



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Бојан З. Милошевић

ЕКСПРЕСИЈА МАМАГЛОБИНА У ТКИВУ КАО ПРЕДИКТОРА
АГРЕСИВНОСТИ ТУМОРА ДОЈКЕ

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Срђан Нинковић, ванредни професор

Крагујевац, 2019. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Бојан З. Милошевић
Датум и место рођења: 11.07.1976. Крагујевац, Република Србија.
Садашње запослење: КЦ- Крагујевац, Клиника за општу и грудну хирургију, специјалиста опште хирургије; Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, асистент за ужу научну област Хирургија, Крагујевац, Република Србија.
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Експресија мамаглобина у ткиву као предиктора агресивности тумора дојке
Број страница: 162
Број слика: 18
Број библиографских података: 135
Установа и место где је рад израђен: КЦ - Крагујевац, Клиника за општу и грудну хирургију, Служба за патолошку анатомску дијагностику; Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију.
Научна област (УДК): Медицина, Клиничка и експериментална хирургија
Ментор: Проф. др Срђан Нинковић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 14.04.2016. год.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-834/25 од 13.09.2016. год.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Проф. др Јасна Јевђић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник 2. Доц. др Срђан Нинковић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, члан 3. Доц. др Владан Живаљевић , доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан 4. Проф. др Снежана Јанчић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан 5. Доц. др Гордана Радосављевић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:

1. **Проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **Проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. **Проф. др Владан Живаљевић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан

Датум одбране дисертације:

САЖЕТАК

УВОД: Упркос напретку који је постигнут у лечењу карцинома дојке очигледан је висок морталитет и морбидитет када је у питању ова болест, тако да је неопходно даље изучавање на овом пољу у циљу проналажења нових маркера као предиктора агресивности болести. Хумани мамаглобин се сматра једним од најзначајнијих маркера хематогене дисеманације карцинома дојке.

МЕТОД: У испитивање су укључени пацијенти са дијагностикованим примарним карциномом дојке лечени у КЦ Крагујевац, у периоду праћења од 5 година (2011-2016). Током хируршке интервенције се узоркује туморско и перитуморско ткиво дојке и подвргава патохистолошкој обради. Потом се врше лабораторијске анализе ради утврђивања нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву, а затим се добијени резултати упоређују са анализом маркера који су у корелацији са појавом удаљених метастаза и рецидива болести.

ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ: Ниво мамаглобина у тумору и ткиву у непосредном окружењу тумора код пацијенткиња које болују од карцинома дојке корелира са потенцијалом самог тумора да метастазира или да рецидив након лечења. Однос нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву у корелацији са осталим маркерима канцерогенезе има прогностички значај када је у питању карцином дојке. Ниво мамаглобина у тумору и ткиву у непосредном окружењу тумора корелира са одређеним патохистолошким типовима. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву чак и код пацијената код којих је постигнута Р0 хируршка ресекција може указати на постојање системске болести.

ОЧЕКИВАНИ ЗАКЉУЧАК: Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву у корелацији са осталим анализираним маркерима може да издвоји пацијенте под повећаним ризиком од појаве системске болести, што би за последицу имало спровођење раног радикалног адјувантног третмана.

Кључне речи: карцином дојке, мамаглобин, рецидив, метастазе

ABSTRACT

INTRODUCTION: Despite the achieved advance in the breast cancer treatment, high rates of mortality and morbidity are obvious related to this disease, so further study in this field is necessary in order to find new predictors of disease aggressiveness. Human mammaglobin is significant marker of hematogenous dissemination of breast carcinoma.

METHOD: This research included patients with diagnosed primary breast cancer treated at the Clinical Center in Kragujevac during the five-year follow up period (2011 - 2016). During the surgical intervention, a sample of tumoral and peritumoral breast tissue is taken and sent for a pathohistological examination. After that, laboratory analyses are done to analyze the level of mammaglobin in cancer and microenvironment tissue and then, obtained results are compared with the marker analysis that are in correlation with the appearance of distant metastases and disease relapse.

EXPECTED RESULTS: The level of mammaglobin in cancer and microenvironment tissue in breast carcinoma patients correlates with aggressiveness degree. The ratio of mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue in correlation with other markers of carcinogenesis has a prognostic role in the outcome in breast carcinoma patients. The mammaglobin level in tumoral and breast cancer surrounding tissue correlates with certain pathohistological types. The mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue even in patients who underwent P0 surgical resection might indicate the existence of systemic disease.

EXPECTED CONCLUSION: The mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue in correlation with other analyzed markers may identify patients with higher risk of the appearance of systemic disease, which would have as a consequence conducting of early radical adjuvant treatment.

Key words: breast carcinoma, mammaglobin, relapse, metastases

ПОСВЕЋЕНО МОМ ОЦУ ЗОРАНУ....

САДРЖАЈ:

1. УВОД	9
1.1. Историјски ток рака дојке	11
1.2. Фактори ризика за настанак рака дојке	11
1.3. Васкуларизација дојке и лимфна дренажа	13
1.4. Класификација тумора дојке.....	14
1.5. Прогностички и предиктивни фактори рака дојке	20
1.6. Потенцијални прогностички / предиктивни маркери рака дојке	28
1.7. Хирургија инвазивног рака дојке	33
1.8. Метастатски рак дојке	39
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	41
2.1. Радне хипотезе	41
2.2. Циљеви истраживања	41
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ СТУДИЈЕ.....	42
3.1. Врста судије.....	42
3.2. Методологија.....	42
4. РЕЗУЛТАТИ.....	49
4.1. Клиничко-патолошке карактеристике код пацијената са карциномом дојке	49
4.2. Карактеристике лечења примарног карцинома дојке	58
4.3. Концентрација мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора	59
4.4. Анализа генске експресије мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијената са карциномом дојке	61

4.5. Предиктивни значај концентрације мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора	63
4.6 Предиктивни значај генске експресије мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора.....	65
5. ДИСКУСИЈА.....	82
6. ЗАКЉУЧЦИ	90
7. СКРАЋЕНИЦЕ И АКРОНИМИ.....	91
8. ЛИТЕРАТУРА.....	92

1. УВОД

Карцином дојке је водећи узрок смрти узроковане карциномском болешћу у САД са преко 230,000 новодијагностикованих пацијената у 2014-ој години и са готово 40,000 смртних исхода (Siegel и сар., 2015). Упркос напретку који је постигнут коришћењем бројних хормонских, генских и молекуларних маркера (естроген рецептор, прогестреон рецептор, HER2, Ki67, итд) очигледан је висок морталитет и морбидитет када је у питању ова болест, тако да је неопходно даље изучавање на овом пољу у циљу проналажења нових маркера као предиктора агресивности карциномске болести дојке (Zambrano и Yeh, 2016.) (Inoue и Fry., 2016). Кроз историјат хирургије дојке сачињени су бројни системи класификације карцинома у циљу оптималног избора лечења (Džodić и сар., 2014). Карцином дојке је на основу патохистолошких карактеристика као најзначајнијег параметра класификације био подељен на инванзивни дуктани карцином (преко 80% укупног броја), инвазивни лобуларни са око 10% учешћа док осталих 10% чине сви остали хистолошки типови који су ређе заступљени (Toss и Cristofanilli, 2015). Са напретком медицине дошло се до појма индивидуализације терапије, тј избора третмана који би одговарао сваком појединачном пацијенту (Koren и Bentires-Alj, 2015). Данас је актуелно молекуларно профилисање на основу кога се карцином дојке као једна врло хетерогена група дели на најмање 6 подтипова. Ова класификација има импликације на избор терапијског модалитета и последично на исход лечења (Reyes и сар., 2012). Хумани мамаглобин је члан утероглобинске групе протеина који се у литератури често наводи као маркер специфичан за карцином дојке. Док се ниски нивои мамаглобина могу наћи у здравом ткиву дојке, његова експресија је драматично повишена код пацијената са карциномом дојке. Његова детекција у крви је у вези са појавом метастаза, а његов ниво утиче на прогнозу болести (Watson и Fleming, 1996). Watson и Fleming су 1994-те године методом PCR (polymerase chain reaction) изоловали ланац цДНК која је кодирала протеин, данас познат као хумани мамаглобин (hMAG) (Bellone и сар., 2013). Осим у ткиву дојке, hMAG-B подтипа (hMAG B-1 и B-2) је такође детектован и у ткиву карцинома ендометријума и оваријума (Al Joudi, 2014). У литератури се често користи различита номенклатура када је у питању мамаглобин, тако да поред hMAG можемо срести бројне скраћенице као што су: MAM, MGB, UGB3, MMG, SCGB2A1 (Zafrakas и сар., 2006). Хумани мамаглобини А и В су хомологни чланови велике фамилије протеина са великим

значајем у дијагностици и прогнози исхода лечења пацијената са карциномом дојке (Liu и сар., 2012). Клиничке студије сугеришу да велики број пацијената са карциномом дојке има системску болест и да код приближно 25–30% пацијента код којих су верификовани негативни лимфни нодуси припадајуће аксиле у време хируршке интервенције ипак долази до појаве удаљених метастаза у петогодишњем периоду праћења и често до смртог исхода. Системска адјувантна терапија може да допринесе ерадикацији резидуалних карциномских ћелија које су се већ прошириле до удаљених ткива и органа. Ови потенцијални фокуси тумора могу дуго остати аваскуларни и клинички неми али задржавају потенцијал за раст и размножавање тако да се могу активирати и после више година. Хумани мамаглобин (hMAM) је експримиран у мањој концентрацији у нормалном ткиву дојке, али је у карциномском ткиву дојке његова концентрација повишена, док у крви и коштаној сржи здравих пацијената није присутан. Показао се као значајан предиктор јављања метастаза у костима код пацијената са карциномом дојке (Li и сар., 2011). Хумани мамаглобин се сматра једним од најзначајнијих маркера хематогене дисеманације карцинома дојке (O'Brien и сар., 2012). У литератури се може наћи више радова који се тичу анализе нивоа мамаглобина у периферној крви пацијената са карциномом дојке, мање је радова који описују ниво мамаглобина у самом туморском ткиву, док је најмање радова који се тичу испитивања нивоа мамаглобина у перитуморском ткиву. Наш циљ је анализа нивоа мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора дојке, њихова корелација са другим маркерима за које је познато да утичу на појаву рецидива тумора и метастазирање као што су Ki 67, E-Cadherin, итд., што би директно утицало на избор одговарајућег модалитета лечења.

1.1. ИСТОРИЈСКИ ТОК РАКА ДОЈКЕ

У старом Египту, су пронађени папируси са белешкама о неизлечивом тумору дојке. Тако **Хипократ** наводи да је узрок настанка тумора дојке вишак “црне жучи”. Говорио је:” Боље је не ексцидирати рак, они којима је уклоњен брзо нестају, док они којима није уклоњен живе дуже”.

Гален је сматрао да постоји више и мање опасни тумори. Препоручивао је промтну ексцизију рака дојке.

Henri Le Dran је први предложио лимфаденектомију.

Claude-Nicolas Le Cat је изнео тезу да је хирургија једина опција лечења.

Virchow је у 19. веку пажљивим истраживањем рака дојке закључио да он настаје из епителних ћелија, а да се потом шири дуж фасција и лимфним каналима. Он је рак дојке сматрао локалном болешћу која се може излечити локалном терапијом, односно операцијом.

William Halstead је устновио модалитет лечења који се заснивао на мутилантној операцији уклањања дојке, мишића грудног коша и радикалној лимфаденектомији.

Benson, шкотски хирург, поставља хипотезу да естроген из јајника има улогу у патогенези болести те стога препоручује уклањање јајника.

Bernard Fisher, 1976. године, указује на значај поштедне хирургије праћене адјувантним лечењем (Džodić и сар., 2014).

1.2. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРЦИНОМА ДОЈКЕ

Фактори који доприносе настанку карцинома дојке који се наводе у литератури су бројни: генетски, хормонски, фактори околине и географски. Није једноставно одредити улогу сваког понаособ, јер су често међусобно испреплетани. Основни фактори ризика су: позитивна породична анамнеза, рана прва менструација, бенигна патологија дојке, нерађање или малобројно рађање, касна прва трудноћа, касна менопауза (Dupont и Page, 1995).

Генетски фактори за настанак рака дојке су комплексни из више разлога, јер постоје бројне генске мутације које могу да доведу до настанка рака дојке. Жене које су лечене од операбилног рака дојке у 5-15% случајева имају висок ризик од метакроног рака контралатералне дојке. Ризик је посебно висок код жена код којих постоји позитивна

породична анамнеза, код млађих жена у време откривања карцинома и код жена са лобуларним типом рака дојке. У више од 50% случајева билатералног рака дојке постоје мутације на BRCA 1 и BRCA 2 (Breast Cancer Genes 1 and 2) супресорским генима (Kollias и сар., 2000). Гени одговорни за настанак рака дојке су из групе супресорских гена, BRCA 1 и BRCA 2. Мутације ових гена носе са собом ризик од настанка не само рака дојке, већ и оваријума. Жене којима је дијагностикована мутација BRCA 1 гена имају ризик од скоро 80% да добију рак дојке. У таквим случајевима се може размишљати о превентивним супкутанним мастектомијама са реконструкцијом (Grann и сар., 1998). Генетска испитивања треба да имају за циљ да се оптимизује скрининг рака дојке код младих жена код којих постоји повишени ризик. Рано откривање рака дојке и адекватно лечење омогућавају висок проценат излечења. Женама са веома високим ризиком од рака дојке може се саветовати хемопревенција или превентивна субкутана мастектомија са реконструкцијом, али је одлука ипак на пацијенткињи, након што јој се адекватно и детаљно објасне ризици, али и добит коју превентивна субкутана мастектомија са реконструкцијом носи (Агиуан, 1995). Рана прва менструација, касна менопауза, нерађање или касна прва трудноћа, после 30 године, са собом носе веома велики ризик од настанка рака дојке. Што је период између прве менструације и менопаузе дужи, то је ризик за настанак рака дојке већи (Hulka и Stark, 1995).

Утицај оралних контрацептива на настанак рака дојке је дискутабилан. Бројне студије које су рађене нису показале повишен ризик од рака дојке због употребе оралних контрацептива. Код жена млађих од 45 година присутан је умерено повишен ризик од рака дојке током примене оралних контрацептива и неколико година по престанку (Le, 1999).

У литератури постоје подаци о повишеном ризику од рака дојке, чак 30 - 40 % код жена у менопаузи које су узимале хормонску (естрогену) супституцију. Међутим, бројни радови показују да је ризик повишен само током узимања супституције и престаје по њеном прекидању. Супституциона хормонска терапија естрогенима и прогестеронима у менопаузи удружена је са повећаном учесталашћу рака дојке. Ризик расте са дужином узимања хормонске супституције (Colditz и сар., 1999).

Бројне студије указују на значај нутриције и гојазности код жена у постменопаузи у настанку карцинома дојке. Повећан унос витамина, поврћа и воћа умањује ризик од настанка рака дојке (Newman и сар., 1996).

1.2.1. Патохистолошке карактеристике BRCA 1 и BRCA 2 (Breast Cancer Genes 1 and 2) зависних карцинома дојке

За карциноме који су повезани са мутацијама у високо пенетрабилном гену BRCA1 (енг. BReast CAncer gene 1) је примећено да су лошије диферентовани (хистолошки градус 3), имају већи степен једарних плеоморфизама као и већи број митоза у односу на спорадичне туморе (Garcia-Casado и сар., 2011). Око 75% BRCA1 зависних карцинома су по типу инвазивни дуктални, али и атипични медуларни карциноми су чешћи код BRCA1 зависних тумора (15%) у односу на спорадичне форме (3%) (Lalloo и Evans, 2012). Најупечатљивија карактеристика BRCA1 везаних карцинома дојке (90% случајева) је недостатак експресије стероидног рецептора за естроген (ER) који представља један од најзначајних прогностичких и предиктивних маркера (Mavaddat и сар., 2010). Доказан је и недостатак експресије рецептора за прогестерон (PR) као и нижа учесталост HER2 експресије у поређењу са спорадичним облицима. Што се тиче пролиферативних маркера, висока експресија Ki-67, као и висок митотски индекс, такође карактеришу BRCA1 зависне карциноме (Mangia и сар., 2011).

Патологија карцинома дојке код носилаца мутација у другом високо пенетрабилном гену у карциному дојке, BRCA2 (енг. BReast CAncer gene 2), није толико карактеристична као код BRCA1. BRCA2 зависни тумори су средње или ниско диферентовани карциноми (хистолошки градуси 2 и 3) без повећања једарних плеоморфизама, и немају обавезно повећан митотски индекс (Lalloo и Evans, 2012). Лобуларни карцином као и дуктални карцином *in situ* (DCIS) су пријављени као чешћи код BRCA2 зависних тумора у односу на BRCA1 зависне туморе. Што се тиче статуса стероидних рецептора, BRCA2 зависни тумори имају сличан ниво експресије ER и PR као и спорадични облици. Повећана HER2 експресија је ретка код BRCA2 везаних карцинома са учесталошћу која варира од 0% до 3,9% (Mangia и сар., 2011).

1.3. ВАСКУЛАРИЗАЦИЈА ДОЈКЕ И ЛИМФНА ДРЕНАЖА

Крв у дојку већином доводе две велике артерије: унутрашња грудна артерија (a. thoracica /mammaria/ interna) која са својим гранама васкуларизује око 60% ткива дојке, углавном средишње делове и латерална грудна артерија (a. thoracica lateralis) која васкуларизује око 30% дојке, углавном горње и латералне делове. Мањи део крви у дојку долази путем

огранака других артерија: торакоакромијалне, међуребарних, подлопатичне и торакодорзалне артерије (Osborne, 2004).

Венска дренажа показује значајне индивидуалне разлике, али углавном прати артеријску васкуларизацију. Површински венски сплет налази се у поткожном ткиву у тече од латералне према медијалној страни, а крв скупља *v. thoracica interna*. Крв из дубоких делова дојке дренира се путем огранака три вене: то су унутрашња грудна вена, пазушна и међуребарне вене (Rosen, 2001).

Лимфна дренажа дојке захтева посебну пажњу због улоге коју има у метастазирању рака дојке. Преко 75% лимфе, углавном из латералних квадраната дренира се у лимфне чворове пазушне јаме или аксиле (*nodi lymphoidei axillares*). Остатак лимфе, углавном из медијалних делова дојке, дренира се или у парастерналне лимфне чворове (*nodi lymphoidei parasternales*) или у чворове супротне дојке, а лимфа из доњих делова у чворове (*nodi phrenici inferiores*). Изузев коже брадавице и ареоле, лимфа из коже дојке, дренира се у аксиларне лимфне чворове, доње дубоке лимфне чворове врата (*nodi lymphoidei cervicales inferiores*), лимфне чворове испод клавикуле (*nodi lymphoidei infraclaviculares*) и парастерналне лимфне чворове (Rosen, 2001).

1.4. КЛАСИФИКАЦИЈА ТУМОРА ДОЈКЕ

Због сложене хистолошке грађе дојке, хистогенетско порекло тумора у њој може бити: епително, мезенхимно и мешовито. У оквиру сваке хистогенетске групе постоје: **бенигни** (палпиломи, аденоми, фиброаденоми, филодни тумори), **гранични** (*borderline*- филодни тумори) и **малигни тумори** (карциноми, саркоми, карциносаркоми и малигни филодни тумори).

Постоје бројне класификације карцинома дојке, почев од оних које се заснивају на хистолошким карактеристикама тумора, преко молекуларних класификационих система, до оних који у први план стављају инвазивност или биолошке особине тумора (Scarff и Torloni, 1998).

Најчешћи малигни тумори дојке су порекла епителних ћелија (карциноми) у односу н остале малигне туморе.

Први корак у хистопатолошкој дијагностици рака дојке је сагледавање степена његове инвазивности, односно да ли је у питању карцином *in situ* или инвазивни. Степен

инвазивности рака дојке је од изузетног значаја за врсту терапије и за прогнозу даљег тока болести. Неинвазивни, микроинвазивни и инвазивни карциноми пречника до 10 милиметара, чине групу која је означена као *early (рани)* карцином код кога је могуће применити поштедну операцију и постоперативну радиотерапију остатка дојке (Silverstein, 1997).

1.4.1. Одређивање клиничког стадијума рака дојке (TNM класификација)

TNM класификација укључује величину примарне туморске промене (T), захваћеност лимфних нодуса (N) и удаљене метастазе (M).

TNM класификација тумора дојке према Светској здравственој организацији (Marković, 2013).

1.4.1.1. Клиничка и патохистолошка класификација примарног тумора (T)

T – величина примарног тумора:

TX - примарна туморска промена се не може одредити

T0 - примарни тумор није доказан

Tis - карцином који није пробио базалну мембрану

T1 - тумор мањи или једнак од 2 cm

T1a: тумор дијаметра 0,1 до 0,5 cm

T1b: тумор дијаметра 0,5 до 1 cm

T1c: тумор дијаметра 1 до 2 cm

T2 - тумор дијаметра 2 до 5 cm

T3 - тумор већи од 5 cm

T4 -тумор који инфилтрише зид торакса или кутис

T4a: захватање зида торакса

T4b: улцерозне промене кутиса дојке, са ипсилатералним сателитским кутаним нодусима или оток коже

T4c: T4a, T4b

T4d: запаљенски тумор

Регионални лимфни нодуси:

Пазушни (ипсилатерални): интерпекторални (Rotter) лимфни нодуси као и они дуж пазушне вене и њених грана, и то:

- **I ниво:** лимфни нодуси латерално од спољашње ивице m. pectoralis minor-a.
- **II ниво:** лимфни нодуси између медијалне и латералне ивице m. pectoralis minor-a
- **III ниво:** лимфни нодуси у апексу пазушне јаме и медијално од медијалне ивице m. pectoralis minor-a, као и подкључни и надкључни лимфни нодуси.

Подкључни (ипсилатерални)

Лимфни нодуси дуж ипсилатералне унутрашње мамарне артерије

Надкључни (ипсилатерални)**1.4.1.2. Клиничка класификација регионалних лимфних чворова (N):**

NX – непознат статус регионалних лимфних нодуса

N0 - лимфни нодус у коме нису нађени секундарни депозити

N1 – секундарни депозит у мобилном ипсилатералном пазушном лимфном нодусу I и II нивоа

N2 - секундарни депозит у мобилном ипсилатералном пазушном лимфном нодусу I и II нивоа, фиксирани, сливени или уколико постоји очигледна ипсилатерална лимфаденопатија дуж унутрашње мамарне артерије али без очигледних секундарних депозита у пазушним лимфним нодусима

N2a - секундарни депозит у пазушном лимфном нодусу/нодусима који су срасли међусобно или са околним структурама

N2b - секундарни депозити само у клиничким прегледом очигледном нодусу у околини унутрашње мамарне артерије, али без клинички очигледних секундарних депозита у пазушним лимфним нодусима.

N3 - секундарни депозити у ипсилатералном подкључном или надкључном лимфном нодусу, око унутрашње мамарне артерије

N3a - секундарни депозит у подкључном лимфном нодусу

N3b - секундарни депозит у лимфном нодусу пазушне јаме или око унутрашње мамарне артерије

N3c - секундарни депозит у надкључном лимфном нодусу

1.4.1.3. Патохистолошка класификација припадајућих лимфних нодуса (pN):

pNX – статус припадајућих лимфних нодуса није познат

pN0 - припадајући лимфни нодус без секундарних депозита

pN1 – секундарни депозити у 1 до 3 ипсилатерална пазушна лимфна нодуса, или ипсилатерални захваћен стражарски нодус.

pN1ми - микрометастаза (до 2 мм)

pN1a - секундарни депозит у 1 до 3 пазушна лимфна нодуса, бар један већи од 2 мм

pN1b – захваћен стражарски лимфни нодус

pN1c - секундарни депозит у 1 до 3 нодуса, при чему су унутрашњи нодуси са микрометастазом стражарског лимфног нодуса

pN2 - секундарни депозити у 4-9 ипсилатералних пазушних лимфних нодуса

pN2a - секундарни депозит у 4-9 пазушних лимфних нодуса, од којих је један промера изнад 2 мм

pN2b - секундарни депозит у клиничким прегледом евидентном унутрашњем нодусу, али без секундарних депозита у пазушним лимфним нодусима.

pN3 - секундарни депозити описани као:

pN3a - секундарни депозити у 10 или више пазушних лимфних нодуса (најмање 1 изнад 2 мм) или секундарни депозит у подкључним нодусима

pN3b - секундарни депозити у палпабилном унутрашњем лимфном нодусу заједно са захваћеним пазушним лимфним нодусом или секундарни депозити присутни у најмање 4 пазушна нодуса и у лимфним нодусима са микрометастазом у стражарском лимфном нодусу, а која није палпабилна.

pN3c - секундарни депозит у надкључном лимфном нодусу

1.4.1.4. Клиничка и патохистолошка класификација удаљених секундарних депозита (M)

M - удаљени секундарни депозити:

MX - постојање удаљених секундарних депозита непознато

M0 - без удаљених секундарних депозита

M1 – постоје удаљени секундарни депозити

1.4.1.5. Постојање резидуалног тумора (R)

Постоперативно постојање резидуалног тумора означено је словом **R**.

RX – не може се установити да ли има малигну хелија на маргинама препарата

R0 – на ивицама ресекције нема малигну хелија

R1 - Микроскопски присутно малигно ткиво на маргинама препарата

R2 - Макроскопски присутно малигно ткиво на маргинама препарата

1.4.1.6. Стадијуми рака дојке према TNM класификацији

Стадијум 0	T(без пробијања базалне мембране), N(0), M(0)
Стадијум IA	T(1), N(0), M(0)
Стадијум IB	T(0), T(1), N(1mi), M(0)
Стадијум IIA	T(0); T(1), N(1), M(0); T(2), N(0), M(0)
Стадијум IIB	T(2), N(1), M(0); T(3), N(0), M(0)
Стадијум IIIA	T(0);T(1); T(2), N(2), M(0); T(3), N(0), N(1), N(2), M(0)
Стадијум IIIB	T(4), N(0), N(1), N(2), M(0)
Стадијум IIIC	T, N(3), M(0)
Стадијум IV	T и N, M(1)

(TNM classification of breast cancer, 2010).

1.4.2. Хистолошки типови рака дојке према Светској здравственој организацији

На основу однос малигну хелија према базалној мембрани, карциноми могу бити **неинвазивни** (in situ), који не прелазе базалну мембрану, или **инвазивни**, уколико прелазе базалну мембрану. Светска здравствена организација је, обзиром на хистолошки тип тумора, предложила следећу поделу инвазивних карцинома дојке (Tavassoli и Devilee, 2003):

- Дуктални
- Лобуларни
- Тубуларни

- Инвазивни крибриформни
- Медуларни
- Муцинозни
- Инвазивни папиларни
- Инвазивни микропапиларни
- Апокрини
- Метапластични
- Богат липидима
- Секреторни
- Онкоцитни
- Аденоидно-цистични
- Карцином ацинарних ћелија
- Светло-ћелијски, богат гликогеном
- Себацеални
- Малигни миоепителиом
- Мукоепидермоидни
- Сквамозни
- Аденосквамозни

Лошију прогнозу имају дуктални карцином, лобуларни и медуларни, док нешто бољу прогнозу имају тубуларни, муцинозни и крибриформни карцином (Elston и сар., 1998).

Дуктални карцином је најчешћи тип рака дојке, који чини укупно 80% свих карцинома дојке.

Лобуларни карцином је на другом месту по учесталости међу инвазивним карциномима дојке и на њега отпада око 10% свих карцинома дојке.

Медуларни карцином се чешће среће код млађих жена које су носиоци BRCA1 и BRCA2 мутација, док је муцинозни карцином чешћи код старијих жена.

1.5. ПРОГНОСТИЧКИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ РАКА ДОЈКЕ

Прогностички фактор је термин који показује да су неке особености тумора и домаћина у вези са природним током болести и њеним исходом, али у одсуству терапије. У том контексту представља маркер значајан за релапс болести. *Предиктивни фактор* је термин који се користи у контексту одговора тумора на одговарајући терапијски модалитет лечења. Ови фактори зависе од карактеристика самог тумора, као и карактеристика самог пацијента, а њихова идентификација може помоћи у одређивању најбољег индивидуалног терапијског модалитета лечења за сваког пацијента. Посебно је важна идентификација високоризичне групе пацијената. Прогноза рака дојке је врло различита, те се избор најприкладнијег терапијског приступа процењује индивидуално према читавом низу прогностичких фактора. Прогностички фактори код рака дојке могу се поделити на оне традиционалне и новије који обухватају низ фактора од којих су многи још предмет испитивања и клиничких студија. У рутинској клиничкој пракси, у употреби је неколико добро познатих прогностичких и предиктивних фактора који су важни у избору одговарајућег терапијског модалитета лечења а то су: величина тумора, захваћеност лимфних чворова пазушне јаме, присуство удаљених метастаза, експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (ER/PR), HER-2 статус, хистолошки градус тумора, индекс пролиферативности ћелије Ki-67 и присуство лимфоваскуларне инвазије (Cardoso и сар., 2013).

1.5.1. Величина тумора

Величина тумора је један од значајнијих прогностичких фактора, поготово код пацијенткиња с негативним пазушним лимфним чворовима. Између величине тумора и преживљења постоји позитивна корелација, односно пацијенткиње са мањим туморима имају бољу прогнозу. Петогодишња стопа рецидива је приближно 10% за пацијенткиње са тумором мањим од 10 милиметара, а приближно 30-50% за оне са тумором од 50 милиметара и више (Tot и сар., 2002). За туморе мање од 10 мм, уобичајени прогностички фактори, као што је хистолошки градус, нису довољни да сврстају пацијенткиње у различите прогностичке категорије. У овим случајевима, постојање удруженог DCIS, његова распрострањеност и његов градус (G) су значајни прогностички фактори. Мали

инвазивни тумор удружен са екстензивном DCIS G.III компонентом има лошију прогнозу од малих тумора без DCIS или са DCIS G.I (Fisher и сар., 1993).

Величина тумора је, предиктивни фактор за статус лимфних чворова пазушне јаме, али и независан прогностички фактор код пацијената са негативним статусом лимфних чворова. Рутински се користи при одлучивању о примени адјувантне системске терапије. Пацијенти са негативним лимфним чворовима пазушне јаме и туморима величине до/или 1cm представљају групу са најповољнијом прогнозом који не би имали користи од примене адјувантне системске терапије. За пацијенте са туморима 1-2 cm треба размотрити примену адјувантне терапије, јер код њих постоји ризик за појаву удаљених метастаза од преко 20%.

1.5.2. Захваћеност лимфних чворова пазушне јаме

Ово је један од најважнији прогностички фактора код пацијенткиња са раком дојке који указује на вероватноћу рецидива болести, такође представља значајан параметар при селекцији пацијенткиња код којих треба применити адјувантну хемиотерапију (Schnitt, 2001). Неопходан је преглед бар 8-10 лимфних нодуса пазушне јаме за адекватну процену. Ризик појаве рецидива и укупно преживљење зависе од броја захваћених лимфних чворова пазушне јаме. Пацијенткиње са негативним лимфним чворовима пазушне јаме имају петогодишње преживљење без релапса болести преко 80%, а ако су чворови позитивни, преживљење је испод 65%, односно прогноза је лошија што је број захваћених лимфних чворова већи. Ниво захваћености лимфних чворова такође је прогностички значајан. Метастазе у виши ниво аксиле и апекс указују на лошију прогнозу. Након пазуха, друго по важности дренажно подручје је у лимфне чворове дуж унутрашње мамарне артерије. Они су захваћени укупно у 22% случајева, чешће код тумора у медијалној половини дојке и код позитивне аксиле. Супраклавикуларни лимфни чворови захваћени су у око 20% случајева са позитивном аксиллом, а готово никад нису захваћени код негативне аксиле (Andea и сар., 2004).

Статус лимфних чворова пазушне јаме се обично процењује интраоперативно методом биопсије сентинел лимфних чворова или након дисекције пазушне јаме, обзиром да је клиничка евалуација непрецизна. Дефинише се као број позитивних у односу на укупан број лимфних чворова достављених на преглед.

Величина метастатских депозита у лимфном чвору дефинише се као:

- **изоловане туморске ћелије (ИТС)**, ако су метастазе $\leq 0.2\text{mm}$,
- **микрометастазе**, ако су метастазе $>0.2\text{mm}$, а $\leq 2\text{mm}$,
- **макрометастазе**, ако су метастазе $>2\text{mm}$.

Значајнија прогностичка информација добија се на основу броја метастатских лимфних чворова, него на основу самог присуства/одсуства метастаза у регионалним лимфним чворовима.

Пацијенти се према броју захваћених лимфних чворова деле у **четири групе**:

I група, са 0 захваћених лимфних чворова,

II група, са 1 до 3 позитивних лимфних чворова,

III група, са 4 до 9 позитивних лимфних чворова,

IV група, са 10 и више позитивних лимфних чворова.

Статус лимфних чворова пазушне јаме је параметар који се узима у обзир при одлучивању о примени адјувантне системске терапије. Адјувантна системска терапија, према онколошким препорукама, индикована је код свих пацијената са позитивним лимфним чворовима аксиле, јер код њих стопе рецидива у 10-годишњем периоду достижу 70%.

1.5.3. Присуство удаљених метастаза

Метастазирање се дефинише као ширење ћелија рака од примарног тумора и стварање секундарног депозита на удаљеној локацији (Chambers и сар, 2002).

Метастазирање се састоји од низа веома комплексних корака, а ћелије канцера морају да савладају сваки корак у тој каскади како би дошло до настанка метастатског тумора. Ови кораци укључују тзв. бег од примарног тумора (екстравазација), лимфну или хематогену дисеминацију, преживљавање у циркулацији, екстравазацију на секундарну локализацију, раст и стварање микрометастаза на секундарној локацији, наставак раста уз обезбеђивање адекватне васкуларизације и стварање клинички детектабилне макрометастазе (MacDonald и сар., 2001) (Swartz и сар., 2001). Присуство удаљених метастаза је доказано

најзначајнији прогностички фактор. Хематогене метастазе воде генерализованој дисеминацији рака дојке у кости, плућа, јетру, јајнике, надбубрежне жлезде, плеуру и друга места. Најчешће захваћене кости су ребра, лобањске кости, кичмени пршљенови, хумерус и клавикула. Метастазе рака дојке у кости су, слично другим типовима карцинома, најчешће остеолитичке (Edge и сар., 2010). Уколико је метастатска болест присутна само у костима, такве пацијенткиње имају бољу прогнозу него оне са висцералним метастазама.

Рак дојке има посебан афинитет за метастазирање у регионалне лимфне чворове, плућа, јетру, кости и мозак.

1.5.4. Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (ER/PR)

Рецептор за естроген (ER) и рецептор за прогестерон (PR) су највише изучавани биохемијски параметри прогнозе/предикције тока болести код пацијената оболелих од рака дојке (Saez и сар., 1983). Познато је да 50 - 80% пацијената оболелих од рака дојке садрже мерљиве концентрације ER. PR се углавном експримира заједно са и при вишим концентрацијама ER. Око 75% рака дојке је хормонски позитивно. Хормонски рецептори код рака дојке немају само прогностички већ и предиктивни значај. Тумори који су високо хормонски позитивни боље ће реаговати на хормонску терапију од оних који су слабо хормонски позитивни. ER негативни (ER-) тумори боље реагирају на хемиотерапију у односу на ER позитивне туморе (ER+) (Henderson и Feigelson, 2000). Пацијенти са ER+ туморима имају дуже преживљење без релапса болести у односу на оне са ER- туморима. ER+ тумори чешћи су код старијих жена, чешће су добро диферентовани, ниже митотске активности. Око 5% карцинома дојке су ER- PR+ што се може објаснити или лажно негативним резултатом у одређивању ER или синтеза PR може бити индукована независно од естрогенских рецептора. Значај PR као независног прогностичког фактора је врло мала (Layfield и сар., 2006).

Статус ER/PR код рака дојке је моћан фактор предикције тока болести који указује на ефикасност примене адјувантне хормонске терапије. Клинички значај ER се односи на чињеницу да његово присуство идентификује туморе који су осетљиви на деловање естрогена. Доказано је да око 55% пацијенткиња оболелих од рака дојке, које имају позитиван статус ER, повољно одговарају на адјувантну хормонску терапију (Early Breast

Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Пацијенткиње са позитивним статусом ER у туморима имају дужи интервал до појаве релапса болести након примене терапије, дуже преживљавање након појаве релапса болести и значајно боље укупно преживљавање, у поређењу са пацијенткињама које имају туморе са негативним статусом ER. Ако тумори, поред ER, садрже и PR, одговор на неку врсту адјуванте хормонске терапије је присутан у око 75 - 80% случајева (McGuire и сар., 1997).

Из овога се може закључити да се статус стероидних рецептора може користити као фактор предикције за ефикасност адјувантне хормонске терапије (Тамоксифен). (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Све пацијенткиње са позитивним статусом стероидних рецептора, које је оправдано лечити адјувантном системском терапијом, препорука је да буду лечене и хормонском терапијом, осим ако постоје контраиндикације.

1.5.5. HER 2 статус

HER2 је протеин који постоји на површини појединих ћелија рака дојке. Кодира га протоонкоген ERBB2, лоциран на другом краку хромозома 17 (17q12). HER2/neu онкоген је амплификован и/или прекомерно експримиран код око 20% случајева рака дојке и значајан је прогностички фактор за рецидив и лоше преживљавање, нарочито код пацијената са позитивним аксиларним статусом (Prati и сар., 2005)

HER2 протеин има важну улогу у расту и преживљавању ћелија. С обзиром да је један од фактора који одређује терапијски приступ у лечењу рака дојке, HER2 статус се рутински одређује код сваког инвазивног рака дојке. За одређивање HER2 статуса користи се имунохистохемија: додавање антитела на HER2 протеин доводи до промене у боји узорка, што се посматра микроскопом и означава као 0, 1+, 2+, или 3+. Овом методом се одређује заправо број HER2 протеинских рецептора у ћелијама рака.

Карциноми дојке код којих је појачана експресија HER 2 називају се HER 2 позитивни, а остали HER 2 негативни. HER 2 негативни карциноми немају циљану терапију. HER 2 позитивни карциноми могу бити лечени циљаним молекулским агенсима као што је Herceptin® (Salomon и сар., 1987).

Позитиван HER 2 статус удружен је и са другим факторима лоше прогнозе рака дојке, као што су позитивни лимфни чворови, већи промер тумора, лош степен хистолошке

диференцијације, висока пролиферациона стопа и негативан естроген и прогестерон рецепторни статус (Cianfrocca и Goldstein, 2004).

1.5.6. Хистолошки градус тумора (G)

Хистолошки градус тумора (G) има за циљ да укаже на мању или већу агресивност тумора и самим тим представља један од стандардних прогностичких фактора, нарочито за инвазивне карциноме веће од 10 мм. Приликом одређивања хистолошког градуса (G) анализирају се три особине тумора, које се класификују од 1 до 3: 1. формирање тубула, 2. нуклеарни полиморфизам и 3. број митоза. Хистолошки градус израчунава се из збира бодова из чега произлазе градуси (Fisher и сар., 1993):

G1 (добро диферентовани) - 3 до 5 бодова

G2 (умерено диферентовани) - 6 до 7 бодова

G3 (слабо диферентовани) - 8 до 9 бодова

Добро диферентовани тумори (G1) имају петогодишње преживљавање у око 75% случајева, а десет година преживи око 47% пацијенткиња. Са умерено диферентованим туморима (G2) пет година преживи око 53% пацијенткиња, а десет година преживи око 27%. У групи пацијенткиња са слабо диферентованим туморима (G3) пет година преживи 31%, а десет година преживи 18% (Fisher и сар., 1993). Прогностичка вредност хистолошког градуса расте у комбинацији с другим прогностичким факторима од којих су најважнији величина тумора и хистолошки статус лимфних чворова. Већина студија је потврдила да пацијенти чији су тумори високог градуса, односно слабо диферентовани, имају већи ризик за релапс болести од оних чији су тумори ниског градуса, односно добро диферентовани (Contesso и сар., 1987).

Хистолошки градус је значајан прогностички фактор и за укупно преживљавање, како за пацијене са позитивним, тако и за пацијенте са негативним статусом лимфних чворова (Fisher и сар., 1993). Установљено је да адјувантна хемиотерапија доводи до значајног побољшања тока болести код болесника са негативним као и оних са позитивним статусом лимфних чворова који имају слабо диферентоване туморе, у поређењу са пацијентима који имају добро диферентоване туморе (Davis и сар., 1996). Значи, висок

хистолошки градус може да укаже на бољи одговор пацијента на адјувантну хемиотерапију.

Највећи прогностички значај, има комбинација три описана фактора: статус лимфних чворова пазушне јаме, величина тумора и хистолошки градус (Shek и Godolphin, 1998).

1.5.7. Индекс пролиферативности ћелије Ki-67

Ki-67 је једарни протеин који се доводи у везу са ћелијском пролиферацијом. Индекс пролиферативности ћелије се убраја у прогностичке факторе за рак дојке. Тумори који имају већу пролиферативну активност имају лошију прогнозу и краћи интервал до појаве релапса болести (Yerushalmi и сар., 2010). У узорцима нормалног ткива дојке Ki-67 се експримира у ниском проценту (<3 % ћелија) код ER негативних ћелија. Студије које су испитивале предиктивни значај маркера пролиферације код пацијенткиња које су примале хемио или ендокрину терапију, нису показале да се протеин Ki-67 може сматрати самосталним предиктором одговора на терапију. Једна од метода за одређивање степена пролиферације у тумору је имунохистохемијска, коришћењем анти-Ki-67 антитела које маркира једра у свим фазама ћелијског циклуса осим G0 и ране G1 фазе (Keshgegian и Спаан, 1995).

Према препорукама Ст. Гален консензус конференције из 2009. године пролиферативни Ki-67 индекс у карциномима дојке може да буде: 1) низак (до 15%), 2) средњи (16-30%) и 3) висок (преко 31%), тако да су препоручене граничне вредности 15% или 30%.

Ki-67 позитивност указује на висок ризик од појаве релапса болести и лошије преживљавање пацијената са раком дојке. На конференцији у Ст. Галену 2013. године Ki-67 је препоручен за одређивање степена пролиферативности и разликовање луминал А од луминал Б рака дојке (Untch и сар., 2013). Већина учесника Ст. Гален консензус конференције 2013. године сложили су се да Ki-67 треба узети у обзир при доношењу одлуке о примени адјувантне хемиотерапије код појединачних пацијената.

1.5.8. Присуство лимфоваскуларне инвазија

Доказано је да је лимфоваскуларна инвазија јак предиктор за захваћеност лимфних чворова пазушне јаме. Више студија је показало да налаз туморских ћелија унутар лумена

крвних или лимфних простора значи лошију прогнозу. Васкуларна инвазија нађена је у готово четвртини случајева рака дојке, а чешће се види код слабо диферентованих, већих тумора, уз дуктални инвазивни карцином, те у случајевима са позитивном аксилом. Перинеурална инвазија је обично присутна у туморима високог хистолошког градуса, често уз лимфатичку инвазију. До сада није доказано да представља независан прогностички фактор (Elston и сар., 1998).

Лимфоваскуларна инвазија је и прогностички значајна за удаљену прогресију рака дојке код пацијената са негативним статусом лимфних чворова пазушне јаме, који нису имали адјувантну системску терапију. Код пацијента без лимфоваскуларне инвазије, стопа 10-годишњег преживљавања без појаве удаљених метастаза је око 90%, а за пацијенте са лимфоваскулатном инвазијом стопа преживљавања износи око 70%.

1.5.9. Молекуларна класификација рака дојке

Примена молекуларне класификације рака дојке у процесу одабира одговарајуће терапије је јако присутна у последњих неколико година. На основу генских експресионих профила настала је молекуларна класификација рака дојке, која карциноме позитивне на хормонске рецепторе дели у две групе: луминал А и луминал Б, а карциноме негативне на хормонске рецепторе на HER2 + позитивни и базалоидни тип. Осим споменутих типова, у литератури се помињу и тип луминал Ц и тип карцинома сличан нормалној дојци, али ови типови су још увек слабо дефинисани (Geyer и сар., 2012). Ова класификација је изведена на основу експресије естроген и прогестерон рецептора, HER2 рецептора и пролиферативног индекса (Ki-67):

ЛУМИНАЛНИ А ТИП: (ER позитиван, PR позитиван, HER2 негативан, Ki 67 <14%)

ЛУМИНАЛНИ Б ТИП: (ER позитиван, HER 2 негативан, Ki 67 >15% или PR>20%)

HER 2 ПОЗИТИВНИ ТИП: (ER негативан, PR негативан, HER 2 позитиван)

ТРОСТРУКО НЕГАТИВНИ ТИП: (ER негативан, PR негативан, HER 2 негативан).

Луминални А тип рака дојке, чини више од 40% свих типова рака дојке, обично има високу експресију ER, ниску експресију HER-2 рецептора, као и низак ниво експресије маркера пролиферације Ki -67, мање од 14%. Карцином дојке луминалног типа А, обично

има ниски хистолошки градус, па овај тип тумора карактерише најбоља прогноза болести у односу на друге типове рака дојке (Sotiriou и Puztai, 2009). Карциноми луминалног типа Б углавном имају позитивне ER и амплификацију HER-2, високи хистолошки градус, високи индекс пролиферације и лошију прогнозу него они луминалног типа А (Puztai, 2009). Карциноми XEP-2 типа имају високу израженост HER-2 и гена повезаних са HER-2 сигналним путевима. Ове туморе карактерише високи хистолошки градус и индекс пролиферације. Базални карциноми дојке чине до 15% свих карцинома дојке. У више студија доказано је да су базални карциноми дојке претежно лоше диферентовани тумори, често са медуларним и метапластичним елементима. Имунохистохемијски, они су претежно хормонски и HER-2 негативни (ER-, PR-, HER2-). Позитивна експресија базалних маркера повезана је са лошом прогнозом и са BRCA-1 мутацијама због непостојања адекватне, индивидуализоване циљане терапије (Sotiriou и сар., 2009).

1.6. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ПРОГНОСТИЧКИ / ПРЕДИКТИВНИ МАРКЕРИ РАКА ДОЈКЕ

Бројне студије анализирају потенцијалне молекуларне биомаркере као прогностичке /предиктивне факторе агресивности, који утичу на појави рецидива тумора и метастазирање, као што су E-Cadherin, **Humani Mammaglobin (hMAG)**, Interleukin 8 (IL8), Matriksne metaloproteinaze 2 и 9 (MMP2, MMP9) и многи други, јер би њихова корелација са другим маркерима канцерогенезе, директно утицало на избор одговарајућег модалитета лечења у различитим типовима хуманих канцера, укључујући и рак дојке.

1.6.1. E-cadherin

E-cadherin је епително-специфични молекул укључен у ћелијско-ћелијску адхезију, који има улогу тумор супресорног гена туморске инвазије. Када се прави поређење са инвазивним дукталним карциномима, E-cadherin имунохистохемијска експресија се значајно смањује или губи код већине инвазивно лобуларних карцинома дојке, а такође се губи и имунохистохемијска реактивност за алфа-, бета- и гама- катенине (De Leeuw и сар., 1997).

Бројне студије показују E-cadherin реактивност у око 90,5% инвазивних дукталних карцинома (Qureshi и сар, 2006). Међу класичним инвазивним лобуларним карциномима,

90% било је E-cadherin негативно, а 10% E-cadherin позитивно. Учесталост E-cadherin негативности била је незнатно мања, око 80% међу плеоморфним лобуларним карциномима. Губитак E-cadherin реактивности код карцинома који изгледају по хистолошким критеријумима као дуктални се много чешће виђа код лоше диферентованих тумора, али се дешава и код добро диферентованих карцинома (Harigopal и сар., 2005).

Катенини су протеини укључени у повезивање E-cadherin мембранског комплекса са интрацелуларним актинским цитоскелетом. Саопштено је да лобуларни карциноми класичног и плеоморфног типа приказују одсуство мембранске имунореактивности за катенин, паралелно са губитком E-cadherin-ске реактивности код тих карцинома (Dabbs и сар., 2007). Као што се понекад дешава са E-cadherin имунохистохемијски, p120 катенин ретко има тачкасто мембранско бојење "у виду бројанице" код ћелија лобуларног карцинома. Јако дифузно цитоплазматско или тачкасто парануклеарно p120 катенин бојење обично се виђа код ћелија лобуларног карцинома дојке (Dabbs и сар., 2007). Насупрот томе, дуктални карциноми и нормални епител дојке показује континуалну мембранску p120 катенинску реактивност. Међутим, у неким студијама запазили су слабо мембранско p120 катенинско бојење у 10% дукталних карцинома и закључили да тај део промена може да буде погрешно класификован као лобуларни карцином, ако се дијагноза заснива на p120 катенин бојењу (Brandt и сар., 2008). Мада је E-cadherin бојење само по себи довољно да би се направиле разлике између лобуларних и дукталних карцинома, у већини случајева p120 катенин може да буде од помоћи заједно са E-cadherinom код двосмислених случајева.

1.6.2. Интерлеукин 8 (IL 8)

Познато је да је IL8 медијатор урођене имуности. IL8 секретују имунолошке ћелије које као компоненте урођене имуности обављају фагоцитозу – неутрофили и моноцити/макрофази. Стимулисани фагоцити секретују цитокине, хемокине, ензиме и друге антимикробне молекуле, факторе раста, факторе ангиогенезе и протеазе са циљем да се ремоделује оштећено ткиво и замени новим. Повећана експресија IL8 је карактеристична за хронична инфламаторна стања и различите типове хуманих канцера, укључујући и рак дојке. Различити фактори микросредине тумора као и сами хемотерапеутски агенси, индукују у ћелијама тумора повећану синтезу и секрецију IL8

(Bendrik и сар., 2009). Секретовани IL8 битно утиче на микросредину тумора посредством CHCR1/CHCR2 рецептора експримираних од стране ћелија тумора, ендотелних ћелија, неутрофила и моноцита/макрофага. Делујући аутокринно и паракринно, IL8 стимулише пролиферацију, преживљавање/хеморезистенцију, покретљивост и инвазивност ћелија тумора. Додатно, IL8 стимулише пролиферацију, преживљавање и миграцију ендотелних ћелија које и саме синтетишу и секретују IL8. На тај начин IL8 делује као врло значајан фактор ангиогенезе. IL8 индукује хемотаксичну инфилтрацију неутрофила и моноцита/макрофага на место тумора, који са своје стране продукују факторе раста, факторе ангиогенезе и протеазе, што такође доприноси ангиогенези, расту и прогресији тумора. Новија истраживања су указала на важност феномена епително-мезенхималне транзиције (EMT) у процесу прогресије тумора. Више аутора је указало на важност IL8 у иницијацији и/или одржању мезенхималних и инвазивних карактеристика ћелија тумора, које би могле бити терапеутски елиминисане управо блокирањем IL8 и/или CHCR1/CHCR2. Новија истраживања су такође указала на важност IL8/CHCR1 сигнализације у самообнављању и одржању фенотипских и функционалних карактеристика канцерских стем ћелија дојке. Анализе генске експресије су показале да је CHCR1 маркер канцерских стем ћелија дојке. На основу ин витро истраживања, Гинестиер и сарадници су закључили да би хемиотерапија у комбинацији са инхибицијом CHCR1 рецептора била ефикаснија у лечењу рака дојке (Ginestier и сар., 2010).

1.6.3. Матрикс металопротеиназе (ММП)

Матрикс металопротеиназе (ММП) су фамилија протеина зависних од цинка, а ММП-2 и ММП-9 су главни чланови ММП породице. ММП-2 и ММП-9 се углавном излучују у туморским ћелијама и стромалним ћелијама у облику неактивног облика-зимогена. Након активације путем хидролизе, ММП-2 и ММП-9 деградирају колаген базалне мембране (ВМ) типа IV, утичући на способност ВМ да делиује као баријера даљем продору туморских ћелија у циркулацију. Пробојем базалне мембране тумор прелази из ткз. „in situ“ стадијума, који нема способност метастазирања у инвазивни облик, који је склон појави метастаза. Истраживања су показала да ММП-2 и ММП-9 играју кључне улоге у деградацији екстрацелуларног матрикса и промовишу инвазију тумора и метастазе. ММП-

2 и MMP-9 се могу користити као предиктори исхода лечења и процену прогнозе болести (Li H, и сар., 2017).

1.6.4. Human Mamaglobin (hMAG)

Хумани мамаглобин (hMAG) је члан утероглобинске групе протеина који се у литератури наводи као маркер специфичан за рак дојке. Иако се ниске вредности могу детектовати у нормалном ткиву дојке, његова експресија је драматично повишена код рака дојке и у корелацији је са високим хистолошким градусом. Детекција мамаглобина у крви и телесним течностима је такође повезана са појавом метастаза, а ниво његове експресије са прогнозом болести. То обећава да ће мамаглобин бити користан скрининг маркер за рано откривање рака дојке, нарочито код особа са високим ризиком за настанак рака дојке. У литератури, мамаглобин је такође коришћен за циљану имунотерапију ћелија рака дојке. Међутим, постоје неке контроверзе у вези његове дијагностичке ефикасности и прогностичке вредности, које захтевају даље проучавање.

Watson и Fleming су 1994-те године методом PCR (polymerase chain reaction) изоловали ланац сДНК која је кодирала протеин, данас познат као хумани мамаглобин (hMAG) (Watson и Fleming, 1994). Осим у ткиву дојке, hMAG-B подтипа (hMAG B-1 и B-2) је такође детектован и у ткиву карцинома ендометријума и оваријума (Bernstein и сар., 2005). У литератури се често користи различита номенклатура када је у питању мамаглобин, тако да поред hMAG можемо срести бројне скраћенице као што су: MAM, MGB, UGB3, MMG, SCGB2A1. hMAG је описан као један од 23 чланова утероглобинске групе протеина, фамилије малих епителних секреторних протеина, секретоглобина (Klug и сар., 2000). То је протеин 93-амино киселине са два N-повезана места гликолизе. Мамаглобин формира растворљиве, ковалентно везане хетеродимере са Липофилином Б у антипаралелном режиму што дозвољава формирање три дисулфидна моста између ова два молекула (Ni и сар., 2000). Мамаглобински молекул формира 4 алфа-хеликса у глава-реп оријентацији стварајући хидрофобно језгро, омогућавајући формирање 3 блиско повезана споја. У овом моделу N-терминални цистеин мамаглобина је ковалентно повезан са C-терминалним цистеином Л. Протеински серолошки маркер код карцинома дојке се налази у оквиру секвенци мамаглобин-липофилин комплекса (Carter и сар., 2002). Мултигенска фамилија

мамаглобина А и В је локализована на хромозому 11q12.2 у густом кластеру заузимајући не више од 400 kbp (Ni и сар., 2000.).

Путем Western blot анализе, утврђено је да hMAG-A постоји у ткива дојке у два главна облика са приближним молекулским масама 18 и 25 kDa. Оба облика су детектована чешће у карциномима дојке него у нормалном ткиву дојке. Обрнути однос је утврђен између високе молекулске тежине hMAG-A, градуса тумора и пролиферативног индекса. Није утврђена значајна корелација између hMAG-A протеина, величине тумора или статуса лимфних нодуса, у прогнози рака дојке (O'Brien и сар., 2005). Иако се зна да су секретоглобини регулисани од стране стероидних хормона, експресија hMAG-A није изазвана естрогеном у ER позитивним ћелијским линијама рака дојке, као што су MCF7 и T47D, наговештавајући да је експресија hMAG-A у ткиву дојке, независна од стероидних хормона (Watson и сар., 1998). У туморима дојке, hMAG-A и липофилин се ко-експримирају симултано, што указује на постојање заједничког регулаторног механизма (Span и сар., 2004). Функција hMAG-A протеина није позната. Northern blot и RT-PCR анализе су показале да је експресија hMAG-A ограничена на ткиво дојке и то да је веома изражена у ћелијским линијама рака дојке и примарним туморима дојке у поређењу са нормалним ткивом дојке (Watson и сар., 1998). Међутим, његова експресија није повећала стопу раста ћелијских линија, што значи да није укључен у процес ћелијске деобе (Sjodin и сар., 2008). Такође се очекује да се лако излучује од стране тумора дојке и да изазова производњу аутоантитела детектабилних у серуму пацијената са карциномом дојке и жена са високим ризиком од рака дојке, те се поставља питање да ли мамаглобин може да се користи као тумор маркер (Watson и сар., 1999).

У прелиминарним покушајима да утврде клинички значај мамаглобин као маркера тумора дојке, Watson и Fleming су открили да је експресија мамаглобин mRNA вишеструка у поређењу са нормалним ткивом дојке. Коришћењем RT-PCR and Northern blot анализе, они су открили hMAG у 91% случајева рака дојке, независно од стадијума болест и хистолошког типа (Watson и сар., 1999).

Слично томе, бројне накнадне студија описују повећану експресију мамаглобина у примарном тумору дојке, његово присуство у здравом ткиву дојке, у мањим концентрацијама, али не и у другим ткивима, што га чини погодним маркером у дијагностици рака дојке (Silva и сар., 2002). hMAG је такође коришћен у разликовању

различитих под-типова карцинома дојке, попут Luminal A и B, HER-2, Basel-like carcinom (BLC) и трипле-негативног карцинома (Lewis и сар., 2011). Позитивна експресија MAG-A, имунохистохемијским бојењем нађена је у приближно 90% инвазивног дукталног карцинома и у 80% интрадукталног карцинома (Leung и сар., 2013). Поред тога, претерана експресија hMAG гена је у корелацији са високим градусом тумора дојке (Mikhitarian и сар., 2008). Величина тумора, степен захваћености аксиларних лимфних нодуса, висок хистолошки градус, сматрају се снажним показатељима за рецидив рака дојке и лоше прогнозе пацијената са метастатским туморима (Diel и сар., 1996). Детекција hMAG у периферној крви је био слаб прогностички знак. Постоје, међутим, контроверзе на основу експерименталних налаза у којима нема корелације између детекције hMAG у крви пацијената са раком дојке и исхода лечења, или је мамаглобин описан као добар прогностички индикатор метастазирања (Raica и сар., 2009). Поред тога, експресија hMAG је у корелацији са мање агресивним туморима дојке (Nunez-Villar и сар., 2003). In vitro студије показале су да прекомерна експресија hMAG није имала велики утицај на стопу раста ћелијске линије карцинома дојке Hs578T34. Стога, ставови о односу између hMAG и прогнозе су веома контроверзни. Мамаглобин се сматра перспективним дијагностичким маркером рака дојке већ дужи низ година. Много напора је до сада уложено у детекцију мамаглобин mRNA у лимфним чворовима, крви и коштаном сржи пацијената са карциномом дојке. Специфичност hMAG лежи у његовом готово искључивом постојању у ткиву дојке и карциному дојке. Поред тога, његова повећана експресија у карциномима дојке и његова повезаност са туморским градусом, чини га одличним маркером за дијагнозу и прогнозу болести. Методе за скрининг и детекцију раног рака дојке се и даље проучавају. До данас, само мамографија је начин раног откривања, а hMAG може повећати и допуни предиктивну вредност мамографије (O'Brien и сар., 2008).

1.7. ХИРУРГИЈА ИНВАЗИВНОГ РАКА ДОЈКЕ

У зависности од статуса лимфних чворова пазушне јаме, величине тумора и хистолошког градуса, индиковане су различите операције рака дојке.

1.7.1. Поштедна хурургија карцинома дојке

Рана дијагностика тумора дојке, примена неoadјувантне хемиотерапије и постоперативна радиотерапија, омогућили су последњих деценија поштедну хирургију тумора дојке. Под поштедном хирургијом дојке се подразумева такав хируршки захват при коме се максимално чувају волумен и првобитни изглед дојке, уз sentinel биопсију, уз адјувантну онколошку или хормонску терапију (Fitzal и сар., 2008). Чисте линије ресекције потврђује микроскопска анализа.

У поштедне операције рака дојке спадају:

1. **Туморектомија** - ексцизија тумора са најмање 1цм ексцизије околног ткива уз обавезну патохистолошку интраоперативну верификацију
2. **Сегментектомија** – ексцизија препарата са линијом ресекције од минимално 2 цм околног ткива.
3. **Квадрантектомија** – ексцизија препарата који захвата читав квадрант дојке, а слободне ивице ексцизије су преко 2цм у здраво.
4. **Кунеиформна ресекција** – заједничко уклањање брадавице, ареоле са околном кожом и припадајућим ткивом испод ареоле
5. **Дисекција пазушне јаме** - Подразумева првенствено лимфаденектомију али и уклањање масног ткива пазушне јаме, у дијагностичке и терапијске сврхе (Berwal и сар., 2009).

1.7.1.1. Индикације за поштедну хирургију рака дојке:

- непалпабилни тумори,
- T1 и T2 тумори мањи од 3цм уз N0 и N1статус,
- Процена зависи од величине како тумора тако и дојке,
- Уколико је добар одговор на неoadјувантну хемиотерапију

1.7.1.2. Стања у којима није индикована поштедна хирургија рака дојке:

- стадијум IIb и III, јер би уклањање читавог тумора значајно изменило морфологију дојке,
- уколико су дојке релативно мале величине у односу на тумор,
- реинтервенција уколико претходно није постигнута R0 ресекција,
- вишеструке микрокалцификације суспектне на малигнитет,
- мултицентрични тумори,
- раније спроведена интензивна РТ,
- контариндикација за РТ,
- уколико се сматра да ће интервенција неизоставно изазвати наруженост,
- жеља пацијенткиње да се уради мастектомија,
- први и други триместар трудноће,
- рецидив након поштедне операције,
- психолошки, социјални и други разлози.

1.7.1.3. Концепт биопсије стражарски лимфни чвор (Sentinel lymph node)

Концепт стражарског лимфног нодуса полази од премисе да уколико није захваћен први лимфни нодус у аксилу, нема пропагације малигне болести ни на остале, те стога није индикована радикална дисекција аксиле, чиме се избегавају бројна нежељена дејства овакве радикалне операције, која је у овом случају и непотребна у онколошком смислу (Vergara-Fernández и сар., 2004). Ова методологија је данас у широкој клиничкој употреби. Код више од 70% пацијенткиња са раним карциномом дојке нема секундарних депозита у припадајућим лимфним нодусима, тако да се смањује потреба за дисекцијом аксиле, јер од ове процедуре код ових жена нема значајне онколошке користи (Collins, 2005). Обележавање SLN се врши на два начина, преоперативно перитуморско убризгавање радиоактивног изотопа (Tc99m), у околину тумора и перитуморским убризгавањем виталне боје (*Patent blue V*, *Isosulfan blue*, *Mwtilen blue*). Најбоље резултати се постижу симултаном применом поменутих метода (Schneebaum и сар., 1998) (Van Rijk и сар., 2005).

Подаци који се могу наћи у литератури указују да разлика није статистички значајна по питању дужине преживљавања пацијенткиња код којих је учињена радикална дисекција аксиле у односу на оне код којих није била урађена јер је сентинел нодус био негативан (Harissis и сар., 2010).

Поменутом методологијом се постижу подједнако добри онколошки резултати уз бољи козметски ефекат (Fodor и сар., 2005).

1.7.2. Мутилантна хирургија рака дојке – Мастектомије

У другој половини 20-ог века се сматрало да једино радикална мастектомија, нпр. по Halsted-у, обезбеђује онколошку сигурност. Данас су ставови значајно промењени, првенствено због напретка на пољу хемиотерапије, која заједно са оперативним лечењем обезбеђује бољи исход лечења.

1.7.2.1. Врсте мастектомија

Радикална мастектомија по *Halsted - у* (Halsted, 1907).

Модификација мастектомије по *Madden - у* (Madden, 1972).

Модификација мастектомије по *Patey - у* (Madden и сар., 1972).

Субдермална мастектомија

Субкутана или субдермална мастектомија подразумева уклањање жлезданог ткива дојке уз очување коже, ареоле и папиле са истовременом имплантацијом протезе, чиме се постижу одлични козметски резултати (Driul и сар., 2013).

Проста (simplex) мастектомија (Carlson и сар., 1997).

1.7.3. ПРОГНОСТИЧКЕ ГРУПЕ ИНВАЗИВНОГ РАКА ДОЈКЕ

У постоперативном току се врши процена ризика за рецидив болести у десетогодишњем периоду праћења и сви пацијенти се сврставају у три групе:

- 1. пацијенти са ниским ризиком (<10%),**
- 2. пацијенти са умереним ризиком (10-50%) и**
- 3. пацијенти са високим ризиком (>50%).**

Сврха овакве стратификације је процена потребе за адјувантним онколошким лечењем.

1.7.3.1. Примена постоперативне хемиотерапије код пацијенткиња са раком дојке

Концепт адјувантне или постоперативне хемиотерапије подразумева примену антинеопластичних хемиотерапеутика са циљем уништења преосталих малигнух ћелија и смањења ризика од настанка рецидива.

Потреба за применом адјувантне терапије се врши на основу опште прихваћених протокола добре клиничке праксе. Хормонски и HER 2 статус је веома значајан за процену о потреби примене оваквог модалитета лечења (Nagaraj и Ma, 2013).

Данашњи алгоритми лечења указују да је за трећу групу пацијената, код којих је највећа вероватноћа за развој рецидива и метастаза, најбоље применити **антрациклинске препарате**, нарочито уколико постоји HER2 прекомерна експресија.

Код пацијента у одмалом животном добу или уколико постоје значајни кардиолошки коморбидитети саветује се примена **ЦМФ-Циклофосфамид, метотрексат, 5-флуоурацил хемиотерапија** као најбоља терапијска опција (Joensuu и сар., 2012).

Трајање адјувантне хемиотерапије је још увек у сфери истраживања. Данас се у највећем броју случајева користи 6 до 8 циклуса, уколико се не ради о јако старим особама. Третман **таксаном** се примењује уколико постоје позитивни лимфни нодули у припадајућој аксилу, (Lagha и сар., 2013).

На основу хормонског стауса се врши процена за примену хормонске терапије која се користи након завршене хемиотерапије, осим када је у питању кастрација која се може урадити и пре или током саме хемиотерапије.

Када се примењује **анти-HER2 терапија**, најчешћи лек је **трастузумаб**, који се аплицира након или у току хемиотерапије. Уколико је у питању метастатски стадијум болести стандард је примена таксана (Albert и сар., 2011).

1.7.3.2. Адјувантна биолошка терапија рака дојке

Уколико се имунохистохемијским методама докаже да је тумор HER2 позитиван, индикована је примена Херцептина (Lifrange и сар., 2011).

Контраиндикације за примену Херцептина могу бити кардиолошки коморбидитети. Херцептин се примењује у комбинацији са хемиотерапијом, у недељном или тронедељном режиму по утврђеним онколошким принципима (Tan и сар., 2003).

1.7.3.3. Неоадјувантна хемиотерапија рака дојке

Модалитет лечења у коме се медикаментозна терапија користи преоперативно се назива **неoadјувантна, индукциона** или **преоперативна терапија**. Примењује се уколико не постоје метастазе, код узнaпредовалих карцинома дојке. Најбољу прогнозу имају пацијенти у раној фази локалне болести, нешто лошију они са локално узнaпредовалом болешћу, док најлошију прогнозу имају пацијенти са удаљеним метастазама. Посебан ентите представља инфламаторни карцином који такође има висок малигни потенцијал и лошу прогнозу (Sun и сар., 2013). Најчешће коришћена комбинација хемиотерапеутика у неоадјувантном лечењу је антрациклин-таксан режим (Alken и Kelly, 2013).

Не препоручује се мање од шест циклуса преоперативне хемиотерапије.

Уколико се процени да постоји потреба за применом постоперативне терапије, иста се може применити без обзира што је претходно коришћена и неоадјувантна терапија и оперативно лечење (Valenzuela и Julian, 2008).

1.7.3.4. HER2 позитивни локално узнaпредовали рак дојке

Уколико се ради о локално узнaпредовалим туморима који су уз то и HER2 позитивни или уколико је у питању инфламаторни тумор, потребно је споровести агресивну неоадјувантну терапију са применом **Трастузумаба** и **Херцептина** (Adams и сар., 2008).

1.7.3.5. Значај радиотерапија у третману пацијената са карциномом тојке

Радиотерапија се спроводи локална контрола болести и индикована је у свим стадијумима карцинома дојке (Cutuli, 2012).

1.8. МЕТАСТАТСКИ РАК ДОЈКЕ

Током историје су се водиле дебате међу лекарима по питању тога да ли је карцином дојке локална или системска болест. Данас се сматра, према ткз. теорији каскаде, да је карцином дојке уколико нема лимфонодалних секундарних депозита локална болест, у супротном, сматра се системском болешћу.

Данас се сматра да је потребно 10 и више година да би карцином дојке достигао величину 0,5-1цм. Као и сви карциноми карцином дојке је епителног порекла и сматра се ин ситу варијантом док не пробије базалну мебрану, када настаје инвазивни карцином, који продором у лимфоток или крвоток даје лимфогене, односно хематогене метастазе. Ретке су метастазе које иницијално прескачу регионе првог реда (Tichy и сар., 2013). Секундарни депозити се могу јавити и изоловано у сливу унутрашње торакалне артерије, без захватања аксиларних лимфонодуса. Степен афекције аксиле се сматра значајним прогностичким фактором, мада се зна да око 1/3 пацијената без метастаза у пазушној јами умире од метастаза у костима, будући да је карцином дојке ткз. остеофилни тип тумора.

Малигни потенцијал, тј. Биолошко понашање секундарних депозита је и данас недовољно проучено. На жалост, познати су случајеви да су пацијенткиње чак и након 20 година од привидно успешног лечења добијале метастатску болест (Merkel и Osborne, 1989).

Око 10% пацијенткиња приликом постављања дијагнозе карцинома дојке већ има развијену метастатску болест. Што је болест више узнапредовала у тренутку постављања дијагнозе већа је вероватноћа развоја системске, метастатске болести. Предилекциона места за настанак секундарних депозита су скелетни систем, јетра, плућа, ЦНС... Уколико се констатује постојање метастаза, неопходно је хитно спровести додатна истраживања у циљу стажирања болести да би се:

- проценила проширеност болести,**
- поставила прогноза болести,**

- да се постави циљ системске терапије и
- изабере оптимални модел лечења за сваког пацијента индивидуално.

Најбољи резултати се постижу избором оптималног начина лечења за сваког пацијента понаособ. То је концепт индивидуализације, односно персонализације терапије.

Мада су постигнути значајни резултати у циљу контроле болести и продуженог периода преживљавања, матастатски стадијум болести је и даље неизлечив (Tseng и сар., 2013).

Циљ лечења:

- Радикално лечење-излечење уколико је могуће
- Пролонгирање периода преживљавања
- Пролонгирање периода без рецидива
- Пролонгирање периода без метастаза
- Што бољи терапијски одговор на примењене модалитете лечења
- Палијативно лечење
- Успостављање квалитетнијег живота
- Превенција коморбидитета

Алгоритми у лечењу:

Хормонотерапија је индикована код релативно мање агресивних облика болести

Хемиотерапија је резервисана за агресивне форме болести

(Lim и Winer, 2011).

Уколико се користи само један лек у облику монотерапије, терапијски одговор постиже се до око 75% пацијената. Код свега 16% пацијената се постиже комплетна ремисија болести, али је њено трајање нажалост кратко, тако да тек сваки 10-и пацијент преживи 5 година у стању ремисије, након чега долази до прогресије болести (Burdette-Radoux и Muss, 2003).

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Радне хипотезе

1. Ниво мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора-перитумору код пацијената са раком дојке корелира са потенцијалом тумора за настанак агресивне форме болести
2. Однос нивоа мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора-перитумору у корелацији са осталим маркерима канцерогенезе има предиктивни значај код пацијената са раком дојке
3. Ниво мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора-перитумору код пацијената са раком дојке корелира са одређеним патохистолошким типовима
4. Ниво мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора чак и код пацијената код којих је постигнута R0 хируршка ресекција може указати на постојање системске болести

2.2. Циљеви истраживања

1. Сакупити узорке како карциномског тако и перитуморског ткива дојке пацијената са карциномом дојке и патохистолошки анализирати исте
2. Лабораторијска *in vitro* истраживања на узорцима туморског и ткива из непосредног окружења тумора ради дефинисања нивоа мамаглобина у ткиву
3. Утврдити корелацију добијених нивоа мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора са маркерима који су у корелацији са појавом удаљених метастаза (Ki 67, E-Cadherin, итд).
4. На основу наведеног извести закључке који могу значајно утицати на избор одгорајућег терапијског модалитета

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ СТУДИЈЕ

3.1. Врста студије

Рад представља клиничку опсервациону студију (кохортна) уз експерименталну студију на хуманим ткивима *in vitro*.

3.2. Методологија

Лабораторијски сегмент испитивања изведен је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Хирурзи Клинике за хирургију КЦ Крагујевац су узорковали делове карциномског ткива, као и ткива из непосредног окружења тумора, које је након прегледа од стране лекара Службе за патолошку дијагностику Клиничког Центра у Крагујевцу допремано у лабораторију ради даљих истраживања. Читава дисертације је урађена у складу са водичима добре клиничке праксе и Хелсиншком декларацијом.

Студија је урађена под покровитељством Министарства за науку Србије бр. Ш 41010: "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци (ПИБАС)", са одобрењем Етичког одбора КЦ Крагујевац бр. 01-4990.

3.2.1. Хемикалије и реагенси

Физиолошки раствор у који је додат фосфатни пуфер- Gipro, SAD.

Етанол, хлороформ, изопропанол - Serva, Nemačka.

Кит за hMAG и Моноклонско антитело -My BioSource, inc. San Diego, SAD.

Китови за превођење РНК у комплементарну ДНК и PCR Кит (Sensiscript Reverse Transcriptase Kit - RT)-Qiagen, Nemačka.

Вода PCR чистоће и TRIzol-Ambion, SAD.

Кит за експресију гена КапаSYBR® Green PCR Master Mix-KAPA Biosystems, Boston, SAD. Прајмери-Eurofins Genomics, Ebersberg.

3.2.2. Критеријуми за одабир пацијената који су учествовали у истраживању

Вршене су анализе на ткиву карцинома и ткиву из непосредног окружења тумора-перитумору. У истраживању су учествовали пацијенти код којих је дијагностикован рак дојке. Индикација за операцију је постављена од стране Онколошког конзилијума Клиничког центра Крагујевац. Сви пацијенти су детаљно информисанио циљевима и значају истраживања и дали су свој писмени пристанак. Етички одбор КЦ Крагујевац је у извештају заведеним под бројем 01-4990 дао сагласност за истраживање. Одговарајућом хируршком интервенцијом узорковано је карциномско ткиво дојке (n=64) као и макроскопски неизмењено ткиво из непосредног окружења тумора (n=64). Само истраживање није имало утицаја на уобичајен ток како саме хируршке интервенције, тако и читавог лечења, а такође ни код једног пацијента није забележено нежељено дејство које би могло бити у вези са самим истраживањем. Узорковани су препарати различите величине, у зависности од величине како самог тумора тако и величине дојке. Перитуморско ткиво је узорковано на дистанци до 3cm од ивице макроскопски и микроскопски препознатљивог туморског ткива, у сарадњи хирурга и патолога. Сви узорци су депоновани у одговарајућим складиштима са оптималним условима -196 °C до сакупљања довољног броја за извођење истраживања. Након патохистолошке обраде сваког препарата дефинисан је хистолошки тип тумора, градус тумора, лимфонодални статус, ER, PR и HER 2 статус (Elston и сар., 2002; Edge и сар., 2010).

Преоперативна онколошка терапија је била критеријум за искључивање пацијената из студије. Пацијенти који су у историји лечења имали податак о карциному дојке, као и пацијенти са системском, метастатском болешћу такође нису учествовали у истраживању.

3.2.3. Обрада ткива након узорковања

По узорковању се изврши мерење и хомогенизација додавањем 500 µl пуфера за лизирање на сваких 0,01 g ткива коришћењем хомогенизатора. Пуфер за лизирање представља мешавину 31.25 mM Triss-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерола, а потом се допуни дестилованом H₂O до количине од 100 ml. Након филтрирања пуфер се чува на собној температури. Потом се врши центрифугирање на 10,000 rpm на 4 °C, 10 минута, издвоји се супернатант. На тај начин се издвоје укупни протеини из карциномског и ткива из

околине тумора. Lowry метода је коришћена за одређивање укупне концентрације протеина у супернатанту. Супернатант се чува на -80°C .

3.2.4. Одређивање концентрације протеина Lowry методом (Lowry и сар., 1951):

Узоркује се 0,1 ml супернатанта добијеног обрадом узорака ткива и дода се 0,1 ml 0,2 M NaOH и 0,3 ml Реагенса II (бакар-карбонат). Потом се дода 0,2 M NaOH (Реагенс I) до количине 0,1 ml. Затим се врши инкубација четврт сата и дода се 0,6 ml Folin-Ciocalteu-реагенса. Потом следи инкубација од пола сата, а апсорбанца се мери на 490 nm. Израчунавање концентрације протеина је вршено на основу мерења апсорбанце очитане из стандардне криве, а пре познатој концентрацији бовиног албумина из серума.

3.2.5. Одређивање концентрације хуманог *Mamaglobin-A* у ткиву карцинома дојке

Пуфер за испирање - 30 ml концентрованог пуфера за испирање је разблажено у 750 ml дејонизоване или дестиловане воде. Неискоришћен раствор је остављен на 4°C . Када су се кристали формирали у концентрату, загреван је на 40°C у воденом купатилу (температура загревања није прелазила 50°C) и полако се вршило мешање док се кристали у потпуности нису растворили. Раствор је остављен да се охлади на собној температури пре употребе.

Стандард:

1) 10 ng/ml стандардног раствора: додато је 1ml узорка/стандардног пуфера за растварање у епрувету, епрувета је остављена на собној температури 10 мин. и измешано.

2) 5 ng/ml - 0.156 ng/ml стандардних раствора: обележено је 6 епрувета са 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.3125 ng/ml, 0.156 ng/ml, појединачно. Аликвот 0.3 ml узорка/стандардног пуфера за растварање у сваку епрувету. Додато је 0.3 ml изнад поменутог 10 ng/ml стандардног раствора у прву епрувету и измешано. Узето је 0.3 ml из прве епрувете и стављено у другу епрувету и измешано. Узето је 0.3 ml из друге епрувете и стављено у трећу епрувету и измешано, и тако редом. Стандардни раствори су коришћени у току два сата. Стандардни раствор је био на температури од 4°C до 12 сати.

Припрема биотинисаног радног раствора за детекцију антитела је припремана један сат пре експеримента

1) Израчуната је укупна запремина радног раствора: $0.1\text{ml}/\text{бунарчић} \times \text{величина бунарчића}$ (0.1 - 0.2 ml више од укупне запремине)

2) Разблажен је биотин за детекцију антитела са пуфером за растварање антитела у сразмери 1:100 и измешано. (додато је 1 μ l биотина за детекцију антитела у 99 μ l пуфера за растварање антитела)

Припрема HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) радног раствора:

Припремано 30 мин. пре експеримента.

1) Израчуната је укупна запремина радног раствора: 0.1ml/бунарчић x величина бунарчића. (0.1-0.2ml више од укупне запремине)

2) Разблажено је SABC са SABC пуфером за растварање при сразмери 1:100 и измешано. (додато је 1 μ l SABC у 99 μ l SABC пуфера за растварање)

Поступак испитивања

Пре додавања у бунарчиће, уједначени су SABC радни раствор и ТМВ супстрат око 30 мин. на собној температури (37°C). Узорци и реагенси су потпуно и уједначено измешани.

Унета је стандардна крива за сваки тест.

1. Подешен је стандард, тест узорак и контролни (нула) бунарчићи на претходно припремљеној (обложеној) плочи за сваки појединачно, и онда су забележени њихови положаји. Измерен је сваки стандард и узорак дупло. Опрана је посуда два пута пре него што су додати стандард, узорак и контролни (нула) бунарчићи.

2. Аликвот 0.1ml од 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.3125ng/ml, 0.156ng/ml, стандардни раствори у стандард бунарчиће.

3. Додато је 0.1ml узорка/стандардног пуфера за растварање у контролни (нула) бунарчић.

4. Додато је 0.1 ml одговарајуће разблаженог узорка (хомогенат ткива) у бунарчиће са тест узорком.

5. Затворена је плоча са поклопцем и започета је инкубација на 37°C 90 мин.

6. Уклоњен је поклопац и одложен садржај плоче, брзо је стављена плоча на филтер папир или други материјал за упијање. Бунарчићи се нису у потпуности осушили. Плоча није опрана.

7. Додато је 0.1ml биотинисаног радног раствора за детекцију антитела у поменуте бунарчиће (стандард, тест узорак и нула бунарчиће). Додат је раствор на дно сваког бунарчића без додиривања зидова.

8. Плоча је затворена поклопцем и започета је инкубација на 37°C у току 60 мин.

9. Уклоњен је поклопац и плоча је опрана три пута са пуфером за испирање.

10. Додато је 0.1ml SABC радног раствора у сваки бунарчић, покривено је поклопцем и започета је инкубација на 37°C у току 30 мин.

11. Уклоњен је поклопац и испрана је плоча пет пута са пуфером за испирање и сваки пут је пуфер за испирање остављен да одстоји у бунарчићима 1-2 мин.

12. Додато је 90µl ТМВ супстрата у сваки бунарчић, покривена је плоча и започета је инкубација на 37°C у мраку 15-30 мин. Нијансе плаве су се могле видети у прва три до четири бунарчића (са најконцентрованијим SCGB2A2 стандардним растворима), други бунарчићи нису показивали очигледну боју.

13. Додато је 50µL стоп раствора у сваки бунарчић и измешано. Боја се одмах мења у жуто.

14. Очитана је О.Д. апсорпција на 450 nm у читачу микроплоче одмах након додавања стоп раствора.

За прорачун, (релативни О.Д.450) = (О.Д. 450 сваког бунарчића) – (О.Д. 450 нула бунарчића).

Стандардна крива је могла да се нацрта као релативни О.Д.450 сваког стандардног раствора (Y) вс. појединачна концентрација стандардног раствора (X). SCGB2A2 концентрација узорка може интерполирати од стандардне криве.

Резиме

1. Опрана је плоча два пута пре него што је додат стандард, узорак и контролни (нула) бунарчићи.

2. Додато је 100µl стандарда или узорка сваком бунарчићу 90 мин. на 37°C.

3. Додато је 100µl биотинисаног радног раствора за детекцију антитела у сваки бунарчић 60 мин. на 37°C.

4. Аспирирано је и опрано три пута

5. Додато је 100µl SABC радног раствора у сваки бунарчић. Инкубација 30 мин. на 37°C.

6. Аспирирано је и опрано пет пута.

7. Додато је 90µl ТМВ супстрата. Инкубација 15-30 мин. на 37°C.

8. Додато је 50µl стоп раствора. Очитано одмах на 450nm.

9. Прорачунати су резултати.

3.2.6. Испитивање експресије информационе РНК за *mamaglobin-A* ген

У сврху испитивања експресије информационе РНК циљаног гена примењује се qRT-PCR метода, односно квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену. Она представља биохемијску реакцију којом је могуће амплификовати циљани фрагмент ДНК и до неколико милијарди пута. Сам апарат у себи има инкорпориран софтвер, који аутоматски издаје врло прецизне резултате и стога се може доћи до закључка да је ово једна од најефикаснијих и најпрецизнијих метода које се користе у модерној дијагностици.

3.2.7. Изоловање РНК из ткива и ћелија

Фенол/хлороформ реакција за изолацију РНК је по први пут описана од стране Chomczynski и Sacchi (1987). Цела процедура се ради на леденој подлози како би се инхибирала активност ДНаза и РНаза. Узорку масе 0.01 g (ткиво карцинома и перитуморско ткиво) се на самом почетку додаје 1 ml TRIzol-а у коме се врши хомогенизација. Након овог корака следи додавање хлороформа, који ће након центрифугирања омогућити издвојање три видљиве фазе унутар микротубе. На врху у воденој фази је РНК, која је пажљивим пипетирањем пренета у нову тубу. Након додавања изопропанола уследило је инкубирање на собној температури. После периода инкубације, уследило је центрифугирање након чега је био видљив талог на дну тубе који представља РНК. Овако добијени талог је завршном кораку је испран са 1 ml 80% етанолом.

Овако изолована РНК је ресуспендована у ПЦР води, а подаци о чистоћи и концентрацији изолата су добијени на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer Plus). Узорци РНК су складиштени на -80 °C до завршетка експеримента.

3.2.8. Реверзна транскрипција (RT-PCR)

Реакција реверзне транскрипције се засива на могућности ензима реверзне транскриптазе да једноланчану РНК преписује у комплементарну ДНК (Bustin, 2000). У овој дисертацији је употребљен Qiagen Seniscript RT Mix (Master Mix) који је садржавао све неопходне компоненте за реакцију као што су пуфер за реверзну транскрипцију,

дезоксирибонуклеотид трифосфате, олиго-dT прајмере, водубез ДНаза и РНаза, као и ензим реверзне транскриптазе. На самом крају додато је и 2 μl изоловане РНК (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Тубе са мастер миксом и узорком РНК су постављене у MultiGene OptiMax Thermal апарат (Labnet Intetional Inc. North America). Добијени узорци комплементарне ДНК се могу користити одмах за даље анализе или чувати на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.9. Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR)

Комплементарна ДНК је коришћена за анализу експресије циљаног гена (Zhai и сар. 2005). За ову анализу је коришћен кит *Universal Kapa Sybr fast qPCR Master Mix 2x* који је садржавао све неопходне компоненте. Узорак сДНК и прајмери су додати на самом крају. Укупна запремина у бунарићу ПЦР плоче је била 20 μl . За *qRT-PCR* коришћен је Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems апарат.

Коришћени су прајмери за гене $\beta\text{-actin}$,

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
$\beta\text{-actin}$	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<i>Mamaglobin-A gen</i>	5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCCTTG-3'	5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3'

У складу са упутствима произвођача коришћен је следећи програм:

1 x	40 пута		
Топлотна активација 95 $^{\circ}\text{C}$, 3 минута	Денатурација 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 секунди	Хибридизација 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 секунди	Полимеризација 60 $^{\circ}\text{C}$, 60 секунди

Релативна генска експресија *Mamaglobin-A* гена је израчуната у односу на експресију ендогене контроле $\beta\text{-actin}$ -а у истом узорку (Schmittgen и Livak, 2008), коришћењем формуле:

$$2^{-\Delta\text{Ct}}$$

$\Delta\text{Ct}_1 = \text{Ct}$ вредност испитиваног гена у узорку; $\Delta\text{Ct}_2 = \text{Ct}$ вредност $\beta\text{-actin}$ -а у узорку.

3.2.10. Статистичка анализа

Прикупљени подаци су обрађени уз помоћ статистичког програма SPSS верзија 20. За проверу нормалности расподеле је коришћен Колмогоров-Смирнов тест. За континуиране варијабле су одређене мере централне тенденције и мере варијабилитета, а за категоријске варијабле учесталост појединих категорија. За нумеричке варијабле које имају нормалну расподелу коришћени су Студентов t-тест и ANOVA. За нумеричке варијабле које немају нормалну расподелу коришћен је Mann-Whitney тест а за категоријске променљиве коришћен је X² тест. За испитивање предикције за две категорије коришћена је бинарна логистичка регресија. За утврђивање да ли нека променљива може да се користи за предвиђање метастазирања коришћена је ROC (receiver operating characteristic) крива као и површина испод криве (AUROC). Максимални ниво прихватљиве вероватноће нулте хипотезе који је коришћен у овој студији је 0.05.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Клиничко-патолошке карактеристике пацијенткиња са раком дојке

Анализирани су нивои мамаглобина у ткиву карцинома и пери-туморском ткиву и евалуирана је њихова прогностичка вредност. Студија је имала и корелацију између нивоа мамаглобина у ткиву карцинома и пери-туморског ткива и одређених клиничких патолошких карактеристика. Клиничке и патолошке карактеристике пацијената описане су у Табели 1 и 2.

Табела 1.

Клиничке, патолошке и ТНМ карактеристике пацијенткиња са раком дојке

Карактеристике	Број пацијенткиња-Н, (%)
Број анализираних препарата	128 (100%)
• Ткиво из окружења тумора	64 (50%)
• Ткиво карцинома	64 (50%)
Хистолошки градус	
• Low grade (Г1 или добро диферентован)	8 (12%)
• Intermediate grade (Г2 или умерено диферентован)	36 (56%)
• High grade (Г3 или слабо диферентован)	20 (32%)
• High grade (Г3 или недиферентован)	0 (0%)
Промер тумора	
• Тумор мањи од 2 cm (Т1)	27 (42%)
• Тумор 2-5 cm (Т2)	3 (4%)
• Тумор већи од 5 cm (Т3)	34 (54%)
• Тумор било ког промера уколико захвата зид торакса (Т4)	0 (0%)
Припадајући лимфни нодуси (N)	
• Без захваћености припадајућих лимфних нодуса (N0)	4 (6%)
• Лимфонодалне метастазе у истостраној пазушној јами (N1)	31 (48%)
• Лимфонодалне метастазе у истостраној пазушној јами међусобно срасли или срасли са околином (N2)	29 (46%)
Удаљене метастазе дијагностиковане током 5-огодишњег периода	
• Без удаљених секундарних депозита (M0)	23 (36%)
• Дијагностиковани удаљени секундарни депозити (M1)	33 (52%)
• Присуство удаљених секундарних депозита није познато (Mx)	8 (12%)

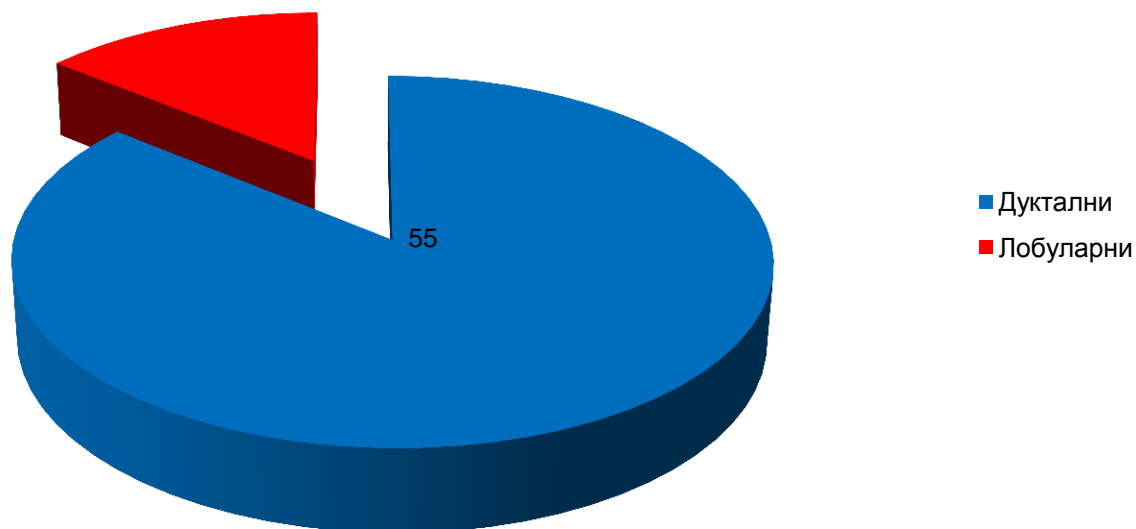
Табела 2. Клиничке, патолошке и имунохистохемијске карактеристике пацијенткиња са раком дојке

Карактеристике	Број пацијенткиња-Н, (%)
Број анализираних препарата	128 (100%)
• Ткиво из окружења тумора	64 (50%)
• Ткиво карцинома	64 (50%)
Патохистолошки тип рака дојке	
• <i>Инвазивни дуктални карцином</i>	55 (86%)
• <i>Инвазивни лобуларни карцином</i>	9 (14%)
Рецепторски статус	
• Естроген позитивни	38 (60%)
• Естроген негативни	26 (40%)
• Прогестерон позитивни	29 (46%)
• Прогестерон негативни	35 (54%)
• HER2 позитивни	31 (48%)
• HER2 негативни	33 (52%)
Старосна доб	
• < 50	3 (4%)
• > 50	61 (96%)

Просечна старост пацијенткиња је била $58,95 + 11,24$ године.

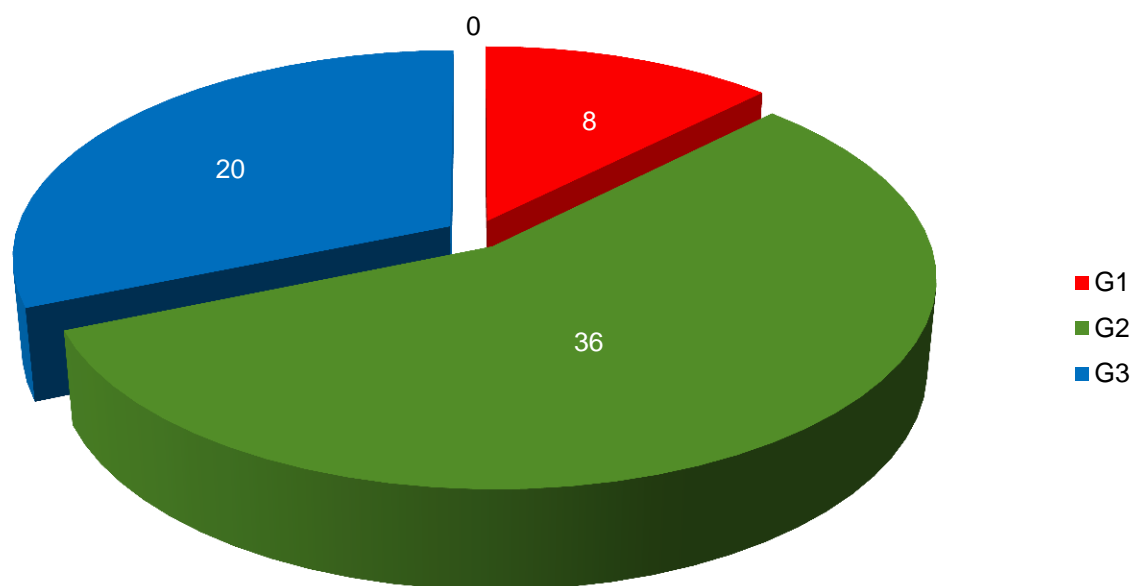
Средња старост болесница била је 60,5 година, 55 (86%) пацијенткиња је имало дуктални карцином у односу на 9 (14%) болесница са лобуларним карциномом, а овај однос је био статистички значајан ($\chi^2, p < 0,01$).

Графикон 1. Расподела пацијенткиња према хистолошком типу тумора



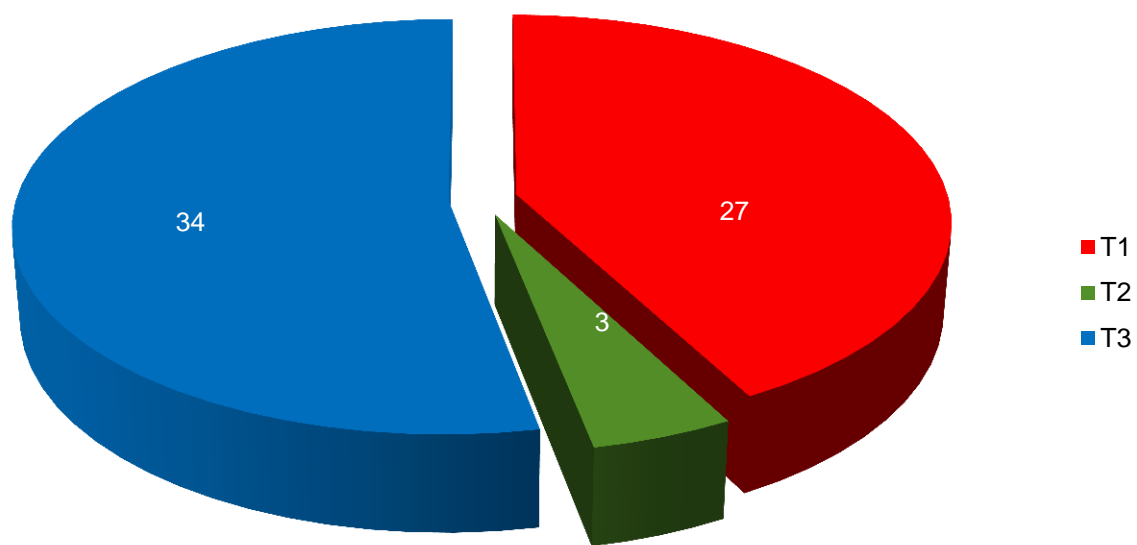
Најзаступљенији су били тумори умерене диференције (56%) док је најмање било добро диферентованих тумора (12%) (χ^2 , $p < 0.01$). Није било недиферентованих тумора.

Графикон 2. Диферентованост тумора



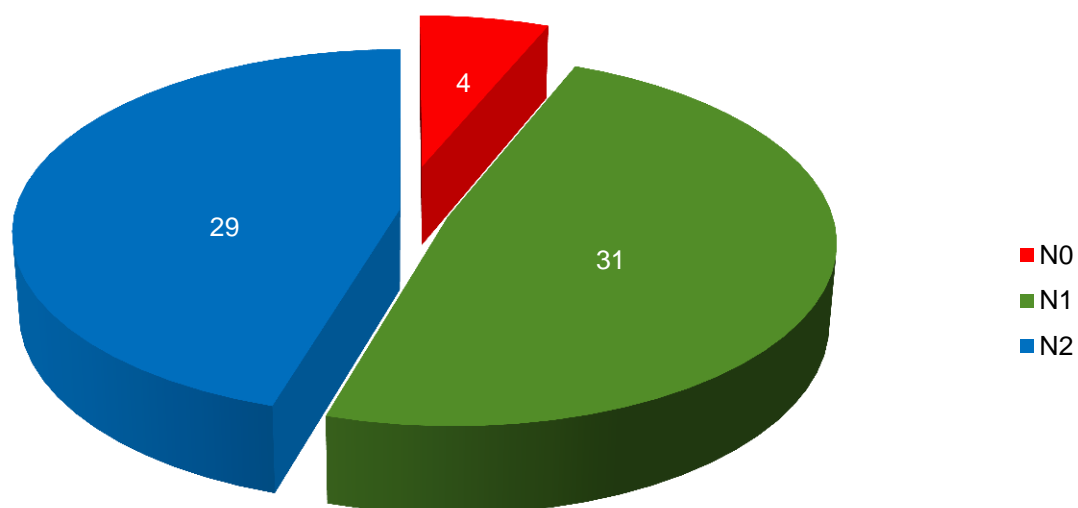
Тумор величине Т3 (тумор > 5 cm) је био најчешћи 54% док је најмање пацијенткиња било са Т2 величином тумора (између 2 и 5 cm) и ова разлика се показала високо значајном (X^2 , $p < 0.01$).

Графикон 3. Дистрибуција пацијенткиња према величини тумора



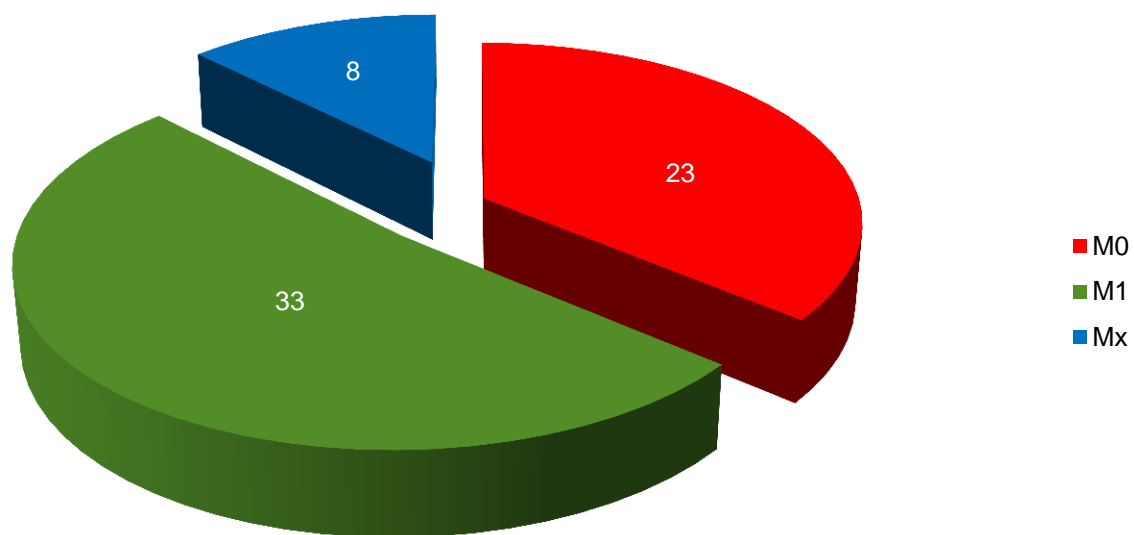
У ипсилатералним аксиларним лимфним жлездама регистроване су метастазе код 48% пацијенткиња док 6% пацијенткиња није имало регионалне лимфоидне метастазе (χ^2 , $p < 0.01$).

Графикон 4. Дистрибуција пацијенткиња према захваћености лимфних нодуса



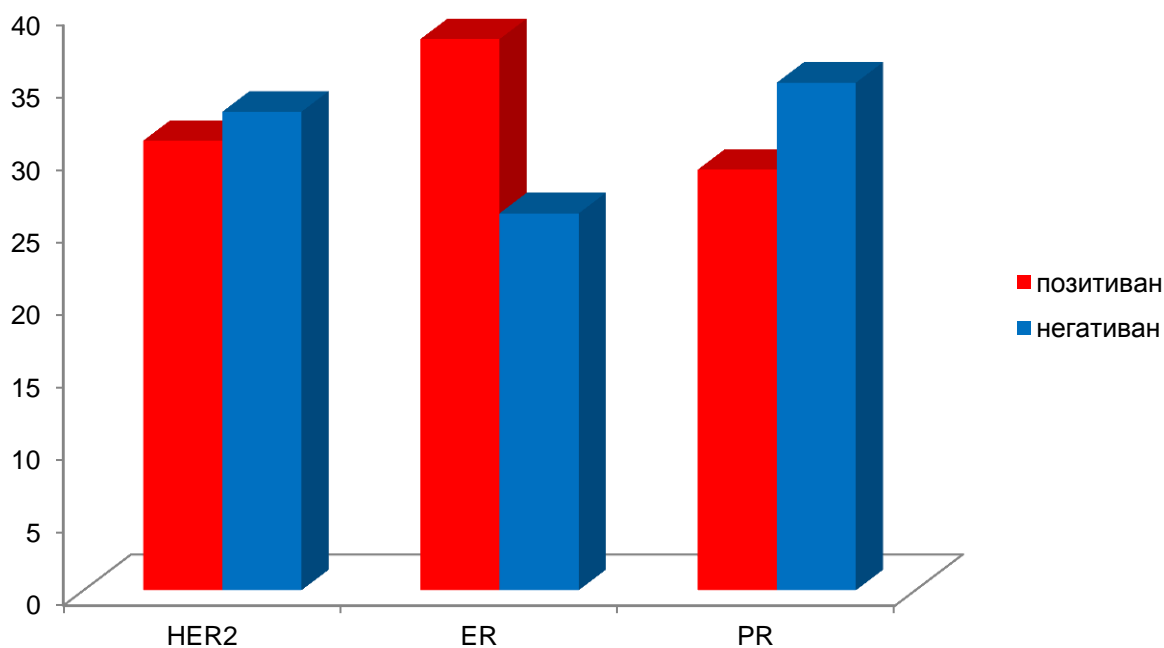
Највећи број пацијенткиња (52%) је имао удаљене метастазе, 36% није док је код 12% пацијенткиња присуство метастаза било непознато (χ^2 , $p=0.001$).

Графикон 5. Дистрибуција пацијенткиња према метастазирању



Није показана статистички значајна разлика у броју пацијенткиња које су биле позитивне и негативне на испитиване рецепторе. Прогестреон и естроген негативан статус је имало 52% пацијенткиње, 48% пацијенткиња је било HER2 + (X^2 , $p=0.803$). ER позитивно је било 60% пацијенткиња а негативно 40% (X^2 , $p=0.134$). PR позитивно је било 46% пацијенткиња а негативно 54% (X^2 , $p=0.453$).

Графикон 6. Дистрибуција пацијенткиња према рецепторском статусу



4.2. Карактеристике лечења рака дојке

Карактеристике лечења рака дојке које се односе на учињену хируршку интервенцију (поштедна или мутилантна операција) и постоперативну онколошку терапију, описане су у Табели 3.

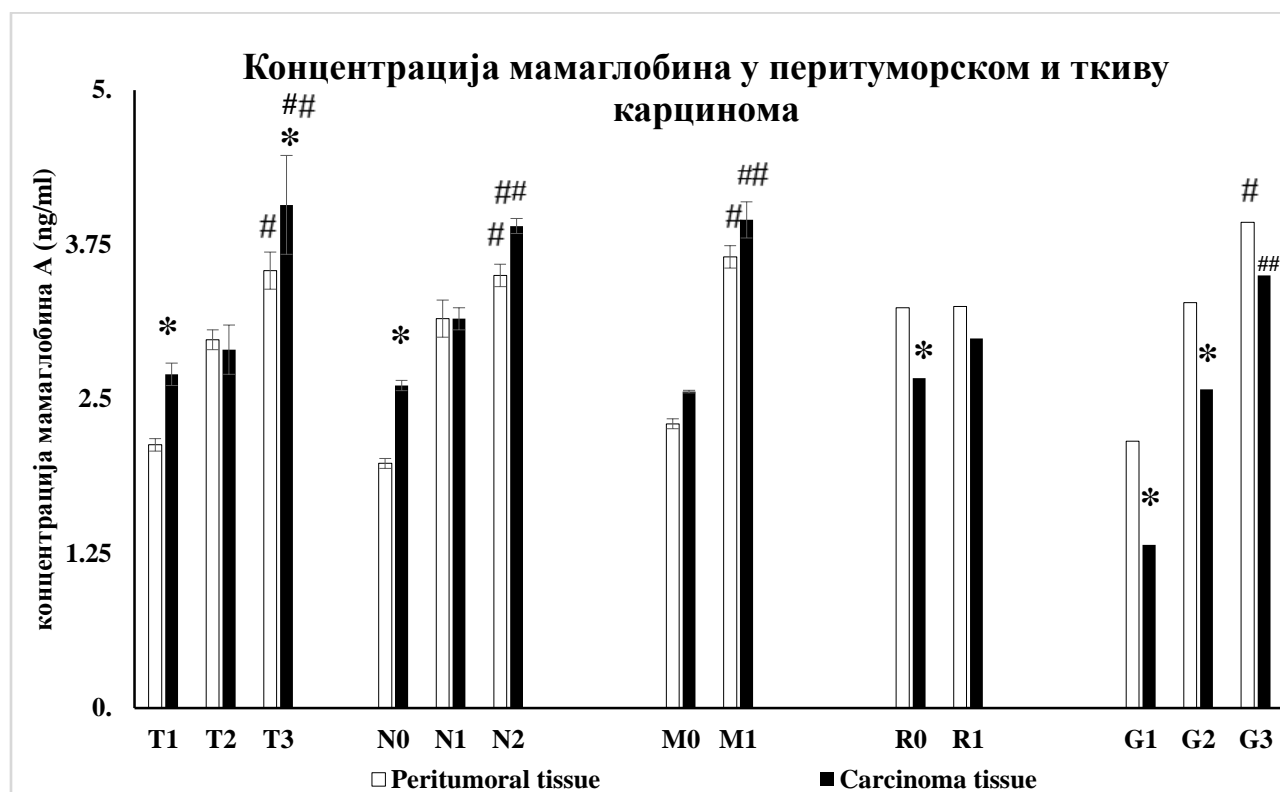
Табела 3. Карактеристике лечења рака дојке

Карактеристике N (%)	Број пацијената-N, (%)
Хируршка интервенција	
• Поштедна (Тумор < 3 cm)	29 (45,3%)
• Мутилантна (Тумор ≥ 3 cm)	35 (54,7%)
Постоперативна адјувантна хемотерапија	
• Да	46 (72%)
• Не	18 (28%)
Постоперативна радиотерапија	
• Да	43 (67%)
• Не	21 (33%)
Укупно	64 (100%)

Поштедна операција је изведена код 29 (45,3%) пацијенткиња са раком дојке мањим од 3 cm, у поређењу са 35 (54,7%) пацијенткиња код којих је извршена мутилантна операција. Адјувантну хемотерапију је примило 46 (72%) пацијенткиња. Постоперативна радиотерапија коришћена је код 43 (67%) пацијенткиња.

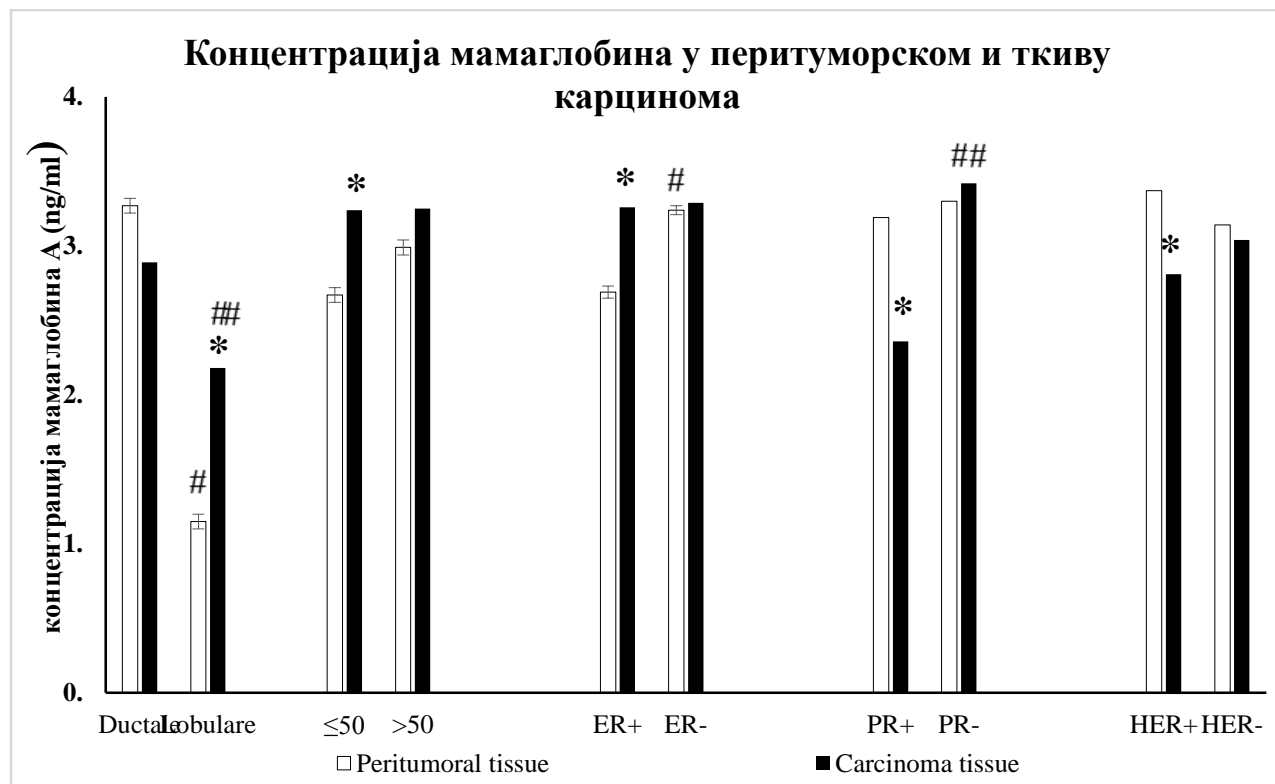
4.3. Концентрација мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву

Графикон 7. Концентрација мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијенткиња са раком дојке према ТНМ класификацији, хистолошком градусу и статусу маргине ресекције.



Стубићи су изражени у виду средње вредности \pm SE за дати број узорака (n); за статистичку значајност између карциномског и перитуморског ткива се узимала вредност * $p < 0,05$; за статистичку значајност између перитуморских ткива се узимала вредност # $p < 0,05$; за статистичку значајност између карциномских ткива се узимала вредност ## $p < 0,05$.

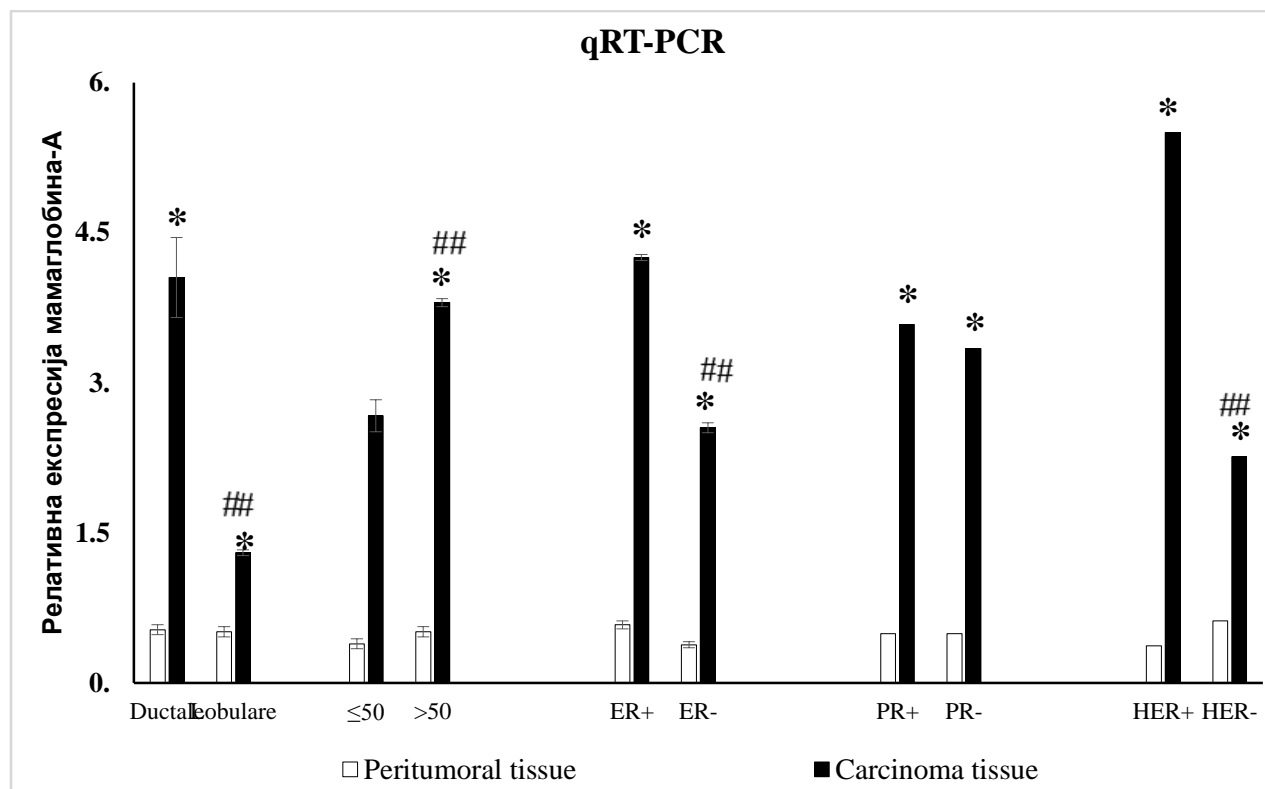
Графикон 8. Концентрација мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора пацијената са раком дојке у односу на патохистолошки тип тумора, старосну доб пацијента, хормонски и HER 2 статус.



Стубићи су изражени у виду средње вредности ± SE за дати број узорака (n); за статистичку значајност између карциномског и перитуморског ткива се узимала вредност * $p < 0,05$; за статистичку значајност између перитуморских ткива се узимала вредност # $p < 0,05$; за статистичку значајност између карциномских ткива се узимала вредност ## $p < 0,05$.

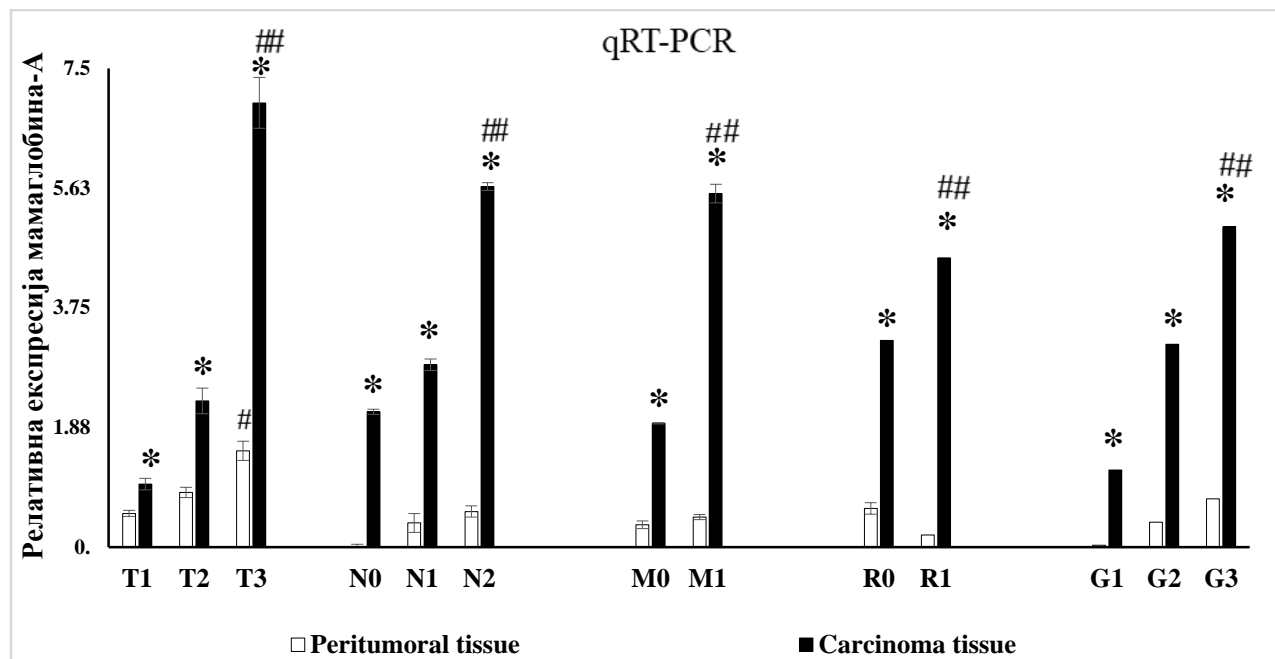
4.4. Анализа генске експресије *мамаглобина А* у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијенткиња са раком дојке

Графикон 9. Релативна генска експресија *мамаглобина А* у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора пацијенткиња са раком дојке у односу на патохистолошки тип тумора, старосну доб пацијента, хормонски и HER 2 статус.



Стубићи су изражени у виду средње вредности ± SE за дати број узорака (n); за статистичку значајност између карциномског и перитуморског ткива се узимала вредност * p <0,001; за статистичку значајност између перитуморских ткива се узимала вредност #p <0,001; за статистичку значајност између карциномских ткива се узимала вредност ## p <0,001.

Графикон 10. Генска експресија *мамаглобина А* у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијената са раком дојке у односу на ТНМ класификацију, захваћеност маргина препарата карциномом и хистолошки градус тумора

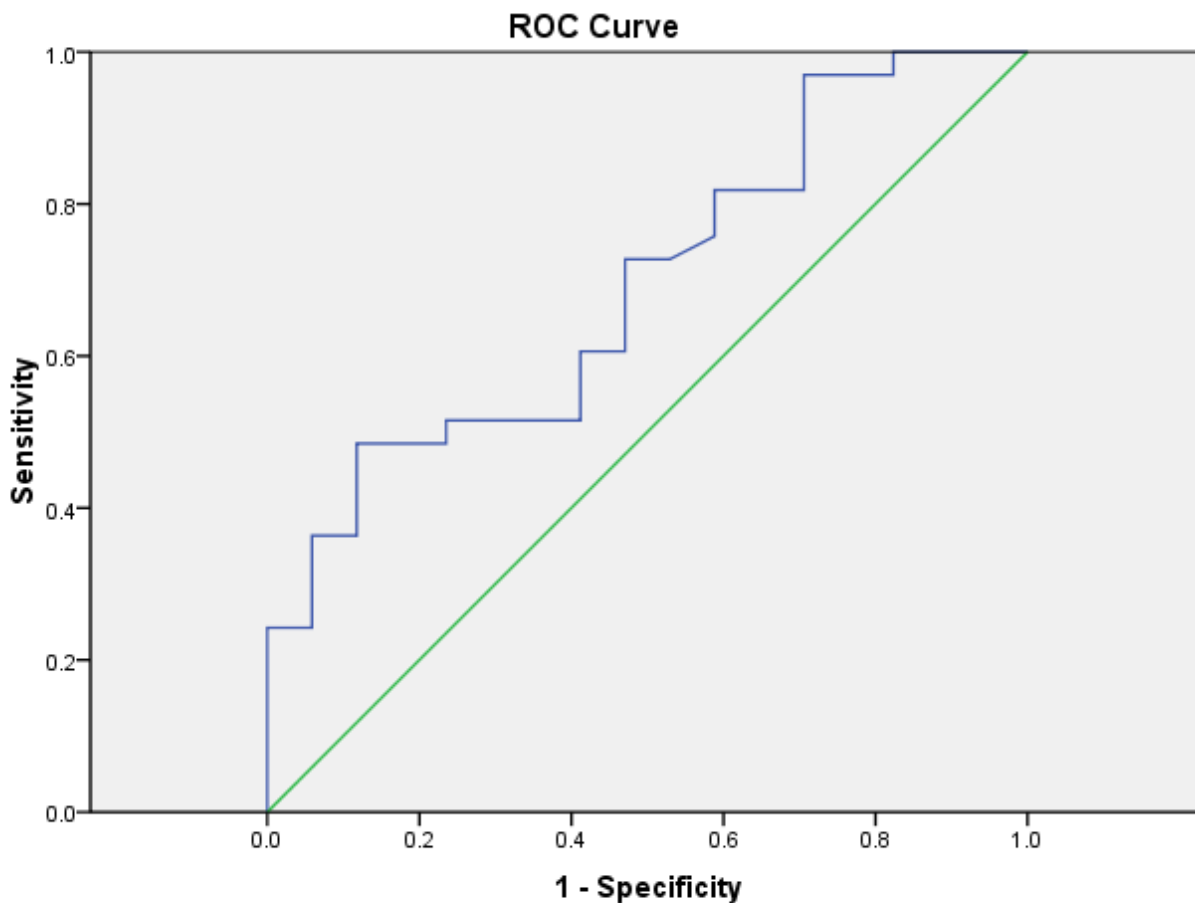


Стубићи су изражени у виду средње вредности \pm SE за дати број узорака (n); за статистичку значајност између карциномског и перитуморског ткива се узимала вредност * $p < 0,001$; за статистичку значајност између перитуморских ткива се узимала вредност # $p < 0,001$; за статистичку значајност између карциномских ткива се узимала вредност ## $p < 0,001$.

Генска експресија мамаглобина у туморском ткиву је значајно израженија у поређењу са перитуморским ткиво (Mann-Whitney тест, $U = 754$, $p = 0.001$).

4.5. Предиктивни значај концентрације мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијенткиња са раком дојке

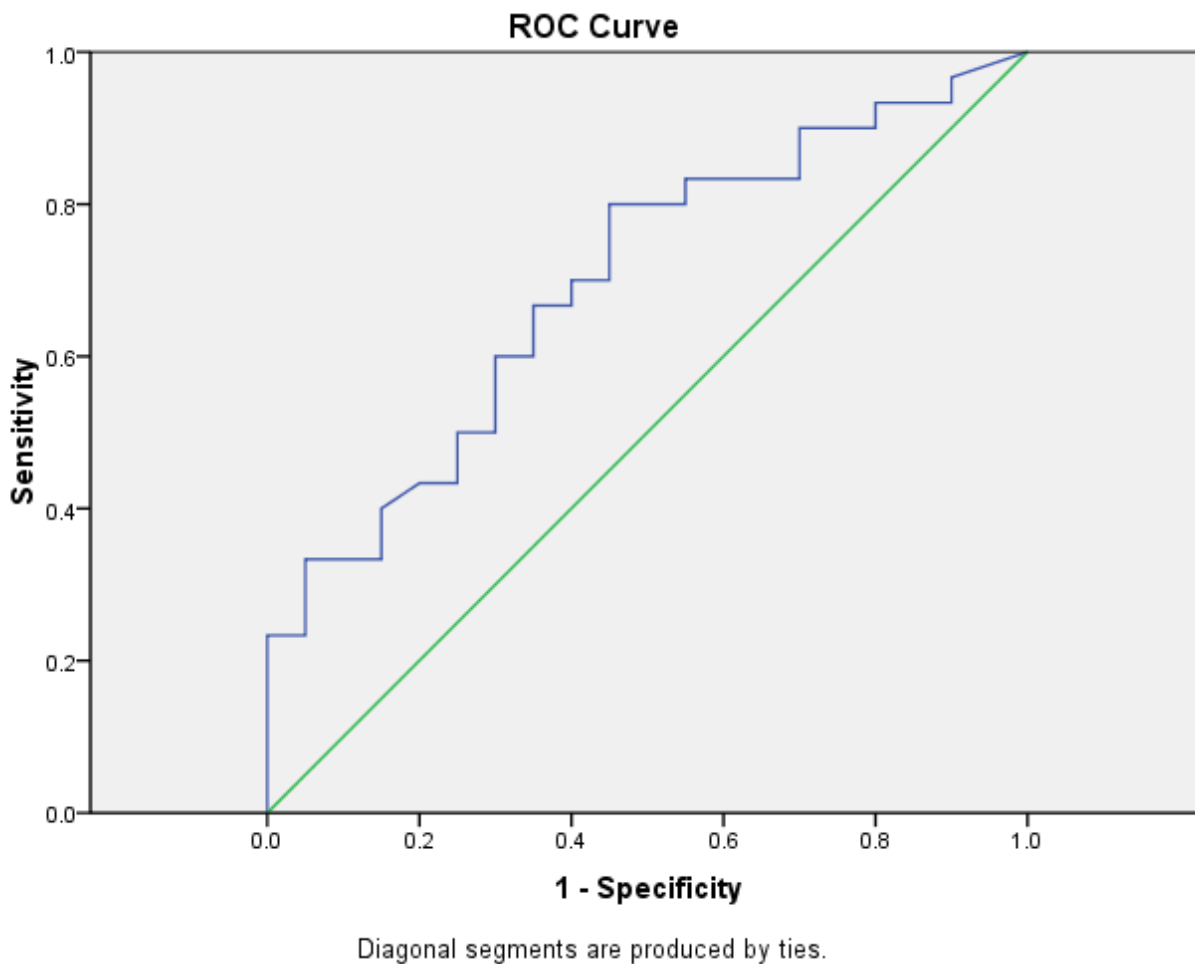
Графикон 11. ROC крива-концентрација мамаглобина А у перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Diagonal segments are produced by ties.

Концентрација мамаглобина у перитуморском ткиву код карцинома дојке значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија, $p=0.024$). На основу ROC криве можемо закључити да вредност концентрације мамаглобина у перитуморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ($AUC= 0.693$, $p=0.027$). Гранична вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи 0.67ng/ml за сензитивност 0.58 и специфичност 0.59.

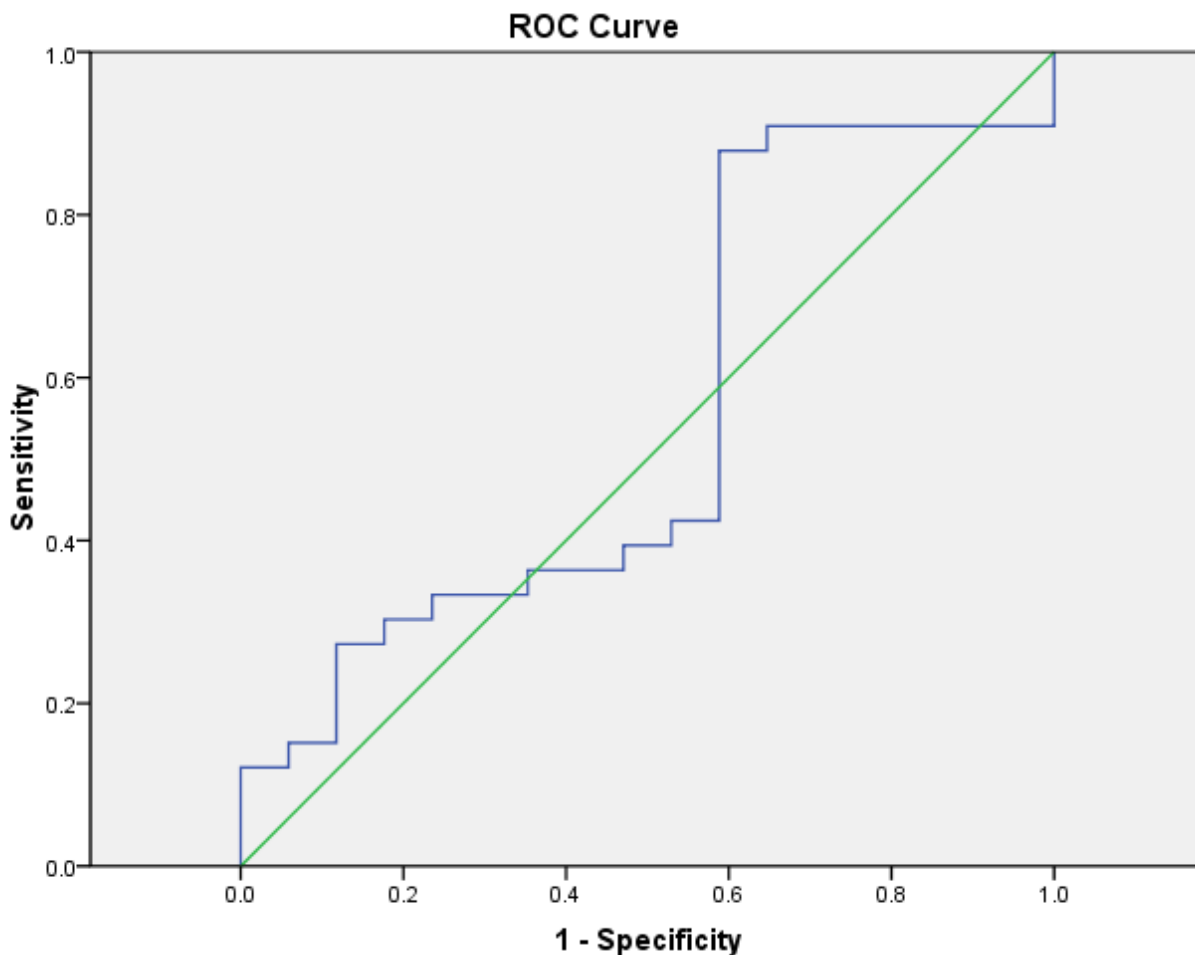
Графикон 12. ROC крива-концентрација мамаглобина А у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Концентрација мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија, $p = 0.025$). На основу ROC криве можемо закључити да вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ($AUC = 0.698$, $p = 0.019$). Гранична вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи 0.578 ng/ml за сензитивност 0.67 и специфичност 0.65 .

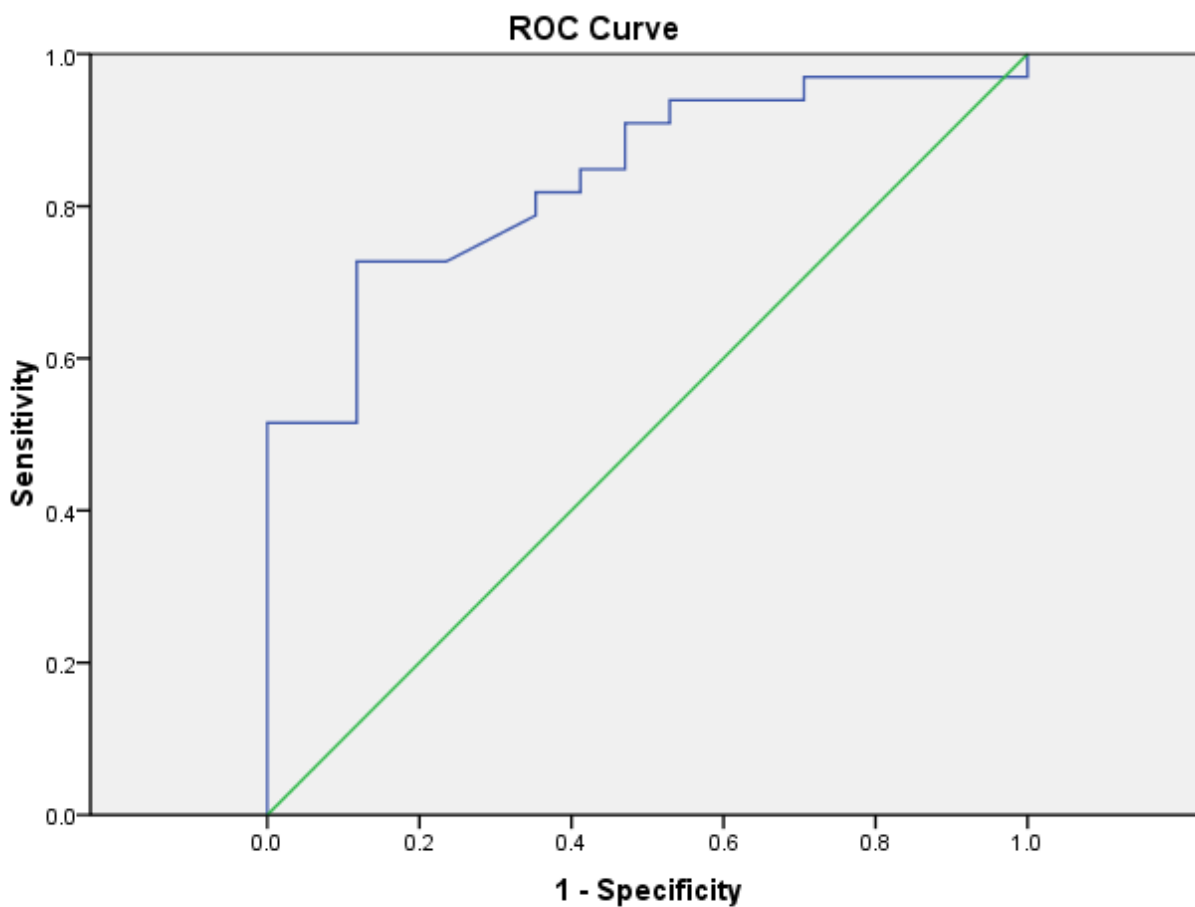
4.6. Предиктивни значај генске експресије мамаглобина А у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијенткиња са раком дојке

Графикон 13. ROC крива-генска експресија мамаглобина А у перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Генска експресија мамаглобина у перитуморском ткиву не утиче значајно на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија, $p=0.307$). На основу ROC криве можемо закључити да вредност генске експресије мамаглобина у перитуморском ткиву не може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ($AUC= 0.553$, $p=0.546$).

Графикон 14. ROC крива-генска експресија мамаглобина А у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Diagonal segments are produced by ties.

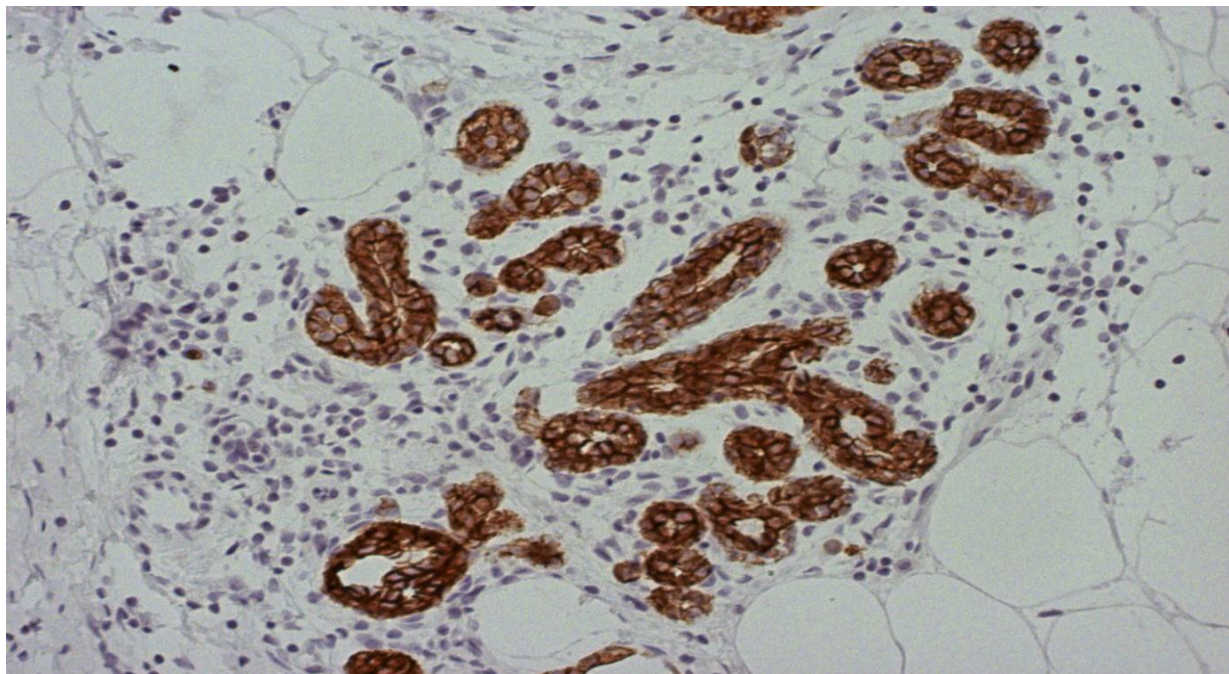
Генска експресија мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке одређена PCR методом значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија, $p=0.043$). На основу ROC криве можемо закључити да вредност генске експресије мамаглобина у туморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ($AUC=0.838$, $p<0.01$). Гранична вредност генске експресије мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи 1.003 за сензитивност 0.73 и специфичност 0.76.

4.7. Значај имунохистохемијског одређивања E-Cadherin-a код пацијаната са карциномом дојке

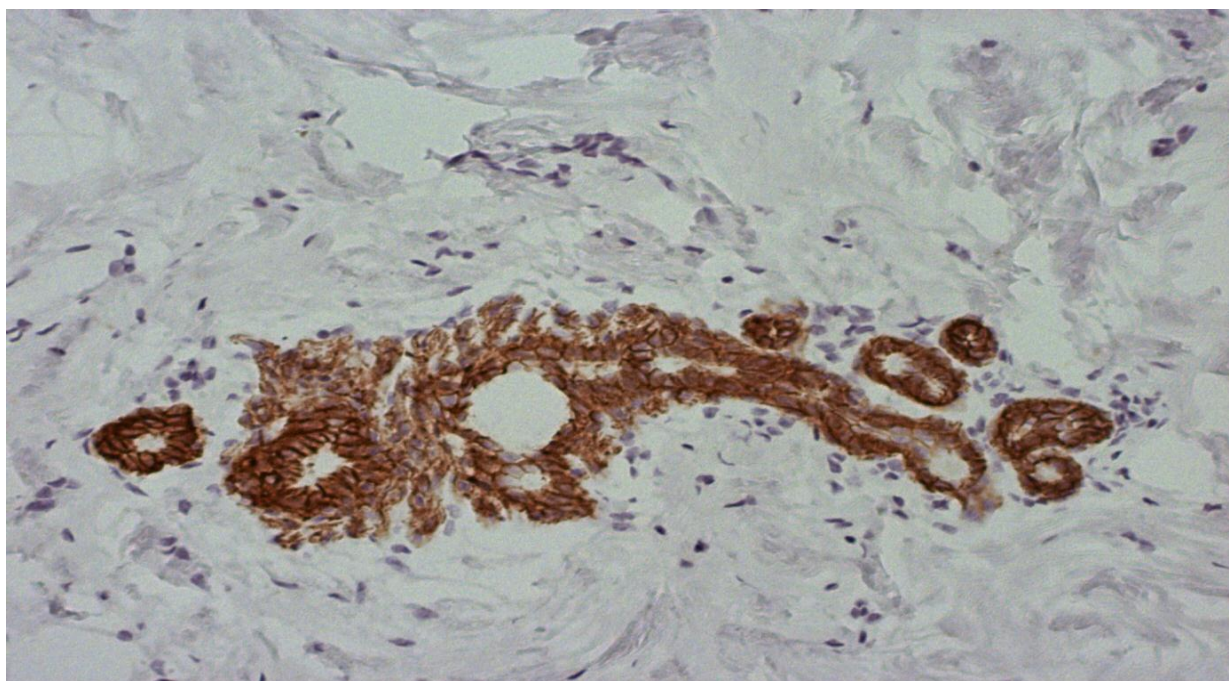
Табела 4. E-Cadherin у односу на патохистолошки тип рака дојке

	Cadherin			Укупно
		нег.	поз.	
Тип карцинома дојке	64	0	0	64
Дуктални	0	3	52	55
Лобуларни	0	5	4	9
Укупно	64	8	56	128

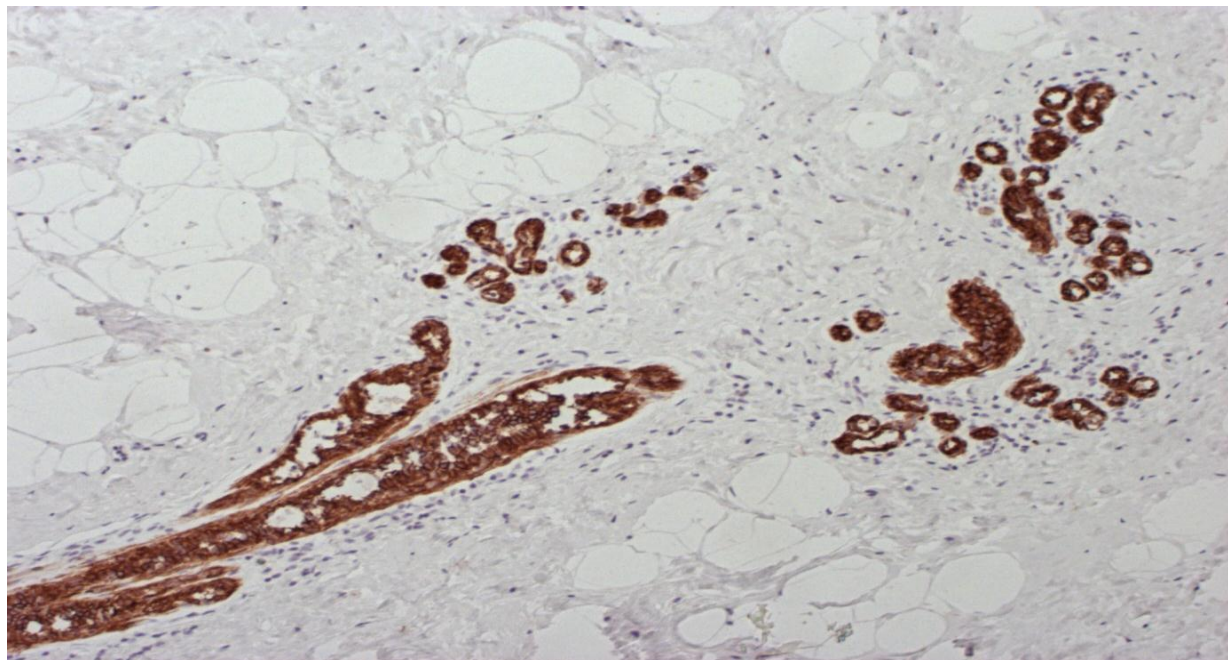
E-Cadherin се статистички значајно чешће јавља код пацијената са дукталним типом карцинома дојке у односу на лобуларни тип (Ни квадрат тест, $X^2=125.166$, $p<0.01$)



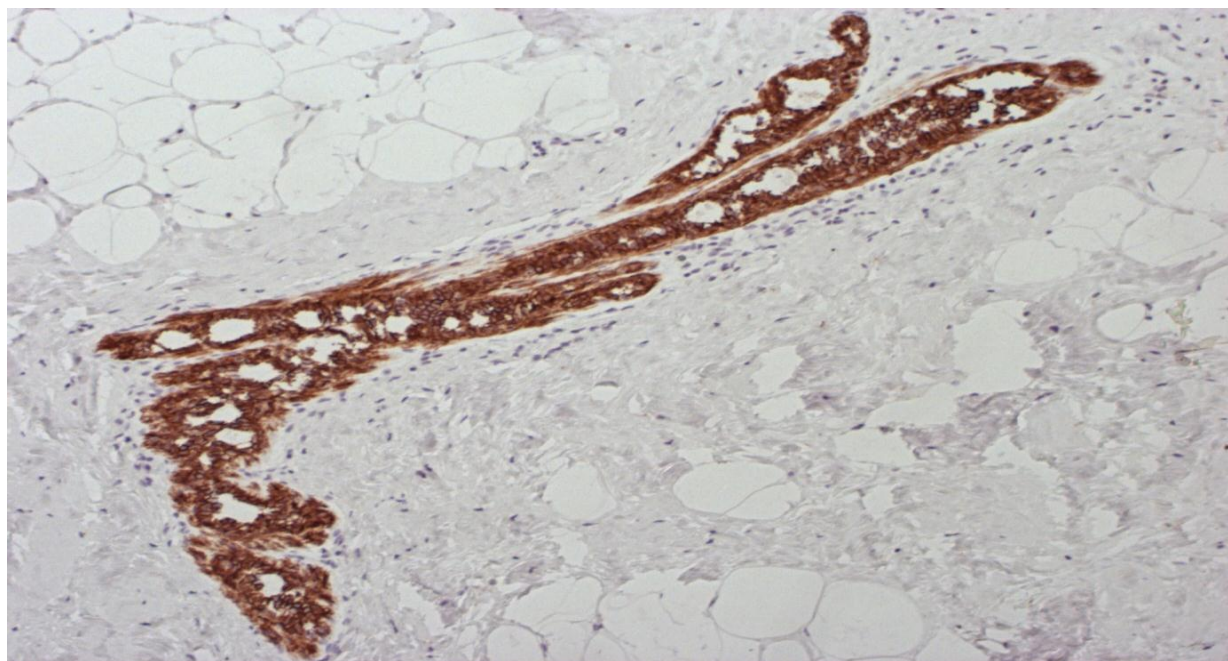
Слика 1. Мембранска позитивност епителних ћелија дукталних структура.
(Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



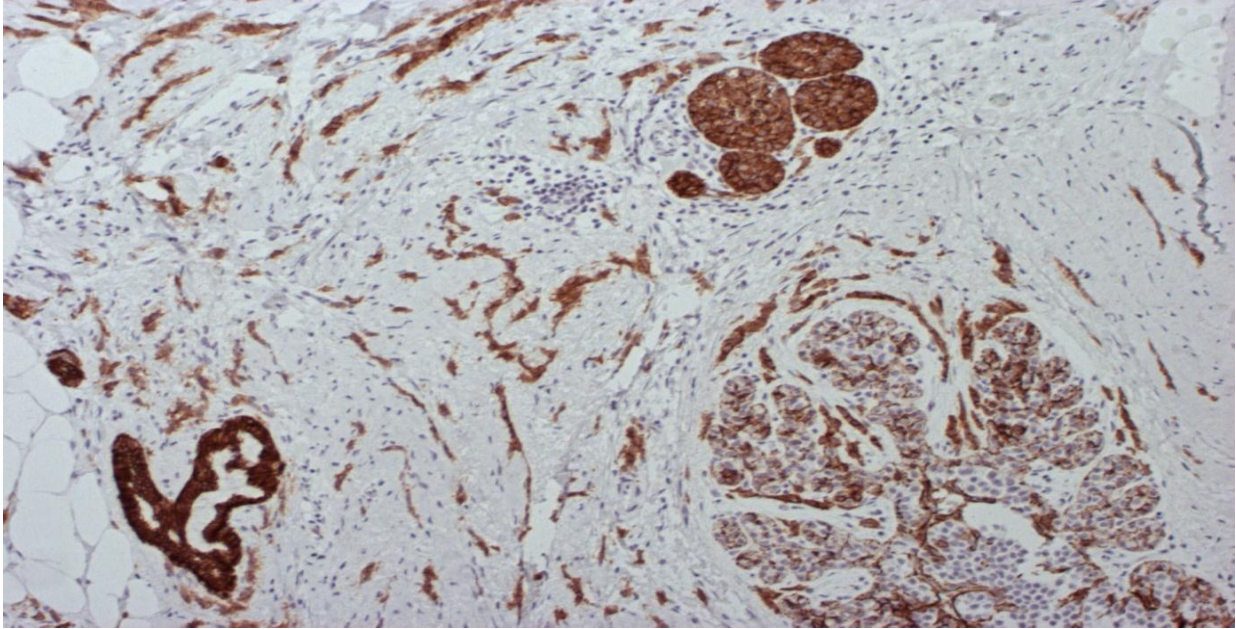
Слика 2. Мембранска позитивност епителних ћелија дукталних структура.
(Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



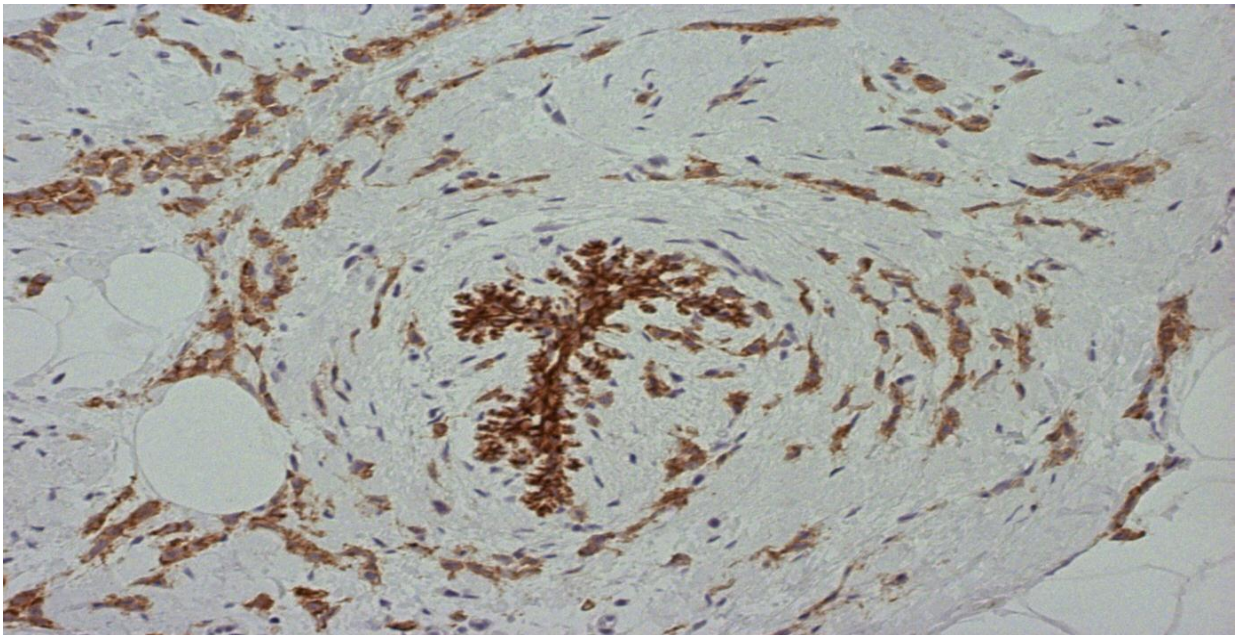
Слика 3. Мембранска позитивност епителних ћелија завршних дукталних структура атипичне дукталне хиперплазије. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увељичање x100)



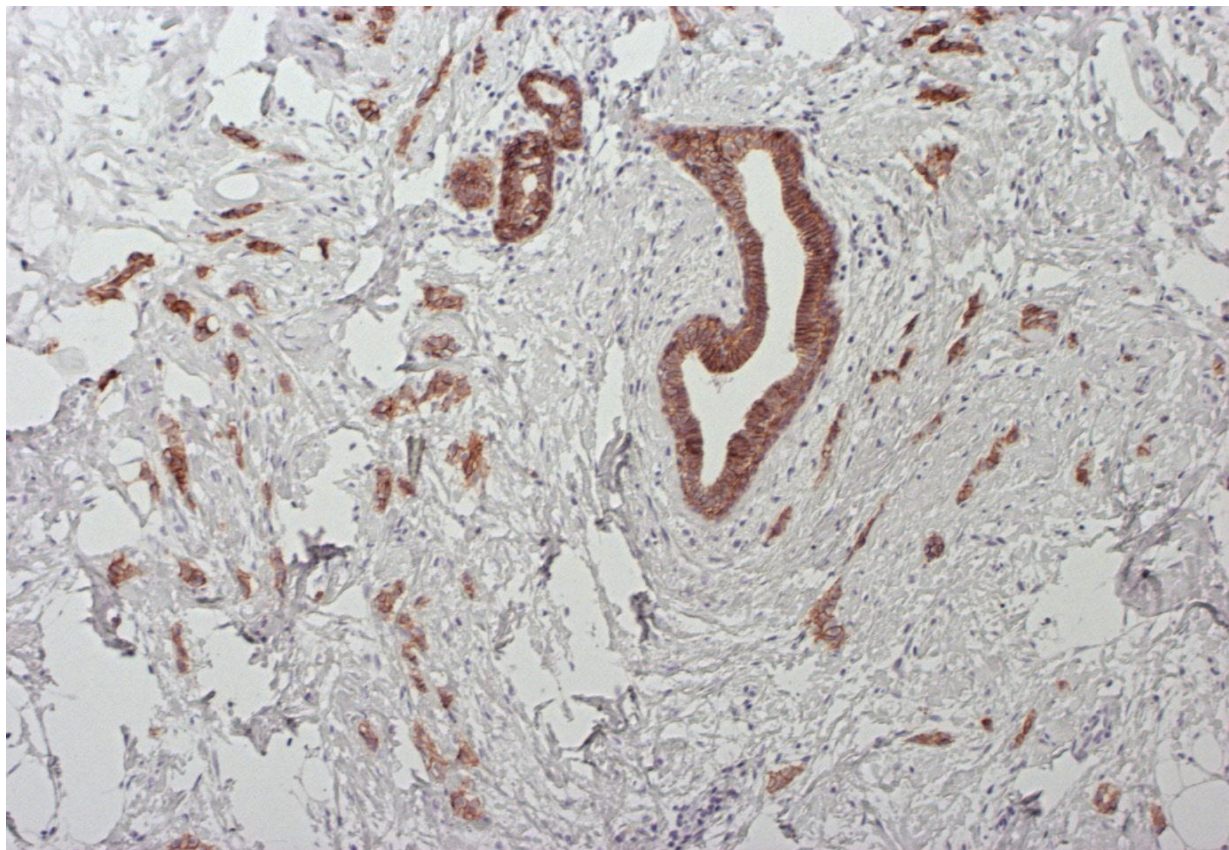
Слика 4. Мембранска позитивност епителних ћелија завршних дукталних структура атипичне дукталне хиперплазије. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увељичање x100)



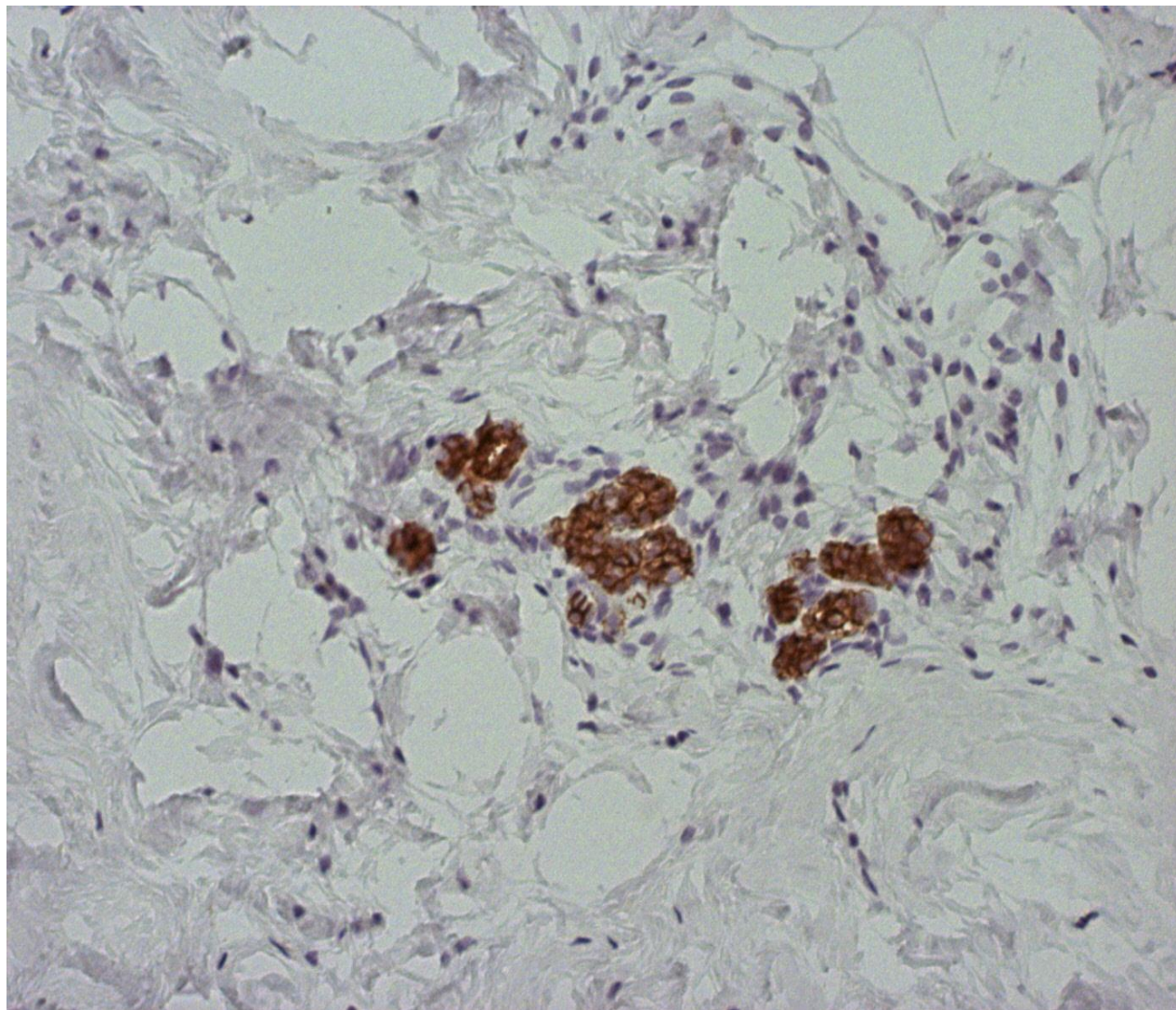
Слика 5. Имунопозитивност ћелијских трака и низова дукталног карцинома и унутрашња негативна контрола у фокусу лобуларног *in situ* карцинома. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x100)



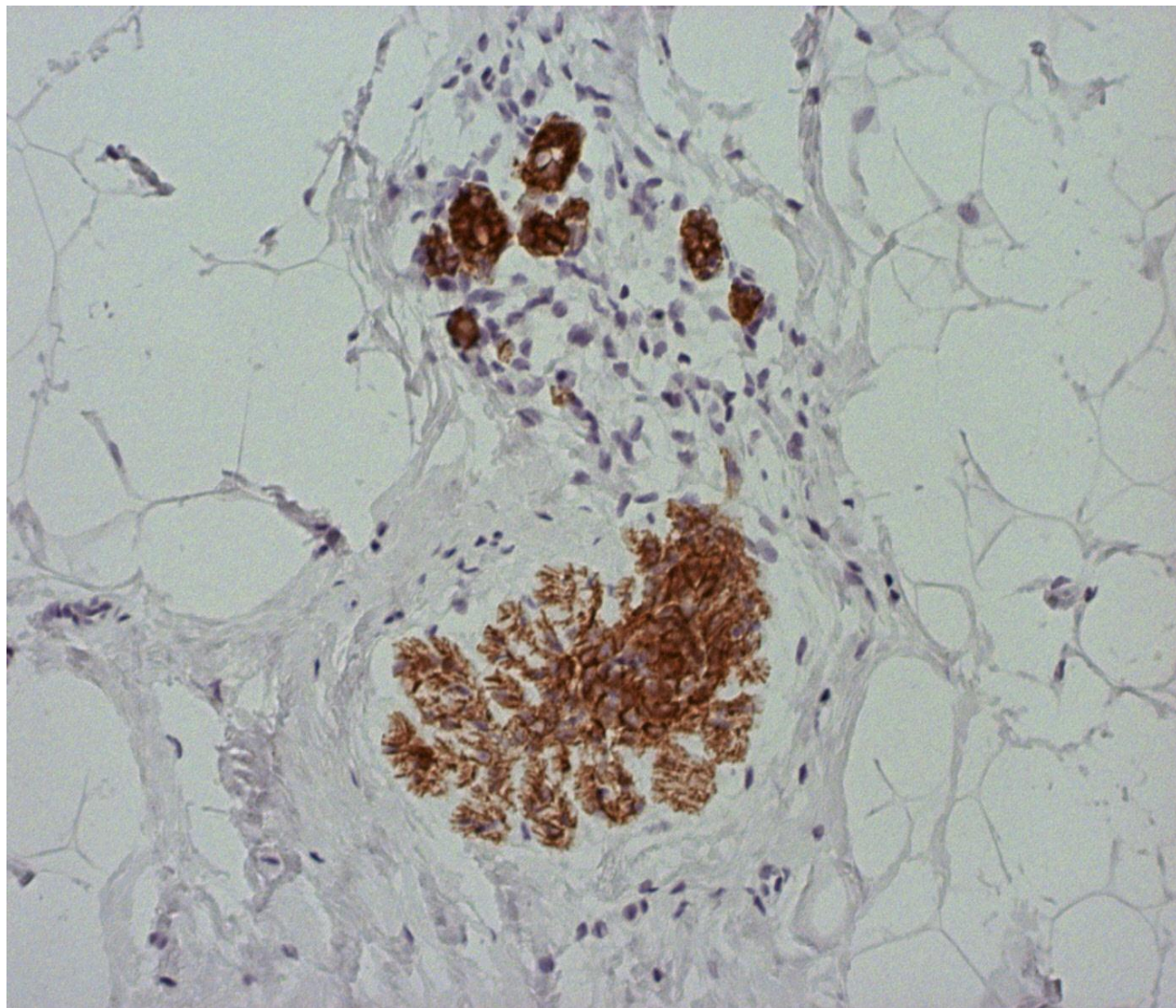
Слика 6. Континуирана и дисконтинуирана мембранска имунореактивност туморских ћелија које формирају траке и колоне око дуктуса. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x100)



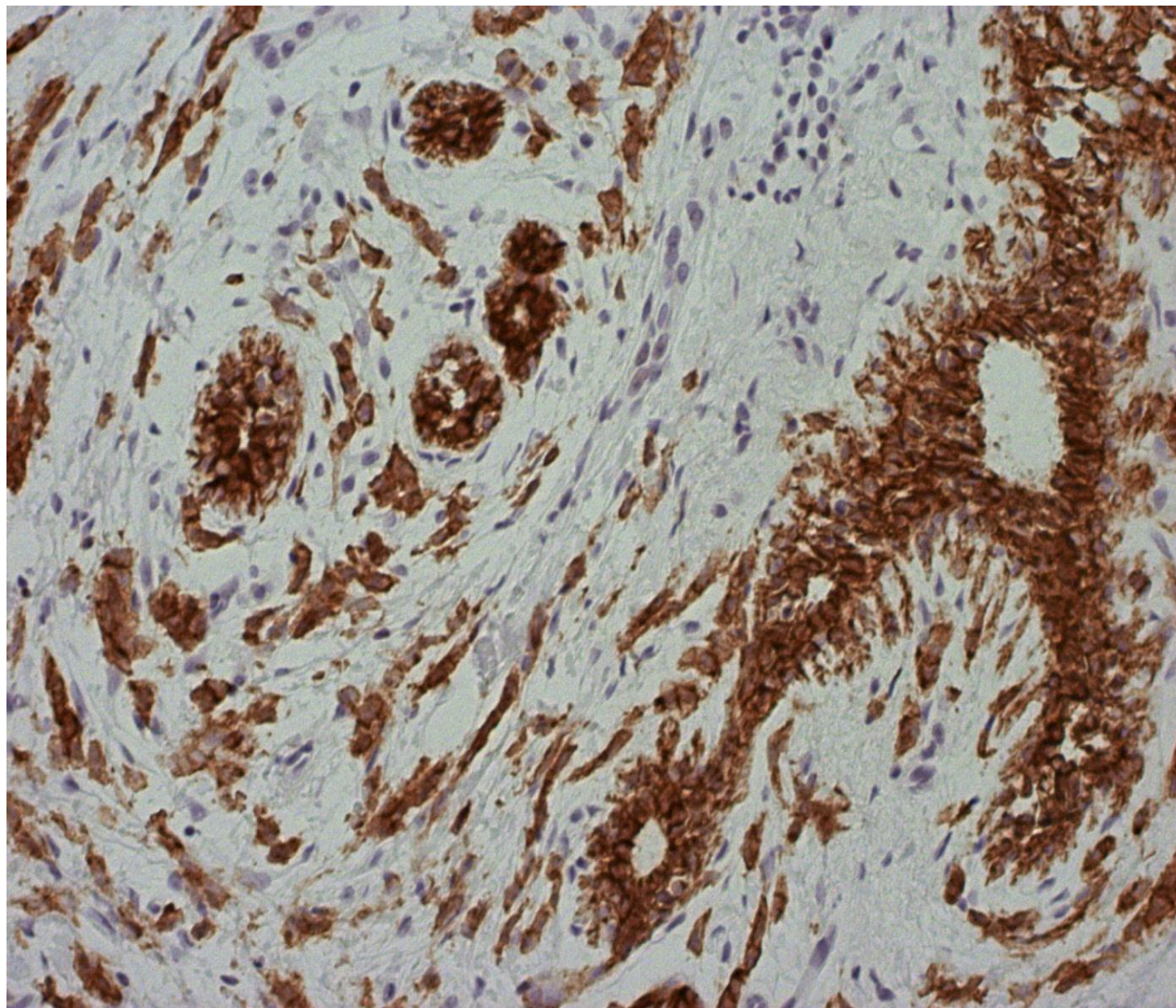
Слика 7. Континуирана и дисконтинуирана мембранска имунореактивност туморских ћелија које формирају траке и колоне око дуктуса. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



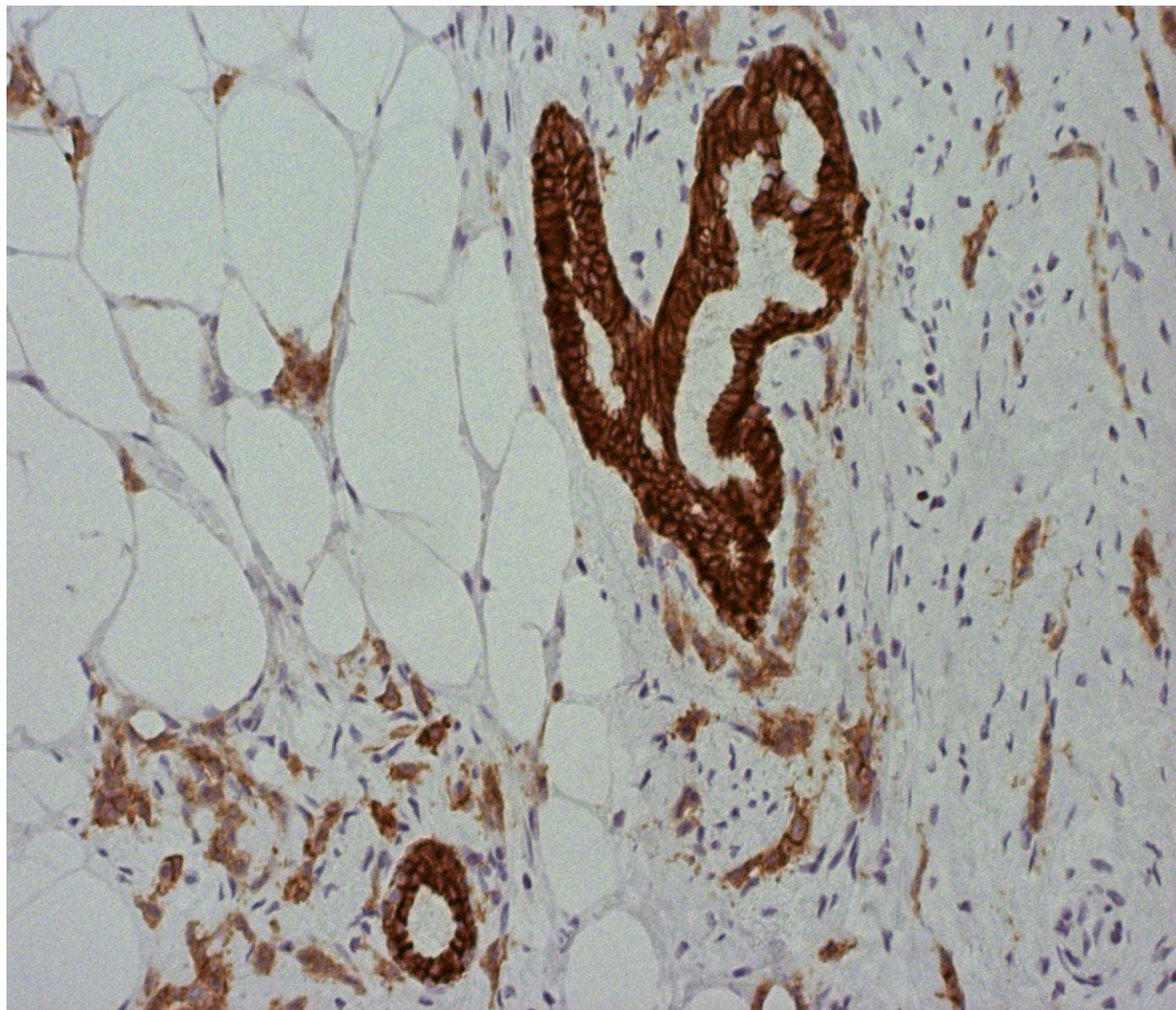
Слика 8. Нормалне епителне ћелије ацинуса. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



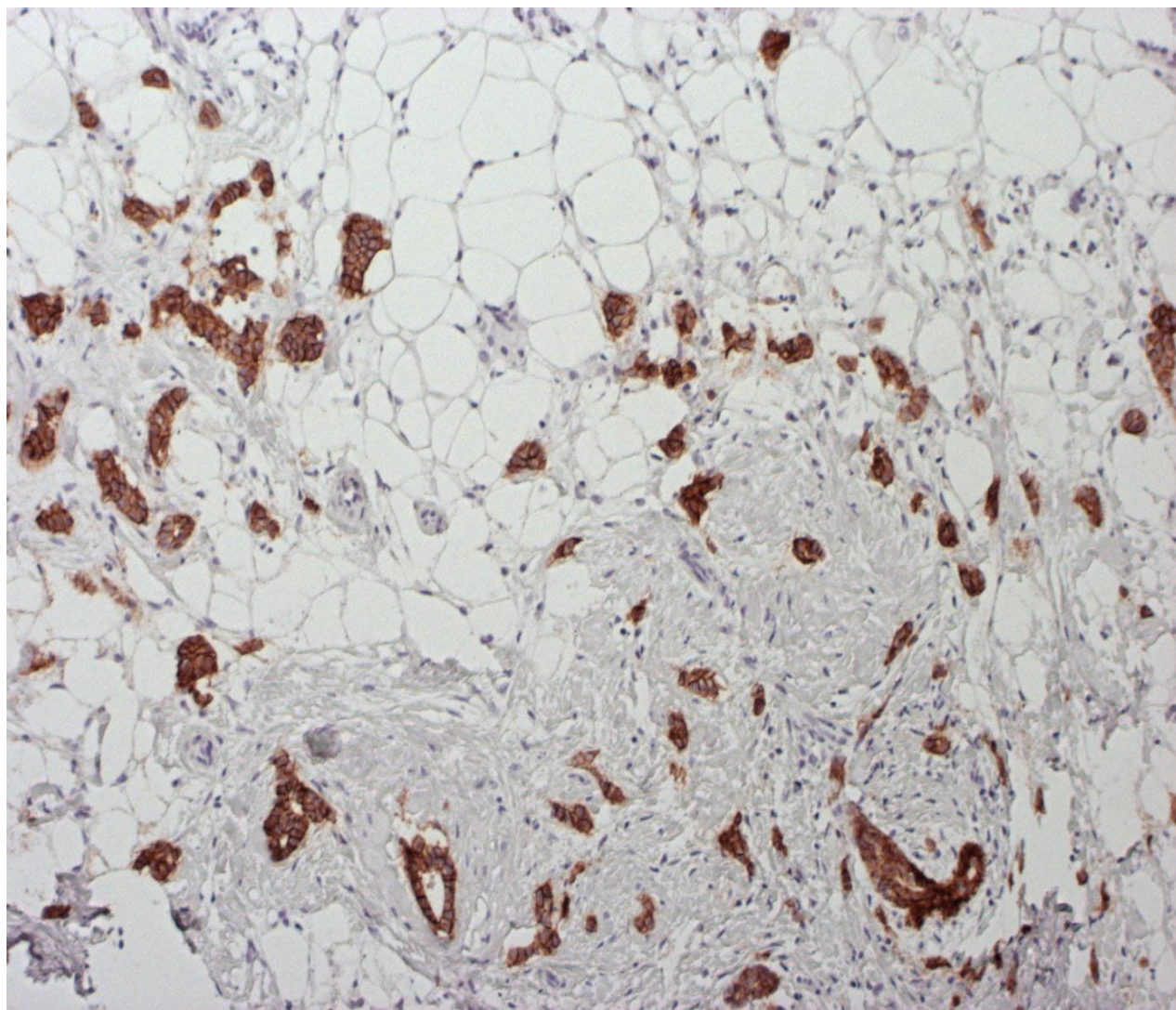
Слика 9. Нормалне епителне ћелије ацинуса и дуктуса. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



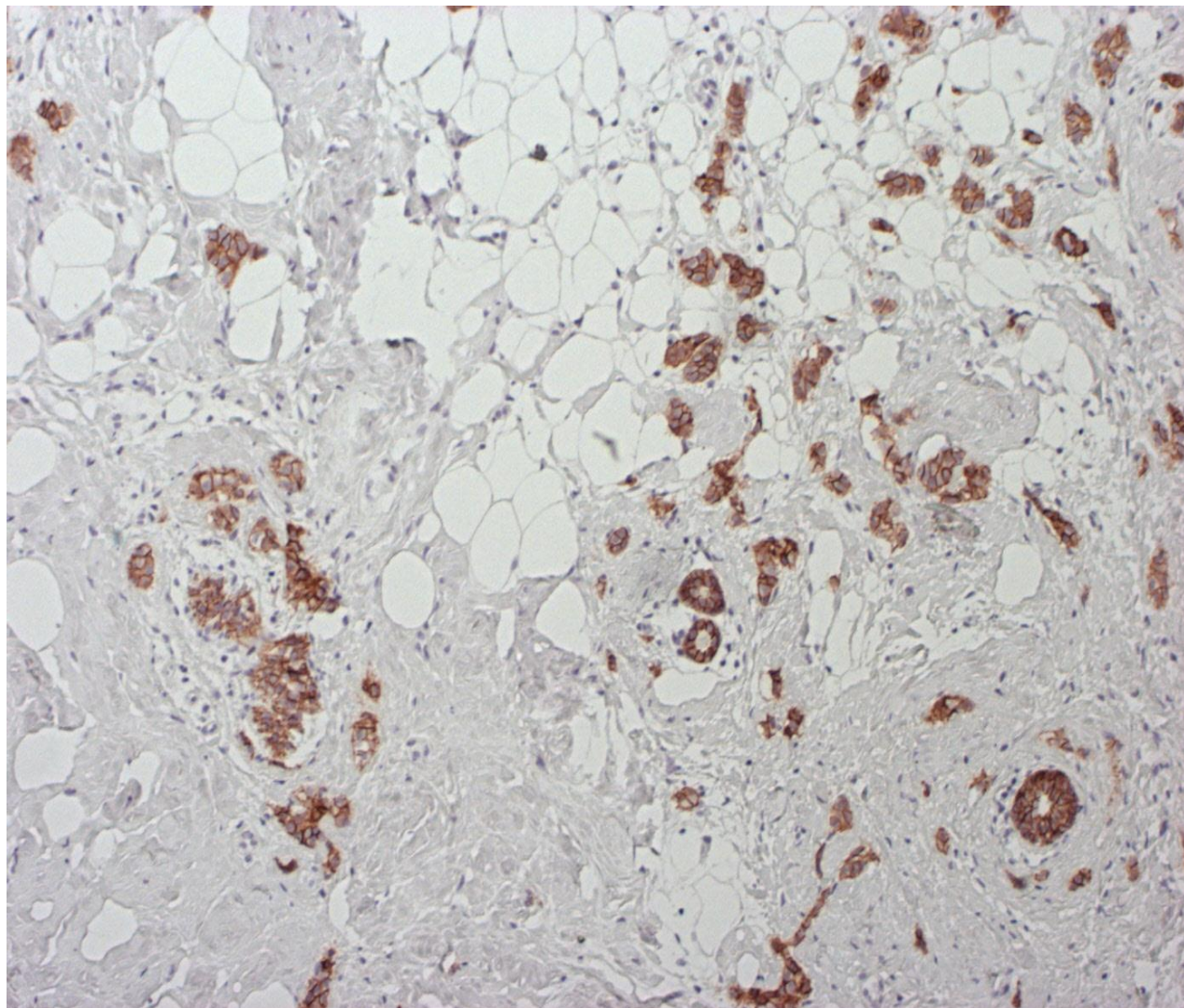
Слика 10. Континуирана мембранска имунопозитивност туморских ћелија које формирају траке и колоне око дуктусних каналића. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увећање x200)



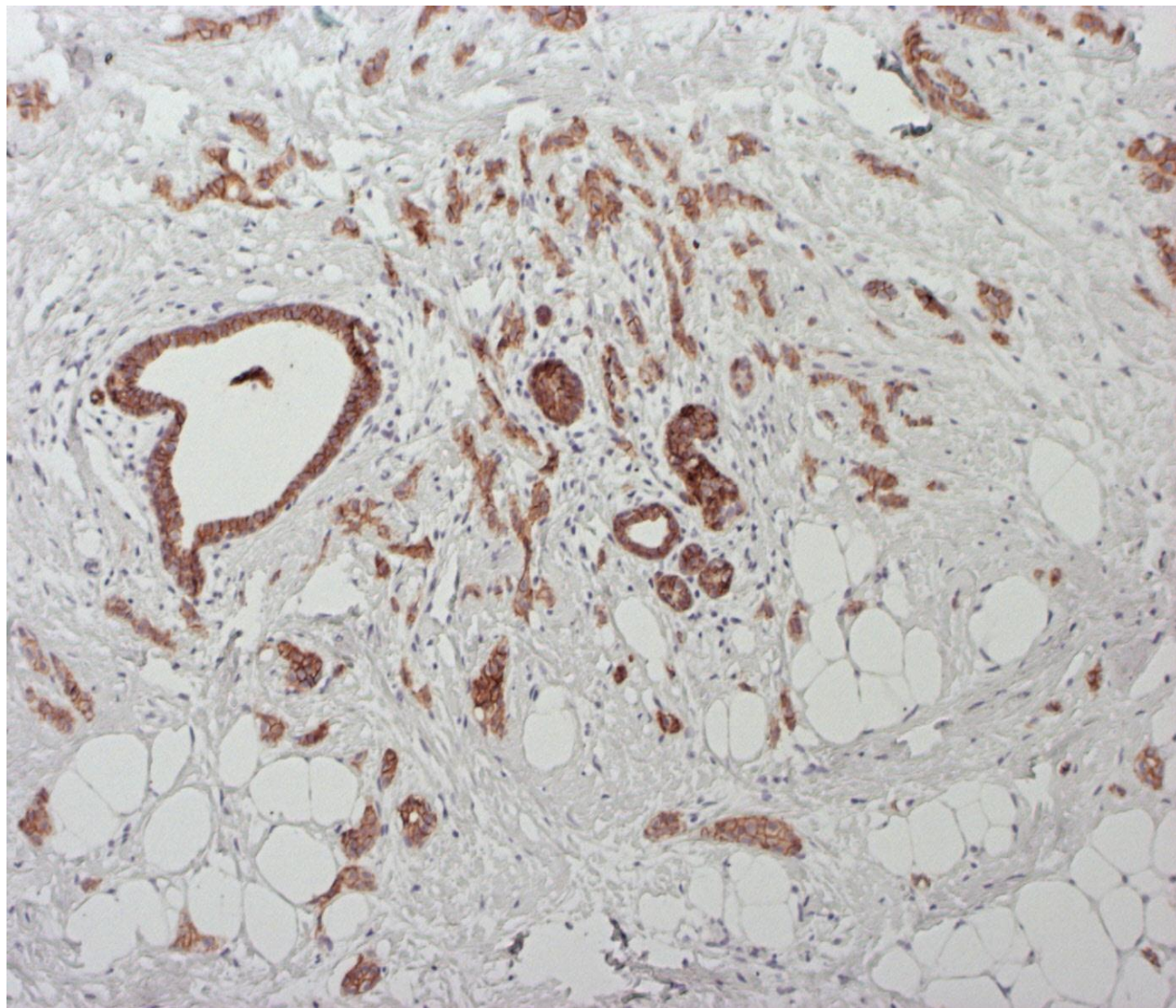
Слика 11. Дисконтинуирана лака до умерена имунопозитивност мембране туморских ћелија које формирају траке и колоне око дилатираних дуктуса. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



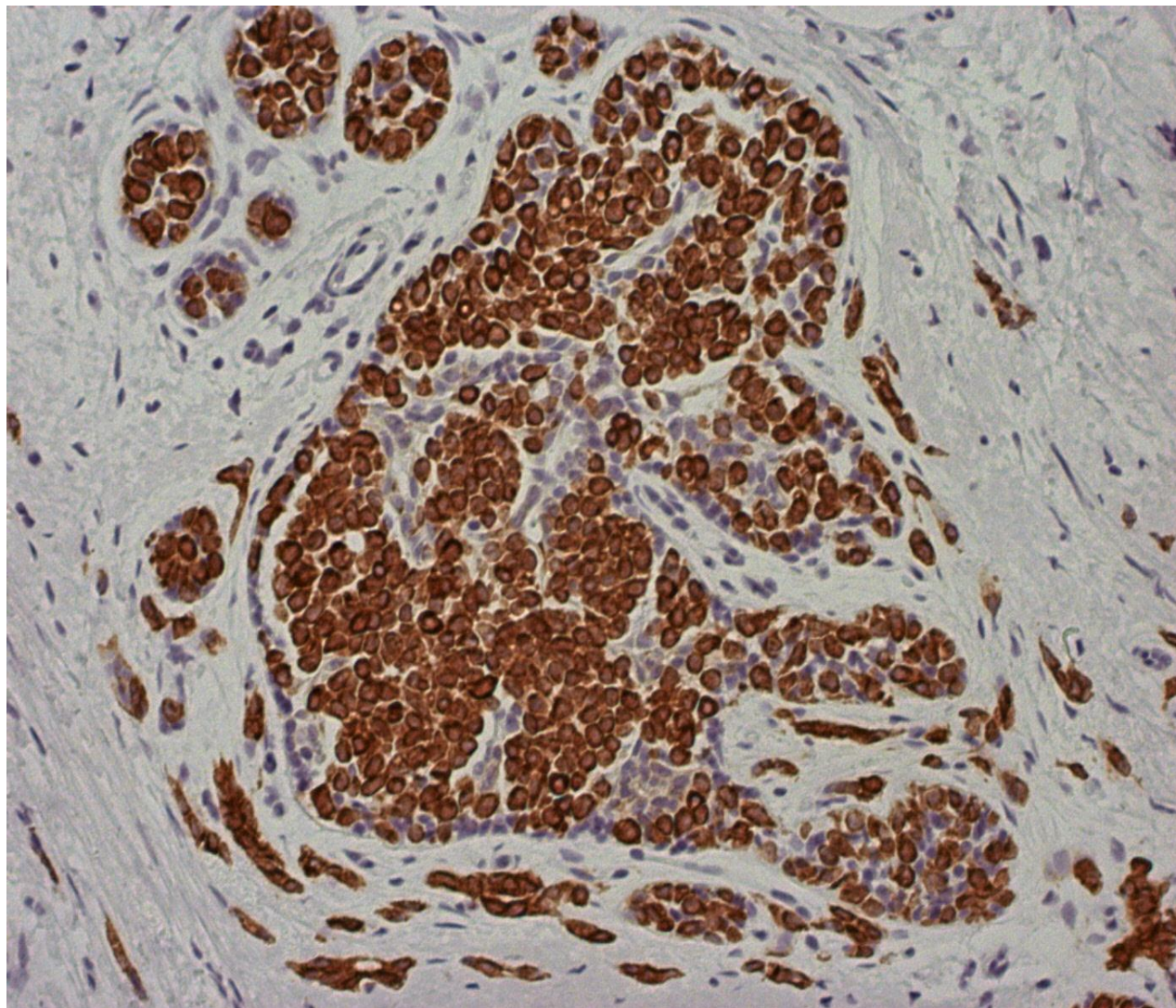
Слика 12. Тубуларне туморске формације чије ћелије показују континуирану мембранску позитивност. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x100)



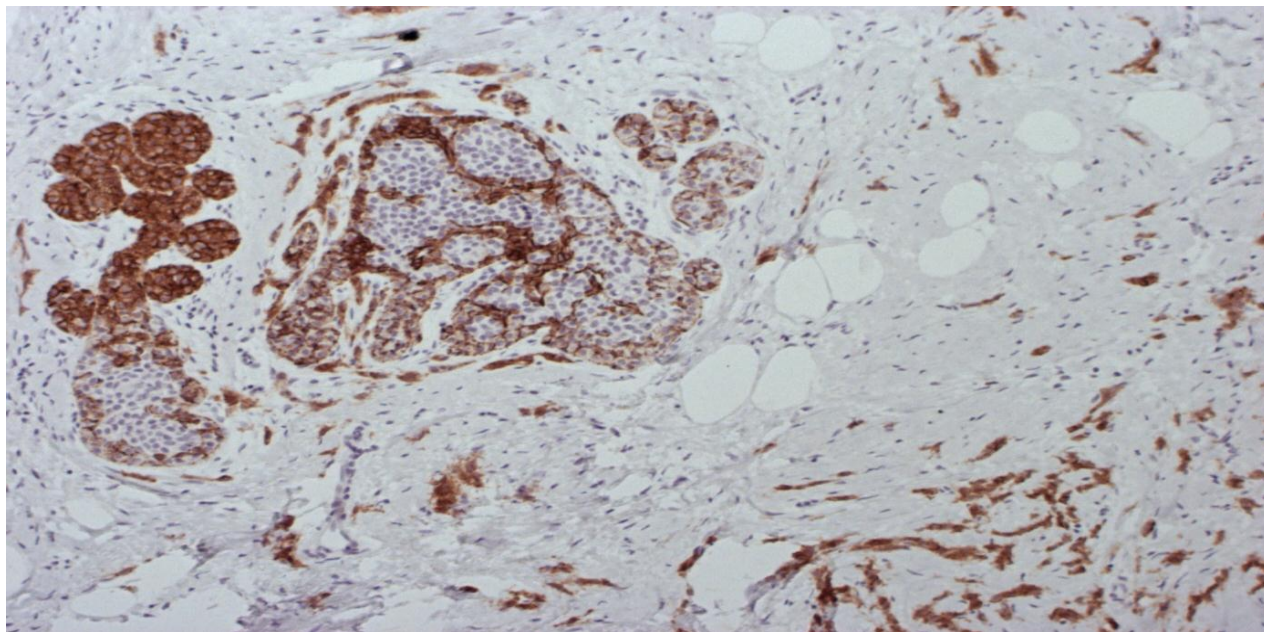
Слика 13. Тубуларне туморске формације чије ћелије показују континуирану мембранску позитивност. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x100)



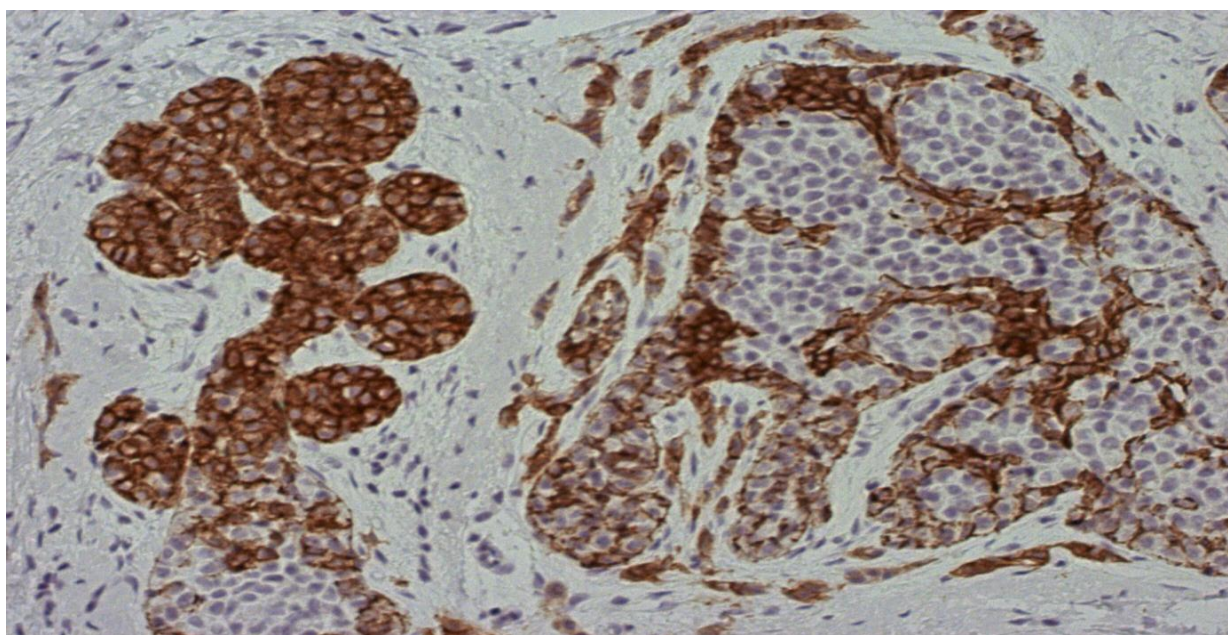
Слика 14. Псеудогландуларне формације, траке и низови чије туморске ћелије показују континуирану мембранску позитивност. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увећање x100)



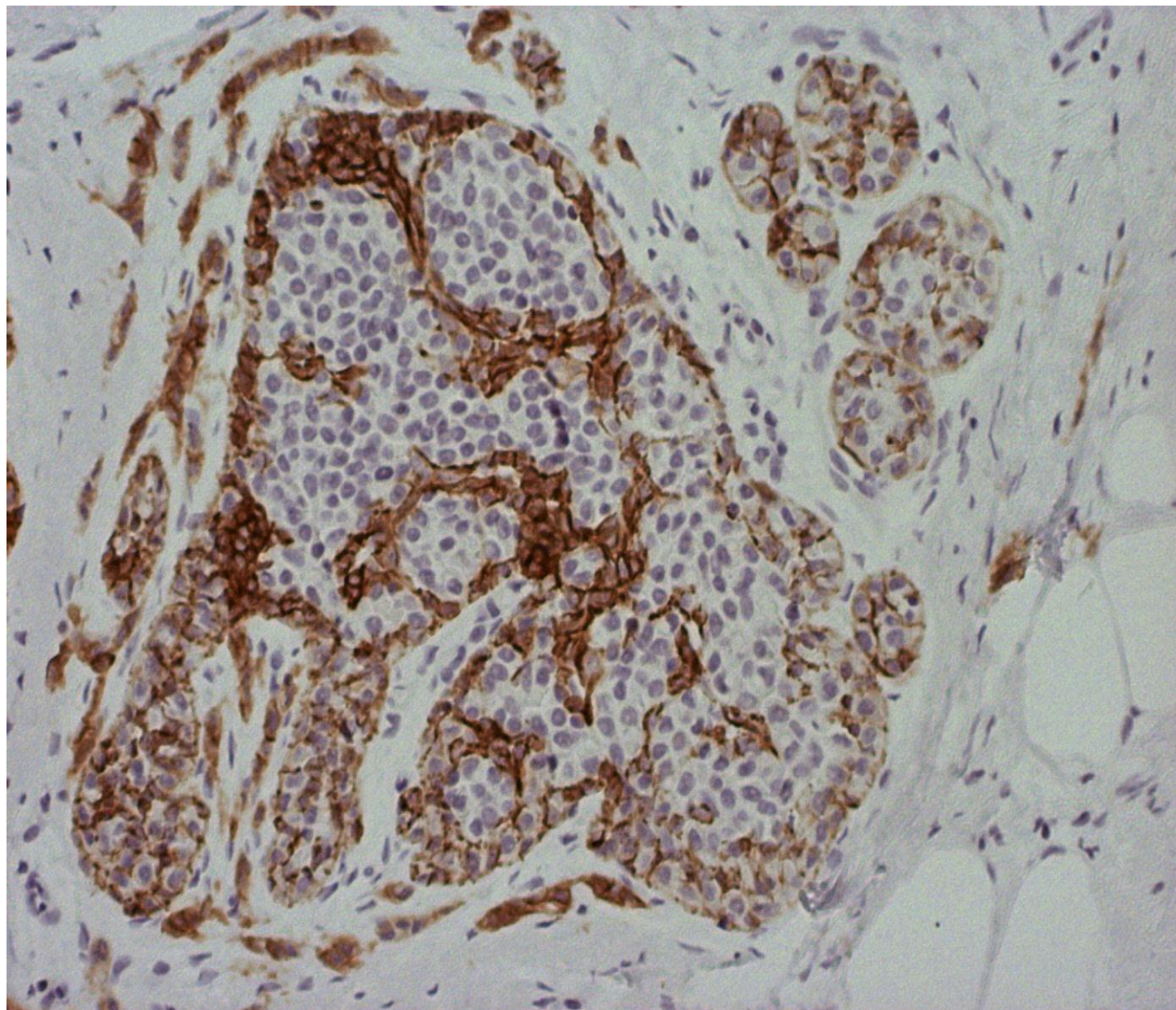
Слика 15. Тракасте туморске формације чије ћелије показују интензивну мембранску позитивност локализоване концентрично око фокуса солидне варијанте дукталног *in situ* карцинома . (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x200)



Слика 16. Имунопозитивност ћелијских трака и низова дукталног карцинома и унутрашња негативна контрола у фокусу лобуларног *in situ* карцинома. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x100)



Слика 17. Изостанак мембранске имунореактивности у фокусима лобуларног *in situ* карцинома и експресија E-cadherina у фокусу дукталног *in situ* карцинома. Између поља *in situ* карцинома присутни су инвазивни тракасти туморски аранжмани. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x400)



Слика 18. Изостанак мембранске имунореактивности у фокусима лобуларног *in situ* карцинома и околни инвазивни тракасти туморски аранжмани. (Имунохистохемијско бојење, E-cadherin, увеличање x400)

5. ДИСКУСИЈА

Мотив за нашу студију је била веома висока инциденца карцинома дојке, њен велики пораст током последњих година, као и веома велика смртност услед ове болести. Процењује се да се у свету сваке године дијагностикује преко 1 600 000 нових случајева са преко 500 000 смртних исхода. Стога је испитивање нових прогностичких маркера од круцијалног значаја (Weng и сар., 2014). Испитивањем нивоа hMGA mRNA у периферној крви пацијената са карциномом дојке долази се до податка о сензитивности од 38,2%, специфичности од 100,0%, позитивној предиктивној вредности (PPV) од 100,0%, и негативној предиктивној вредности (NPV) од 61,8% (Aristizábal-Pachón и сар., 2015). Светска литература последњих година обилује литературом која описује истраживања нивоа мамаглобина у серуму пацијената са карциномом дојке, али је веома мали број студија које су се бавиле анализом нивоа мамаглобина у самом тумору, док је најмање радова који се тичу испитивања нивоа мамаглобина у перитуморском ткиву. Уопште у светској литератури испитивање перитуморског ткива је релативно новијег датума, јер су недавна истраживања потврдила значајну улогу перитуморског ткива у процесима настанка и развоја тумора у којима перитуморско ткиво има веома значајну модулишућу улогу (Lareire и сар., 2014). Наш циљ је био да анализирамо генску и протеинску експресију мамаглобина у узорцима туморског и перитуморског ткива пацијената са раком дојке, даље, да докажемо да испитивани нивои имају предиктивну вредност која може бити од користи клиничарима у избору одговарајућег модалитета онколошког лечења. Такође, успели смо да дефинишемо конкретне вредности ових параметара у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора пацијената са раком дојке који имају прогностичку вредност у процени исхода болести. Циљ модерне онколошке терапије је индивидуализација (персонификација) терапијског режима, који би, како му и само име каже, био оптималан, тј. најбољи могући за конкретног пацијента (Trifiletti и сар, 2017). Ова студија даје допринос истраживању персонализоване терапије у том смислу што анализира потенцијалну корелацију између експресије мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора и одређених клиничко патолошких особина које су карактеристичне за сваког пацијента понаособ. Даље, успели смо да дефинишемо конкретне вредности нивоа мамаглобина (тзв. cut-off вредности) у ткиву тумора и

непосредном окружењу тумора пацијената са карциномом дојке које имају статистички доказану предиктивну вредност када су у питању параметри као што је појава релапса болести, удаљених и лимфонодалних метастаза, што су круцијални прогностички параметри који дефинишу даљи ток и исход болести код ових пацијената (Tseng и сар., 2013).

Према литературним подацима серумске концентрације мамаглобина код пацијената са карциномом дојке су се кретале од 0,07 до 9,6 ng/ml у поређењу са 0 до 0,07 ng/ml код контролне групе здравих особа (Fanger и сар, 2002). Наше истраживање показује да разлика у концентрацији мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву одређеној ELISA тестом није статистички сигнификантна, тј. перитуморско ткиво секретује мамаглобин у готово истој концентрацији као и сам тумор, а што је значајно више од вредности које литературни подаци наводе за здраве особе. Ми смо добили вредности од 2,4 ng/ml до 3,8 ng/ml, што је свакако значајно више од дијапазона 0 до 0,07 ng/ml, који срећемо у серуму здравих особа, што јасно говори у прилог предиктивној вредности одређивања ткивних концентрација мамаглобина ELISA тестом у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора. Још један веома значајан заључак који се из овога може извести је и тврдња да перитуморско ткиво има особине сасвим различите од здравог ткива дојке, јер иако на патохистолошком препарату имају исте особине перитуморско ткиво има другачије молекуларне карактеристике, тј. лучи мамаглобин у знатно вишим концентрацијама од ткива дојке особа које немају карцином, што може имати предиктивну вредност.

Литературни подаци по питању серумске концентрације мамаглобина су често контрадикторни. Тако *Zehentner са сар.* наводи да подаци добијени ELISA тестом на пацијентима у различитим стадијумима карцинома дојке као и здравих особа показују да ниво мамаглобина није завистан од стадијума болести. ROC крива је конструисана за случајеве када је cutoff вредност била 1,71 ng/ml; тест је сматран позитивним када је вредност мамаглобина била изнад наведене вредности (Zehentner и сар, 2004).

За разлику од горе наведених података *Bernstein JL и сар.* наводи да су пацијенти у стадијумима од I до III имали вредности мамаглобина од 0,9 до 1,4 ng/ml док су у стадијуму IV имали чак 2,3 ng/ml. Пронађена је јака позитивна корелација између нивоа мамаглобина и величине тумора; пацијенти са туморима већег дијаметра су имали веће серумске концентрације мамаглобина (Bernstein и сар., 2005). Резултати наше студије су у складу са најновијим подацима који се могу наћи у стручној литератури. Ми смо такође констатовали градацијски пораст нивоа мамаглобина како у ткиву тумора тако и у непосредном окружењу тумора пацијаната са раком дојке са порастом величине тумора. Наши резултати се разликују од поменутих који се тичу серумских концентрација, док смо ми проучавали концентрације мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора тако да смо добили концентрације преко 2,6 ng/ml у стадијуму T1 до 3,8 ng/ml у стадијуму T3. Вредности у перитуморском ткиву су биле незнатно ниже од оних у туморском и кретале су се од 2,4 ng/ml у T1 до 3,6 ng/ml у T3 стадијуму болести. Претрагом доступних база података нисмо нашли слична испитивања која се тичу концентрације мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора са којима би смо могли да направимо поређење, тако да је наша студија прва студија ове врсте.

Наши резултати су показали да постоји градацијски пораст протеинске експресије мамаглобина, како у туморском, тако и у перитуморском ткиву, са порастом вероватноће јављања лимфонодалних метастаза у пазушној јами. Добили смо вредности у опсегу 2,3 ng/ml до 3,7 ng/ml у перитуморском ткиву и 2,6 ng/ml до 3,8 ng/ml у туморском ткиву, када су у питању N0 и N2 стадијуми болести, респективно. Ове разлике су статистички значајне што говори у прилог предиктивном значају одређивања ткивних концентрација мамаглобина у вези са присуством метастатски измењених припадајућих лимфонодуса. Ови закључци се слажу са подацима које смо нашли у литератури. Тако *Liu Y. са сар.* наводе статистички значајно више концентрације мамаглобина код пацијената са позитивним лимфним нодусима у пазушној јами, шта више, што је више нодуса захваћено, виша је и експресија мамаглобина (Liu и сар., 2006).

Средња вредност серумске концентрације мамаглобина код пацијената са метастатским карциномом дојке је била 9,38 ng/ml (7,9 ng/ml у контролној групи здравих

особа); вредност од 8,8 ng/ml cutoff је установљена као граница изнад које су узорци сматрани позитивним. Сензитивност је достигала 68% а специфичност 88,8%. Резултати се могу минимално разликовати јер су у различитим студијама коришћена различита антитела за извођење тестова (Zehentner и сар, 2004). Наше истраживање указује да је средња вредност мамаглобина одређеног протеинском експресијом код пацијаната са метастатском болешћу била у распону од 2,4 ng/ml до 3,75 ng/ml у перитуморском, односно 2,55 ng/ml до 3,8 ng/ml у туморском ткиву. Наше истраживање показује да одређивање протеинске експресије ELISA тестом како у туморском, тако и у перитуморском ткиву има јасну предиктивну вредност када је у питању појава удаљених метастаза код пацијената са карциномом дојке. Отишли смо и корак даље, те смо дефинисали и конкретне cutoff вредности концентрације мамаглобина које са високим степеном вероватноће указују на ризик од појаве удаљених метастаза. Та вредност је за перитуморско ткиво 0,6704221 ng/ml, а за туморско ткиво 0,5784426 ng/ml. Претрагом доступне литературе нисмо нашли податке које смо могли користити за поређење, што говори у прилог актуелности нашег истраживања.

Када је у питању градус тумора наше истраживање је указало на јасан градацијски пораст протеинске експресије мамаглобина, како у туморском тако и у перитуморском ткиву са порастом градуса тумора. Овакав налаз је логичан када се узме у обзир да су тумори вишег градуса лоше диферентовани и биолошки су агресивнији, тако и у овом случају високе концентрације мамаглобина могу указати на склоност ових тумора ка метастазирању у удаљене органе као што је напред наведено, што још једном говори у прилог предиктивној вредности одређивања протеинске експресије мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијената са раком дојке. Слични резултати се могу наћи у малобројним радовима који су анализирали експресију мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке имунохистохемијском методом, док смо ми одређивали протеинску и генску експресију како у карциномском тако и у ткиву из непосредног оружења. *Rehman F. са сар.* су такође приметили пораст концентрације мамаглобина у ткиву карцинома са порастом градуса тумора и величине тумора (Rehman и сар., 2010).

Када је у питању корелација између протеинске експресије мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијената са карциномом дојке и хистолошког типа тумора, наши резултати указују да је експресија виша код дукталног хистолошког типа карцинома, него код лобуларног и осталих ређих типова рака дојке. У литератури се могу наћи различити и контрадикторни резултати. Тако, *Watson u Nunez-Villar* нису нашли статистички значајну разлику у експресији мамаглобина у зависности од хистолошког типа рака дојке (Nunez-Villar и сар., 2003) (Watson и Fleming, 1996). Са друге стране има и студија које су као и наша студија утврдиле повишену протеинску експресију код дукталног карцинома дојке у односу на остале хистолошке типове (Rehman i sar., 2010). Ово је у супротности са студијом спроведеном од стране *Bhargava ca sar.* код којих је инфилтративни лобуларни карцином показивао највишу експресију мамаглобина (Bhargawa и сар., 2007).

Нисмо показали корелацију измеђи хормоског статуса (ER и PR) и HER2 са једне стране и протеинске експресије мамаглобина са друге. У литератури се срећу различити подаци по том питању. Тако да *O'Brien. ca sar.* наводи да је присуство мамаглобина код пацијената са ER и PR позитивним карциномима дојке добар прогностички параметар (O'Brien и сар., 2015).

Guan ca sar. показују да је присуство и генске и протеинске експресије мамаглобина удружено са ER позитивношћу (Guan и сар., 2003).

Нисмо показали добну зависност у експресији мамаглобина код пацијената са карциномом дојке, што су резултати конзистентни са литературним (Liu и сар., 2012).

Закључак који се јасно намеће из наше студије је да се протеинска експресија мамаглобина како у карциномском тако и у ткиву у непосредном окружењу тумора може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке. Дефинисали смо конкретне вредности концентрације мамаглобина како за туморско ткиво, тако и за перитуморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације болести. На тај начин прецизно дефинишемо групу пацијената која је под повишеним ризиком за развој системске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана. За перитуморско ткиво

гранична вредност протеинске експресије мамаглобина одређана ЕЛИСА тестом је 0,6704221 ng/ml, док је за туморско ткиво та вредност 0,5784426 ng/ml.

Поред протеинске експресије у нашој студији је одређивана и генска експресија мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора пацијаната са карциномом дојке и између ових налаза постоје разлике, поготово када је у питању перитуморско ткиво. Резултати добијени генском експресијом свакако показују исте трендове као и они добијени протеинском експресијом, али се квантитативно разликују, што је чињеница која је позната и описана у литератури (O'Brien и сар., 2015). Сличан феномен је примећен и код других врста карцинома. Тако *Chen G са сар.* су показали да само око 21% резултата добијених генским испитивањем корелира са протеинском експресијом када су у питању узорци аденокарцинома плућа (Chen и сар., 2002).

Вероватни разлози су добро познати феномени посттранскрипционе и посттранслационе регулације и модификације, тако да иако је ген експримиран, не мора да значи да ће његов финални продукт-протеин бити функционалан и детектабилан (Wei и сар., 2015). (Vasudevan и сар., 2015).

По питању корелације између генске експресије мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора код пацијаната са карциномом дојке, наша студија показује јасно градацијско, статистички значајно повећање генске експресије мамаглобина са порастом величине тумора. Исти тренд постоји и у туморском и у перитуморском ткиву, мада је у перитуморском ткиву нешто мање изражен. У туморском ткиву вредности концентracије мамаглобина добијене генском експресијом се крећу од 1,5 у Т1 стадијуму до 7,4 у Т3 стадијуму, док су у перитуморском ткиву те вредности знатно ниже и крећу се од 0,9 у Т1 стадијуму до 1,7 у Т3 стадијуму. Резултати су конзистентни са онима добијеним протеинском експресијом и слажу се са онима који се могу наћи у литератури.

Генска експресија мамаглобина показује корелацију са статусом пазушних лимфних нодуса, што је тренд присутан и у случају одређивања протеинске експресије. Апсолутне вредности концентracије мамаглобина одређиване генском експресијом су

статистички значајно ниже у перитуморском него у туморском ткиву и крећу се од 0,1 у N0 до 0,4 у N2 стадијуму болести, док се вредности у туморском ткиву крећу од 1,9 у N0 до 5,6 у N2 стадијуму. Ови наши подаци се слажу са литературним подацима (Zehentner и сар., 2002). *Marchetti A са сар.* наводи да је мамаглобин један од најсензитивнијих и најспецифичнијих маркера за детекцију микрометастаза у лимфним нодусима пазушне јаме (Marchetti и сар., 2001).

Концентрација мамаглобина добијена генском експресијом је статистички значајно повишена код пацијената са присутним метастазама у туморском ткиву, али није повишена у перитуморском ткиву. У перитуморском ткиву она је реда величина око 0,3 у M0 до 0,5 у M1, док се у туморском ткиву те вредности крећу од 2,0 у M0 до 5,5 у M1 стадијуму болести. У 12% случајева M статус није био дефинисан тако да су ови пацијенти изузети из анализе.

Студија спроведена од стране *Span са сар.* је показала да је повишена генска експресија мамаглобина код пацијената са карциномом дојке независно повезана са дужим периодом без релапса болести. Ова корелација је посебно изражена код пацијената који су примали Тамохифен у терапији, што говори о повезаности са хормонским статусом тумора. Стога, генска експресија мамаглобина се може сматрати добрим и прогностички и предиктивним маркером када је у питању карцином дојке (Span и сар., 2004). Са друге стране многи аутори наводе да у својим студијама нису нашли статистички значајну повезаност између нивоа генске експресије мамаглобина и хормонског статуса (Marques и сар., 2009) (Fortunato и сар., 2009).

Наши резултати се слажу са горе наведеним. Супротно наведеним резултатима, група из Кореје је пронашла статистички значајну корелацију између нивоа мамаглобина у периферној крви и ER и PR статуса пацијената, али не и када је HER2 статус у питању (Lee и сар., 2012).

Наша студија указује да је генска експресија израженија у самом карциномском него у ткиву у непосредном окружењу тумора, као и да је статистички значајно виша када

је у питању дуктални у односу на лобуларни и остале хистолошке типове карцинома дојке. Такви налази су кохерентни са литературним (Al Joudi и сар., 2014).

Из наше студије се закључује да се генска експресија мамаглобина само у туморском ткиву може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке, али не и генска експресија у перитуморском ткиву. Дефинисали смо конкретне вредности генске експресије мамаглобина за туморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације. Тако се може диференцирати група болесница под повишеним ризиком за развој метастатске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана. За туморско ткиво гранична вредност генске експресије мамаглобина одређана RT-qPCR је 1.003 за сензитивност 0.73 и специфичност 0.76.

E-Cadherin се према нашем истраживању статистички значајно чешће јавља код пацијената са дукталним типом карцинома дојке у односу на лобуларни тип. Нисмо демонстрирали прогностичку вредност имунохистохемијски одређиваног E-Cadherin-a, као ни корелацију са протеинском концентрацијом и генском експресијом мамаглобина А код пацијената са карциномом дојке. Научне студије указују да је ниска експресија E-Cadherin-a, када је у питању дуктални инвазивни карцином дојке, значајно повезана са лошијом прогнозом у смислу OS (Overall Survival) и DFS (Disease Free Survival) (Li и сар., 2017).

6. ЗАКЉУЧАК

Добијени резултати доводе до следећих закључака:

- Протеинска експресија мамаглобина како у туморском тако и у перитуморском ткиву се може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке
- Дефинисали смо конкретне граничне вредности концентрације мамаглобина како за туморско, тако и за перитуморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације болести.
- За перитуморско ткиво гранична концентрација мамаглобина одређена ЕЛИСА тестом је 0,6704221 ng/ml, док је за туморско ткиво та вредност 0,5784426 ng/ml.
- Генска експресија мамаглобина се може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке само за туморско, али не и за перитуморско ткиво.
- За туморско ткиво гранична вредност генске експресије мамаглобина одређана RT-qPCR је 1.003.
- Анализом мамаглобина у ткиву тумора и непосредном окружењу тумора из веома хетерогене групе пацијената са карциномом дојке дефинишемо оне који су под повишеним ризиком за развој системске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана у циљу превенције развоја системске болести.
- Одређивање ткивних нивоа мамаглобина код пацијената са карциномом дојке може бити корак у индивидуализацији терапије, која ће бити оптимална за сваког пацијента понаособ.
- Хумани мамаглобин представља значајан прогностички маркер развоја системске болести када је у питању рак дојке.

7. СПИСАК СКРАЋЕНИЦА И АКРОНИМА

- hMAG - хумани мамаглобин
- IL8 - интерлеукин 8
- DCIS - дуктални карцином in situ
- ИТС - изоловане туморске ћелије
- BRCA 1, BRCA 2 - Breast Cancer Genes 1 and 2
- ER - рецептор за естроген
- PR - рецептор за прогестерон
- HER 2- (рецептор за хумани епидермални фактор раста 2)
- EMT - епително-мезенхимална транзиција
- BM - базална мембрана
- PCR - polymerase chain reaction
- MAM, MGB, UGB3, MMG, SCGB2A1 - скраћенице за мамаглобин
- DNK - дезоксирибонуклеинска киселина
- RKN - рибонуклеинска киселина
- BLC - Basel- like carcinom
- Sentinel lymph node, SLN - стражарски лимфни чвор
- Tc99m - технецијум 99 ,радиоактивни колоид
- CMF - Циклофосфамид, метотрексат, 5-флуоурацил
- AJCC - American Joint Committee on Cancer
- Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction
- ПТ - перитуморско ткиво
- КТ - карциномско ткиво
- PPV – (+) прогностичка вредност
- NPV – (-) прогностичка вредност

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Al Joudi FS. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res.* 2014;139(5):675-85.
2. Albert JM, Buzdar AU, Guzman R, Allen PK, Strom EA, Perkins GH, et al. Prospective randomized trial of 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide (FAC) versus paclitaxel and FAC (TFAC) in patients with operable breast cancer: impact of taxane chemotherapy on locoregional control. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 128(2):421-7.
3. Alken S, Kelly CM. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2013; 5:357-365.
4. 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.
5. Aristizábal-Pachón AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2015; 27(4):217-22.
6. Bellone S, et al. Mammaglobin B (SCGB2A1) is a novel tumour antigen highly differentially expressed in all major histological types of ovarian cancer: implications for ovarian cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2013; 109(2): 462–471.
7. Bendrik C, Dabrosin C. Estradiol increases IL-8 secretion of normal human breast tissue and breast cancer in vivo. *J Immunol* 2009; 182:371-8.
8. Beriwal S, Rungruang B, Soran A, Thull D, Kelley JL, Bhargava R, Lin CJ, Sukumvanich P. Comparison of Locoregional Recurrence with Mastectomy vs. Breast Conserving Surgery Associated Breast Cancer (PABC). *Cancers (Basel).* 2009 ;1(1):12-20.
9. Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA, et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:6528–35.

10. Bhargawa R, Berival S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohisto-logic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:103-13.
11. Brandt S, Chen YB, Chadwick P, Shin SJ. Is P120 as effective a E-cadherin (Ecad) in distinguishing lobular (L) from ductal (D) carcinomas of the breast? *Mod Pathol* 2008; 21(suppl 1):24A.
12. Burdette-Radoux S, Muss HB. Optimizing the use of anthracyclines in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2003; 4(4):264-72.
13. 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): 7 - 23.
14. Carlson GW, Bostwick J 3rd, Styblo TM, Moore B, Bried JT, Murray DR, Wood WC. Skin-sparing mastectomy. Oncologic and reconstructive considerations. *Ann Surg*. 1997 May;225(5):570-5
15. Carter D, Douglass JF, Cornellison CD, Retter MW, Johnson JC, Bennington AA, et al. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry* 2002; 41: 6714-22.
16. Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer*. 2002; 563–572.
17. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardina SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 304–13.
18. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606–16.
19. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hannekens C, Rosner B, Speicer FE. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1999; 332: 1589-1593.
20. Collins CD. The sentinel node in breast cancer: an update. *Cancer Imaging*. 2005 Nov 23;5 Spec No A: 3-9
21. Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010

- patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987;5(9):1378-86.
22. Cutuli B. Radiotherapy for breast cancer: which strategy in 2012? *Cancer Radiother.* 2012; 16(5-6):493-502.
 23. Dabbs DJ, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of P120 catenin. *Amer J Surg Pathol* 2007; 31:427–437.
 24. Dabbs DJ, Kaplai M, Chivukula M, et al. The spectrum of morphomolecular abnormalities of the E-cadherin/catenin complex in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Applied immunohistochemistry and molecular morphology* 2007; 15:260–266.
 25. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Save- Soderbergh J, Holloway L, Russell I, et al. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1996;58(12):2662-70.
 26. De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997; 183:404–411.
 27. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1652-8.
 28. Driul L, Bernardi S, Bertozzi S, Schiavon M, Londero AP, Petri R. New surgical trends in breast cancer treatment: conservative interventions and oncoplastic breast surgery. *Minerva Ginecol.* 2013 Jun;65(3):289-96.
 29. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1995; 312: 146-151.
 30. Džodić R, Nešković Konstantinović Z, Gudurić B. *Rak dojke. Zavod za udžbenike, Beograd; 2014. pp. 53-57.*
 31. Edge B, Byrd R, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.*
 32. Elston CW, Ellis IO, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast. London: Churchill Livingstone; 1998.p.385-433.*

33. Fanger GR, Houghton RL, Retter MW, Hendrickson RC, Babcook J, Dillon DC, et al. Detection of mammaglobin in the sera of patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2002; 23:212–21.
34. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71(8):2507-14.
35. Fisher ER, Constantino J, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer.* 1993; 71:41-50.
36. Fitzal F, Mittlboeck M, Trischler H, Krois W, Nehrer G, Deutinger M, Jakesz R, Gnant M. Breast-conserving therapy for centrally located breast cancer. *Ann Surg.* 2008 Mar;247(3):470-6.
37. Fodor J, Mózsai E, Zaka Z, Polgár C, Major T. [Local relapse in young (40 years) women with breast cancer after mastectomy or breast conserving surgery: 15-year results]. *Magy Onkol.* 2005;49(3):203, 205-8.
38. Fortunato L, Mascaro A, Baldi A, Farina M, Cortese G, Ventrone MA, et al. Positive bone marrow biopsy is associated with a decreased disease-free survival in patients with operable breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2009;16 (11): 3010–3019.
39. Garcia-Casado Z, Romero I, Fernandez-Serra A, Rubio L, Llopis F, Garcia A et al. A de novo complete BRCA1 gene deletion identified in a Spanish woman with early bilateral breast cancer. *BMC Med Genet* 2011; 12:134.
40. Geyer C, Rodrigues N, Weigelt B, Reis-Filho S. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol.* 2012; 19:39–53.
41. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M i saradnici. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* 2010; 120:485-97.
42. Grann VR, et al. Decision analysis of prophylactic mastectomy in BRCA 1- positive or BRCA 2- positive patients. *J clin Oncol* 1998; 16: 979-985.
43. Guan XF, Hamedani MK, Adeyinka A, Walker C, Kemp A, Murphy LC, Watson PH, Leygue E. Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors. *Endocrine* 2003; 21: 245–50.

44. Halsted WS. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg.* 1907 Jul;46(1):1-19.
45. Harigopal M, Shin SJ, Murray MP, et al. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005; 3:73–83.
46. Harissis HV, Ziogas D, Baltogiannis G. Mastectomy vs breast-conserving surgery: an old dilemma comes again for early breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(7):1966-7.
47. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000; 21:427–433.
48. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 11: 883-887.
49. Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer.* 2016; 8:25-42.
50. Joensuu H, Gligorov J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann Oncol.* 2012; (6): 40-5.
51. Keshgegian A, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol.* 1995;104(1):42–9.
52. Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomark Cancer.* 2013; 5:61–70.
53. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann NY Acad Sci* 2000; 923: 348-54.
54. Kollias J, Ellias I. O, Elston I. O, Blamey R.W. Clinical and histological predictors of contralateral breast cancer. *EJSO* 2000; 25: 584-589.
55. Koren S, Bentires-Alj M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Mol Cell.* 2015;60(4):537-46.
56. Lagha A, Chraiet N, Labidi S, Krimi S, Ayadi M, Gligorov J, Boussen H. [Impact of taxanes in the adjuvant setting of node-negative breast cancers]. *Bull Cancer.* 2013;100(5):465-71.
57. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet* 2012; 82:105-114.

58. Lapeire L, Hendrix A, Lambein K, Van Bockstal M, Braems G, Van Den Broecke R, et al. Cancer-Associated Adipose Tissue Promotes Breast Cancer Progression by Paracrine Oncostatin M and Jak/STAT3 Signaling. *Cancer Res.* 2014; (74) (23): 6806-6819.
59. 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.
60. Le M. Pilule et cancer du sein. *Contr Fert Sex* 1999 ; 18: 399-408.
61. Lee GW, Kim JY, Koh EH, Kang D, Choi DS, Maeng KY, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*, 2012; 11 (4): 4034–4042.
62. Leung K. VivoTag-S 680-anti-human mammaglobin-A monoclonal antibody. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-13.
63. Lewis GH, Subhawong AP, Nassar H, Vang R, Illei PB, Park BH, et al. Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease uid protein 15 and mammaglobin. *Am J Clin Pathol* 2011; 135 :587-91.
64. Li G, Zhang J, Jin K, He K, Wang H, Lu H, Teng L. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med.* 2011;5(2):249-60.
65. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters.* 2017;14(5):5865-5870.
66. Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(10):16445-16455.
67. Lifrange E, Andre C, Bleret V, Collignon J, Coucke P, Cusumano P, et al. Hormone therapy for breast cancer. *Rev Med Liege.* 201; 66(5-6): 367-71.
68. Lim E, Winer EP. Adjuvant chemotherapy in luminal breast cancers. *Breast.* 2011; 20 (3): 128-31.
69. Liu Y, Ma L, Liu X, Wang L. Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Exp Ther Med.* 2012;3(3):550-554.

70. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 2002; 24: 885–893.
71. Madden JL, Kandalaft S, Bourque RA. Modified radical mastectomy. *Ann Surg.* 1972; 175(5):624-34.
72. Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22: 24-30.
73. Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, Viacava P, Naccarato A, Bonadio A, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol* 2001; 195: 186–90.
74. 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
75. Marques AR, Teixeira E, Diamond J, Correia H, Santos S, Neto L, et al. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. *Breast Cancer Res Treat*, 2009; 114 (2): 223–232.
76. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(3):174-91.
77. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1997; 39 (6): 2934-47.
78. Merkel DE, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1989; 3(4):641-52.
79. Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, Gillanders WE, Hoda R, Schutte del H, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study. *BMC Cancer* 2008; 8:55.
80. Nagaraj G, Ma CX. Adjuvant chemotherapy decisions in clinical practice for early-stage node-negative, estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer: challenges and considerations. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(3):246-50.
81. Newman S. C., Miller A.B., Howe G. R. A Study of the effect of weight and dietary fat on survival time. *Am J Epidemiol* 1996; 123: 767.

82. Ni J, Kalf-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 25-42.
83. Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 65-70.
84. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Mammaglobin: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem*. 2012; 48(8): 1362-4.
85. O'Brien N, O'Donovan N, Foley D, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Use of a panel of novel genes for differentiating breast cancer from non-breast tissues. *Tumour Biol* 2007; 28: 312-7.
86. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer* 2005; 114:623-7.
87. O'Brien, N. A., O'Donovan, N., Ryan, B., Hill, A. D.K., McDermott, E., O'Higgins, N. and Duffy, M. J. Mammaglobin a in breast cancer: Existence of multiple molecular forms. *Int. J. Cancer* 2015; 114: 623–627.
88. Osborne MP. Breast anatomy and development. Lippman ME, Morrow M, Osborne CK Harris JR. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, str. 1-35.
89. Prati R, Apple S K, He J, Gornbein J A, Chanh H R. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J*. 2005;11(6):433-9.
90. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:11.
91. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, et al. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:377–385.
92. Raica M, Cîmpean AM, Meche A, Alexa A, Suciuc C, Mureşan A. Analysis of the immunohistochemical expression of mammaglobin A in primary breast carcinoma and lymph node metastasis. *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50: 341-7.

93. Rehman F, Nagi A H, Hussain M. Immunohistochemical expression and correlation of mammaglobin with the grading system of breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53:619-23.
94. Reyes C, Gomez-Fernández C, Nadji M. Metaplastic and medullary mammary carcinomas do not express mammaglobin. *Am J Clin Pathol.* 2012;137(5):747-52.
95. Rosen P. Anatomy and physiologic morphology. *Rosen's Breast Pathology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1-21.
96. Saez S, Cheix F, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breastcancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3(4):345-53.
97. Salomon Đ, Clarc M, Wong G, Levin J, Ullrich A, McGuire L. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235:177-82.
98. Scarff RW., Torloni H. Histological typing of breast tumours. *International Histological Classification of Tumours, No 2 WHO* 1998.
99. Schneebaum S, Stadler J, Cohen M, Yaniv D, Baron J, Skornick Y. Gamma probe-guided sentinel node biopsy--optimal timing for injection. *Eur J Surg Oncol.* 1998; 24(6):515-9.
100. Schnitt S. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 30:22-26.
101. Shek LL, Godolphin W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Rec* 1998; 48(19):5565-9.
102. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.
103. Silva Al, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JI. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002;13: 422-9.
104. Silverstein MJ. Recent advances: diagnosis and tretment of early breast cancer. *BMJ* 1997; 314: 1736.

105. Sjödin A, Ijuslinder I, Henriksson R, Hedman H. Mammaglobin and lipophilin B expression in breast tumors and their lack of effect on breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res* 2008; 28: 1493-8.
106. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360:790-800.
107. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol* 2004; 22: 691-8.
108. Sun B, Song ST, Jiang ZF, Wang T, Zhang SH, Meng XY, et al. Analysis of the factors affecting pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013;35(1):38-42.
109. Swartz MA and Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis, *Microsc Res Tech*. 2001; 55: 92–99.
110. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
111. Tan AR, Swain SM. Ongoing adjuvant trials with herceptin in breast cancer. *Semin Oncol*. 2003; 30(5):54-64.
112. Tavassoli FA, Devilee P. World health organisation classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs. France: IARC Press; 2003.
113. Tichy JR, Lim E, Anders CK. Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(9):1060-9.
114. TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition. *Pathologie*. 2010;31(5):361-6.
115. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):60.
116. Tot T, Tabar L, Dean P. *Practical Breast Pathology*. 1st ed. Thieme: Medical Publishers; 2002.
117. Trifiletti DM, Sturz VN, Showalter TN, Lobo JM. Towards decision-making using individualized risk estimates for personalized medicine: A systematic review of ge-

- nostic classifiers of solid tumors. PLoS ONE. 2017; 12(5): e0176388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176388>
118. Tseng LM, Hsu NC, Chen SC, Lu YS, Lin CH, Chang DY, et al. Distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(3):290-4.
 119. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S (2013) 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus. *Breast Care* 03/2013.
 120. Valenzuela M, Julian TB. Neo-adjuvant hormonal therapy. *Breast J*. 2008; 14(3):279-83.
 121. Van Rijk MC, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJ, Hoefnagel CA, Kroon BB. Non-axillary breast cancer recurrences after sentinel node biopsy. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15;92(4):292-8.
 122. Vasudevan D, Hickok JR, Bovee RC, et al. Nitric oxide regulates gene expression in cancers by controlling histone posttranslational modifications. *Cancer research*. 2015;75(24):5299-5308.
 123. Vergara-Fernández O, Cortés-González R, Medina-Franco H. Validation of sentinel node in breast cancer]. *Rev Invest Clin*. 2004 May-Jun;56(3):309-13.
 124. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome11q13. *Oncogene* 1998; 16: 817-24.
 125. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 3028-31.
 126. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4598-602.
 127. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996; 56:860–865.

128. Wei C, Luo Q, Sun X, et al. microRNA-497 induces cell apoptosis by negatively regulating Bcl-2 protein expression at the posttranscriptional level in human breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(7):7729-7739.
129. Weng B, Wang Q, Lin S, Lu Y. Nasal cavity metastasis of breast cancer: a case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (10): 7028–7033.
130. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010; 11:174–83.
131. Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knüchel R, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer*. 2006; 6:88.
132. Zambrano J, Yeh ES. Autophagy and Apoptotic Crosstalk: Mechanism of Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer*. 2016; 10:13-23.
133. Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002; 48: 1225–31.
134. Zehentner BK, Persing DH, Deme A, Toure P, Hawes SE, Brooks L, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem*. 2004; 50:2069–76.
135. Ariyan S. Prophylactic mastectomy for precancerous and high-risk lesions of the breast. *Can J Surg* 1995; 28: 262-265.

БИОГРАФИЈА

Др Бојан З. Милошевић, спец. опште хирургије, рођен је 11.07.1976. године у Крагујевцу. Основну школу и гимназију завршио је у Крагујевцу са одличним успехом. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписао је школске 1995/96. године, а дипломирао је школске 2001/02. године са просечном оценом 8,40 након шест година студирања. 2003. године завршио је школу Резервних Официра - Санитетске Службе ВМА. Одмах по дипломирању започео је стаж и уписао последипломске студије из Ургентне хирургије. Завршио је стаж и положио је стручни испит. Магистарску тезу под називом: „Процена значаја појединих фактора у настајању, развоју и прогнози акутног билијарног перитонитиса“ одбранио је 07. 07. 2006. године пред комисијом којом је председавао академик проф. др Александар Димитријевић и тиме стекао академско звање магистар медицинских наука. Уписао је трећу годину Докторских академских студија, на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија. Докторску дисертацију под називом: „Експресија мамаглобина у ткиву као предиктора агресивности тумора дојке“ пријавио је 14.04.2016. године. На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу 13.09.2016. године дата је сагласност за израду теме докторске дисертације и именован ментор, проф. др Драган Чановић. На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу 04.04.2018. године уместо сада покојног проф. др Драгана Чановића за ментора је именован проф. др Срђан Нинковић (број одлуке IV- 03-247/53). Запослен је од 2006. године у Клиничком центру у Крагујевцу, Клиника за хирургију. Октобра месеца 2008. године започео је специјализацију из опште хирургије на Медицинском факултету Универзитета у Београду. Положио је специјалистички испит из опште хирургије дана 27.01.2014. године са одличним успехом, чиме је стекао стручни назив специјалисте опште хирургије. Члан је Српског лекарског друштва, Српског Панкреасног Клуба, Eurorean Pancreatic Club, Удружења ендоскопских хирурга Србије и Европске асоцијацијације ендоскопске хирургије. Активно учествује од 2006. године у научно - истраживачком раду и извођењу практичне наставе на предмету Хирургија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, као и у организацији рада хируршке катедре. Одлуком Наставно – научног већа, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, мр сци. др Бојан З.

Милошевић, специјалиста опште хирургије, изабран је за асистента за ужу научну област Хирургија. Једногласном одлуком чланова Катедре за хирургију изабран је за секретара хируршке катедре. Учесник је пројекта Министарства науке Републике Србије III 41010: "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци" - учествује као истраживач, у пројектном циклусу 2011-2019. Говори енглески и немачки језик, познаје рад на рачунару.

БИБЛИОГРАФИЈА

Др Бојан З. Милошевић, специјалиста опште хирургије, активно учествује у научно-истраживачком раду. Објавио је до сада **15 радова** у часописима међународног значаја на **SCI листи**, остварио је укупно **64 бода** и сума импакт фактор- **10, 447**, остварио је више учешћа на скуповима међународног (**категорија М30**) значаја и објавио је више радова у часописима националног значаја (**категорија М50**).

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија М20)

1. Cvetkovic A, Markovic R, **Milosevic B**. Choledochal cyst Presentation of the disease with a case report. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2011; 11 (3): 194 – 196. **М 23**
2. Ninkovic S, Ninkovic V, Cvetkovic A, Cvetkovic D, Nedovic J and **Milosevic B**. Multifocal and multicentric breast cancer: is breast conserving surgery acceptable? J BUON. 2012; 17(1): 38-45. **М 23**
3. Nedovic J, Protrka Z, Ninkovic S, Mitrovic S, Vojinovic R, Glisic J, Filipovic Markovic B, **Milosevic B**, Peulic M, Cvetkovic A. Cisplatin monotherapy with concurrent radiotherapy versus combination of cisplatin and 5-fluorouracil chemotherapy with concurrent radiotherapy in patients with locoregionally advanced cervical carcinoma. J BUON. 2012; 17 (4): 740-745. **М 23**
4. Savic DM, Stojanovic ND, Stankovi VD, Stojkovic AK, Canovic DS, Ninkovic SM, **Milosevic BZ**, Cvetkovic AM. Subcutaneous fat necrosis in newborns. Med Glas Ljek komore Zenicko-doboj kantona. 2012; 9(2):429-431. **М 23**
5. Radovanovic D, Matovic Z, Canovic D, Cvetkovic A, Spasic M, **Milosevic B**, Pavlovic M, Vojinovic R, Stankovic V, Jevdjic J. Multiple esophageal cancer and balloon dilatation of late postoperative stenosis. HealthMed. 2012; 6(9): 3169-3173. **М 23**
6. Pesovic JP, **Milosevic BZ**, Canovic DS, Cvetkovic AM, Milosavljevic MZ, Jevdjic JD, Pavlovic MD, Petrovic MD. Cancer of ectopic parathyroid gland presentation of the disease with a case report. Int J Clin Exp Med. 2013; 6(3):227-230 **М 23**
7. **Milosevic B**, Markovic R, Cvetkovic A. Solid and Cystic Pseudopapillary Tumor of the Pancreas: A Case Report. Srp. Arh. Celok. Lek. 2013; 141(5-6): 392- 394. **М 23**

8. Ognjanovic N, Jeremic D, Zivanovic-Macuzic I, Sazdanovic M, Sazdanovic P, Tanaskovic I, Jovanovic J, Popovic R, Vojinovic R, **Milosevic B**, Milosavljevic M, Stojadinovic D, Toševski J, Vulović M. MDCT angiography of anatomical variation of the coeliac trunk and superior mesenteric artery. ArchBiol Sci. 2014; 66(1): 233-240. **M 23**
9. Ninkovic SM, Ninkovic VM, Nedovic JR, Miljkovic J, Milovanovic A, Jevtic M, Cvetkovic AM, **Milosevic BZ**. Breast conserving surgery in multifocal breast cancer. BREAST. 2015; 24: 149-150. **M 21**
10. **Milosevic B**, Milisavljevic S, Doncic N, Arsenijevic M, Mrvic S, Stojkovic D, Maric N and Spasic M. Flail Chest in a Polytraumatized patient: Management and Treatment – Case report. Vojnosanit Pregl. 2016; doi:10.2298/VSP151207097M **M 23**
11. Spasic M, Arsenijevic M, Doncic N, Mrvic S, Stojkovic D, **Milosevic B** and Milisavljevic S. A Rare Case of Traumatic Chylothorax after Blunt Thoracic Trauma: Case Report. Srp Arh za cel lek. 2017; 145(1-2). **M23**
12. Zivanovic-Macuzic I, Vulovic M, Vojinovic R, Jovanovic M, Radunovic A, Milev B, Cvetkovic A, Stojiljkovic M, **Milosevic B**, Ivosevic A, Aksic M, Simovic A and Jeremic D. The Böhler's Angle in Population of Central Serbia - A Radiological Study. Vojnosanit Pregl. 2017; doi:10.2298/VSP160419209Z **M23**
13. Pavlovic M, **Milosevic B**, Radovanovic D, Cvetkovic A, Canovic D, Mitrovic S, Jovanovic M, Spasic M, Vulovic M, Stojanovic B, Jeremic D and Jevdjic J. Malignant Fibrous Histiocytoma of the Right Upper Leg – case report. Vojnosanit Pregl. 2016; DOI: 10.2298/VSP160512237P **M23**
14. Vulovic M, Zivanovic-Macuzic I, Jeremic D, Djonovic N, Radunovic A, Jovanovic M, **Milosevic B**, Aleksic Z, Stankovic I, Vojinovic R. MDCT estimation of prevalence and anatomic characteristics of sternal body foramen in population of central Serbia. Vojnosanit Pregl. 2017; doi: 10.2298/VSP170321084V **M23**
15. **Milosevic B**, Cvetkovic A, Ninkovic S, Markovic S, Mitrovic S, Stojanovic B, Radunovic A, Vulovic M and Cvetkovic D. Mammaglobin expression in tissue as a predictor of breast carcinoma aggressiveness. Vojnosanit Pregl 2019. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP190129046M>. **M23**

Зборници међународних научних скупова (категорија М30)

1. Markovic R, Bogojevic R, Spasic M, Milosevic **B**, Cvetkovic A, Markovic N. Surgical treatment of the pancreatic head cancer – our experience. 10th Congress European-African Hepato Pancreatico Biliary Association (E-AHPBA), 29th-31th May 2013, Belgrade, Serbia. P360 **M34**
2. Markovic R, **Milosevic B**, Cvetkovic A, Markovic N, Stankovic V, Spasic M. Synchronous cancer of right colon and left kidney: Report of a case. 9th Biannual International Symposium of Coloproctology, 9th-11th October 2014, Belgrade, Serbia. P-2 **M34**
3. Cvetkovic MD, Cvetkovic MA, **Milosevic BZ**, Ninkovic MS, Milutinovic GM, Nikodijevic DD, Jovankic VJ and Markovic DS. The role of molecular mechanisms of neoangiogenesis as tumor markers in the treatment individualization of breast cancer patients. 3rd Congress of the Serbian Association for Cancer Research with international participation "Challenges in anticancer research: translation of knowledge to improve diagnosis and treatment". Belgrade, 6-7th October 2017. page 49-50. **M34**

Часописи националног значаја (категорија М50)

1. Milisavljevic S, Spasic M, **Milosevic B**. Pneumothorax-diagnosis and treatment. Sanamed. 2015; 10(3): 221–228. **M 52**
2. Radovanovic D, Pavlovic M, Canovic D, Lazic D, Cvetkovic A, Spasic M, Stojanovic B, and **Milosevic B**. The Collis procedure and the acquired short esophagus. Ser J Exp Clin Res. 2016; doi: 10. 1515/SJECR-2016-0078 **M51**
3. Canovic D, **Milosevic B**, Lazic D, Cvetkovic A, Spasic M, Stojanovic B, Mitrovic S, Pavlovic M. Esophageal mobilization in the treatment of short esophagus. Ser J Exp Clin Res 2016; doi: 10. 1515/SJECR-2016-0086 **M51**
4. Vucinic B, Radovanovic D, Canovic D, Spasic M, Pavlovic M, **Milosevic B**, Dimic S, Mitrovic B, Petkovic N. Prediktivni značaj mijeloperoksidaze za nastanak postoperativnih vaskularnih komplikacija. Med Čas (Krag) 2016; 50(1): 17-25. **M 52**

5. Vucinic B, Radovanovic D, Canovic D, Pavlovic M, Lazic D, Spasic M, **Milosevic B**, Dimic S, Mitrovic B. Uloga hiperhomocisteinemije u nastanku postoperativnih vaskularnih komplikacija. Med Čas (Krag) 2016; 50(2) doi:10.5937/mckg50-11492 **M 52**

6. Jevdjic J, Zunic F and **Milosevic B**. New therapeutic concepts in pot-resuscitation care. Serbian Journal of Experimental and Clinical Reserach. Expert opinion. 2017; DOI: 1 0. 1 5 1 5/SJECR-20 16-0037 **M51**

7. Cvetkovic A, Spasic M, Pavlovic M, Cvetkovic D, Stojanovic B, Ninkovic S, Jevdjic J, Canovic D and **Milosevic B**. The Use of Proton Pump Inhibitors in Intensive Care Units. Ser J Exp Clin Res. 2017; doi: 10. 1515/SJECR-2017-0011 **M51**

Магистарске и докторске тезе (категирија М70)

Милошевић Бојан З. Процена значаја појединих фактора у настајању, развоју и прогнози акутног билијарног перитонитиса. Магистарска теза. Медицински факултет, Крагујевац. 2006. **M72**

ПРИЛОГ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број - РБ:

Идентификациони број - ИБР:

Тип документације - ТД: Монографска публикација

Тип записа - ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада - ВР: Докторска дисертација

Аутор - АУ: Бојан З. Милошевић

Ментор/коментор - МН: Проф. др Срђан Нинковић

Наслов рада - НР: Експресија мамаглобина у ткиву као предиктора агресивности тумора дојке

Језик публикације - ЈП: српски/ћирилица

Језик извода - ЈИ: српски/енглески

Земља публиковања - ЗП: Република Србија

Уже географско подручје - УГП: Централна Србија

Година - ГО: 2019. година

Издавач - ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса - МС: 34 000 Крагујевац, Светозара Марковића 69, Република Србија

Физичи опис рада - ФО: 162 стране, 4 табеле, 14 графикана, 18 слика

Научна област - УДК: Медицина

Научна дисциплина - ДИ: Клиничка и експериментална хирургија

Предметна одредница/ кључне речи - ПО: карцином дојке, мамаглобин, рецидив, метастазе

Чува се - ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена- МН:

Извод - ИД:

Увод: Хумани мамаглобин је један од назначајнијих маркера хематогене дисеминације карцинома дојке. Наш циљ је указати на важну улогу перитуморског ткива као активног учесника у процесу туморогенезе и концентрацију/експресију мамаглобина у перитуморском ткиву као значајног прогностичког фактора.

Материјал и методе: Ова студија је обухватила 64 пацијенткиње са примарним карциномом дојке током периода од пет година. За одређивање концентрације мамаглобина А у ткиву карцинома и перитуморском ткиву користили смо ELISA тест, док је за одређивање релативне генске експресије овог молекула коришћен qRT-PCR.

Резултати: Концентрација мамаглобина А расте како у ткиву карцинома тако и у перитуморском ткиву са порастом величине тумора, броја захваћених лимфних чворова, броја метастаза, док је релативна експресија Мамаглобина А статистички значајно виша у карциному него у перитуморском ткиву, без обзира на величину тумора, број захваћених лимфних чворова, број метастаза и туморски тип. Концентрација мамаглобина А је већа у перитуморском ткиву него у ткиву дукталног карцинома, док је у случају лобуларног карцинома концентрација мамаглобина А већа у карциному него у перитуморском ткиву.

Закључак: Концентрације Мамаглобина А у перитуморском ткиву веће од 0,6704221 ng/ml и у ткиву карцинома веће од 0,5784426 ng/ml, као и релативна генска експресија *Мамаглобина А* у ткиву карцинома већа од 1.003 су cut-off вредности на основу којих се могу идентификовати пацијенти који су под повећаним ризиком за развој метастатске болести и који се могу третирати раним радикалним адјувантним лечењем.

Кључне речи: карцином дојке, мамаглобин, рецидив, метастазе

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 07.09.2016. године.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. **Проф. др Драгче Радовановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хирургија, председник
2. **Проф. др Слободанка Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан
3. **Проф. др Владан Живаљевић**, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хирургија, члан

KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number - ANO:

Identification number - INO:

Documentation type - DT: Monographic publication

Type of record - TR: Textual printed material

Contents code - CC: Ph. D. Thesis

Author - AU: Bojan Z. Milosevic

Menthor/co-mentor - MN: Associate professor Srdjan Ninkovic, M.D. Ph.D.

Title - TI: Expression of mamaglobin in the tissue as a predictor of breast tumor aggressiveness

Language of text - LT: Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication - CP: Republic of Serbia

Locality of publication - LP: Central Serbia

Publication year - PY: 2019

Publisher - PU: Author reprint

Publication place - PP: 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description - PD: 162 pages, 4 tables, 14 graphics, 18 images

Scientific field - SF: Medicine

Scientific discipline - SD: Clinical and experimental surgery

Subject/key words - SKW: breast carcinoma, mammaglobin, relapse, metastases

UDC

Holding data: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note - N:

Abstract - AB:

Introduction: Human mammaglobin is considered to be one of the most significant markers of hematogenous dissemination of breast carcinoma. Our goal is to indicate the important role of peritumoral tissue as an active participant in the tumorigenesis process and the concentration / expression of mamaglobins in the peritumoral tissue as a significant prognostic factor.

Materials and methods: This research included 64 patients with primary breast carcinoma during five-year follow-up period. To determine the concentration of mamaglobin A in samples of carcinoma tissue and peritumoral tissue, ELISA assay was used, and for the determination of relative gene expression of Mammaglobin A, qRT-PCR was used.

Results: The concentration of mamaglobin A increases in both the carcinoma tissue and peritumoral tissue with an increase in tumor size, number of affected lymph nodes, number of metastases, while relative expression of Mamaglobin A is statistically significantly higher in carcinoma tissue than in peritumoral tissue, regardless of tumor size, number of affected lymph nodes, number of metastases and tumor type. The concentration of mamaglobin A is higher in peritumoral tissue than in tissue of ductal carcinoma, while in the case of lobular carcinoma the concentration of mamaglobin A is higher in carcinoma tissue than in peritumoral tissue.

Conclusion: Mammaglobin A concentration in peritumoral tissue higher than 0,6704221 ng/ml, and in carcinoma tissue higher than 0,5784426 ng/ml, as well as *Mammaglobin A* relative gene expression in carcinoma tissue higher than 1.003 were determined as cut-off values that may identify patients who are at higher risk of metastatic disease, which would be treated with early radical adjuvant treatment.

Keywords:

breast carcinoma, mammaglobin, relapse, metastases.

Accepted by the Scientific Board on - ASB: September 07th 2016.

Defended on - DE:

Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:

1. **Associate Professor, Dragce Radovanovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, chairman
2. **Associate Professor, Slobodanka Mitrovic**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, member.
3. **Associate Professor, Vladan Zivaljevic**, M.D, Ph.D, Medical Faculty, University of Belgrade, member

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бојан З. Милошевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Експресија мамаглобина у ткиву као предиктора агресивности
тумора дојке

која је одбрањена на Факултету медицинских наука
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 2019. године,


потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бојан З. Милошевић, дозвољавам не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**Експресија мамаглобина у ткиву као предиктора агресивности
тумора дојке**

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

 дозвољавам не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делим под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу, 2019. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од попуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>



VOJNOSANITETSKI PREGLED
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA
Crnotravska 17, 11 000 **Beograd, Srbija**
Tel/faks: +381 11 2669689
vsp@vma.mod.gov.rs

ACCEPTED MANUSCRIPT

Accepted manuscripts are the articles in press that have been peer reviewed and accepted for publication by the Editorial Board of the *Vojnosanitetski Pregled*. They have not yet been copy edited and/or formatted in the publication house style, and the text could still be changed before final publication.

Although accepted manuscripts do not yet have all bibliographic details available, they can already be cited using the year of online publication and the DOI, as follows: article title, the author(s), publication (year), the DOI.

Please cite this article **MAMMAGLOBIN EXPRESSION IN TISSUE AS A PREDICTOR OF BREAST CARCINOMA AGGRESSIVENESS**

EKSPRESIJA MAMAGLOBINA U TKIVU KAO PREDIKTORA AGRESIVNOSTI KARCINOMA DOJKE

Authors Milosevic Bojan *†, Cvetkovic Aleksandar *†, Ninkovic Srdjan *†, Markovic Snezana ‡, Mitrovic Slobodanka ||, Stojanovic Bojan *†, Radunovic Aleksandar §, Vulovic Maja ¶ and Cvetkovic Danijela ‡, *Vojnosanitetski pregled* (2019); Online First April, 2019.

UDC:

DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP190129046M>

When the final article is assigned to volumes/issues of the Journal, the Article in Press version will be removed and the final version appear in the associated published volumes/issues of the Journal. The date the article was made available online first will be carried over.

**MAMMAGLOBIN EXPRESSION IN TISSUE AS A PREDICTOR OF
BREAST CARCINOMA AGGRESSIVENESS**

**EKSPRESIJA MAMAGLOBINA U TKIVU KAO PREDIKTORA
AGRESIVNOSTI KARCINOMA DOJKE**

Milosevic Bojan *†, Cvetkovic Aleksandar *†, Ninkovic Srdjan *†, Markovic Snezana ‡,
Mitrovic Slobodanka ||, Stojanovic Bojan *†, Radunovic Aleksandar §, Vulovic Maja ¶ and
Cvetkovic Danijela †

*Clinic for General and Thoracic Surgery, Clinical Center Kragujevac, Serbia

† University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Surgery

‡ University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology

|| University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathology

§Military Medical Academy, Clinic for Orthopedic Surgery and Traumatology, Belgrade

¶University of Kragujevac, Serbia, Faculty of Medical Sciences, Department of Anatomy

Correspondence: Milosevic Bojan, General Surgeon, MSc, Asst., Faculty of Medical
Sciences, The University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac,
Serbia. E-mail: drbojanzm@gmail.com Phone: +38163625686

Short title: Mammaglobin and breast carcinoma

Abstract

Introduction: Human mamaglobin is considered to be one of the most significant markers of hematogenous dissemination of breast carcinoma. Our goal is to indicate the important role of peritumoral tissue as an active participant in the tumorigenesis process and the concentration / expression of mamaglobins in the peritumoral tissue as a significant prognostic factor.

Materials and methods: This research included 64 patients with primary breast carcinoma during five-year follow-up period. To determine the concentration of mamaglobin A in samples of carcinoma tissue and peritumoral tissue, ELISA assay was used, and for the determination of relative gene expression of Mamaglobin A, qRT-PCR was used.

Results: The concentration of mamaglobin A increases in both the carcinoma tissue and peritumoral tissue with an increase in tumor size, number of affected lymph nodes, number of metastases, while relative expression of Mamaglobin A is statistically significantly higher in carcinoma tissue than in peritumoral tissue, regardless of tumor size, number of affected lymph nodes, number of metastases and tumor type. The concentration of mamaglobin A is higher in peritumor tissue than in tissue of ductal carcinoma, while in the case of lobular carcinoma the concentration of mamaglobin A is higher in carcinoma tissue than in peritumor tissue.

Conclusion: Mamaglobin A concentration in peritumoral tissue higher than 0,6704221 ng/ml, and in carcinoma tissue higher than 0,5784426 ng/ml, as well as Mamaglobin A relative gene expression in carcinoma tissue higher than 1.003 were determined as cut-off values that may identify patients who are at higher risk of metastatic disease, which would be treated with early radical adjuvant treatment.

Keywords:

breast carcinoma, mamaglobin, relapse, metastases.

Apstrakt

Uvod: Humani mamaglobin je jedan od naznačajnijih markera hematogene diseminacije karcinoma dojke. Naš cilj je ukazati na važnu ulogu peritumorskog tkiva kao aktivnog učesnika u procesu tumorogeneze i koncentraciju/ekspresiju mamaglobina u peritumorskom tkivu kao značajnog prognostičkog faktora.

Materijal i metode: Ova studija je obuhvatila 64 pacijentkinje sa primarnim karcinomom dojke tokom perioda od pet godina. Za određivanje koncentracije mamaglobina A u tkivu karcinoma i peritumorskom tkivu koristili smo ELISA test, dok je za određivanje relativne genske ekspresije ovog molekula korišćen qRT-PCR.

Rezultati: Koncentracija mamaglobina A raste kako u tkivu karcinoma tako i u peritumorskom tkivu sa porastom veličine tumora, broja zahvaćenih limfnih čvorova, broja metastaza, dok je relativna ekspresija Mamaglobina A statistički značajno viša u karcinomu nego u peritumorskom tkivu, bez obzira na veličinu tumora, broj zahvaćenih limfnih čvorova, broj metastaza i tumorski tip. Koncentracija mamaglobina A je veća u peritumorskom tkivu nego u tkivu dukalnog karcinoma, dok je u slučaju lobularnog karcinoma koncentracija mamaglobina A veća u karcinomu nego u peritumorskom tkivu.

Zaključak: Koncentracije Mamaglobina A u peritumorskom tkivu veće od 0,6704221 ng/ml i u tkivu karcinoma veće od 0,5784426 ng/ml, kao i relativna genska ekspresija Mamaglobina A u tkivu karcinoma veća od 1.003 su cut-off vrednosti na osnovu kojih se mogu identifikovati pacijenti koji su pod povećanim rizikom za razvoj metastatske bolesti i koji se mogu tretirati ranim radikalnim adjuvantnim lečenjem.

Ključne reči: karcinom dojke, mamaglobin, recidiv, metastaze.

Introduction

Breast carcinoma (BC) is the leading cause of cancer death in the USA with over 230,000 estimated new cases in 2014 and 40,000 estimated deaths (1). Despite the achieved advance in the treatment of breast carcinoma by the applications of numerous hormonal, genetic and molecular markers (estrogen receptor (ER), progesteron receptor (PR), HER2, Ki67, etc.), high rates of mortality and morbidity are obvious related to this disease, so

further study in this field is necessary with the aim of finding new markers as predictors of disease aggressiveness (2-4). Breast cancer was classified into invasive ductal carcinoma (over 80% of total BC), invasive lobular carcinoma (10% of total BC) and other BC histological types that are not so common (10% of total BC) according to pathohistological features (5). Improvement of medical achievements led to individualisation of therapy, i.e. selection of treatment tailored to individual patients (6).

One of the specific breast cancer markers is the uteroglobin protein called human mamaglobin. This protein is detected both in normal breast tissue and in breast cancer. Detected blood levels are increased in cancer and have prognostic significance (7, 8). Human mamaglobin was first detected in 1994 by Watson and Fleming using PCR method (9). In addition to breast tissue, this uteroglobin protein occurs in two subtypes B1 and B2 that are detected in ovarian carcinoma (10). In the literature, other names for human mamaglobin are also used: MAM, UGB3, SCGB2A1, MMG, MGB (11). It has been an important predictor for bone metastases in breast cancer (12). mRNA expression of mamaglobin may be multiplied in breast cancer versus non-malignant breast tissue (13). The overexpression of mamaglobin is probably caused by complex mechanism on the level of transcription (14).

Span PN et al. demonstrated that mRNA expression of Mamaglobin A could be used for individualization of postoperative adjuvant treatment planning (15). Human mamaglobin (hMAG) was also used to distinguish different breast carcinoma subtypes (16). Human mamaglobin is positively expressed in 80% of the intraductal carcinoma and 90% of invasive ductal carcinoma (17). The expression of human mamaglobin is in correlation with a high grade of breast cancer (18).

There is no consensus in the literature on the association of human mamaglobin levels and the prognosis of the course of the disease (19). Nunez-Villar et al. showed a correlation of human mamaglobin with less aggressive forms of the disease (20). Many efforts have been made to detect mRNA mamaglobin in lymph nodes, blood and bone marrow in patients with breast carcinoma. The peculiarity of hMAG lies in its almost sole existence in mammary tissue and mammary carcinoma. In addition, the heightened expression in carcinomas and its association with tumour grades renders it an excellent marker for diagnosis and prognosis (21).

BC early detection screening and other detection methods are still being studied. It is reported that expression of hMAG is mostly related to breast carcinoma tissue, and hMAG is defined as one of the first relatively mammary-specific markers (13). There are many studies in literature that are related to mammaglobin level of the peripheral blood in BC patients, while there are not so many studies describing mammaglobin level in cancer tissue; studies concerning mammaglobin level of peritumoral tissue are really rare (22-24).

Methods

This study presents a clinical observational cohort study along with an experimental study based on human origin material in vitro. The experimental research was carried out in Laboratory of Cell and Molecular Biology, Biology and Ecology Institute, Faculty of Science, University of Kragujevac. Samples (carcinoma tissue and peritumoral tissue) were taken in corporation with The General and Thoracic Surgery Clinic and Anatomic pathology Department of Clinical Centre in Kragujevac. Researches of this study were carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Chemicals and reagents

Phosphate-buffered saline - PBS was provided by Gibco, the USA; chloroform, ethanol and isopropanol were provided by Serva Company, Germany. Human Mammaglobin-A ELISA kit and monoclonal antibody Anti-Human Antibody by My BioSource, inc. San Diego, CA, the USA.

QuantiTect Reverse Transcription Kit and PCR Kit (Sensiscript Reverse Transcriptase Kit - RT) were provided by Qiagen, Hilden, Germany. The PCR water and TRIzol were provided by Ambion, the USA. Gene expression Kit KapaSYBR® Green PCR Master Mix was provided by KAPA Biosystems, Boston, the USA. PCR primers were provided by Eurofins Genomics, Ebersberg.

Criteria for involving the patients in the study

In this study we analyzed carcinoma and peritumoral tissue. The study included patients with diagnosed early breast carcinoma. All the patients were examined by the Tumor board meeting of Clinical Centre Kragujevac, and then subjected to the appropriate surgical intervention. After the examination that had been carried out by the Tumor board meeting, tissue samples were taken willingly from patients and approved of the Ethics Committee Clinical Centre of Kragujevac (no. 01-4990). All patients were given written information about the study details. During the surgeries carried out in General and Thoracic Surgery Clinic in Kragujevac, breast carcinoma (n=64) specimens and peritumoral tissue (n=64) specimens were collected. The carcinoma tissue samples appeared to be different in size depending on carcinoma size, and the peritumoral macroscopic unchanged tissue samples were taken to 3 cm from macroscopic carcinoma margin depending on the size of the excised breast tissue. All specimens were pathohistologically examined and verified by Anatomic pathology Department of Clinical Centre in Kragujevac. Specimens were stored at -196 °C until analysis. Specimens were evaluated including these parameters: histological type of the tumor, grade of disease (Nottingham Histological Scores), the condition of the lymph nodes, estrogen and progesterone and HER2/neu status that were evaluated according to protocol of American Joint Committee on Cancer - AJCC (25, 26). The study did not include patients who preoperatively underwent neoadjuvant treatment. The patients with previous history of breast carcinoma, as well as the patients with metastatic deposits were excluded from the study. The study did not affect treatment generally conducted in Clinical Centre of Kragujevac and established on principles of good clinical practice.

Tissue sample preparation

The sample was measured and homogenized on ice. Samples were homogenized in 500 µl cold lysis buffer for 0,01g of sample. IKA Homogeniser IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany and Ultrasonic homogenizers Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Germany were used. Lysis buffer contained 31.25 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol and dH₂O was added up to 100 ml. After centrifugation at 10 000 RPM at 4 °C, 10 min., supernatant was isolated and it presented the cell lysate. In this way the proteins

from carcinoma and peritumoral tissue were isolated. The Lowry method was used to determine protein concentrations (27).

Determining human mammaglobin-A concentration in carcinoma tissue

The human mammaglobin-A levels in carcinoma tissue were quantified using Human Mammaglobin-A ELISA kit and monoclonal antibody Anti-Human Antibody (My BioSource, inc. San Diego, CA, the USA) according to manufacturer's instructions.

Relative expression of mRNA mammaglobin gene

Total RNA from the carcinoma and peritumoral tissue was isolated using the phenol-chloroform method by Chomezinski and Sacchi (28). Concentrations and purity of RNA were measured on biophotometer (Eppendorf BioPhotometer plus). $A_{260/280}$ and $A_{260/230}$ ratios were monitored to assess any possible contamination by protein, organic solvents, salts, carbohydrate etc. The samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The RNA template is first converted into a complementary DNA (cDNA) using a reverse transcriptase (Reverse Transcriptase, RT) (29).

Quantitative mRNA analysis

Quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) cDNA was used for gene expression analysis. Master mix (Universal Kapa Sybr fast qPCR Master Mix 2X) is designed for high-performance real-time PCR containing everything that was necessary except primers, cDNA specimens and Rox Low dye which were added. All qPCR experiments were performed by using the Applied Biosystems, quantitative Real-Time system (Applied Biosystems 7500/7500 Real-Time PCR Software v2.0). Each reaction (a 20 μl reaction mixture) contained 10 μl SYBR Green PCR Master Mix, 1 μl forward and reverse primer (5 pmol/ μl) and 2 μl cDNA and 7 μl nuclease-free water. A PCR negative control containing nuclease-free water instead of cDNA and a 2RT control containing 2RT reaction instead of cDNA were included. The thermal cycling conditions included an initial denaturation step at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, followed by 40 cycles at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 seconds, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$

8

for 30 seconds, and 72 °C for 30 seconds. To analyze the qPCR results, we used the relative quantification method, which is based on the expression levels of a target gene versus reference genes (housekeeping gene).

There are 2 replicates in each combination of gene. Relative quantification of gene expression was normalized to the β -actin mRNA expression level. The gene-specific qRT-PCR primers were as follows:

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
<i>β-actin</i>	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<i>Mammaglobin-A</i>	5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCCTTG-3'	5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3'

To calculate the expression of a target gene in relation to a reference gene, we used $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (30).

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm SEM (standard error of the mean). The normality of distribution was tested by Kolmogorov-Smirnov test. The two-tailed Student's t-test, ANOVA test or nonparametric Mann-Whitney rank-sum test were used depending on the normality of distribution. Also, Chi-square test used for categorical variables. A binary logistic regression model was used to evaluate prediction between two variables. A receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was employed to assess the diagnostic capabilities of the variables for prediction of distant metastasis. The results were considered significantly different when $p < 0.05$. The data were analyzed using SPSS version 20, statistical package.

Results

Clinical and pathological characteristics of breast cancer (BC) patients

The levels of mammaglobin in carcinoma tissue and peritumoral tissue were observed and their prognostic value was analysed. Correlation between mammaglobin level in carcinoma tissue and peritumoral tissue and certain clinical pathological characteristics was also the object of the study. Clinical and pathological characteristics of the patients are described in Table 1 and 2.

Average age of patients was 58.95 ± 11.24 years old. Median age of patients was 60.5 years, 55 (86%) of patients had ductal carcinoma compared to 9 (14%) of patients with lobular carcinoma, and this ratio was statistically significant (X^2 , $p < 0.01$). A sparing operation was performed in 29 (45.3%) patients who had primary breast cancer of less than 3cm, compared to 35 (54.7%) patients in whom mutilatory surgery was performed. Adjuvant chemotherapy had 46 (72%) patients. Postoperative radiotherapy was used in 43 (67%) patients.

Mammaglobin A concentration in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients (Figure 1 and 2).

The concentration of mammaglobin A grows both in carcinoma tissue and peritumoral tissue with an increase in tumor size, the number of affected lymph nodes, the number of metastases and tumor grade (Figure 1).

The concentration of mammaglobin A is higher in peritumoral tissue than in carcinoma tissue in ductal carcinoma, while in the case of lobular carcinoma the concentration of mammaglobin A is higher in carcinoma than in peritumoral tissue (Figure 2).

Analysis of Mammaglobin A gene expression in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients (Figure 3 and 4)

Relative expression of *Mamaglobin A* is statistically significantly higher in carcinoma than in peritumoral tissue, regardless of the histological type of tumor, age of the patient, hormone or HER status (Figure 3).

Relative expression of Mamaglobin A is statistically significantly higher in carcinoma than in peritumoral tissue, regardless of tumor size, number of affected lymph nodes, number of metastases and tumor grade (Figure 4).

Prognostic significance of Mammaglobin A concentration in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients

As shown in Figure 5, mammaglobin concentration in peritumoral tissue has a propensity for distant metastasis (binary logistic regression, $p=0.024$). Mammaglobin borderline value in carcinoma tissue is 0.67ng/ml for sensitivity 0.58 and specificity 0.59.

Mammaglobin concentration in carcinoma tissue has a propensity for distant metastasis (binary logistic regression, $p=0.025$). Mammaglobin borderline value in carcinoma tissue is 0.578ng/ml for sensitivity 0.67 and specificity 0.65 (Figure 6).

Prognostic significance of Mammaglobin A gene expression in peritumoral and carcinoma tissue in breast carcinoma patients

As indicated in Figure 7, mammaglobine gene expression in peritumoral tissue has no significant influence on occurrence of distant metastasis (binary logistic regression, $p=0.307$).

Mammaglobin gene expression in carcinoma tissue identified by PCR method has a propensity for distant metastasis (binary logistic regression, $p=0.043$) (Figure 8). Mammaglobin gene expression borderline value in carcinoma tissue is 1.003 for sensitivity 0.73 and specificity 0.76.

Discussion

Examination of hMGA mRNA levels of patients' peripheral blood results in 38, 2% sensitivity, 100% specificity, 100% positive prognostic value (PPV) and 61, 8% negative prognostic value (NPV) (31). There have been many studies describing mammaglobine level in patients' serum but not so many studies related to the mammaglobine level in carcinoma tissue; studies examining mammaglobin level in peritumoral tissue are very rare. The peritumoral tissue is a relatively new research topic, and recent studies have presented its important role in breast cancer formation and development (32). One of the studies that investigated mammaglobin levels in peritumoral, as well as tumoral tissue in breast cancer patient is the study of Zafracas et al. They found that mammaglobin was abundantly expressed in both malignant and normal breast tissues (11). Our goal was analysis of gene and protein expression of mammaglobin in carcinoma tissue and peritumoral tissue. We also managed to determine specific values of these parameters in carcinoma tissue and peritumoral tissue that appeared to be of highly prognostic value.

The goal of modern oncology is personalized therapy, which presents the optimal method for a patient (33). This study contributes to personalized therapy researches, dealing with analysis of potential correlation between mammaglobin expression in carcinoma tissue and peritumoral tissue and certain clinical pathological characteristics that are specific for each patient. We also managed to define specific values of mammaglobin levels (cut-off values) in carcinoma tissue and peritumoral tissue, having statistically proved prognostic values related to some of the most important prognostic parameters (e.g. distant and lymph nodes metastasis) for the outcome (34).

According to studied data, serum concentrations of mammaglobine were 0,07 - 9,6 ng/ml compared to 0 - 0,07 ng/ml of the control group (35). Our study shows that there was no statistically significant difference in mammaglobin concentration in carcinoma and peritumoral tissue. ELISA test was used to determine this difference. We got the values 2, 4 ng/ml - 3, 8 ng/ml, which is more than the range of healthy persons 0 - 0, 07 ng/ml, pointing out the prognostic value of mammaglobin concentrations in tissues.

Data in studies related to serum concentration of mammaglobin have been contradictory. Zehentner et al. claim that ELISA test data showed that mammaglobin level was not dependant on disease stage. ROC curve showed the values of 1,71 ng/ml of cut-off; the test considered to be positive when values of mammaglobine were higher than the given ones (36). In our study ROC curve showed that mammaglobin concentration value in peritumoral tissue can be used as a prognostic factor of distant metastasis (AUC= 0.693, p=0.027). Also, ROC curve showed that mammaglobin concentration value in carcinoma tissue can be used as a prognostic factor of distant metastasis (AUC= 0.698, p=0.019).

However, Bernstein JL et al. claim that patients at stages I – III had mammaglobin values of 0,9 - 1,4 ng/ml, and at stage IV the value 2,3 ng/ml. There was a strong positive correlation between mammaglobine values and carcinoma size; patients with a tumor of large diameter had higher serum concentrations of mammaglobin (37). Our results match these data. There was an increased level of mammaglobin in carcinoma tissue and peritumoral tissue in patients with a larger breast tumor. As for the serum concentrations, results of our study showed concentrations of 2,6 ng/ml at stage T1 up to those of 3,8 ng/ml at stage T3. Values in peritumoral tissue were in significantly lower than those in carcinoma tissue- 2,4 ng/ml at T1 up to 3,6 ng/ml at T3. We did not find similar studies while searching the available data bases so it was impossible to compare the results. To our

knowledge, this is the first study of this kind that dealt with determining of mammaglobin tissue concentration.

Our results showed that there is a gradual increase of mammaglobin protein expression in carcinoma tissue and peritumoral tissue with higher possibility of lymphatic metastasis. For peritumoral tissue the values were at range 2,3 ng/ml - 3,7 ng/ml, and for carcinoma tissue 2,6 ng/ml- 3,8 ng/ml concerning N0 and N2 disease stages, respectively. These differences are statistically significant giving tissue mammaglobin concentrations a prognostic role. These results correspond with the ones we found in other studies. Liu Y. et al. cite statistically higher mammaglobin concentration in patients with positive lymph nodes (38). Tafreshi et al. demonstrated that the the level of mamaglobin is significantly higher in affected lymph nodes comparing with healthy lymph nodes and showed that breast cancer targeted agent, based on mammaglobin can be used for the non-invasive, in vivo detection of cancer altered axillary lymph nodes (39).

Mean value of serum concentration of mammaglobin in patients with metastatic breast carcinoma was 9,38 ng/ml (7,9 ng/ml in the control group). Sensitivity was 68% and specificity 88,8%. Slight differences may appear because of different antibodies that were used in various studies (36). Our results showed that mean value of mammaglobine determined by protein expression in patients with metastatic disease was 2,4 ng/ml - 3,75 ng/ml in peritumoral, and 2,55 ng/ml - 3,8 ng/ml in carcinoma tissue. Determining protein expression with ELISA test shows prognostic value related to distant metastasis in BC patients. Further, we defined specific cut-off values of mammaglobin concentration which indicate distant metastasis occurrence risks. This value was 0,6704221 ng/ml in peritumoral tissue, and 0,5784426 ng/ml in carcinoma tissue. We did not find similar studies while searching the available data bases so it was imposible to compare the results.

As for the tumor grade, our study showed that increased mammaglobin protein expression in carcinoma tissue and peritumoral tissue affected the tumor grade. Higher concentration of mammaglobin can affect tumor metastatis in distant organs; threfore, determining protein expression of mammaglobin can have a prognostic value. Similar results can be found in a few studies that examined mammaglobin expression in carcinoma tissue using the method of immunohistochemistry; we determined both protein and gene expression in carcinoma and peritumoral tissue. Rehman F. et al. also noticed increased

mammaglobin concentration in carcinoma tissue while changing the tumor grade and size (40).

Our results showed that protein expression of mammaglobin in carcinoma tissue and peritumoral tissue was higher in patients with ductal tumors than in those with lobular tumors. The results of some other studies were different. Watson and Nunez-Villar found no significant difference in mammaglobin expression considering histological types of breast cancer (7, 20). On the other hand, there are studies like us that confirmed increased protein expression in ductal tumors (40). This confronts with the study by Bhargava et al.; this study showed that infiltrated lobular carcinoma had the highest mammaglobin expression (41).

We did not present correlation between hormonal status (ER and PR) and HER2 and protein expression. There are different data in the studies related to this. O'Brien et al. cite that the presence of mammaglobin in patients with ER+ and PR+ a good prognostic indicator (42). Guan et al. show that the presence of mammaglobin protein and gene expression correlates with ER positivity (43).

We did not show age dependence in mammaglobin expression, since the results were like those of other studies (38). We defined specific values of mammaglobin concentration in carcinoma tissue and peritumoral tissue, and we showed that there were patients who were potentially at risk of disease development. They were suggested an adjuvant cancer treatment. Protein expression value was 0,6704221 ng/ml in peritumoral tissue, and 0,5784426 ng/ml in carcinoma tissue (ELISA test).

We also dealt with mammaglobin gene expression in carcinoma tissue and peritumoral tissue and the results were quantitatively different as described in other studies (42). Nevertheless, Chen G et al. showed that only 21% of results of gene examination correlated with protein expression (adenocarcinoma lung) (44).

Possible reasons are well known phenomena of post transcriptional and post translational regulation and modification; in some cases, it is not certain that protein would be functional and detectable (45, 46).

As for the gene expression in carcinoma tissue and peritumoral tissue, our studies shows gradual increase of mammaglobin gene expression depending on the tumor size, though it is less shown in peritumoral tissue. Mammaglobin gene expression values of concentration

in carcinoma tissue were 1,5 at T1 stage up to 7,4 at T3 stage, being lower in peritumoral tissue: 0,9 at T1 stage up to 1, 7 at T3 stage.

Mammaglobin gene expression is in correlation with lymph nodes status. Results showed significantly lower values in peritumoral tissue: 0,1 at N0 up to 0,4 at N2 stage; in carcinoma tissue these values were 1,9 at N0 up to 5,6 at N2 stage. These data are like the ones from the other studies (36). Marchetti A et al. consider mammaglobin one of the most sensitive and most specific markers for lymph nodes micrometastasis detection (47).

Gene expression of mammaglobin was slightly increased in carcinoma tissue of patients with metastasis. In peritumoral tissue it had values of 0,3 at M0 up to 0,5 at M1, and in carcinoma tissue 2,0 at M0 up to 5,5 at M1. 12% of cases M status was not defined so these patients were excluded from the study.

ROC curve shows that the value of mammaglobin gene expression in peritumoral tissue cannot be used as a prognostic factor of distant metastasis (AUC= 0.553, p=0.546).

ROC curve shows that the value of mammaglobin gene expression in carcinoma tissue can be used as a prognostic factor of distant metastasis (AUC=0.838, p<0.01).

The study by Span et al. showed that increased gene expression was independently associated with longer non-relapse period. This was particularly evident in patients taking Tamoxifen, indicating relation to hormonal status of tumor. Therefore, mammaglobin gene expression is considered to be a good prognostic marker (15). There are some authors, nevertheless, stating that there was not a statistically significant correlation between gene expression level and hormonal status (48, 49).

Our results match previously described data. A Korean group found a statistically significant correlation between mammaglobin level of peripheral blood and ER, PR status of patient and hormonal status. No connection existed related to HER2 status (50).

Our study indicates that gene expression is significantly higher in carcinoma tissue than in peritumoral tissue, and statistically more significant in ductal than in lobular breast cancer. These data correspond to those of other researches (51).

It can be concluded that mammaglobin gene expression in carcinoma tissue (not the one in peritumoral tissue) can be used as a prognostic marker of hematogenous dissemination of breast carcinoma. We determined specific values of gene expression for carcinoma tissue. Thus, it is possible to identify high-risk patients of metastatic disease; these patients are suggested adjuvant cancer treatment. Boundary value of mammaglobin

gene expression is considered to be 1.003 for sensitivity of 0.73 and specificity of 0.76 in carcinoma tissue.

In summing up, the basic results of this study are:

- Protein expression of mammaglobin in peritumoral and carcinoma tissue can be used as a prognostic marker for hematogenous dissemination of breast carcinoma.
- Specific values of mammaglobin concentration in peritumoral and carcinoma tissue were defined above which it can be assumed that metastatic dissemination of disease would occur.
- In peritumoral tissue mammaglobin concentration determined with ELISA test was 0,6704221 ng/ml, and in carcinoma tissue this value was 0,5784426 ng/ml.
- Mammaglobin gene expression can be a prognostic marker for hematogenous dissemination of breast carcinoma concerning carcinoma tissue.
- Determined value of mammaglobin gene expression in carcinoma tissue was 1.003.
- Analysis of mammaglobin in peritumoral and carcinoma tissue makes it possible to define high- risk patients of disease development and we suggest adjuvant cancer treatment in order to prevent disease development.

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

The study is a part of the project of Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia no. III 41010: "Preclinical Testing of bioactive substances (PIBAS)" approved by the Ethics Committee Clinical Centre of Kragujevac no. 01-4990. The part of this research is supported by Ministry of Education in Serbia, Grant III41007.

Acknowledgement

We would like to thank miss Sanja Dugic for her help with the translation of this manuscript.

REFERENCES:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(1):5-29.
2. Zambrano J, Yeh ES. Autophagy and Apoptotic Crosstalk: Mechanism of Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Breast cancer : basic and clinical research*. 2016;10:13-23.
3. Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomarkers in cancer*. 2016;8:25-42.
4. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):279-92.
5. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2015;17:60.
6. Koren S, Bentires-Alj M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Molecular cell*. 2015;60(4):537-46.
7. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer research*. 1996;56(4):860-5.
8. Lacroix M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(4):1033-67.
9. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer research*. 1994;54(17):4598-602.
10. Bellone S, Tassi R, Betti M, English D, Cocco E, Gasparrini S, et al. Mammaglobin B (SCGB2A1) is a novel tumour antigen highly differentially expressed in all major histological types of ovarian cancer: implications for ovarian cancer immunotherapy. *British journal of cancer*. 2013;109(2):462-71.
11. Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knuchel R, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more

- than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC cancer*. 2006;6:88.
12. Li G, Zhang J, Jin K, He K, Wang H, Lu H, et al. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomarkers in medicine*. 2011;5(2):249-60.
 13. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott E, et al. Mammaglobin a: a promising marker for breast cancer. *Clinical chemistry*. 2002;48(8):1362-4.
 14. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome 11q13. *Oncogene*. 1998;16(6):817-24.
 15. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(4):691-8.
 16. Lewis GH, Subhawong AP, Nassar H, Vang R, Illei PB, Park BH, et al. Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin. *American journal of clinical pathology*. 2011;135(4):587-91.
 17. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004.
 18. Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, Gillanders WE, Hoda R, Schutte del H, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study. *BMC cancer*. 2008;8:55.
 19. Raica M, Cimpean AM, Meche A, Alexa A, Suciuc C, Muresan A. Analysis of the immunohistochemical expression of mammaglobin A in primary breast carcinoma and lymph node metastasis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2009;50(3):341-7.
 20. Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical

- and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast cancer research : BCR*. 2003;5(3):R65-70.
21. O'Brien N, O'Donovan N, Foley D, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Use of a panel of novel genes for differentiating breast cancer from non-breast tissues. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2007;28(6):312-7.
 22. Bozhenko VK, Kharchenko NV, Vaskevich EF, Kudinova EA, Oorzhak AV, Rozhkova NI, et al. [Mammaglobin in peripheral blood and tumor in breast cancer patients]. *Biomeditsinskaia khimiia*. 2016;62(4):453-7.
 23. Gargano G, Agnese V, Calo V, Corsale S, Augello C, Bruno L, et al. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2006;17 Suppl 7:vii41-5.
 24. Cerveira N, Torres L, Rocha P, Bizarro S, Pereira D, Abreu J, et al. Highly sensitive detection of the MGB1 transcript (mammaglobin) in the peripheral blood of breast cancer patients. *International journal of cancer*. 2004;108(4):592-5.
 25. Elston CW EI, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast*. London: Churchill Livingstone; 1998.p.385-433. 1998.
 26. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4.
 27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
 28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
 29. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;25(2):169-93.
 30. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.

31. Aristizabal-Pachon AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2015;27(4):217-22.
32. Lapeire L, Hendrix A, Lambein K, Van Bockstal M, Braems G, Van Den Broecke R, et al. Cancer-associated adipose tissue promotes breast cancer progression by paracrine oncostatin M and Jak/STAT3 signaling. *Cancer research*. 2014;74(23):6806-19.
33. Trifiletti DM, Sturz VN, Showalter TN, Lobo JM. Towards decision-making using individualized risk estimates for personalized medicine: A systematic review of genomic classifiers of solid tumors. *PloS one*. 2017;12(5):e0176388.
34. Tseng LM, Hsu NC, Chen SC, Lu YS, Lin CH, Chang DY, et al. Distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(3):290-4.
35. Fanger GR, Houghton RL, Retter MW, Hendrickson RC, Babcook J, Dillon DC, et al. Detection of mammaglobin in the sera of patients with breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2002;23(4):212-21.
36. Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clinical chemistry*. 2002;48(8):1225-31.
37. Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA, et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(18):6528-35.
38. Liu Y, Ma L, Liu X, Wang L. Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;3(3):550-4.
39. Tafreshi NK, Enkemann SA, Bui MM, Lloyd MC, Abrahams D, Huynh AS, et al. A mammaglobin-A targeting agent for noninvasive detection of breast cancer metastasis in lymph nodes. *Cancer research*. 2011;71(3):1050-9.

40. Rehman F, Nagi AH, Hussain M. Immunohistochemical expression and correlation of mammaglobin with the grading system of breast carcinoma. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2010;53(4):619-23.
41. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *American journal of clinical pathology*. 2007;127(1):103-13.
42. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *International journal of cancer*. 2005;114(4):623-7.
43. Guan XF, Hamedani MK, Adeyinka A, Walker C, Kemp A, Murphy LC, et al. Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors. *Endocrine*. 2003;21(3):245-50.
44. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2002;1(4):304-13.
45. Wei C, Luo Q, Sun X, Li D, Song H, Li X, et al. MicroRNA-497 induces cell apoptosis by negatively regulating Bcl-2 protein expression at the posttranscriptional level in human breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(7):7729-39.
46. Vasudevan D, Hickok JR, Bovee RC, Pham V, Mantell LL, Bahroos N, et al. Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications. *Cancer research*. 2015;75(24):5299-308.
47. Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *The Journal of pathology*. 2001;195(2):186-90.
48. Marques AR, Teixeira E, Diamond J, Correia H, Santos S, Neto L, et al. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. *Breast cancer research and treatment*. 2009;114(2):223-32.
49. Fortunato L, Mascaro A, Baldi A, Farina M, Cortese G, Ventrone MA, et al. Positive bone marrow biopsy is associated with a decreased disease-free survival in patients with operable breast cancer. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(11):3010-9.

50. Lee GW, Kim JY, Koh EH, Kang D, Choi DS, Maeng KY, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genetics and molecular research : GMR*. 2012;11(4):4034-42.
51. Al Joudi FS. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *The Indian journal of medical research*. 2014;139(5):675-85.

PAPER ACCEPTED

Table 1.
Clinical, pathological and TNM characteristics of breast cancer patients

Characteristics	Number of patients-N, (%)
Total number of specimens	128 (100%)
• Peritumoral tissue (PT)	64 (50%)
• Carcinoma tissue (CT)	64 (50%)
Histological grade	
• Low grade (G1 or well differentiated)	8 (12%)
• Intermediate grade (G2 or moderately differentiated)	36 (56%)
• High grade (G3 or poorly differentiated)	20 (32%)
• High grade (G4 or undifferentiated)	0 (0%)
The size of the tumor	
• Tumor \leq 2 cm (T1)	27 (42%)
• Tumor 2-5 cm (T2)	3 (4%)
• Tumor > 5 cm (T3)	34 (54%)
• Tumor of any size grown into the chest wall (T4)	0 (0%)
Regional lymph nodes (N)	
• No regional lymph node metastasis (N0)	4 (6%)
• Metastasis to movable ipsilateral axillary lymph node(s) (N1)	31 (48%)
• Metastasis to ipsilateral axillary lymph node(s) fixed to one another or to other structures (N2)	29 (46%)
Distant metastasis (M)-developed during 5-year period	
• No distant metastasis (M0)	23 (36%)
• Distant metastasis (M1)	33 (52%)
• Presence of distant metastasis cannot be assessed (Mx)	8 (12%)

Table 2. Clinical, pathological and immunohistochemical characteristics of breast cancer patients

Characteristics	Number of patients-N, (%)
Total number of specimens	128 (100%)
• Peritumoral tissue (PT)	64 (50%)
• Carcinoma tissue (CT)	64 (50%)
Histological type of cancer	
• <i>Invasive Ductal Carcinoma</i>	55 (86%)
• <i>Invasive Lobular Carcinoma</i>	9 (14%)
Receptor status	
• ER+	38 (60%)
• ER-	26 (40%)
• PR+	29 (46%)
• PR-	35 (54%)
• HER+	31 (48%)
• HER-	33 (52%)
Age	
• < 50	3 (4%)
• > 50	61 (96%)

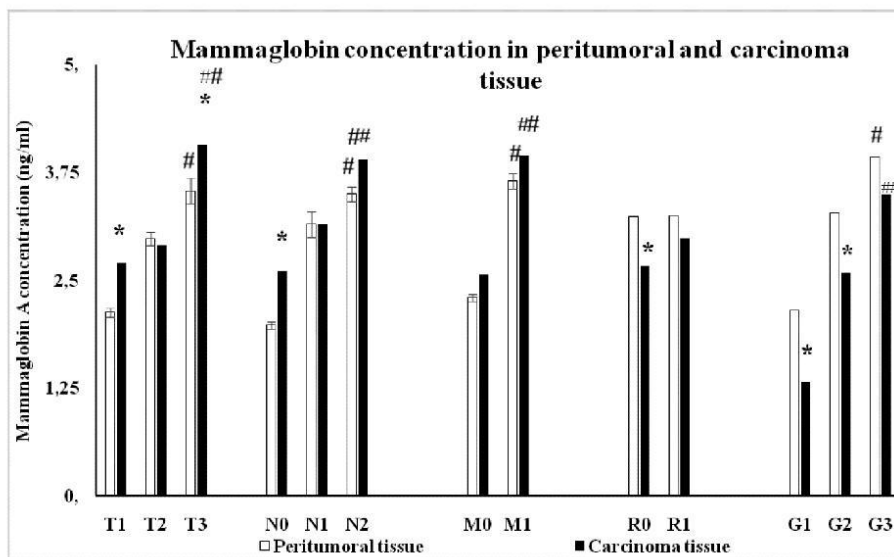


Figure 1. Mammaglobin A concentration in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients related to TNM system classification and histologic tumor grade. R0 and R1 - status of resection margins. The results are given as the mean value \pm SE for the examined parameter number of samples (N); * $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue and peritumoral tissue; # $p < 0,05$ statistically significant difference between peritumoral tissue of different patients; ## $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue of different patients. *Student's T Test* and *ANOVA* were used, and $p < 0.05$ was regarded as statistically significant difference.

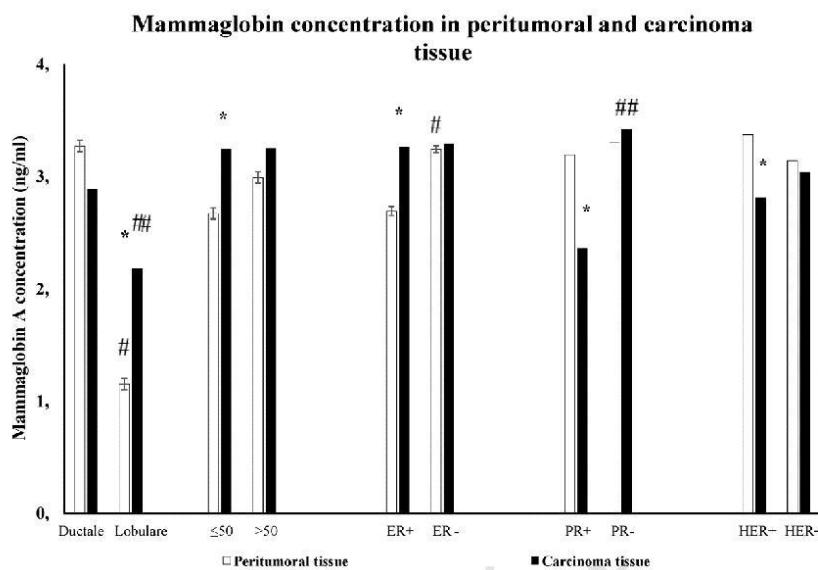


Figure 2. Mammaglobin A concentration in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients related to pathohistological tumor type, patient's age, hormone and HER 2 status. The results are given as the mean value \pm SE for the examined parameter number of samples (N); * $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue and peritumoral tissue; # $p < 0,05$ statistically significant difference between peritumoral tissue of different patients; ## $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue of different patients. *Student's T Test* was used, and $p < 0,05$ was regarded as statistically significant difference.

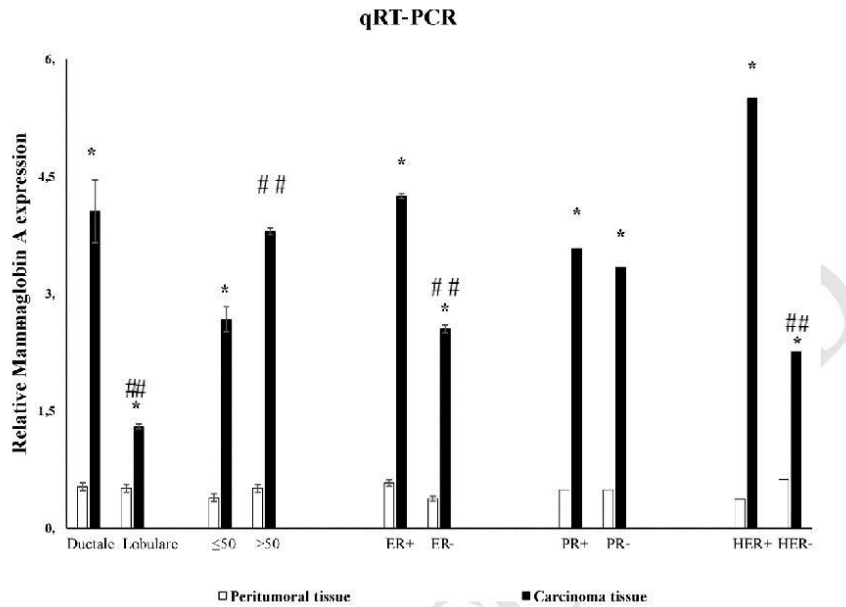


Figure 3. Relative Mammaglobin A gene expression in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients related to pathohistological tumor type, patient's age, hormone and HER 2 status. The results are given as the mean value \pm SE for the examined parameter number of samples (N); * $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue and peritumoral tissue; # $p < 0,05$ statistically significant difference between peritumoral tissue of different patients; ## $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue of different patients.

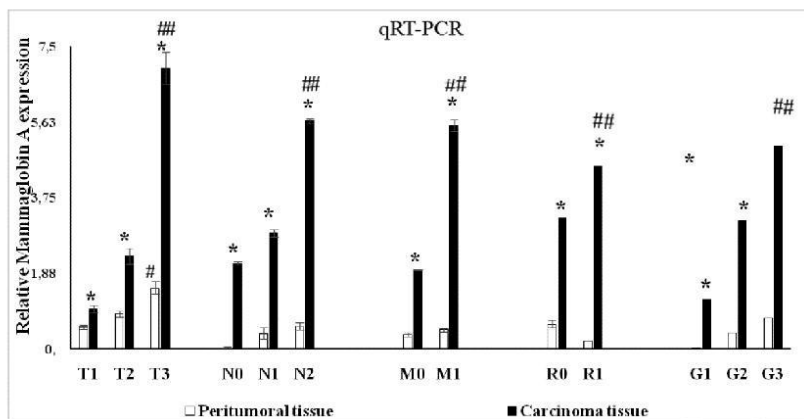


Figure 4. Mammaglobin A gene expression in carcinoma and peritumoral tissue in breast carcinoma patients related to TNM system classification, positive margins and histologic tumor grade. R0 and R1 - status of resection margins. The results are given as the mean value \pm SE for the examined parameter number of samples (N); * $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue and peritumoral tissue; # $p < 0,05$ statistically significant difference between peritumoral tissue of different patients; ## $p < 0,05$ statistically significant difference between carcinoma tissue of different patients. Mammaglobin gene expression is significantly higher in carcinoma tissue (Mann-Whitney Test, $U = 754$, $p = 0.001$).

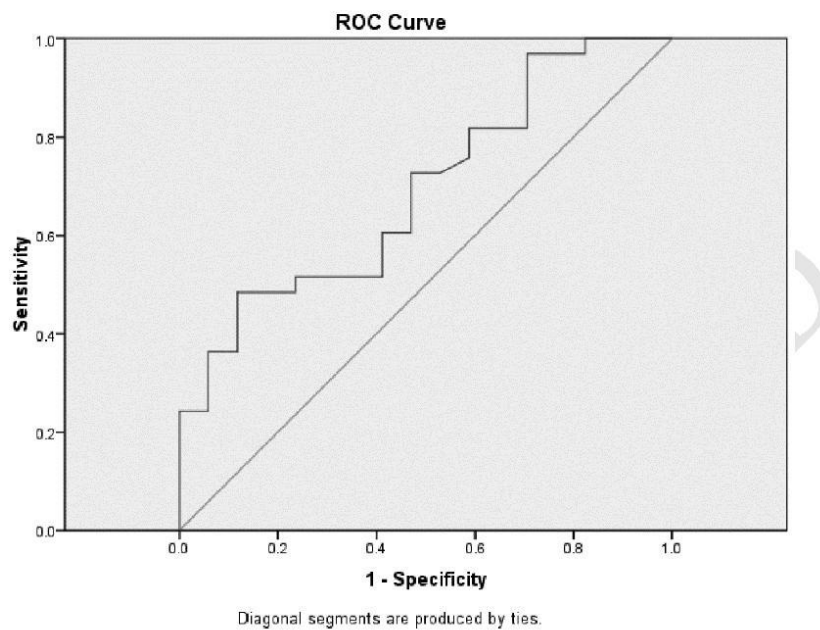


Figure 5. ROC curve- Mammaglobin A concentration in peritumoral tissue in breast carcinoma patients.

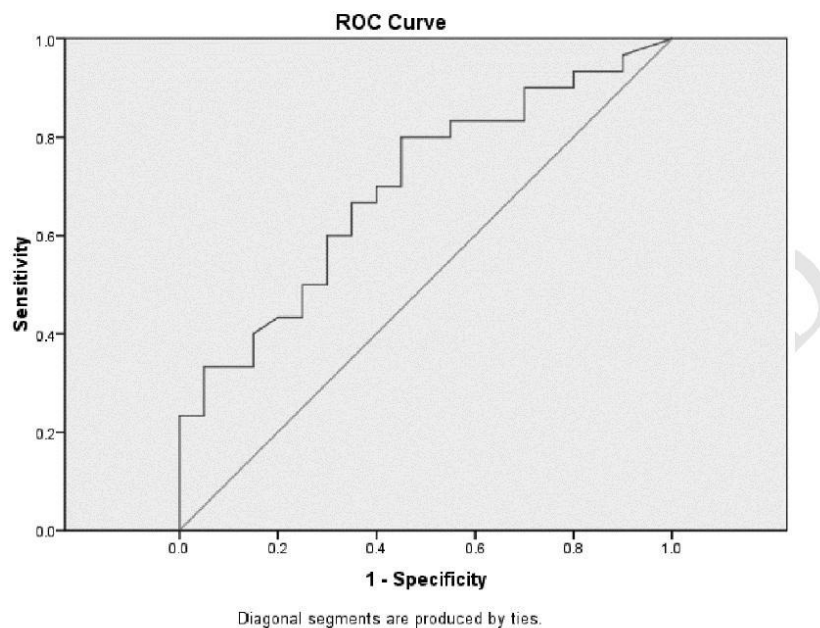


Figure 6. ROC curve- Mammaglobin A concentration in carcinoma tissue in breast carcinoma patients

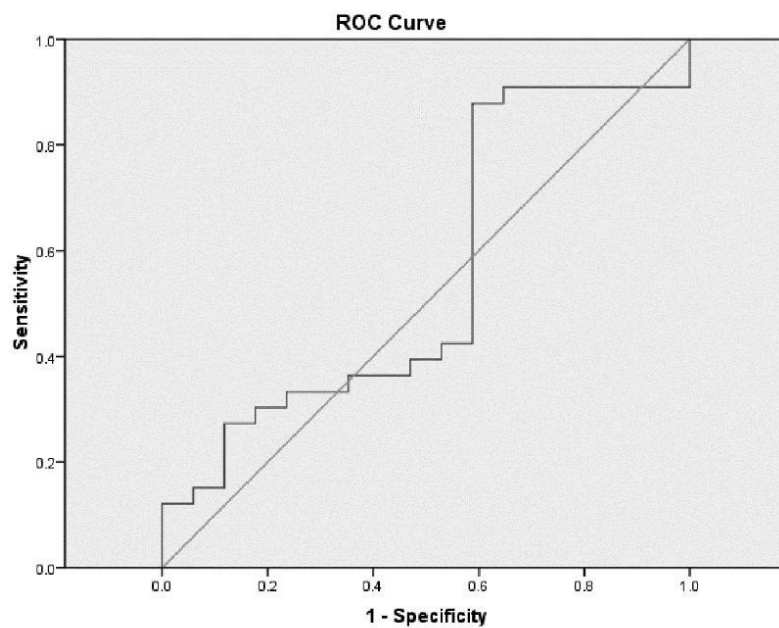
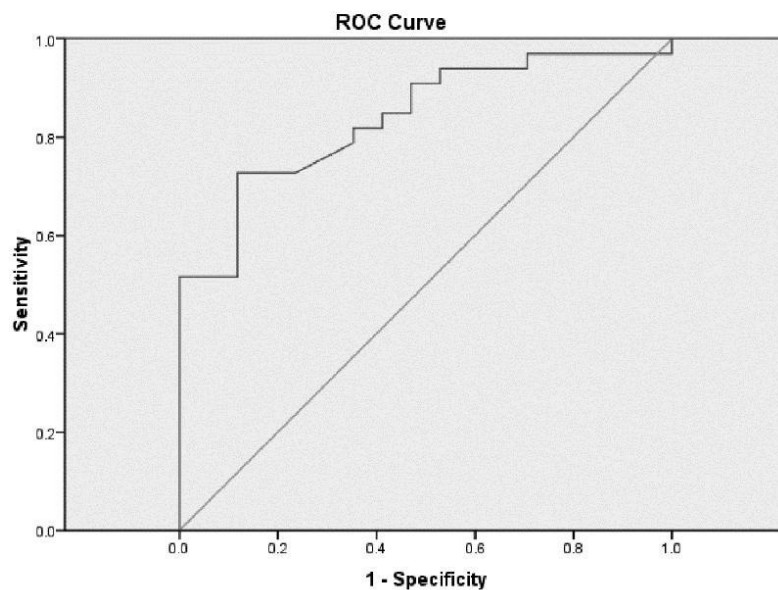


Figure 7. ROC curve- Mammaglobin A gene expression in peritumoral tissue in breast carcinoma patients



Diagonal segments are produced by ties.

Figure 8. ROC curve- Mammaglobin-A gene expression in carcinoma tissue in breast carcinoma patients

Fondacije / institucije — Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia

Naziv projekta — Preclinical Testing of bioactive substances (PIBAS)

Oznaka projekta — III 41010

Received on January 29, 2019.

Revised on March 27, 2019.

Accepted April 1, 2019.

Online First April, 2019.

ORIGINAL ARTICLE

Multifocal and multicentric breast cancer: is breast conserving surgery acceptable?S. Ninkovic^{1,2}, V. Ninkovic³, A. Cvetkovic^{1,2}, D. Cvetkovic⁴, J. Nedovic⁵, B. Milosevic¹

¹Clinical Center Kragujevac, Clinic for Surgery, Kragujevac; ²Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac; ³SB Merkur, Department of Cardiology, Vrnjacka Banja; ⁴Faculty of Science, Department for Biology and Ecology, University of Kragujevac, Kragujevac; ⁵Clinical Center Kragujevac, Department of Oncology, Kragujevac, Serbia

Summary

Purpose: The purpose of our study was to evaluate the significance of multifocal (MF) and multicentric (MC) breast cancer in the diagnosis and treatment of this condition.

Methods: This retrospective study was a combination of clinical and laboratory data. The patient population consisted of 274 women operated on with Madden mastectomy for breast cancer. Assessed were the following parameters: age, menstrual status, histopathological parameters, HER-2 status, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) status, disease stage, quadrant(s) in which breast cancer was detected and axillary lymph nodes status.

Results: Of 274 patients 206 (85%) has unifocal disease, 41 (15%) suffered of MF (n=27; 9.9%)/MC (n=14; 5.1%) disease. MC disease was associated with metastatic

axillary lymph nodes in 92.9% of the cases. MF/MC cases were primarily dependent on histology. MF/MC cancer was best related to the lobular type (85.7% of the cases), while ductal histological type was characteristic of unifocal tumors.

Conclusion: Quadrantectomy as a form of conservative breast surgery is acceptable in cases of MF tumors, because all tumor foci can be removed. We suggest radical surgical treatment in all cases of suspected MC tumors because they are most often associated with metastasis to the axillary lymph nodes. Lobular histology characterizes MC breast cancer.

Key words: breast cancer, conservative surgery, multicentricity, multifocality

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy and the leading cause of death in females in the Western world. In highly developed Western countries, breast cancer makes 15-20% of all cancer deaths in females [1]. The risk of developing invasive breast cancer can be calculated using the so-called Gail model which has been confirmed in several studies [2-4]. The Gail model takes into account 5 factors including age, menarche, previous breast biopsy (taking into account the tissue atypia in these biopsies), age at first childbirth, and family history of breast cancer in the next of kin. A revised Gail model is used at the University of Texas Southwestern Medical Center in Dallas and called the NSABP model 2 [5]. The calculation is a bit different from the Gail model,

as well as programming techniques and differences in the use of data and results of genetic testing (BRCA 1 and BRCA 2). The terms MF and MC are often used to describe the characteristics of certain types of breast cancer. The presence of 2 or more foci of breast cancer in the same quadrant is defined as MF, while the presence of 2 or more foci of cancer in different quadrants of the breast is defined as a MC [6]. The nomenclature is widely used to describe multiple tumors diagnosed on clinical examination, mammography, ultrasound (US) and magnetic resonance imaging (MRI) or histological analysis [7]. All foci of MF breast cancer are located in the same quadrant of the breast and all depart from a primary focus. MF breast cancer is a less invasive cancer, as distinct foci are not independent units, and invasive growth and metastasis depend on the primary focus. MC

Correspondence to: Aleksandar Cvetkovic, MD, Medical Faculty, University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia.
Tel: +381 691814352, Fax: +381 34500089, E-mail: alex777yu@yahoo.com

Received 26-05-2011; Accepted 12-07-2011

breast cancer has more than one tumor in the breast that do not depart from a primary focus. MC breast tumors are located in different parts of the breast. This is an invasive cancer, because each focus is a special unit that has a special propensity for invasive growth and metastasis. Although there is evidence that MF/MC breast cancers have a higher incidence of spread to the regional axillary lymph nodes, this has not been clearly demonstrated [8]. It is recommended that the treatment of diagnosed MF/MC breast cancer should start with neoadjuvant chemotherapy regardless of the size of a particular focus. After neoadjuvant chemotherapy, treatment should be followed by locoregional therapy. There are no data so far for the use of conservative therapies for clinically proven MC tumors [9]. The most important diagnostic method involves taking a detailed family history and palpation of both breasts and the axilla in different positions by an experienced specialist [10]. When the US examination can not characterize the nature of the changes, US-guided biopsy should be performed. Standard diagnostic procedures include US and mammography. Dynamic contrast enhanced MRI mammography is a technique that has been widely introduced into practice in the past 10 years, especially as a modality for young women at high risk for breast cancer and women with dense breasts. [11,12]. It was concluded that the diagnosis of breast cancer in these groups is improved by using MRI, with a sensitivity of 79-92%. The American Cancer Society guidelines recommend mammography and MRI to be used for annual testing of all women with BRCA mutations or a lifetime risk of 20-25% or more [13]. PET scan is costly, available in very few centers and used in special conditions only [14-17]. No single screening imaging method is specific for MF/MC breast cancer. Early diagnosis of breast cancer, neoadjuvant chemotherapy and postoperative radiotherapy have enabled conservative surgery for breast cancer during the last decades. Conservative surgery should not be done with tumors larger than T2, irrespective of the preoperative status of axillary lymph nodes. Mutilating surgery has an important impact on the psychological status of the patient [18,19]. The benefit of sentinel lymph node (SLN) biopsy is that with negative SLN biopsy one can avoid axillary lymph node dissection with its undesirable sequelae.

The purpose of the present study was to evaluate the therapeutic results of breast conserving surgery in patients with MF/MC cancer.

Methods

Our study was a combination of clinical and laboratory data. We have operated on 470 women with breast cancer. Out of that number, we performed 274 Madden operations, and only these pa-

tients were subjected to histological studies, because in these cases the entire breast can be examined and it is possible to compare preoperative with postoperative results. For the assessment of aggressiveness of MF/MC tumors, the following parameters were examined and compared: age, menstrual status, histological type, histological grade, nuclear grade, mitotic index, vascular invasion, perineural invasion, lymphatic invasion, HER-2 status, ER and PR status, stage, quadrant and axillary lymph node status.

Statistical analysis

Standard statistical methods were used to analyse data. We used the ANOVA test to compare data with normal distribution and χ^2 test for non-parametric data. Fisher's exact test was performed in cases where sample sizes were small and binary logistic regression analysis was used to analyse tumor aggressiveness. A p-value of less than 0.05 was regarded as statistically significant. SPSS Statistics, version 19, was used for statistical analysis.

Results

Most of the patients had already begun treatment for stage II (157 patients; 57.5%) and III (87 patients; 31.9%). Post-menopausal women prevailed (n=191; 69.7%). More than half of the patients (173; 63.1%) had T2 tumors (2-5 cm). In 122 patients (44.5%) no clinical or histological metastatic disease in the regional lymph nodes was registered. The most common histological type of breast cancer was ductal carcinoma (172 patients; 62.8%), while almost one third of cases (90 patients; 32.8%) had lobular breast cancer. Ten cases had papillary histological type and 2 some of the other types of breast cancer. According to the localization of the primary tumor in breast quadrants, the most common site was the upper outer quadrant (129 patients; 47.1%). Two hundred and thirty-three (85%) patients had unifocal tumors, 14 (5.1%) had MC and 27 (9.9%) MF tumors (Table 1). Pathological analysis of postoperative breast cancer preparations of all patients showed that more than half of the patients had a relatively advanced stage of disease when the tumor had significant invasive and metastatic potential, and when its growth was mainly dependent on ER/PR status, and only in one quarter of the cases there was a significant HER-2 expression. Age differences between unifocal and MF and/or MC breast cancer were not statistically significant ($p = 0.825$). Analysing the impact of prognostic parameters we found that MF and MC tumors were related to stage II disease ($p = 0.020$) and the lobular histological type of breast cancer ($p < 0.0005$). MF/MC tumors most often occurred in the central and upper quadrants of the breast ($p < 0.0005$). MC or MF correlated with the metastatic status of regional lymph nodes ($p = 0.001$). MC tumors in a large percentage correlated with metastatic deposits in the regional lymph nodes (4-

Table 1. Epidemiological characteristics of breast cancer in the studied group

Characteristics	Patients, N	%
Age (years)		
20 - 30	3	1.1
30 - 40	7	2.6
40 - 50	77	28.1
50 - 60	84	30.7
60 - 70	69	25.2
70 - 80	34	12.4
Menstrual status		
Premenopausal	83	30.3
Postmenopausal	191	69.7
T stage		
T1	9	3.3
T2	70	25.5
T3	173	63.1
T4	22	8.0
N stage		
N0	122	44.5
N1 (< 4)	82	29.9
N2 (4 - 8)	40	14.6
N3 (> 8)	30	10.9
TNM stage		
I	28	10.3
II	157	57.5
III	87	31.9
IV	1	0.4
Histological type		
Ductal	172	62.8
Lobular	90	32.8
Papillary	10	3.6
Others	2	0.7
Quadrant		
Upper outer	129	47.1
Lower outer	28	10.2
Upper inner	48	17.5
Lower inner	19	6.9
Central	36	13.1
More than one quadrant	14	5.1
Focality		
Unifocal	233	85.0
Multifocal	27	9.9
Multicentric	14	5.1
Total	274	100.0

8 positive nodes), while MF tumors were mostly without metastases. MF and MC showed no correlation with tumor size, histological and nuclear grade, invasion of lymph and blood vessels and nerves. The same was true for ER, PR and HER-2 receptor. MF was significantly related to the lobular type of breast cancer, and ductal histological type was characteristic of unifocal tumors (Table 2). Most cases (85.7%) of MC tumors had lobular histology ($p < 0.0005$), while 68.7% of unifocal cases had ductal histological type. MC was correlated with advanced disease stages because 57% of unifocal

cal cancer occurred in stage II disease while 71.4% of patients with MC tumors had stage III disease with a positive correlation between MC and stage ($p=0.001$). This relationship was confirmed by the fact that in most cases MC tumors were positively correlated with the nodal status. MC tumors in 92.9% of the cases were associated with the presence of metastatic deposits in the regional lymph nodes, unlike unifocal tumors where such an association was seen in 54.9% of the cases ($p < 0.0005$). Stage II MF disease was found in 76.9% of the cases, while stage III MC disease was confirmed in 71.4% of the cases ($p=0.005$). According to these results, it is not surprising that MF tumors, in most cases, were not associated with metastasis in the regional lymph nodes (63%), unlike the MC tumors which were almost always associated with metastatic deposits in the regional lymph nodes ($p < 0.0005$) (Table 3). Advanced stage was 3-fold higher in premenopausal compared with postmenopausal patients (OR 0.347, 95% CI 0.126-0.955). Greater tumor size was related with more advanced disease stage ($p < 0.0005$) and increase in tumor diameter of 1 cm increased the risk of higher disease stage even 5.5 times (OR 5.506, 95% CI 2.587-11.720). MC tumors had 12-fold higher risk compared to unifocal tumors that the disease is in advanced stage, and thus 12-fold more worse prognosis (OR 12.126, 95% CI 1.842-79.933). Vascular invasion increased the probability of higher disease stage ($p < 0.0005$) and this risk was increased 4 times compared to tumors without invasion (OR 4.095, 95% CI 1.921-8.727). Tumor localization was significant for disease staging ($p=0.006$). Specifically, our results showed that tumors localized in the upper inner quadrant had the lowest risk to be associated with advanced disease and this risk was 10-fold lower than the worst localization of tumors in the central quadrant (OR 0.097, 95% CI 0.022-0.424). Expression of PR was a good prognostic factor because any increase in PR expression by 10% decreased the probability of the risk of advanced disease stage by 15% (OR 0.851, 95% CI 0.730-0.993) (Table 4). Analyzing factors contributing to the capacity of the tumor to metastasize to the regional lymph nodes, our results showed that this phenomenon depended on the size of primary tumor ($p=0.015$), presence of invasion of blood vessels ($p=0.001$) and tumor localization ($p < 0.0005$) (Table 5).

Discussion

Our results showed that more than half of the patients had undergone surgical treatment in a relatively advanced disease stage, when the tumor had a significant invasive and metastatic potential. Its growth was

Table 2. Relationship between unifocal and multifocal breast cancers by epidemiological and histopathological prognostic factors

	<i>Menstrual status</i>				p=0.352
	<i>Premenopausal</i>		<i>Postmenopausal</i>		
	<i>Patients, N</i>	<i>%</i>	<i>Patients, N</i>	<i>%</i>	
Unifocal	74	31.8	159	68.2	
Multifocal	7	25.9	20	74.1	
	<i>TNMstage</i>				p=0.257
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	
Unifocal	27 (11.6)	133 (57.1)	72 (30.9)	1 (0.4)	
Multifocal	1 (3.8)	20 (76.9)	5 (19.2)		
	<i>Tstage</i>				p=0.878
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	
Unifocal	8 (3.4)	59 (25.3)	147 (63.1)	19 (8.2)	
Multifocal	1 (3.7)	7 (25.9)	18 (66.7)	1 (3.7)	
	<i>Nstage</i>				p=0.321
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>0</i>	<i><4</i>	<i>4-8</i>	<i>>8</i>	
Unifocal	105 (4.5)	71 (30.5)	31 (13.3)	26 (11.2)	
Multifocal	17 (63.0)	5 (18.5)	2 (7.4)	3 (11.1)	
	<i>Histological type</i>				p=0.001
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Ductal</i>	<i>Lobular</i>	<i>Papillary</i>	<i>Others</i>	
Unifocal	160 (68.7)	61 (26.2)	10 (4.3)	2 (0.9)	
Multifocal	10 (37.0)	17 (63.0)			
	<i>Quadrant localization (%)</i>				
	<i>UOQ</i>	<i>LOQ</i>	<i>UIQ</i>	<i>LIQ</i>	<i>CQ</i>
Unifocal	51.1	11.2	16.7	8.2	12.9
Multifocal	37.0	7.4	33.3		22.2
	<i>Histological grade</i>				p=0.121
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>	
Unifocal	32 (13.7)	58 (24.9)	77 (33.0)	66 (28.3)	
Multifocal	2 (7.4)	12 (44.4)	9 (33.3)	4 (14.8)	
	<i>Nuclear grade (Ng)</i>			p=0.254	
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Ng 1</i>	<i>Ng 2</i>	<i>Ng 3</i>		
Unifocal	74 (31.8)	102 (43.8)	57 (24.4)		
Multifocal	11 (40.7)	14 (51.9)	2 (7.4)		
	<i>Lymphatic invasion</i>		p=0.595		
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Invasion negative</i>	<i>Invasion positive</i>			
Unifocal	50 (21.5)	183 (78.5)			
Multifocal	7 (25.9)	20 (74.1)			
	<i>Perineural invasion</i>		p=0.424		
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Invasion negative</i>	<i>Invasion positive</i>			
Unifocal	77 (33.0)	156 (67.0)			
Multifocal	11 (40.7)	16 (59.3)			
	<i>Vascular invasion</i>		p=0.161		
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Invasion negative</i>	<i>Invasion positive</i>			
Unifocal	152 (65.5)	80 (34.5)			
Multifocal	14 (51.9)	13 (48.1)			
	<i>HER-2 expression</i>		P=0.302		
	<i>Patients, N(%)</i>				
	<i>Expression negative</i>	<i>Expression positive</i>			
Unifocal	178 (76.4)	55 (23.6)			
Multifocal	23 (85.2)	4 (14.8)			

UOQ: upper outer quadrant, LOQ: lower outer quadrant, UIQ: upper inner quadrant, LIQ: lower inner quadrant, CQ: central quadrant

Table 3. Distribution of epidemiological and histopathological prognostic factors in multifocal and multicentric breast carcinoma

<i>Menstrual status, N(%)</i>	<i>Premenopausal</i>		<i>Postmenopausal</i>			
Multifocal	7	(25.9)	20	(74.1)		
Multicentric	2	(14.3)	12	(85.7)	p=0.393	
<i>Disease stage, N(%)</i>	<i>Stage</i>					
	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>		
Multifocal	1 (3.8)	20 (76.9)	5 (19.2)			
Multicentric		4 (28.6)	10 (71.4)		p=0.005	
<i>T stage, N(%)</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>		
Multifocal	1 (3.7)	7 (25.9)	18 (66.7)	1 (3.7)		
Multicentric		4 (28.6)	8 (57.1)	2 (14.3)	p=0.555	
<i>Nstage, N(%)</i>	<i>0</i>	<i>< 4</i>	<i>4- 8</i>	<i>> 8</i>		
Multifocal	17 (63.0)	5 (18.5)	2 (7.4)	3 (11.1)		
Multicentric		6 (42.9)	7 (50.0)	1 (7.1)	p < 0.0005	
<i>Histological type, N(%)</i>	<i>Ductal</i>	<i>Lobular</i>	<i>Papillary</i>	<i>Others</i>		
Multifocal	10 (37.0)	17 (63.0)				
Multicentric	2 (14.3)	12 (85.7)			p=0.129	
<i>Quadrant (%)</i>	<i>UOQ</i>	<i>LOQ</i>	<i>UIQ</i>	<i>LIQ</i>	<i>CQ</i>	
Multifocal	37.0	7.4	33.3		22.2	
Multicentric					100.0	p < 0.0005
<i>Histological grade, N(%)</i>	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	<i>G4</i>		
Multifocal	2 (7.4)	12 (44.4)	9 (33.3)	4 (14.8)		
Multicentric	2 (14.3)	2 (14.3)	8 (57.1)	2 (14.3)	p=0.244	
<i>Nuclear grade (Ng), N(%)</i>	<i>Ng 1</i>	<i>Ng 2</i>	<i>Ng 3</i>			
Multifocal	11 (40.7)	14 (51.9)	2 (7.4)			
Multicentric	3 (21.4)	10 (71.4)	1 (7.2)	p=0.471		
<i>Invasion of lymphatic vessels, N(%)</i>	<i>Invasion negative</i>		<i>Invasion positive</i>			
Multifocal	7 (25.9)		20 (74.1)			
Multicentric	2 (15.4)		12 (84.6)		p=0.455	
<i>Perineural invasion, N(%)</i>	<i>Invasion negative</i>		<i>Invasion positive</i>			
Multifocal	11 (40.7)		16 (59.3)			
Multicentric	3 (21.4)		11 (78.6)		p=0.216	
<i>Vascular invasion, N(%)</i>	<i>Invasion negative</i>		<i>Invasion positive</i>			
Multifocal	14 (51.9)		13 (48.1)			
Multicentric	9 (64.3)		5 (35.7)		p=0.447	
<i>Expression of HER-2, N(%)</i>	<i>Expression negative</i>		<i>Expression positive</i>			
Multifocal	23 (85.2)		4 (14.8)			
Multicentric	12 (85.7)		2 (14.3)		p=0.964	

mainly dependent on ER / PR, and only in one quarter of the cases there was a significant HER-2 expression. The most common histological type of breast cancer in this study was ductal carcinoma, while the lobular type was registered in only one third of the cases, which is consistent with the literature data [20]. According to the localization of the primary tumor in breast quadrants, the most common site was the upper outer quadrant. Multi-

focality and multicentricity of breast cancer, tumor size, histological and nuclear grade, invasion of lymph and blood vessels and nerves in the tumor showed no interdependence. The same was true for the expression of ER, PR and HER-2 receptors. Multicentricity, as an important feature, is related to the lobular type of breast cancer, while ductal histological type is characteristic of unifocal tumors. MC disease was an extremely unfavorable

Table 4. Epidemiological and pathological factors of breast cancer affecting the stage of disease and prognosis

Variables	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Age	0.039	0.022	3.091	1	0.079	1.040	0.996	1.086
Menstrual status	-1.058	0.516	4.203	1	0.040	0.347	0.126	0.955
Tumor size	1.706	0.385	19.590	1	0.000	5.506	2.587	11.720
Histological type			3.702	3	0.295			
Ductal	2.024	15.740	0.017	1	0.898	7.568	0.000	18905501
Lobular	1.114	15.741	0.005	1	0.944	3.045	0.000	76330746
Others	2.256	15.767	0.020	1	0.886	9.548	0.000	25161254
Multifocality or multicentricity		8.390	2	0.015				
Multifocal	-0.503	0.668	0.567	1	0.451	0.604	0.163	2.241
Multicentric	2.495	0.962	6.735	1	0.009	12.126	1.842	79.833
Histological grade	0.032	0.425	0.006	1	0.939	1.033	0.449	2.376
Nuclear grade	-0.486	0.481	1.023	1	0.312	0.615	0.240	1.578
Perineural invasion	0.793	0.610	1.689	1	0.194	2.209	0.668	7.301
Invasion of lymphatic vessels	0.660	0.530	1.552	1	0.213	1.935	0.685	5.467
Vascular invasion	1.410	0.386	13.332	1	0.000	4.095	1.921	8.727
HER-2 status	-0.042	0.424	0.010	1	0.921	0.959	0.418	2.200
Localization (quadrant)			14.370	4	0.006			
Upper outer	-0.038	0.520	0.005	1	0.942	0.963	0.347	2.669
Lower outer	0.431	0.650	0.439	1	0.507	1.539	0.430	5.504
Upper inner	-2.332	0.752	9.618	1	0.002	0.097	0.022	0.424
Central	-0.294	0.772	0.145	1	0.704	0.745	0.164	3.387
ER status	0.032	0.070	0.207	1	0.649	1.032	0.900	1.183
PR status	-0.161	0.079	4.198	1	0.040	0.851	0.730	0.993
Constant	-8.423	15.773	0.285	1	0.593	0.000		

Table 5. Epidemiological and pathological factors of breast cancer affecting the appearance of metastases in regional lymph nodes

Variables	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Multifocality or multicentricity			2.325	2	0.313			
Multifocal	-0.810	0.582	1.937	1	0.164	0.445	0.142	1.392
Multicentric	8.910	14.621	0.371	1	0.542	7402.496	0.000	20630495
Age	-0.012	0.021	0.301	1	0.583	0.988	0.948	1.030
Menstrual status	0.051	0.500	0.010	1	0.919	1.052	0.395	2.802
Tumor size	0.718	0.295	5.946	1	0.015	2.051	1.151	3.654
Histological type			3.393	3	0.335			
Ductal	-0.997	1.598	0.389	1	0.533	0.369	0.016	8.457
Lobular	-1.726	1.583	1.189	1	0.276	0.178	0.008	3.963
Others	-1.456	1.651	0.778	1	0.378	0.233	0.009	5.927
Histological grade	-0.412	0.408	1.020	1	0.313	0.662	0.297	1.474
Nuclear grade	-0.179	0.445	0.162	1	0.687	0.836	0.349	2.001
Perineural invasion	0.321	0.476	0.454	1	0.500	1.379	0.542	3.507
Invasion of lymphatic vessels	1.204	0.422	8.154	1	0.004	3.333	1.459	7.617
Vascular invasion	1.308	0.391	11.168	1	0.001	3.699	1.718	7.965
HER-2 status	0.595	0.440	1.825	1	0.177	1.812	0.765	4.294
ER status	0.007	0.067	0.012	1	0.915	1.007	0.883	1.149
PR status	-0.048	0.069	0.491	1	0.484	0.953	0.833	1.091
Localization			24.915	4	0.000			
Upper outer quadrant	-0.002	0.489	0.000	1	0.997	0.998	0.383	2.604
Lower outer quadrant	1.604	0.725	4.893	1	0.027	4.973	1.201	20.601
Upper inner quadrant	-1.873	0.595	9.894	1	0.002	0.154	0.048	0.494
Central quadrant	-0.375	0.692	0.295	1	0.587	0.687	0.177	2.666
Constant	-0.111	1.870	0.004	1	0.953	0.895		

prognostic sign in our results, since it was frequently associated with axillary lymph nodes metastasis and with advanced disease stage. Fifty-five percent of the cases of unifocal cancer had stage II disease while MC tumors in 71.4% of the cases had stage III disease at the time of initiation of therapy, with a positive correlation between multicentricity and stage. Certainly, this relationship is confirmed by the fact that in most cases, MC tumors were positively correlated to the nodal status. MC tumors in 92.9% of the cases were associated with the presence of metastatic deposits in the regional lymph nodes, while unifocal tumors were associated with nodal metastasis in only 54.9% ($p < 0.0005$). Comparing the two characteristics (multicentricity and multifocality), we found that MF cancers are usually diagnosed in stage II of the disease (76.9%), while MC tumors are diagnosed in the unfavorable stage III (71.4%). This difference was of great importance. According to this result, it is not surprising that MF tumors, in most cases, are not associated with metastasis to the regional lymph nodes, unlike the MC tumors which are almost always associated with nodal metastasis with highly significant difference. According to the literature, if aggregate diameters are used, unifocal and MF breast carcinomas are similar with respect to the frequency of regional lymph node metastasis [21]. Using binary logistic regression analysis to examine the material, the obtained results indicated that the initial diagnosis of a tumor in stage III was primarily dependent on the menstrual status ($p = 0.040$). Treatment initiation at an advanced stage of disease is 3-fold more common in premenopausal than in postmenopausal women. This fact is not unexpected because in premenopausal women, estrogen deprivation (by surgical or pharmaceutical castration) is very effective and has become the adjuvant treatment of choice [22]. MC tumors are discovered in advanced stage 12-fold more common compared to unifocal tumors. The existence of vascular invasion increases the probability of higher disease stage and this risk is increased 4 times compared to tumors without invasion. Our results showed that tumor localization in the breast as well as expression of PR is associated with disease stage, which is consistent with literature data [23]. Tumor size directly affects the occurrence of metastasis to the regional lymph nodes [24]. However, in the presence of vascular invasion, regardless of tumor size, the risk of nodal metastasis is increased about 4 times.

Based on these data we believe that all lobular breast cancers should be treated with radical surgery, because they are often associated with MC disease and metastases to the axillary lymph nodes. Yet, some authors reported that in selected patients with MF/MC breast cancer, wide conservative surgery was proven to be safe [25].

Acknowledgements

Part of this research was supported by the Ministry of Education and Science of Serbia, Grants III41007 and III41010.

References

- Ginsburg OM, Love RR. Breast cancer: a neglected disease for the majority of affected women worldwide. *Breast J* 2011; 17: 289-295.
- Jacobi CE, de Bock GH, Siegerink B, van Asperen CJ. Differences and similarities in breast cancer risk assessment models in clinical practice: which model to choose? *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 381-390.
- Gail MH, Brinton LA, Byar DP et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1879-1886.
- Mealiffe ME, Stokowski RP, Rhees BK, Prentice RL, Petteinger M, Hinds DA. Assessment of clinical validity of a breast cancer risk model combining genetic and clinical information. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1618-1627.
- Owens WL, Gallagher TJ, Kincheloe MJ, Ruetten VL. Implementation in a large health system of a program to identify women at high risk for breast cancer. *J Oncol Pract* 2011; 7: 85-88.
- Oh JL. Multifocal or multicentric breast cancer: understanding its impact on management and treatment outcomes. In: Hayat MA (Ed): *Methods of cancer diagnosis therapy and prognosis*. Springer, New York, 2008, 1, pp 583-587.
- Houssami N, Ciatto S, Macaskill P et al. Accuracy and surgical impact of magnetic resonance imaging in breast cancer staging: systematic review and meta-analysis in detection of multifocal and multicentric cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3248-3258.
- Cabioglu N, Ozmen V, Kaya H et al. Increased lymph node positivity in multifocal and multicentric breast cancer. *J Am Coll Surg* 2009; 208: 67-74.
- Oh JL, Dryden MJ, Woodward WA et al. Locoregional control of clinically diagnosed multifocal or multicentric breast cancer after neoadjuvant chemotherapy and locoregional therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4971-4975.
- Mahoney L, Csima A. Efficiency of palpation in clinical detection of breast cancer. *Can Med Assoc J* 1982; 127: 729-730.
- Biglia N, Bounous VE, Martincich L et al. Role of MRI (magnetic resonance imaging) versus conventional imaging for breast cancer presurgical staging in young women or with dense breast. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 199-204.
- Rotaru N, Luciani A. Magnetic resonance imaging of the breast: potential for lesion characterization. *J BUON* 2004; 9: 77-82.
- El Khouli RH, Jacobs MA, Bluenke DA. Magnetic resonance imaging of the breast. *Semin Roentgenol* 2008; 43: 265-281.
- Millet I, Bouic-Pages E, Hoa D, Azria D, Taourel P. Growth of breast cancer recurrences assessed by consecutive MRI. *BMC Cancer* 2011; 11: 155 doi: 10.1186/1471-2407-11-155.
- Liu YH, Ye JM, Xu L et al. Effectiveness of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in evaluating clinical responses to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 194-198.

16. Cooper KL, Meng Y, Haman S et al. Positron emission tomography (PET) and magnetic resonance imaging (MRI) for the assessment of axillary lymph node metastases in early breast cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2011; 15: 1-134.
17. Walter C, Scheidhauer K, Scharl A et al. Clinical and diagnostic value of preoperative MR mammography and FDG-PET in suspicious breast lesions. *Eur Radiol* 2003; 13: 1651-1656.
18. Jamison KR, Wellisch DK, Pasnau RO. Psychosocial aspects of mastectomy: I. the women's perspective. *Am J Psychiatry* 1978; 135: 432-436.
19. Bartelink H, van Dam F, van Dongen J. Psychological effects of breast conserving therapy in comparison with radical mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985; 11: 381-385.
20. Choi YJ, Seong MH, Choi SH et al. Ultrasound and clinicopathological characteristics of triple receptor-negative breast cancers. *J Breast Cancer* 2011; 14: 119-123.
21. Andea AA, Wallis T, Newman LA, Bouwman D, Dey J, Visscher DW. Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 1383-1390.
22. Neskovic-Konstantinovic Z, Filipovic S. The role of endocrine therapy in early breast cancer: adjuvant treatment of pre and postmenopausal patients. *J BUON* 2003; 8: 11-17.
23. Bogina G, Bortesi L, Marconi M et al. Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss. *Virchow's Arch* 2011; 459: 1-10.
24. Tot T. The metastatic capacity of multifocal breast carcinomas: extensive tumors versus tumors of limited extent. *Hum Pathol* 2009; 40: 199-205.
25. Eryilmaz MA, Mushumanoglu M, Ozmen V, Igci A, Koc M. Breast conserving surgery in patients with multifocal/multicentric breast cancer. *J BUON* 2011; 16: 450-453.

Int J Clin Exp Med 2013;6(3):227-230
www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM1212003

Case Report

Cancer of ectopic parathyroid gland presentation of the disease with a case report

Jovan P Pesovic¹, Bojan Z Milosevic^{1,2}, Dragan S Canovic^{1,2}, Aleksandar M Cvetkovic^{1,2}, Milos Z Milosavljevic³, Jasna D Jevdjic^{2,4}, Miladen D Pavlovic^{1,2}, Marko D Petrovic²

¹Department of Endocrine Surgery, Surgical Clinic, Clinical Centre Kragujevac, Serbia; ²Faculty of Medical Sciences, The University of Kragujevac, Serbia; ³Department of Pathology, Clinical Centre, Kragujevac, Serbia; ⁴Center for Anesthesiology and Resuscitation, Clinical Centre, Kragujevac, Serbia

Received December 13, 2012; Accepted January 22, 2013; Epub March 21, 2013; Published March 31, 2013

Abstract: Tc-99m-methoxyisobutylisonitri (MIBI) scintigraphy is localizing diagnostic methods that is used for detection of sicken parathyroid gland (PT). The use of this method for PT diseases diagnosis makes surgical treatment of a patient more successful. This is a report about the patient who was surgically treated for primary hyperparathyroidism caused by hyperplasia of parathyroid glands and cancer of ectopic parathyroid gland. He was operated in two acts. The first surgical intervention was performed without preoperative diagnostics of Tc-99m-MIBI scintigraphy, while the second surgical intervention was preceded by Tc-99m-MIBI scintigraphy which clearly showed the existence of tumor in the back mediastinum (ectopic parathyroid gland). Pathophysiological analysis of the extirpated parathyroid gland showed the case of ectopic parathyroid gland cancer. The use of Tc-99m-MIBI scintigraphy as a localizing method before the first surgical intervention could have saved the patient from the second one and from risks it could have caused, as well.

Keywords: Tc-99m-MIBI scintigraphy, primary hyperparathyroidism, cancer

Introduction

Primary hyperparathyroidism is a disease characterized by increased secretion of parathyroid hormone (PTH) caused by hyperfunction of one or more parathyroid glands. Enlarged PTH concentration in the circulation causes hypercalcemia and hypophosphatemia. Clinical manifestation of the disease can be hardly noticeable and it can have a benign course for many years. The disease can sometimes start suddenly with life-threatening complications (dehydration and coma), known as hypercalcemic parathyroid crisis. Those who have PHPT can have numerous symptoms and signs, such as kidney calculosis, peptic ulcer, constipations, mental changes, cardiovascular disorders, and demineralization of bone tissue in more serious cases of PHPT. Direct cause of PHPT genesis is unknown but it is considered to be genetically conditioned [1-3]. Hyperplasia, adenoma, and PT cancer are basic PHPT pathoanatomical substrates. In hereditary cases demonstration

is either isolated – familial hyperparathyroidism (in which case only primary hyperparathyroidism is hereditary) or integral part of multiple endocrine neoplasia type 1 and 2 (MEN1 and MEN2). X-ray of head and neck area is considered as one of the etiologic factors of sporadic hyperparathyroidism. Cancer as a cause of PHPT is rare and it has been found in 0.5–5% cases of PHPT [1-3]. PHPT diagnosis is strictly established by laboratory analyses [4]. Basic parameters are: hypercalcemia, enlarged parathyroid hormone, hypophosphatemia, and calcuria. Symptomatic PHPT treatment is strictly surgical. Failure of surgical PHPT treatment is about 10% and this can be imputed to inadequate preoperative localization of PHPT causes [5]. Localizing examinations can be non-invasive and invasive. Non-invasive methods include ultrasound diagnostics (U), scintigraphy (Tc-99m-MIBI scintigraphy is mainly used), computerized tomography (CT), magnetic resonance (MRI), and X-ray diagnostics [6]. Biopsy with a thin needle under the control of ultra-

Cancer of ectopic parathyroid gland

Table 1. Laboratory analyses before and after the operation

Laboratory parameter	Preoperative	Postoperative
Serum calcium	3.41	1.93
Inorganic phosphate	0.50	1.11
Magnesium	0.35	0.71
PTH	1,270.00	15.60

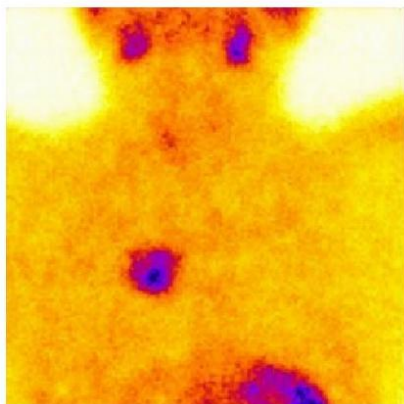


Figure 1. Late phase of parathyroid gland scintigraphy. Isotope Tc-99m-MIBI.

sound, selective arteriography, and selective vein catheterization are used in invasive localizing examinations.

Case description

A 54-year-old male patient had many difficulties for a few last years: renal colics, polyuria, depression, pains in his muscles and bones, hypertension, as well as pathologic fractures of left lower leg and left forearm. After several hospitalizations, a primary hyperparathyroidism was diagnosed; diagnosis was based on laboratory findings (serum calcium, PTH). It was determined by standard diagnostic procedures (US, scintigraphy, hormone status) that there was inactive solitary nodus in the left lobe of thyroid gland. Enlarged values of serum calcium, low values of inorganic phosphates, and high values of PTH (**Table 1**) were laboratory confirmed. After the preoperative preparation which consisted of implementation of calcium antagonists (30 mg of pamidronate-Aredia), bisphosphonates, corticosteroids (last value of

serum calcium was 2.86 mmol/L), and infusions of crystalloid solutions, the patient was operated on. Left lobo isthmectomy, right sub-total parathyroidectomy, and left parathyroidectomy with resection of cervical thymus were performed. PH finding showed hyperplasia of removed parathyroid glands. PH finding: Primary, nodular hyperplasia of PT with dominance of main cells and scattered follicular histological organization. Soon after the surgery, a slight fall of serum calcium value (2.87 mmol/L) occurred. The patient was released. Symptoms of PHPT were still present at the checkup. Laboratory analyses showed enlarged values of serum calcium (3.16 mmol/L), low values of inorganic phosphate (0.36 mmol/L), and enlarged values of PTH (1150 pg/mL), which indicated the existence of ectopic parathyroid tissue. To localize it, we used Tc-99m-MIBI scintigraphy, and computerized tomography (CT). Tc-99m-MIBI scintigraphy registered pathologic radio-markers accumulation in right upper half of the back mediastinum. Diphasic scintigraphy of neck and mediastinum area was performed 10 minutes after the initiation of 555MBq Tc-99m-MIBI, and again 2 hours later. Previously made scintigrams (thyroid phase) showed radio-drugs accumulation in projection of upper mediastinum (close to lung apexes). The second scintigram (parathyroid phase), after it was rinsed out, showed a slight radio-drugs accumulation in projection of the thyroid gland remainders; the area of radio-drugs was also detected in the upper mediastinum (along the lung apexes, mostly on the right side), which scintigraphy matches to ectopically localized tissue of parathyroid gland (**Figure 1**). Computerized tomography with the window for the mediastinum in the middle back mediastinum retro and in right parallel indicated a multilocular septal tumor shade with peripheral calcificate and septa calcification, attenuation of soft tissues sized 45*55*65 mm. The change dislocated esophagus and trachea to the opposite side and it was in a close contact with ascending aorta. The second surgery consisted of partial sternotomy and extirpation of the tumorous change sized about 6*10 cm. PH finding of the extirpated tumor change: Carcinoma glandulae parathyroideae (middle differentiated histologic type) (**Figure 2**). Postoperative course went on without any surgical complications. The value of serum calcium and parathormone fell down soon after the

Cancer of ectopic parathyroid gland

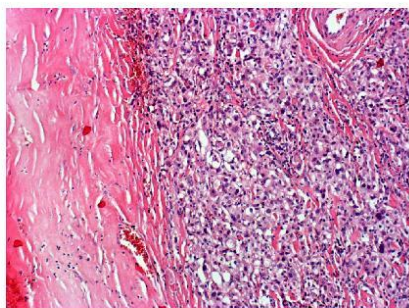


Figure 2. Carcinoma glandulae parathyroideae (middle differentiated histologic type).

surgery (**Table 1**). Postoperative substitutional therapy (Ca-Sandoz, CaCl₂, Alfacalcidol, Mg) was implemented. Six days after the surgery the patient was transferred to Metabolic Department of Internal Clinic where his treatment was continued with calcium medicines, magnesium, active type of vitamin D, ACE inhibitors, calcium antagonists, antibiotics, low-molecular heparin, followed by constant monitoring of electrolytic, acid-basic and chemodynamics status and necessary correction of them. Period of parenteral compensation lasted for a long time (about 3 months) which explains the intensity and duration of PHPT. Implemented therapy led to subjective and objective improvement so recovered and examined patient was released to further ambulatory treatment with following therapy: Calcium gluconate, ascorbic acid 500 milligrams tablets 2+2+2, Alfacalcidol 0.25 milligrams tablets 2+2+2, Magnesium hydroxide 150 milligrams tablets 1+0+1, Quinapril 20 milligrams tablets 1+0+1, Amlodipine 5 milligrams tablet 1+0+0.

Discussion

Laboratory diagnostic methods (values of serum calcium, calciuria, and PTH) are the basis for establishing the diagnosis of parathyroid glands diseases [1-4]. Surgical treatment of parathyroid gland diseases demands their precise localization which emphasizes the importance of localizing examinations in preoperative procedure [5-7]. Localizing examinations can be invasive and non-invasive. Non-invasive methods are: ultrasound diagnostics (US), scintigraphy (Tc-99m-MIBI scintigraphy has priority), computerized tomography (CT),

and magnetic resonance (MRI). Biopsy with a thin needle under the control of ultrasound, selective arteriography, and selective vein catheterization are used in invasive localizing examinations.

Ferlin was the first who used double radio-isotopic scintigraphy with ²⁰¹Tl-chloride and Tc-99m pertechnetate in order to visualize parathyroid glands [8]. There are many controversies about the usage of localizing examinations before the first operation. Preoperative localizing examinations are not used for the first operation in most of the cases mostly because of the general opinion that an experienced surgeon will almost always find sickened parathyroid gland during the first operation. This attitude is supported by the fact that localizing examinations are of little importance for hyperplasias of parathyroid glands. Doppman, the radiologist, has the same opinion; he thinks that the only thing important for the localization of the pathologically changed parathyroid gland is an experienced surgeon [9]. However, frequent need for the second operation in PHPT treatment has imposed the need for localizing examinations [10-12].

Conclusion

Localizing methods, especially Tc-99m-MIBI scintigraphy, CT, MRI, and US are important in preoperative diagnostics of pathologic conditions of parathyroid gland. The presented case shows that implemented Tc-99m-MIBI scintigraphy in combination with CT localized etiologic cause of PHPT; it also shows that the usage of localizing diagnostic procedures would reduce the need for secondary surgery and all the risks that might appear.

Acknowledgement

The part of this research is supported by Ministry of Education in Serbia, Grants III41007 and III41010.

Address correspondence to: Dr. Bojan Z Milosevic, Faculty of Medical Sciences, The University of Kragujevac, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia. Phone: +38163625686; Fax: +3813450008; E-mail: drbojanzm@gmail.com

References

- [1] Akerstrom G and Hellman P. Primary hyperparathyroidism. *Curr Opin Oncol* 2004; 16: 1-7.

Cancer of ectopic parathyroid gland

- [2] Brown EM. The pathophysiology of primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res* 2002; 17 Suppl 2: N24-29.
- [3] Dotzenrath C, Goretzki PE, Farnebo F, Teh BT, Weber G, Roher HD and Larsson C. Molecular genetics of primary and secondary hyperparathyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104 Suppl 4: 105-107.
- [4] Rothmund M, Diethelm L, Brunner H and Kummerle F. Diagnosis and surgical treatment of mediastinal parathyroid tumors. *Ann Surg* 1976; 183: 139-145.
- [5] Mariani G, Gulec SA, Rubello D, Boni G, Puccini M, Pelizzo MR, Manca G, Casara D, Sotti G, Erba P, Volterrani D and Giuliano AE. Preoperative localization and radioguided parathyroid surgery. *J Nucl Med* 2003; 44: 1443-1458.
- [6] Moka D, Voth E, Dietlein M, Larena-Avellaneda A and Schicha H. Technetium 99m-MIBI-SPECT: A highly sensitive diagnostic tool for localization of parathyroid adenomas. *Surgery* 2000; 128: 29-35.
- [7] Mimura Y, Kanauchi H, Ogawa T, Kamori M and Kaminishi M. Review of 41 patients operated on for primary hyperparathyroidism. *Biomed Pharmacother* 2000; 54 Suppl 1: 72s-76s.
- [8] Ferlin G, Borsato N, Camerani M, Conte N and Zotti D. New perspectives in localizing enlarged parathyroids by technetium-thallium subtraction scan. *J Nucl Med* 1983; 24: 438-441.
- [9] JL D. Reoperative parathyroid surgery: localization procedures, parathyroid surgery. *Prog Surg* 1968; 1171-1175.
- [10] Clark PB, Case D, Watson NE Jr, Perrier ND and Morton KA. Enhanced scintigraphic protocol required for optimal preoperative localization before targeted minimally invasive parathyroidectomy. *Clin Nucl Med* 2003; 28: 955-960.
- [11] Krausz Y, Bettman L, Guralnik L, Yosilevsky G, Keidar Z, Bar-Shalom R, Even-Sapir E, Chisin R and Israel O. Technetium-99m-MIBI SPECT/CT in primary hyperparathyroidism. *World J Surg* 2006; 30: 76-83.
- [12] Melton GB, Somervell H, Friedman KP, Zeiger MA and Cahid Civelek A. Interpretation of 99mTc sestamibi parathyroid SPECT scan is improved when read by the surgeon and nuclear medicine physician together. *Nucl Med Commun* 2005; 26: 633-638.