odgovora i prognoze bolesti (95, 96). Upotrebom savremene DNK tehnologije, klasična patohistološka klasifikacija invazivnih karcinoma dojke je proširena uvođenjem podtipova ovog tumora. Godine 2000. opisana su četiri podtipa karcinoma dojke, i to: luminalni, HER2 ekspimirajući, bazaloidni i karcinom sličan normalnoj dojci (97). Ubrzo su sledile nove publikacije koje su ukazale na potrebu za izvesnim modifikacijama pomenutih podtipova, te kako genetske analize nisu uvek raspoložive i finansijski moguće, 2011. godine na St. Galen internacionalnoj konferenciji usvojena je reklasifikacija, kao dostupniji surogat genskoj ekspresiji. Ekspertna radna grupa je preporučila klasifikaciju karcinoma dojke baziranu na ekspresiji estrogenog receptora (ER), progesteronskog receptora (PR), humanog epidermalnog faktora rasta (HER2- human epidermal growth factor receptor 2) i proliferativnog markera Ki-67. Na osnovu kliničko-patoloških kriterijuma, načinjena je podela na pet podtipova karcinoma: luminal A, luminal B, HER2-pozitivan luminal B, non-luminal HER2-pozitivan i bazaloidni (trostruko negativan) tip karcinoma dojke (Tabela 1.2.).

Tabela 1.2. Molekularna klasifikacija invazivnog karcinoma dojke, St. Galen 2011. godine.

<i>Molecular subtype</i>	<i>Surrogate subtype</i>	<i>ER</i>	<i>PgR</i>	<i>HER2</i>	<i>PI (Ki-67)</i>
Luminal A	Luminal A-like	+ or +	-	-	<14%
Luminal B	Luminal B-like (HER2-negative)	+ or +	-	-	≥14%
	Luminal B-like (HER2-positive)	+ or +	+	+	Any
HER2-overexpression	HER2-positive	-	-	+	Any
Basal-like	Triple negative	-	-	-	Any

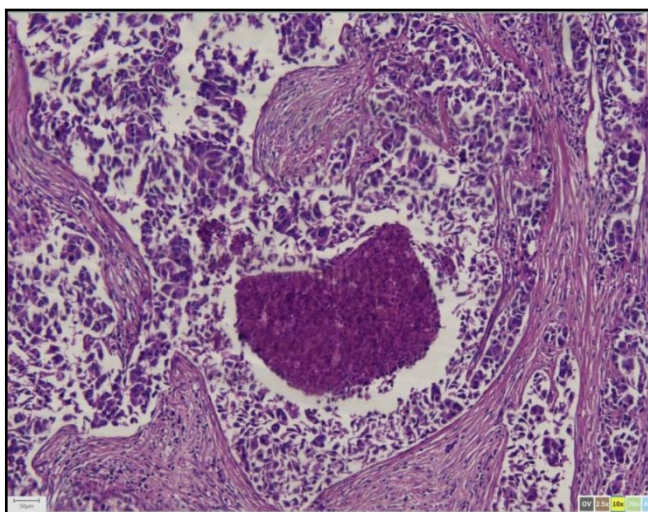
ER: Estrogen receptor; PgR: Progesterone receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; PI: Proliferation index; +: Positive; -: Negative

Luminal A podtip obuhvata tumore koji su ER i/ili PR pozitivni, HER2 negativni i niskog Ki-67 proliferativnog indeksa, a luminal B podtip ima iste imunohistohemijske karakteristike, uz visoku vrednost Ki-67 proliferativnog indeksa. Za Ki-67 je definisana vrednost od 14% kao granična. HER2-pozitivan luminal B podtip tumora dojke obuhvata tumore koji su ER i/ili PR pozitivni,

HER2 pozitivni i bilo koje vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa, non-luminal HER2-pozitivni tumori su ER i PR negativni i HER2 pozitivni, dok su trostruko negativni karcinomi dojke ER i PR i HER2 negativni (26, 98).

1.4.11. Nekroza (Slika 18)

Nekroza predstavlja negativan prognostički znak tumora. Najčešće je prisutna u duktalnom invazivnom karcinomu dojke. Iako su sprovedene mnoge studije, i dalje su aktuelne različite kontroverze oko kvantifikacije nekroze, te nije definisan kriterijum za opseg nekroze od kliničkog značaja. Pojedine studije tumorsku nekrozu definišu kao konfluentna nekrotična područja bilo koje veličine u invazivnom tumoru koja se mogu detektovati na srednjem uveličanju mikroskopa, a koja su značajan prediktor ukupnog preživljavanja, kao i vremena do pojave recidiva bolesti (99). Druge studije su istraživale karcinome dojke sa centralnom nekrozom i ukazale na visokoprocentnu povezanost ovih tumora sa negativnom ER i PR ekspresijom (u 94%), kao i češćom pojavom recidiva bolesti (u 71% centralno nekrotičućih tumora) (100), dok su Yu i saradnici kod iste vrste karcinoma dojke ukazali na povezanost sa višim histološkim gradusom, kao i na prosečno vreme od 15,5 meseci do pojave recidiva (101). Budući da literaturni navodi ipak ukazuju na povezanost nekroze sa veličinom, višim histološkim gradusom tumora, ekspresijom trostruko negativnog imunofenotipa i kraćim vremenom do pojave recidiva, teško je reći da li nekroza predstavlja nezavisan prognostički faktor.



Slika 18. Područje nekroze u duktalnom karcinomu dojke.

1.4.12. Angiogeneza

Angiogeneza ili neovaskularizacija je proces formiranja novih, funkcionalnih krvnih sudova iz preegzistirajuće vaskularne mreže, a sve veći značaj ovom fenomenu kao prognostičko-prediktivnom faktoru daje se zbog mogućnosti primene anti-angiogene terapije. Ona omogućava rast tumora i povećava metastatski potencijal tumora otvaranjem puteva za prodor tumorskih ćelija u cirkulaciju. Najznačajniji stimulatori angiogeneze su članovi porodice faktora rasta fibroblasta (FGF) i faktora rasta vaskularnog endotela (VEGF) (102). Primena imunohistohemijskih antitela specifičnih za endotelne ćelije (faktor VIII, CD34 i/ili CD31) omogućava lakšu detekciju novostvorenih krvnih sudova u tumoru (102).

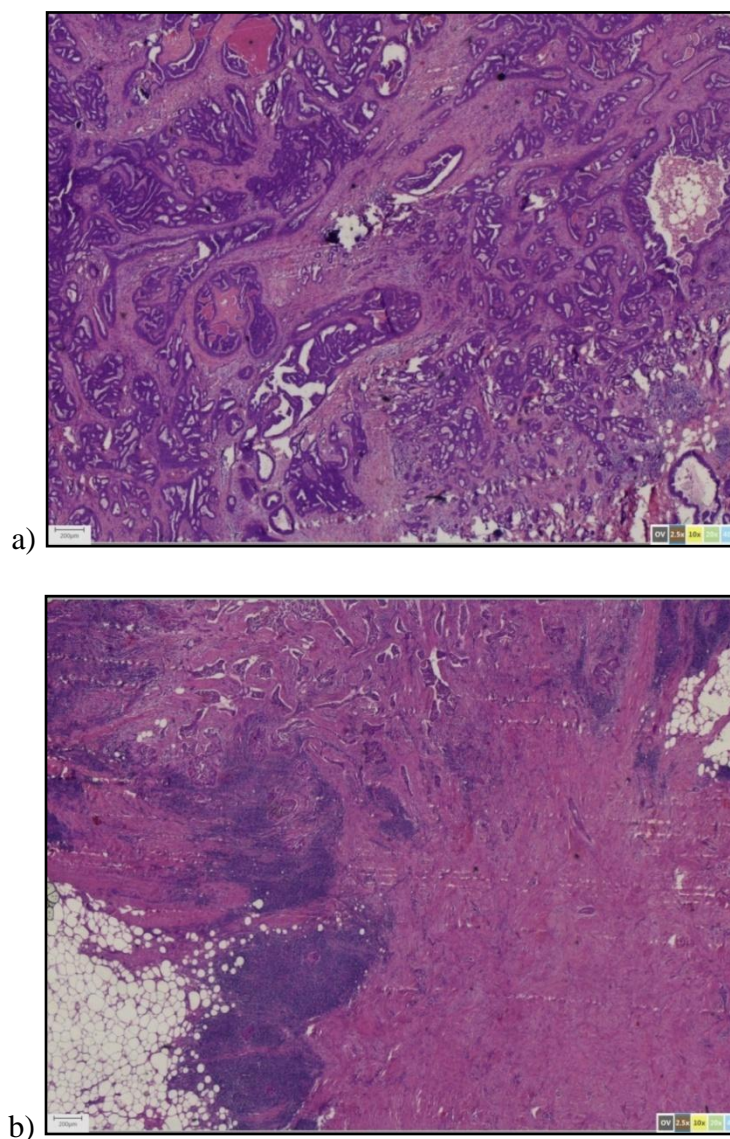
Pojedine publikacije pokazuju da je angiogeneza izraženija u tumorima bolesnica mlađih od 50 godina, u tumorima većih dimenzija, tumorima višeg histološkog gradusa, hormon-receptor negativnim tumorima, HER2 pozitivnim tumorima (103-106), a prema drugim autorima, neovaskularizacija je povezana sa histološkim tipom tumora, pa je slabija u lobularnim invazivnim karcinomima u odnosu na duktalne, te u tom histološkom tipu nije značajniji prognostički faktor (107).

Dostupni podaci ukazuju da terapijski odgovor na primenjenu konvencionalnu hemioterapiju nije u korelaciji sa tumorskom angiogenezom. Posledično, tumori sa izraženom angiogenezom nemaju veću senzitivnost na adjuvantnu terapiju u poređenju sa tumorima sa slabom angiogenezom (108, 109). Međutim, ono čemu se pridaje značaj jesu eksperimentalni dokazi koji ukazuju da anti-angiogena terapija može da pojačava hemioterapijsko dejstvo i da inhibira neovaskularizaciju u tumorskom ležištu (110).

1.4.13. Inflamatorni ćelijski odgovor organizma

Inflamatorni ćelijski odgovor organizma domaćina na karcinom dojke se ogleda u postojanju inflamatornog infiltrata unutar i oko invazivnog tumora dojke (Slika 19). Ovaj infiltrat se predominantno sastoji od zrelih limfocita koji su izmešani sa različitom količinom plazma ćelija, histiocita, mastocita, neutrofilnih i eozinofilnih granulocita. Retko je prisutna predominacija plazma ćelija ili eozinofila, izuzev u medularnim karcinomima dojke (111). Medularni karcinomi i invazivni duktalni karcinomi sa izraženom limfocitnom reakcijom su gotovo uvek ER i PR

negativni. Brojne studije rađene na temu inflamatornog odgovora, kao prognostičkog i prediktivnog faktora, pokazale su značajnu neusaglašenost rezultata. Dok jedni autori ukazuju na bolju prognozu pri detekciji izraženog inflamatornog odgovora (112), drugi autori ukazuju na suprotno (113). Literaturni podaci govore u prilog nepostojanja uticaja limfo-plazmocitne reakcije na mortalitet u grupi bolesnica sa negativnim nodalnim statusom (114), brojne analize iz studije Pupe i saradnika pokazuju da je limfo-plazmocitni uticaj na prognozu bolesti povezan sa nodalnim statusom, gradusom tumora i ekspresijom HER2 gena (115).



Slika 19. Inflamatorni odgovor organizma na invazivni karcinom dojke, 2,5x: a) oskudan limfocitni infiltrat u stromi tumora; b) obilan limfocitni infiltrat u stromi tumora.

1.4.14. Tumor-supresorski geni i onkogeni kod tumora dojke

Najznačajniji tumor-supresorski gen je p53 sa lokalizacijom na 17p hromozomu. Njegova glavna uloga jeste regulacija ćelijskog ciklusa, popravka DNK, kao i stimulacija sinteze bax gena. Mutacije p53 gena spadaju u najčešće molekularne abnormalnosti koje su čest nalaz u invazivnom duktalnom karcinomu dojke, a prisutne su i kod drugih solidnih tumora. Bax gen pripada grupi gena koji podstiču apoptozu, te je p53 indirektni stimulator apoptoze. Karcinomi dojke sa mutiranim genom p53 su agresivnijeg biološkog ponašanja, kraćeg preživljavanja i generalno lošijeg toka i prognoze bolesti (116).

Drugi značajan gen jeste protonkogen bcl-2 koji inhibira programiranu ćelijsku smrt (apoptozu) i to zaustavljajući oslobađanje citohroma C iz mitohondrija. Jedna od bitnih uloga ovog gena je nadzor enzima kaspaze koji razgrađuju belančevine kada započne proces apoptoze. Hormon pozitivni tumori dojke se karakterišu visoko eksprimiranim genom bcl-2, te ovaj gen spada u dobre prognostičke faktore. U vezi sa prethodnim podatkom je i prediktivna uloga ovog gena, te je pokazano da bolesnice sa hormonski pozitivnim karcinomom dojke imaju bolji odgovor na tamoksifen ako je prisutna visoka izraženost bcl-2 (117).

Gen c-myc kodira jedarne belančevine koje imaju važnu ulogu u rastu, proliferaciji i diferencijaciji ćelija, stabilnosti genoma i apoptozi. Prekomerna ekspresija gena c-myc je jedna od najčešćih genetskih alteracija kod obolelih od karcinoma dojke, a javlja se približno kod jedne trećine bolesnica. Spada u negativne prognostičke faktore karcinoma dojke (118).

1.4.15. Parametri domaćina tumora – godine i status menopauze

Postoje pretpostavke da su karcinomi dojke koji se javljaju u različitoj životnoj dobi (mlađoj i starijoj) zapravo različiti biološki entiteti, te se i tok bolesti kod mlađih i starijih pacijentkinja značajno razlikuje (119). Dve velike studije pokazale su da grupa pacijentkinja koje su mlađe od 35 godina imaju izrazito nepovoljniju prognozu bolesti, čak i posmatrano u kontekstu sa ostalim prognostičkim parametrima (119-121). Menopauzalni status je u direktnoj vezi sa starošću pacijentkinja. Naime, pacijentkinje mlađe od 45 godina su uglavnom premenopauzne, one starije od 59 godina postmenopauzne, a pacijentkinje starosne dobi između 45 i 59 godina mogu biti i premenopauzne i postmenopauzne, te je u ovoj grupi potrebno posebno obratiti pažnju.

Kako je i u normalnom tkivu dojke prisustvo određenih promena zavisno od dela menstrualnog ciklusa (122, 123), tako i kod reproduktivnih žena obolelih od karcinoma dojke postoje varijacije tokom smenjivanja faza menstrualnog ciklusa. Od posebnog je značaja studija koja je istraživala uticaj menstrualnih faza na ekspresiju markera Ki-67 u grupi bolesnica obolelih od hormon-pozitivnog karcinoma dojke. Rezultati su pokazali da je ekspresija Ki-67 viša u uzorcima hormon-pozitivnih tumora dojke koji su operativno odstranjeni za vreme lutealne faze menstrualnog ciklusa bolesnice, te prilikom procene vrednosti indeksa Ki-67 ni tu činjenicu ne treba zanemariti (90).

1.5. IMUNOHISTOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE KARCINOMA DOJKE

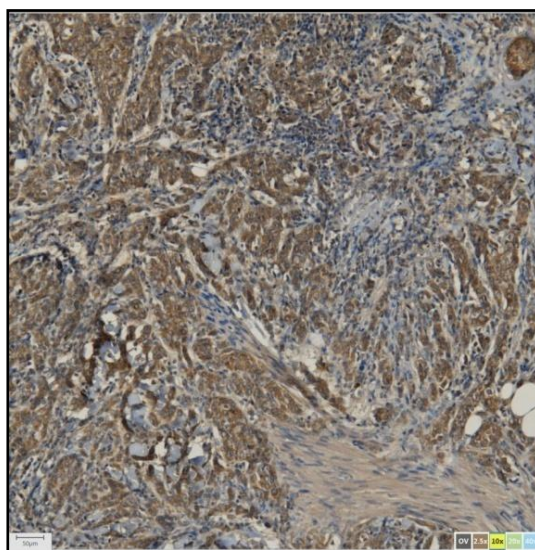
Razvoj imunohistohemije (IHC) i upotreba antitela koja omogućavaju obeležavanje i vizuelizaciju antigena u ćeliji in situ prvi put su opisani još 1941. godine, kada su upotrebljavana antitela bila sjedinjena sa fluorescentnim molekulom (124). Nakon toga, ova laboratorijska tehnika je usavršavana i danas zauzima centralno mesto u dijagnostici i lečenju karcinoma dojke. IHC karcinoma dojke često daje ključne dijagnostičke informacije i pruža prognostičke i prediktivne informacije o planiranoj terapiji.

Pored prethodno opisanih hormonskih markera (ER, PR), kao i HER2 markera i proliferativnog Ki-67 markera, neophodno je istaći značaj još nekoliko IHC markera koji olakšavaju dijagnostiku karcinoma dojke.

1.5.1. Citokeratini

Citokeratini (CK) predstavljaju intermedijarne proteinske filamente koji formiraju intacitoplazmatski citoskelet epitelnih ćelija. Imaju značajnu ulogu u obezbeđivanju ćelijske stabilnosti, ali su takođe uključeni i u procese ćelijske mitoze, migracije i diferencijacije (125). Do sada su opisana 54 citokeratinska gena čija je ekspresija visoko specifično povezana sa tipom epitelne ćelije, kao i stepenom diferencijacije (126). Citokeratini su podeljeni u dve grupe- tip I

(kiseli CK) i tip II (bazni ili neutralni CK), a takođe ih je moguće podeliti i na osnovu njihove molekularne težine na CK visoke (HMWCK, engl. high molecular weight cytokeratin) i CK niske molekularne težine (LMWCK, engl. low molecular weight cytokeratin). Citokeratinski filamenti epitelnih ćelija su sagrađeni od jednog citokeratina tip I i jednog tip II (127). Prilikom neoplastične transformacije, epitelne ćelije teže da zadrže svoj profil ekspresije CK, što čini njihovu osnovu korisnog IHC sredstva za tumorsku dijagnostiku i klasifikaciju. Značajna CK antitela koja se koriste u dijagnostici karcinoma dojke su HMWCK- bazalni CK i LMWCK- luminalni CK. Najznačajniji bazalni CK za identifikaciju karcinoma dojke su CK 5, 14 i 17, kao i manje specifičan 34 β E12, sa glavnim ulogama u diferencijaciji benignog od atipičnog i neoplastičnog epitela, identifikaciji mioepitelnih ćelija prilikom razlikovanja in situ od invazivnog tumora, sa ulogom izdvajanja grupe karcinoma dojke sličnih bazaloidnim (basal-like carcinoma), kao i identifikaciju mioepitelne komponente u adenomioepitelnim tumorima (128). Među luminalnim CK od važnosti za karcinom dojke izdvajaju se CK 7, 8, 18 i 19, koji su korisni za identifikaciju i benignog i malignog dukalnog (luminalnog) epitela (Slika 20), a koji mogu biti bez ekspresije u basal-like karcinomima dojke, a takođe su ovi CK od izuzetne koristi pri identifikaciji pojedinačnih ćelija u epidermisu kod Pedžetove bolesti bradavice (128). Generalno govoreći, najveći deo karcinoma dojke pokazuje ekspresiju LMWCK, a najčešće su ovi karcinomi i ER pozitivni. Suprotno, mnogo manji broj karcinoma dojke eksprimira HMWCK, što je udruženo sa lošijom prognozom, ER negativnošću i slabijom tumorskom diferentovanošću (129, 130).



Slika 20. Imunohistohemijska ekspresija CK7 u karcinomu dojke, 10x.

1.5.2. Mioepitelni markeri

Pored opisanih HMWCK (bazalni CK), postoji još nekoliko antitela koja se eksprimiraju u normalnim mioepitelnim ćelijama, što je značajno u dijagnostičkom izdvajanju neinvazivnog od invazivnog procesa dojke. Takav je jedarni marker p53, zatim SSMHC (Smooth musclemyosin heavy chain), SMA (Smooth muscle actin), CD10, Calponin, S100, H-caldesmon, P-cadherin (131).

1.5.3. Basal-like markeri

U ovoj heterogenoj grupi karcinoma dojke nalaze se oni karcinomi koji pokazuju ekspresiju HMWCK, ali ne i ekspresiju ER, PR i HER2 (tzv. tripl-negativni karcinomi dojke). Nisu izolovani specifični markeri ove grupe karcinoma dojke.

1.5.4. Markeri lobularne neoplazije

Lobularne neoplazije morfološki karakteriše slaba ćelijska kohezivnost, dok se u imunohistohemijskoj analizi ističu pojedini markeri u cilju razdvajanja lobularnih i duktalnih karcinoma. To su E-cadherin i nekoliko catenin proteina (β -catenin, α -catenin, γ -catenin i p120catenin). E-cadherin je marker koji svoju ekspresiju (membransku) pokazuje samo u duktalnim neoplazmama, te lobularni invazivni karcinomi ne pokazuju ekspresiju ovog markera (132, 133). Marker p120catenin pokazuje pozitivnu membransku ekspresiju u non-lobularnim karcinomima dojke, dok u lobularnom karcinomu dojke ovaj marker ima citoplazmatski pozitivno bojenje (134).

1.5.5. Neuroendokrini markeri (NE)

Neuroendokrini markeri (chromogranin A, synaptophysin, CD56 i NSE) svoju ekspresiju ostvaruju u do 30% primarnih karcinoma dojke (135), a da bi se tumor definisao kao neuroendokrini tumor dojke potrebno je da više od 50% tumorskih ćelija pokazuje ekspresiju

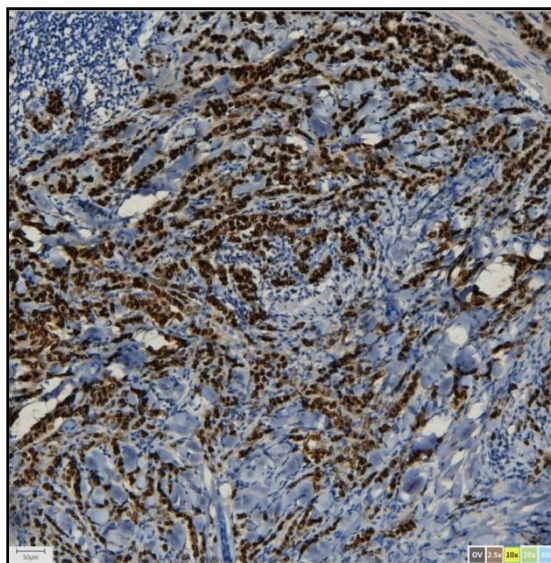
ovih markera. Non-neuroendokrini karcinomi dojke koji imaju IHC pozitivnost NE markera su obično ER pozitivni, a HER2 negativni karcinomi.

1.5.6. Markeri koji ukazuju na diferencijaciju tkiva dojke

Ne postoji apsolutni marker koji će jasno potvrditi da se radi o tkivu dojke, međutim u tu svrhu najčešće se upotrebljava GCDFP (engl. gross cystic disease fluid protein), mamaglobin i GATA3. GCDFP je marker koji je pozitivan u pljuvačnim žlezdama, nekim adneksalnim tumorima kože i adenokarcinomu prostate, ali i u tkivu dojke sa specifičnošću od 98%, ali relativno niskom senzitivnošću od 62-77% (Slika 21). Oko 23% karcinoma dojke pokazuje ekspresiju ovog markera, ali se i u slučaju njegove negativnosti dojka kao primarno mesto maligniteta ne može isključiti (136, 137).

Mamaglobin je marker koji je više senzitivan za tkivo dojke ali manje specifičan u odnosu na GCDFP, jer je njegova ekspresija zabeležena i u normalnom endometriju, kao i u oko 17% tumora endometrija, nekim tumorima pljuvačnih žlezda, melanomu, seroznom karcinomu jajnika. Mamaglobin je marker humanog epitela dojke i pokazuje citoplazmatsku ekspresiju u 55-83% karcinoma dojke (137, 138).

GATA3 je marker čija je ekspresija prisutna u oko 95% karcinoma dojke (139), dok drugi autori iznose rezultate sa 91-100% pozitivnosti ovog markera u ER pozitivnim karcinomima dojke i 3-83% u ER negativnim karcinomima dojke (140). Senzitivniji je od GCDFP i mamaglobina, ali je takođe pozitivan i u urotelnom karcinomu, skvamoznom karcinomu kože, cerviksa, larinksa i bronha. GATA3 je visoko senzitivni marker u karcinomima dojke i urotela, ali nije specifičan, te kombinacija sa panelom ostalih IHC antitela upotpunjava dijagnostiku metastatskih tumora.



Slika 21. Imunohistohemijska ekspresija GCDFP u metastatskom karcinomu dojke, 10x.

1.5.7. KIT (CD117)

Ekspresija CD117 u karcinomima dojke je veoma retka (do 3%), ali adenoid-cistični tumor, epitelno-mioepitelni tumori i maligni filodes tumori dojke pokazuju ekspresiju ovog markera, te se u tome ogleda njegov dijagnostički značaj. Prediktivni terapijski značaj ovog markera i dalje nije dokazan (141-143).

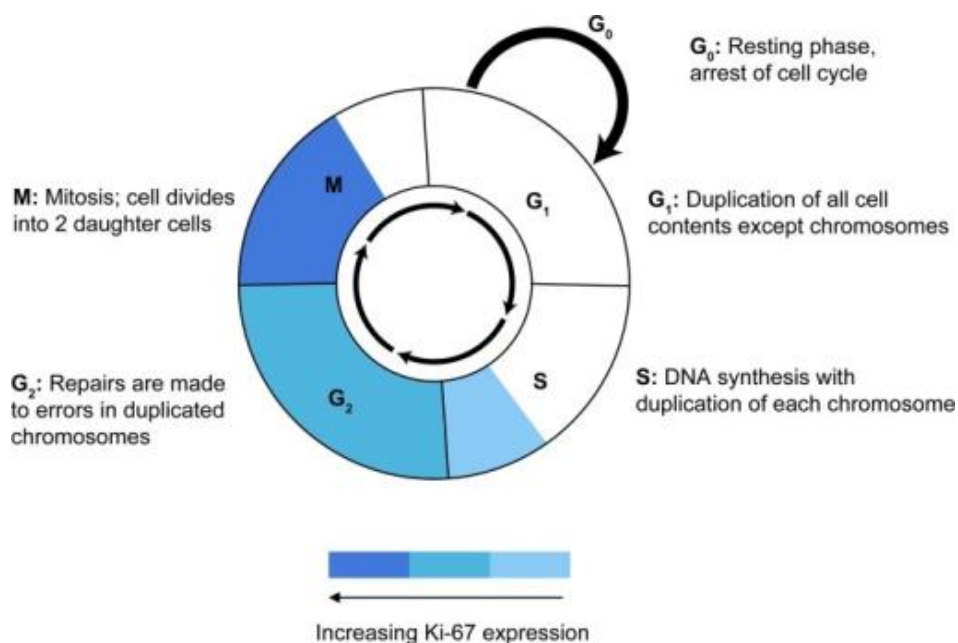
1.5.8. Epitelni membranski antigen (EMA)

EMA, takođe poznat i kao MUC1, je mucinozni glikoprotein koji je široko rasprostranjen u većini glandularnih i duktalnih epitelnih ćelija. U dojci je obično ekprimiran na luminalnoj strani duktusnih i acinusnih epitelnih ćelija, što je obrnuto u slučaju invazivnog mikropapilarnog karcinoma dojke, gde se uočava EMA pozitivnost na spoljašnjoj (stromalnoj) strani epitelnih ćelija (144).

1.6. ZNAČAJ PROLIFERATIVNOG INDEKSA KI-67 ZA KARCINOM DOJKE

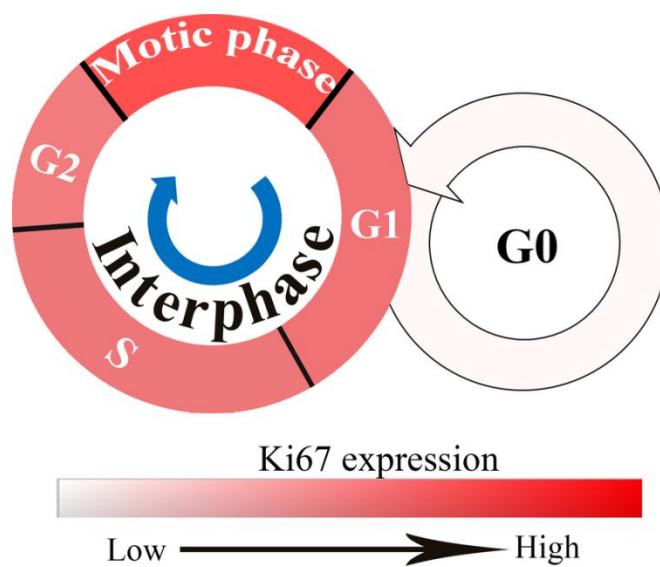
U poslednje dve decenije intenzivno su proučavani molekularni mehanizmi uključeni u procese nastanka i biološkog ponašanja karcinoma dojke. Određivanje hormonskog receptorskog statusa je neophodno, kako u prognostičke, tako i u prediktivne svrhe. Karcinom dojke je izrazito heterogeno oboljenje sa različitim faktorima rizika za njegov nastanak, kliničko-patološkim karakteristikama, odgovorom na terapiju, kao i različitim ishodom bolesti. Zahvaljujući sve većem razumevanju molekularnih mehanizama uključenih u nastanak i razvoj karcinoma dojke i, shodno tome, klasifikaciji podtipova karcinoma dojke, javila se potreba za definisanjem novih prognostičkih i prediktivnih biomarkera, među kojima je jedan od najvažnijih proliferativni marker Ki-67. Kako dostupne publikacije ukazuju na korišćenje različitih graničnih („cut-off“) vrednosti ovog indeksa, postoje ozbiljne teškoće za definisanje standarda koji su potrebni za svakodnevnu praktičnu upotrebu. St. Galenska internacionalna konferencija 2011. godine ukazuje na efikasnost upotrebe Ki-67 indeksa u diferenciranju luminalnih A i luminalnih B podtipova tumora, sa preporukom za korišćenje granične vrednosti od 14% (98). Ovo je bio prvi pokušaj koji je načinjen sa ciljem da se utvrdi internacionalni standard granične vrednosti za Ki-67 indeks kao prognostički faktor karcinoma dojke, obzirom da je Ki-67 jedarni marker ćelijske proliferacije koji pokazuje ekspresiju u svim fazama ćelijskog ciklusa, izuzev u G0 stadijumu (81, 82, 91) (Slika 22 i 23). Vodiči Američkog društva za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology- ASCO) čak ni ne uključuju marker Ki-67 kao potreban biomarker u rutinskim analizama karcinoma dojke (145), uprkos sve većem broju dokaza o njegovoj kliničkoj koristi i sve većoj prihvaćenosti. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je marker Ki-67, odnosno njegova niska ekspresija u tumoru, glavni razlog zašto luminalni A karcinomi spadaju u grupu tumora niskog stepena malignosti (engl. low grade tumors) i zašto imaju najbolju prognozu. Takođe, marker Ki-67 je glavni indikator koji se koristi pri diferenciranju luminalnih A od luminalnih B karcinoma dojke, koji zahtevaju drugačiji terapijski tretman i imaju drugačiju prognozu. Luminalni A karcinomi dojke imaju slabiji odgovor na tradicionalnu hemioterapiju i tumori ovog podtipa koji su dobro diferencirani, sa niskim stepenom maligniteta, u većini slučajeva se uspešno leče samo endokrinom terapijom, sem kada postoje multipli pozitivni limfni čvorovi, te adekvatna hemioterapija može da se koristi kao suplementarna terapija. Dakle,

izdvajanje luminalnih A karcinoma dojke kao nisko proliferativnih tumora smanjuje mogućnost od potencijalnog prekomernog tretmana ovih pacijentkinja. Neka istraživanja u Kini su dokazala da luminalni A karcinomi dojke imaju najbolju prognozu, dok HER2 pozitivni karcinomi dojke koreliraju sa lošijom prognozom (većih su dimenzija, češće su prisutni metastatski izmenjeni limfni čvorovi i kraći je vremenski period do pojave recidiva bolesti) (146). Trostruko negativni karcinomi su najagresivniji podtip karcinoma dojke, koji su u velikom procentu udruženi sa pojavom udaljenih metastaza, visceralnih metastaza kao i smrtnog ishoda. Recidiv nastaje obično unutar tri godine od dijagnostikovanja, dok je smrtni ishod visok unutar petogodišnjeg perioda praćenja, sa prosečnim preživljavanjem pacijentkinja obolelih od trostruko negativnog karcinoma dojke od oko 12 meseci (147).



Slika 22. Faze ćelijskog ciklusa i ekspresija Ki-67.

(Preuzeto iz: Sysel AM, Valli VE, Bauer JA. Immunohistochemical quantification of the cobalamin transport protein, cell surface receptor and Ki-67 in naturally occurring canine and feline malignant tumors and in adjacent normal tissues. 2014;6(4).)



Slika 23. Ekspresija Ki-67 u različitim fazama ćelijskog ciklusa.

(Preuzeto iz: Yuan JP, Wang LW, Qu AP, Chen JM, Xiang QM. Quantum Dots-Based Quantitative and In Situ Multiple Imaging on Ki-67 and Cytokeratin to Improve Ki-67 Assessment in Breast Cancer. 2015;1–17.)

2

CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE

Karcinom dojke je heterogena bolest koju karakterišu različita morfologija, imunohistohemijski profil, klinički tok, kao i odgovor na primenjenu terapiju, te je korišćenjem standardnih histopatoloških faktora i biomarkera veoma teško predvideti tok i ishod ove bolesti, kao i potrebu davanja adjuvantne hemioterapije. Cilj lečenja jeste da se nakon hirurškog tretmana, sprovede adekvatna dalja terapija karcinoma dojke, te se ukazuje na stalnu potrebu za pronalaženjem novih pokazatelja pomoću kojih bi se identifikovale bolesnice sa povećanim rizikom od razvoja recidiva bolesti. Takođe, svaka hemioterapija ima ograničeno terapijsko dejstvo, ali i obavezno štetno dejstvo na okolno tkivo dojke, te i sa tog aspekta postoji potreba za izdvajanjem bolesnica koje bi imale benefit od primene hemioterapije, odnosno da se izbegne nepotrebno štetno dejstvo hemioterapije kod bolesnica koje bi imale nedovoljan ili nikakav benefit od iste. U cilju primene ciljane (target) terapije, u dosadašnje prognostičko-prediktivne parametre neophodno je uvrstiti dodatne biomarkere, među kojima se, pre svega, ističe proliferativni Ki-67 marker, a čija visoka vrednost korelira sa faktorima loše prognoze. Proliferativni Ki-67 indeks je jedan od markera sa prognostičkim i prediktivnim značajem, čije metodološko određivanje i analiza još uvek nisu standardizovani.

2.1. CILJEVI RADA:

- Određivanje stepena Ki-67 tumorske proliferacije u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima u regijama najveće imunoreaktivnosti („hot spots“) i u području invazivnog tumorskog ruba.

- Utvrđivanje povezanosti vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima sa: životnim dobom bolesnica, veličinom tumora, stepenom diferencijacije tumora (histološki gradus) i nivoom tumorske ekspresije estrogen i progesteron receptora.

- Utvrđivanje prognostičkog značaja Ki-67 proliferativnog indeksa kod obolelih od karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima, tj. razlike u vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa u odnosu na pojavu lokalnog recidiva, udaljenih metastaza i dužinu preživljavanja u toku petogodišnjeg perioda praćenja pacijentkinja.

- Utvrđivanje granične (cut-off) vrednosti Ki-67 tumorskog proliferativnog indeksa, u cilju uspostavljanja preciznijeg prognostičkog parametra za preživljavanje bez pojave recidiva bolesti, kao i ukupnog preživljavanja pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima.

2.2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA:

- Postoji značajna razlika u vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa dobijenim analizom tumorskih područja najveće imunoreaktivnosti („hot spots“) i na invazivnom rubu karcinoma dojke pozitivnih na hormonske receptore.

- Vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 određene u područjima najveće tumorske aktivnosti („hot spots“) koreliraju sa veličinom tumora, histološkim gradusom i stepenom pozitivne ekspresije estrogen i progesteron receptora. Viši stepen proliferacije tumorskih ćelija u tumorima sa pozitivnim hormonskim receptorima povezan je sa većim dijametrom tumora, višim histološkim gradusom i nižim nivoom tumorske ekspresije estrogen i progesteron receptora.

- Vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 određene u područjima najveće tumorske aktivnosti („hot spots“) koreliraju sa dužinom preživljavanja bez pojave recidiva bolesti, kao i dužinom ukupnog preživljavanja. Bolesnice sa višim Ki-67 proliferativnim indeksom u

karcinomu dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima imaju kraće ukupno vreme preživljavanja i kraći vremenski period bez znakova bolesti, u odnosu na pacijentkinje istog stadijuma bolesti sa nižim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa.

- Granična vrednost Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off) u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima od prognostičkog značaja za dužinu preživljavanja bez znakova bolesti i ukupno vreme preživljavanja iznosi 20%.

3

MATERIJAL I METODE

3.1. NAČIN IZBORA, VELIČINA I KONSTRUKCIJA UZORKA

Studijom je obuhvaćeno 120 bolesnica obolelih od karcinoma dojke, koje su operisane na Institutu za onkologiju Vojvodine u periodu od 01.01.2009. godine do 31.12.2011. godine, a kojima je imunohistochemijskom analizom dokazano da se radi o karcinomu dojke pozitivnom na hormonske receptore (ER, PR), a negativnom na HER2 - luminal A i luminal B karcinom dojke, bez metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova (stadijum bolesti pN0), čiji je postoperativni tok bolesti redovno kontrolisan po standardnom protokolu za rani karcinom dojke (jednom godišnje načinjeni mamografija i klinički pregled).

Pratiće se vreme do pojave recidiva i/ili metastatskog depozita bolesti u odnosu na visinu indeksa Ki-67, kao i ostali pomenuti prognostičko-prediktivni parametri tumora.

U studiju nisu uključene pacijentkinje kojima je dokazan karcinom dojke koji je negativan na hormonske receptore, kao i karcinom dojke sa HER2 ekspresijom (HER2-pozitivan luminal B, non-luminal HER2 pozitivan i trostruko negativni karcinomi dojke). Takođe, u studiju nisu uključene pacijentkinje sa prisutnim metastatskim depozitima u aksilarnim limfnim čvorovima, one sa multifokalnim i difuznim tipom karcinoma, one koje su primile preoperativnu terapiju, kao ni one o čijem praćenju kliničkog toka bolesti nedostaju potrebni podaci.

Celokupna histološka, imunohistohemijska i in situ hibridizaciona metoda obavljena je u Službi za patološko-anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku Instituta za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica.

Istraživanje je sprovedeno u tri faze.

Prva faza - RETROSPEKTIVNA ANALIZA PODATAKA

Uvidom u arhivu patohistoloških nalaza Službe za patološko-anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku Instituta za onkologiju Vojvodine izvršen je odabir pacijentkinja koje ispunjavaju uslove za uključivanje u studiju. Ponovljena je patohistološka analiza postojećih kalupa (isečci tkiva uzeti za standardnu, postoperativnu patohistološku analizu), bojenih hematoksilin-eozin metodom (hematoxylin-eosin, HE) i imunohistohemijskim bojenjem na primenjena monoklonska antitela ER, PR i HER2. Reprezentativni kalup sa uzorkom tumorskog tkiva karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima, a bez HER2 ekspresije, i ukoliko pacijentkinja nije imala tumorski izmenjene aksilarne limfne čvorove (stadijum bolesti pN0), odabran je za dalje dodatno imunohistohemijsko ispitivanje.

Druga faza – IMUNOHISTOHEMIJSKA ANALIZA

Imunohistohemijska analiza tkiva urađena je u Službi za patološko-anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku Instituta za onkologiju Vojvodine. Iz uzoraka tkiva, nakon standardne procedure pripreme tkiva za imunohistohemijsko bojenje, primenjena je analiza sa primarnim monoklonskim antitelom:

- Ki-67

Istovremeno su se prikupljali podaci o kliničkom toku bolesti nakon operacije iz bolničkog informacionog sistema („Birpis“).

Treća faza - INTERPRETACIJA IMUNOHISTOHEMIJSKIH NALAZA

Sprovedena je semikvantitativna procena ekspresije primenjenog antitela u tkivu nakon imunohistohemijske analize, kao i statistička obrada podataka sa analizom dobijenih rezultata u cilju donošenja zaključka. Analizirana je pozitivna jedarna reakcija na 200 tumorskih ćelija (procentualno) u „hot spot“ regijama tumora i u perifernim delovima tumora.

3.2. METODE KOJE SU BILE PRIMENJENE

Iz patohistoloških nalaza arhive Službe za patološko-anatomsku i laboratorijsku dijagnostiku Instituta za onkologiju Vojvodine izvršen je odabir pacijenata koji ispunjavaju uslove za uključivanje u studiju. Naime, izdvojeni su patohistološki nalazi karcinoma dojke koji su pozitivni na hormonske receptore (estrogen i progesteron), a koji su bez HER2 ekspresije i bez metastatski izmenjenih limfnih čvorova (pN0 stadijum bolesti). Sa istih patohistoloških nalaza preuzeti su podaci o veličini tumora koja je određena makroskopski, merenjem lenjirom, a vrednosti iskazane u milimetrima (pri linearnom merenju određuje se najveći dijametar promene, ako je makroskopski uočljivo tumorsko tkivo). Takođe su preuzeti podaci o stepenu tumorske diferencijacije (histološki gradus), kao i starosna dob pacijentkinje.

Patohistološki nalazi koji su korišćeni u studiji sačinjeni su na osnovu histološke analize odabranih uzoraka tkiva koji su fiksirani su u 10% formalinu, kalupljeni u parafin i sečeni na rezove debljine 3-5 μm . Deparafinisani tkivni iseći bojeni su standardnom metodom hematoksilin-eozin. Ovako pripremljeni histološki preparati su analizirani svetlosnim mikroskopom.

Ekspresija standardnih prognostičkih parametara u ćelijama karcinoma (receptora estrogena i progesterona i HER2) deo je standardne histopatološke analize, i vršena je na osnovu opšte prihvaćenih kriterijuma. Ocena imunohistohemijske ekspresije receptora estrogena i progesterona u karcinomu dojke vršena je primenom Allred bodovnog sistema (Allred scoring system), koji uzima u obzir procenat ćelija koje pokazuju nuklearno (jedarno) bojenje i intenzitet tog bojenja (DACO, Pathology, ER/PR PharmDx, Interpretation Manual, 2007).

Na osnovu procenta ćelija dodeljena je vrednost:

- (0) – nema jedarnog bojenja,
- (1) – manje od 1% karcinomskih ćelija pokazuje jedarno bojenje,
- (2) – 1-10% karcinomskih ćelija pokazuje jedarno bojenje,
- (3) – 11-33% karcinomskih ćelija pokazuje jedarno bojenje,
- (4) – 34-66% karcinomskih ćelija pokazuje jedarno bojenje,
- (5) – 67-100% karcinomskih ćelija pokazuje jedarno bojenje.

Na osnovu intenziteta bojenja dodeljuje se vrednost:

- (0) – nema bojenja,
- (1) – slabo,
- (2) – umereno i
- (3) – jako bojenje.

Allred skor jednak je numeričkom zbiru (skoru) vrednosti dodeljenih u odnosu na procenat ćelija i intenziteta bojenja, pa se skor 0-2 smatra negativnim, skor 3-5 smatra se slabo pozitivnim, a skor 6-8 smatra se izrazito pozitivnim (DACO, Pathology, ER/PR PharmDx, Interpretation Manual, 2007).

HER2 testiranje standardno se vrši za invazivne karcinome, a kriterijumi za ocenu imunohistohemijske reakcije kod HER2 testiranja su:

- 0 – nema membranskog bojenja ili je obojeno manje od 10% tumorskih ćelija,
- 1+ –parcijalno i slabo bojenje membrane u više od 10% tumorskih ćelija,
- 2+ –slabo bojenje kompletne membrane u više od 10% ili jako bojenje nekompletne membrane u manje od 10% tumorskih ćelija,
- 3+ –intenzivno bojenje kompletne membrane u više od 10% tumorskih ćelija.

Svi slučajevi sa HER2 skorom 2+ bili su retestirani, u cilju utvrđivanja postojanja genske amplifikacije korišćenjem sistema HER2 in situ hibridizacije (CISH ili SISH) (DACO, Education, HercepTest, Interpretation Manual, Breast cancer, 2014).

Stadijum tumorske bolesti karcinoma dojke, prema utvrđenim standardima, određen je na osnovu p (patološke) TNM klasifikacije karcinoma dojke na osnovu TNM sistema Američkog udruženog odbora za karcinome (148).

Stepen histološke diferencijacije tumorskog tkiva, prema utvrđenim standardima, određen je semikvantitativno po modifikovanom Bloom-Richardson sistemu gradiranja (modifikovan od strane Elston i Ellis-a) (73).

Na osnovu dobijenih rezultata imunohistohemijskih analiza sačinjen je postojeći patohistološki izveštaj.

➤ Dodatna imunohistohemijska obrada materijala

Parafinski kalupi reprezentativnih uzoraka tumorskog tkiva bojenih HE metodom bili su izdvojeni za dalju imunohistohemijsku analizu. Dalja obrada je obuhvatila:

- 1) sečenje parafinskih kalupa na debljinu 3-5µm,
- 2) deparafinizaciju isečaka,
- 3) blokiranje endogene peroksidaze (3% H₂O₂, 5 minuta),
- 4) demaskiranje antigena (10mM citratnim puferom, pH 6,0),
- 5) ispiranje dejonizovanom vodom.

Imunohistohemijska identifikacija ispitivanih antigena vršena je primenom streptavidin-biotin-peroksidaza tehnike, prema standardnoj LSAB+ proceduri (DACO). Kao hromogeni supstrat korišćen je 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, DACO). Nakon svakog inkubiranja uzorci su ispirani u Tris puferisanom rastvoru (TBS: 0,05 M, pH 7,6) i kontrastirani hematoksilinom. Zatim je primenjeno primarno monoklonsko antitelo:

- Ki-67

➤ Interpretacija imunohistohemijskih nalaza i morfometrijska analiza

Način vrednovanja ekspresije imunohistohemijskih analiza:

Proliferativni indeks (Ki-67 pozitivne tumorske ćelije) tumora predstavlja procenat tumorskih ćelija u kojima se verifikuje jedarno bojenje. Izražava se kao procenat tumorskih ćelija koje pokazuju jedarnu reakciju bilo kog intenziteta, procenjen na 200 ćelija u jednom vidnom polju u kojem ima najviše obojenih jedara (hot spot), a zatim i u vidnom polju na perifernom delu tumora (28). Određivanje Ki-67 indeksa je vršeno manuelnom metodom (brojanje pozitivnih karcinomskih jedara).

Za primenjeno antitelo koristila se pozitivna i negativna kontrola.

➤ Primenjene metode statističke obrade podataka

Pri analizi podataka upotrebljavali su se odgovarajući parametrijski i neparametrijski testovi, izračunati su pokazatelja centralne tendencije obeležja (aritmetička sredina, medijana), kao i apsolutne mere disperzije obeležja - standardne devijacije. Metoda po Kaplan-Majeru i KOKS-ov regresijski model je primenjivan za analizu preživljavanja. Za nivo statističke značajnosti je uzet $p < 0,05$. Da bi se utvrdilo postojanje statističkih veza između pojava izračunat je koeficijent korelacije (Pirsonov test korelacije ili kapa koeficijent). Rezultati su prikazani grafički i tabelarno. Za prikaz „cut off“ vrednosti kontinuirane varijable Ki67 proliferativnog markera korišćene su statističke „ROC“ krive.

Obrada podataka rađena je primenjivanjem standardnih statističkih paketa (SPSS).

4

REZULTATI

4.1. Deskriptivna statistika i frekvencija kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima

Studijom je obuhvaćeno 120 pacijentkinja obolelih od karcinoma dojke, kojima je imunohistohemijskom analizom dokazano da se radi o karcinomu dojke pozitivnom na hormonske receptore (ER, PR) - luminal A i luminal B karcinom dojke, bez metastatski izmenjenih aksilarnih limfnih čvorova.

U sprovedenoj studiji prosečna starost pacijentkinja iznosila je $57,42 \pm 10,17$ godina; najmlađa operisana pacijentkinja imala je 30 godina, dok je najstarija imala 78 godina. Prosečna veličina tumorskog čvora bila je $17,98 \pm 6,97$ mm; najmanji tumorski čvor bio je veličine 2 mm, dok je najveća veličina čvora iznosila 45 mm.

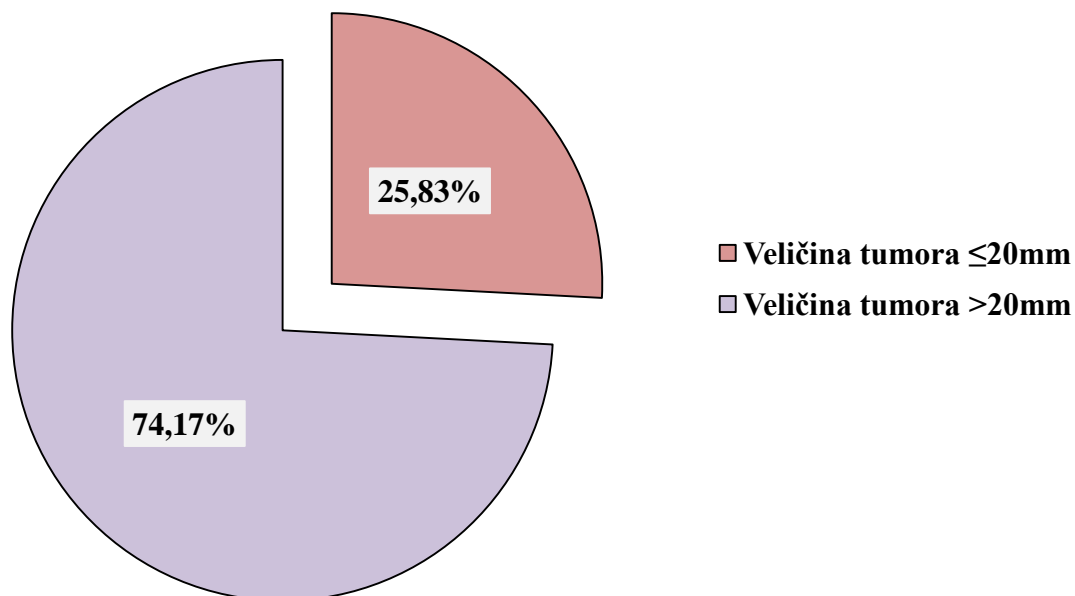
Posmatrajući vreme postoperativnog praćenja bolesnica, prosečna dužina vremenskog praćenja ispitivanih pacijentkinja nakon operacije tumora iznosila je $72,92 \pm 8,38$ meseca; najkraće vreme praćenja bilo je 60 meseci, dok je najduže bilo 90 meseci.

Recidiv je registrovan samo kod 8 (6,7%) pacijentkinja, dok većina ispitivanih pacijentkinja nije imala recidiv bolesti u analiziranom vremenskom periodu (112, odnosno 93,3% pacijentkinja). Prosečne vrednosti vremena do pojave recidiva bile su $49 \pm 20,23$ meseci; najkraće vreme do pojave recidiva iznosilo je 13 meseci, dok je najduže bilo 71 mesec (Tabela 4.1.1.).

Tabela 4.1.1.

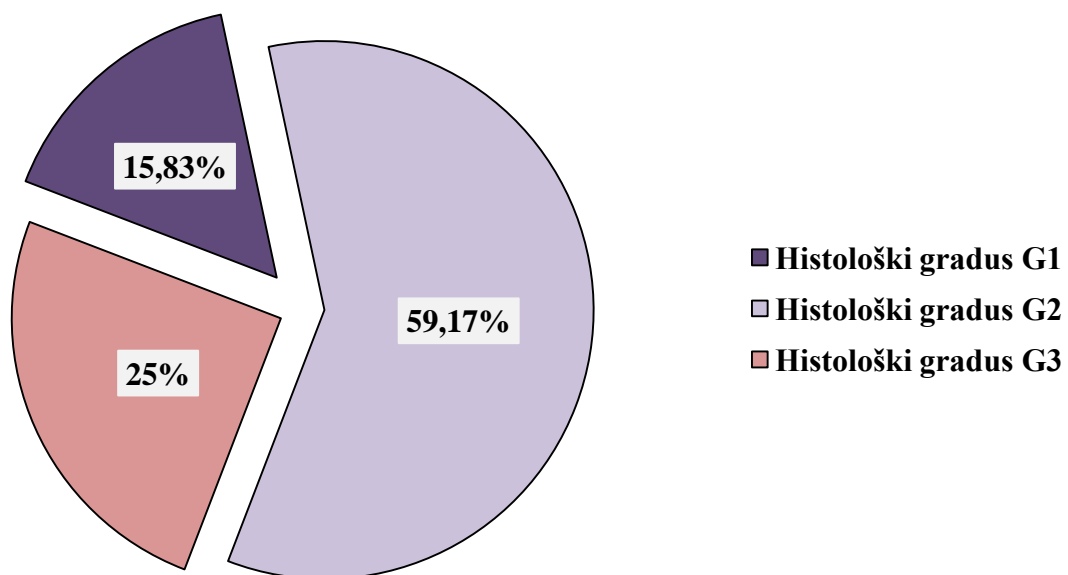
Deskriptivna statistika kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima

Starost (godine)	Srednja vrednost	57,42
	Medijana	59
	Standardna devijacija	10,17
	Minimum	30
	Maksimum	78
Veličina tumora (mm)	Srednja vrednost	17,98
	Medijana	17
	Standardna devijacija	6,97
	Minimum	2
	Maksimum	45
Vreme praćenja (meseći)	Srednja vrednost	72,92
	Medijana	73,6
	Standardna devijacija	8,38
	Minimum	60
	Maksimum	90
Vreme do pojave recidiva (meseći)	Srednja vrednost	49,25
	Medijana	55,50
	Standardna devijacija	20,23
	Minimum	13
	Maksimum	71



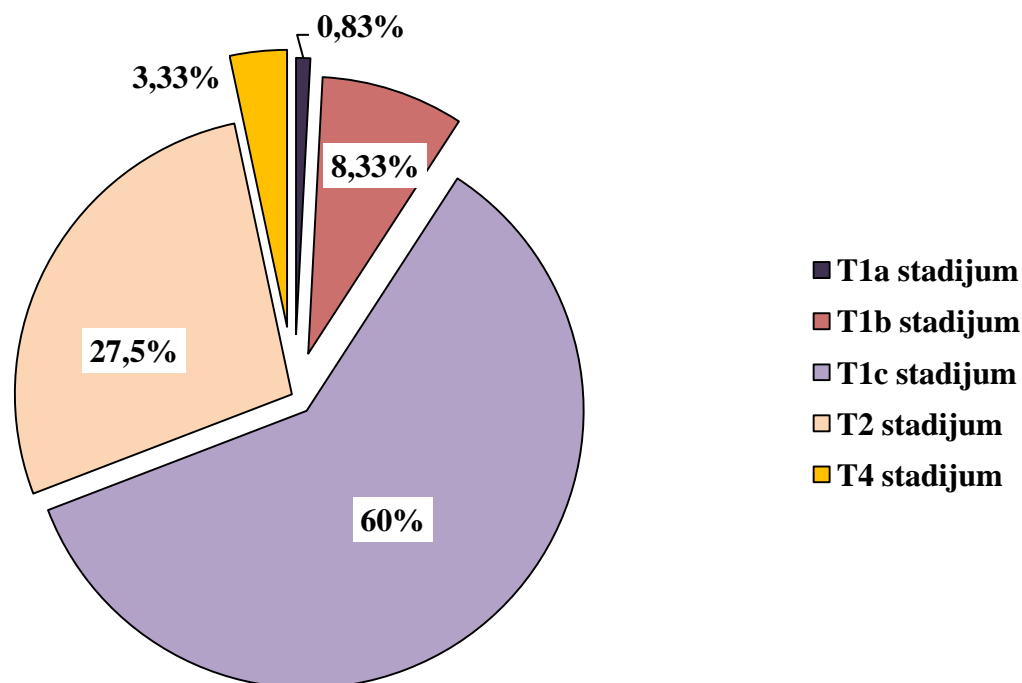
Grafikon 4.1.1. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u zavisnosti od veličine tumora

U ispitivanom uzorku, kod 31 (25,83%) pacijentkinje pokazalo se da je tumor manji ili jednak 20 mm, dok je kod 89 (74,17%) pacijentkinja utvrđeno da je tumor veći od 20 mm (Grafikon 4.1.1.).



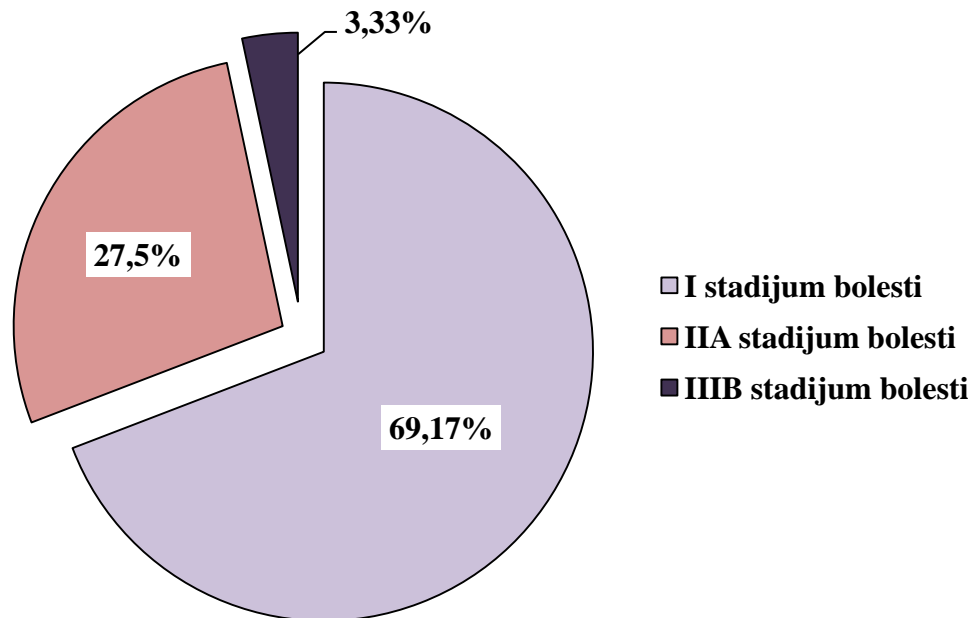
Grafikon 4.1.2. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na histološku diferentovanost tumora

Analizom stepena histološke diferentovanosti tumora, može se uočiti da je u datom uzorku 19 (15,83%) malignih tumora bilo dobro diferentovano (G1), 71 (59,17%) malignih tumora bilo je umereno diferentovano (G2), dok je 30 (25%) malignih tumora bilo slabo diferentovano (G3) (Grafikon 4.1.2.).



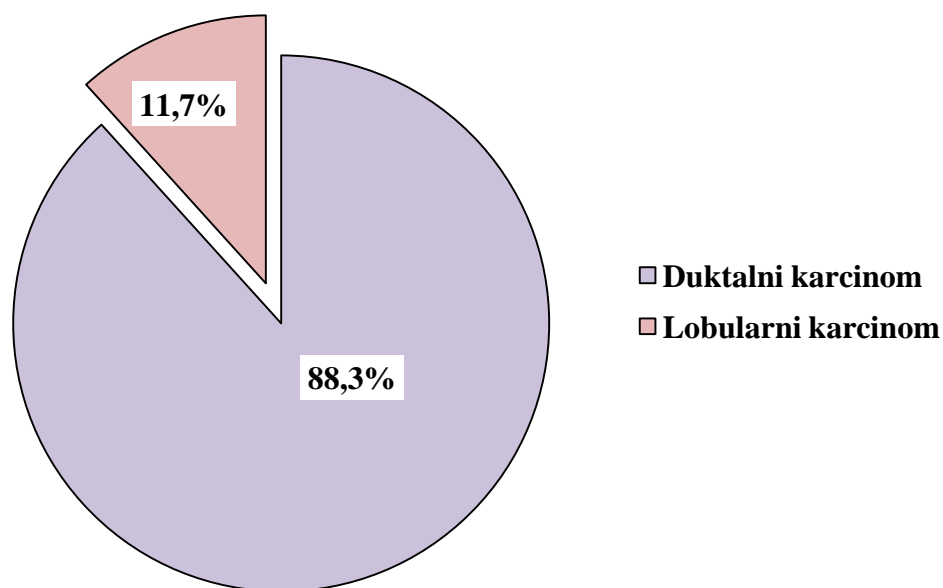
Grafikon 4.1.3. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na T stadijum bolesti

Većina ispitivanih pacijentkinja (60%) pripadalo je T1c stadijumu bolesti, manji deo (27,5%) bio je u T2 stadijumu, 8,33% pacijentkinja pripadalo je T1b stadijumu, dok se najmanji deo (0,83%) nalazio u T1a stadijumu bolesti. Iako se radilo o luminalnim karcinomima, u uzorku je zabeleženo i 3,33% slučajeva stadijuma T4 (Grafikon 4.1.3.).



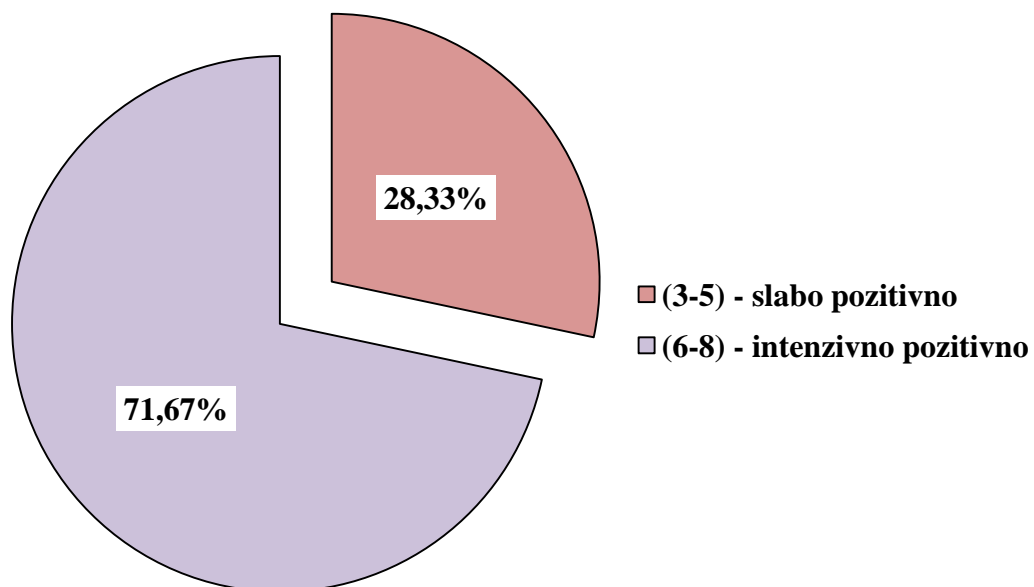
Grafikon 4.1.4. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na anatomske stadijume bolesti

Posmatrajući anatomske-prognostičke stadijume bolesti, najveći broj pacijentkinja se nalazio u I stadijumu ove maligne bolesti, a zatim u stadijumu IIA (Grafikon 4.1.4.). Stadijum IIB nije registrovan u ispitivanom uzorku, a stadijumi IIIA, IIIC i IV po definiciji obuhvataju tumore sa metastatski izmenjenim limfnim čvorovima, te svakako nisu registrovani.



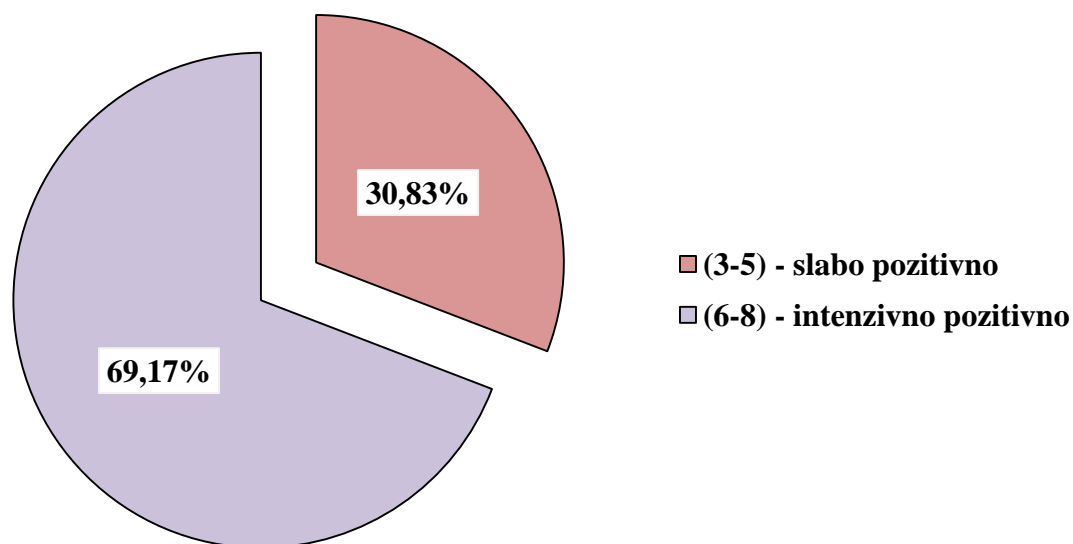
Grafikon 4.1.5. Procentualna zastupljenost histološkog tipa invazivnog karcinoma dojke

Analizirajući histološki tip karcinoma dojke, duktalni infiltrativni karcinom dojke uočen je kod 106 (88,3%) pacijentkinja. Kod preostalih 14 (11,7%) pacijentkinja u ispitivanom uzorku registrovan je lobularni infiltrativni karcinom dojke (Grafikon 4.1.5.).



Grafikon 4.1.6. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na jačinu ekspresije estrogenskih receptora po Allred scor-u

Analizom intenziteta pozitivnosti estrogenskih receptora, u ispitivanom uzorku utvrđeno je da se kod 37 (28,33%) pacijentkinja radilo o slabo pozitivnoj reakciji, dok je kod 83 (71,67%) pacijentkinja bila izražena intenzivna estrogenska ekspresija (Grafikon 4.1.6.).



Grafikon 4.1.7. Procentualna zastupljenost pacijentkinja u odnosu na jačinu ekspresije progesteronskih receptora po Allred scor-u

Analizom intenziteta pozitivnosti progesteronskih receptora u ispitivanom uzorku utvrđeno je da se kod 34 (30,83%) pacijentkinja radilo o slabo pozitivnoj reakciji, dok je kod 86 (69,17%) pacijentkinja bila izražena intenzivna progesteronska ekspresija (Grafikon 4.1.7.).

4.2. Stepen Ki-67 indeksa tumorske proliferacije u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima u područjima “hot spot” i invazivnog tumorskog ruba

U sprovedenoj studiji utvrđena je srednja vrednost Ki-67 indeksa tumorske proliferacije u područjima “hot spot” i iznosila je $22,92 \pm 15,2$ procenata; najniži indeks je bio 3 procenta, dok je najviši bio 90 procenata. U području invazivnog tumorskog ruba srednja vrednost Ki-67 indeksa iznosila je $16,1 \pm 12,62$ procenata; najniži indeks je bio 1 procenat, dok je najviši bio 80 procenata (Tabela 4.2.1.).

Tabela 4.2.1.
Deskriptivna statistika vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa

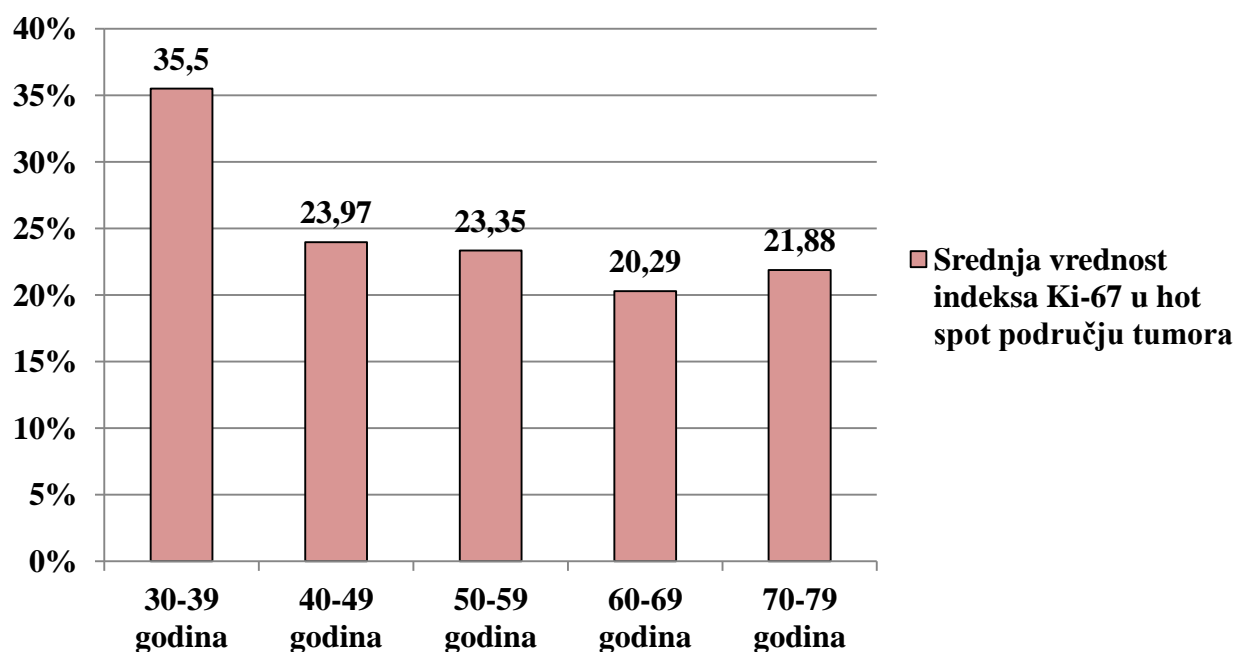
Lokalizacija u tumoru		%
“hot spot”	Srednja vrednost (x)	22,92
	Medijana (Md)	20,00
	Standardna devijacija (SD)	15,20
	Minimum	3,0
	Maksimum	90,0
rub	Srednja vrednost (x)	16,10
	Medijana (Md)	13,50
	Standardna devijacija (SD)	12,62
	Minimum	1,0
	Maksimum	80,0

Vrednosti proliferativnog indeksa nisu imale normalnu raspodelu, te je za potrebe ispitivanja razlike u vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa u okviru područja “hot spot” i invazivnog ruba tumora korišćen neparametarski Man-Vitnijev U test.

Man-Vitnijev-im U testom dokazana je značajna statistička razlika između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa dobijenog analizom tumorskih područja “hot spot” (Md=20) i vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa na invazivnom rubu tumora (Md=13,5), U=4980, Z=-4,131, p=0,000036.

Tabela 4.2.2. Hot spot vrednost Ki-67 po starosnim grupama pacijentkinja

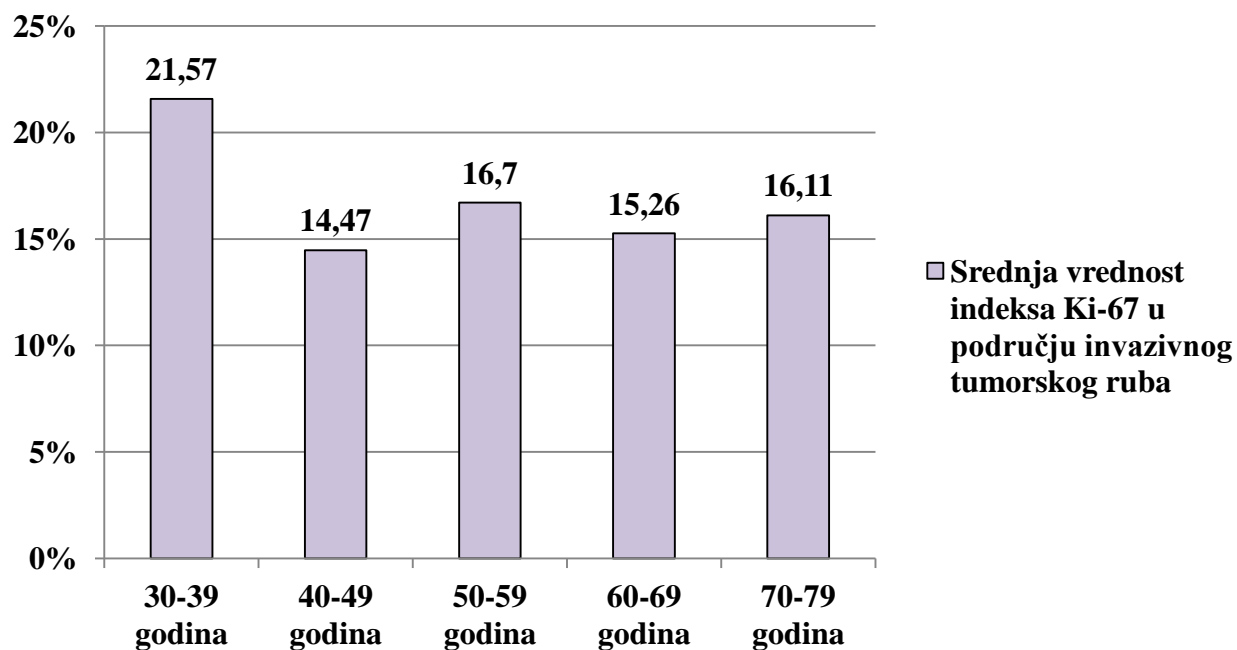
Starosne grupe	Srednja vrednost Ki-67 hotspot	Broj pacijentkinja
30-39 godina	35,50±28,12	7
40-49 godina	23,97±9,10	17
50-59 godina	23,35±17,23	41
60-69 godina	20,30±12,59	42
70-79 godina	21,88±11,56	13

**Grafikon 4.2.1. Vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 u hot spot područjima posmatrano po starosnim grupama pacijentkinja**

Starosnom stratifikacijom analiziranih pacijentkinja uočeno je da se u “hot spot” područjima tumora najviša vrednost proliferativnog indeksa ostvaruje kod najmlađih pacijentkinja (prosečna vrednost Ki-67 je 35,5%), u odnosu na pacijentkinje starijih starosnih grupa. Najnižu vrednost indeksa Ki-67 imale su pacijentkinje starosti od 60-69 godina (prosečna vrednost Ki-67 je 20,29%) (Tabela 4.2.2.). Navedeni rezultati su grafički prikazani (Grafikon 4.2.1.).

Tabela 4.2.3. Vrednost Ki-67 na rubu tumora po starosnim grupama pacijentkinja

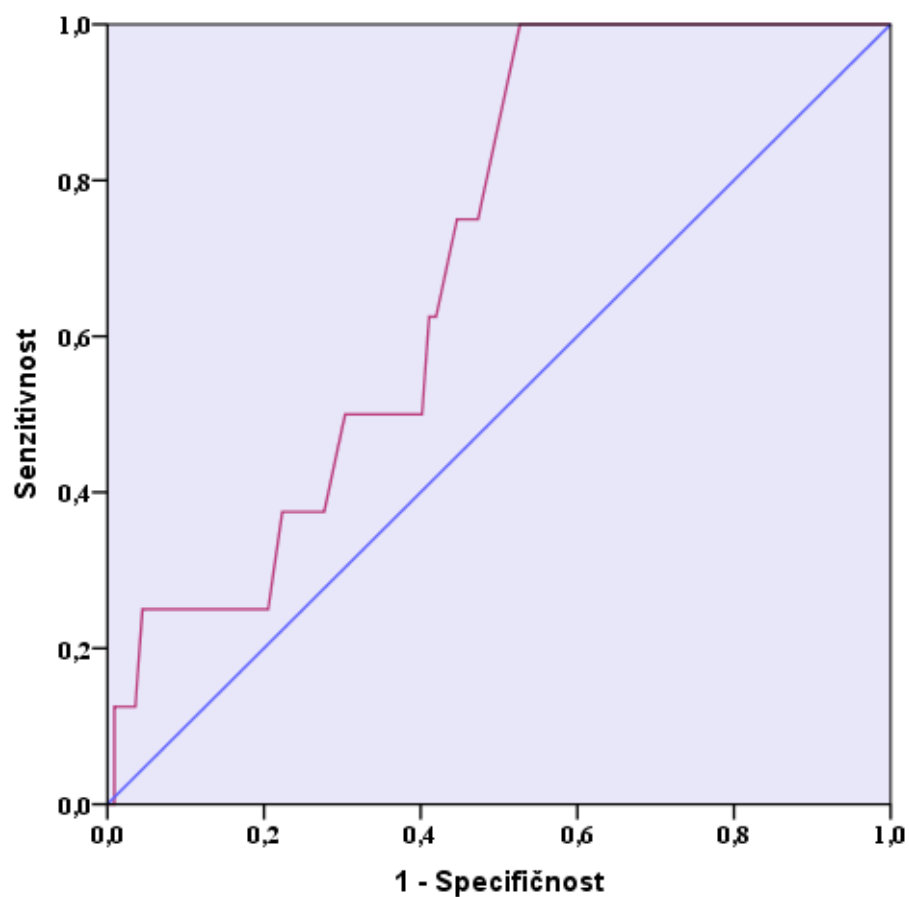
Starosne grupe	Srednja vrednost Ki-67 rub	Broj pacijentkinja
30-39 godina	21,57±18,45	7
40-49 godina	14,47±4,87	17
50-59 godina	16,71±14,65	41
60-69 godina	15,26±12,97	42
70-79 godina	16,12±7,90	13

**Grafikon 4.2.2. Vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 na rubu tumora posmatrano po starosnim grupama pacijentkinja**

Posmatrajući vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 na tumorskom rubu u odnosu na starosnu stratifikaciju analiziranih pacijentkinja uočeno je, kao i u slučaju “hot spot” područja, da se najviša vrednost ostvaruje kod najmlađih pacijentkinja (prosečna vrednost Ki-67 je 21,57%), u odnosu na pacijentkinje viših starosnih grupa (Tabela 4.2.3.). Navedeni rezultati su grafički prikazani (Grafikon 4.2.2.).

4.3. Utvrđivanje granične (cut off) vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa uz pomoć ROC krive

Granična vrednost (cut off) Ki-67 proliferativnog indeksa kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva iznosi 20,75% (Grafikon 4.3.1.).



Grafikon 4.3.1. ROC kriva za određivanje graničnih (cut off) vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa kod analiziranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima

Koordinate ROC krive			Koordinate ROC krive (nastavak tabele)		
Ki-67 indeks	Senzitivnost	1 - Specifičnost	Ki-67 indeks	Senzitivnost	1 - Specifičnost
2,000	1,000	1,000	21,500	,625	,420
3,250	1,000	,982	22,250	,625	,411
3,750	1,000	,973	23,750	,500	,402
4,250	1,000	,955	25,750	,500	,375
4,750	1,000	,946	26,750	,500	,366
5,500	1,000	,893	27,250	,500	,348
6,250	1,000	,884	27,750	,500	,321
6,750	1,000	,857	28,250	,500	,313
7,250	1,000	,839	29,250	,500	,304
7,750	1,000	,830	30,250	,375	,277
8,750	1,000	,821	30,750	,375	,268
9,750	1,000	,813	31,750	,375	,259
10,250	1,000	,759	32,750	,375	,232
10,750	1,000	,750	33,250	,375	,223
11,250	1,000	,741	34,250	,250	,205
11,750	1,000	,723	35,250	,250	,170
12,250	1,000	,714	35,750	,250	,152
13,000	1,000	,688	36,750	,250	,134
14,000	1,000	,670	38,750	,250	,125
14,750	1,000	,652	40,500	,250	,080
15,500	1,000	,589	41,250	,250	,071
16,250	1,000	,580	42,000	,250	,063
16,750	1,000	,571	42,750	,250	,054
17,250	1,000	,563	44,000	,250	,045
17,750	1,000	,545	47,500	,125	,036
18,250	1,000	,536	60,000	,125	,018
19,250	1,000	,527	75,000	,125	,009
20,250	,750	,473	85,000	,000	,009
20,750	,750	,446	91,000	,000	,000

4.4. Povezanost vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa sa kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma dojke

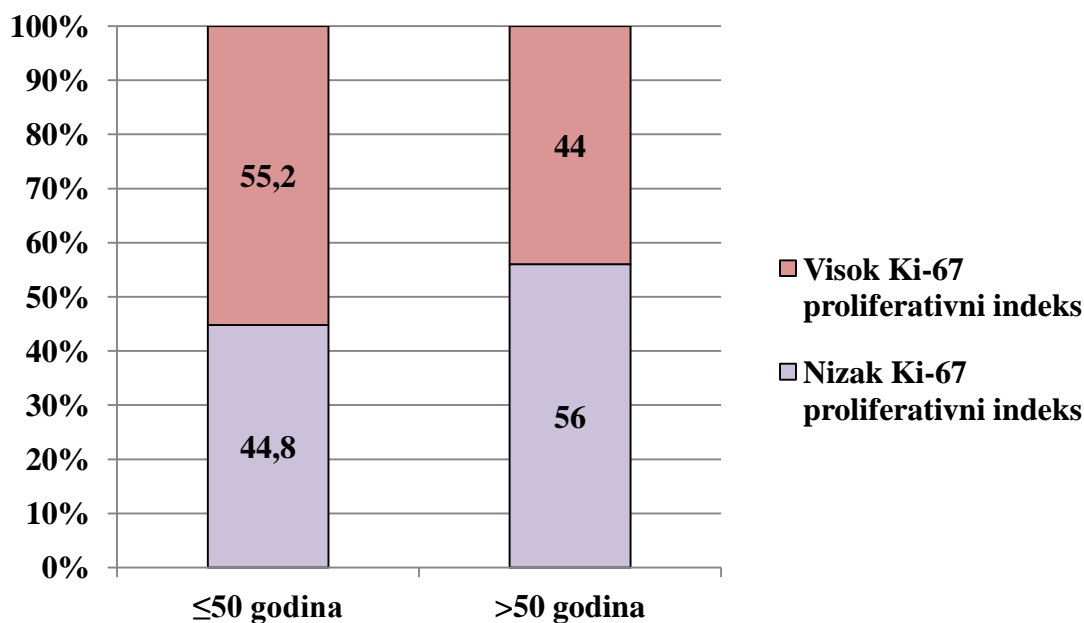
Kako bi se ispitala povezanost vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 sa starosnom dobi pacijentkinja, veličinom tumora, histološkim gradusom i stepenom pozitivne ekspresije estrogen i progesteron receptora, primenjen je niz χ^2 testova za nezavisne uzorke i niz Kendal τ (tau) – b testova za ispitivanje korelacije ordinalnih vrednosti. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.4.1. i u grafikonima koji slede.

Tabela 4.4.1.

Povezanost Ki-67 proliferativnog indeksa i kliničko patoloških karakteristika karcinoma dojke

	Nizak Ki-67 indeks (cut off $\leq 20,75\%$)	Visok Ki-67 indeks (cut off $> 20,75\%$)	χ^2 / p nivo	Kendal τ – b / p nivo
Godine starosti			0,707 / 0,401	-0,096 / 0,293
≤ 50 godina	13 (10.8%)	16 (13.3%)		
> 50 godina	51 (42.5%)	40 (33.3%)		
Veličina tumora			4,427 / 0,035*	0,211 / 0,020*
≤ 20 mm	53 (44.2%)	36 (30.0%)		
> 20 mm	11(9.2%)	20 (16.7%)		
Histološki gradus			6,411 / 0,041*	0,195 / 0,020*
G1	15 (12.5%)	4 (3.3%)		
G2	36 (30.0%)	35 (29.2%)		
G3	13 (10.8%)	17 (14.2%)		
Estrogen receptor (po Allred-u)			0,00 / 1,00	-0,005 / 0,957
3-5 (slabo)	18 (15.0%)	16 (13.3%)		
6-8 (izrazito)	46 (38.3%)	40 (33.3%)		
Progesteron receptor (po Allred-u)			1,202 / 0,273	0,118 / 0,189
3-5 (slabo)	23 (19.2%)	14 (11.7%)		
6-8 (izrazito)	41 (34.2%)	42 (35.0%)		

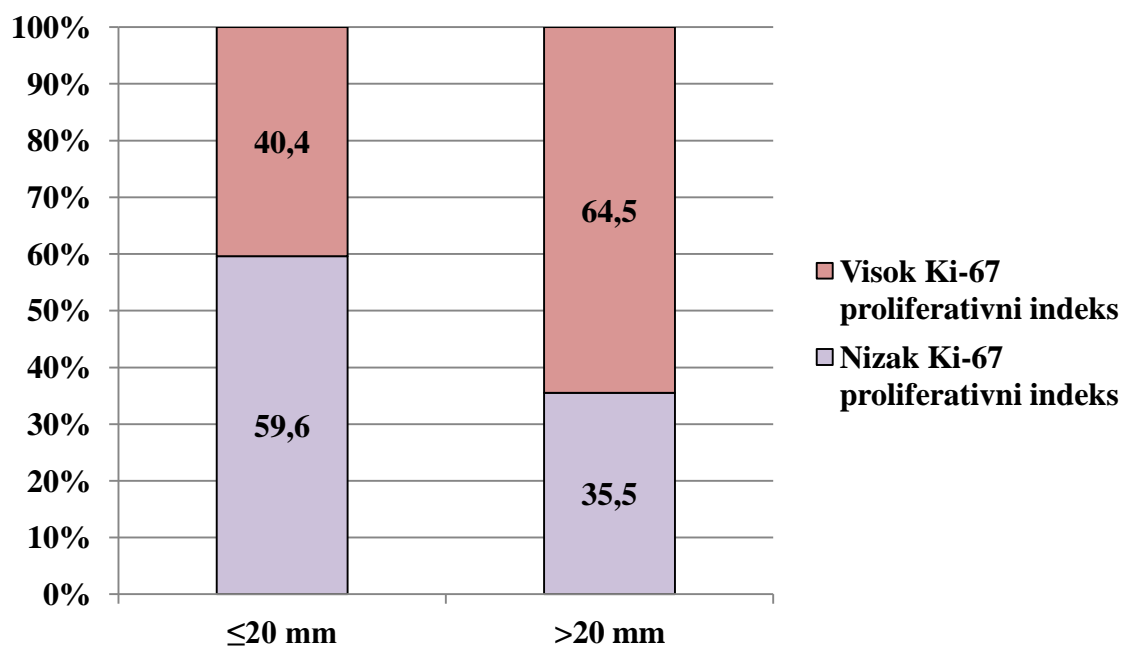
* postoji statistički značajna razlika



Grafikon 4.4.1. Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od starosti

U grupi pacijentkinja ≤50 godina, 13 (44,8%) pacijentkinja imalo je nizak Ki-67 indeks, dok je 16 (55,2%) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks. U grupi pacijentkinja od 50 i više godina, 51 (56%) pacijentkinja imalo je nizak Ki-67 indeks, dok je njih 40 (44%) imalo visok Ki-67 indeks (Tabela 4.4.1.). Kao cut off vrednost korišćena je dobijena vrednost indeksa Ki-67 kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva (≤20,75%).

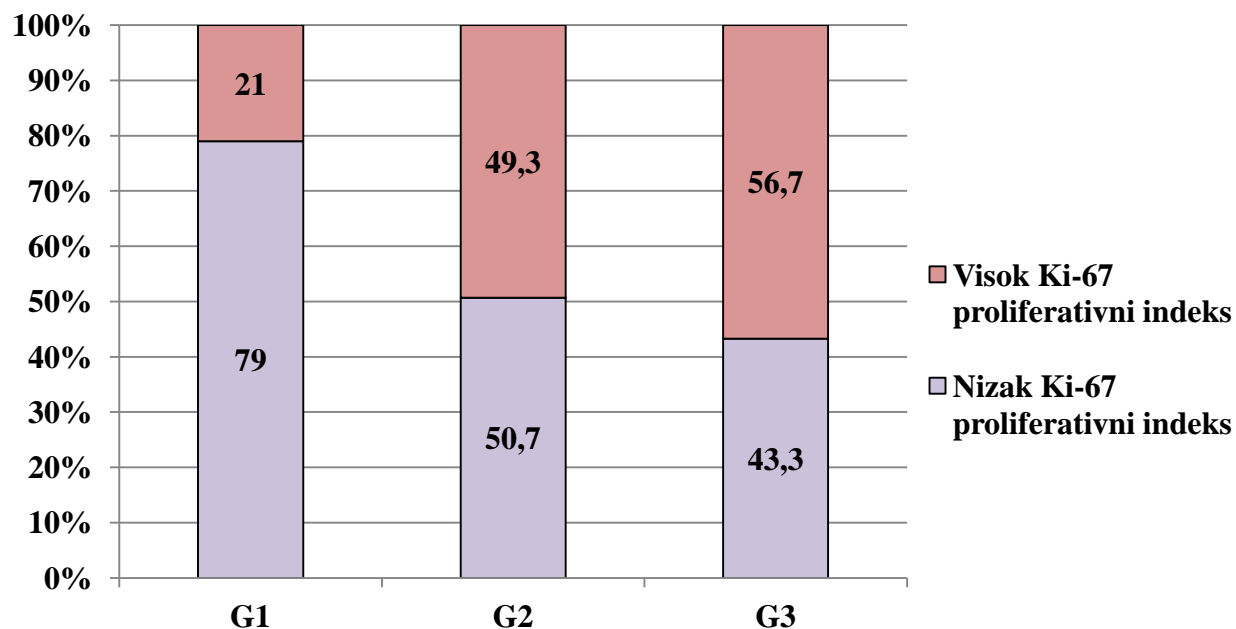
χ^2 test je pokazao da između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i godina starosti pacijentkinja ne postoji statistički značajna veza ($p=0,401$). Kendal τ -b test pokazuje negativnu korelaciju koja nije signifikantna ($p=0,293$) (Grafikon 4.4.1.).



Grafikon 4.4.2. Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od veličine tumora

U grupi tumora koji su veličine ≤ 20 mm, 53 (59,6%) pacijentkinje je imalo nizak Ki-67 indeks, dok je 36 (40,4%) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks. U grupi tumora koji su veličine > 20 mm, 11 (35,5%) je imalo nizak Ki-67 indeks, dok je 20 (64,5%) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks (Tabela 4.4.1.). Kao cut off vrednost korišćena je dobijena vrednost indeksa Ki-67 kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva ($\leq 20,75\%$).

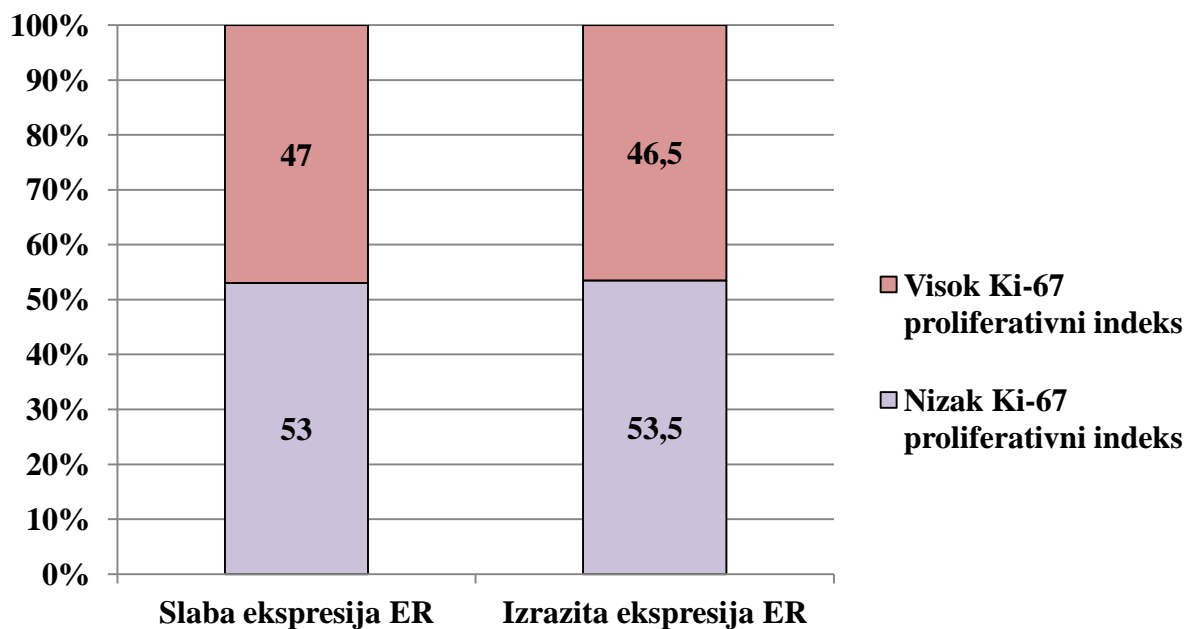
χ^2 test je pokazao da između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i veličine tumora postoji statistički značajna povezanost ($p=0,035$). Kendal τ -b test pokazuje slabu pozitivnu signifikantnu korelaciju ($p=0,02$) (Grafikon 4.4.2.).



Grafikon 4.4.3. Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od histološkog gradusa tumora

U grupi dobro diferentovanih tumora (G1), 79% (15) pacijentkinja je imalo nizak Ki-67 indeks, dok je 21% (4) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks. U grupi srednje diferentovanih tumora (G2), 50,7% (36) pacijentkinja je imalo nizak Ki-67 indeks, dok je 49,3% (35) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks. U grupi loše diferentovanih tumora (G3), 43,3% (13) pacijentkinja je imalo nizak Ki-67 indeks, dok je 56,7% (17) pacijentkinja imalo visok Ki-67 indeks (Tabela 4.4.1.). Kao cut off vrednost korišćena je dobijena vrednost indeksa Ki-67 kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva ($\leq 20,75\%$).

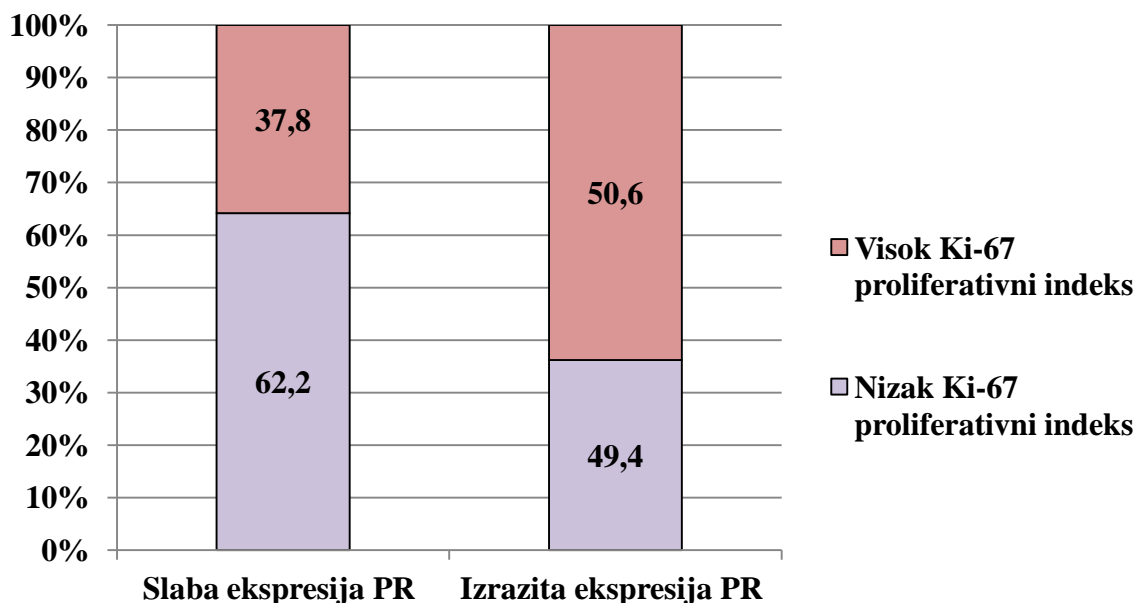
χ^2 test je pokazao da između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i histološkog gradusa postoji statistički značajna povezanost ($p=0,041$). Kendal τ -b test pokazuje slabu pozitivnu signifikantnu korelaciju (0,02) (Grafikon 4.4.3.).



Grafikon 4.4.4. Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od intenziteta ekspresije estrogen receptora

U odnosu na Allred skor, u grupi tumora koji su imali slabu estrogensku ekspresiju (vrednost Allred skora 3-5), nalazilo se 53% (18) pacijentkinja koje su imale nizak Ki-67 indeks, dok je kod 47% (16) pacijentkinja bio prisutan visok Ki-67 indeks. U grupi tumora koji su imali izraženu estrogensku ekspresiju (vrednost Allred skora 6-8), nalazilo se 53,5% (46) pacijentkinja koje su imale nizak Ki-67 indeks, dok je kod 46,5% (40) pacijentkinja bio prisutan visok Ki-67 indeks (Tabela 4.4.1.). Kao cut off vrednost korišćena je dobijena vrednost indeksa Ki-67 kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva ($\leq 20,75\%$).

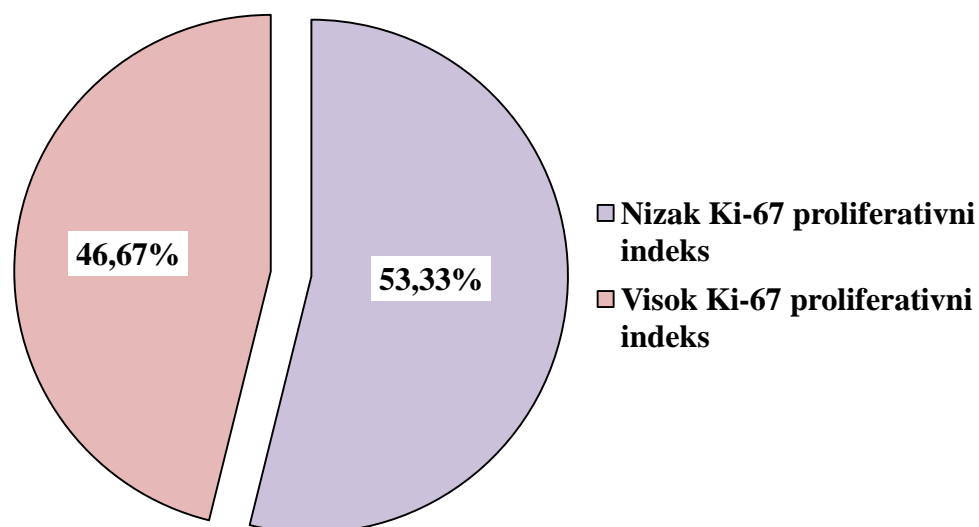
χ^2 test je pokazao da između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i jačine ekspresije ER ne postoji statistički značajna povezanost ($p=1,00$). Kendal τ -b test pokazuje skoro pa nepostojeću, negativnu korelaciju koja nije signifikantna ($p=0,957$) (Grafikon 4.4.4.).



Grafikon 4.4.5. Raspored pacijentkinja niskog i visokog Ki-67 proliferativnog indeksa u zavisnosti od intenziteta ekspresije progesteron receptora

U odnosu na Allred skor, u grupi tumora koji su imali slabu progesteronsku ekspresiju (vrednost Allred skora 3-5), nalazilo se 62,2% (23) pacijentkinja koje su imale nizak Ki-67 indeks, dok je kod 37,8% (14) pacijentkinja bio prisutan visok Ki-67 indeks. U grupi tumora koji su imali izraženu progesteronsku ekspresiju (vrednost Allred skora 6-8), nalazilo se 49,4% (41) pacijentkinja koje su imale nizak Ki-67 indeks, dok je kod 50,6% (42) pacijentkinja bio prisutan visok Ki-67 indeks (Tabela 4.4.1.). Kao cut off vrednost korišćena je dobijena vrednost indeksa Ki-67 kod posmatranih karcinoma dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva ($\leq 20,75\%$).

χ^2 test je pokazao da između vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i jačine ekspresije PR ne postoji statistički značajna povezanost ($p=0,273$). Kendal τ -b test pokazuje slabu pozitivnu korelaciju koja nije signifikantna ($p=0,189$) (Grafikon 4.4.5.).



Grafikon 4.4.6. Procentualna zastupljenost niskog i visokog indeksa Ki-67 u hot spot područjima tumora

Analizirajući vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 u “hot spot” regijama, a spram dobijene granične vrednosti koja je od prognostičkog značaja za vremenski period bez pojave recidiva u analiziranom uzorku ($\leq 20,75\%$), registruje se blaga predominacija niskih vrednosti indeksa Ki-67 u “hot spot” regijama (53,33% nisko proliferativnih karcinoma). Iako su ovo područja najintenzivnije proliferativne tumorske aktivnosti, ovakav rezultat se može objasniti homogenošću analiziranog uzorka luminalnih karcinoma dojke bez HER2 ekspresije koji imaju najbolju prognozu (Grafikon 4.4.6.).

Tabela 4.4.2.

Prosečna vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 u hot spot područjima invazivnog duktalnog i lobularnog karcinoma dojke

		N	Srednje vrednosti Ki-67 hotspot	SD
Ki-67 hotspot	cdi	106	21,991	13,9190
	cli	14	29,964	22,1190

Analizom prosečne vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 u “hot spot” područjima invazivnog duktalnog i lobularnog karcinoma dojke dokazana je razlika koja nije statistički značajna ($t=-1,864$, $p=0,065$) (Tabela 4.4.2.).

4.5. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – indeks Ki-67

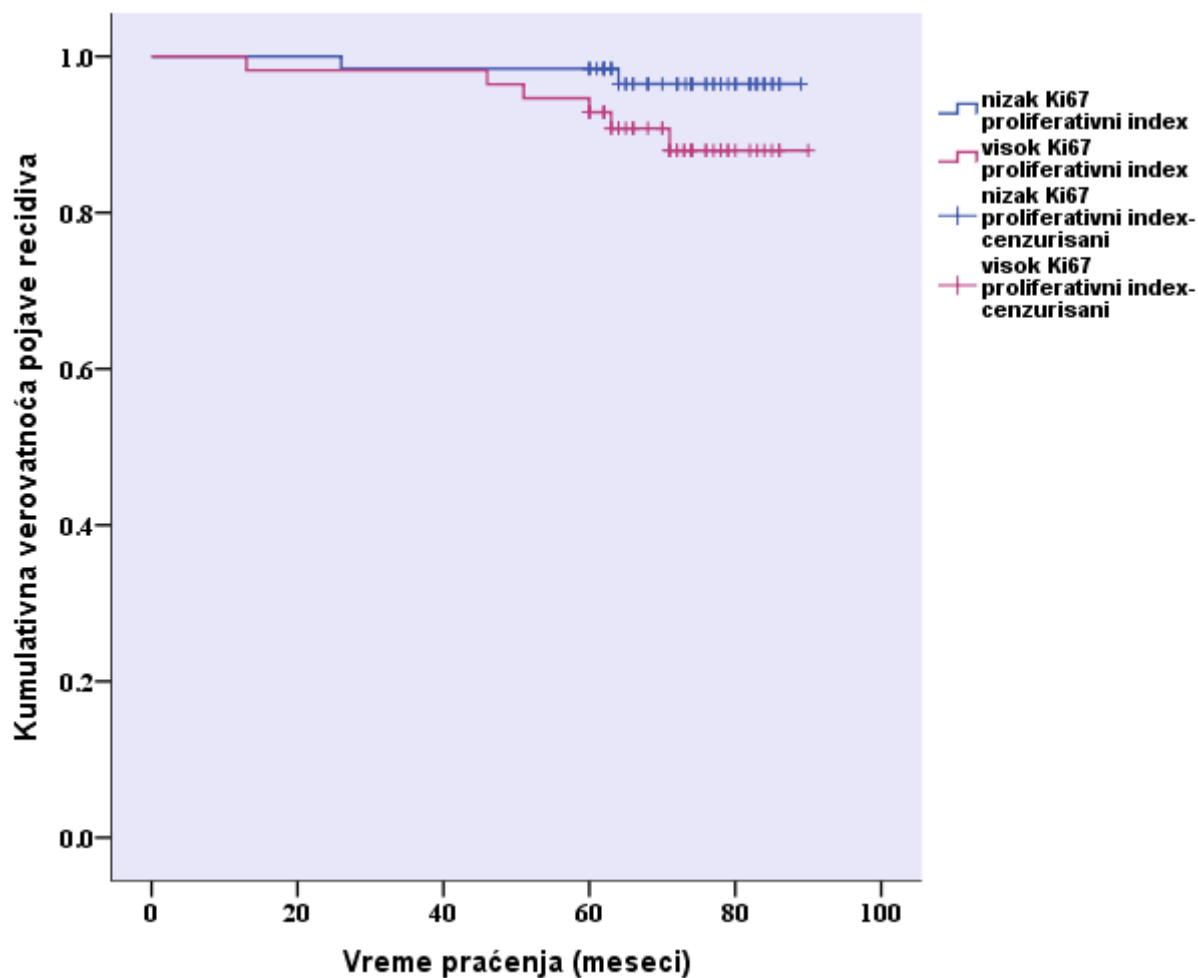
Pri ispitivanju vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa kod ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i broja meseci proteklih od operacije do recidiva, korišćena je Kaplan–Majerova analiza i Log rank test.

Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa niskim vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off $\leq 20,75\%$) iznosi 87,52 meseci, dok prosečno vreme do pojave recidiva u grupi ispitanika sa visokim vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off $> 20,75\%$) iznosi 80,51 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave recidiva log rank testom, za dve ispitivane grupe (niske vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa i visoke vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa), utvrđene su statistički značajne razlike (Log rank (df = 1) = 2,73; $p=0,045$).

Bolesnice sa višim Ki-67 proliferativnim indeksom u karcinomu dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima imaju statistički značajno kraći vremenski period bez pojave recidiva, u odnosu na bolesnice sa nižim vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa (Grafikon 4.5.1.).

Kako bi se ispitaio uticaj visokih i niskih vrednosti Ki-67 proliferativnog indeksa na recidiv bolesti, korišćena je Koksova regresiona analiza. Rezultati prikazani Tabelom 4.5.1. ukazuju na to da regresioni model jeste statistički značajan ($p<0,05$).

Proliferativni indeks Ki-67 se pokazao kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički je značajan ($p < 0,05$), što se može videti u Tabeli 4.5.2.



Grafikon 4.5.1. Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na nivo Ki-67 proliferativnog indeksa u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima

Tabela 4.5.1.
Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
71,67	2,75	0,04

Tabela 4.5.2.
Doprinos Ki-67 proliferativnog indeksa kao prediktora u regresionom modelu

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
Ki-67 indeks	1,262	0,817	0,041	3,534	0,713	17,511

4.6. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – intenzitet bojenja ER

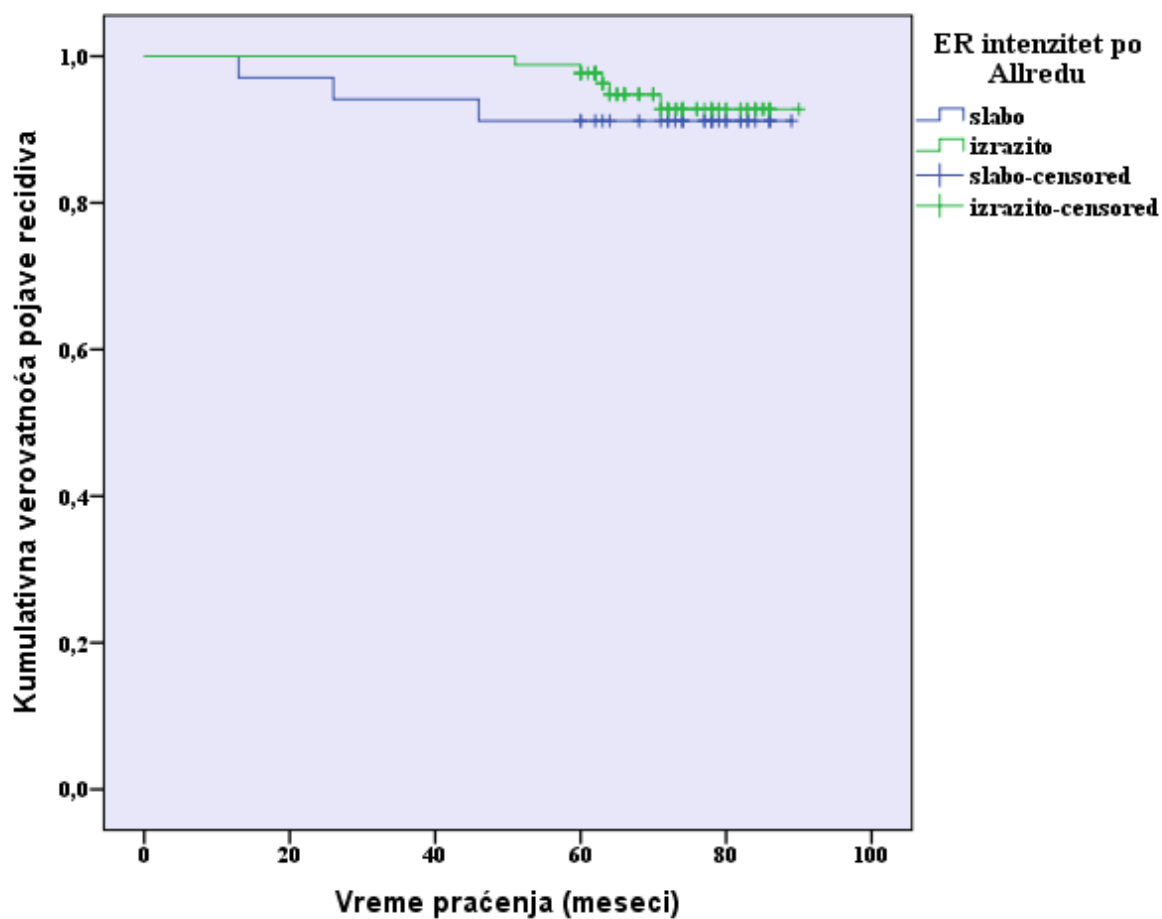
Pri ispitivanju odnosa intenziteta ER po Allred-u, kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti (recidiva), i broja meseci proteklih od operacije do recidiva, korišćena je Kaplan–Majerova analiza.

Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa slabim intenzitetom ER iznosi 83,65 meseci, dok prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa izrazitim intenzitetom ER iznosi 88,05 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave recidiva log rank testom, za dve ispitivane grupe, nisu utvrđene statistički značajne razlike (Log rank (df = 1) = 0,309; p=0,578).

Bolesnice sa izrazitim intenzitetom ER u karcinomu dojke nemaju bitno statistički značajan duži vremenski period bez pojave recidiva, u odnosu na bolesnice sa slabim intenzitetom ER (Grafikon 4.6.1.).

Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja intenziteta bojenja ER na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.6.1. i ukazuju na to da regresioni model nije statistički značajan ($p > 0,05$).

Intenzitet bojenja ER se nije pokazao kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički je beznačajan ($p > 0,05$), što se može videti u Tabeli 4.6.2.



Grafikon 4.6.1. Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na intenzitet bojenja ER po Allred-u u karcinomima dojke

Tabela 4.6.1.
Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
74,18	0,309	0,578

Tabela 4.6.2.***Doprinos intenziteta bojenja ER kao prediktora u regresionom modelu***

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
ER Allred	0,4	0,732	0,581	1,49	0,357	6,281

4.7. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – intenzitet bojenja PR

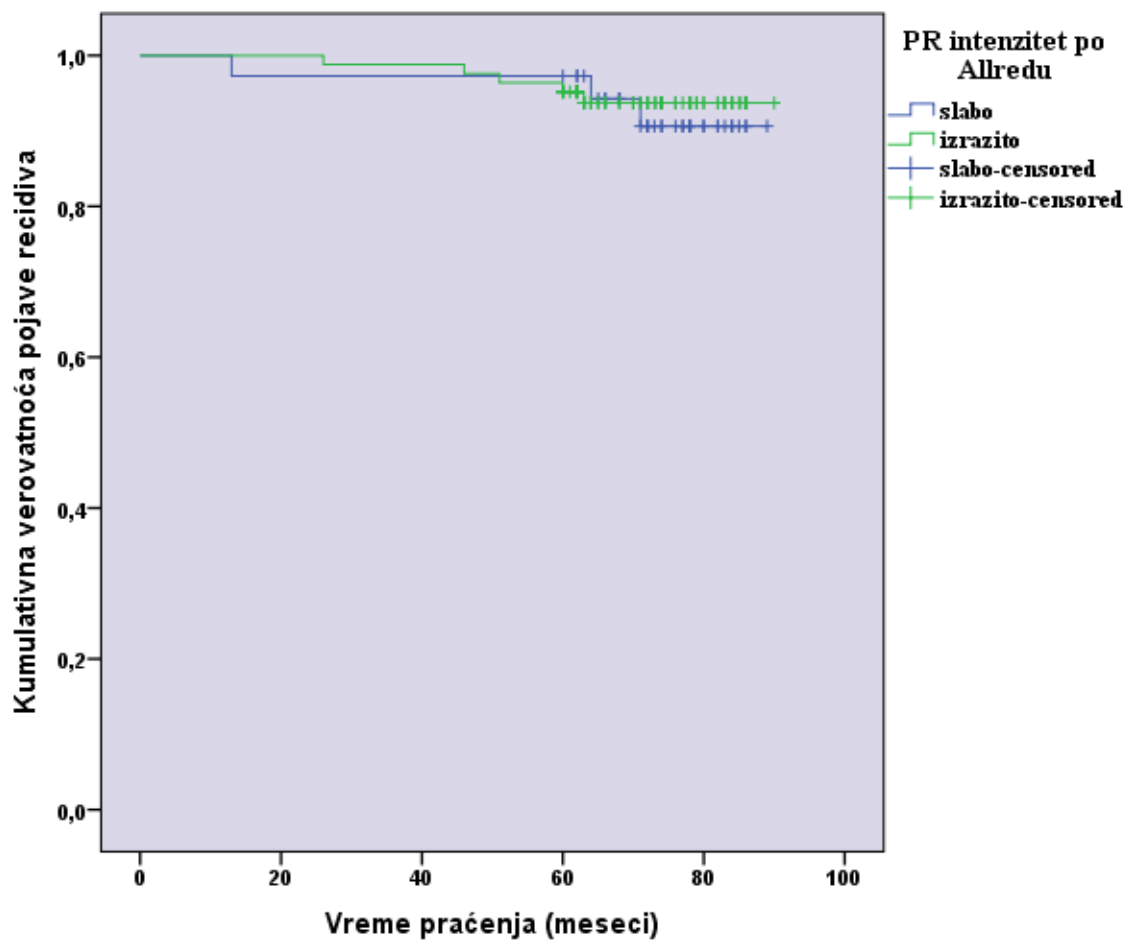
Ispitivan je odnos intenziteta PR po Allred-u, kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti (recidiva), i broja meseci proteklih od operacije do recidiva.

Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa slabim intenzitetom PR iznosi 85,53 meseci, dok prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa izrazitim intenzitetom PR iznosi 87,47 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave recidiva log rank testom, za dve ispitivane grupe, nisu utvrđene statistički značajne razlike (Log rank (df = 1) = 0,101; p=0,75).

Bolesnice sa izrazitim intenzitetom PR u karcinomu dojke nemaju bitno statistički značajan duži vremenski period bez pojave recidiva, u odnosu na bolesnice sa slabim intenzitetom PR (Grafikon 4.7.1.).

Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja intenziteta bojenja PR na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.7.1. i ukazuju na to da regresioni model nije statistički značajan ($p > 0,05$).

Intenzitet bojenja PR se nije pokazao kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički je beznačajan ($p > 0,05$), što se može videti u Tabeli 4.7.2.



Grafikon 4.7.1. Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na intenzitet bojenja PR po Allred-u u karcinomima dojke

Tabela 4.7.1.
Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
74,37	0,101	0,75

Tabela 4.7.2.***Doprinos intenziteta bojenja PR kao prediktora u regresionom modelu***

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
PR Allred	0,232	0,73q	0,751	1,261	0,301	5,286

4.8. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – veličina tumora

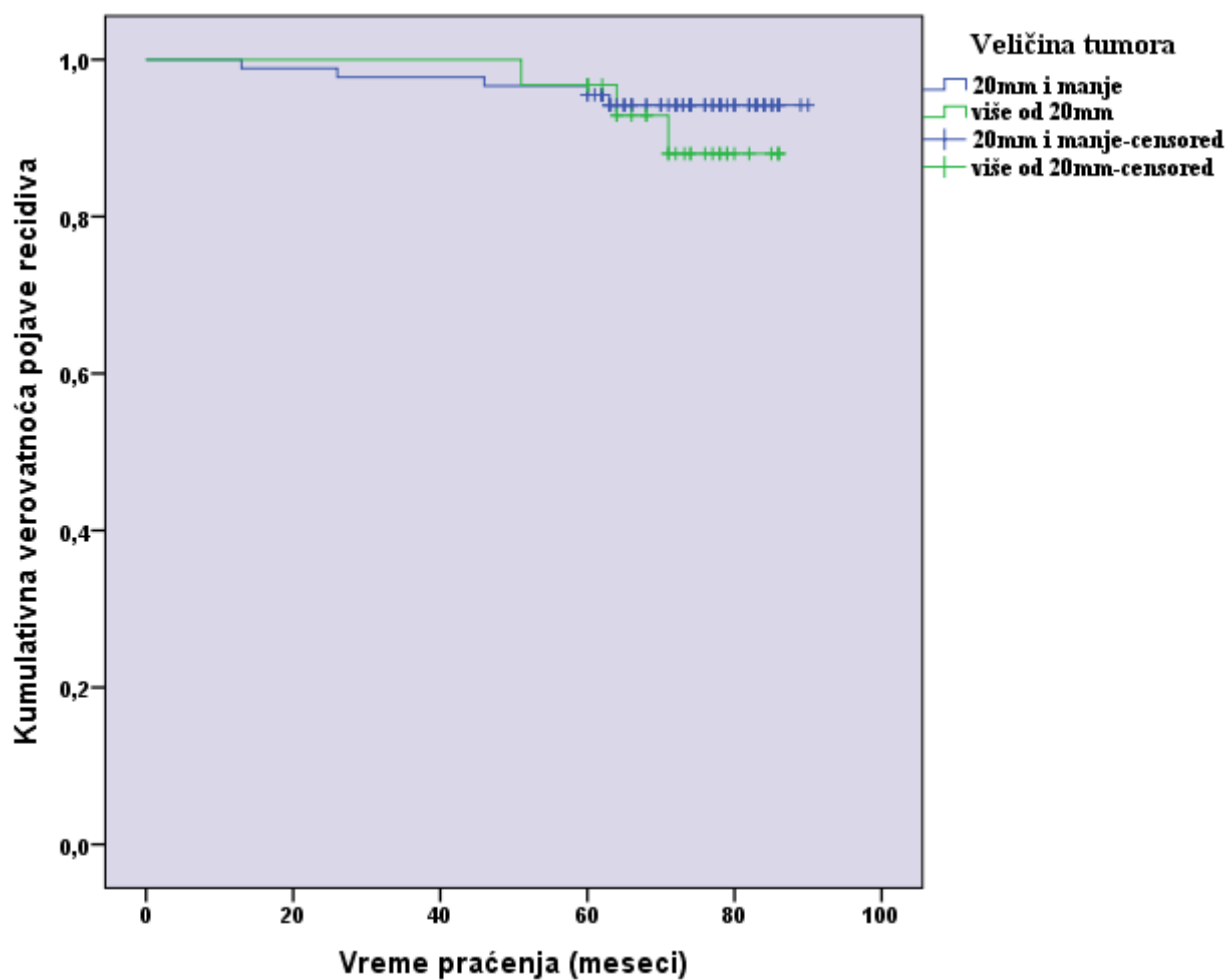
Ispitivan je odnos veličine tumora kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i broja meseci proteklih od operacije do recidiva.

Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa veličinom tumora od 20 mm i manje iznosi 87,23 meseci, dok prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa tumorima većim od 20 mm iznosi 83,29 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave recidiva log rank testom, za dve ispitivane grupe, nisu utvrđene statistički značajne razlike (Log rank (df = 1) = 0,529; p=0,467).

Bolesnice sa karcinomom dojke manjim od 20 mm nemaju bitno statistički značajno duži vremenski period bez pojave recidiva, u odnosu na bolesnice sa karcinomom većim od 20 mm (Grafikon 4.8.1.).

Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja veličine tumora na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.8.1. i ukazuju na to da regresioni model nije statistički značajan (p > 0,05).

Veličina tumora se nije pokazala kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički je beznačajan (p>0,05), što se može videti u Tabeli 4.8.2.



Grafikon 4.8.1. Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na veličinu tumora u karcinomima dojke

Tabela 4.8.1.
Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
73,98	0,529	0,467

Tabela 4.8.2.
Doprinos veličine tumora kao prediktora u regresionom modelu

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
Veličina tumora	-0,525	0,73	0,472	0,592	0,141	2,476

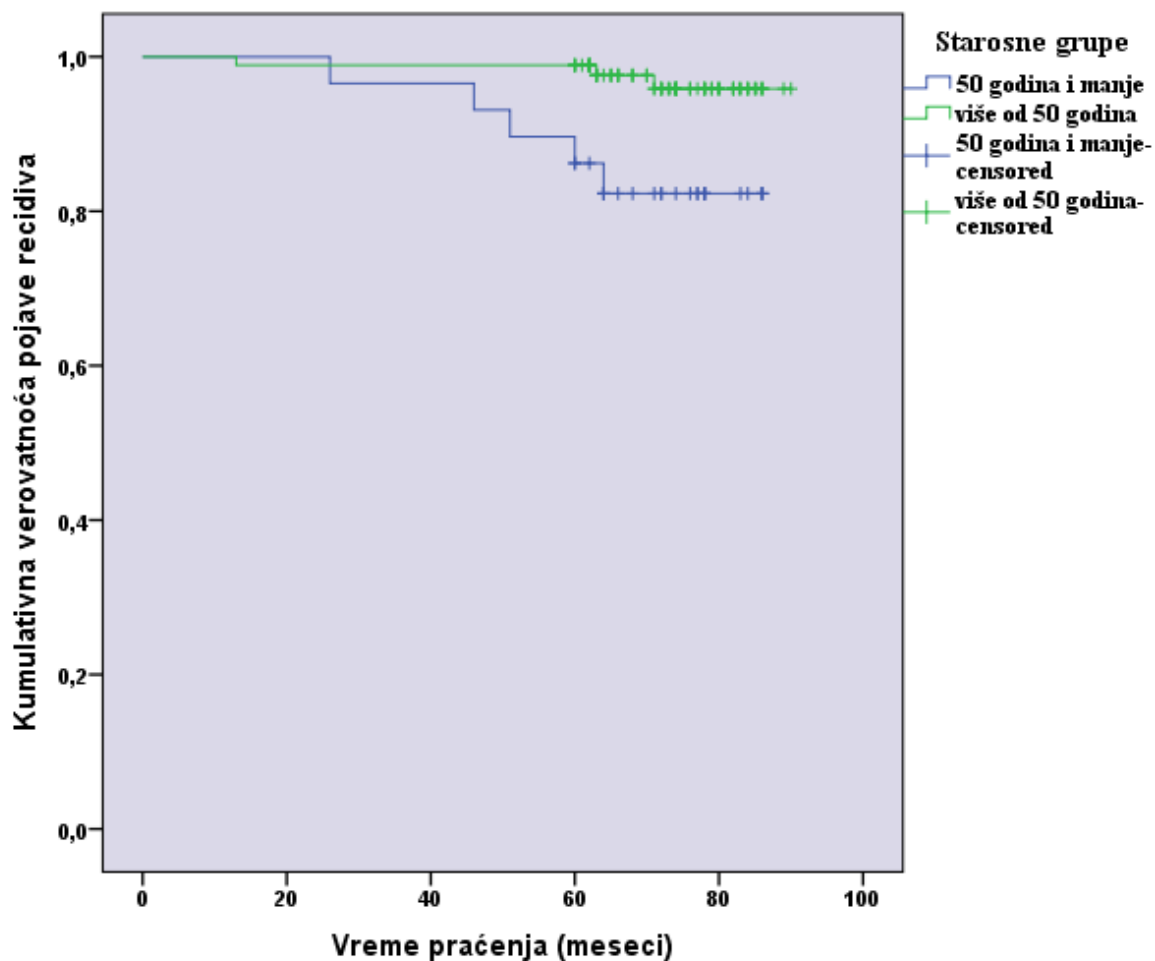
4.9. Kaplan-Majerova analiza i Koksova regresiona analiza – starosne grupe

Ispitivan je odnos starosnih grupa pacijentkinja kao kofaktora za verovatnoću ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i broja meseci proteklih od operacije do recidiva.

Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa manje od 50 godina starosti iznosi 79,58 meseci, dok prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa više od 50 godina iznosi 88,47 meseci. Testiranjem značajnosti razlike u kumulativnoj verovatnoći pojave recidiva log rank testom, za dve ispitivane grupe, utvrđena je statistički značajna razlika (Log rank (df = 1) = 6,885; p=0,009).

Bolesnice starije od 50 godina sa karcinomom dojke imaju bitno statistički značajan duži vremenski period bez pojave recidiva, u odnosu na bolesnice koje su mlađe od 50 godina (Grafikon 4.9.1.).

Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja starosnih grupa na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.9.1. i ukazuju na to da je regresioni model statistički značajan (p < 0,05). Starosne grupe su se pokazale kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički su značajne (p<0,05), što se može videti u Tabeli 4.8.2. Pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su starije od 50 godina imaju manji rizik od pojave recidiva, u odnosu na pacijentkinje sa karcinomom dojke koje su mlađe od 50 godina.



Grafikon 4.9.1. Kaplan-Majerova kriva recidiva bolesnica u odnosu na starosne grupe kod karcinoma dojke

Tabela 4.9.1.
Značajnost regresionog modela

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
68,89	6,685	0,009

Tabela 4.9.2.***Doprinos starosnih grupa pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu***

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
Starosne grupe	-1,703	0,73	0,02	0,182	0,043	0,762

4.10. Koksova regresiona analiza – histološki gradus

Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja histološkog gradusa na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.10.1. i ukazuju na to da regresioni model nije statistički značajan ($p > 0,05$).

Histološki gradus tumora se nije pokazao kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički nije značajan ($p > 0,05$), što se može videti u Tabeli 4.10.2.

Tabela 4.10.1.***Značajnost regresionog modela***

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
74,46	0,015	0,902

Tabela 4.10.2.***Doprinos histološkog gradusa tumora pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu***

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
Histološki gradus	0,067	0,546	0,902	1,07	0,367	3,121

4.11. Koksova regresiona analiza – primenjena terapija

Pacijentkinje su podeljene prema kombinaciji primenjenih terapija na one koje su dobijale samo hormonsku terapiju, one koje su dobijale hormonsku i hemioterapiju, one koje su dobijale hormonsku i radioterapiju, zatim hemioterapiju i radioterapiju, sve tri terapije, i one pacijentkinje koje nisu dobijale terapiju posle operativnog lečenja. Rezultati Koksove regresione analize (ispitivanje uticaja primenjene terapije na pojavu recidiva) prikazani su Tabelom 4.11.1. i ukazuju na to da regresioni model nije statistički značajan ($p > 0,05$).

U analiziranom uzorku primenjena terapija se nije pokazala kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički nije značajna ($p > 0,05$), što se može videti u Tabeli 4.11.2. Dobijeni rezultat se ne može adekvatno tumačiti usled postojanja veoma malog broja recidiva bolesti (8 bolesnica).

Tabela 4.11.1.***Značajnost regresionog modela***

-2 Log verodostojnost	χ^2	p nivo
72,11	2,13	0,144

Tabela 4.11.2.***Doprinos histološkog gradusa tumora pacijentkinja kao prediktora u regresionom modelu***

Prediktor	B	Standardna greška (SE)	p nivo	HR (srazmera opasnosti)	95,0% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
Histološki gradus	-0,558	0,4	0,163	0,572	0,262	1,252

4.12. Prosek Ki-67 u hot spotu po T stadijumima bolesti

Ispitivanjem srednjih vrednosti Ki-67 u “hot spot” mestima u tumorskom tkivu, u pT1 stadijumu je utvrđena srednja vrednost koja je iznosila 22,849%, u pT2 stadijumu je iznosila 23,091%, a u pT4 stadijumu je iznosila 23% (Tabela 4.12.1.). Kad je u pitanju pT3 stadijum, nijedna pacijentkinja nije bila u ovom stadijumu bolesti. Sprovođenjem Kruskal-Wallis neparametarskog statističkog testa nije utvrđena bitna statistički značajna razlika između ova tri T stadijuma bolesti ($\chi^2=0,374$, $df=2$, $p=0,83$).

Tabela 4.12.1.***Prosek vrednosti Ki-67 u hot spot po T stadijumima bolesti***

T stadijum	Broj	Srednja vrednost (%)	SD
pT1	83	22,849	16,4322
pT2	33	23,091	12,5570
pT4	4	23,000	10,0083

4.13. Prosek Ki-67 u hot spotu po histološkim gradusima karcinoma dojke

Ispitivanjem srednjih vrednosti Ki-67 u “hot spot” mestima u tumorskom tkivu, u dobro diferentovanim karcinomima dojke (HG1) utvrđena je srednja vrednost koja je iznosila 14,605%, u srednje diferentovanim karcinomima dojke (HG2) je iznosila 23,099%, a u slabo diferentovanim karcinomima dojke (HG3) je iznosila 27,767% (Tabela 4.13.1.).

Sprovođenjem Kruskal-Wallis neparametarskog statističkog testa utvrđena je bitna statistički značajna razlika između ova tri histološka gradusa karcinoma dojke ($\chi^2=10,06$, $df=2$, $p=0,0,007$). Dakle, bolje diferentovani karcinomi dojke imaju značajno niži proliferativni indeks Ki-67, odnosno loše diferentovani karcinomi dojke su najčešće visoko proliferativni karcinomi.

Tabela 4.13.1.

Prosek vrednosti Ki-67 u hot spot po histološkim gradusima karcinoma dojke

HG	Broj	Srednja vrednost (%)	SD
HG1	19	14,605	9,3059
HG2	71	23,099	14,5810
HG3	30	27,767	17,6434

5

DISKUSIJA

U ženskoj populaciji karcinom dojke je najčešći maligni tumor. Ova bolest predstavlja vodeći uzrok smrti od tumorskih bolesti ženske populacije u čitavom svetu, kao i u Srbiji. Iako se u poslednjih nekoliko godina u razvijenim zemljama registruje blagi pad mortaliteta od karcinoma dojke, ova bolest je i dalje vodeći karcinom u grupi novoobolelih žena od malignih tumora (149, 150). Istraživanja sprovedena u Sjedinjenim Američkim Državama ukazuju da oko 180 000 žena svake godine oboli od ove bolesti, odnosno jedna od osam žena, pri čemu najveći udeo čine invazivni duktalni karcinomi, kao i u našoj sprovedenoj studiji (151). Od terapijskog pristupa, odnosno sprovođenja odgovarajuće terapije, u značajnoj meri zavisi ukupno preživljavanje obolelih od karcinoma dojke, kao i dužina života bez recidiva bolesti. Uspeh u lečenju najbolje se ostvaruje prilikom detekcije tumora u ranom stadijumu razvoja, odnosno kod lokalizovane bolesti bez metastatskih depozita u aksilarnim limfnim čvorovima. Međutim, čak i prilikom detekcije ranog karcinoma dojke, odluke o terapijskom izboru su često teške i zavise od mnogobrojnih kompleksnih i međusobno povezanih faktora koji predviđaju dalji tok bolesti i efikasnost terapijskih opcija. Iako pojedini autori smatraju da je karcinom dojke sistemska bolest već u trenutku postavljanja dijagnoze, i da je treba i tretirati kao sistemska bolest sa lekovima koji deluju na celo telo (hemioterapija, antihormonalna terapija, imunoterapija), ipak većina stručnog mišljenja se slaže oko definisanja određenih parametara karcinoma dojke koji su značajni za prognozu i predikciju toka bolesti (152, 153). Najvažniji parametri koji definišu terapijske preporuke ranog karcinoma dojke, odnosno markeri koji su sastavni deo svakog patohistološkog izveštaja jesu status estrogenskog receptora, progesteronskog receptora i status receptora 2

humanog epidermalnog faktora rasta (HER2), kojima je u skorije vreme dodat i proliferativni marker Ki-67. Prognostička i prediktivna uloga ovog markera takođe je istraživana i u drugim malignim tumorima.

Značajno je naglasiti razliku između termina prognostički i prediktivni faktor. Naime, prognostički faktor je onaj koji daje prognozu, tj. predviđa tok bolesti nezavisno od terapijskog izbora, dok prediktivni faktor predviđa efikasnost primene određenog terapijskog modaliteta. Prilikom istraživanja prognostičkih faktora, najtačniji rezultati se postižu sprovođenjem eksperimenta u grupi pacijenata koji u daljem toku lečenja neće primati adjuvantnu sistemsku terapiju, jer se na taj način eliminiše efekat adjuvantne terapije na rezultate i tumačenje istih. Međutim, kako u današnje vreme gotovo svi bolesnici primaju neki vrstu adjuvantne terapije, i studije koje proučavaju prognostičke faktore imaju ograničenu vrednost. Prema National Comprehensive Cancer Network (NCCN) preporukama za lečenje karcinoma dojke iz 2016. godine, kandidati za adjuvantnu terapiju su praktično svi pacijenti, nezavisno od veličine tumora, pa čak i pacijenti bez zahvaćenih limfnih nodusa. Izuzetak su pacijenti oboleli od trostruko negativnih karcinoma (engl. triple negative), koji imaju promer tumora ispod 5 mm. Kod pacijenata koji imaju karcinom dojke promera 5 mm ili manji, bez zahvaćenih limfnih nodusa i sa pozitivnim steroidnim receptorima (ER i PR), a bez ekspresije HER2 receptora, predlaže se razmatranje primene adjuvantne hormonske terapije, dok kod pacijenata sa prečnikom tumora većim od 5 mm, pored adjuvantne hormonske terapije, predlaže se i hemioterapija (154).

Iako patolozi sve češće u svoje patohistološke izveštaje uključuju i marker Ki-67, postojeći vodiči Američkog udruženja kliničke onkologije (ASCO) ne uvrštavaju Ki-67 kao rutinski marker u patohistološkim izveštajima (155). Međutim, konsenzus internacionalnih eksperata u St. Galenu 2011. godine sačinio je preporuke za lečenje ranog karcinoma dojke, i izdat je vodič za endokrinu i hemioterapiju. Prilikom izbora adekvatne terapije, uz standardne parametre kao što su stadijum bolesti, histološki gradus tumora i endokrini status bolesnice, preporučeno je panel za upotrebu proliferativnih markera (Ki-67, MIB-1) (91, 98, 156, 157). Do današnjeg vremena, nije postignut konsenzus granične (cut off) vrednosti za nisku i visoku ekspresiju markera Ki-67, koja oslikava nizak ili visok proliferativni potencijal tumora. Gore pomenuta ekspertska grupa u St. Galenu je 2013. godine sačinila reviziju prethodnog vodiča, kada je uvrštena podela luminalnih karcinoma dojke na luminalni A i luminalni B, a na osnovu niske, odnosno visoke vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 (Goldrith et al, 2013). Kao granična vrednost korišćena je vrednost

od 14%. Godine 2015. ista radna grupa je kao cut off vrednost za Ki-67 predložila da to bude vrednost koja se nalazi u opsegu od 20-29%, a da ukoliko je Ki-67 iznad te definisane vrednosti bolest može definisati kao luminal B-like tumor, i predlog je bio prihvaćen od strane većine ekperata radne grupe. Međutim, deo grupe ipak nije smatrao da je Ki-67 koristan marker za razdvajanje luminal A-like od luminal B-like tumora, te konsenzus nije usvojen, pa se debate na ovu temu i dalje vode. Usled nepostojanja opšte prihvaćenog stava i kako, u prognostičkom smislu, pojedini vodiči (ESMO) preporučuju upotrebu cut off vrednosti od 20%, primena granične vrednosti prepuštena je izboru laboratorije zbog različitih varijacija u određivanju Ki-67 vrednosti (26, 158, 159). Takođe, ne treba zaboraviti ni labilnost ekspresije markera Ki-67, te uzorkovano tkivo treba adekvatno tretirati, strogo poštujući preporučenu proceduru fiksacije. Naime, istraživanja su ukazala da je vrednost Ki-67 viša ukoliko je centar tumora uzorkovan neposredno nakon hirurške ekcizije, odnosno pre primene fiksativa, u odnosu na uzorkovanje tumora nakon prethodne fiksacije celog hirurškog materijala (26,2% vs. 23,5%), što se objašnjava činjenicom da je u prvom slučaju fiksativ mnogo brže penetrirao u tkivo. Takođe, ista studija je pokazala i da je Ki-67 pokazivao više vrednosti pri upotrebi 10% neutralnog puferisanog formalina kao vrste fiksativa, u odnosu na 15% nepuferisani formalin (30,5 % vs. 27,8%) (94).

U našoj studiji, manuelnom metodom su određivane vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 u “hot spot” regijama i na perifernom delu tumora- tumorski rub. Uočena je značajna razlika između ove dve vrednosti, pri čemu je prosečna vrednost Ki-67 u “hot spot” regiji iznosila 22,92%, dok je u regiji tumorskog ruba ova vrednost iznosila 16,10%, što se može objasniti činjenicom da mnogi invazivni tumori upravo na periferiji, odnosno na rubu ostvaruju svoj “hot spot”, tj. fokus svoje najintenzivnije proliferacije. Kako je naš uzorak obuhvatio i mali udeo lobularnih karcinoma (11,7%, što je u skladu sa dostupnom literaturom koja navodi da 5-15% invazivnih karcinoma dojke čine lobularni karcinomi), određena je srednja vrednost indeksa Ki-67 u “hot spot” područjima i u grupi invazivnih duktalnih karcinoma (CDI) i u grupi invazivnih lobularnih karcinoma (CLI). Komparacijom ove dve grupe nije pokazana statistički značajna razlika u prosečnoj “hot spot” vrednosti Ki-67, iako se u literaturi navodi da su CLI karcinomi niskog Ki-67 indeksa. Ova pojava se može objasniti malim udelom invazivnih lobularnih karcinoma u našem analiziranom uzorku. Korejska studija, koja je u hormon-receptor pozitivnim, a HER2 negativnim invazivnim karcinomima dojke komparirala metod određivanja vrednosti Ki-67 u “hot spot” regiji sa metodom prosečne vrednosti Ki-67 u celom tumorskom čvoru,

ukazuje na slične rezultate, sa prosečnom vrednošću Ki-67 od 18,5% u “hot spotu”, u odnosu na prosečnu vrednost Ki-67 celog isečka koja je uznosila 13% (160). Međutim, ista studija je pokazala neznačajnu razliku u izboru metoda za određivanje Ki-67 kod ranog karcinoma dojke, što se može objasniti histološkom heterogenošću studijskog uzorka, u odnosu na izrazitu homogenost uzorka naše studije (analizirani su samo rani luminalni karcinomi).

Do današnjeg vremena, brojne studije su se bavile određivanjem nivoa ekspresije proliferativnog indeksa Ki-67 u invazivnom karcinomu dojke (161, 162, 163). Haroon i saradnici (161) su korišćenjem 15% kao cut off vrednosti za Ki-67 indeks registrovali 39,8% karcinoma sa niskim Ki-67 indeksom, dok su Fasching i saradnici zabeležili 29,3% nisko proliferativnih karcinoma, ali koristeći cut off vrednost od 13% (162). Takođe, 36,2% invazivnih duktalnih i 59,7% invazivnih lobularnih karcinoma sa niskim indeksom Ki-67 prikazani su u studiji Heusignera i saradnika, koji su koristili 14% kao cut off vrednost za Ki-67 (163). Međutim, sve navedene studije su obuhvatale heterogenu grupu invazivnih karcinoma dojke u različitim stadijumima bolesti. Sun i saradnici izveštavaju o 36,2% ovakvih tumora pri cut off vrednosti od 15% (164). U našem istraživanju, posmatrajući samo rane invazivne luminalne HER2 negativne karcinome, ispitivali smo udeo nisko proliferativnih karcinoma analizom “hot spot” područja, kao područja najintenzivnije tumorske proliferacije. Registrovali smo blagu predominaciju ovakvih tumora, čak 53,33%, što se može objasniti analizom homogenog uzorka ranih luminalnih karcinoma, a pri korišćenju dobijene cut off vrednosti koja je od prognostičkog značaja za DFS u našem ispitivanom uzorku (20,75%).

Objavljene su brojne studije koje su analizirale korelaciju između Ki-67 i drugih kliničko-patoloških parametara (161, 165, 166). Studija pacijenata u Pakistanu ukazala je na značajnu povezanost indeksa Ki-67 i histološkog gradusa tumora, PR, HER2 i limfonodalnog statusa (161). Ranije studije sprovedene u Velikoj Britaniji registrovale su značajnu povezanost Ki-67 indeksa sa histološkim gradusom tumora, veličinom i histološkim tipom tumora (165). Međutim, navedene studije imaju nedostatke u vidu malog broja obuhvaćenih pacijenata, kao i heterogenosti histoloških tipova i stadijuma karcinoma dojke. Sun i saradnici su u svom molekularno heterogenom uzorku karcinoma dojke pokazali značajnu povezanost vrednosti indeksa Ki-67 sa nivoom ekspresije ER, PR i HER2. Odnosno, pomenuta studija je ukazala da tumori sa višim procentom ekspresije ER i PR imaju niži nivo ekspresije Ki-67, dok za HER2 važi obrnuto, tj. tumori većeg stepena ekspresije HER2 imaju i viši stepen ekspresije indeksa Ki-

67 (164). Isti odnosi povezanosti dokazani su i u mnogim drugim studijama ranijih datuma (78, 93, 167-170). Takođe, Viale i saradnici su pokazali da su više vrednosti indeksa Ki-67 povezane sa lošijim prognostičkim faktorima, tj. tumori višeg nivoa Ki-67 su bili udruženi sa većom dimenzijom tumora, lošijim stepenom diferentovanosti, peritumorskom vaskularnom invazijom i HER2 pozitivnošću. Korišćena cut off vrednost iznosila je >11% (87). Pozitivna korelacija vaskularne i limfatične invazije sa višim vrednostim indeksa Ki-67 pokazana je i u radu Jacquemier et al. (171). Sopstvenom studijom potvrdili smo većinu navedenih značajnih korelacija. Naime, analizom našeg uzorka dokazana je statistički značajna povezanost vrednosti indeksa Ki-67 i veličine tumora, kao i histološkog gradusa, tj. tumori sa visokim Ki-67 (cut off $\leq 20,75\%$) većih su dimenzija i slabijeg stepena diferentovanosti.

Starosna dob pacijentkinja ne pokazuje značajnu povezanost sa vrednostima indeksa Ki-67. Kako su u naš uzorak svrstani samo luminalni, odnosno hormon-receptor pozitivni (ER i PR), a HER2 negativni karcinomi dojke, analizirana je povezanost jačine ekspresije ER i PR sa vrednostima indeksa Ki-67, te nije dokazana značajna razlika između slabe i izrazite pozitivnosti hormonskih receptora.

U svim gore navedenim studijama, indeks Ki-67 je, pored opisanih odnosa sa kliničko-patološkim parametrima, istraživan i kao prognostički faktor u toku ove bolesti (88, 172-177). Takođe, i ranije ovaj marker se smatrao ključnim prilikom izbora terapije (178, 179). Colozza i saradnici (180) su istraživali prognostičku i prediktivnu ulogu markera Ki-67 u ranim karcinomima dojke i, kao i u svim prethodno pobrojanim studijama, i oni su dokazali postojanje statistički značajne korelacije vrednosti Ki-67 sa DFS i OS.

Posmatrajući vremenski period bez pojave recidiva bolesti, naše istraživanje je ukazalo na Ki-67 cut off vrednost od 20,75%, koja je približna preporukama pojedinih ekspertskih radnih grupa (ESMO). Autorska grupa iz Japana u svom istraživanju registrovala je graničnu vrednost od 20% kao efektivan prognostički faktor za sveukupno preživljavanje (OS), kao i za preživljavanje bez recidiva (DFS). Međutim, kako je ispitivani uzorak pomenute studije bio veoma heterogen u pogledu molekularnih podtipova karcinoma dojke, tvrdnje su dokazane samo u grupi luminalnih karcinoma bez HER2 ekspresije. Prosečna vrednost Ki-67 indeksa u "hot spot" regijama njihovog uzorka iznosila je 20,5%, što je približno prosečnoj vrednosti od 22,92% istih područja u našem istraživanju, međutim treba imati na umu izrazitu homogenost našeg uzorka (181). Upravo zbog ovakvog uzorka, koji je obuhvatio samo rane luminalne HR-pozitivne, a HER2 negativne

karcinome dojke, sve analizirane pacijentkinje su preživele u našem posmatranom periodu (OS=100%). Prosečan posmatrani period, tj. period postoperativnog praćenja naših pacijentkinja je iznosio 72,92 meseci, pri čemu je najduže vreme praćenja iznosilo 90 meseci, a najkraće 60 meseci. Rossi et al. u svojoj studiji navode gotovo isto vreme praćenja pacijentkinja, tačnije 73 meseca (158). Registrovana je pojava recidiva samo kod 8 pacijentkinja (6,67%), sa prosečnim vremenskim periodom javljanja recidiva (DFS) od 49,25 meseci. Slučaj sa najbržom pojavom recidiva je zabeležen nakon 13 meseci od operacije, a slučaj sa najdužim vremenskim periodom do pojave recidiva je beležio 71 mesec. Nemačka studija ukazuje na značaj indeksa Ki-67 kao nezavisnog prognostičkog parametra i za DFS i za OS (182). Tačnije, koristeći cut off $\leq 15\%$, DFS je registrovan kod 86,7% pacijentkinja, a OS kod 89,3% pacijentkinja u petogodišnjem periodu, dok koristeći cut off Ki-67 $> 45\%$, DFS je registrovan kod 75,8% bolesnica, odnosno OS kod 82,8% pacijentkinja. Iako ovaj marker ni u Nemačkoj nije uvršten u rutinski imunohistohemijski panel za karcinom dojke, obzirom da je većina slučajeva u izveštaju prethodno obuhvatala i analizu Ki-67, jasno je ukazano klinički značaj procene ovog markera. Još jedno istraživanje koje potkrepljuje gore navedene tvrdnje je i studija sprovedena u Japanu, koja identifikuje pacijente sa ER-pozitivnim HER2 negativnim tumorima i pokazuje da visoke i srednje vrednosti indeksa Ki-67 koreliraju sa kraćim DFS i OS u odnosu na iste tumore, ali sa niskim Ki-67 indeksom (cut off: nizak Ki-67 $\leq 10\%$, srednja vrednost Ki-67 $> 10\%$, visok Ki-67 $\leq 20\%$) (183).

Posmatrajući veličinu tumorskog čvora, u našoj sprovedenoj studiji najmanji tumorski čvor bio je promera 2 mm, dok je najveći iznosio 45 mm. Prosečna veličina tumorskog čvora iznosila je 17,98 mm, sa standardnom devijacijom od 6,97. Naime, najveći broj analiziranih tumora je pripadao pT1c stadijumu bolesti (60%), a zatim pT2 stadijumu bolesti (27,5%). Studija Sun J. i saradnika (164) takođe dokazuje pozitivnu i značajnu korelaciju između veličine tumora i vrednosti indeksa Ki-67, ali daje nešto drugačije rezultate, sa najvećim udelom tumora pT2 stadijuma (65%) a zatim pT1 stadijuma (23%). Navedena odstupanja se mogu objasniti raznolikim uzorkom, gde su analizirani i tumori sa ekspresijom HER2, kao i trostruko negativni tumori i tumori sa limfonodalnim metastazama, koji su agresivnijeg biološkog ponašanja.

Mnoge studije su dokazale značajnu korelaciju vrednosti indeksa Ki-67 i histološkog gradusa tumora (173, 184-186), dok grupa Finskih autora (187) ukazuje na suprotno, ali zbog malog uzorka od samo 256 pacijenata ova studija nema veliki značaj. Gore pomenuta Nemačka studija

(182), osim klasičnih kliničko-patoloških parametara, jasno ističe i povezanost histološkog gradusa (HG) i vrednosti indeksa Ki-67. Tačnije, prosečna vrednost indeksa Ki-67 u HG1 tumorima iznosila je 9,7%, dok je u HG2 tumorima iznosila 16,2% a u HG3 tumorima čak 37,4%. Shokouh et al. iznose prosečnu vrednost indeksa Ki-67 od 23,2% za HG1 tumore, odnosno 30,9% za HG2 i 45,84% za HG3 tumore (32). Isti značaj korelacije dokazan je i u različitim prethodnim studijama (93, 165, 173, 174, 188-192). Naša studija takođe dokazuje da, prosečno gledano, viši histološki gradus tumora ima viši indeks proliferacije Ki-67. Prosečna vrednost Ki-67 u “hot spot” područjima dobro diferentovanih ranih luminalnih karcinoma (HG1) iznosila je 14,6%, u grupi srednje diferentovanih (HG2) iznosila je 23,1%, dok je u grupi slabo diferentovanih karcinoma (HG3) ova vrednost iznosila 27,8%. Više vrednosti indeksa Ki-67 dobijene u našem istraživanju mogu se objasniti korišćenjem “hot spot” područja, za razliku od prethodno navođenih studija, koje su analizirale heterogenu grupu karcinoma dojke koristeći prosečnu vrednost indeksa Ki-67 za ceo tkivni isečak.

Posmatrajući starosnu dob obolelih žena, naša sprovedena studija daje rezultat od 57,42 godina kao prosečnu starost obolevanja, što je u skladu sa literaturnim podacima koji navode 55 godina ili više kao prosečnu starosnu dob za obolevanje od invazivnog karcinoma dojke (151). Međutim, naša dobijena prosečna starosna dob obolevanja je nešto viša u odnosu na istraživanje Korejskih autora, u kojem je prosečna starost obolevanja 50 godina (160), što se može objasniti heterogenošću njihovog uzorka, koji je obuhvatao i karcinome koji se predominantno javljaju u mlađoj populaciji. Na istu prosečnu starost obolevanja (50 godina) ukazuje i druga grupa Korejskih autora, analizirajući takođe heterogen uzorak molekularnih podtipova karcinoma dojke (12). Slično, autori Najjar H. i Easson A. nakon sprovedenog istraživanja u arapskim zemljama ukazuju na mlađu starosnu dob obolevanja gotovo za deceniju (prosečna starost obolevanja je 48 godina), u odnosu na naš ispitivani uzorak, što se može objasniti različitim rasnim uzorcima, kao i životnim stilom ispitivanih grupa (193). Posmatrano u odnosu na starosne grupe ispitivanih pacijentkinja, potvrdili smo literaturne navode (182) da bolesnice mlađe životne dobi obolevaju od karcinoma dojke višeg proliferativnog indeksa Ki-67 (cut off $\leq 20,75\%$). Preciznije, bolesnice starosti od 30-39 godine su obolevale od tumora sa prosečnom vrednošću 35,5% indeksa Ki-67, u odnosu na bolesnice starosti od 60-69 godina, koje su obolevale od tumora sa prosečnom vrednosti 20,29% indeksa Ki-67 (analizirano u odnosu na “hot spot” područja).

Različite studije su istraživale prediktivni značaj određivanja indeksa Ki-67, među kojima su pojedine ukazale da pacijentkinje obolele od karcinoma sa visokim Ki-67 indeksom imaju bolji odgovor na hemioterapiju ukoliko se prethodno aplikuje neoadjuvantna terapija, u odnosu na one pacijentkinje koje nisu primile neoadjuvantnu terapiju (83, 194-197), dok druge studije nisu pokazale značajnu povezanost ovih parametara (177, 198-200).

Kako u našem sprovedenom istraživanju nije bilo preminulih pacijentkinja, ispitivana je povezanost različitih tumorskih parametara u odnosu na vreme pojave recidiva. Pokazano je da intenzitet bojenja ER i PR, veličina tumora i histološki gradus nisu dobri prediktori recidiva luminalnog karcinoma dojke, za razliku od starosne dobi obolevanja. Naime, pacijentkinje sa luminalnim karcinomom dojke koje su starije od 50 godina imaju manji rizik od pojave recidiva u odnosu na pacijentkinje sa istim karcinomom dojke koje su mlađe od 50 godina.

Posmatrajući primenjeni terapijski modalitet, a u odnosu na pojavu recidiva bolesti, između grupa pacijentkinja koje su dobijale samo hormonsku terapiju, onih koje su dobijale hormonsku i hemioterapiju, onih sa hormonskom i radioterapijom, pacijentkinja sa hemioterapijom i radioterapijom, i grupe pacijentkinja sa primenjene sve tri terapije, kao i pacijentkinja koje nisu dobijale terapiju, nije pokazana značajna povezanost sa vremenom do pojave recidiva bolesti. Dakle, u našem analiziranom uzorku primenjena terapija se nije pokazala kao dobar prediktor za procenu ponovnog javljanja bolesti (recidiva) i statistički je beznačajna, međutim dobijeni rezultat se ne može adekvatno tumačiti usled registrovanog veoma malog broja recidiva bolesti (samo 8 bolesnica).

Do sada više puta pominjana grupa autora Azambuja et al. (89) je, analizirajući prognostički značaj nivoa ekspresije Ki-67 u karcinomima dojke, publikovala svoje rezultate nakon meta-analize koja je obuhvatala 35 studija, sa ukupno 12500 karcinoma dojke u ranom stadijumu bolesti. Naime, ukazano je da su visoke vrednosti Ki-67 udružene sa lošijom prognozom, kraćim ukupnim preživljavanjem (HR: 1,95), kao i kraćim vremenskim periodom do pojave recidiva bolesti (HR: 1,93). Meta-analiza grupe italijanskih autora Petrelli i saradnika ukazala je da su visoke vrednosti Ki-67, pri čemu su korišćene cut-off vrednostiod 10% i više, udružene sa procentom rizika većom od 50% od smrti među pacijentkinjama sa ranim karcinomom dojke, a naročito među pacijentkinjama sa ER-pozitivnim karcinomima. Takođe, viši Ki-67 indeks je udružen i sa većim rizikom od javljanja recidiva bolesti (201). Upravo je i ova studija još jedna u nizu koja ukazuje na potrebu standardizacije određivanja vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67.

Dowsett sa saradnicima (202), kao i Polley sa svojim saradnicima (203, 204), radili su na otkrivanju uzroka koji dovode do razlika vrednosti Ki-67 među laboratorijama, kao i teškoća koje utiču na određivanje optimalne granične vrednosti ovog markera pri izboru kliničkog tretmana. Međutim, i pored brojnih pokušaja, ovaj problem je ostao otvoren. Focke et al. objavili su rad novijeg datuma koji potvrđuje aktuelnost problematike različitog analiziranja i interpretiranja indeksa Ki-67 (205).

U cilju određivanja optimalne granične vrednosti indeksa Ki-67, radili su i autori iz Italije koji su takođe analizirani hormon-receptor pozitivne, HER2 negativne karcinome dojke. Rezultati su predočili da kod izbora cut-off vrednosti <14% ne postoji razlika ni u pogledu vremena do pojave recidiva, kao ni preživljavanja nakon karcinoma dojke, u odnosu na vrednosti Ki-67 u opsegu između 14% i 20%. Pacijentkinje obolele od karcinoma dojke sa vrednostima Ki-67 >20% su imale značajno lošiju prognozu, te je upravo ova vrednost (20%) proglašena za najbolju u cilju stratifikacije visoko rizičnih bolesnica sa luminalnim karcinomom dojke (206).

Sledeća grupa autora u Italiji (207) sprovela je studiju poredeći invazivni lobularni i invazivni duktalni karcinom dojke, tj. vrednosti Ki-67 ovih karcinoma u odnosu na OS i DFS. Dobijena Ki-67 cut-off vrednost za invazivni lobularni karcinom dojke bila je 4%, dok je za invazivni duktalni karcinom dojke ta vrednost iznosila 14%. Posmatrajući ova dva histološka tipa karcinoma dojke, pomenuta studija je ukazala da pacijentkinje sa nisko proliferativnim karcinomom dojke duktalnog tipa imaju duže vreme preživljavanja bez pojave recidiva, u poređenju sa nisko proliferativnim lobularnim karcinomom, dok sa porastom vrednosti indeksa Ki-67 ova dva histološka tipa pokazuju tendenciju preklapanja u pogledu prognoze.

Upravo zbog nepostojanja standardizacije u određivanju granične vrednosti indeksa Ki-67, postojali su mnogi pokušaji zamene ovog markera sa nekim drugim tumorskim parametrima, pre svega histološkim gradusom i mitotskim indeksom. Čileanska grupa autora je u svom istraživanju ukazala na pozitivnu korelaciju vrednosti indeksa Ki-67 sa histološkim gradusom, kao i mitotskim indeksom, ali samo u grupi luminalnih A karcinoma (grupa tumora <14%). Za luminalne B karcinome ova korelacija nije bila potvrđena, te je za ovu grupu pacijentkinja neophodno određivanje vrednosti Ki-67 indeksa (208). Takođe, grupa istraživača iz Turske (Kilickap et al.) došla je do sličnih rezultata u svojoj studiji koja se bavila korelacijom nivoa ekspresije Ki-67 sa različitim prognostičkim faktorima karcinoma dojke. Uz naglasak da je ova studija obuhvatala karcinome dojke različitog kliničkog stadijuma i receptorskog statusa,

koresteći 20% kao cut off vrednost za Ki-67, dokazana je pozitivna korelacija između visoko proliferativnih karcinoma sa višim histološkim gradusom tumora ($p < 0,001$), prisustvom limfovaskularne invazije ($p = 0,001$), negativnošću ER receptora ($p = 0,035$), pozitivnošću HER2 receptora ($p = 0,001$), prisustvom metastatskih depozita u limfnim čvorovima ($p < 0,003$), kao i uznapredovalim stadijumom bolesti ($p < 0,001$). Bolesnice obolele od karcinoma sa niskim proliferativnim indeksom Ki-67 su imale duže sveukupno preživljavanje, kao i duže vreme do pojave recidiva bolesti (209).

Određivanjem prosečne vrednosti indeksa Ki-67 u “hot spot” regijama karcinoma u različitim pT stadijumima, našom studijom nije pokazana značajna razlika. Studija koja ističe prednost određivanja Ki-67 u “hot spot” regiji u odnosu na druge regije tumora sprovedena je u Japanu, međutim potrebno je naglasiti da je ova studija analizirala hormon-receptor pozitivne, a HER2 negativne tumore, koji su tretirani endokrinom terapijom. Tačnije, pokazano je da je indeks Ki-67 određen u “hot spotu” dobar prediktor odgovora kod pacijentkinja obolelih od HR-pozitivnih, a HER2 negativnih karcinoma, koje su dobijale endokrinu monoterapiju (210).

Studija novijeg datuma, koja je sprovedena u Japanu i publikovana 2015. godine, bavila se analizom svih bitnih kliničko-patoloških parametara karcinoma dojke koji utiču na pojavu ranih i kasnih recidiva bolesti kod ER-pozitivnih HER2-negativnih karcinoma dojke, ali razdvajajući premenopauzalne i postmenopauzalne bolesnice. Naime, u grupi premenopauzalnih pacijentkinja kao prediktori ranih recidiva izdavaju se velika dimenzija tumora, viši pN stadijum i visok gradus tumora, dok su u grupi kasnih recidiva izdvojeni veća dimenzija tumora i viši pN stadijum. Kod postmenopauzalnih bolesnica mlađih od 60 godina, prediktori ranih recidiva su bili bilateralni karcinom dojke, velika dimenzija tumora, viši pN stadijum, niža ekspresija PR, kao i visok indeks Ki-67. Prediktori kasnih recidiva su bili identični kao i u grupi premenopauzalnih bolesnica, tj. velika dimenzija tumora i viši pN stadijum. Kod postmenopauzalnih bolesnica starosti 60 godina i više, prediktori ranih recidiva su bili bilateralni karcinom dojke, velika dimenzija tumora, viši pN stadijum, visok histološki gradus tumora, niska ekspresija ER, kao i visok indeks Ki-67. Prediktori kasnih recidiva kod ovakvih pacijentkinja su bili viši pN stadijum, niska ekspresija ER, visok indeks Ki-67, kao i kratak period primenjene adjuvantne endokrine terapije. U istoj studiji, analizom pacijentkinja koje nisu imale recidiv bolesti, pokazano je da je ekspresija ER viša kod postmenopauzalnih bolesnica, u odnosu na jednako obolele premenopauzalne bolesnice. U suprotnom, ekspresija PR je bila viša

kod premenopauzalnih bolesnica. U slučaju indeksa Ki-67, rezultati govore da je ovaj indeks značajno niži kod bolesnica u menopauzi starosti 60 godina ili više (prosečan Ki-67 indeks je 9,1%), u poređenju sa premenopauzalnim bolesnicama koje su mlađe od 40 godina (prosečan Ki-67 indeks je 19,7%). Svi prethodno izneti rezultati ove Japanske studije donose zaključak da postoji potreba za upotrebom različitih graničnih vrednosti (cut off) proliferativnog indeksa Ki-67, u zavisnosti od menopauzalnog statusa i starosne dobi obolele osobe (211).

Iako nije bilo predmet našeg istraživanja, korisno je napomenuti Nemačku studiju koja ukazuje na poteškoće određivanja cut off vrednosti za Ki-67 nakon primene neoadjuvantne hemioterapije (212). Tačnije, grupa ovih autora je došla do rezultata da za različite podtipove karcinoma dojke, za različite kliničke parametre, kao i u slučaju procene terapijskog odgovora nakon primene neoadjuvantne hemioterapije, postoji više Ki-67 cut off vrednosti koje su statistički značajne (to su vrednosti u opsegu od 2,5% do 94,5%). Za procenu vremena bez recidiva bolesti- DFS statistički značajne Ki-67 cut off vrednosti se nalaze u opsegu od 5,5% do 46,5%, dok se vrednosti Ki-67 cut off za procenu ukupnog preživljavanja- OS nalaze u opsegu od 3,5% do 58,5%. Takođe, isti autori, poredeći odgovore bolesnica na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju, izneli su rezultate da je porast vrednosti indeksa Ki-67 indikator loše prognoze u grupi bolesnica bez odgovora na neoadjuvantnu hemioterapiju, dok je u grupi bolesnica sa odgovorom na primenjenu adjuvantnu hemioterapiju porast vrednosti ovog markera indikator dobre prognoze. Preciznije, kod bolesnica bez odgovora na primenjenu terapiju dobijeno je da je Ki-67 značajan negativan prognostički faktor za DFS i OS u veoma širokom opsegu cut off Ki-67. U drugoj grupi, grupi bolesnica sa odgovorom na primenjenu neoadjuvantnu hemioterapiju, Ki-67 je prikazan kao pozitivan prognostički faktor za DFS i OS, s tim da je ova tvrdnja moguća samo za Ki-67 cut off u opsegu od 20,5% do 28,5% za DFS, odnosno od 22,5% do 24,5% za OS. Takođe, u cilju što preciznijeg određivanja vrednosti indeksa Ki-67, korisni su rezultati istraživanja grupe autora iz Norveške, koji su analizirali vrednosti ovog markera u različim uzorcima tkiva tumora dojke. Istaživane su vrednosti indeksa Ki-67 u tkivnom materijalu dobijenom iglenom biopsijom (core needle biopsy)- CNB, zatim u tkivnim mikronizovima (tissue microarray) – TMA, i u operativnom materijalu (whole section)- WS, a dobijeni rezultati ukazuju na značajne razlike vrednosti Ki-67 u različitim tkivnim kategorijama (213). Naime, analizirano je 137 karcinoma dojke koji su imali sve tri kategorije tkivnih uzoraka. Ki-67 je bio značajno viši u operativno dobijenim uzorcima tkiva (prosečna vrednosti Ki-67 je 17%), u

odnosu na tkivne uzorke dobijene iglenom biopsijom (prosečna vrednosti Ki-67 je 13%), kao i uzorke u tkivnim mikronizovima (prosečna vrednosti Ki-67 je 6%). Koristeći 14% kao cut off vrednost za Ki-67, u grupi WS uzoraka čak 61% slučajeva je imalo visok Ki-67, 48% CNB tkivnih uzoraka, odnosno 25% slučajeva sa visokim Ki-67 u grupi TMA uzoraka, što ukazuje na oprez prilikom procene indeksa Ki-67, kao i potrebu korišćenja različitih cut off vrednosti u zavisnosti od vrste dobijenog tkivnog uzorka.

Značaj ove doktorske disertacije ogleda se u tome što su rezultati ove studije jedinstveni, obzirom da istraživana populacija obuhvata izrazito homogenu grupu pacijenata sa ranim luminalnim karcinomom dojke, bez metastatskih depozita u aksilarnim limfnim čvorovima, koji nisu primali neoadjuvantu terapiju. Kako je granična vrednost markera Ki-67 i dalje kontroverzna tema o kojoj se vode mnogobrojne debate, takođe je važno ukazati na značaj ove doktorske disertacije za određivanje granične vrednosti markera Ki-67 za subpopulaciju istraživanog podneblja, te doprinos preciznijem izboru terapijskog modaliteta ovih pacijentkinja. Takođe, obzirom da je pokazano da je Ki-67 indeks u pozitivnoj korelaciji sa većinom prognostičkih faktora, a posebno dužinom preživljavanja bez recidiva bolesti, buduća istraživanja bi trebalo fokusirati na standardizaciju određivanja Ki-67 indeksa i uputiti na značajnost uloge ovog markera prilikom izbora terapijskog modaliteta.

6

ZAKLJUČCI

Na osnovu izloženih rezultata sopstvenog istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Rani luminalni karcinom dojke se najčešće javlja u šestoj deceniji života, sa prosečnom starosnom dobi obolevanja od 57 godina.
2. Najčešći histološki tip ranog luminalnog karcinoma dojke je invazivni duktalni karcinom (88,3%).
3. Prosečna veličina ranog luminalnog karcinoma dojke je ~18 mm, odnosno stadijum pT1c.
4. Rani luminalni karcinom dojke je tumor sa dobrom prognozom. Recidiv je registrovan kod 8 pacijentkinja (6,7%), sa prosečnim vremenom javljanja od 49 meseci nakon primarne operacije. Tokom petogodišnjeg perioda praćenja nije zabeležen nijedan smrtni ishod u ispitivanoj grupi bolesnica.
5. Rani luminalni karcinom dojke je najčešće srednjeg stepena histološke diferentovanosti (59,17%).
6. Potvrđena je hipoteza da postoji značajna razlika u vrednostima proliferativnog indeksa Ki-67 dobijenim analizom tumorskih područja najveće imunoreaktivnosti ("hot spot") i na tumorskom rubu ranih luminalnih HER2 negativnih karcinoma dojke. Srednja vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 određena u hot spot području tumora iznosi 22,92%, dok ista određena na rubu tumorskog čvora iznosi 16,10%.
7. Dokazana je hipoteza da vrednost proliferativnog indeksa Ki-67 određena u hot spot području tumora korelira sa veličinom tumora i histološkim gradusom, odnosno stepenom

histološke diferentovanosti tumora. Tumori većeg dijametra kao i tumori višeg HG imaju više vrednosti indeksa Ki-67.

8. Jačina ekspresije ER i PR (slaba / izrazita pozitivnost) nema značajnog uticaja na vrednost proliferativnog indeksa Ki-67.

9. Delimično je potvrđena hipoteza da je granična vrednost Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off) u karcinomima dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima od prognostičkog značaja za dužinu preživljavanja bez znakova bolesti i ukupno vreme preživljavanja. Dobijena cut off vrednost za ispitivanu grupu bolesnica iznosi 20,75%.

10. Godine starosti ne pokazuju značajan nivo povezanosti sa vrednostima proliferativnog indeksa Ki-67, iako je pokazano da su mlađe pacijentkinje obolevale od tumora više proliferativne aktivnosti. U grupi pacijentkinja 30-39 godina starosti vrednost Ki-67 je iznosila 35,5%, dok u grupi pacijentkinja od 60-69 godina vrednost ovog markera je iznosila 20,29% posmatrano u hot spot područjima tumora.

11. Potvrđena je hipoteza da vrednosti proliferativnog indeksa Ki-67 određene u područjima najveće tumorske aktivnosti („hot spots“) koreliraju sa dužinom preživljavanja bez pojave recidiva bolesti. Bolesnice sa višim Ki-67 proliferativnim indeksom u karcinomu dojke sa pozitivnim hormonskim receptorima imaju kraći vremenski period bez znakova bolesti u odnosu na pacijentkinje istog stadijuma bolesti sa nižim vrednostima proliferativnog Ki-67 indeksa. Prosečno vreme do pojave recidiva u grupi pacijentkinja sa niskim vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off $\leq 20,75\%$) iznosilo je 87,52 meseci, dok je prosečno vreme do pojave recidiva u grupi ispitanika sa visokim vrednostima Ki-67 proliferativnog indeksa (cut off $> 20,75\%$) iznosilo 80,51 meseci.

12. Proliferativni indeks Ki-67 ima značaj u predikciji ponovnog javljanja bolesti (lokalnog recidiva) kod ranih luminalnih karcinoma dojke.

7

LITERATURA

1. International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2012; Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 2012. Available from: <http://globocan.iarc.fr> Accessed January 18, 2014.
2. American Cancer Society; Breast Cancer, Key Statistic for Breast Cancer. American Cancer Society, Atlanta, Georgia 2015.
Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-key-statistics> Accessed September 15, 2015.
3. Cancer Research UK; Breast Cancer. Cancer Research UK, London, UK 2012. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/breast-cancer/> Accessed January 25, 2014.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 13/12/2013.
5. Forouzanfar MH, Foreman KJ, Delossantos AM, Lozano R, Lopez AD, Murray CJL, Naghavi M. Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2011;378:1461–84.
6. 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.

7. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
8. De Vita, Hellman, Rosenber. *Cancer principles and practice of oncology*, 9th ed 2011 Lipincott Williams and Wilkins.
9. Bruce Wr, Van Der Gaag H A Quantitative Assay For The Number Of Murine Lymphoma Cells Capable Of Proliferation In Vivo. *Nature.* 1963;199:79-80.
10. A.F. Chambers, A.C. Groom and I.C. MacDonald, Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;563–572.
11. Luzzi, I.C. MacDonald, E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, V.L. Morris, A.F. Chambers and A.C. Groom, Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;865–73.
12. D.R. Welch. Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis.* 1997;272–306.
13. T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke and I.L. Weissman. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;105–11.
14. M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison and M.F. Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;3983– 8.
15. J.E. Dick, Breast cancer stem cells revealed. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;3547– 9.
16. J. Marx, Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science.* 2003;1308– 10.
17. R. Pardal, M.F. Clarke and S.J. Morrison. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;895–902.
18. S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano and P.B. Dirks. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 396–401.
19. Wicha MS, Liu S, Dontu G. *Cancer Res.* Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006;66(4):1883-90; discussion 1895-6.
20. M. Al-Hajj and M.F. Clarke. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene.* 2004;7274– 82.
21. R. Bjerkvig, B.B. Tysnes, K.S. Aboody, J. Najbauer and A.J. Terzis. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer.* 2005;899– 904.
22. American Cancer Society; Breast Cancer, Key Statistic for Breast Cancer. American Cancer

- Society, Atlanta, Georgia 2018. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention.html> Accessed February 27, 2018.
23. Larsen J, Thomassen M, Gerdes A, Kruse A. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer (Auckl)*.2014;8:145-55.
 24. Petrucelli N, Daly M, Feldman G. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. *Genetics in Medicine*.2010;12:245–259.
 25. Lindor M, McMaster M, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes. 2nd. ed. Monogr: J Natl Cancer Inst;2008.
 26. Cardoso F, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Senkus E, Thompson A, et al. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl 6): vi7-vi23.
 27. Chlebowski T. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and recurrence. *The Breast*. 2013;22(Suppl 1);S5.
 28. Hoda AS. Invasive Ductal Carcinoma: Assessment of Prognosis with Morphologic and Biologic Markers. In: Rosen PP, editor. *Rosen's Breast Pathology*. 4th edition. Philadelphia: Lippinkott Williams and Wilkins; 2014.
 29. Italiano A. Prognostic or Predictive? It's Time to Get Back to Definitions! *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4718-24.
 30. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606–16.
 31. Deniz F, Dilek K, Hande M, Umit UM, Handan K. Ki-67 and caspase expression in breast carcinoma: does variance in locational sampling exist? *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11305-13.
 32. Shokouh TZ, Ezatollah A, Barand P, Yang F. Interrelationships between Ki-67, HER2/neu, p53, ER, and PR status and their associations with tumor grade and lymph node involvement in breast carcinoma subtypes: Retrospective-observational analytical study. *Med (United States)*. 2015;94(32):1–6.
 33. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
 34. Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE. Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg*. 2002;235(1):10-26.

35. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 1997;47(1):28-51.
36. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I(T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol.* 1989;7(9):1239-51.
37. Ferno M. Prognostic factors in breast cancer: a brief review. *Anticancer Res.* 1998;18(3C):2167-71.
38. Fisher ER, Constantino J, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer.*1993;71:41-50.
39. Tot T, Tabar L, Dean P. *Practical Breast Pathology.* 1st ed. Thieme: Medical Publishers; 2002.
40. Andea A, Bouwman D, Wallis T, Visscher W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer.* 2004;100:20-7.
41. Treatment of Early-Stage Breast Cancer. NIH Consensus Statement Online. 1990;8(6):1-19.
42. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004;9(6):606-16.
43. Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, McGregor FH, Murphy GP. Management and survival of female breast cancer: results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer.* 1980; 45:2917-24.
44. WHO classification of breast tumors. PathologyOutlines.com website. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantwhoclassification.html>. Accessed March 2nd, 2018.
45. Moinfar F. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology. A Practical Approach.* Springer: Verlag Berlin Heidelberg; 2007.
46. Elston CW, Ellis IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991; 19:403-410.
47. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359-77.
48. Shousha S. *Breast Pathology. Problematic Issues.* Springer International Publishing: Switzerland; 2017.

49. Donegan WL. Prognostic factors. Stage and receptor status in breast cancer. *Cancer*. 1992;70(6 Suppl):1755-64.
50. Karak SG, Quatrano N, Buckley J, et al. Prevalence and significance of perineural invasion in invasive breast carcinoma. *Conn Med*. 2010;74:17-21.
51. Schnitt S. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst*. 2001;30:22-6.
52. Rampaul RS, Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Prognostic and predictive factors in primary breast cancer and their role in patient management.; The Nottingham Breast Team. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27:229-38
53. Symmers W, Elston C, Ellis I. *Systemic Pathology: The Breast* 2nd ed. Churchill Livingstone Company; 1997.
54. Weaver DL. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: creating controversy and defining new standards. *Adv Anat Path*. 2001;8:65-73.
55. Fletcher C. Tumors of the Breast. In: Fletcher C. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.
56. Atanacković M. et al. *Patologija*. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za patološku anatomiju, 2003.
57. 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.s.58-65.
58. American Cancer Society; *Breast Cancer, Understanding of Breast Cancer Diagnosis*. American Cancer Society, Atlanta, Georgia 2018. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html> Accessed March 3, 2018.
59. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breastcancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2784-95.
60. Rimm DL, Giltnane JM, Moeder C, et al. Bimodal population or pathologist artifact? *J Clin Oncol*. 2007;25:2487-8.
61. Collins LC, Botero MI., Schnitt SJ. Bimodal frequency distribution of estrogen receptor immunohistochemical staining results in breast cancer: an analysis of 825 cases. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:16-20.

62. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, et al. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:21-7.
63. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J.* 2006;6:189-96.
64. Agoff SN, Swanson PE, Linden H, Hawes SE, Lawton TJ. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(5):725-31.
65. Micello D, Marando A, Sahnane N, Riva C, Capella C, Sessa F. Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers. *Virchows Arch.* 2010;457(4):467-76.
66. Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13 Suppl 1:S15-24.
67. Stone A, Cowley MJ, Valdes-Mora F, McCloy RA, Sergio CM, Gallego-Ortega D, et al. BCL-2 hypermethylation is a potential biomarker of sensitivity to antimetabolic chemotherapy in endocrine-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(9):1874-85.
68. Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1 Pt 2):447S-54S.
69. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 2008;21(Suppl. 2):8-15.
70. Yaziji H, Taylor CR, Goldstein NS, et al. Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2008;16:513-20.
71. Ros S, Fletcher A, Linette P, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist.* 2003;8:307-25.
72. Perez-Soler R. HER1/EGFR targeting: refining the strategy. *The Oncologist.* 2004;9:58-67.
73. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowset M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013.

74. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235:177-82.
75. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244:707-12.
76. Kallioniemi OP, Holli K, Visakorpi T, et al. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer*. 1991;49:650-5.
77. Vance GH, Barry TS, Bloom KJ, et al. Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133:611-2.
78. Aleskandarany MA, Green AR, Rakha EA, Mohammed RA, Elsheikh SE, Powe DG, et al. Growth fraction as a predictor of response to chemotherapy in nodenegative breast cancer. *Int J Cancer*. 2010;126(7):1761–9.
79. Dai H, Veer LV, Lamb J. A cell proliferation signature is a marker of extremely poor outcome in a subpopulation of breast cancer patients. *Cancer Res*. 2005;65(10):4059-66.
80. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13–20.
81. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133(4):1710–5.
82. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311–22.
83. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7212–20.
84. Ruiz C, Seibt S, Kuraya KA, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, et al. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2190–4.
85. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med*. 2010;1(5):747-54.

86. Penault-Llorca F, Andre F, Sagan C, Lacroix-Triki M, Denoux Y, Verrièle V, et al. Ki-67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(17):2809–15.
87. Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, Coates AS, Mastropasqua MG, Dell’Orto P, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1–98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol*. 2008;26(34):5569-75.
88. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
89. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
90. Horimoto Y, Arakawa A, Tanabe M, Kuroda K, Matsuoka J, Igari F, et al. Menstrual cycle could affect Ki-67 expression in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *J Clin Pathol*. 2015;68(10):825–9.
91. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24:2206–23.
92. Pekar G, Gere M, Tarjan M, Hellberg D, Tot T. Molecular phenotype of the foci in multifocal invasive breast carcinomas: intertumoral heterogeneity is related to shorter survival and may influence the choice of therapy. *Cancer*. 2014;120(1):26-34.
93. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, Hacene K, Phillips E, Tubiana-Hulin M, et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. *Cancer*. 2002;94(8):2151-9.
94. Arima N, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Fujisue M, Okumura Y, et al. The importance of tissue handling of surgically removed breast cancer for an accurate assessment of the Ki-67 index. *J Clin Pathol*. 2016;69(3):255–9.
95. Engstrom MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;140(3):463–73.

96. Murinah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, N. A. Sharifah NA, Rohaizak M, A. Norila A, et al. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(2):669–77.
97. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
98. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, B. Thürlimann B, H.-J. Senn H-J, et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
99. Gilchrist KW, Gray R. Fowble B, et al. Tumor necrosis is a prognostic predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer: a 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol.* 1993;11: 1929-35.
100. Jimenez RE, Wallis T, Visscher DW. Centrally necrotizing carcinomas of the breast: a distinct histologic subtype with aggressive clinical behavior. *Am Surg Pathol.* 2001;25:331-7.
101. Yu L, Yang W, Cai X, et al. Centrally necrotizing carcinoma of the breast: clinicopathological analysis of 33 cases indicating its basal-like phenotype and poor prognosis. *Histopathology.* 2010;57:193-201.
102. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995; 333(26):1757–63.
103. Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992;340:1120-4.
104. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, et al. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma. *Histopathology.* 1999;34:35-42.
105. Ogawa Y, Chung Y-S, Nakata B, et al. Microvessel quantitation in invasive breast cancer by staining for factor VIII-related antigen. *Br J Cancer.* 1995;71:1297-301.
106. Toi M, Inada K, Suzuki H, et al. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:193-204.

107. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, et al. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol.* 1998;185:394-401.
108. Gasparini G. Clinical significance of the determination of angiogenesis in human breast cancer. update of the biological background and overview of the Vicenza studies. *Burl Cancer.* 1996;32A:2485-93.
109. Penault-Uorca F, Sun ZZ, Viens P, et al. Tumor angiogenesis is not a predictive marker of responsiveness to conventional adjuvant chemotherapy. *Mod Pathol.* 1997;10:23.
110. Teicher BA, Holden SA, Ara G, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int J Cancer.* 1994;57:920-5.
111. Alderson MR, Hamlin I, Staunton MD. The relative significance of prognostic factors in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 1971;25:646-56.
112. Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer.* 1993;72:2993-3001.
113. Roses DF, Bell DA, Flotte TJ, et al. Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (T1N0M0) breast cancer. *Am Clin Pathol.* 1982;78:817-20.
114. Uifdahl B, Ahlin C, Holmqvist M, et al. Inflammatory cells in nodenegative breast cancer. *Acta Oncol.* 2012;51:680-6.
115. Pupa SM, Bufalino R, Invernizzi AM, et al. Macrophage infiltrate and prognosis in c-B-2-ressing breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1996;14:85-94.
116. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis.* 2001;22(6):851-60.
117. Nadler Y, Camp L, Giltane JM. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10:1-12.
118. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc/Max interaction and function. *Oncogene.* 2003;22:6151-9.
119. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there agedifferentials? *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1994;(16):35-42.

120. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol.* 1994;12:888-94.
121. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer.* 1996;74(11):1796-800.
122. Simpson HW, Cornelissen G, Katinas G, et al. Meta-analysis of sequential luteal-cycle-associated changes in human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;63:171–3.
123. Ramakrishnan R, Khan SA, Badve S. Morphological changes in breast tissue with menstrual cycle. *Mod Pathol.* 2002;15:1348–56.
124. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1941;47:200–2.
125. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 2006;174:169–74.
126. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008;129:705–33.
127. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem.* 2004;37:529-40.
128. Dewar R, Fadare O, Gilmore H, Gown AM. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: myoepithelial markers in breast pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135:422–9.
129. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1998;433:119-29.
130. Abd El-Rehim D, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004;203:661-71.
131. Purdie AC. A Practical Approach to the Use of Immunohistochemistry in the Diagnosis and Management of Breast Disease. In: Shousa S, editor. *Breast Pathology, Problematic Issues.* 1st edition. Switzerland: Springer International Publishing; 2017.
132. Rakha EA, Patel A, Powe DG, et al. Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1472–9.

133. Acs G, Lawton TJ, Rebbeck TR, et al. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:85–98.
134. Sarrió D, Pérez-Mies B, Hardisson D, et al. Cytoplasmic localization of p120^{ctn} and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene.* 2004;23:3272–83.
135. Tan P-H, Schnitt SJ, van de Vijver MJ, et al. Papillary and neuroendocrine breast lesions: the WHO stance. *Histopathology.* 2015;66:761–70.
136. Lerwill MF. Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:1076–91.
137. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol.* 2007;127:103–13.
138. Wang Z, Spaulding B, Sienko A, et al. Mammaglobin, a valuable diagnostic marker for metastatic breast carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2:384–9.
139. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, et al. GATA3: a multispecific but potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of 2500 epithelial and nonepithelial tumors. *Am J Surg Pathol.* 2014;38:13–22.
140. Asch-Kendrick R, Cimino-Mathews A. The role of GATA3 in breast carcinomas: a review. *Hum Pathol.* 2016;48:37–47.
141. Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol.* 2005;18:1623–31.
142. Tse GMK, Putti TC, Lui PCW, et al. Increased c-kit (CD117) expression in malignant mammary phyllodes tumors. *Mod Pathol.* 2004;17:827–31.
143. Hungermann D, Buerger H, Oehlschlegel C, et al. Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast – a spectrum of monophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC Cancer.* 2005;5:92.
144. Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998;58:2014–9.

145. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5287-312.
146. Jia WJ, Jia HX, Feng HY, Yang YP, Chen K, Su FX. HER2-enriched tumors have the highest risk of local recurrence in Chinese patients treated with breast conservation therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(1):315-20.
147. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin BreastCancer*. 2009;9(2):73-81.
148. Lester SC, Bose S, Chen YY, Connolly JL, de Baca ME, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(10):1515-38.
149. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet*. 2001;2:133-40.
150. Miljuš D, Živković S, Božić Z. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2015. 2017;(17):46.
151. Breastcancer.org; Symptoms & Diagnosis; Types of Breast Cancer; Invasive Ductal Carcinoma; Breastcancer.org, Ardmore 2018. Available from: <http://www.breastcancer.org/symptoms/types/idc> Accessed April 12, 2018.
152. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, et al. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*. 2002; 347(8):567–75.
153. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, et al. Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancer of the breast. *N Engl J Med*. 1981; 305(1):6–11.
154. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Version 1.2016. www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf NCCN Clinical Practice.
155. Krop I, Andre F, Bast RC, Barlow W, Collyar DE, Elizabeth M, et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Focused Update. 2018;35(24).

156. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20: 1319–29.
157. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* [Internet]. 2010;11(2):174–83.
158. Rossi L, Laas E, Mallon P, Vincent-Salomon A, Guinebretiere JM, Lerebours F, et al. Prognostic impact of discrepant Ki-67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2015;113(7):996–1002.
159. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* [Internet]. 2017;75:284–98.
160. Jang MH, Kim HJ, Chung YR, Lee Y, Park SY. A comparison of Ki-67 counting methods in luminal Breast Cancer: The Average Method vs. the Hot Spot Method. *PLoS One.* 2017;12(2):1–15.
161. Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, et al: Ki-67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in pakistani patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14: 4353-8.
162. Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, et al. Ki-67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer.* 2011;11: 486.
163. Heusinger K, Jud SM, Haeberle L, et al: Association of mammographic density with the proliferation marker Ki-67 in a cohort of patients with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012,135: 885-92.
164. Sun J, Chen C, Wei W, Zheng H, Yuan J, Tu Y, et al. Associations and indications of Ki-67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study. *Oncol Lett.* 2015;10(3):1741–8.
165. Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer.* 1995;71: 146-9.
166. Midulla C, De Iorio P, Nagar C, et al. Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki-67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19: 4033-7.

167. Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996; 2(3):585–92.
168. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;7(2):101–13.
169. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Cetto GL. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer.* 1997;74(4):433–7.
170. Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, Karaiskos I, Alexiou I, Pateras I, Konstantoudakis K, Stamatakos M. Correlation between Ki-67 and Breast Cancer Prognosis. *Oncology.* 2013;84(4):219–25.
171. Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Monville F, Esterni B, Extra JM, Houvenaeghel G, Xerri L, Bertucci F, Birnbaum . Association of GATA3, P53, Ki-67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11(2):R23.
172. Milde-Langosch K, Karn T, Müller V, Witzel I, Rody A, Schmidt M, Wirtz RM. Validity of the proliferation markers Ki-67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(1):57–67.
173. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 1991;68(3):549–57.
174. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, Golouh R, Goldhirsch A, Coates AS, Collins J, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA; International Breast Cancer Study Group. Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors—a surrogate marker? *Cancer* . 2003;97(5):1321–31.
175. Domagala W, Markiewski M, Harezga B, Dukowicz A, Osborn M. Prognostic significance of tumor cell proliferation rate as determined by the MIB-1 antibody in breast carcinoma: its relationship with vimentin and p53 protein. *Clin Cancer Res.* 1996;2(1):147–54.

176. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, Hillen HF. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1998;78(4):460–5.
177. Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E, Colleoni M, Price KN, Golouh R, Perin T, Brown RW et al. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(3):207–12.
178. Luporsi E, Andre´ F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, Tubiana-Mathieu N, Sigal-Zafrani B, Arnould L, Gompel A et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(3):895–915.
179. Loehberg CR, Almstedt K, Jud SM, Haeberle L, Fasching PA, Hack CC, Lux MP, Thiel FC, Schrauder MG, Brunner M et al. Prognostic relevance of Ki-67 in the primary tumor for survival after a diagnosis of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(3):899–908.
180. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol*. 2005;16:1723–1739.
181. Tashima R, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Okumura Y, Nakano M, et al. Evaluation of an optimal cut-off point for the Ki-67 index as a prognostic factor in primary breast cancer: A retrospective study. *PLoS One*. 2015;10(7):1–10.
182. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539–52.
183. Niikura N, Masuda S, Kumaki N, Xiaoyan T, Terada M, Terao M, et al. Prognostic significance of the Ki-67 scoring categories in breast cancer subgroups. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2014;14(5):323–9.
184. Barbareschi M, Girlando S, Mauri FM, et al. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki-67 antibodies in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 1994; 102: 171–5.
185. Kennedy JC, el-Badawy N, DeRose PB, Cohen C. Comparison of cell proliferation in breast carcinoma using image analysis (Ki-67) and flow cytometric systems. *Anal Quant Cytol Histol*. 1992; 14: 304–11.

186. Gasparini G, Pozza F, Meli S, Reitano M, Santini G, Bevilacqua P. Breast cancer cell kinetics: immunocytochemical determination of growth fractions by monoclonal antibody Ki-67 and correlation with flow cytometric S-phase and with some features of tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 1991; 11: 2015–21.
187. Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki-67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki-67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology.* 2006; 48: 674–82.
188. Rudas M, Gnant MF, Mittlbock M, Neumayer R, Kummer A, Jakesz R, Reiner G, Reiner A. Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;32(2):165–75.
189. Pierga JY, Leroyer A, Viehl P, Mosseri V, Chevillard S, Magdelenat H. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;37(1):57–64.
190. Liu S, Edgerton SM, Moore DH 2nd, Thor AD. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1716–23.
191. Vasseur F, Baranzelli MC, Fournier C, et al. Ki-67 in young patients with breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil.* 2013;41:16–9.
192. Kim HW, Lee HM, Hwang SH, et al. Patterns and biologic features of p53 mutation types in Korean breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2014;17:1–7.
193. Najjar H, Easson A. Age at diagnosis of breast cancer in Arab nations. *Int J Surg [Internet].* 2010;8(6):448–52.
194. Chang J, Ormerod M, Powles TJ, Allred DC, Ashley SE, Dowsett M. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2000;89(11):2145–52.
195. Archer CD, Parton M, Smith IE, Ellis PA, Salter J, Ashley S, Gui G, Sacks N, Ebbs SR, Allum W, Nasiri N, Dowsett M (2003) Early changes in apoptosis and proliferation following primary chemotherapy for breast cancer. *Br J Cancer.* 89(6):1035–41.

196. Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'herm R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M. Studies of the potential utility of Ki-67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;82(2):113–23.
197. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Han W, Kim DW, Kim TY et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res.* 2011;13(2):R22.
198. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, Brunelli A, Bolsi G, Allevi G, Generali D et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki-67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2001;85(8):1106–12.
199. Colleoni M, Zahrieh D, Gelber RD, Viale G, Luini A, Veronesi P, Intra M, Galimberti V, Renne G, Goldhirsch A. Preoperative systemic treatment: prediction of responsiveness. *Breast.* 2013;12(6):538–42.
200. Ferguson NL, Bell J, Heide R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, Munsey B, Panella T, Orucevic A. Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women. *Breast J.* 2013;19(1):22–30.
201. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(3):477–91.
202. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R et al. Assessment of Ki-67 in breast cancer: recommendations from the International Ki-67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656–64.
203. Polley MY, Leung SC, McShane LM et al. An international Ki-67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1897–906.
204. Polley MY, Leung SC, Gao D et al. An international study to increase concordance in Ki-67 scoring. *Mod Pathol.* 2015;28(6):778–86.
205. Focke CM, Bu H, Diest PJ Van, Finsterbusch K, Gla D, Korsching E. ScienceDirect Interlaboratory variability of Ki-67 staining in breast cancer Thomas Decker on behalf of German Breast Screening Pathology. 2017;84:219–27.

206. Bustreo S, Paola SO, Michela C, Airoidi M, Pedani F, Papotti M, et al. Optimal Ki-67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation : a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):363–71.
207. Carbognin L, Sperduti I, Fabi A, Dieci MV, Kadrija D, Griguolo G, et al. Prognostic impact of proliferation for resected early stage “pure” invasive lobular breast cancer: Cut-off analysis of Ki-67 according to histology and clinical validation. *Breast.* 2017;35:21–6.
208. Oddo D, Pulgar D, Elgueta N, Acevedo F, Razmiliz D, Navarro ME, et al. Can Histological Grade and Mitotic Index Replace Ki-67 to Determine Luminal Breast Cancer Subtypes? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(1):179–83.
209. Kilickap S, Kaya Y, Yucel B, Tuncer E, Babacan NA, Elagoz S. Higher Ki-67 expression is associates with unfavorable prognostic factors and shorter survival in breast cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(3):1381–5.
210. Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Ito Y, et al. Ki-67 evaluation at the hottest spot predicts clinical outcome of patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. *Breast Cancer.* 2015;22(1):71–8.
211. Yamashita H, Ogiya A, Shien T, Horimoto Y, Masuda N, Inao T, et al. Clinicopathological factors predicting early and late distant recurrence in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2016;23(6):830–43.
212. Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, et al. Ki-67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: A translational investigation in the neoadjuvant gepartrio trial. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2786–93.
213. Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, Arnes J, Eide J, Collett K. Evaluation of Ki-67 Expression across Distinct Categories of Breast Cancer Specimens : A Population-Based Study of Matched Surgical Specimens, Core Needle Biopsies and Tissue Microarrays. *Plos One.* 2014;9(11):1–11.