

# Prognostička vrijednost ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u invazivnom karcinomu dojke

---

**Puzović, Velibor**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2014**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:333858>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-27**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Velibor Puzović**

**PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST EKSPRESIJE ETS-1,  
MMP-2 I MMP-9 U INVAZIVNOM KARCINOMU  
DOJKE**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Split, 2014.**

**Ovaj rad je izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pod vodstvom prof.dr.sc. Jasminke Jakić-Razumović, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog znanstvenog studija "Biologija novotvorina" pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.**

**Zahvaljujem se svim djelatnicima Kliničkog zavoda za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb što su mi nesebično prenijeli svoje znanje i davali savjete od neprocjenjive koristi tijekom specijalizacije i izrade ovog doktorskog rada.**

**Veliko hvala predavačima Medicinskog fakulteta Sveučilištu u Splitu i poslijediplomskog studija "Biologija novotvorina" koji su mi približili molekularne osnove onkogeneze i koji su me usmjerili u istraživački rad.**

**Posebno zahvaljujem svojoj mentorici, prof.dr.sc. Jasminki Jakić -Razumović na strpljenju, nabavci materijala za praktični dio rada, vodstvu pri svim fazama pisanja i izrade rada te svesrdnoj pomoći i potpori.**

**Rad posvećujem svojoj obitelji i neizmjereno im zahvaljujem na pruženoj ljubavi i bezuvjetnoj podršci.**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epidemiologija karcinoma dojke.....	1
1.2. Klasifikacija karcinoma dojke.....	5
1.2.1. Histološka klasifikacija tumora dojke.....	5
1.2.1.1 Invazivni karcinom bez posebnog histološkog tipa.....	10
1.2.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke .....	12
1.2.3. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke.....	16
1.3. Dijagnostika karcinoma dojke .....	17
1.4. Prognostički i prediktivni čimbenici karcinoma dojke .....	21
1.5. Matriks metaloproteinaze .....	30
1.6. Onkogeni i tumor supresorski geni .....	36
1.7. Molekularni i genetski profil tumora .....	43
1.8. Liječenje raka dojke .....	44
1.8.1. Kirurško liječenje karcinoma dojke.....	44
1.8.2. Adjuvantna terapija .....	45
1.8.3. Hormonska terapija .....	46
1.8.4. Citostatsko liječenje .....	47
1.8.5. Imunoterapija .....	48
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZA RADA</b> .....	<b>50</b>
2.1. Ciljevi rada .....	50
2.2. Hipoteza rada .....	50
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>51</b>
3.1. Analiza mikroskopskih preparata .....	51
3.2. Uklapanje uzoraka u tkivne „mikročipove“ (eng. tissue microarray-TMA).....	51
3.3. Stupanj diferenciranosti tumora.....	54
3.4. Proliferacijski indeks .....	54
3.5. Steroidni receptori .....	55
3.6. Izraženost HER-2/neu .....	56
3.7. Pacijentice i analiza podataka medicinske dokumentacije.....	57
3.8. Statistička obrada.....	58
3.9. Identitet pacijentica i etička načela .....	58
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>59</b>
4.1. Opis ispitivanog uzorka pacijentica s rakom dojke .....	59
4.2. Analiza povezanosti međusobnih ekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 .....	71
4.2.1. Povezanost ekspresije ETS-1 sa gelatinazama .....	71
4.2.2. Usporedba ekspresije MMP-2 sa ekspresijom MMP-9.....	71

4.3.	<i>Usporedba ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima .....</i>	71
4.4.	<i>Usporedba koekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima .....</i>	76
4.5.	<i>Praćenje pacijentica i analiza preživljenja .....</i>	76
4.5.1.	<i>Kaplan -Meier analiza .....</i>	76
4.5.2.	<i>Univarijatna logistička regresija .....</i>	86
4.5.3.	<i>Multivarijatna logistička regresija .....</i>	90
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA .....</b>	93
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	103
<b>7.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	104
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK .....</b>	117
<b>9.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	118
<b>10.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	119

# POPIS OZNAKA I KRATICA

<b>Kratika</b>	<b>značenje</b>
AJCC	engl. American Joint Committee on Cancer
AF1, AF2	engl. activation function 1 i 2, dvije domene estrogenskog receptora
ALH	atipična lobularna hiperplazija
AML1	engl. acute myeloid leukemia 1 protein
ANDI	engl. aberrations of normal development and involution
AOL	engl. Adjuvant Online Programme
AP1, AP2	engl. activator protein 1 and 2
ATM	engl. ataxia telangiectasia mutated
BAD	engl. BCL2-associated death promoter
BAG 1	engl. BCL2-associated gene 1
BAX	engl. BCL2-associated X protein
BCL2	engl. B-cell lymphoma 2
BI-RADS	engl. Breast Imaging Reporting and Data System
BRCA 1 i 2	engl. breast cancer 1 i 2
CAF	engl. cancer associated fibroblasts
CBP/p300	kompleks proteina, engl. CREB-binding protein/p300
CD	engl. cluster of differentiation
CDK	kinaze ovisne o ciklinu engl. cyclin dependent kinases
CEACAM6	engl. carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule
CHEK2	engl. checkpoint kinase 2
CISH	engl. chromogenic in situ hybridization
CK	citokeratin
CMF	ciklofosamid, metotreksat, fluorouracil
CNB	centrolobin
CREB	engl. cAMP response element-binding protein
D240	antigen limfnih žila D240
Daxx/EAP1	kompleks proteina engl. death-associated protein 6/ Enhanced at puberty protein 1
DCIS	duktalni karcinom in situ
DFS	engl. disease-free survival
EBCTCG	engl. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group
EBS	engl. ETS binding site
ECD	engl. extracellular domain
EGFR	engl. epidermal growth factor receptor
ELISA	engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	epitelni membranski antigen
EMMPRIN	engl. extracellular matrix metalloproteinase inducer
EMT	epitelno mezenhimalna tranzicija
ER	estrogenski receptor
ERG	engl. ETS-related gene
ERM	kompleks 3 proteina: ezrin, radiksin, moesin
ETS-1	transkripcijski faktor ETS-1 (engl. E26 transformation specific -1)
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
FGF	engl. fibroblast growth factor
FNAC	engl. fine needle aspiration cytology

GAPDH	engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRB7	engl. growth factor receptor-bound protein 7
GSTM1	engl. glutathione S-transferase Mu 1
GUS	beta glukuronidaza
HER	engl. human epidermal growth factor receptor
HIF2 $\alpha$	engl. hypoxia inducible factor 2 $\alpha$
HOXB13	engl. homeobox protein B13
IARC	engl. International Agency for Research on Cancer
IL17BR	engl. interleukin-17 receptor B
Ki-67	nuklearni antigen, marker proliferacije
Ki-S1	protutijelo na topoizomerazu 2
LCIS	lobularni karcinom in situ
LDL	engl. low density lipoprotein
LHRH	engl. luteinizing-hormone-releasing hormone
LN	lobularna neoplazija
LKB1/STK11	kompleks proteina, engl. liver kinase B1/ Serine/threonine kinase 11
MAPK	engl. mitogen activated protein kinaze
MIB-1	protutijelo protiv antigena Ki67
MMP-2	metaloproteinaza 2, gelatinaza A
MMP-9	metaloproteinaza 9, gelatinaza B
MYBL2	engl. myb-related protein B
NCHG	engl. Nottingham Combined Histologic Grade
NF- $\kappa$ B	engl. nuclear factor kappa-light-chain
NPI	Nottinghamski prognostički indeks
NST	engl. no special type
OS	engl. overall survival
PAI-1	engl. plasminogen activator inhibitor-1
PARP	poli (ADP-riboza)polimeraza
Pax5	engl. paired box protein 5
PCNA	engl. proliferating cell nuclear antigen
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDEF	engl. pointed domain-containing Ets transcription factor
PgR	progesteronski receptor
Pit1	engl. pituitary-specific transcription factor
PNT	engl. pointed, domena ETS proteina
PRL	prolaktin
PTEN	engl. phosphatase and tensin homolog
PTHrP	engl. paratiroid hormon related protein
PTK	protein tirozin kinaza
RPLPO	engl. human large ribosomal protein
RECK	engl. reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
ROC	engl. receiver operating characteristic
RS	engl. recurrence score
SCUBE2	engl. signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
SERD	engl. selective estrogen receptor down regulators
SERM	engl. selective estrogen receptor modulator
SISH	engl. silver in situ hybridization
SLN	engl. sentinel lymph node, limfni čvor stražar
Smad	engl. mothers against decapentaplegic homolog 1

Sp1	engl. specificity protein 1
SPF	engl. S-phase fraction
STK15	serine/threonine-protein kinase 15
TDLU	engl. terminal duct-lobular unit
TGF $\alpha$ , TGF- $\beta$	engl. transforming growth factor $\alpha$ , $\beta$
TIL	engl. tumour Infiltrating lymphocytes
TIMP	engl. tissue inhibitors of metalloproteinases
TFO	engl. triplex forming oligonucleotides
TFRC	engl. transferrin receptor protein 1
TLI	engl. thymidine labeling index
TMA	engl. tissue microarray
TNM	engl. tumour, node, metastasis
UICC	franc. Union Internationale Contre le Cancer
uPA	urokinaza plazminogen aktivator
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor



# 1. UVOD

## 1.1. Epidemiologija karcinoma dojke

### Učestalost i smrtnost

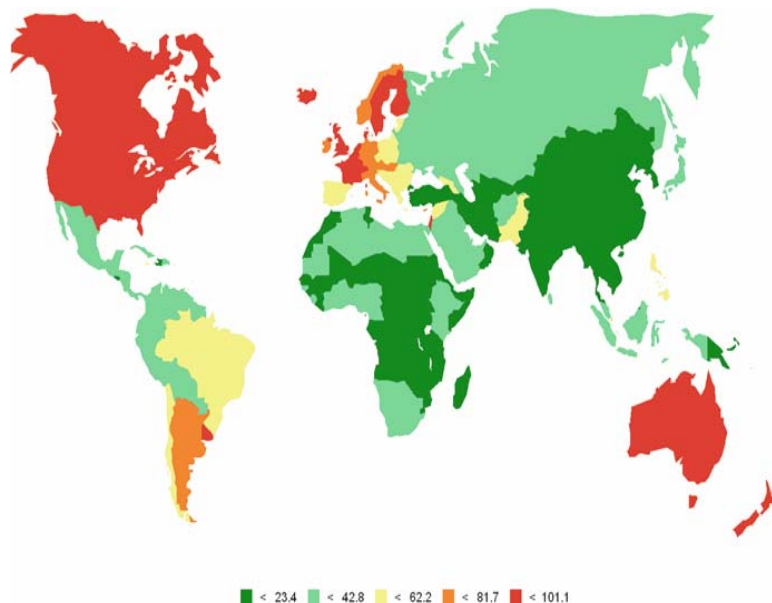
Rak dojke je najučestalija zloćudna bolest kod žena i jedan od najvećih zdravstvenih problema razvijenih zemalja svijeta. Prema statističkim podacima iz svih dijelova svijeta, predstavlja najčešće dijagnosticiranu zloćudnu bolest kod žena i čini 27-32% svih primarnih malignih tumora. U razvijenom se svijetu kod žena pojavljuje dvostruko češće od bilo kojeg primarnog karcinoma drugog sijela (1), a u razvijenim će zemljama svaka sedma do deseta žena oboliti od karcinoma dojke (2). Godišnje se u svijetu dijagnosticira oko 1,4 milijuna novih slučajeva, a polovica broja opada na zemlje u razvoju. Incidencije izrazito variraju te je u Mongoliji i Butanu 2008. g. iznosila 8/100 000, a u Belgiji 109,4/100 000. Incidencija je visoka u Sjevernoj Americi, Australiji, Novom Zelandu te južnoj i zapadnoj Europi. Srednje je visoka u istočnoj Europi, a niska u većim dijelovima Afrike i Azije. Velika razlika u incidenciji i u zemljopisnoj distribuciji vjerojatno odražava loše uspostavljen sistem probira i registracije karcinoma u nerazvijenim zemljama (3), (Slika 4).

Tijekom nekoliko prethodnih desetljeća incidencija se povećala gotovo posvuda u svijetu, a najveći je porast zabilježen u zemljama koje su, povijesno gledano, imale nisku incidenciju (3). Invazivni je karcinom dojke vodeći pojedinačni uzrok smrti žena u dobi od 40 do 49 godina, a 2008. g. uzrokovao je smrt kod 458 400 žena u svijetu (4).

Metode probira, rana dijagnostika i adekvatno liječenje općenito pridonose povećavanju preživljenih pacijentica s karcinomom dojke u razvijenim zemljama kao što su Australija, SAD i Kanada. Međutim, smrtnost se konstantno povećava u nekim zemljama kao što su Japan, Rusija i Južna Koreja (1).

### Učestalost i smrtnost u Hrvatskoj

U Hrvatskoj je karcinom dojke najčešća maligna bolest kod žena, a na vrhu je i ljestvice mortaliteta od zloćudnih novotvorina kod žena. Prema podacima Hrvatskog registra za rak iz 2010. g., rak dojke čini 26% novooboljelih zloćudnih tumora kod žena, a u posljednja dva desetljeća incidencija je u porastu oko 4%. 2010. g. zabilježeno je 2513 novooboljelih bolesnika od čega su 2492 žene (incidencija 109/100000) s najvećom učestalošću od 40. do 79. g. života. Iste su godine od raka dojke umrle 983 žene (5). Standardizirana stopa smrtnosti žena, umrlih od raka dojke, na 100.000 stanovnika za 2012. g. iznosi 24,53 (6).



Slika 4. Incidencije karcinoma dojke u svijetu, 2002. g. (3).

### Čimbenici rizika

Karcinom dojke biološki je heterogena bolest uvjetovana kombinacijom brojnih urođenih i okolišnih čimbenika koji su uključeni u karcinogenezu. Povezanost između čimbenika i rizika bolesti najčešće je izražena kao relativni rizik (RR). Ako je "p" broj subjekata s rizičnim faktorom koji razvijaju bolest, a "q" broj subjekata bez rizičnog faktora koji razviju bolest, onda se RR izračunava kao  $p/q$ . RR se izračunava izravno u kohortnim studijama ili može biti aproksimativno izveden preko omjera šansi (engl. odds ratio, OR) u "case control" studiji (7).

Najveći rizični čimbenik za karcinom dojke je ženski spol i žene imaju oko 100 puta veću pojavnost karcinoma dojke od muškaraca (8). Dob žene glavni je rizični čimbenik za obolijevanje, a relativni rizik koji počinje od generativne dobi raste s godinama života te se nastavlja i nakon menopauze. Iznimno je rijetka pojavnost karcinoma dojke prije 30. g. života. Stalni porast incidencije tijekom života usporava između 45. i 50. g. što jako sugerira ulogu reproduktivnih hormona u etiologiji. To potvrđuje i činjenica da hormonski neovisni tumori ne pokazuju taj pad incidencije u razdoblju perimenopauze. Do 74. g. života incidencija raste do svoje najveće vrijednosti, 455/100 000 (9).

Ostali etiološki čimbenici važni u nastanku karcinoma dojke uključuju demografske značajke, način življenja (rađanje, dojenje, pretilost, fizička aktivnost,

pušenje, alkohol), hormonalni status (dob menarhe i menopauze, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija, dužina menstrualnog ciklusa), antropometrijske značajke, ekspoziciju zračenju te genetsku predispoziciju. Reproductive značajke povezane s povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke uključuju rani nastup menarhe, kasni nastup menopauze, stariju dob kod prve trudnoće te niski paritet ili nulparitet (9, 10).

Postoje brojni dokazi iz epidemioloških studija da spolni hormoni imaju veliku ulogu u nastanku karcinoma dojke. Incidencija karcinoma dojke brže raste u razdobljima prije nego poslije menopauze, kada funkcija jajnika opada. Koncentracija estrogena i testosterona u krvi korelira s pojavnošću karcinoma dojke u postmenopauzalnih žena i neovisan je prognostički čimbenik. U premenopauzalnih žena viša koncentracija testosterona te ukupnog i slobodnog estradiola u folikulima jajnika povezana s većim rizikom nastanka karcinoma. Povišena koncentracija prolaktina korelira s većom pojavnosti karcinoma u pre- i postmenopauzalnih pacijentica (1).

Većina studija nije našla povezanost između oralnih kontraceptiva i karcinoma dojke premda postoje studije koje su našle povećani rizik za karcinom dojke kod premenopauzalnih žena. Relativni je rizik mali i iznosi između 1,4 i 1,5. Vremenski period uzimanja kontraceptiva nije imao neovisan učinak na pojavnost karcinoma dojke, tako da se povećani relativni rizik od obolijevanja pripisao kratkotrajnom učinku hormona kao potencijalnih promotora kasne faze nastanka bolesti. Na temelju ovih i sličnih otkrića, Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (IARC) je 2005. g. klasificirala oralne kontraceptive kao grupu 1 humanih karcinogena (9).

Velike su studije pokazale da žene koje zbog simptoma perimenopauze koriste hormonsku nadomjesnu terapiju imaju veći rizik za nastanak karcinoma dojke nego žene koje nisu nikad koristile terapiju. Taj je učinak veći u kombinaciji estrogenskih i progesteronskih preparata nego samih estrogena. Rizik za karcinom dojke raste s vremenskim periodom uzimanja terapije i smanjuje se nakon prestanka uzimanja terapije. Većina studija sugerira da rizik od karcinoma dojke nestaje nakon 5 i više godina od prestanka uzimanja terapije, no studije isto tako naglašavaju da se učinak hormonalne terapije na pojavnost karcinoma dojke mora dalje istraživati (11).

Hipoteza o utjecaju prehrane na pojavnost karcinoma dojke je nastala zbog utvrđenih razlika u incidenciji u pojedinim područjima svijeta za koja su karakteristični pojedini dijetalni obrasci. Međutim, nije uspjelo izdvajanje niti jednog sastojka hrane koji bi se povezao s karcinomom dojke. Umjerena i povećana konzumacija alkohola povećava rizik za obolijevanje i iznosi oko 10% na 10 g. konzumiranog alkohola dnevno. Niti jedna studija nije uspjela dokazati povezanost karcinoma dojke s pušenjem cigareta (11).

Procjenjuje se kako je obolijevanje od raka dojke povezano s prekomjernom tjelesnom težinom, ali samo kod postmenopauzalnih žena. Žene u postmenopauzi koje imaju indeks tjelesne težine (BMI) veći od 30 imaju 50 % veći rizik za obolijevanje nego žene s BMI nižim od 20. Neke su studije kod žena s prekomjernom tjelesnom težinom u premenopauzi čak našle smanjeni rizik od obolijevanja nego kod žena s normalnom tjelesnom težinom (11).

Utvrđeno je kako izlaganje dojke ionizirajućem zračenju, kod radijacijskih incidenata ili radioterapije, može inducirati rak dojke. Životna dob u vrijeme ekspozicije ionizirajućem zračenju (do 30 godina života) i apsorbirana doza zračenja u tkivu dojke (linearni odnos doze i učinka zračenja), važne su odrednice budućeg rizika. Relativni rizik obolijevanja iznosi od 1,1 do 2,7 pri ekspoziciji od 1 Gy (10, 11).

Također, dokazano je da žene većeg socioekonomskog statusa imaju veću pojavnost karcinomu dojke od žena nižeg socioekonomskog statusa što se objašnjava činjenicom da imaju manje djece i da kasnije rađaju (9).

Neke osobe imaju sklonost razvoju raka dojke jer nose naslijeđene mutacije gena uključenih u proces karcinogeneze. Učinci obiteljske anamneze posebno su naglašeni kod žena mlađih od 40 godina (10). Skupina od 5-10% karcinoma dojke odnosi se na tzv. urođeni (obiteljski) karcinom dojke koji se nasljeđuje autosomno dominantno s varijabilnom penetrantnosti. Geni, koji su najvažniji u obiteljskom nasljeđivanju karcinoma dojke, podijeljeni su na visokorizične i nisko do umjereno rizične gene. Visokorizični geni uključuju *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *TP53*, *LKB1/STK11* i *CDH1*. Skupini nisko do umjereno rizičnih gena pripadaju *CHEK2*, *TGF-β1*, *CASP8* i *ATM* (12). Prethodna su istraživanja ukazivala na puno veću ulogu mutacija *BRCA1* i *BRCA2* (engl. breast cancer 1 i 2) gena na pojavnost familijarnog karcinoma dojke, ali novija istraživanja pokazuju kako su te mutacije uključene samo u 25% slučajeva. Općenito se smatra da osobe s mutacijom *BRCA1* i *BRCA2* imaju 80% vjerojatnost obolijevanja od karcinoma dojke do svoje 70. g. Glavna uloga *BRCA1* i *BRCA2* je u popravcima oštećenja DNA i spriječavanju stanične proliferacije (13).

Stečene su somatske mutacije odgovorne za oko 90 do 95% karcinoma dojke. Međutim, za sada se samo jedna somatska mutacija koristi u kliničkom definiranju raka dojke, a to je amplifikacija *HER2/neu* (14).

Kod žena s prethodno učinjenim biopsijama dojke zbog benignih bolesti, definirani su relativni rizici za nastanak karcinoma dojke. Benigna proliferativna bolest dojke sa slikom atipične hiperplazije ima visoki relativan rizik (2,5-5,3), proliferativna bolest bez atipije ima relativan rizik 1,6-2,2 dok za bolesti bez proliferacije rizika nema ili je mali (0,9-1,5). Neinvazivni karcinomi nose visoki rizik za razvoj invazivnog karcinoma i iznose 6,0 i više (10). Kod benignih se stanja dojke pokušavaju identificirati različite molekule čijom bi se analizom mogle izdvojiti one skupine žena

koje imaju veći rizik za razvoj karcinoma dojke. Većina imunohistokemijskih markera kao što su p53 i HER2/neu imaju relativni rizik 2 do 3 (9), a novija molekula koja se pokazala obećavajućom u odvajanju visokorizičnih pacijentica za razvoj invazivnog karcinoma unutar skupine pacijentica s atipičnom duktalnom hiperplazijom je CEACAM-6 (engl. carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule ) (15).

Unatoč činjenici da je karcinom dojke epidemiološki jedno od najviše istraživanih područja onkologije i da se znanje o epidemiologiji karcinoma dojke neprestano poboljšava, prethodno nabrojani rizični čimbenici samo djelomično mogu objasniti visoku incidenciju raka dojke u populaciji. Današnji čimbenici rizika su korisniji za razumijevanje patogeneze karcinoma dojke, nego za utvrđivanje definitivne preventivne strategije. Treba se nadati da će daljnja istraživanja s epidemiološkim i genetskim pristupom dovesti do značajnih pomaka, posebno zato što većina žena ima jedan ili više rizičnih čimbenika za rak dojke. Moguće je da rezultat daljnjih istraživanja bude kemoprevencija raka dojke u rizičnim skupinama, no čimbenici rizika, na koje žene danas mogu najviše utjecati, još su uvijek prehrana i način života te bi njihovo reguliranje moglo dovesti do smanjenja rizika nastanka bolesti (10, 11).

## **1.2. Klasifikacija karcinoma dojke**

U posljednjih tridesetak godina predložene su različite klasifikacije tumora dojke koje su se mijenjale sukladno s novim spoznajama i koje su više ili manje prihvaćali različiti specijalisti koji se bave problematikom patologije dojke. Podjela koja je službeno prihvaćena i koja se danas u svijetu najviše koristi je histološka klasifikacija tumora dojke po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (1).

### **1.2.1. Histološka klasifikacija tumora dojke po SZO (1).**

#### **I. Epitelni tumori**

Mikroinvazivni karcinom

#### **Invazivni karcinom**

Invazivni karcinom bez posebnog tipa (engl. NST, of no special type)

Pleomorfni karcinom

Karcinom s osteoklastičnim tipom orijaških stanica

Karcinom s koriokarcinomskim obilježjima

Karcinom s melanomskim obilježjima

Invazivni lobularni karcinom

Klasični lobularni karcinom

Solidni lobularni karcinom

Alveolarni lobularni karcinom

Pleomorfni lobularni karcinom

Tubulolobularni karcinom

Miješani lobularni karcinom

Tubularni karcinom

Kribriformni karcinom

Mucinozni karcinom

Karcinom s medularnim karakteristikama

Medularni karcinom

Atipični medularni karcinom

Invazivni karcinom NST s medularnim karakteristikama

Karcinom s apokrinom diferencijacijom

Karcinom sa diferencijacijom u stanice tipa prstena pečatnjaka

Invazivni mikropapilarni karcinom

Metaplastični karcinom bez posebnog tipa

Adenoskvamozni karcinom niskog gradusa

Metaplastični karcinom nalik na fibromatozu (engl. fibromatosis like)

Planocelularni karcinom

Karcinom vretenastih stanica (engl. spindle cell carcinoma)

Metaplastični karcinom s mezenhimalnom diferencijacijom

Hondroidna diferencijacija

Osealna diferencijacija

Ostali tipovi mezenhimalne diferencijacije

Miješani metaplastični karcinom

Mioepitelialni karcinom

*Rijetki karcinomi*

Karcinom s neuroendokrinim odlikama

Neuroendokrini tumor, dobro diferenciran

Neuroendokrini karcinom, slabo diferenciran (karcinom malih stanica)

Karcinom s neuroendokrinom diferencijacijom

Sekretorni karcinom

Invazivni papilarni karcinom

Mukoepidermoidni karcinom

Polimorfni karcinom

Onkocitni karcinom

Karcinom acinarnih stanica

Karcinom bogat lipidima (engl. lipid rich)

Karcinom svijetlih stanica bogat glikogenom

Sebacealni karcinom

Karcinom tipa žlijezda slinovnica/kožnih adneksa

Cilindrom

Svijetlostanični hidradenom

## **II. Epitelno-mioepitelni tumori**

Pleomorfni adenom

Adenomioepiteliom

Adenomioepiteliom s karcinomom

Adenoid cistični karcinom

## **III. Prekursorne lezije**

Duktalni karcinom in situ

Lobularna neoplazija

Lobularni karcinom in situ

Klasični lobularni karcinom in situ

Pleomorfni lobularni karcinom in situ

Atipična lobularna hiperplazija

#### **IV. Intraduktalne proliferacijske lezije**

Uobičajena duktalna hiperplazija

Lezije kolumnarnih stanic vključujući ravnu epitelnu atipiju

Atipična duktalna hiperplazija

#### **V. Papilarne lezije**

Intraduktalni papilom

Intraduktalni papilom s atipičnom hiperplazijom

Intraduktalni papilom s duktalnim karcinomom in situ

Intraduktalni papilom s lobularnim karcinomom in situ

Intraduktalni papilarni karcinom

Očahureni papilarni karcinom

Očahureni papilarni karcinom s invazijom

Solidni papilarni karcinom

In situ

Invazivni

#### **VI. Benigne epitelne proliferacije**

Sklerozirajuća adenoza

Apokrina adenoza

Mikroglandularna adenoza

Radijalni ožiljak/kompleksna sklerozirajuća lezija

Adenomi

Tubularni adenom

Mliječni adenom

Apokrini adenom



Duktalni adenom

## **VII. Mezenhimalni tumori**

Nodularni fascitis, Hemangiom, Angiomatoza, Hemangiopericitom, Pseudoangiomatozna stromalna hiperplazija, Miofibroblastom, Inflammatory miofibroblastični tumor, Desmoidna fibromatoza, Lipom, Angiolipom, Granular cell tumor, Neurofibrom, Švanom, Angiosarkom, Liposarkom, Rabdomyosarkom, Osteosarkom, Leiomyom, Leiomyosarkom

## **VIII. Fibroepitelni tumori**

Fibroadenom

Filodes tumor

Benigni

Bordeline

Maligni

Periduktalni stromalni tumor, "low grade"

Mamarni hamartom

## **IX. Tumori bradavice**

Adenom bradavice

Siringomatozni adenom

Pagetova bolešć bradavice

## **X. Maligni limfomi**

Difuzni velikostanićni B-stanićni limfom (DLBCL)

Burkittov limfom

T stanićni limfom

ALCL, ALK negativni

Extranodalni B-stanićni limfom marginalne zone (MALT)

Folikularni limfom

## **XI. Metastatski tumori**

## **XII. Tumori dojke u muškaraca**

Ginekomastija

Karcinom

Invazivni

Neinvazivni

## **XIII. Klinički entiteti**

Inflamatorni karcinom

Bilateralni karcinom dojke

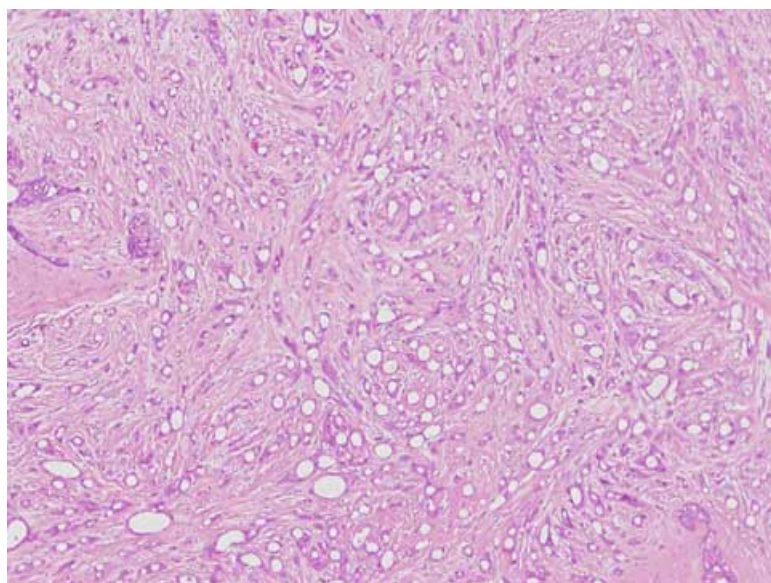
Karcinom dojke može nastati iz dukalnog (90%) ili lobularnog epitela (10%), a dijeli se na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinvazivni) i na one koji to jesu (invazivni). Navedena je podjela službeno prihvaćena od većine stručnjaka koji dijagnosticiraju i liječe tumore dojke, a njezina je prednost u pojednostavljenju i korektnim nazivima prethodno nejasno definiranih histoloških tipova tumora. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije je jednostavnija od prijašnjih, a histološka je slika u mnogim slučajevima povezana s kliničkim ponašanjem tumora. Ona omogućava proučavanje epidemiologije raka dojke, patologije po zemljopisnoj pripadnosti populacije i kontrolu onkološke terapije (1).

Nedostatak ove klasifikacije je u tome što definira samo osnovne patohistološke značajke tumora. Građa tumora nije jednostavna jer su tumori ponekad patohistološki različiti pa postoje znatne varijacije u pojavnosti zrelih, dobro diferenciranih i nezrelih, slabo diferenciranih tumora. Histološka slika malignih tumora nije uvijek u skladu s biološkim ponašanjem tumora pa je i davanje prognoze na temelju histološkog izgleda ponekad nesigurno. Unatoč nedostacima, ova klasifikacija znači veliki korak naprijed i prihvatljiva je u svakodnevnom rutinskom radu (1).

### **1.2.1.1. Invazivni karcinom bez posebnog histološkog tipa (NST, engl. no special type)**

Invazivni karcinom bez posebnog histološkog tipa, poznat i kao dukalni NST, definira se kao karcinom dojke čija histološka slika ne odgovara niti jednom posebnom tipu karcinoma te se dijagnoza postavlja isključivanjem. Termin se dukalni karcinom napušta jer se time želi naglasiti kako ovaj tip karcinoma ne nastaje

isključivo od duktalnog dijela terminalne duktalno-lobularne jedinice (TDLU) te se jedinica mora shvaćati kao cjelina. Ova skupina invazivnih karcinoma je najveća skupina invazivnih tumora dojke i čini 40 - 75% patohistoloških nalaza. Da bi se tumor mogao klasificirati kao NST, više od 50% tumorske mase mora imati histološke osobine ovog tumora. U protivnom se klasificira kao miješani invazivni karcinom. Karakterizira ga prisustvo malignih stanica izvan duktalno-lobularnih jedinica i invazija strome. Za njega je tipičan i gubitak pravilnih struktura koje se inače vide unutar tumora specijalnih tipova te vrlo raznolika histološka slika s obzirom na izgled stanica, izgled strome, rubove tumora i na zastupljenost intraduktalne komponente. Ovaj tip raka dojke često je udružen s drugim specifičnim karcinomima, ali specifična struktura ne smije biti prisutna u više od 50% tumorske mase. Makroskopski mogu biti zrakasti ili nodularni, a radi obilne dezmodoplastične strome su tvrdi na presjeku te su se zbog toga prije nazivali sciroznim karcinomima (grč. skirros, tvrd). Postoje i rijetki podtipovi invazivnog NST karcinoma kao što su pleomorfni i karcinom s osteoklastičnim tipom stanica. Vrlo rijetki podtipovi uključuju karcinom s koriokarcinomskim i melanomskim karakteristikama (1).



*Slika 2. NST karcinom dojke s brojnim tubularnim strukturama (nuklearni gradus 2, histološki gradus 1), HE x 100.*

Pleomorfni karcinom je rijetka varijanta invazivnog NST karcinoma s velikim, bizarnim, ponekad i multinuklearnim tumorskim stanicama koje čine barem 50% histološke slike pregledanog tumora. Tipično ima histološki i nuklearni gradus 3 i visok proliferacijski indeks tumorskih stanica (1).

Histološki se u karcinomu s osteoklastičnim tipom orijaških stanica vide tumorske stanice nalik na osteoklaste koje se nalaze u obilno vaskulariziranoj i inflamatornoj vezivnoj stromi. Ultrastrukturnim i imunohistokemijskim analizama je

pokazano da su orijaške stanice histiocitnog porijekla (CD68+, S100-, CK -, EMA -). Ovaj podtip tumora ima nešto bolju prognozu od običnog NST-a. Prognoza ovisi o karakteristikama pratećeg tumorskog tkiva, a ne i o multinuklearnim orijaškim stanicama (1).

Kako se radi o heterogenoj grupi tumora, unutar koje se nalazi široki spektar prognostički povoljnih do izrazito nepovoljnih karcinoma, prognoza se procjenjuje individualno, prema prognostičkim i prediktivnim čimbenicima. Prognoza NST nešto je lošija nego prognoza ostalih tipova invazivnih karcinoma dojke i desetogodišnje preživljenje iznosi 35-50% (1).

### **1.2.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke**

Rezultati liječenja i procjena ishoda liječenja još su uvijek u najvećoj mjeri temeljeni na poznavanju proširenosti bolesti. Danas se primjenjuje TNM klasifikacija Međunarodne unije za borbu protiv raka (UICC, franc. Union Internationale Contre le Cancer) i Američkog udruženja za rak (AJCC, engl. American Joint Committee on Cancer). Prvo je izdanje izašlo 1977. g., a danas je u upotrebi sedmo izdanje iz 2010. g. (16). Klasifikacija opisuje veličinu tumora (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i postojanje udaljenih metastaza (M), (tablica 1). Na temelju TNM klasifikacije, karcinom dojke se svrstava u četiri stadija (tablica 2). Klinički TNM stadij ima "c" prefiks. Zbog sve češće uporabe i prognostičkog utjecaja neoadjuvantne terapije, prefiks "yp" stavlja se u TNM klasifikaciju kod pacijentica koje su bile podvrgnute terapiji. Neoadjuvantna terapija ne mijenja klinički stadij bolesti prije tretmana. Biopsija tankom iglom (engl. FNA, fine needle aspiration) i biopsija limfnog čvora prije neoadjuvantne terapije označava se prefiksom "f", odnosno "sn". Metastaze koje se otkriju biopsijom ili aspiracijom klasificirane su kao makrometastaze (N1).

Tablica 1. TNM klasifikacija (16).

**T - primarni tumor**

Tx	ne može se ustanoviti postojanje primarnog tumora u dojci
T0	bez klinički evidentnog tumora
Tis	karcinom in situ (DCIS, LCIS, Paget bez evidentnog karcinoma)
T1	tumor 20 mm ili manji
T1 mic	tumor 1 mm ili manje
T1a	tumor >1 mm, ali < 5 mm
T1b	tumor > 5 mm, ali < 10 mm
T1c	tumor > 10 mm, ali < 20 mm
T2	tumor > 20 mm, ali < 50 mm
T3	tumor > 50 mm
T4	tumor bilo koje veličine s izravnim širenjem na torakalnu stijenku ili u kožu
T4a	tumor se širi na torakalnu stijenku bez zahvaćanja pektoralnog mišića
T4b	tumor dovodi do ulceracije kože dojke, edema ili stvara satelitske kožne čvoriće ograničene na istu dojku
T4c	oboje prethodno navedeno (T4a i T4b)
T4d	inflamatorni karcinom dojke

**N - regionalni limfni čvorovi**

Nx	ne može se ustanoviti zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova
N0	limfni čvorovi nisu zahvaćeni tumorom
N1	zahvaćeni istostrani pazušni limfni čvorovi koji su pomični
N2a	zahvaćeni istostrani pazušni limfni čvorovi, prirasli međusobno ili na druge strukture
N2b	zahvaćenost samo klinički evidentnih istostranih limfnih čvorova uz unutarnju mamarnu arteriju, a bez klinički evidentnih metastaza u aksilarne limfne čvorove
N3a	zahvaćenost ipsilateralnih infraklavikularnih limfnih čvorova
N3b	zahvaćeni istostrani limfni čvorovi uz unutarnju mamarnu arteriju i aksilarni limfni čvorovi
N3c	zahvaćenost istostranih, supraklavikularnih limfnih čvorova

## **M - udaljene metastaze**

M0	bez kliničkih i radioloških dokaza za udaljene metastaze
cM0(i+)	bez kliničkih i radioloških dokaza za udaljene metastaze, ali mikroskopom ili molekularnim metodama su depoziti tumorskih stanica otkriveni u krvi, koštanoj srži ili drugim, neregionalnim limfnim čvorovima. Nakupine tumorskih stanice ne smiju biti veće od 0,2 mm, a pacijenti moraju biti bez simptoma ili znakova metastatske bolesti.
M1	udaljene metastaze, veće od 0,2 mm.

## **Određivanje patološkog stadija limfnih čvorova (pN)**

pNX	zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova se ne može ustanoviti
pN0	histološki bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
pN0(i-)	histološki bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, negativan nalaz imunohistokemije
pN0(i+)	izolirane tumorske stanice u limfnim čvorovima tj. male nakupine tumorskih stanica ne veće od 0,2 mm ili 200 stanica u nakupinama na HE ili imunohistokemijskom preparatu
pN0(mol-)	histološki bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, negativan nalaz molekularne analize (RT-PCR)
pN0(mol+)	histološki bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, ali je nalaz molekularne analize pozitivan
pN1	obuhvaća kako slijedi:
pN1mi	mikrometastaze, žarišta od 0,2 do 2 mm
pN1a	metastaze u 1 do 3 ipsilateralna limfna čvora , bar jedno žarište veće od 2 mm
pN1b	metastaze u čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju koje su se detektirale biopsijom limfnog čvora čuvara (engl. sentinel lymph node), a nisu bile klinički evidentne
pN1c	obuhvaća pN1a i pN1b
pN2	obuhvaća kako slijedi:
pN2a	metastaze u 4-9 pazušnih limfnih čvorova (bar jedno žarište veće od 2 mm)
pN2b	metastaze u klinički pozitivnim limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz odsutnost metastaza u pazušnim limfnim čvorovima
pN3	metastaze u čvorovima kako slijedi:
pN3a	metastaze u 10 i više pazušnih limfnih čvorova ili u infraklavikularnim limfnim čvorovima (regija III pazušnih limfnih čvorova)
pN3b	metastaze u klinički pozitivnim ipsilateralnim limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz metastaze u jedan ili više pazušnih limfnih čvorova; ili metastaze u više od tri pazušna limfna čvora i metastazama u čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju koje su se detektirale biopsijom limfnog čvora čuvara, a nisu bile klinički evidentne.
pN3c	metastaze u ipsilateralnim, supraklavikularnim limfnim čvorovima.

Tablica 2: Klinički stadiji karcinoma dojke (16).

<b>Stadij 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadij IA</b>	T1*	N0	M0
<b>Stadij IB</b>	T0	N1mi	M0
	T1*	N1mi	M0
<b>Stadij IIA</b>	T0	N1**	M0
	T1	N1**	M0
	T2	N0	M0
<b>Stadij IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stadij IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1*	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>Stadij IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>Stadij IIIC</b>	bilo koji T	N3	M0
<b>Stadij IV</b>	bilo koji T	bilo koji N	M1

\* uključuje i T1mi

\*\* T0 i T1 tumori s nodalnim mikrometastazama su uvršteni u IB stadij

Stadij I: tumor < 2 cm, bez zahvaćenosti pazušnih limfnih čvorova i bez udaljenih metastaza; uključuje također i DCIS s mikroinvazijvom.

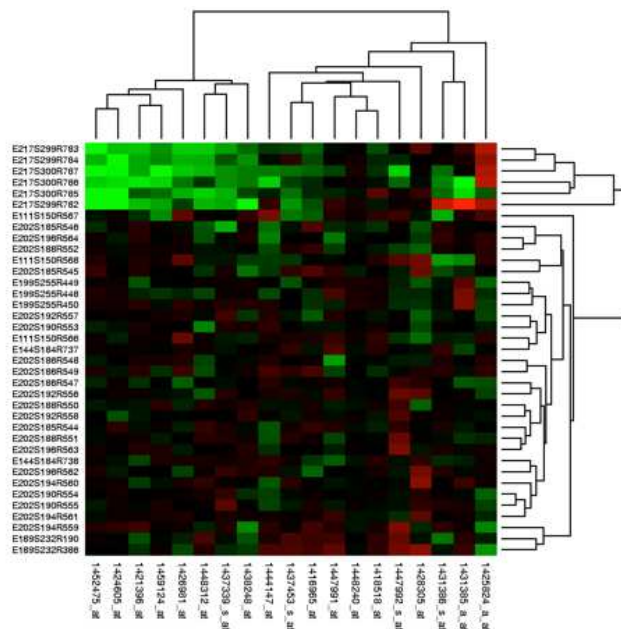
Stadij II: tumor > 2, ali < 5 cm bez metastaza u limfne čvorove.

Stadij III: tumor bilo koje veličine s metastazama u fiksirane pazušne limfne čvorove; tumor zahvaća kožu ili je fiksiran za prsnu stjenku; tumor bilo koje veličine s metastazama u supraklavikularne limfne čvorove.

Stadij IV: postojanje udaljenih metastaza, uz bilo koju veličinu tumora i bilo koji status.

### 1.2.3. Molekularna klasifikacija raka dojke

Danas se dijagnostika i liječenje malignih tumora sve više usmjeravaju prema individualiziranom pristupu. Svaki je tumor, pa tako i karcinom dojke, jedinstven u molekularnom smislu, u svome mikrokolišu i u interakciji unutar neoplastičnih i domaćinskih stanica. Rak dojke je heterogena skupina bolesti koja obuhvaća brojne biološke entitete sa specifičnim patološkim obilježjima, posljedičnim različitim biološkim ponašanjem i kliničkim ishodom. Unatoč činjenici da su tumori jedinstveni, tumorska klasifikacija i molekularna dijagnostika kreću od pretpostavke da slični tumori nastaju, razvijaju se i ponašaju slično. Polazeći od ove činjenice, molekularnim analizama možemo bolje klasificirati tumore i samim time se približiti pravoj personaliziranoj medicini (1, 17). Razvojem genomike i simultanom analizom tisuća gena (DNA mikročipovi, engl. microarrays), ustvrdilo se kako postoji nekoliko podtipova karcinoma dojke s različitim genskim profilom, različitom prognozom i odgovorom na terapiju. Ovakva je raznolikost izazov za stvaranje klasifikacije tumora koja bi imala kliničku vrijednost u prognostičkom i prediktivnom smislu. S obzirom na profil genske ekspresije, postoji bar pet podtipova karcinoma dojke: luminalni tip A (LumA), luminalni tip B (LumB), "basal like" tip, HER2 tip (s prekomjernom ekspresijom HER2/neu onkogen) i tip karcinoma nalik na normalnu dojku. Noviji molekularni tipovi su dva ER negativna tipa, apokrini i "claudine low" tip, ali njihova se klinička vrijednost tek mora ustvrditi (1).



Slika 5. Primjer multigenske analize, "DNA microarray", fluorescentna detekcija gena (dostupno na <http://www.microarrays.com>).



Najčešći je luminalni podtip, koji je dobio ime zbog sličnosti genetskog profila s luminalnim stanicama normalne dojke. Čine ga hormonski ovisni tumori, a može se podijeliti u barem dvije podskupine: luminalni tip A i luminalni tip B. Luminalni tip A čine tumori s visokom ekspresijom gena za estrogenske receptore, izraženim genima za citokeratine niske molekularne mase, niskim histološkim gradusom, niskom izraženošću gena proliferacije i ukupno odličnom prognozom. Karcinomi dojke luminalnog B tipa imaju pozitivne ER, varijabilnu izraženost HER2/neu, varijabilni stupanj proliferacije, a uglavnom su slabije diferencirani i lošije prognoze od luminalnog tipa A. Prvi tip luminalnog B karcinoma ima pozitivne estrogenske receptore, Ki67 veći od 14% te je Her2 negativan. Drugi tip luminalnog B karcinoma ima pozitivne estrogenske receptore, pozitivan Her2/neu te bilo koju vrijednost proliferacijskog indeksa (1, 18).

ER negativni subtipovi uključuju tip HER2 pozitivni i "basal like" tumore. Visokog su proliferacijskog indeksa i histološkog gradusa, češće imaju pojačanu ekspresiju p53 i lošijeg su ishoda (1, 18).

U molekularnoj studiji Parkera i suradnika na 761 uzorku karcinoma dojke, pokazano je da se u 82% uzoraka radilo o ER pozitivnim tumorima. 73% ER pozitivnih tumora pripadalo je luminalnim skupinama, 11% HER2 pozitivnoj skupini, 5% "basal like" i 7% skupini nalik na normalnu dojku. U ER negativnoj skupini, 11% ih je bilo u luminalnom tipu A i B, 32% je bilo Her2 pozitivnih, 50% "basal like" i 77% nalik na normalnu dojku. Važno je naglasiti da su intrinzični molekularni podtipovi imali različit utjecaj na preživljenje bez znakova bolesti kod pacijentica koje nisu bile podvrgnute adjuvantnoj kemoterapiji. U multivarijatnoj analizi sa standardnim prognostičkim faktorima, molekularni su podtipovi zadržali statističku značajnost u utjecaju na preživljenje bez znakova bolesti, a pokazali su se kao prediktori sa senzitivnošću i specifičnošću 94%, odnosno 57% u procjeni odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju (18).

### **1.3. Dijagnostika karcinoma dojke**

Prije slikovnih metoda dijagnostike, liječenje karcinoma dojke u potpunosti se oslanjalo na simptomatske tumore. Danas se, zbog učestalijeg korištenja mamografije i veće spoznaje pacijenata o simptomima karcinoma, tumor može otkriti u stadijima koji su puno povoljniji za liječenje. Otkrivanje raka dojke u ranim stadijima utječe istodobno i na odabir načina liječenja (19).

Probir (engl. screening) je pregled grupe ljudi sa svrhom otkrivanja bolesti ili pronalaženja one skupine ljudi koji imaju povećani rizik za nastanak bolesti (20). AJCC za probir raka dojke kod asimptomatskih žena preporuča mamografiju svake godine,

počevši od 40. g. starosti; klinički pregled svake treće godine u dobi od 20 do 39 g. i svake godine od 40. g. života; samopregled dojki počevši od 20. g. života te razmatranje ranijih i češćih metoda probira i korištenje dodatnih testova probira kod žena s povećanim obiteljskim rizikom (10).

Svijest se žena o karcinomu dojke povećala te je samopregled dojke jedan od uzroka otkrivanja bolesti u povoljnijim kliničkim stadijima. Samopregled dojke ima senzitivnost 12 do 41 % (3, 21).

Inicijalni dijagnostički postupak kod žena koje imaju simptome u dojci prati načelo tzv. trodijelne dijagnostike (engl. tripple test) koju čine klinički pregled, slikovna dijagnostika (mamografija/ultrazvuk) i tkivna analiza (citološka analiza tankom iglom ili patološka analiza širokom iglom)(22, 23).

Temeljna orijentacijska dijagnostička metoda je klinički pregled i prema njoj se planira potreba za daljnjom dijagnostikom. Klinički pregled dojke ima senzitivnost od 40% do 69% i specifičnost 88% do 99% te se ženama starijim od 35 godina savjetuje da ga naprave jednom godišnje. Dok je u sedamdesetogodišnjakinja oko tri četvrtine jasno palpabilnih čvorova maligne etiologije, kod žena mlađih od 25 godina mogućnost postojanja zloćudnog palpabilnog čvora gotovo je jednaka ničici. Oko 10% karcinoma otkriva se samo kliničkim pregledom (21, 24, 25).

Mamografija je još uvijek zlatni dijagnostički standard i slikovna dijagnostička metoda izbora u probiru, sa svrhom otkrivanja suspektnih tvorbi sa što većom senzitivnošću. Treba paziti na činjenicu da se oko 10% palpabilnih oblika ne uspijeva otkriti na mamografiji te negativan mamografski nalaz nije dovoljan za isključivanje maligniteta u klinički simptomatske pacijentice (10). Mamografija je pogodna za "sekundarnu prevenciju", koja putem probira zdrave populacije, utječe i mijenja krajnji ishod pacijentica s karcinomom dojke. Primjena mamografskog probira kod žena iznad 50. g. života, neovisno o postojanju drugih rizičnih čimbenika, reducira smrtnost od karcinoma dojke za oko 30% (26). U svrhu standardizacije i uniformnosti radioloških mamografskih nalaza, Američko društvo za radiologiju je uvelo tzv. BI-RADS (engl. Breast Imaging Reporting and Data System) sistem bodovanja lezija koji ima pet kategorija: negativan nalaz, benigna promjena, vjerojatno benigna promjena, sumnja na abnormalan nalaz te nalaz izrazito suspektan na malignitet (27).

Od 2002. g. Američko društvo za prevenciju (engl. United States Preventive Services Task Force) sve više preporuča korištenje digitalne mamografije i magnetske rezonance kod probira žena s povećanim rizikom za obolijevanje od karcinoma dojke. Iako su velike studije pokazale sličnu dijagnostičku vrijednost konvencionalne i digitalne mamografije, preporuča se koristiti digitalnu metodu kod žena mlađih od 50 godina i kod dojki s većom gustoćom tkiva. Senzitivnost mamografskog probira je 77% do 95%, a specifičnost 94% do 97%. Na specifičnost i senzitivnost mogu utjecati brojni

faktori koji uključuju dob žene, vrijeme od prethodnog pregleda, gustoća tkiva dojke, oprema i stručnost radiologa. Kontroverznost same metode mamografije postoji zbog njenih neželjenih učinaka koji uključuju lažno pozitivne i lažno negativne nalaze te učinak ionizirajućeg zračenja. Lažno pozitivni rezultati češći su kod mlađih žena, a mogu uzrokovati anksioznost žene i dovesti do novih, invazivnih metoda dijagnostike. Lažno negativni nalazi javljaju se rjeđe i nešto su češći kod žena starijih od 70 godina. Kod DCIS-a i lezija, koje ne bi ni progredirale u karcinom, moguće je i predijagnosticiranje, pogotovo kod mlađih žena. Štetan učinak mamografije je i zračenje čime se povećava rizik za razvoj karcinoma dojke. Za povećanje rizika potrebne su puno veće doze zračenja od doza koje se koriste pri pregledu. Međutim, redovita mamografija može pridonijeti kumulativnim dozama zračenja zbog nekih drugih dijagnostičkih i/ili terapijskih zahvata (21). Integrirana se 2D i 3D mamografija u novoj STORM studiji pokazala boljom od konvencionalne mamografije u smislu manje lažno pozitivnih rezultata, ali su nužni daljnji klinički randomizirani pokusi da bi se metoda uvrstila u rutinske metode probira (28).

Ultrazvuk se u proteklih dvadesetak godina izborio za mjesto komplementarne dijagnostičke metode u dijagnostici karcinoma dojke. Primjenjuje se za evaluaciju promjena u mamografski gustim dojka, dijagnostičko razlučivanje i identifikaciju, daljnju procjenu cističnih promjena i intervencijske zahvate. Zbog ograničene osjetljivosti u otkrivanju neinvazivnih karcinoma i malih invazivnih karcinoma ne preporuča kao izbor metode probira kod mamografski gustih dojki. Za klasifikaciju nalaza koristi se i BI-RADS sistem (21, 27, 29, 30).

Magnetska rezonanca nije rutinska metoda probira zbog ograničenog pristupa i visokih troškova pregleda. Primjenjuje se kao komplementarna metoda samo u odabranoj skupini žena. Dobra je metoda za otkrivanje okultnih karcinoma kod pacijentica s pozitivnim istostranim pazušnim limfnim čvorovima ili s distalnim metastazama, za razlučivanje ožiljnog tkiva od povrata bolesti u prethodno liječenih žena te za planiranje poštednog operativnog zahvata radi preciznog određivanja veličine tumora, multifokalnosti i eventualne bilateralnosti. AJCC preporuča korištenje magnetske rezonance kod probira žena s povećanim rizikom za obolijevanje od karcinoma dojke (21, 31-35).

Galaktografija je korisna metoda koja se primjenjuje u dijagnostici intra i periduktalnih patoloških zbivanja radi lokalizacije i vizualizacije promjena čime se izbjegava nedovoljno ili preveliko kirurško odstranjenje tkiva. Indicirana je kod patološke sekrecije na izvodni mliječni kanalić, najčešće u kombinaciji s citološkim razmazom. Retrogradnom instilacijom kontrasta i oslikavanjem na mamografu je moguće odrediti prirodu, mjesto i veličinu lezije koja dovodi do sekrecije iz bradavice (36, 37).

Citološka punkcija tankom iglom (engl. fine-needle aspiration cytology - FNAC) i biopsija širokom iglom (engl. core needle biopsy - CNB) dvije su široko prihvaćene patološke metode u dijagnosticiranju bolesti dojke. FNAC je minimalno invazivna dijagnostička metoda koja često prethodi otvorenoj biopsiji širokom iglom. Jeftinija je, manje su nuspojave i nalazi su dostupni relativno brzo.

Perkutana biopsija širokom iglom je nekirurško uzimanje tkiva za histološku analizu, a osnovna prednost metode u odnosu na FNAC je što daje patohistološke podatke i mogućnost imunohistokemijske analize. Specifičnost i senzitivnost FNAC i CNB su za dijagnosticiranje invazivnih karcinoma slične, međutim, zbog znatno niže specifičnosti i senzitivnosti u dijagnosticiranju suspektnih lezija, atipičnih i fibroepitelnih promjena, uloga FNAC-a je danas upitna. Također, pokazalo se da je FNAC u samo 30% slučajeva bila točna dijagnostička metoda kod lobularnih i tubularnih karcinoma. Zbog toga je većina ustanova u razvijenom svijetu, pogotovo u SAD-u, Velikoj Britaniji i Kanadi napustila FNAC kao dijagnostičku metodu. Osim niske specifičnosti i senzitivnosti, kod FNAC-a postoji i veliki broj neadekvatnih uzoraka, posebno kod nepalabilnih lezija dojke (38-42).

Sistem bodovanja pregledanog materijala u biopsiji širokom iglom (43):

B1- normalno tkivo dojke

B2- benigne lezije

B3- lezije s nepoznatim malignim potencijalom

B4- nalaz suspektan na malignitet

B5- maligni tumor; a-in situ; b-invazivni; c-invazivni status neodređen; d-drugi maligni tumori dojke.

Posljednjih godina pratimo veliki razvoj novih, komplementarnih metoda u dijagnostici zloćudnih bolesti dojke. No njihova praktična vrijednost i pomoć pri definitivnom dijagnostičkom odlučivanju za sada nije značajna. Metode oslikavanja dojke iz područja nuklearne medicine mogu poslužiti za utvrđivanje metabolizma stanica unutar dojke. Pozitronska emisijska tomografija (PET) s 18F-fluorodeoksiglukozom je korisna za proučavanje metabolizma glukoze dok je 99mTc-sestamibi koristan izvor informacija o mitohondrijskoj funkciji stanica. Pojavljuju se i dijagnostičke metode koje pružaju dodatne informacije o molekularnim i metaboličkim procesima te o promjenama koje se događaju u tkivu dojke. Neke od njih su spektroskopija magnetskom rezonancom (MRS), elastografija, termografija i optoakustičko oslikavanje (44).

## 1.4. Prognostički i prediktivni čimbenici karcinoma dojke

Zbog izrazite biološke heterogenosti karcinoma dojke koja se očituje u kliničkoj raznolikosti, određivanje kliničkih i patoloških prognostičkih i prediktivnih čimbenika pomaže u procjeni prognoze pacijentica i individualiziranju liječenja. Prognostički se i prediktivni čimbenici koriste kako bi se izdvojila podgrupa pacijentica s dobrom prognozom kojoj nije potrebno adjuvantno sustavno liječenje, podgrupa s gorom prognozom koju je potrebno liječiti agresivnijim pristupom te kako bi se donijela odluka o liječenju koje će biti najučinkovitije za pojedinu pacijenticu (45, 46).

Prognostički čimbenici predstavljaju osobitost tumora ili pacijentice u vrijeme postavljanja dijagnoze. Oni, neovisno o adjuvantnoj sistemnoj terapiji određuju ili koreliraju s prirodnim tijekom i ishodom bolesti te su time odraz agresivnosti tumora. Prognostički čimbenici upućuju na invazivni i metastatski potencijal zloćudne bolesti te daju podatke o vjerojatnosti pojave povrata bolesti i preživljenju. Posljednjih dvadesetak godina testiran je niz potencijalnih molekularnih prognostičkih čimbenika, no samo su neki od njih našli primjenu u kliničkoj praksi. Smatra se kako bi potencijalni prognostički čimbenici karcinoma dojke trebali imati značajnu i neovisnu vrijednost potvrđenu u kliničkim studijama, a utvrđivanje njihove prisutnosti bi trebalo biti točno, pouzdano, jednostavno, reproducibilno i specifično. I dok još uvijek niti jedan čimbenik ne ispunjava sve navedene kriterije, neki su se ipak pokazali korisnima u kliničkoj praksi (46-48).

Prediktivni čimbenici su osobitost tumora koja upućuje na vjerojatnost ili odsutnost odgovora na specifičnu terapiju. Najbolji primjer prediktivnog markera su estrogenski receptori koji predviđaju odgovor na hormonalnu terapiju u adjuvantnom ili neoadjuvantnom hormonskom liječenju. Jača ekspresija znači i bolji odgovor na hormonalnu terapiju, a time su estrogenski receptori slabi prognostički čimbenik za povoljniji ishod bolesti i jaki prediktivni čimbenik na hormonalnu terapiju. Prekomjerna ekspresija HER2/neu je prognostički faktor za lošiji ishod bolesti i jaki prediktivni čimbenik u liječenju trastuzumabom. Dakle, neki od čimbenika imaju istodobno dobru prognostičku i prediktivnu vrijednost (46-48).

Određivanje prognostičkih i prediktivnih čimbenika je kod karcinoma dojke postalo neizostavan dio patohistološkog nalaza na temelju kojega se donosi odluka o daljnjem liječenju pacijentica. Trenutno se u kliničkoj praksi kao prediktivni i prognostički patološki čimbenici koriste veličina tumora, status pazušnih limfnih čvorova, histološki podtip, nuklearni i histološki gradus, proliferacijski indeks Ki67, status steroidnih receptora, amplifikacija ili prekomjerna ekspresija HER2/neu, a uz njih postoje i multiparametrijske analize ekspresije gena (46).

Uz opisane se čimbenike u kliničkoj praksi kao prediktivni i/ili prognostički čimbenici sve više upotrebljavaju limfo-vaskularna invazija, biljezi proliferacije tumora kao što je ciklin E, zatim urokinazni aktivator plazminogena uPA/PAI-1, receptor za EGF i drugi faktori kao što su p53, TGF $\alpha$ , bcl-2, pS2 i katepsin D. Dok je zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova dominantni prognostički indikator razvoja diseminacije bolesti, ostali prognostički čimbenici odražavaju rizik za već prisutne okultne metastaze (46).

### **Dob**

Brojne studije koje su istraživale utjecaj dobi i preživljenja kod karcinoma dojke su male i pokazale su oprečne rezultate. Nekoliko je velikih studija pokazalo da je mlađa životna dob značajan prediktor recidiva bolesti i smrti te su karcinomi u mlađoj životnoj dobi povezani s češćim nepovoljnim patohistološkim karakteristikama tumora, kao što su slaba diferencijacija, prisutna limfovaskularna invazija, zahvaćenost limfnih čvorova, visoki proliferacijski indeks i negativnost hormonskih receptora (46, 49).

### **Veličina tumora**

Veličina tumora jedan je od najjačih prognostičkih čimbenika karcinoma dojke, pogotovo kod žena s negativnim limfnim čvorovima. Učestalost nodalnih metastaza kod pacijenata s tumorima manjim od 1 cm je 10% do 20%, a pacijentice sa negativnim limfnim čvorovima imaju desetogodišnje preživljenje oko 90%. Prognoza se pogoršava s veličinom tumora, ali je zanimljivo da jako veliki tumori (veći od 5cm) imaju nešto bolju prognozu od srednje velikih tumora (3-4,9 cm) (45, 46, 50).

### **Status limfnih čvorova**

Status limfnih čvorova ostaje najvažniji prognostički i prediktivni čimbenik kod preživljenja sa i bez znakova bolesti. U usporedbi s 80% pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima, samo će 20% pacijentica s negativnim limfnim čvorovima razviti recidiv bolesti unutar 10 godina. Broj zahvaćenih limfnih čvorova je također bitan prognostički čimbenik te pacijentice s 4 i više pozitivnih čvorova imaju još lošiju prognozu. Prognostički je važna i veličina metastaza unutar limfnih čvorova. Makrometastaze su depoziti veći od 2 mm, mikrometastaze od 0,2 mm do 2 mm, a izolirane tumorske stanice su žarišta manja od 0,2 mm. Nekoliko je retrospektivnih studija pokazalo da se prognoza pacijentica s nalazom mikrometastaza u limfnim čvorovima ne razlikuje od prognoze pacijentica s negativnim nalazom limfnih čvorova. Druge studije pokazuju razliku u prognozi tih dviju skupina te se prognoza pacijentica s mikrometastazama nalazi između prognoze pozitivnih i negativnih limfnih čvorova. U novije je vrijeme u kliničkoj praksi, kao alternativa disekciji aksile, sve popularnija metoda analize limfnog čvora čuvara (engl. sentinel lymph node-SLN). Metoda omogućava izvođenje poštenijeg zahvata, smanjenje postoperativnog morbiditeta i

veću mogućnost detekcije mikrometastaza s obzirom na detaljniju patohistološku analizu čvora. Biopsija limfnog čvora čuvara pokazala se osobito dobra metoda kod pacijentica s malim primarnim tumorom. Ako se metastaza nađe, preporuča se daljnja disekcija aksile (45, 46, 50).

### **Histološki i nuklearni gradus**

Histološki je gradus važan čimbenik koji omogućava prognostičko stupnjevanje tumora unutar određenog stadija bolesti. Budući da je određivanje stupnja diferenciranosti pod utjecajem subjektivne procjene patologa s posljedično lošom reproducibilnošću, standardizirani su objektivniji načini stupnjevanja. Danas je najviše u upotrebi Scarf-Bloom-Richardsonova metoda, odnosno njezina modifikacija po Elstonu i Ellisu tzv. Nottingham Combined Histologic Grade (NCHG) koja daje kriterije za ocjenjivanje morfoloških osobitosti: stvaranja tubula, nuklearnog pleomorfizma i broj mitoz. Tumorima s tubularnom histološkom slikom u više od 75% tumorskog tkiva dodijeljuje se jedan bod, od 10% do 75% 2 boda i manje od 10% 3 boda. Nuklearni pleomorfizam ocjenjuje se prema sličnosti tumorskih stanica s urednim jezgrama tkiva dojke te se relativno malim i jednoličnim dodijeljuje jedan bod, a krupnim, polimorfnim jezgrama tri boda. Dva boda se dodijeljuju jezgrama između ove dvije skupine. Mitoze se broje u proliferacijski najaktivnijim područjima tumora na deset vidnih polja velikog povećanja, a bodovi od 1 do 3 dodijeljuju se ovisno o veličini vidnog polja. Bodovi se zbrajaju te njihov krajnji zbroj određuje gradus tumora:

3-5 bodova : Gradus I - dobro diferencirani tumor

6-7 bodova: Gradus II - srednje diferencirani tumor

8-9 bodova: Gradus III - slabo diferencirani tumor

Pacijentice s dobro diferenciranim tumorima imaju 5-godišnje preživljenje oko 75%. Oko 53% pacijentica sa srednje diferenciranim tumorima preživi 5 godina dok kod pacijentica sa slabo diferenciranim tumorima 5-godišnje preživljenje iznosi 31%.

Prognostička vrijednost histološkog gradusa raste u kombinaciji s drugim prognostičkim čimbenicima, na temelju čega je napravljen tzv. Nottinghamski prognostički index (NPI). NPI na temelju histološkog gradusa, veličine tumora i statusa limfnih čvorova, definira daljnje tri prognostičke grupe: dobra, osrednja i loša (45, 46, 50, 51).

### **Histološki tip tumora**

Histološke karakteristike invazivnih karcinoma dojke imaju prognostički značaj te se prema histološkom tipu dijele u četiri grupe:

a) odlična prognoza (10-godišnje preživljenje 80%) - tubularni, invazivni kribriiformni, mucinozni, tubulolobularni, adenoid cistični, intracistični papilarni.

b) dobra prognoza (10-godišnje preživljenje 60 do 80%) - miješani tubularni, miješani NST, klasični lobularni.

c) umjereno dobra prognoza (10-godišnje preživljenje 50 do 60%) - karcinom s medularnim karakteristikama, miješani lobularni, invazivni papilarni.

d) loša prognoza (10-godišnje preživljenje manje od 50%) - NST karcinom, solidni tip lobularnog, miješani (lobularni invazivni i NST).

Osobito lošu prognozu ima karcinom tipa prstena pečatnjaka te pleomorfni lobularni invazivni karcinom (45).

### **Limfovaskularna invazija**

Peritumorska limfovaskularna invazija loš je prognostički čimbenik kod ukupnog preživljenja pacijentica i pokazatelj rizika za raniji lokalni recidiv bolesti. Prisutna je u oko 25 % karcinoma dojke, češće kod slabije diferenciranih tumora te kod pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima aksile. Neke studije nisu našle povezanost s kliničkim ishodom, ali se smatra da su uzrok takvim rezultatima retrakcijski artefakti koji su se krivo interpretirali kao vaskularna invazija. Korisna metoda za razlikovanje retrakcije od vaskularne invazije je imunohistokemijsko bojanje na CD31, CD34, faktor VIII, D240, laminin ili kolagen tipa 4 (45, 46, 50).

### **Proliferacijska aktivnost tumora**

Postoje brojne metode određivanja proliferacijske aktivnosti tumora i sve su korelirane s prognozom. Najčešće se proliferacijska aktivnost određuje kao sastavni dio patohistološkog nalaza, mitotskim indeksom te imunohistokemijski s MIB-1 protutijelom koji obilježava nuklearni protein Ki-67. Ki-67 je nuklearni antigen koji stvaraju proliferirajuće stanice te se nalazi tijekom svih faza staničnog ciklusa osim u fazi mirovanja (GO faza). Preporuke Radne grupe za karcinom dojke iz 2011. g. su da se Ki67 određuje u područjima najjače tumorske proliferacije (engl. hot spot) na 1000 tumorskih stanica, a minimalno na 500 stanica. Konsenzualne granične vrijednosti Ki67 nisu uspostavljene te u literaturi variraju između 10 i 20% (46, 49, 52, 53).

Drugi nuklearni markeri proliferacije koji još nisu inkorporirani u kliničku praksu su: proliferirajući nuklearni antigen (engl. proliferating cell nuclear antigen - PCNA), topoizomeraza II alfa (Ki-S1), razni ciklini i mitozin. Ostale metode koje se koriste u procjeni proliferacijske aktivnosti tumora temelje se na ploidijskim tumorskim stanicama, broju stanica tumora u S fazi (određivanje SPF-a protočnom citometrijom, engl. "S-phase fraction") te indeksom označavanja timidinom (TLI, engl. thymidine labeling index) (46, 54, 55).



Visoka proliferativna aktivnost tumora korelira s višim histološkim gradusom, HER2/neu amplifikacijom, negativnim steroidnim receptorima, boljim odgovorom na kemoterapijsko liječenje te većim rizikom za obnavljanje bolesti (46, 49, 52-55).

### **Hormonski receptori**

Rak je dojke izvrstan primjer hormonski ovisnog tumora, pri čemu su brojni steroidni i peptidni hormoni uključeni u kontrolu tumorskog rasta i razvoja. Najznačajniji hormonski čimbenici su estrogenski receptori (ER) i progesteronski receptori (PgR). Prisutnost i količina ER i PgR u raku dojke važan je prediktivni pokazatelj odgovora na hormonsku terapiju, ali i prognostički indikator tijeka bolesti. Hormonski receptori imaju veću prediktivnu nego prognostičku vrijednost kod karcinoma dojke te se njihovo određivanje zbog jakih prediktivnih vrijednosti na hormonalnu terapiju treba napraviti u svakom invazivnom karcinomu dojke te se ponoviti u slučaju metastatske bolesti (46).

Estrogenski receptori su skupina steroidnih ligand aktivirajućih transkripcijskih faktora koji pripadaju obitelji nuklearnih hormonskih receptora. Oligomerne su građe, a svaka se podjedinica reverzibilno veže za jednu molekulu specifičnog steroidnog hormona s visokim afinitetom. Otkriveni su 1950-ih godina, a 40-ak godina poslije, ustanovilo se kako postoje dvije vrste estrogenskih receptora, ER $\alpha$  i ER $\beta$ , koji su u različitim omjerima eksprimirani u brojnim organima. Rezultat su produkcije različitih gena, ali posjeduju otprilike 95% sličnosti u DNA i otprilike 60% sličnosti u vezujućoj domeni. Transkripcijska aktivnost ER-a odvija se preko dvije domene, AF-1 i AF-2 (56).

Interakcija estrogena sa svojim receptorima (ER) u zloćudnim stanicama vodi kočenju apoptoze i oštećenja staničnog ciklusa što rezultira proliferacijom stanice. 1977. g. prvi se put spominju estrogenski receptori kao neovisni prognostički čimbenici u karcinomu dojke (57), a 1988. g. objavljuju se rezultati istraživanja Clarka i Mc Guirea koji govore o 10% boljem 5-godišnjem preživljenju kod pacijentica s ER pozitivnim tumorima, u odnosu na ER negativne (58). Progesteronski su receptori također eksprimirani u dvije forme, PgR-A i PgR-B, a obje su izoforme produkt jednoga gena koji je pod kontrolom dva različita promotora. Uloga PgR statusa kao prediktivnog čimbenika za karcinom dojke još uvijek nije dovoljno jasna. Postoje funkcionalne razlike različitih formi PgR receptora i studije su pokazale da je u karcinomima s lošijom prognozom i lošijim odgovorom na hormonalnu terapiju dominantan PgR-A receptor dok povećana ekspresija PgR-B korelira s većim rizikom od nastanka karcinoma dojke (59, 60). Tumori s ER+ PgR+ će reagirati na hormonsku terapiju u 78% slučajeva, ER+ PgR- u 34% slučajeva dok će ER- PgR + reagirati u 45% slučajeva. Vjerojatno je različit odgovor tumorskih stanica na hormonalnu terapiju rezultat različitih signalnih puteva koji su pod utjecajem estrogenskih receptora, njihovih izoformi, koaktivatora i korepresora. Sinteza PgR je pod kontrolom ER te je PgR odraz funkcionalnosti ER. Vrlo rijetko postoje PgR+ER- tumori, a smatra se da je

takav nalaz posljedica lažno negativnih rezultata ili je sinteza PgR u manjem dijelu pod kontrolom nekog drugog čimbenika. Uskoro bi se moglo očekivati da će se u kliničkoj praksi rutinski određivati različiti poznati oblici estrogenskih i progesteronskih receptora u svrhu određivanja boljih prognostičkih i prediktivnih čimbenika (45, 46, 61).

U 5-10% će slučajeva čak i ER-PgR- tumori reagirati na hormonalnu terapiju što se objašnjava lažno negativnim nalazima dijagnostičkih metoda ili da tamoksifen dijelom djeluje nekim drugim, estrogen i progesteron neovisnim putem (45, 46).

Hormonski status metastaza ne odgovara uvijek hormonskom statusu primarnog tumora jer se pokazalo da 20% ER pozitivnih tumora ima ER negativne metastaze. Primarni tumori koji su ER negativni nikada nemaju ER pozitivne metastaze. ER + tumori dojke su češći kod starijih žena, bolje su diferencirani, niže su mitotske aktivnosti, rjeđe imaju prekomjernu ekspresiju mutiranog p53 i HER2/neu. Kod žena s ER pozitivnim tumorima bolje preživljenje bez znakova bolesti nakon dužeg praćenja se gubi, zbog čega se može zaključiti kako je ER status u većoj mjeri biljeg proliferativne aktivnosti nego potencijala tumora za udaljenu diseminaciju. Iako su ER negativni tumori slabije diferencirani i ukupno lošije prognoze, riječ je o heterogenoj skupini tumora koja se može naći unutar različitih histoloških tipova invazivnih karcinoma dojke različite prognoze. Pravi je primjer medularni karcinom dojke koji je ER negativan tumor, a ima relativno dobru prognozu (45, 62, 63).

Postoji više načina određivanja hormonskih receptora (biokemijskim, imunokemijskim ili molekularnim metodama). Iako postoji određeni stupanj subjektivnosti u interpretaciji, danas se receptori najvećim dijelom određuju imunohistokemijski (IHC), najčešće na parafinskim rezovima, a metoda omogućava i određivanje ne samo postotka broja pozitivnih jezgara nego i intenzitet bojanja (64).

### **Obitelj receptora za epidermalni čimbenik rasta**

Obitelj receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR) čine transmembranski glikoproteini koji su važni za uredan rast i razvoj, ali su i pojačano eksprimirani u brojnim tumorima te imaju važnu ulogu u tumorskoj invaziji i metastaziranju. Obitelj ima 4 člana: EGFR ili HER-1 (erb-B1), HER-2/neu (erb-B2), HER-3 (erb-B3) i HER-4 (erb-B4). Svaki se protein sastoji od tri domene: izvanstanične, unutarstanične i transmembranske. Izvanstanična je domena (ECD, engl. extracellular domain) receptorsko mjesto vezanja liganda. Transmembranska domena povezuje ekstracelularnu domenu s unutarstaničnom domenom koja ima tirozin-kinaznu aktivnost te ima ulogu prijenosa signala u unutrašnjost stanice, odnosno aktivira sekundarne glasnike koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije i proliferacije stanice (65, 66). Najviše podataka o vrijednosti određivanja, u smislu prognostičkih i prediktivnih čimbenika u raku dojke, imaju dva člana ove obitelji i to HER-1 i HER-2.

HER1 (EGFR), protein od 170kDa koji je eksprimiran u normalnom duktalnom epitelu, nužan je za uredan rast i razvoj dojke, a prekomjerno je eksprimiran u 15-50% karcinoma dojke. Brojne su studije istražile prognostičku vrijednost EGFR-a i većina je u univarijatnim analizama pokazala značajnu povezanost ekspresije s kraćim OS i DFS. No, zbog nedostatka multivarijatnih analiza prognostička vrijednost EGFR-a još nije do kraja rasvijetljena (46).

Za razliku od HER1, HER2/neu je jaki prediktivni i prognostički čimbenik za karcinom dojke. Protoonkogen *HER2/neu (C-erbB2)* nalazi se na 17. kromosomu te je njegova amplifikacija povezana s razvojem karcinoma dojke u animalnim modelima (65). Epitelne stanice tkiva dojke imaju na svojoj površini 20000-50000 HER2 receptorskih mjesta dok stanice karcinoma dojke mogu imati do 2 000 000 receptora. Prekomjerna izraženost HER2 receptora vodi pojačanoj tirozin kinaznoj aktivnosti čime se pojačavaju stanični signali i ometaju normalni unutarstanični kontrolni mehanizmi. Posljedično ima ulogu u malignoj transformaciji stanice i to putem proliferacije, invazivnosti, angiogeneze i inhibicije apoptoze (66, 67). Slamon i suradnici su 1987. g., koristeći "southern blot" metodu, izvijestili da je HER2/neu amplifikacija neovisan prognostički marker za relaps bolesti i sveukupno preživljenje pacijentica (68). Od tada su napravljene brojne studije koje su pokazale da pacijentice s prekomjernom ekspresijom HER2/neu, koja se nalazi u 15-20% karcinoma dojke, imaju lošiju prognozu i veću smrtnost te da su takvi tumori, višeg stupnja malignosti, često hormonski neovisni i da pokazuju rezistenciju na određene vidove citostatskog i hormonalnog liječenja. Lijekovi poput trastuzumaba koji antagoniziraju učinak pojačane ekspresije receptora za epidermalne faktore rasta umanjuju maligni potencijal tumora i značajan su napredak u liječenju karcinoma dojke (64, 69-72).

Analiza HER2/neu statusa danas se može odrediti na više načina. Najčešće se u kliničkoj praksi koristi imunohistokemijska analiza na parafinskim histološkim rezovima te za granične nalaze dodatna *in situ* hibridizacijska tehnika (CISH, FISH, dual SISH). Ostale metode uključuju molekularne (RQ-PCR), razne blot tehnike (Western, Southern) te ELISA (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Najčešći način interpretacije nalaza imunohistokemijskog bojanja tumorskih stanica je:

0 - nema bojanja ili je prisutno u < 10% stanica

1+ jedva/slabo vidljivo, nepotpuno/djelomično bojanje u < 10% stanica

2+ slabo/umjereno, kompletno, isprekidano/difuzno bojanje u >10% stanica i jako kompletno membransko bojanje u <30% tumorskih stanica

3+ jako, kompletno membransko bojanje u > 30% stanica.

Smatra se da je intenzitet bojenja 3+ IHC bojenjem pozitivan nalaz jer je usporedba imunohistokemijskog bojenja s *in situ* hibridizacijom, pokazala odličnu korelaciju visoke razine ekspresije HER2 intenziteta bojanja 3+ s amplifikacijom gena. Intenzitet 2+ se mora provjeriti *in situ* hibridizacijskom metodom jer je kod takvog rezultata samo djelomična povezanost s amplifikacijom gena (73-75).

### **Topoizomeraza IIa**

Topoizomeraze su nuklearni enzimi koji moduliraju terciarnu strukturu dvostruke uzvojnice DNA. Tumori koji pokazuju povećanu ekspresiju TOPO2A se smatraju tumorima lošijeg kliničkog tijeka i ukupno lošije prognoze. *TOPO2A* nalazi se na istom kromosomu kao i *HER2/neu*, a novija istraživanja govore u prilog povezanosti prekomjerne ekspresije TOPO2A i boljeg DFS nakon adjuvantne terapije s trastuzumabom i antraciklinima (46, 76).

### **Tumor infiltrirajući limfociti (TIL, engl. Tumour Infiltrating Lymphocytes)**

Limfocitna je infiltracija u tumorima jedan od glavnih imunih mehanizama u eradikaciji malignih stanica. Medularni karcinom dojke ima obilan limfocitni infiltrat i pokazuje nešto bolju prognozu dok za druge histološke tipove nema definitivnog prognostičkog konsenzusa što se tiče infiltracije limfatičkim stanicama (77, 78). Nekoliko je studija pokazalo da se infiltrat imunih stanica u tumorskom tkivu sastoji od T i B limfocita, makrofaga i NK stanica. Tumor infiltrirajući limfociti ekspimiraju jedan od aktivacijskih markera kao što je CD25 i sastoje se pretežno od pomoćničkih CD4 i citotoksičnih CD8 T limfocita. Međutim, omjeri zastupljenosti pojedinih populacija T limfocita se razlikuju od studije do studije (78-81).

Kvantificiranje i kvalificiranje TIL-a u karcinomu dojke u odnosu na progresiju i prognozu je još uvijek stvar rasprave. Po nekim je autorima infiltrat TIL-a umjereno do jako obilan u oko 60-90% karcinoma dojke. Iako su TIL aktivirani u većini karcinoma dojke, stanično je posredovana imunost očito neadekvatna te karcinom dojke progresivno raste i širi se unatoč prisutnosti imunih stanica unutar tumorskog tkiva. Smatra se da ta oprečna uloga TIL-a nastaje zbog njihove dvostruke uloge u tumorskom tkivu. TIL imaju sposobnost lučenja FGF-a i VEGF-a koji mogu potaknuti limfangiogenezu i angiogenezu, što promovira metastatsku sposobnost tumora. S druge strane, TIL pokazuju i antitumorski učinak preko CD8 T limfocita i NK stanica koji se vežu na Fas ligand malignih stanica uzrokujući njihovu smrt. Još jedan od mehanizama kojima TIL pospješuju smrt tumorske stanice je lučenje IFN gama, TNF alfa i GM-CSF (79, 80). Važno je naglasiti da se funkcija TIL u tumorskom tkivu smanjuje inhibitornim citokinima te alteracijama MHC molekula i Fas liganda u tumorskim stanicama (78, 79). Zanimljivo je da se i estrogen spominje u ulozi aktivacije tumorskih CD4 i CD8 T limfocita u tumoru. U ER- $\alpha$  negativnim tumorima nalazi se veća količina nezrelih B i T limfocita što implicira utjecaj estrogena na zrelost

limfocita u karcinomima dojke (81).

Danas je u svrhu induciranja efektivnog imunog odgovora na tumor i otkrivanja antigena, koji su specifični za karcinom dojke, moguće i manipulirati s limfocitima *ex vivo*. Rezultati nisu dovoljno uspješni, ali ostavljaju prostor za daljnja istraživanja TIL-a, njihovih utjecaja na patogenezu i prognozu karcinoma dojke te otkrivanja novih modaliteta imunoterapije (79).

### **Plazminogen aktivatori i inhibitori**

Vjerojatno najistraživaniji prognostički i prediktivni čimbenici u karcinomu dojke, iza hormonskih receptora i receptora za faktor rasta, jesu molekularni markeri vezani uz uPA sistem. Urokinaza plazminogen aktivator (uPA) i tkivni plazminogen aktivator su članovi obitelji serinskih proteaza. Nakon aktivacije od strane plazmina mogu degradirati različite komponente ekstracelularnog matriksa i time promovirati tumorski rast, invaziju i metastaziranje. uPA je prva proteaza za koju je dokazana prognostička vrijednost u ljudskim malignim tumorima i njezina je prekomijerna ekspresija povezana s lošijom prognozom kod pre- i postmenopausalnih pacijentica s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima. Drugi su članovi obitelji receptor uPAR i inhibitori PAI-1 i PAI-2. Kvantifikacija sastavnica uPA sistema te njihovih interakcija je složena, a većina je velikih retrospektivnih i prospektivnih studija pokazala povezanost njihove prekomjerne ekspresije (RR 2-4) s lošijim OS i DFS. Omjer vrijednosti uPA/PAI-1 također ima prognostički i prediktivni značaj. Pacijentice s negativnim pazušnim limfnim čvorovima i niskom vrijednošću omjera uPA/PAI-1 imaju odličnu prognozu i bez primjene adjuvantnog sustavnog liječenja. Visoka vrijednost omjera uPA/PAI-1 kod pacijentica iste grupe nosi veću vjerojatnost povrata bolesti, ali i veću korist od adjuvantne kemoterapije. Iako se intenzivno istražuju nove metode, do danas se jedino ELISA pokazala kao uspješna metoda detekcije plazminogen aktivatora i inhibitora (46, 82-85).

### **Katepsin D**

Katepsin D je aspartat proteaza koja pripada pepsinskoj obitelji, a nalazi se eksprimirana u gotovo svim stanicama. Sudjeluje u lizosomskoj degradaciji proteina, a povećana ekspresija katepsina D u karcinomima dojke, pozitivno korelira s agresivnijim tumorima, metastazama i lošim preživljenjem (86).

## 1.5. Matriks metaloproteinaze (MMP-e)

Matriks metaloproteinaze pripadaju najvećoj skupini proteaza u ljudskom organizmu tj. porodici proteolitičkih enzima, endopeptidaza. Gross i Lapiere su prije 50-ak godina otkrili prvu metaloproteinazu, a do danas ih je otkriveno 23. Pokazalo se da MMP imaju brojne uloge u normalnim fiziološkim procesima u organizmu kao što je embrionalni razvoj, pregradnja kosti, menstrualni ciklus, cijeljenje rane itd. (87, 88)

MMP su prvenstveno otkrivene kao enzimi ekstracelularnog matriksa koji sudjeluju u njegovoj homeostazi, ali se danas zna da je njihova uloga bitno veća. MMP imaju proangiogenu ulogu putem degradacije matriksa, ali s obzirom na to da se njihovim djelovanjem oslobađaju i inhibitori angiogeneze (digestija plazminogena i nastanak angiostatina te digestija kolagena tipa XVIII i nastanak endostatina), imaju i oprečnu antiangiogenu ulogu. Sudjeluju u regulaciji staničnog rasta putem odvajanja receptora za faktore rasta na staničnoj površini te otpuštanjem faktora rasta koji nastaju sekvestracijom ekstracelularnog matriksa. Djelomično reguliraju apoptozu, imuni sustav te moduliraju bioaktivnost nekih kemokina (89).

Postoje 24 gena koji kodiraju 23 tipa metaloproteinaza. Premda imaju široki afinitet za supstrat, ipak se tradicionalno razvrstavaju u razrede prema supstratnim specifičnostima na kolagenaze, gelatinaze, stromelizine i membranske tipove metaloproteinaza (tablica 3) (90-92).

Tablica 3. Tipovi metaloproteinaza.

Podklasa enzima	Ime	Neki supstrati
<b>Kolagenaze</b>		
MMP-1	Kolagenaza 1	kolagen, agrekan, nidogen, proteoglikan-vezajući protein, tenascin, entaktin, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Kolagenaza 2	kolagen, gelatin, agrekan
MMP-13	Kolagenaza 3	kolagen, gelatin, agrekan, perlekan, fibronektin, osteonektin, MMP-9, PAI-2
MMP-18	Kolagenaza 4	nepoznat
<b>Gelatinaze</b>		
MMP-2	Gelatinaza A	kolagen tipa IV, elastin, gelatin, laminin, fibronektin, agrekan, dekorin, proteoglikan, osteonektin, aktivna MMP-9, MMP-13, nidogen
MMP-9	Gelatinaza B	kolagen, gelatin, elastin, laminin, agrekan, fibronektin, nidogen, proteoglikan, osteonektin, entaktin, plazminogen, TGF- $\beta$
<b>Stromelizini</b>		
MMP-3	Stromelizin 1	kolagen II, IV, IX i X, gelatin, agrekan, verzikan, perlekan, dekorin, proteoglikan, osteonektin, entaktin, nekoliko MMPa, nidogen, kazein
MMP-10	Stromelizin 2	kolagen II, IV, V, gelatin, fibronektin, laminin, pro-MMP1, 8 i 10
MMP-11	Stromelizin 3	kazein, laminin, $\alpha$ 1 antitripsin
<b>Matrilizini</b>		
MMP-7	Matrilizin 1	kolagen I-V i X, gelatin, agrekan, dekorin, fibronektin, laminin, entaktin, osteonektin, elastin, kazein, transferin
MMP-26	Matrilizin 2 Endometaza	kolagen IV, gelatin, fibronektin, kazein, fibrinogen
<b>Membranske MMP</b>		
MMP-14	MT1-MMP	proMMP-2, kolagen I-III, kazein, elastin, fibronektin, gelatin, laminin, vitronektin, proteoglikan
MMP-15	MT2-MMP	proMMP-2, fibronektin, laminin, entaktin, agrekan, perlekan
MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2, kolagen III, gelatin, kazein, fibronektin
MMP-17	MT4-MMP	gelatin, fibrin, fibronektin

MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2 i 13.
MMP-25	MT6-MMP	proMMP-2
<b>Ostale</b>		
MMP-12	Makrofag metaloelastaza	elastin, plazminogen
MMP-19	RASI-1	kolagen I i IV, gelatin, laminin, fibronektin
MMP-20	Enamelizin	amelogenin
MMP-21		gelatin
MMP-23	CA-MMP	gelatin
MMP-27		gelatin, kazein
MMP-28	Epilizin	kazein

### Struktura i regulacija matriks metaloproteinaza

Matriks metaloproteinaze se sastoje od propeptidnog lanca (oko 80 aminokiselina), katalitičke domene (oko 170 amino kiselina), tzv. "hinge" regije tj. vezajućeg peptida varijabilne dužine te od hemopeksinske domene (oko 200 aminokiselina) (Slika 6). Katalitička domena sadrži Zn vezajuću sekvencu koja je karakteristična za Zn superobitelj proteinaza. Propeptidi svih metaloproteinaza, osim MMP23, imaju cisteinski dio koji veže ion Zn što ih održava u latentnom stanju, a nakon proteolitičkog cijepanja cisteinskog kraja peptidnog lanca prelaze u aktivni oblik. MMP su sintetizirane kao pre-proenzimi. Signalni peptid se odstranjuje tijekom translacije i nastaje proMMP koja se nalazi u zimogenim zrcima, čija je aktivacija jako bitna za izlučivanje MMP-a. 13 MMP-a se luči iz stanice u obliku zimogena, a onda se u ekstracelularnom matriksu aktiviraju drugim aktivnim metaloproteinazama ili drugim spojevima. Nekatalitička domena ima ključnu ulogu u određivanju specifičnosti za supstrat MMP-a. Fibronektin tip II domena je specifična za gelatinaze i razgrađuje kolagen tipa 4, gelatin, elastin, ali ne i male peptide (87, 89, 92).

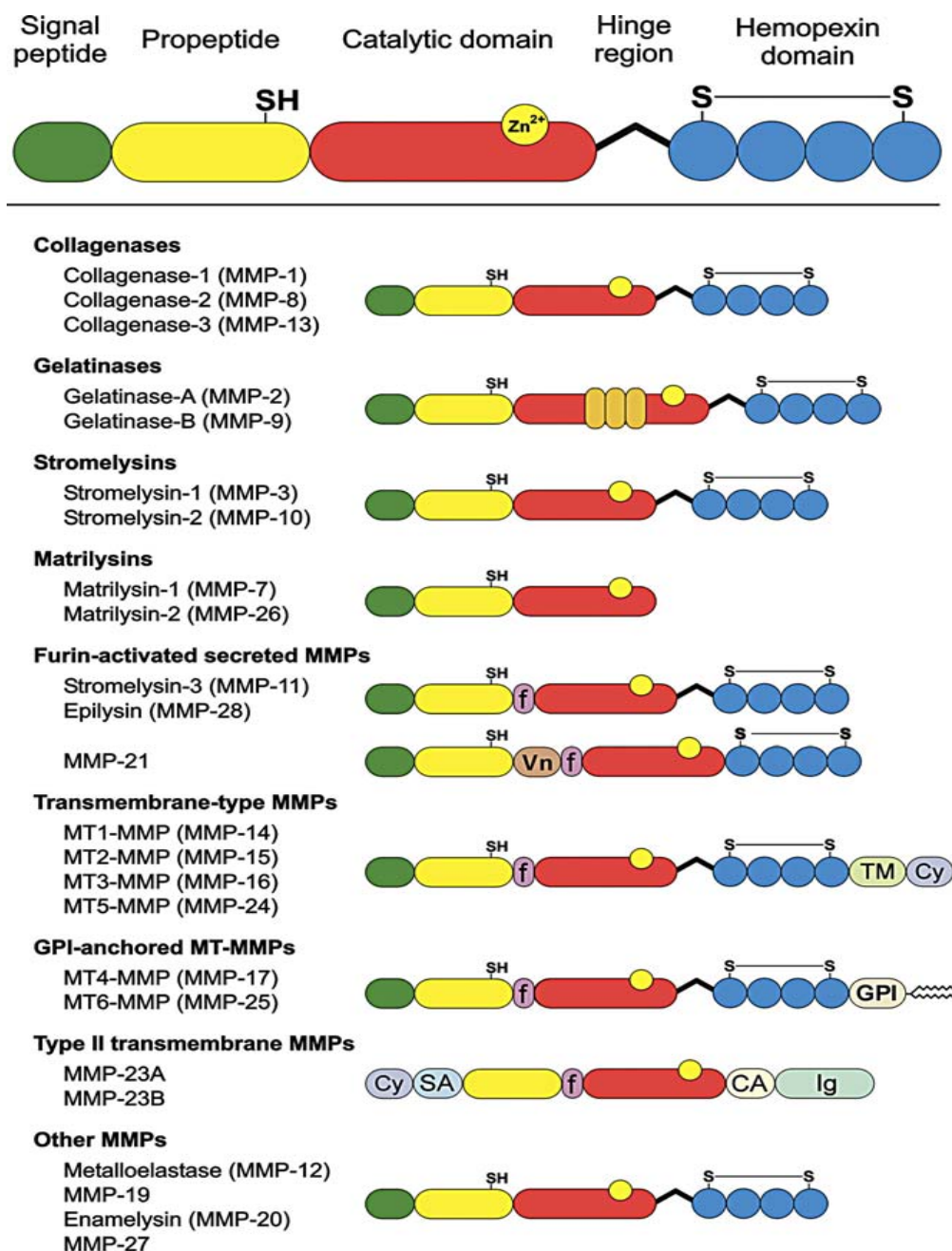
Aktivnost MMP je vrlo blaga u normalnim tkivima, ali se njihova aktivnost povećava citokinima, faktorima rasta, hormonima, međustaničnim interakcijama i interakcijama između stanica i ekstracelularnog matriksa (92). Njihova aktivnost



dodatno je regulirana  $\alpha_2$  makroglobulinom, lučenjem specifičnih tkivnih inhibitora matriks metaloproteinaza (TIMP) i RECK proteinom. U organizmu postoji 4 skupine TIMP-a (1 do 4) i vežu se za Zn regiju MMP-a i nekih proMMP-a. Tkivni inhibitori metaloproteinaza imaju 184-194 aminokiseline, molekularna težina im varira od 21 do 28 kDa i imaju vrlo sličnu tercijernu strukturu s dvije domene. N terminalna domena je nužna za inhibicijsku aktivnost dok je C terminalna domena nužna za njihovu specifičnost. Inhibitorna aktivnost TIMP-a je slična, ali se one razlikuju po tkivnoj distribuciji, interakcijama s prometaloproteinazama i regulacijom njihove ekspresije. Različite stanice i tkiva imaju posebne puteve aktivacije transkripcije MMP-a i TIMP-a, a uključuju MAP kinaze, NF- $\kappa$ B, Smad ovisne puteve i dr.

$\alpha_2$  makroglobulin je protein plazme s četiri domene po 180 kDa s kojima stvara kompleks s MMP. Nakon vezanja se kompleks endocitozom inkorporira u LDL-u sličan receptor koji se onda razgradi unutar stanice.

RECK glikoprotein ima inhibitornu domenu za serinske proteaze i ubikvitarno je eksprimiran u organizmu. Koncentracija RECK-a je izrazito niska u tumorima, a neki onkogeni tipa Ras-a inhibiraju njegovu sintezu. Nakon ponovne aktivacije RECK-a u staničnim linijama humanih tumora se pokazalo da stanice imaju manji invazivni i metastatski potencijal te da je koncentracija MMP-9 reducirana (92-96).



Slika 6. Struktura metaloproteinaza (93).

## **Matriks metaloproteinaze 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9), gelatinaze**

Ključni proces metastaziranja je degradacija bazalne membrane i komponenti ekstracelularnog matriksa, a metaloproteinaze su enzimi koji imaju ključnu ulogu u tom procesu (97-99).

Nekoliko članova iz porodice matriks metaloproteinaza ima središnju ulogu u invaziji i metastaziranju tumora zbog svoje sposobnosti razgradnje građevnih elemenata bazalne membrane, a to su gelatinaze tj. metaloproteinaza 2 (MMP-2) i metaloproteinaza 9 (MMP-9). Kolagenaze razgrađuju tip 4 kolagena koji je glavna sastavnica bazalne membrane, a osim kolagena tipa 4 razgrađuju i gelatin, elastin, hondroitinsulfat, fibronektin, laminin i osteonektin. Za MMP-2 i 9 se pokazalo da su prekomijerno eksprimirane u biološki agresivnijim tumorima (92, 99, 100). Postoje dokazi da gelatinaze djeluju na invazivnu i metastatsku sposobnost tumora, ne samo mehaničkom razgradnjom bazalne membrane, nego i indirektno putem kolagena tipa 4. Kolagen tipa 4, koji se oslobađa tijekom procesa razgradnje u staničnim linijama karcinoma dojke, smanjuje ekspresiju međustaničnog E-kaderina, povećava ekspresiju intersticijskog N-kaderina i vimentina, povećava sekreciju MMP-2 te uzrokuje aktivaciju FALK i NFkB. Sve navedeno govori u prilog induciranja epitelno mezenhimalne tranzicije (EMT, engl. epithelial to mesenchymal transition) čime se prvi put pokazala neovisnost kolagena tipa 4 u indukciji EMT (101, 102). Gen za gelatinazu A nalazi se na 16. kromosomu, a za gelatinazu B na kromosomu 2 (103, 104).

Za razliku od ostalih metaloproteinaza, gelatinaze imaju domenu nalik na fibronektin koja je insertirana u katalitičku domenu. Za razliku od MMP-2, MMP-9 ima i dodatnu domenu nalik na kolagen tipa V koja se nalazi između katalitičke i hemopeksinske domene (89).

Gelatinaze se prepisuju u citoplazmi, a uskladištene su u zimogenim zncima u inaktivnom proenzimskom obliku koji zahtijeva enzimatsko cijepanje peptidnog lanca za prijelaz u aktivni oblik. Pro MMP-2 formira kompleks preko hemopeksinske domene enzima s neinhitornom C terminalnom domenom TIMP-2. Ovaj kompleks je nužan za aktivaciju proMMP-2 od strane MT1-MMP koja se nalazi na površini stanica. Dvije MT1-MMP molekule su potrebne za aktivaciju proMMP-2; na jednu se veže kompleks MMP-2/TIMP-2 dok je druga potrebna za aktivaciju MMP-2. Ako TIMP-2 postoji u suvišku onda blokira drugu molekulu MT1-MMP i na taj način ne dolazi do aktivacije proMMP-2. ProMMP-2 stvara komplekse i s TIMP-3 i TIMP-4 što ne rezultira njenom aktivacijom, a prava uloga tih kompleksa ostaje nepoznanica. Hemopeksinska domena proMMP-9 formira kompleks i s TIMP-1 i TIMP-3, a prava uloga proMMP9-TIMP kompleksa također nije do kraja razjašnjena. Jedino se zna da su snažni inhibitori metaloproteinaza (93).

U animalnim su modelima i kod ljudi nađene brojne pozitivne korelacije ekspresije gelatinaza s malignomima. Kod "knockout" MMP-2 miševa je izazvana supresija angiogeneze, tumorskog rasta te eksperimentalno induciranog karcinoma gušterače. U "knockout" MMP-9 miševa dolazi do supresije eksperimentalno induciranog raka kože, pankreasa, manjeg broja metastaza, odgođene tumorske vaskularizacije, abnormalne enhondralne osifikacije itd. Kod ljudi su nađene i genetske alteracije u genu za MMP-2. Homozigoti za MMP-2 gen imaju subkutane fibrotične nodule, a paradoks je da imaju i osteolitičke lezije te artritis. Smatra se da dolazi do kompenzatornog povećanja produkcije drugih MMP-a na račun MMP-2 ili je možda MMP-2 nužna za aktivnost osteoblasta i/ili osteoklasta (91).

Brojne su studije pokazale pozitivnu korelaciju između prekomjerne ekspresije gelatinaza s tumorskom inicijacijom i progresijom (99, 105-111).

Više je prognostičkih studija pokazalo lošiju prognozu pacijentica s prekomjernom ekspresijom gelatinaza (101, 106, 112-115). Međutim, postoje studije koje nisu našle nikakvu prognostičku vrijednost (107) te radovi koji govore i u prilog povoljnije prognostičke vrijednosti gelatinaza u pacijentica s negativnim limfnim čvorovima (116). Dakle, nema konsenzusa o prognostičkoj vrijednosti ekspresije gelatinaza u karcinomima dojke te su nužna daljnja istraživanja.

Promotori MMP-2 i MMP-9 sadrže vezno mjesto za više transkripcijskih čimbenika od kojih su neki ETS-1, AP-1, AP-2, PEA-3, NF- $\kappa$ B i Sp1 (117, 118).

## **1.6. Onkogeni i tumor supresorski geni**

### **ETS obitelj transkripcijskih čimbenika (E26-Transformation Specific)**

30-ak članova ETS obitelji transkripcijskih čimbenika ima konzerviranu ETS domenu od 85 aminokiselina koja se veže na DNA promotore s GGAA/T slijedovima. ETS domena ima 3 alfa uzvojnice i 4 beta nabrane ploče koje formiraju wHTH (engl. winged helix-turn-helix) strukturu koja omogućuje vezanje proteina na DNA vezno mjesto (engl. EBS, ETS binding site). Uz ETS domenu, još jedna od visoko konzerviranih domena proteina je i PNT (engl. pointed) domena kojom protein stvara veze s drugim proteinima. ETS proteini sudjeluju u brojnim staničnim procesima kao što su apoptoza, diferencijacija, rast i onkogeni transformacija. Posttranslacijske modifikacije im mijenjaju afinitet prema DNK, transkripcijsku aktivnost, interakciju s ostalim proteinima, subcelularnu lokalizaciju i stabilnost. Brojni ETS proteini su na samom dnu kaskadnih lanaca faktora rasta, a do danas je poznato preko 400 ETS ciljnih gena. Za preciznu transkripcijsku regulaciju ETS čimbenicima je nužna interakcija s ostalim proteinima, a nastali kompleksi povećavaju ili inhibiraju njihovu transkripcijsku aktivnost i određuju ciljne gene. Među prvim takvim kompleksima je

otkriven ETS-1 i AP-1 kompleks, nužan za aktivaciju MMP-1, uPA i TIMP-1 (119, 120).

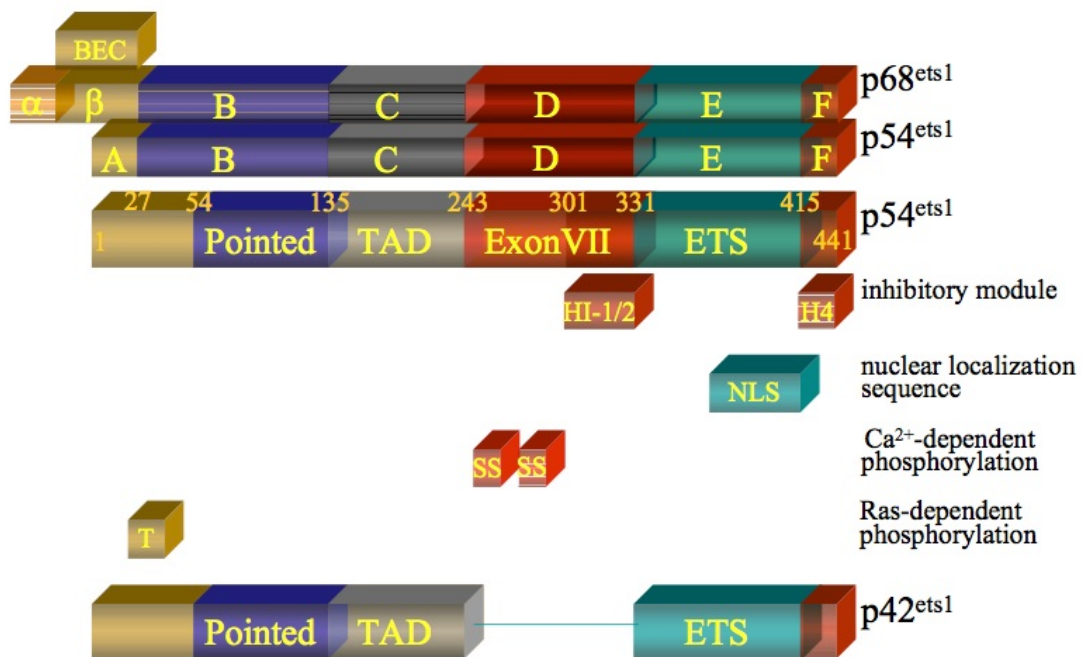
Transkripcijski je čimbenik ETS-1 prvi član obitelji, a otkriven je kao produkt fuzijskog onkogenog *gag-myb-ets* u ptičjem retrovirusu E26 koji inducira eritroblastičnu i mijeloblastičnu leukemiju u pilića. Gen *ETS-1* se kod ljudi nalazi na 11 kromosomu, ima 8 egzona (egzon A i egzoni III-IX) te kodira dvije mRNA od 6,8 kb i 2,7 kb. Transkripti sadrže sve egzone ili im nedostaje egzon IV ili VII. Iz ovakvih se RNA generiraju dva osnovna ETS-1 proteina u ljudi, a to su p42-ETS-1, kojem nedostaje domena VII (delta VII ETS-1), i p54-ETS-1 (p51-ETS-1) koji se sastoji od svih 6 domena (slika 7). Postranslacijskim modifikacijama nastaju i p27, p33 i p52 izoforme.

E domena je DNA vezujuća domena, a njenu aktivnost kontroliraju dvije regulatorne domene, D i F. A i B domena su također regulatorne, dok je C aktivacijska domena. Egzon VII ili D domena ima dvije regulatorne jedinice: C terminalni kraj je dio autoinhibitornog mehanizma dok N terminalni kraj sadrži fosforilacijsko mjesto ovisno o kalciju. Ta su dva dijela funkcionalno povezana i pojačavaju mehanizam autoinhibicije C domene koja je otkrivena zbog činjenice da proteini bez egzona VII imaju čak do deset puta veći afinitet za DNK. Heliksi autoinhibitorne domene blokiraju *ets* domenu u zatvorenoj konfiguraciji i na taj način ometaju vezanje s EBS na DNK. H1 se spontano odmotava te ova strukturna promjena omogućava drugim proteinima da moduliraju sposobnost ETS-1 vezivanja s DNK.

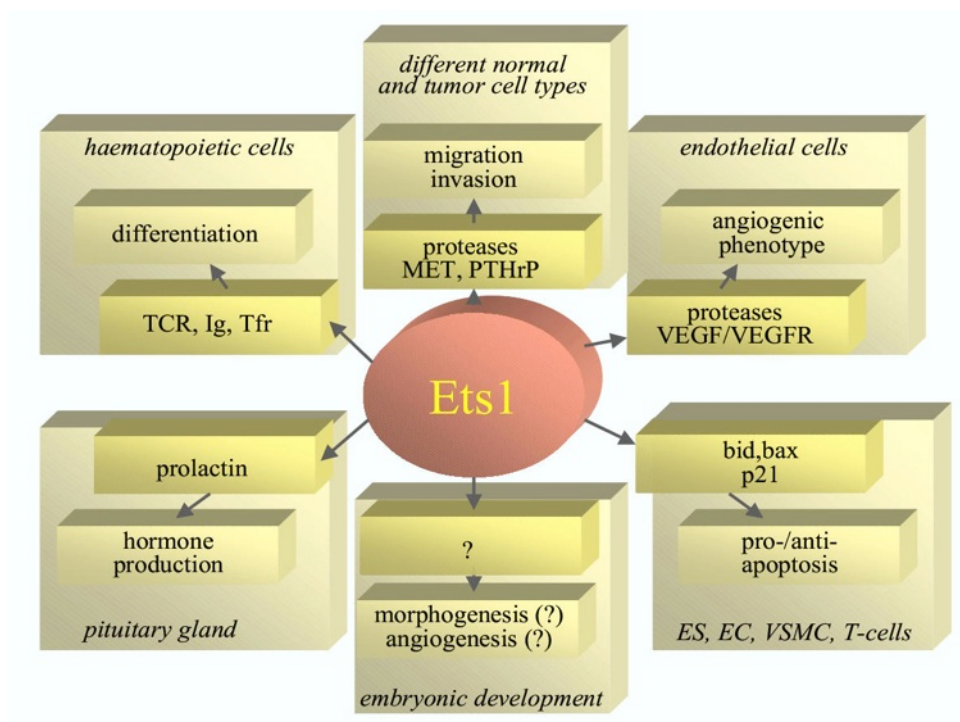
Aktivacijska domena ili C domena je esencijalna za transkripcijsku aktivnost proteina jer se veže s proteinima poput CREB transkripcijskog faktora (CBP/p300). CBP/p300 ima ulogu histon acetil transferaze i pomaže u interakciji ETS-1 s drugim proteinima.

Brojni transkripcijski čimbenici reguliraju transkripcijsku aktivnost ETS-1. AML-1, Pit-1 i HIF2 $\alpha$  se vežu na egzon VII i blokiraju inhibirajući učinak domene. ETS-1 također može djelovati na veznu sposobnost partnerskog proteina prema DNA. U prisutnosti palindromske sekvence DNA koja veže ETS-1 protein, egzon VII također sudjeluje u homodimerizaciji proteina što blokira autoinhibitorni mehanizam i omogućava proteinu da se veže s većim afinitetom za DNK.

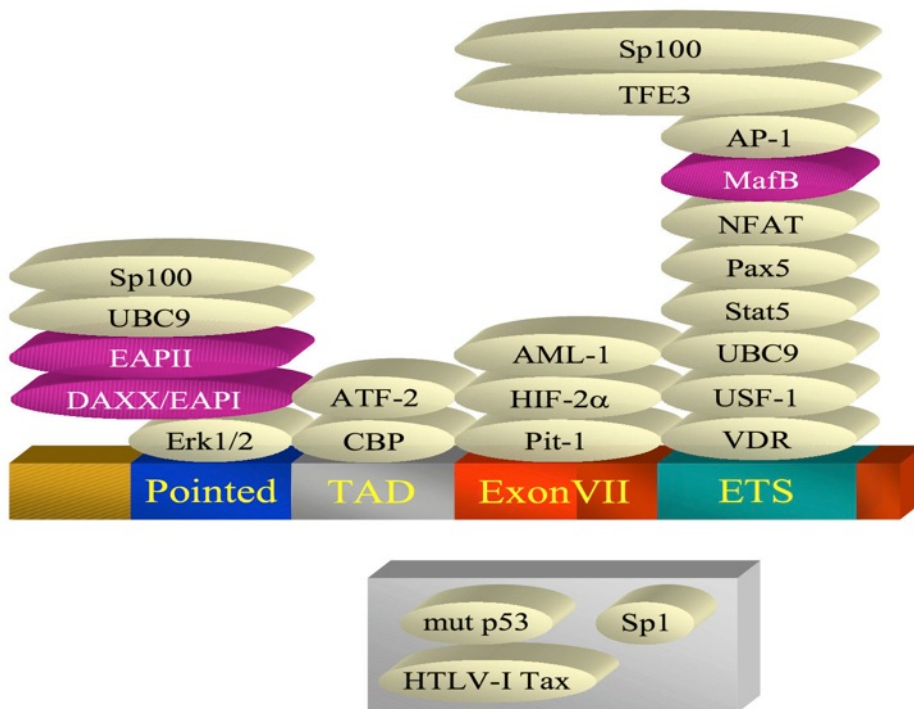
Neki proteini kao što je Pax5 povećavaju afinitet vezanja ETS-1 proteina i na mjesta DNK koja nisu pogodna za *ets* domenu npr. GGAG slijed. Ponekad je nužan i dodatni faktor za interakciju ETS-1 i drugog proteina, npr. TGF- $\beta$  je nužan za sinergističku funkciju ETS-1 i Smad3 na PTHrP promotoru, a vitamin D je nužan za transkripcijsku aktivnost ETS-1 na PRL promotoru. Interakcija s određenim proteinima može dovesti i do inhibicije transkripcije pa tako interakcija ETS-1 i Daxx/EAP1 inducira supresiju *bcl-2* i *MMP-1* gena. Uloga ETS-1 u fiziološkim i patofiziološkim procesima te njegova složena interakcija s drugim proteinima je prikazana na slici 8 i 9 (119-122).



Slika 7. Domene i izoforme ETS-1 proteina (121).



Slika 8. Uloge ETS-1 transkripcijskog čimbenika u fiziološkim i patološkim procesima (121).



Slika 9. Interakcija ETS-1 s drugim proteinima (121).

ETS-1 je nužan i za hematopoetsku, limfoidnu, vaskularnu, neuralnu i osteogenu diferencijaciju (119). Uloga *ETS-1* protoonkogen je već 1985. g. spomenuta kao bitan čimbenik u regulaciji rasta limfocita (124). ETS-1 "knock-out" miševi pokazuju poremećaj u T staničnom razvoju u timusu, slezeni i limfnim čvorovima te manji broj T stanica na periferiji (123). Ekspresija i stanična distribucija ETS-1 pokazuju različitosti u aktiviranim, mirujućim i apoptotičkim B i T limfocitima u pilića (125).

ETS-1 je jako eksprimiran u naivnim B stanicama, a pojačana se ekspresija gubi nakon B stanične aktivacije i terminalne diferencijacije (126). Gubitak ekspresije ETS-1 dovodi do smanjene proizvodnje IgM i IgG protutijela od strane plazma stanica i do smanjenog nastajanja B stanica iz prekursora u koštanoj srži (127, 128). U obrani organizma protiv tumorskih stanica bitnu ulogu imaju i NK stanice, a ETS-1 je uključen i u njihov razvoj (129-130).

ETS-1 je proapoptotički, ali i antiapoptotički transkripcijski čimbenik. P42 izoforma proteina promovira apoptozu regulirajući kaspazu 1 u staničnim linijama karcinoma kolona, a prekomjerna ekspresija ETS-1 u endotelnim stanicama vene umbilikalis promovira apoptozu u stanju kad je smanjen protok plazme. ETS-1 je također nužan za formaciju stabilnog DNA-p53-CBP kompleksa u indukciji proapoptotičkih gena u procesu UV inducirane apoptoze kod embrionalnih matičnih

stanica (119, 131).

Specifično je da su ETS čimbenici supstrati brojnih mitogenih signala tako da je njihova funkcija drastično promijenjena u tumorima. Rana su istraživanja pokazala da je prekomjerna ekspresija ETS-1, ETS-2 te ERG, koja je nastala onkogenom aktivacijom staničnih gena, rezultirala transformacijom fibroblasta in vitro i da su ti fibroblasti tumorigenični in vivo. Od tog su trenutka do danas napravljena brojna istraživanja koja su pozitivno korelirala prekomjernu ekspresiju ETS proteina s malignim tumorima. ETS transkripcijski čimbenici se nalaze i na kraju tirozin-kinaznih puteva te su time uključeni u regulaciju ekspresije brojnih receptora za faktore rasta npr. HER2/neu, c-kit i VEGF (119, 120).

Povećana je ekspresija ETS-1 proteina primijećena u brojnim humanim malignim tumorima kao što su karcinomi pluća, debelog crijeva, dojke, gušterače, štitnjače, jetre itd (120, 132, 133). Osim ETS-1, s karcinomom dojke je povezano više ETS proteina kao što su PEA3, PDEF i ERM. PEA3 je povezan s pojačanom HER2/neu ekspresijom u invazivnom duktalnom karcinomu te karcinomu in situ (134). PDEF, koji se normalno nalazi u visokim koncentracijama u prostati, prekomjerno je ekspimiran u karcinomima dojke i korelira s uznapredovalim stadijima bolesti. PDEF mRNA ima 20 puta veću koncentraciju u karcinomima dojke nego u fibrocističnoj bolesti ili u normalnom tkivu dojke (135). ERM je neovisan prognostički čimbenik za karcinome dojke (136).

ETS-1 je ekspimiran u karcinomima dojke i u staničnim linijama karcinoma dojke te korelira s progresijom bolesti i metastazama. Po nekim je autorima neovisan prognostički marker za preživljenje bez znakova bolesti, nije povezan s ostalim prognostičkim čimbenicima kao što su nodalni status, veličina tumora, histološki gradus i status receptora te je u pozitivnoj korelaciji s uPA, VEGF i PAI1. Također je ekspimiran jače u invazivnim nego u in situ lezijama dojke (122, 137, 138). Pozitivno regulira ekspresiju HER2/neu inducirane MMP-1 i dokazano je da je ETS-1 jedan od efektor HER2/neu puta (122, 139, 140). Većina karcinoma dojke koja metastazira u kosti ekspimiraju PTHrP (engl. paratiroid hormon related protein) koji inducira lokalnu osteolizu dovodeći do aktivacije TGF- $\beta$ . ETS-1 u staničnim linijama karcinoma dojke MD-MB-231 pojačava aktivaciju promotora za PTHrP koja je posredovana TGF- $\beta$ /SMAD putem (141). ETS-1 je prekomjerno ekspimiran u malignim duktalnim stanicama te je jedan od faktora koji je povezan s tumorskim rastom i histološkom diferencijacijom karcinoma dojke (140). Postoje i dokazi da se u staničnim linijama karcinoma dojke, koje su rezistentne na lijekove (vinkristin, docetaksel, doksorubicin), prekomijerno ekspimirira *ETS-1* gen (142).

ETS-1 je ekspimiran tijekom uredne embrionalne angiogeneze te u cijeljenju rana, ali je jako ekspimiran i tijekom tumorske angiogeneze. Tumori često imaju povećanu ekspresiju VEGF-a koji inducira produkciju ETS-1 u endotelnim stanicama



tijekom neovaskularizacije. ETS-1 je dovoljan za konverziju endotelnih stanica u angiogeni fenotip inducirajući uPA, MMP-1, MMP-3, MMP-9 i integrin  $\beta$ 2, što ih implicira kao ETS-1 ciljne gene. VEGF inducirana invazivnost je inhibirana ETS-1 "antisense" oligonukleotidima (137, 143, 144).

ETS-1 regulira ekspresiju gena koji kodiraju enzime involvirane u degradaciju ekstracelularnog matriksa kao što su MMP-1, -2, -3, -7 i -9 te promovira prekomjernu ekspresiju MMP-9 i uPA u odgovoru na EGF signalni put (120, 138, 145-147).

Novija istraživanja su pokazala da nemaju sve izoforme ETS-1 jednaki učinak na transkripciju gena. Novootkrivena izoforma ETS-1 proteina p27, ima negativan učinak na transkripcijsku aktivnost p51 ETS-1 čime suprimira maligne karakteristike kod MDA-MB-231 staničnih linija karcinoma dojke (148).

Unatoč brojnim istraživanjima koji govore u prilog povezanosti ekspresije ETS-1 s malignim bolestima i ostalim fiziološkim stanjima, prava uloga ETS-1 proteina ostaje nepoznata (140).

### **p53**

Tumor supresor gen *p53* je lociran na 17 kromosomu i kodira 53 kDa nuklearni fosfoprotein koji ima ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Divlji tip *p53* proteina zove se još i čuvar genoma te sprječava proliferaciju stanice koja je genetski alterirana. Nefosforilirani oblik *p53* se veže na DNA i pozitivno regulira gene koji inhibiraju rast i invaziju tumora. Alteracije u genu *p53* su najčešće mutacije tumor supresor gena i nalaze se u brojnim tumorima, uključujući i oko trećinu karcinoma dojke. Agresivni "trostruko negativni" tumori imaju vrlo često mutaciju *p53*. Protein se najčešće detektira imunohistokemijski i to, najvećim dijelom, njegov mutirani oblik koji je za razliku od divljeg tipa stabilan (46, 149).

*p53* mutacije su češće nađene u većim tumorima koji imaju viši histološki i nuklearni gardus, pojačanu izraženost HER2/neu i negativne steroidne receptore. U većini studija postoji i pozitivna korelacija ekspresije *p53* s lošijom prognozom pacijentica. U velikoj studiji koja je analizirala 1794 karcinoma dojke pokazano je da mutirani oblik *p53* također korelira s lošom prognozom, ali se u istoj studiji pokazalo da i mjesto mutacije na genu uvjetuje njegovu prognostičku vrijednost. Tako su pacijentice s tumorima dojke koje su imale mutaciju kodona 220 i 245 imale bitno bolju prognozu od ostalih mutacija gena (149).

Chang navodi kako se interes u rutinskoj kliničkoj praksi za prognostičku i prediktivnu vrijednost *p53* kod karcinoma dojke ipak bitno smanjio zbog postojanja studija koje nisu našle nikakvu prognostičku i prediktivnu vrijednost (46).

## **C-MYC**

Uloga *MYC* gena u patogenezi karcinoma dojke je poznata već 30-ak godina te su *MYC* ciljni geni implicirani u procese kao što su rast stanice, maligna transformacija i angiogeneza. Amplifikacija *MYC*-a se može detektirati u 50% do 100% invazivnih karcinoma ili DCIS visokog gradusa dok se ne može otkriti u benignim i hiperplastičnim lezijama.

Brojne su studije pokazale povezanost *MYC* amplifikacije s progresijom karcinoma dojke i lošijom prognozom. Međutim, rezultati radova iz područja prognostičkih i prediktivnih čimbenika nisu konzistentni te postoje i brojni radovi koji nisu pokazali nikakvu prognostičku vrijednost.

*MYC* je marker proliferacije i kao takav je jako popularan marker za istraživanje prediktivnih vrijednosti. Unatoč obećavajućim preliminarnim rezultatima kod liječenja trastuzumabom, prediktivna vrijednost *MYC*-a se nije potvrdila (46, 150-152).

## **Obitelj BCL-2**

Brojni pripadnici BCL-2 obitelji kao što su BAX, BAD, BCL-2, BCL-2L1 su hetero ili homodimeri uključeni u anti ili proapoptotičke procese. BCL-2 je mitohondrijski membranski protein koji sprječava apoptozu stanice, a u karcinomima dojke je reguliran od strane ER. Prekomijerna ekspresija BCL-2 je pozitivno korelirana s ER, niskim proliferacijskim indeksom, smanjenom p53 ekspresijom i nešto boljom prognozom. Nadler i suradnici su također pokazali prognostičku vrijednost BCL-2 i BAG-1 proteina kod karcinoma dojke te navode i njihovu prediktivnu vrijednost u adjuvantnoj terapiji hormon ovisnih tumora (46, 153).

## **p27**

Od inhibitora kinaze ovisne o ciklinu (CDK) se u prognostičkim i prediktivnim čimbenicima najčešće spominje p27. Povećana ekspresija je povezana s visokom proliferacijom, a u većini studija je indikator loše prognoze u karcinomima dojke, pogotovo kad je eksprimiran s prekomjernom ekspresijom ciklina E. Podaci iz nekih studija govore da bi ekspresija p27 bila neovisan prognostički čimbenik kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima, ali ne i kod pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima (154).

## 1.7. Molekularni i genetski profil tumora

Prije opisana molekularna klasifikacija i genetska analiza karcinoma dojke dovela je do razvoja nekoliko višegenskih prognostičkih i prediktivnih testova koje možemo svrstati u tri grupe: testovi za određivanje prognoze oboljelih od raka dojke, testovi za predviđanje koristi hormonskog liječenja i testovi predviđanja odgovora na neoadjuvantnu kemoterapiju. Za sada je nekoliko testova dostupno i u komercijalnom obliku.

Oncotype Dx (Genomic Health Inc, Redwood City, SAD) je prognostički i prediktivni test za pacijentice s hormonski ovisnim rakom dojke bez zahvaćanja pazušnih limfnih čvorova. Ne može se primijeniti kod pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima jer sve pacijentice u ovoj skupini imaju visok rizik povrata bolesti. Test se bazira na RT-PCR tehnologiji, a analizira 21 gen na mRNA nivou u parafinskim preparatima: *Ki67*, *STK15*, *Survivin*, *CCNB1* (ciklin B1), *MYBL2*, *MMP11*, *CTSL2* (katepsin L2), *GRB7*, *HER2*, *GSTM1*, *CD68*, *BAG1*, *ER*, *PgR*, *BCL*, *SCUBE2*, *A CTB* (b-aktin) *GAPDH*, *RPLPO*, *GUS*, *TFRC*. Na temelju rezultata, dobiva se RS (engl. recurrence score) prema kojem se pacijentice, s obzirom na 10-godišnju rizičnost za povrat bolesti, razvrstavaju u tri skupine: pacijentice s niskim rizikom (RS < 17, rizik 7%), srednjim (RS 17 - 30, rizik 14%) i visokim rizikom (RS > 30, rizik 30%). Pacijentice s niskim rizikom imaju značajnu korist od liječenja hormonskom terapijom i nije im potrebna adjuvantna kemoterapija. Vrijednost RS se pokazala i kao dobar prediktivni čimbenik u liječenju CMF protokolom kemoterapije (ciklofosamid, metotreksat, 5-fluorouracil). Studija u koju je uključena 651 pacijentica (NSABP B20 randomizirana studija), pokazala je da se rizik od povrata bolesti kod ovih pacijentica može smanjiti primjenom CMF protokola kemoterapije uz liječenje tamoksifenom. Apsolutno desetogodišnje poboljšanje kod pacijentica s RS većim od 31 je bilo 28%. Također, nekoliko je studija pokazalo kako je test jeftiniji od trenutnih metoda koje pomažu u odluci liječenja pacijentica kao što je AOL (engl. Adjuvant Online Programme)(155-158).

Drugi je test MammaPrint i koristi tehniku mikronizova za analizu izraženosti 70 gena iz uzoraka tumorskog tkiva, a njime se pacijentice dijele u dvije različite prognostičke skupine. Pretpostavlja se da bi pacijentice koje su ovim testom svrstane u povoljniju grupu mogle izbjeći adjuvantno kemoterapijsko liječenje (155, 158).

H/I Test koristi omjer HOXB13 i receptorskog gena za interleukin 17B. HOXB13 je pozitivno, a gen za receptor interleukina 17B negativno koreliran s povratom bolesti. U studiji na 852 pacijentice s ER pozitivnim tumorima, omjer H/I je bio prediktor na hormonalno liječenje. Daljnje su studije pokazale da je HOXB13 povezan s rezistencijom tumorskih stanica na tamoksifen dok je IL17BR bio neovisan prognostički čimbenik (158).

Razvijaju se i drugi molekularni testovi slični Oncotype DX-u kao npr. Mammostrat, koji bi u budućnosti mogli dodatno pomoći u izdvajanju one skupine pacijentica s pozitivnim ER koje bi imale benefit od primjene adjuvantne kemoterapije (155).

Važno je naglasiti kako još uvijek nema dokaza je li bolji kliničko-patološki ili genetski model procjene prognoze i ishoda bolesti kod pacijentica s karcinomom dojke jer još ne postoje rezultati prospektivnih studija na temelju navedenih testova. Nekoliko takvih studija jesu MINDACT, NBRST i MINT koje istražuju Mammaprint i TAILORX studija, u koju je uključen Oncotype DX. Rezultati gore spomenutih velikih prospektivnih studija vjerojatno će moći odgovoriti na takva pitanja (158).

## **1.8. Liječenje raka dojke**

Liječenje žena oboljelih od raka dojke je multidisciplinarno i temelji se na kombinaciji kirurškog liječenja, radioterapije, kemoterapije, hormonske i biološke terapije. Odabir se pojedinih oblika lokalne ili sustavne terapije zasniva na stadiju bolesti te analizi većeg broja prije opisanih prognostičkih i prediktivnih čimbenika.

### **1.8.1. Kirurško liječenje karcinoma dojke**

Krajem 19. stoljeća, Halsted prvi put razvija revolucionarnu metodu radikalne operacije za karcinome dojke kojom se postiglo 34% veće petogodišnje preživljenje pacijentica. U zadnjih se pedesetak godina Halstedova operacija napustila te se koriste neke od poštenijih metoda kirurških zahvata kao što su tumorektomija ili lumpektomija, segmentektomija, kvadrantektomija i modificirana radikalna mastektomija. Uz opisane se metode vrši i disekcija aksile, biopsija limfnog čvora čuvara te rekonstrukcija dojke (159).

Radikalni kirurški zahvati

a) Radikalna mastektomija znači uklanjanje dojke, oba pektoralna mišića i aksilarnih limfnih čvorova. Metoda je bila dominantna gotovo 80 godina, a pacijentice koje su bile podvrgnute operaciji imale su izrazite postoperativne komplikacije. Halstedova je teorija bila da se karcinom dojke lokalno širi pri čemu lokoregionalni limfni čvorovi čine prirodnu barijeru širenju. Urban razvija još radikalniju metodu kojom odstranjuje i limfne čvorove duž unutarnje mamarne arterije.

b) Modificirana radikalna mastektomija je metoda uklanjanja cjelokupnog tkiva dojke uz disekciju aksilarnih limfnih čvorova. Danas je standardna kirurška metoda liječenja

pacijentica s invazivnim karcinomom dojke kada poštediti operativni zahvat nije indiciran.

c) Jednostavna mastektomija je kirurški zahvat pri kojem se uklanja cijela dojka s cjelokupnim žljezdanim tkivom, bez disekcije aksile i uz očuvanje prsnih mišića.

d) Potkožna mastektomija je uklanjanje cjelokupnog tkiva dojke s ciljem očuvanja kože i bradavice s areolom čime se omogućuje istodobna ili naknadna plastična rekonstrukcija dojke (159, 160).

Poštediti operativni zahvati (engl. breast conserving surgery).

Koncept poštediti kirurgije nastao je iz mogućnosti ranog otkrivanja karcinoma dojke, a indikacija za poštediti kirurgiju je palpabilan, mamografski ili ultrazvukom dokazan tumorski čvor uz pravilan odnos veličine tumora i veličine dojke. Najčešće su to tumori do 3 cm veličine. Rezultati istraživanja su pokazali da poštediti kirurški zahvati imaju isti učinak na lokalnu kontrolu bolesti i preživljenje kao i radikalne kirurške metode, uz značajnu redukciju funkcionalnih oštećenja te pozitivan psihološki i estetski učinak (161, 162).

Poštediti operacija podrazumijeva eksciziju primarnog tumora s različito širokim rubom okolnog zdravog tkiva dojke uz odstranjenje istostranih limfnih čvorova. U novije se vrijeme uvela i biopsija limfnog čvora čuvara koja može zamijeniti disekciju aksile kod klinički negativnih limfnih čvorova. Prema opsegu kirurškog zahvata razlikuje se nekoliko vrsta operativnih zahvata:

a) Kvadrantektomija - podrazumijeva odstranjenje cijelog kvadranta dojke u kojem je smješten tumor, uz eksciziju kože iznad kvadranta i fascije velikog pektoralnog mišića.

b) Segmentektomija - ekscizija klinastog isječka dojke gdje je smješten tumor s 2 cm okolnog zdravog tkiva, bez odstranjenja kože ili fascije pektoralnog mišića.

c) Tumorektomija ili lumpektomija - ekscizija ograničena na odstranjenje tumora sa samo 1 cm okolnog zdravog tkiva (159, 160).

### **1.8.2. Adjuvantna terapija**

Engell je 1955. g. objavio rad s dokazima o vaskularnoj diseminaciji malignih stanica dojke i zaključio da terapija karcinoma dojke zahtijeva i sistemno liječenje. Time je postavio temelje adjuvantne terapije (163).

Adjuvantna terapija podrazumijeva dodatnu terapiju koja se većinom koristi nakon, ali nekad i prije kirurškog uklanjanja invazivnog karcinoma, sa svrhom

uništavanja mikrometastaza. Pojam neoadjuvantne terapije, koja se primjenjuje uglavnom kod lokalno uznapredovale bolesti, podrazumijeva sistemnu terapiju prije kirurškog liječenja u svrhu reduciranja tumorske mase i uništavanja okultnih mikrometastaza. U pretkliničkim se animalnim modelima pokazalo da je rana primjena kemoterapije rezultirala eradikacijom tumora u ranom stadiju što nije bio slučaj u modelima s odgođenom primjenom terapije. Prvi randomizirani pokusi adjuvantne terapije počeli su 1960-ih i uključivali su ablaciju jajnika i kratkotrajno davanje kemoterapeutika nakon kirurškog odstranjenja karcinoma.

Danas su osnovni oblici sustavnog liječenja karcinoma dojke hormonska terapija, kemoterapija i imuno terapija. Primjenjuju se u ranim stadijima bolesti s ciljem snižavanja rizika povrata bolesti i poboljšavanja ukupnog preživljenja te u liječenju uznapredovale bolesti sa ili bez udaljenih metastaza s ciljem smanjenja tumorske mase i dužeg preživljenja (164).

### **1.8.3. Hormonska terapija**

Karcinom dojke je prototip hormonski ovisnog tumora. Estrogen kontrolira rast i razvoj karcinoma dojke, a otkriće estrogenskih (ER) i progesteronskih receptora (PgR) bilo je temelj za razvoj hormonskog liječenja (57, 58). Oko 75% žena s rakom dojke ima hormonski ovisne tumore, što ih čini podobnima za hormonsko liječenje. Sve su pacijentice s hormonski ovisnim invazivnim tumorom kandidati za hormonsku terapiju, neovisno o dobi, statusu limfnih čvorova i eventualno planiranoj adjuvantnoj kemoterapiji.

Danas se hormonska terapija najviše temelji na primjeni selektivnih modulatora estrogenskih receptora (SERM, engl. selective estrogen receptor modulators) u koje se ubrajaju tamoksifen, toremifen i raloksifen. Toremfifen ima vrlo sličan učinak kao tamoksifen, ali se danas bitno manje ordinira dok se raloksifen koristi samo za prevenciju povrata bolesti. Tamoksifen je najčešće primjenjivani lijek u hormonskoj terapiji s dokazanom djelotvornošću u adjuvantnoj, neoadjuvantnoj i palijativnoj terapiji. Najobuhvatniju je ocjenu učinkovitosti adjuvantno primijenjenog tamoksifena dala meta-analiza Kolaborativne skupine za istraživanje ranih stadija karcinoma dojke (engl. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group). Nakon 15 godina praćenja, prema podacima od 40 000 žena, potvrdila je korist 5-godišnjeg adjuvantnog liječenja kod žena s hormonski ovisnim tumorima. Žene s ER pozitivnim ili ER nepoznatim statusom imale su 39% godišnje smanjenje rizika za povrat invazivnog karcinoma (164, 165).

Osim SERM-a postoje i inhibitori aromataze (anastrozol, letrozol), zatim steroidni inaktivatori aromataze (eksemestan), hormoni koji oslobađaju luteinizirajući hormon (LHRH agonisti) te antagonisti estrogenih receptora koji smanjuju njihovu aktivnost-SERDS, (engl. selective estrogen receptor down regulators) npr. fulvestrant. Koriste se i androgeni kao što je fluoksimesteron.

Odluka o vrsti hormonske terapije temelji se na hormonskoj ovisnosti tumora - količini ER i PgR, menstrualnom statusu pacijentice te eventualnom prethodnom liječenju (164, 165).

Ovarijalna ablacija još je jedna od učinkovitih oblika adjuvantnog liječenja kod premenopauzalnih pacijentica s hormonski ovisnim tumorima. Može se postići kirurški, radioterapijom ili kemijskim putem, primjenom LHRH lijekova (goserelin i leuprolid). EBCTCG je objavio rezultate meta analize randomiziranih studija ovarijskih ablacija kod pacijentica s hormonski ovisnim karcinomima dojke nasuprot grupe pacijentica koje nisu primile adjuvantno liječenje. Analiza je pokazala da pacijentice do 49. g. života, koje su podvrgnute ablaciji, imaju 25% redukciju u povratu bolesti i oko 30% redukciju smrtnog ishoda (164, 165).

#### **1.8.4. Citostatsko liječenje**

Unatrag 40-ak godina, napravljene su brojne kliničke studije koje su ispitale ulogu kemoterapeutika u reduciranju rizika za povrat bolesti i smrti. Prvi su kemoterapeutici bili tiotep, melfalan i ciklofosamid. Poslije toga, uslijedio je CMF protokol te pokazao bitno bolje rezultate u liječenju. Danas je u primjeni veliki broj adjuvantnih polikemoterapijskih protokola koji se zasnivaju na primjeni ciklofosfamida, antraciklina, taksana, metotreksata i 5-fluorouracila, a CMF protokol je i danas ostao jedan od najčešće korištenih protokola diljem svijeta. Adjuvantna kemoterapija je pokazala koristan učinak u premenopauzalnih i postmenopauzalnih žena, kod pacijentica sa zahvaćenim i nezahvaćenim limfnim čvorovima pazuha, kao i pacijentica s hormonski ovisnim i hormonski neovisnim tumorima. EBCTCG je 2005. g., objavila rezultate meta-analize velikog broja studija na 150 000 pacijentica koji govore o statistički značajnom snižavanju rizika ponovne pojave bolesti i smrtnosti od karcinoma dojke kod pacijentica liječenih polikemoterapijom. Apsolutna je korist veća kod pacijentica sa zahvaćenim pazušnim limfnim čvorovima, hormonski neovisnim tumorima i kod žena mlađih od 50 godina. Tako je primjenom kemoterapije rizik za obnavljanje bolesti kod pacijentica mlađih od 50 godina s hormonski neovisnim tumorima snižen za 13%, a kod onih s hormonski neovisnim tumorima za 7%. Kod pacijentica starijih od 50 g., rizik ponovne pojave bolesti kod hormonski neovisnog raka dojke snižava se za 9,6%, a kod hormonski ovisnog raka za 4.9% (165-167).

### 1.8.5. Imunoterapija

Medicinska je zajednica doživjela revoluciju u molekularno ciljanoj terapiji karcinoma dojke. Sama je ideja počela prije stotinjak godina, kada je Paul Ehrlich postavio teoriju magičnog metka po kojoj će jedan dan biti moguće djelovati lijekovima na neka tkiva dok će druga ostati pošteđena. Danas je trastuzumab primjer takvog lijeka, koji je omogućio bolji ishod karcinoma dojke i smanjenu sistemnu toksičnost. Faktori rasta su, između ostalog, odgovorni i za preživljavanje tumorskih stanica koje se nalaze pod utjecajem citotoksičnih lijekova i radioterapije. To je razlog zašto se citotoksično liječenje u kombinaciji s novijom, molekularno ciljanom terapijom pokazalo efikasnijom (168).

Trastuzumab (Herceptin) je monoklonsko protutijelo usmjereno na izvanstanični dio receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (HER2/neu). Vezivanjem na receptor, onemogućuje vezanje cirkulirajućih čimbenika rasta te daljnji prienos proliferacijskih signala u stanici, ubrzava uvlačenje receptora u stanicu, u određenoj mjeri potiče, o protutijelima ovisnu, citotoksičnu reakciju te smanjenje izlučivanja VEGF-a i drugih angiogenih čimbenika iz tumora. Indiciran je kod pacijentica s HER2 pozitivnim tumorima i predstavlja prvo usmjereno, ciljano liječenje karcinoma dojke (169, 170).

Učinkovitost trastuzumaba samog i u kombinaciji s citostatskom terapijom u metastaskom karcinomu dojke, bila je osnova nastavku istraživanja antitumorskog učinka trastuzumaba u ranom karcinomu dojke (171). Rezultati pet randomiziranih adjuvantnih kliničkih studija, na gotovo 13 000 pacijentica, pokazali su značajnu kliničku korist adjuvantne primjene trastuzumaba kod visoko rizičnih pacijentica s HER-2 pozitivnim tumorima. U svim je studijama, adjuvantno primjenjen trastuzumab produžio vrijeme bez znakova bolesti, a u tri studije i bolje ukupno preživljenje (171-174).

Današnje, i buduće liječenje karcinoma dojke, ovisit će o mogućnosti definiranja skupina pacijentica koje imaju najveću korist od pojedinih načina liječenja koristeći prognostičke i prediktivne čimbenike. Novija istraživanja pokušavaju otkriti podskupinu pacijentica s negativnim limfnim čvorovima kojima bi adjuvantna terapija najviše pomogla. U tom cilju pomažu istraživanja molekula koje posreduju rastu i metastaziranju stanica raka dojke što omogućava razvoj novih kemoterapeutika i bioloških lijekova. Veliki se broj bioloških lijekova zasad pokazao korisnim u animalnim modelima no njihova se vrijednost tek mora istražiti na velikim studijama kod ljudi. Neki su od njih usmjereni i prema molekulama opisanim u prognostičkim i prediktivnim čimbenicima ovoga rada.



MMP inhibitori su, unatoč lošim rezultatima u istraživanju u terapiji karcinoma dojke, u kliničkim istraživanjima i dalje jako interesantni kao potencijalne mete u antitumorskoj terapiji, s obzirom na njihovu pojačanu ekspresiju u tumorima. Nova je era istraživanja usmjerena prema novim MMP inhibitorima koji se kombiniraju s kemoterapeutima (175, 176). RECK protein, koji sudjeluje u regulaciji ekspresije metaloproteinaza, također je jedna od meta mikro RNA, oncomiR-MIRN21 (177). Genetski putevi koje reguliraju ETS proteini mogu također poslužiti kao mete za antitumorsku terapiju, a dosad su napravljeni brojni načini utišavanja ETS gena sa siRNA i antisense cDNA. Oligonukleotidima je inhibirana endotelna migracija i angiogeneza posredovana VEGF putem. Blokiranje bi ETS funkcije također moglo dovesti do poboljšanja terapije Herceptinom jer su HER2/neu i ETS-1 u pozitivnoj korelaciji (120, 122, 139, 140).

Mutirani *p53*, također je istraživani kao potencijalna meta ciljane terapije karcinoma dojke. Peptidi koji imaju sposobnost interferiranja između *p53* i DNA uzrokovali su osjetljivost stanica karcinoma dojke na kemoterapeutike. Jedna od zanimljivijih molekula koja je pokazala sposobnost vraćanja *p53* konformacije proteina na divlji tip je PRIMA-1 (149). TFO (triplex forming oligonucleotides) jesu molekule koje se vežu na DNA sekvencu i selektivni su inhibitori genske ekspresije MYC RNA. Ispitivaju se učinci molekula na stanične linije karcinoma dojke i dokazano povećavaju učinkovitost gemcitabina (150). WX-UK1 (Mesupron), inhibitor serinskih proteaza, nalazi se u fazi I i II ispitivanja kod pacijentica u kasnom stadiju bolesti više solidnih tumora uključujući i karcinom dojke (82).

Obilježja svih mreža signalnih puteva unutar tumorskih stanica jesu kompleksnost i bogata međusobna povezanost. Pojednostavljeno gledajući, kada jedan lijek blokira put A, unutar mreže postoje još brojni putevi koji zaobilaze taj put te se signal može provesti do ciljnih molekula. Istraživači diljem svijeta pokušavaju shvatiti logiku svake signalne mreže što bi bitno povećalo efikasnost pametnih lijekova u terapiji karcinoma dojke i eventualno dovelo i do eradikacije bolesti (168).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA RADA**

### **2.1. Ciljevi rada**

Ciljevi ovog rada su:

1. Odrediti ekspresiju ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u tumoru na reprezentativnom uzorku invazivnih duktalnih karcinoma dojke (NST).
2. Usporediti ekspresiju ETS-1 s ekspresijom MMP-2.
3. Usporediti ekspresiju ETS-1 s ekspresijom MMP-9.
4. Usporediti ekspresiju MMP-2 s ekspresijom MMP-9.
5. Usporediti ekspresiju ETS-1, MMP-2 i MMP-9 pojedinačno, kao i njihovu koekspresiju s ostalim prognostičkim čimbenicima: vaskularnom invazijom, histološkim i nuklearnim gradusom, veličinom tumora, statusom limfnih čvorova, HER2/neu statusom, statusom ER i PgR, proliferacijskim indeksom (Ki67) i molekularnim tipom tumora.
6. Usporediti ekspresiju ETS-1, MMP-2 i MMP-9 kao i njihovu koekspresiju s preživljenjem bez znakova bolesti (DFS) i ukupnim preživljenjem (OS) kod pacijentica s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima.
7. Utvrditi korelaciju ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u uzorcima te na osnovi statističke analize zaključiti o mogućoj ulozi određivanja ETS-1, MMP-2 i MMP-9 kao prognostičkog čimbenika u karcinomu dojke te određivanja one skupine pacijentica koja će imati koristi od agresivnijeg liječenja u smislu dužeg preživljenja.
8. Odrediti ekspresiju ETS-1 u pratećim tumor infiltrirajućim limfocitima (TIL).
9. Usporediti ekspresiju ETS-1 u limfocitima s ekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u tumorskim stanicama te s ostalim patohistološkim i kliničkim pokazateljima.

### **2.2. Hipoteza rada**

Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u uzorcima invazivnih duktalnih karcinoma dojke predstavlja bitan čimbenik koji utječe na preživljenje bez znakova bolesti (DFS) i na sveukupno preživljenje pacijentica (OS). Ako je izražena koekspresija ETS-1 s MMP-2 i MMP-9 u uzorcima, moguće je da se radi o tumorima izrazito lošijeg sveukupnog preživljenja.

### **3. MATERIJAL I METODE**

U ovo, retrospektivno istraživanje, uključeno je 209 uzastopnih pacijentica s karcinomom dojke kod kojih je dijagnoza postavljena tijekom 2002. g. u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb. U studiju su uključene pacijentice s NST histološkim tipom karcinoma dojke, a iz studije su isključene pacijentice s nepotpunim kliničkim podacima tako da je uzorak na kraju činila 121 pacijentica. Za istraživanje su korišteni parafinski blokovi iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju KBC Zagreb.

#### **3.1. Analiza mikroskopskih preparata**

Tumorsko je tkivo fiksirano u 10% formalinu i rutinski uklapano u parafinske blokove koji su rezani u rezove debljine 4-5 mikrometara i bojani standardnom metodom hematoksilin-eozinom. Tako dobiveni preparati, pregledani su svjetlosnim mikroskopom radi potvrde patohistološke dijagnoze, određivanja histološkog i nuklearnog gradusa, utvrđivanja statusa limfnih čvorova te vaskularne invazije u tumorskom tkivu. Histološki tip tumora određen je prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, a histološki gradus prema Elston i Ellisu.

Za imunohistokemijsko bojenje učinjeni su dodatni rezovi. Bojenje je učinjeno standardnom imunoperoksidaza avidin-biotin metodom koristeći stroj za automatsko bojenje (Tech Mate, Dako, Danska) s estrogenskim (DAKO H7096; ready to use), progesteronskim (DAKO M3569; 1:50), Ki-67 (Dako, Glostrup, Danska) i anti HER-2 protutijelom HercepTest (Dako, Glostrup, Danska).

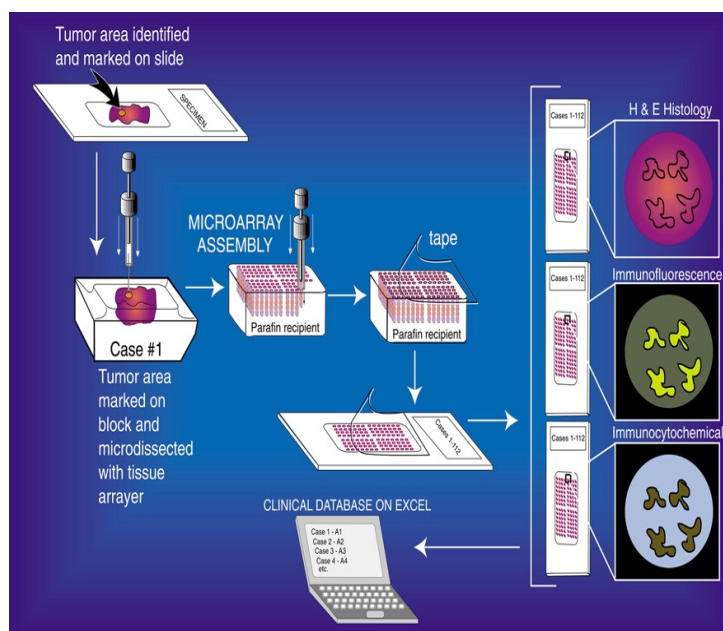
#### **3.2. Uklapanje uzoraka u tkivne „mikročipove“ (engl. tissue microarray-TMA)**

Proučavane smo proteine određivali imunohistokemijski protutijelima anti-ETS-1, anti-MMP-2 i anti-MMP-9 (Novocastra, UK) koristeći se metodom tkivnog mikročipa (eng. tissue microarray; TMA). Tkivni mikročipovi služe za simultano određivanje imunohistokemijske razine proteina u multiplim individualnim uzorcima tkiva, a sve na jednom rezu bloka. Uzorci su uzeti iz reprezentativnih područja tumora, određenih na hematoksilin-eozin bojenim rezovima, te potom označeni na stakalcu.

Ovakvi cilindrični uzorci tkiva, promjera 0,2 cm, dobiveni su „punkcijom“ tumorskog tkiva pomoću posebne igle (SAKURA, Japan). Uzeti su u triplikatima za

svaki pojedini tumor, a potom se, gusto poslagani, ponovno uklapaju u novi prazan „mikročip“ parafinski blok ručnim „arrayerom“ (Beecher Instruments, Sun Prairie, Wisconsin, SAD), kako je prikazano na slikama 10 i 11.

Upotrebom ovakve metode, čak je 60 tkivnih uzoraka tumora analizirano na jednom stakalcu. Tkivni mikročipovi su pomoću mikrotoma izrezani u rezove debljine 4-5 mikrometara, deparafinizirani u ksilolu i dehidrirani u gradiranim alkoholima. Potom su pretretirani u PTK i dalje imunohistokemijski obojeni standardnom metodom bojenja. Upotreba tkivnog „mikročip“ bloka omogućila je da se u isto vrijeme i pod istim uvjetima oboje svi uzorci, što daje komparabilne rezultate, uz značajnu podudarnost ovog „multicore“ sustava s analizom cijelog reza originalnog parafinskog bloka (slika 10 i 11).



Slika 10. Shematski prikaz uklapanja tkivnih uzoraka u prazan „mikročip“ blok (178).



*Slika 11. Prikaz stakalca s priređenim tkivnim „mikročipom“.*

Uzorci su analizirani svjetlosnim mikroskopom, a bojenje za svako protutijelo je iskazano kao postotak i kao intenzitet bojenja obojenih stanica. Negativan rezultat navedenih bojenja je označen s 0, slabo bojanje kao 1, srednje 2 i jako 3. Iz intenziteta bojenja i postotka pozitivnih stanica, naknadno je izračunat broj bodova, tzv. imunohistokemijski indeks, prikazan u tablici 4. Prema postotku broja pozitivnih stanica dodijeljeni su bodovi: 0-negativno, 1=1-10%, 2=10-50%, 3=>50% obojenih stanica. Konačni broj bodova je dobiven množenjem intenziteta (0, 1, 2, 3) s brojem bodova dobivenih prema postotku obojenih stanica.

Tablica 4. Prikaz sistema bodovanja za ETS-1, MMP-2 i MMP-9.

<b>A=postotak obojenih stanica</b>	<b>B=intenzitet bojenja</b>
0 =negativno	0
1=1-10%	1
2=10-50%	2
3= >50%	3
<b>Broj bodova (AxB)</b>	<b>Imunohistokemijski indeks</b>
0	<b>0</b>
1, 2, 3	<b>1</b>
4, 5, 6	<b>2</b>
7, 8, 9	<b>3</b>

### 3.3. Stupanj diferenciranosti tumora

Stupanj diferenciranosti tumora (histološki i nuklearni gradus) određen je metodom prema Elstonu i Ellisu (51) koja definira precizne kriterije za ocjenu morfoloških osobitosti kao što su stvaranje tubula, nuklearni pleomorfizam i broj mitozna na određenoj površini tumora. Svako se od navedenih obilježja ocjenjuje s 1-3 boda. Bodovi se zbrajaju, a njihov krajnji zbroj određuje stupanj diferencijacije:

- a) Gradus I - dobro diferencirani tumor (3 - 5 bodova)
- b) Gradus II - srednje/umjereno diferencirani tumor (6 - 7 bodova)
- c) Gradus III - slabo diferencirani tumor (8 - 9 bodova)

### 3.4. Proliferacijski indeks

Proliferacijski indeks je mjeren imunohistokemijski koristeći anti-Ki-67 protutijelo (DAKO, clone MIB-1, M7240) koje prepoznaje nuklearni antigen izražen u stanicama tumora u proliferacijskim fazama staničnog ciklusa. Rezultati proliferacijskog indeksa su dobiveni brojanjem pozitivne reakcije u jezgrama, na 500 tumorskih stanica i izraženi u postotcima (179).

Za statističku su analizu dobiveni rezultati razvrstani u tri kategorije:

- a) tumori niskog proliferacijskog indeksa: <15% jezgara tumorskih stanica
- b) tumori srednjeg proliferacijskog indeksa: 16-30%
- c) tumori visokog proliferacijskog indeksa: >30% .

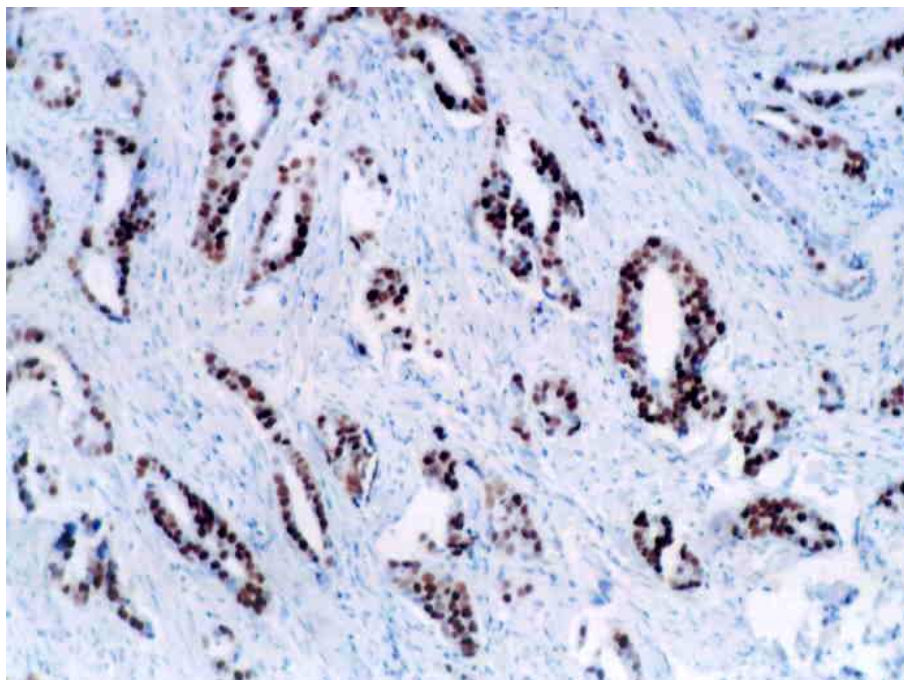
### **3.5. Steroidni receptori**

Steroidni receptori su određeni imunohistokemijskim bojenjem s anti-ER (DAKO, clone 1D5, H7098, razrjeđenje 1:50) i anti-PgR (DAKO, clone PgR36, M3569, razrjeđenje 1:50) protutijelom, semikvantitativnom metodom. Izraženost receptora u tumorskom tkivu je određena kao postotak pozitivnih jezgara (Slika 12). S obzirom na postotak pozitivnih stanica i intenzitet bojenja, tumori su razvrstani u 4 grupe:

- a) bez izraženosti (nema bojenja)
- b) slaba izraženost (1-10% obojenih jezgara)
- c) srednja izraženost (10-50% tumorskih stanica)
- d) jaka izraženost (>50% pozitivnih tumorskih stanica)(Slika 12).

Za statističku su analizu rezultati izraženosti ER i PgR receptora skupno prikazani:

- A) negativan nalaz : nema izraženosti
- B) pozitivan nalaz: slaba, srednja i jaka izraženost (180).



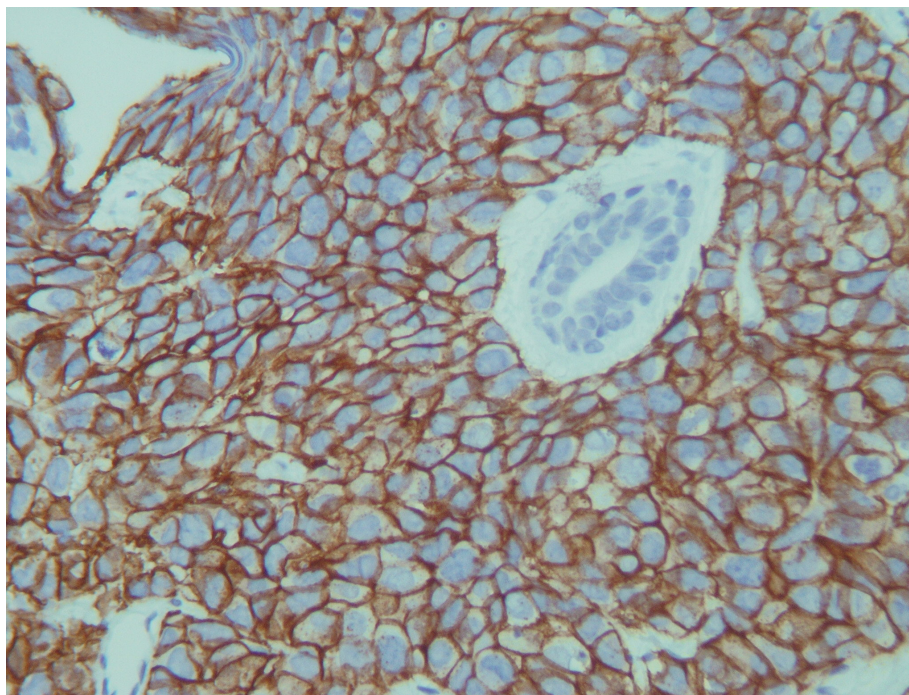
*Slika 12. Imunohistokemijsko bojenje s anti-ER protutijelom za dokazivanje ekspresije ER u tumorskom tkivu. Tumorsko tkivo pokazuje ekspresiju ER u gotovo svim stanicama u jakom intenzitetu (x400).*

### **3.6. Izraženost HER-2/neu**

Izraženost HER-2/neu receptora određena je imunohistokemijskom metodom korištenjem HercepTesta (DAKO). Vrijednost prekomjerne izraženosti HER2/neu vrjednovana je ocjenjivanjem intenziteta bojenja stanične membrane na skali od 0 do 3+. Iz toga proizlazi: a) vrijednost 0 je negativan nalaz, nema bojenja; b) vrijednost 1+ je slabo, nepotpuno bojenje na manje od 10% membrana tumorskih stanica; c) vrijednost 2+ je slabo pozitivan nalaz, sa slabim do srednje jakim, isprekidanim do difuznim bojenjem na više od 10% membrana tumorskih stanica i kompletno, jako membransko bojanje u <30% stanica; d) vrijednost 3+ je jako pozitivan nalaz s kontinuiranim jakim bojenjem membrane na više od 30% tumorskih stanica (Slika 13).

Rezultati ekspresije HER-2/neu očitani su prema preporuci proizvođača. Negativan nalaz su vrijednosti 0 i 1+ (kada nema bojenja i kod bojenja intenziteta 1+). Bojenje intenziteta 2+ provjereno je dual SISH metodom (HER2 detection Kit 84-0146, Zymed Lab. Inc., California, SAD) radi dokazivanja moguće amplifikacije HER-2/neu. Pacijentice kod kojih je nađena amplifikacija HER-2/neu dual SISH metodom, kao i pacijentice s imunohistokemijskom ekspresijom HER-2/neu u intenzitetu boje 3+, su prema ASCO/CAP smjernicama (180) smatrane pozitivnim na ekspresiju HER-2/neu (Slika 13).





*Slika 13. HER2 imunohistokemijsko bojanje membrana tumorskih stanica, intenzitet +++ (pozitivan nalaz), x 400.*

### **3.7. Pacijentice i analiza podataka medicinske dokumentacije**

Za sve su pacijentice prikupljeni podaci o dobi, veličini tumora, menopauzalnom statusu, vrsti kirurškog zahvata dojke i pazuha, vrsti provedene onkološke terapije (kemoterapija, hormonska terapija i radioterapija), datumu posljednje kontrole za pacijentice koje su žive, sa ili bez znakova povrata bolesti, te datumu smrti pacijentica umrlih od karcinoma dojke. Podaci su dobiveni iz povijesti bolesti Klinike za kirurgiju, Klinike za onkologiju, arhive Kliničkog zavoda za patologiju KBC Zagreb i dodatne imunohistokemijske analize parafinskih blokova Kliničkog zavoda za patologiju. Klinički su podaci prikupljeni iz medicinskih dokumentacija Klinike za onkologiju KBC-a, zaključno do 20. prosinca 2011. g. te je formirana integralna baza podataka s parametrima koji su predmet istraživanja:

1. parametri koji obilježavaju pacijentice i bolest: dob, menstrualni status, veličina tumora, histološki i nuklearni gradus, iznos ER i PgR, proliferacijski indeks, izraženost HER2 receptora, izraženost ETS-1 u tumorskim stanicama i limfocitima, izraženost gelatinaza u tumorskim stanicama i u stanicama strome te status izvađenih limfnih čvorova;
2. parametri koji obilježavaju način liječenja: vrsta operativnog zahvata, primijenjena kemoterapija, hormonska terapija, radioterapija;

3. podaci o preživljenju sa ili bez znakova povrata zloćudne bolesti i podaci o ukupnom preživljenju.

### **3.8. Statistička obrada**

U radu su analizirani podaci pacijentica za koje su bili poznati svi patohistološki pokazatelji karcinoma dojke i klinički podaci o liječenju. Pacijentice s nepotpunim podacima o praćenju i tijeku bolesti nisu uključene u analizu preživljenja. Preživljenje bez znakova bolesti definirano je vremenom od operativnog zahvata zbog raka dojke do posljednje kontrole ili pojave recidiva bolesti. Ukupno preživljenje definirano je kao vrijeme od postavljanja dijagnoze do posljednje kontrole ili datuma smrti od karcinoma dojke. U statističkoj obradi dobivenih rezultata je korišten program STATISTICA v. 6.0. te su primijenjeni primjereni statistički postupci. Korištene su prikladne metode deskriptivne statistike (medijan, raspon) te neparametrijske metode za usporedbu neovisnih uzoraka (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney), metode za analizu korelacije (Spearman test korelacije), Hi-kvadrat test i analiza ukupnog preživljenja i preživljenja do povrata bolesti univarijatnom i multivarijatnom analizom (Kaplan-Meier krivulje, logistička regresija, ROC analiza) radi procjene neovisnog prognostičkog čimbenika preživljenja. Dobiveni rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb. U patohistološkoj je analizi preparata sudjelovao pristupnik te prof.dr.sc. Jasminka Jakić Razumović, specijalist patologije, pročelnica Zavoda za kiruršku patologiju, KBC Zagreb.

Prikupljanje podataka o pacijenticama je proveo pristupnik, a statističku obradu dobivenih podataka je provela gđa. Marta Malinar, specijalizirana za medicinsku statistiku.

### **3.9. Identitet pacijentica i etička načela**

Istraživanje na tumorskim tkivima je učinjeno u skladu sa smjernicama kojima je cilj osigurati pravilno provođenje postupka, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju te Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03). Identitet pacijentica ostat će neotkriven i zaštićen. Ovaj je rad sastavni dio projekta koji je dobio suglasnost za istraživanje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Opis ispitivanog uzorka pacijentica s rakom dojke**

U istraživanje je uključena 121 pacijentica s duktalnim invazivnim karcinomom dojke (NST) koje su u razdoblju 2002. g. operirane na KBC-u Zagreb. Prosječna je dob pacijentica bila 57 godina (raspon 30-83 godine, medijan 54, STD 11.8). Prosječna veličina tumora bila je 2.35 cm (raspon 0,5 - 10 cm, medijan 2 cm, STD 1.5), a vrijeme praćenja pacijentica između 8 i 124 mjeseca (medijan 80.6 mjeseci). Kliničko-patološki podaci su sažeti u tablici 5.

Ekspresija ETS-1 je imunohistokemijski prikazana u tumorskim stanicama i u stanicama tumorske strome. Unutar strome ETS-1 je eksprimiran najviše u limfocitima, zatim u endotelnim stanicama krvnih žila te u fibroblastima. Za studiju su uključene vrijednosti ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama i u tumor infiltrirajućim limfocitima. Gelatinaze (MMP-2 i MMP-9) su eksprimirane u tumorskim stanicama te u stanicama strome (fibroblasti, upalne stanice, endotel krvnih žila).

Tablica 5. Klinički i patološki podaci za 121 pacijenticu.

<b>Variabla</b>	<b>Broj pacijentica (%)</b>	
<b>Menopauzalni status</b>		
Premenopauza	53	(43.8)
Postmenopauza	68	(56.2)
<b>Dob pacijentice</b>		
≤50 g.	49	(40.49)
>50 g.	72	(59.5)
<b>Veličina tumora</b>		
≤2 cm	68	(56.19)
2,1-5 cm	46	(38.01)
>5 cm	7	(5.78)
<b>Histološki gradus</b>		
1	17	(14.04)
2	56	(46.28)
3	45	(37.20)
<b>Nuklearni gradus</b>		
1	9	(7.43)
2	66	(54.54)
3	45	(37.19)
<b>ER</b>		
Pozitivni	82	(67.77)
Negativni	38	(31.40)
Nije napravljeno	1	(0.83)
<b>PgR</b>		
Pozitivni	65	(53.72)
Negativni	55	(45.45)
Nije napravljeno	1	(0.83)
<b>HER-2</b>		
Pozitivan (3, dual SISH)	27	(22.32)
Negativan (0, 1, 2)	94	(77.68)
<b>Ki67</b>		
Nizak	86	(71.07)
Umjeren	20	(16.53)
Visok	12	(9.92)
Nedostaje	3	(2.48)
<b>Vaskularna invazija</b>		
Ne	115	(95.04)
Da	6	(4.95)

<b>Status limfnih čvorova</b>		
Pozitivni	42	(34.71)
Negativni	57	(47.1)
Nisu odstranjeni	22	(18.18)
<b>Kirurške tehnike</b>		
Poštedni zahvat	77	(63.64)
Mastektomija	44	(36.36)
<b>Kemoterapija</b>		
Da	90	(74.38)
Ne	31	(25.61)
<b>Endokrina terapija</b>		
Da	85	(70.25)
Ne	34	(28.1)
<b>Radioterapija</b>		
Da	81	(66.95)
Ne	40	(33.05)
<b>Recidiv bolesti</b>		
Da	38	(31.40)
Ne	83	(68.60)
<b>Smrt pacijentice</b>		
Da	31	(25.61)
Ne	90	(74.38)

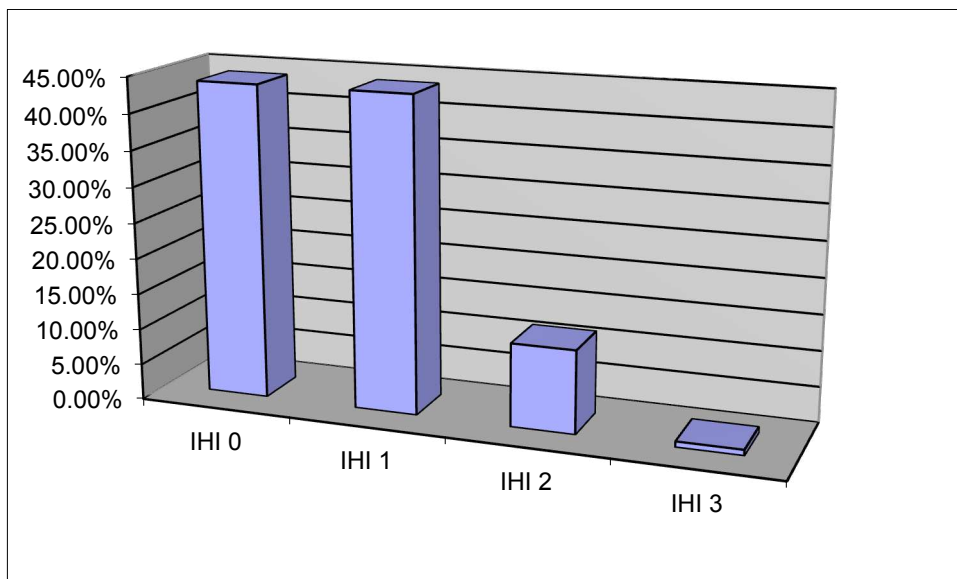
Vrijednosti ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 su prikazane u tablicama 6 i 7 i slikama 14-19.

Tablica 6. Ekspresija ETS-1 proteina u uzorcima invazivnih karcinoma dojke.

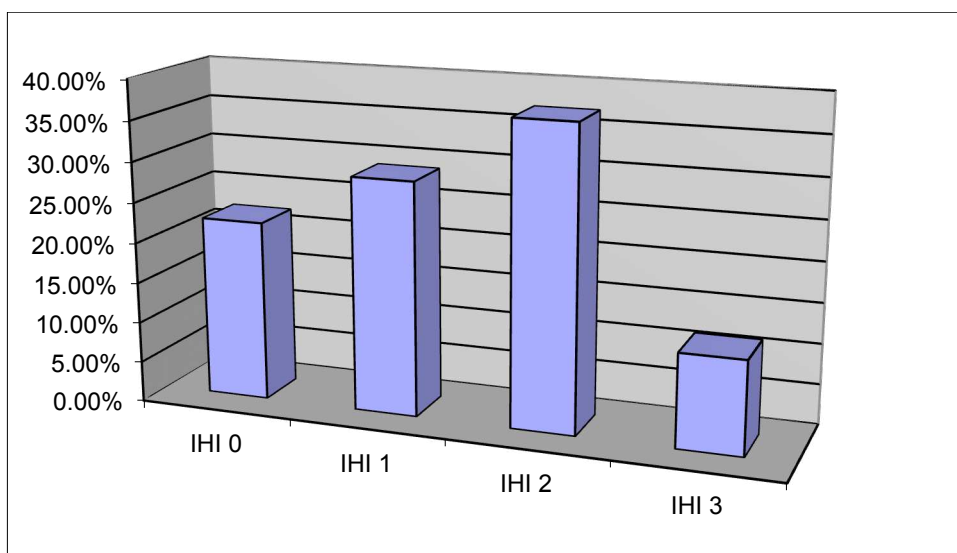
<b>ETS-1, tumorske stanice</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
pozitivno	68	56.20
negativno	53	43.80
IHI 0	53	43.80
IHI 1	53	43.80
IHI 2	14	11.60
IHI 3	1	0.82
<b>ETS-1, limfociti</b>		
pozitivno	115	95.00
negativno	6	5.00
IHI 0	6	5.00
IHI 1	25	20.66
IHI 2	63	52.06
IHI 3	27	22.31

Tablica 7. Ekspresija gelatinaza u tumorskim stanicama i u tumorskoj stromi.

<b>MMP-2, tumorske stanice</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
pozitivno	94	77.68
negativno	27	22.31
IHI 0	27	22.31
IHI 1	35	28.92
IHI 2	45	37.19
IHI 3	14	11.57
<b>MMP-2, tumorska stroma</b>		
pozitivno	97	80.16
negativno	24	19.83
<b>MMP-9, tumorske stanice</b>		
pozitivno	109	90.08
negativno	12	9.92
IHI 0	12	9.92
IHI 1	7	5.78
IHI 2	56	46.30
IHI 3	46	38.00
<b>MMP-9, tumorska stroma</b>		
pozitivno	79	65.30
negativno	42	34.70

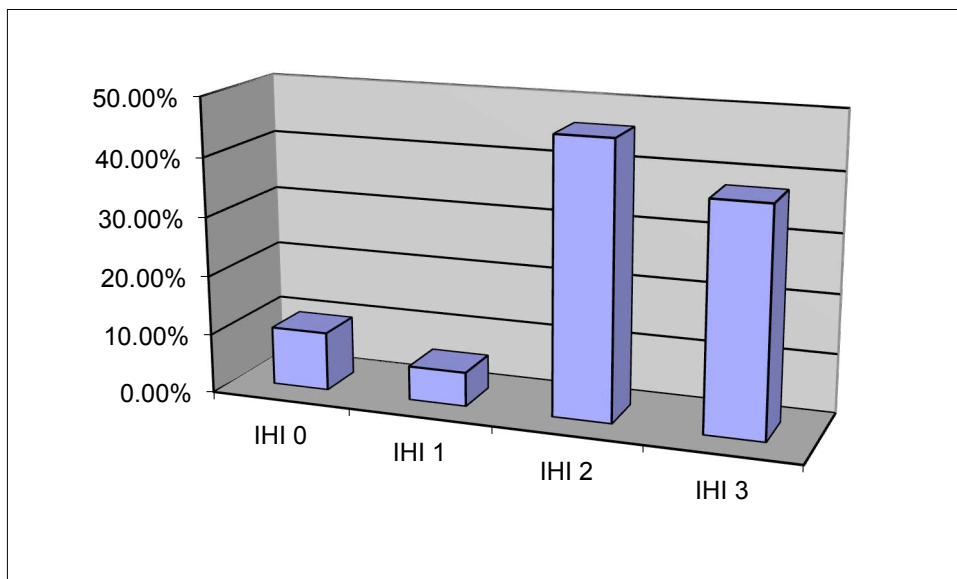


*Slika 14. Imunohistokemijski indeks (IHI) ETS-1 u tumorskim stanicama.*

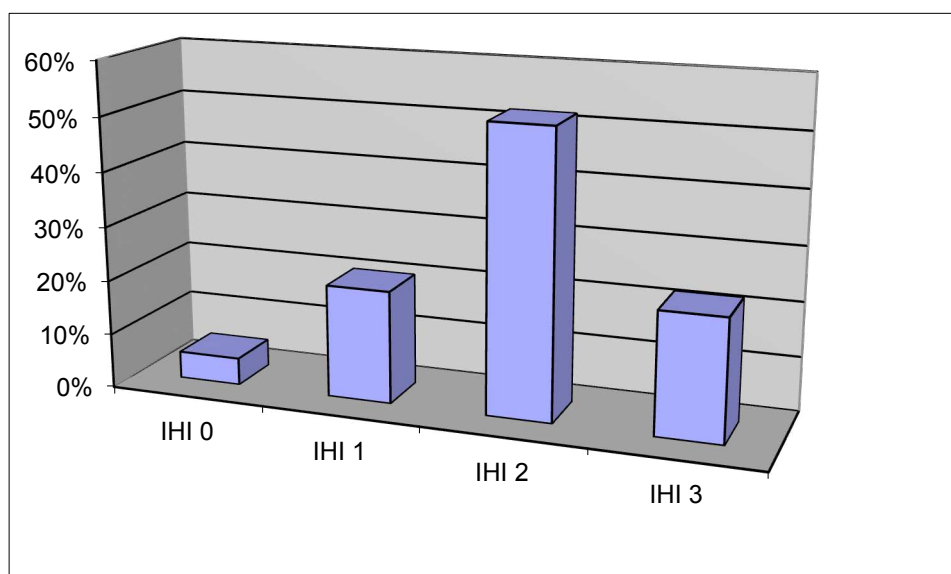


*Slika 15. Imunohistokemijski indeks MMP-2 unutar tumorskih stanica.*

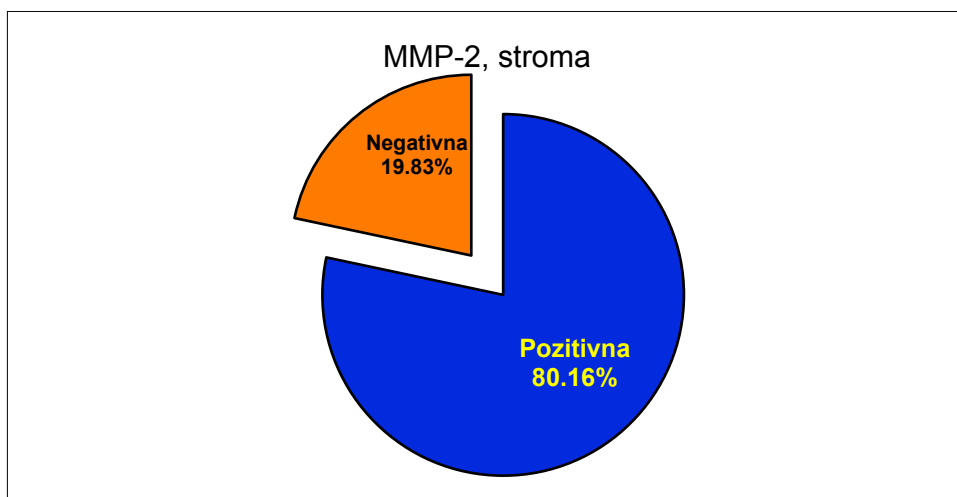




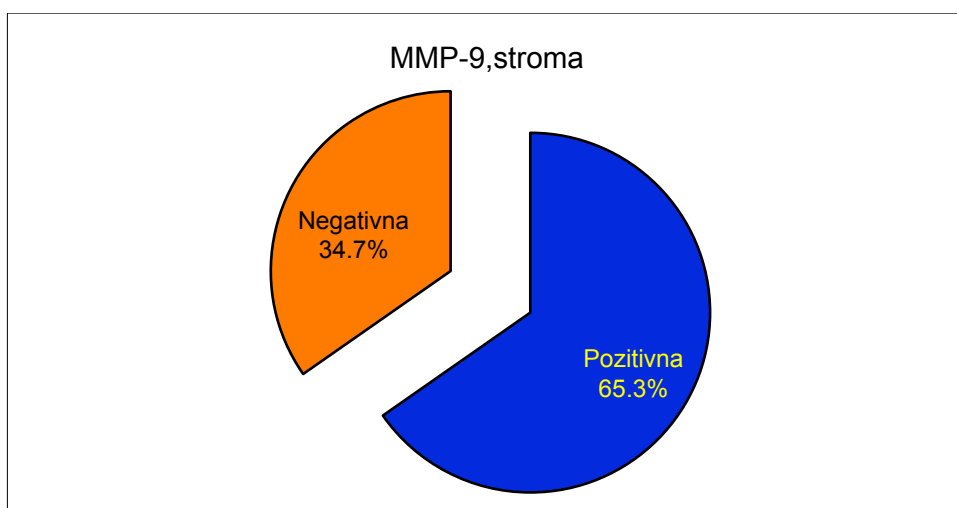
*Slika 16. Imunohistokemijski indeks MMP-9 unutar tumorskih stanica.*



*Slika 17. Imunohistokemijski indeks ETS-1 u tumorskim limfocitima.*



Slika 18. Ekspresija gelatinaze A u tumorskoj stromi.

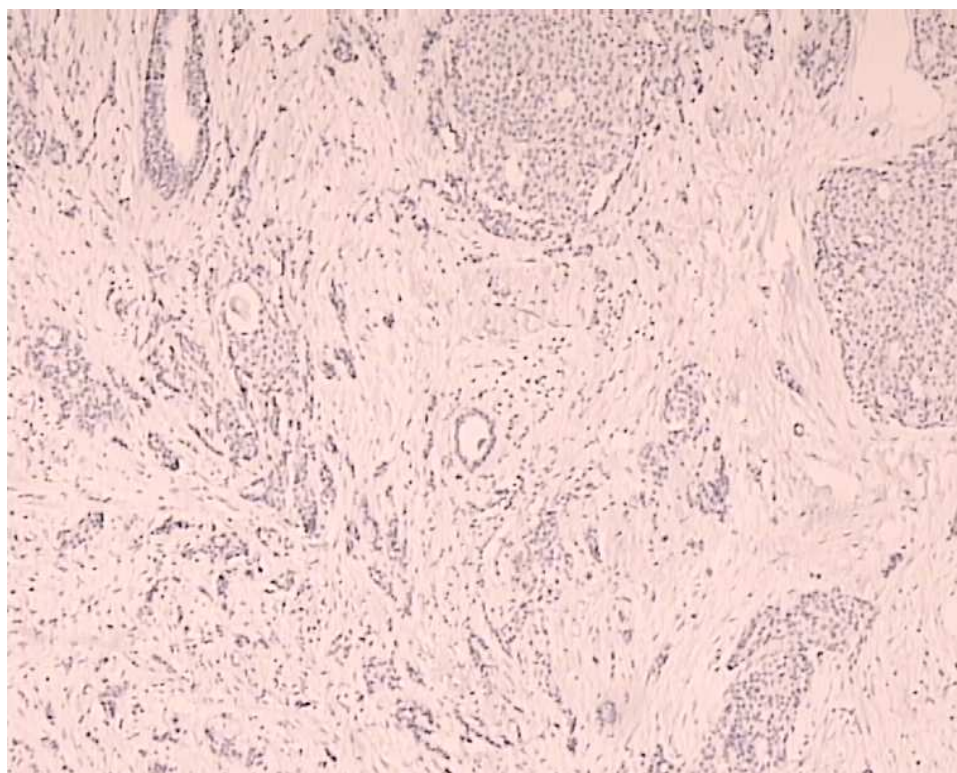


Slika 19. Ekspresija gelatinaze B u tumorskoj stromi.

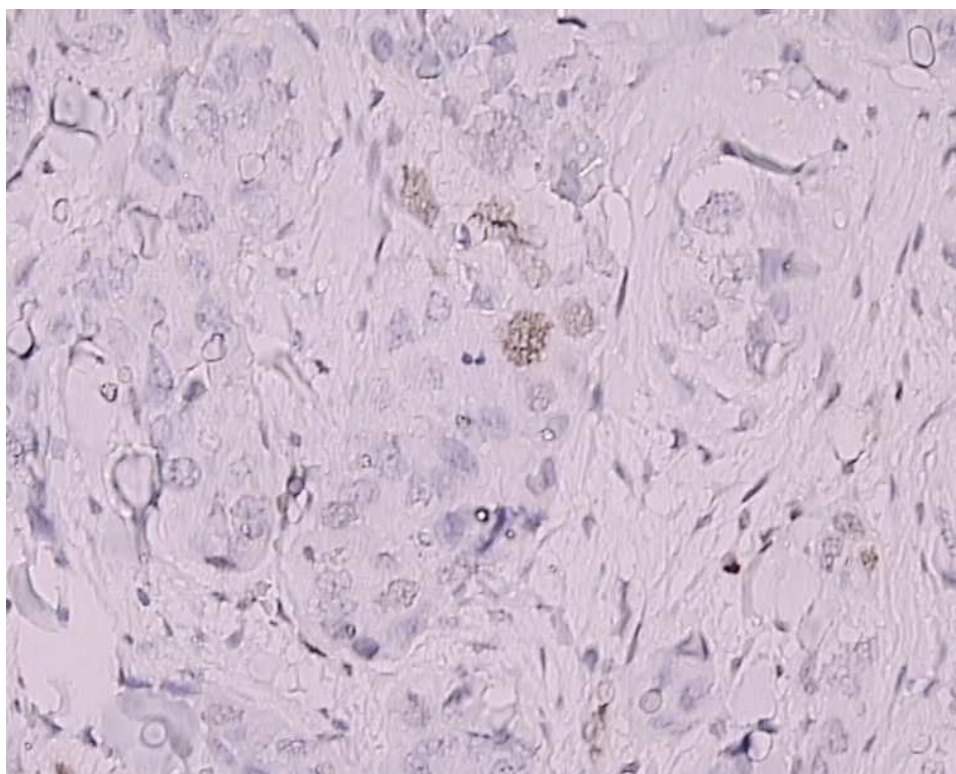
Unutar tumorskih stanica ETS-1 je eksprimiran u 56.2% ispitivanih tumora i to pretežno u slaboj ekspresiji (43.8%). Umjerena se ekspresija nalazila u 11.6% uzoraka dok se jaka ekspresija ETS-1 našla u samo 1 uzorku (0.82%). Unutar tumorskih stanica, MMP-2 je pozitivna u 77.7% uzoraka, sa slabom ekspresijom u 29%, umjerenom ekspresijom u 37.19% i jakom u 11.57% uzoraka. Pozitivna se MMP-9 našla u tumorskim stanicama 90% uzoraka, slabog intenziteta u 5.8%, umjerenog u 46.3% i jakog u 38% uzoraka.

Stromalna ekspresija MMP-2 i MMP-9 je nađena u 80.61%, odnosno 65.3% uzoraka. Ekspresija ETS-1 u limfocitima nađena je u gotovo svim uzorcima (95%) i to najčešće umjerena (52.06%), zatim jaka, u 22.31%, te slaba ekspresija u 20.66% uzoraka.

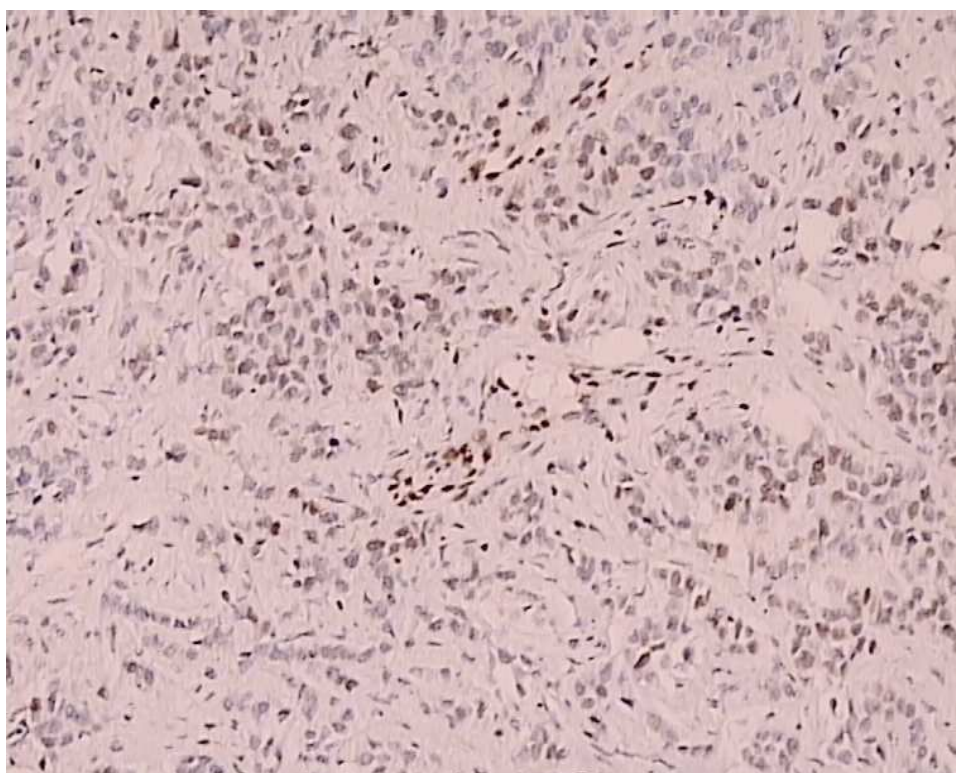
Za potrebe statističke analize napravljeno je nekoliko skupina pacijentica s obzirom na ekspresiju ETS-1 i gelatinaza. Prema jednoj podjeli, razlikuju se skupina negativnih i blago pozitivnih tumora (IHI 0 i 1) te skupina umjereno i jako pozitivnih tumora (IHI 2 i 3). Druga podjela obuhvaća pozitivne i negativne ekspresije (slike 20-26).



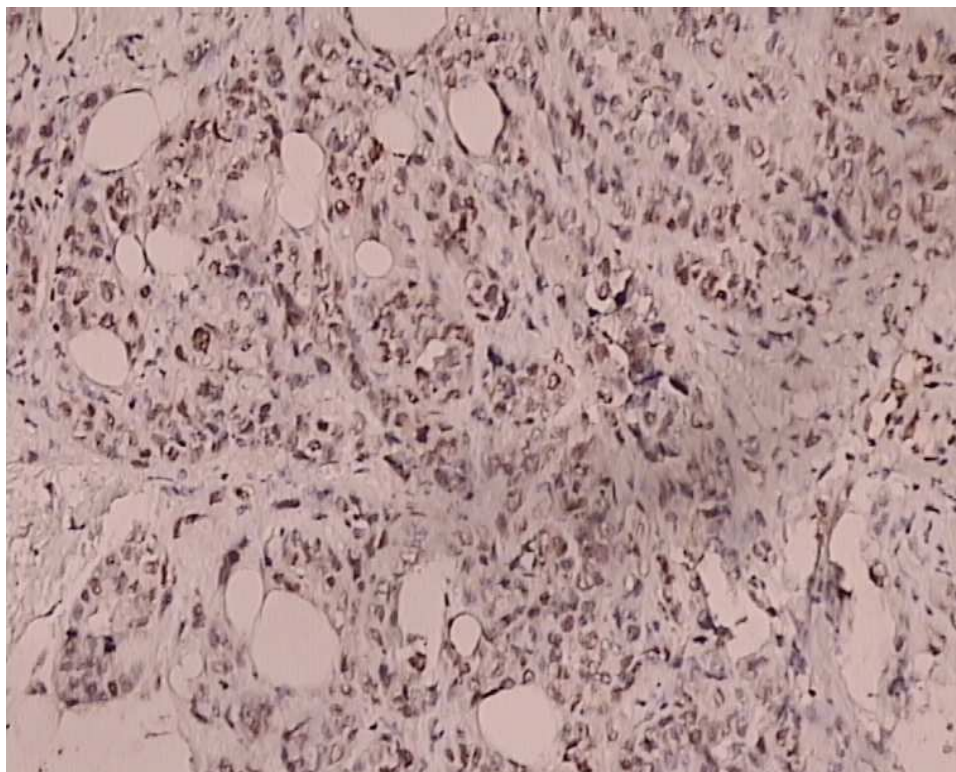
*Slika 20. Negativna ekspresija ETS-1 u limfocitima i u tumorskim stanicama, x100.*



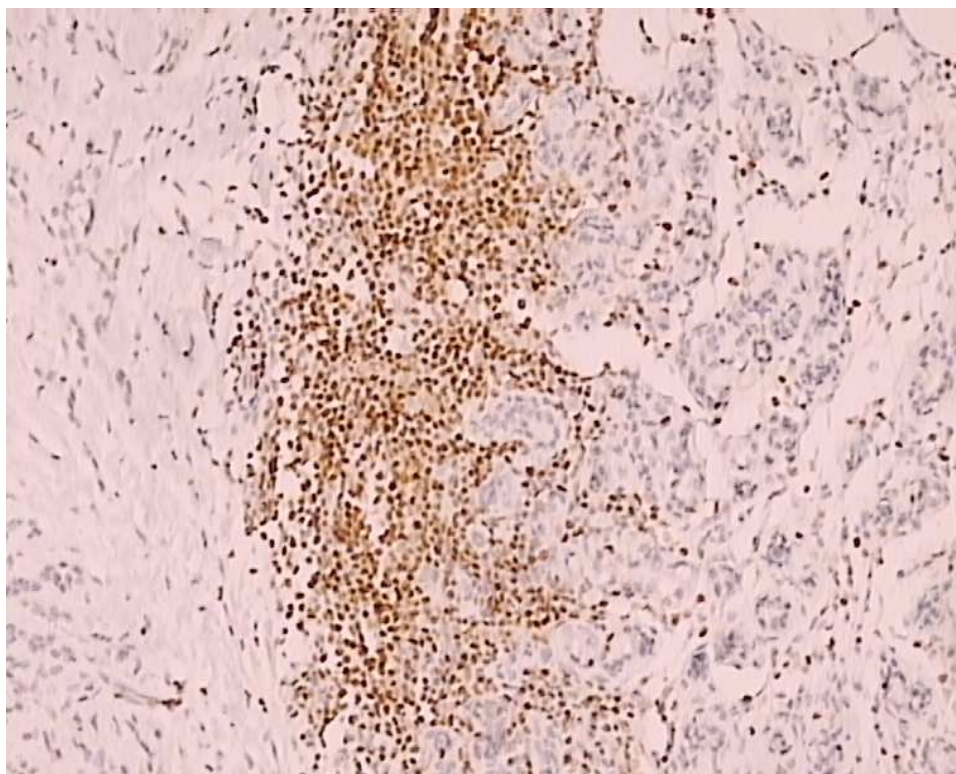
*Slika 21. Slaba ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama, IHI 1, x400.*



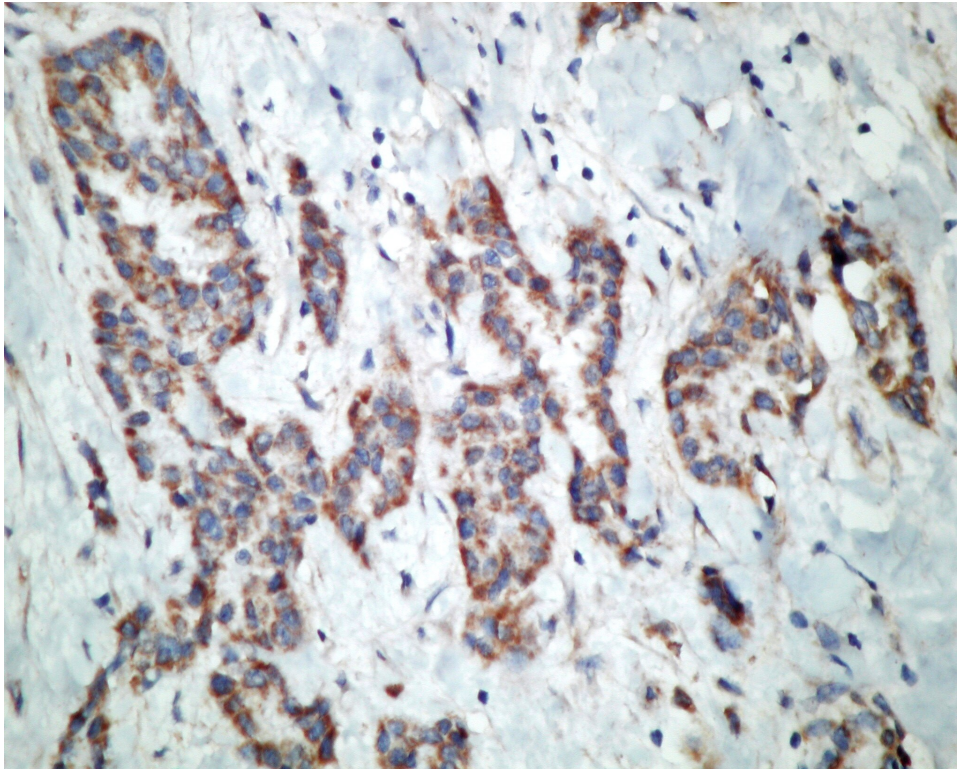
*Slika 22. Srednje jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama, IHI 2, x200.*



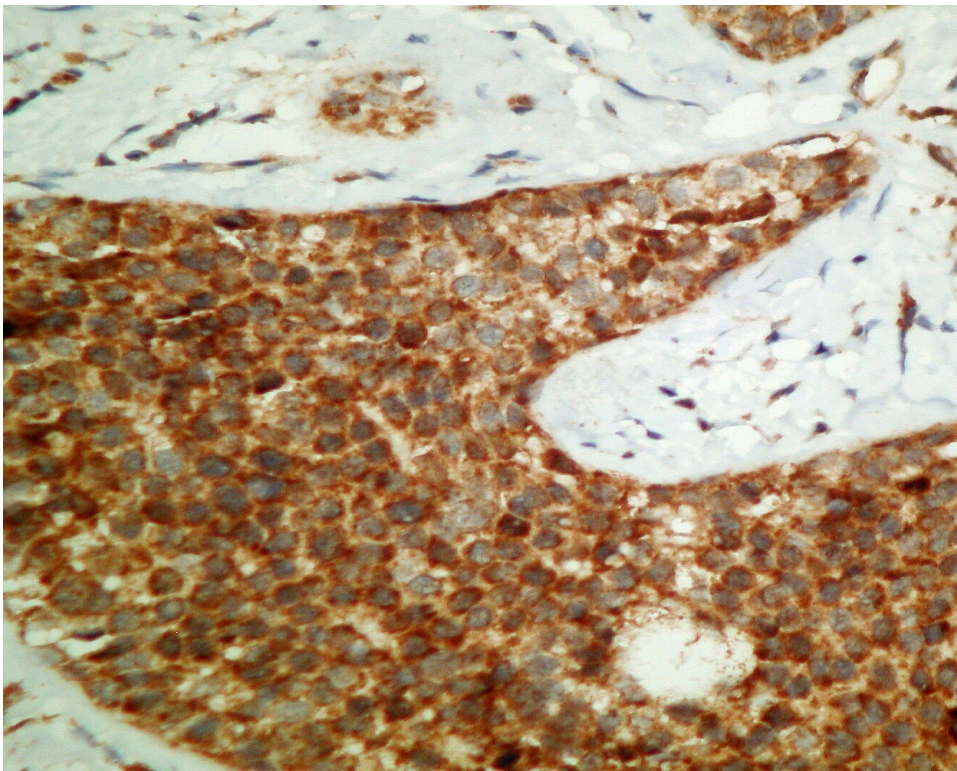
*Slika 23. Jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama, IHI 3, x200.*



*Slika 24. Jaka ekspresija ETS-1 u stromalnim limfocitima, tumorske stanice negativne, x200.*



*Slika 25. Jaka ekspresija MMP-2 u tumorskim stanicama, x200.*



*Slika 26. Jaka ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama, x400.*

## **4.2. Analiza povezanosti međusobnih ekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9**

### **4.2.1. Povezanost ekspresije ETS-1 s gelatinazama**

Općenito, nije nađena povezanost ekspresije ETS-1 s MMP-2 u tumorskim stanicama, osim za umjerenu ekspresiju ETS-1, nađenu češće kod pacijentica koje imaju negativan nalaz MMP-2 u stromalnim stanicama i za ETS-1 negativne tumore koji su češće imali pozitivan nalaz MMP-2 u stromi ( $P=0.0398$ ).

Nakon spajanja rezultata ETS-1 u skupine, rezultat je potvrđen, tj. negativna ili blaga ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama češća je kod pacijentica s pozitivnom ekspresijom MMP-2 u stromi, a umjerena je i jaka ekspresija ETS-1 češća kod negativnog nalaza MMP-2 u stromi. Rezultat je uvjetno značajan jer je nakon Yatesove korekcije nivo značajnosti  $P=0.0634$ .

Nije dokazana niti jedna statistički značajna povezanost ekspresije ETS-1 s ekspresijom MMP-9.

### **4.2.2. Usporedba ekspresije MMP-2 s ekspresijom MMP-9**

Dokazane su samo dvije statistički značajne povezanosti ekspresije MMP-9 s ekspresijom MMP-2 i to:

1. pozitivna ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama češća je kod negativne ekspresije MMP-2 u tumorskoj stromi ( $P=0.0492$ ).
2. povezanost ekspresije MMP-2 i MMP-9 u stromalnim stanicama ( $P=0.0458$ ).

## **4.3. Usporedba ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima**

Hi-kvadrat testom te testovima korelacije (Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis ANOVA), napravljena je usporedba ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima (tablica 8-10). ETS-1 u tumorskim stanicama je povezan s histološkim gradusom. Umjerena je i jaka ekspresija ETS-1 češća kod histološkog gradusa 3 dok je negativan ili blago pozitivan nalaz ETS-1 češći kod histološkog

gradusa 1 ( $P=0.0430$ ). Povezanost ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s nuklearnim gradusom nije dokazana.

Povezanost ekspresija s vaskularnom invazijom nije dokazana zbog toga što je u ovoj skupini pacijentica samo 6 imalo sigurnu vaskularnu invaziju.

Nađena je povezanost ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama s ekspresijom ER. Kod umjerene i jake ekspresije tumori su češće ER negativni, dok je negativna ekspresija ETS-1 češća u ER pozitivnih tumora ( $P=0.0476$ ). Nije dokazana povezanost ER s ekspresijom MMP-2 i MMP-9, ali je nađena povezanost negativne ekspresije ER s koekspresijom ETS-1/MMP2/MMP9 ( $P=0.013$ ).

Nije nađena statistički značajna korelacija ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 i statusa limfnih čvorova aksile.

Ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama povezana je s veličinom tumora. Kod većih tumora (veći od 2 cm) jača je i ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama ( $P=0.0105$ ), a isto vrijedi i za koekspresiju ETS-1/MMP-2/MMP-9 ( $P=0.0065$ ).

Ekspresija MMP-2 u stromi povezana je s veličinom tumora. Kod većih je tumora manja ekspresija MMP-2 u stromi ( $P=0.0063$ ), a za ekspresiju MMP-9 u stromi nije nađena povezanost ni s jednim istraživanim patohistološkim čimbenikom (tablica 9). Ekspresija ETS-1 u limfocitima povezana je s veličinom tumora, histološkim gradusom, ekspresijom PgR i proliferacijskim indeksom (tablica 10). Prikazana je statistički značajna povezanost ekspresije ETS-1 u limfocitima s menopauzom, većim tumorom, visokim histološkim gradusom, negativnim PgR i višim proliferacijskim indeksom. Pacijentice s umjerenom i jakim ekspresijom ETS-1 u limfocitima su također u prosjeku starije (prosjek 57.8; raspon 30–83; medijan 56; standardna devijacija 12.18) od onih s negativnim i blago pozitivnim nalazom (prosjek 51.66; raspon 38 – 73; medijan 49.5; standardna devijacija 9.85). Prosječna veličina tumora kod umjerene i jake ekspresije ETS-1 u limfocitima je 2.49 cm (0,5 – 10; median 2; STD 1.56), a kod negativnih ETS-1 u limfocitima prosječna veličina tumora je 1.93 cm (0.4 – 6.5; median 1.5; STD 1.27).

ETS-1 u limfocitima korelira s ekspresijom ETS-1 u tumorskim stanicama. Jača ekspresija u limfocitima nalazi se u uzorcima sa slabom ekspresijom ETS-1 u tumorskim stanicama. Kod jače ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama nema statistički značajne razlike u ekspresiji ETS-1 u limfocitima. Ekspresija ETS-1 u limfocitima, također je u korelaciji s određenim koekspresijama: ETS-1 i MMP-9 u tumorskim stanicama, ETS-1 u tumorskim stanicama i MMP-2 u stromi te ETS-1 u tumorskim stanicama i MMP-9 u stromi (tablica 10).



Tablica 8. Korelacija ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 unutar tumorskih stanica s ostalim patohistološkim pokazateljima.

	ETS-1	MMP-2	MMP-9	ETS1/MMP2/ MMP9
Dob	NS	NS	NS	NS
Veličina tumora	<b>0.0105</b>	NS	NS	<b>0.0065</b>
Nuklearni gradus	NS	NS	NS	<b>0.032</b>
Histološki gradus	<b>0.0430</b>	NS	NS	<b>0.0049</b>
Limfni čvorovi	NS	NS	NS	NS
ER	<b>0.0476</b>	NS	NS	<b>0.013</b>
PgR	<b>0.0123</b>	NS	NS	<b>0.0058</b>
HER-2	NS	NS	NS	NS
Ki67	NS	NS	NS	NS

Tablica 9. Korelacija ekspresije MMP-2 i MMP-9 u stromalnim stanicama s patohistološkim pokazateljima.

	MMP-2	MMP-9
Dob	NS	NS
Veličina tumora	<b>0.0063</b>	NS
Nuklearni gradus	NS	NS
Histološki gradus	NS	NS
Limfni čvorovi	NS	NS
ER	NS	NS
PgR	NS	NS
HER-2	NS	NS
Ki67	NS	NS

Tablica 10. Korelacija ekspresije ETS-1 u limfocitima s ostalim patohistološkim i kliničkim pokazateljima.

Varijabla	Ekspresija ETS-1 u limfocitima
Dob	<b>P=0.012</b>
Veličina tumora	<b>P=0.024</b>
Menopauza	<b>P=0.033</b>
Histološki gradus	<b>P=0.040</b>
Ki-67	<b>P=0.008</b>
PgR	<b>P=0.045</b>
Ekspresija ETS-1 u tm. stanicama	<b>P=0.031</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-9 u tm. stanicama	<b>P=0.019</b>
Koekspresija ETS-1 u tm. stanicama i MMP-2 u stromi	<b>P=0.058,</b> granična vrijednost
Koekspresija ETS-1 u tm. stanicama i MMP-9 u stromi	<b>P=0.027</b>

Kod podjele tumora s obzirom na molekularni podtip (tablica 11), pokazalo se da je umjerena i jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama češća kod trostruko negativnih tumora. Kod luminalnog B tipa karcinoma koji je HER-2 negativan češće je nađena negativna ili slaba slaba ekspresija ETS-1 ( $P=0.0115$ , tablica 12). Kod podjele ETS-1 na pozitivne i negativne uzorke ta se statistička značajnost gubi. Također, nije nađena statistički značajna povezanost između ekspresije ETS-1 u limfocitima, kao niti MMP-2 i MMP-9 s molekularnim tipovima tumora (tablica 13).

Tablica 11. Molekularni tipovi tumora kod pacijentica.

Molekularni tip tumora	N	%
1. Luminalni tip A (ER/PgR+,HER2/neu-, Ki67 < 14%)	55	45.45
2. Luminalni tip B a (ER/PgR+,HER2/neu-,Ki67 > 14%)	15	12.39
3. Luminalni tip B b (ER/PgR+, HER2/neu+, bilo koji Ki67)	17	14.04
4. HER2/neu +, ER/PgR-	10	8.26
5. Trostruko negativni	22	18.18
nedostaju podaci	2	1.65

Tablica 12. Dvosmjerna frekvencijska tablica molekularnih tipova tumora i ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama, Hi-kvadrat ( $P=0.0155$ ).

ETS-1, tm	Lum A	LumB, Her2-	LumB, Her2+	Her2+	Trostruko neg.	Ukupno
IHI 0/1	50	15	16	10	14	105
%*	90.90	100	94.11	100	63.63	
%**	47.61	14.28	15.23	9.52	13.33	
IHI 2/3	5	0	1	0	8	14
%*	9.09	0	5.88	0	36.36	
%**	35.71	0	7.14	0	57.14	
Ukupno	55	15	17	10	22	119

\* % pacijentica unutar određene molekularne skupine; \*\* % svih pacijentica

Tablica 13. Povezanost molekularnih podtipova karcinoma s analiziranim proteinima.

analizirani pokazatelji	<i>P</i>
MMP-2 u stromi	0.36
MMP-2 u tumorskim stanicama	0.60
MMP-9 u stromi	0.79
MMP-9 u tumorskim stanicama	0.91
ETS-1 u limfocitima	0.57
ETS-1 u tumorskim stanicama	<b>0.0155</b>

#### **4.4. Usporedba koekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima**

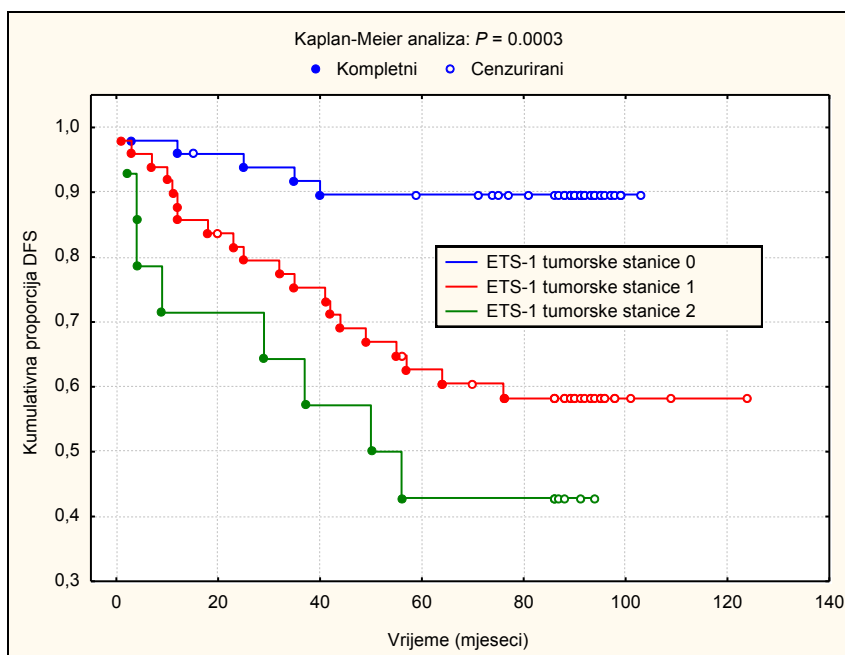
Koekspresija ETS-1 i gelatinaza je prisutna u tumorskim stanicama 40.5% tumora (N=49). Koekspresija istraživanih proteina u pozitivnoj je korelaciji s tumorima većim od 2 cm. Prosječna veličina tumora kod koekspresije bila je 2.35 cm (0.4 cm do 7 cm), a kod ostalih 1.8 cm (0.5 cm do 5.5 cm). Razlika je statistički značajna na razini  $P=0.0065$  (Mann-Whitney U test). Koekspresija je bila češća u tumorima s histološkim gradusom 3 kao i u tumorima s negativnim steroidnim receptorima. Koekspresija nije korelirala s metastazama u limfne čvorove, HER2/neu statusom kao niti s proliferacijskim indeksom Ki67 (tablica 8).

#### **4.5. Praćenje pacijentica i analiza preživljenja**

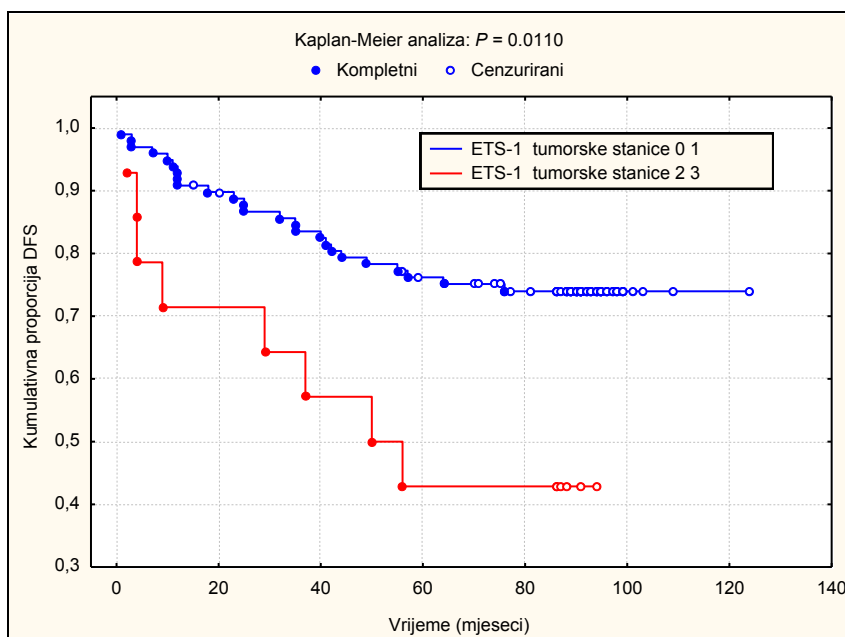
Preživljenje je izračunato za prosječni period od 80.6 mjeseci (raspon 9-124 mjeseca). Unutar tog perioda je 31 pacijentica umrla od posljedica karcinoma dojke.

##### **4.5.1. Kaplan -Meier analiza**

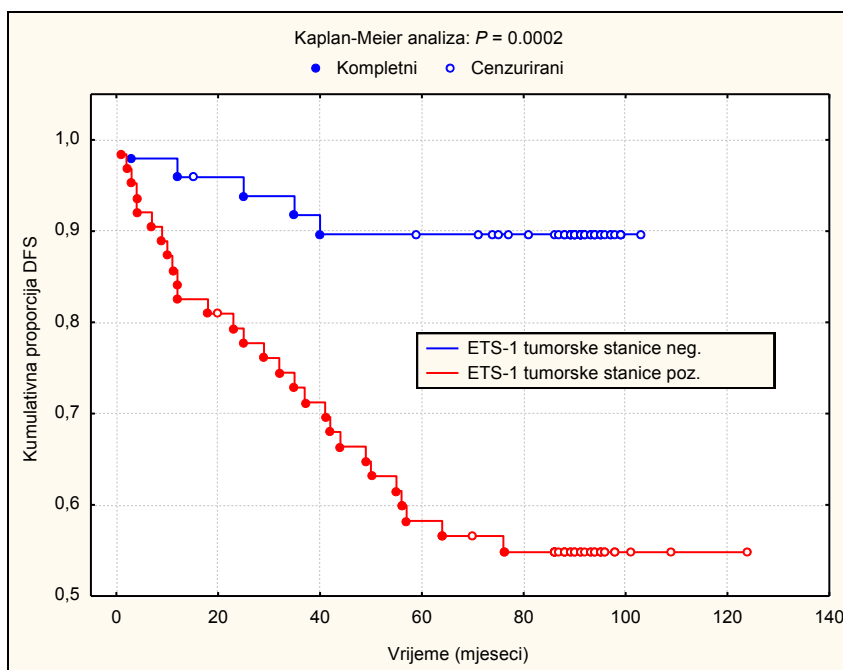
Postoji statistički značajna razlika u pojavi recidiva bolesti kod različitih ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama (slika 27). Kod grupiranja rezultata na dvije skupine, taj je rezultat potvrđen (slika 28 i 29).



Slika 27. Povezanost ekspresije ETS-1 (negativan, slaba ekspresija i jaka ekspresija) u tumorskim stanicama s pojavom recidiva bolesti (DFS).

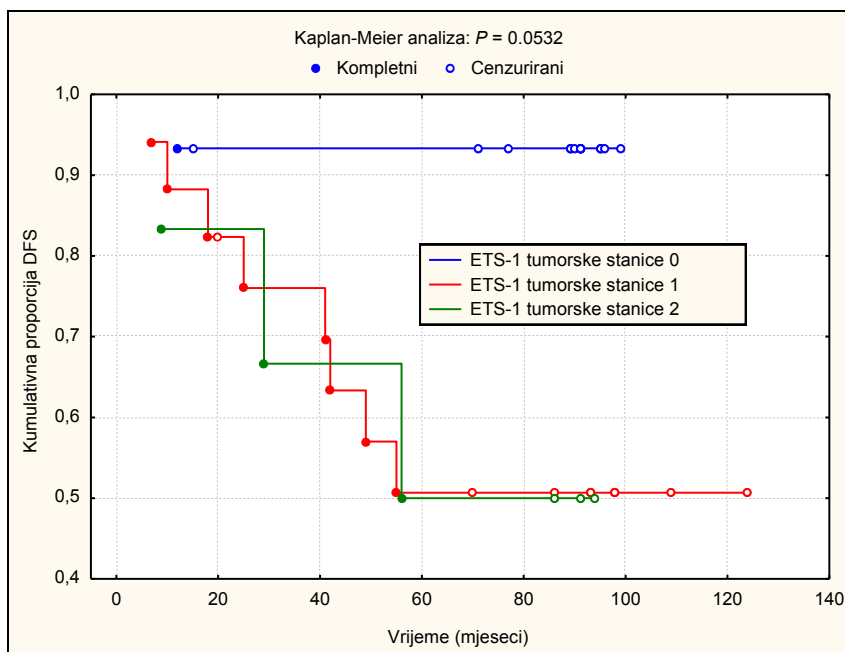


Slika 28. Povezanost ekspresije (negativan i slabo pozitivan u usporedbi umjereno i jako pozitivan) ETS-1 u tumorskim stanicama s pojavom recidiva bolesti (DFS).

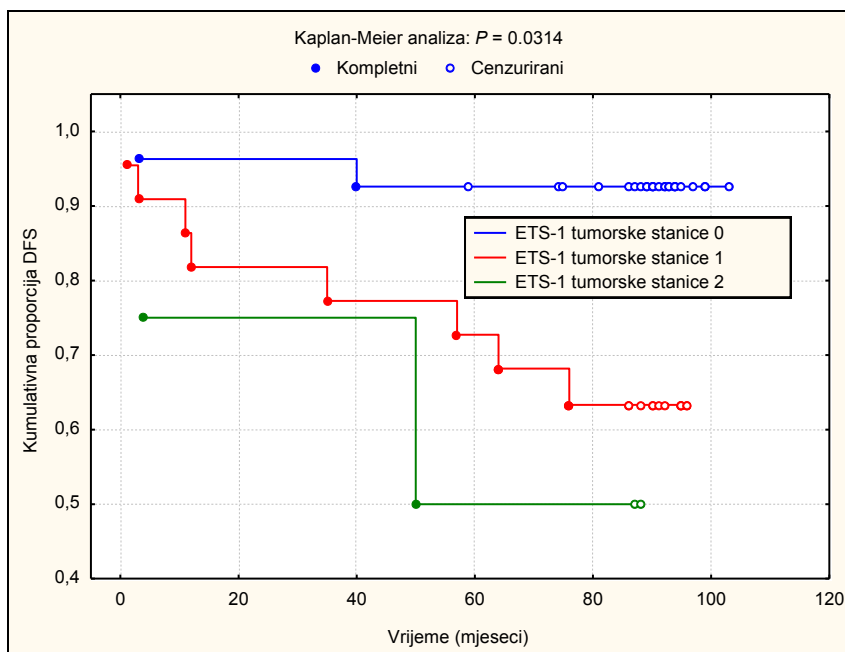


Slika 29. Povezanost ekspresije (negativan i pozitivan) ETS-1 u tumorskim stanicama s pojavom recidiva bolesti (DFS).

Nakon podjele pacijentica na skupinu s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima dobivena je statistički značajna razlika u krivuljama preživljenja s obzirom na ekspresiju ETS-1 u tumoru u obje skupine pacijentica (slika 30 i 31). Kod pozitivne ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama vjerojatnost recidiva je značajno češća i javlja se ranije nego kod negativne ekspresije. Razlika je statistički značajna na razini  $P=0.0532$  odnosno  $0.0314$ .

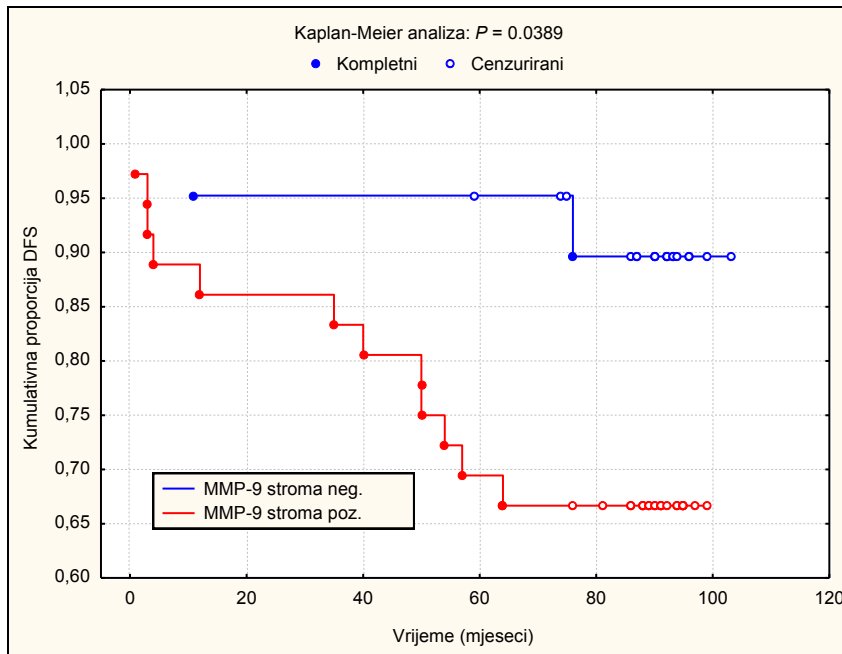


Slika 30. Krivulja ukupnog preživljenja pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima s obzirom na ekspresiju ETS-1 (negativan, slabo i umjereno pozitivan).



Slika 31. Krivulja ukupnog preživljenja pacijentica s negativnim limfnim čvorovima s obzirom na ekspresiju ETS-1 (negativan, slabo i umjereno pozitivan).

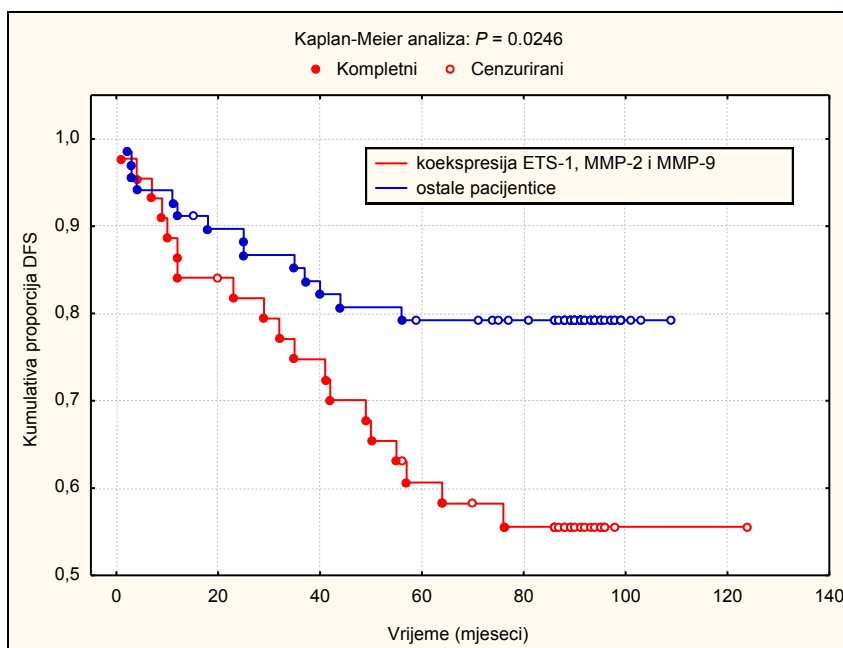
Kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima dobivena je i statistički značajna razlika za DFS s obzirom na ekspresiju MMP-9 u tumorskoj stromi. Pacijentice su u toj skupini imale veću vjerojatnost recidiva nego one s negativnom ekspresijom (slika 32).



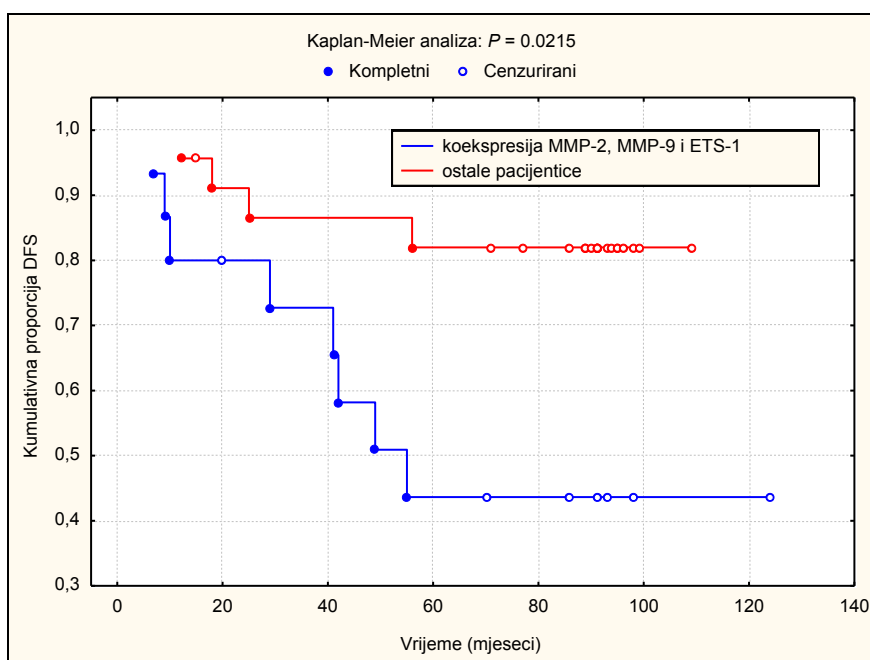
Slika 32. Preživljenje bez znakova bolesti kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima i ekspresijom MMP-9 u stromalnim stanicama.

Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 ima značajan utjecaj na pojavu recidiva te pacijentice s izraženom koekspresijom imaju veću vjerojatnost povrata bolesti (slika 33). Ako uzorak podijelimo na pozitivne i negativne limfne čvorove, kod pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima također postoji značajan utjecaj koekspresija na pojavu recidiva (slika 34) dok kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima nema statistički značajne razlike u pojavi recidiva s obzirom na koekspresiju tri proteina.





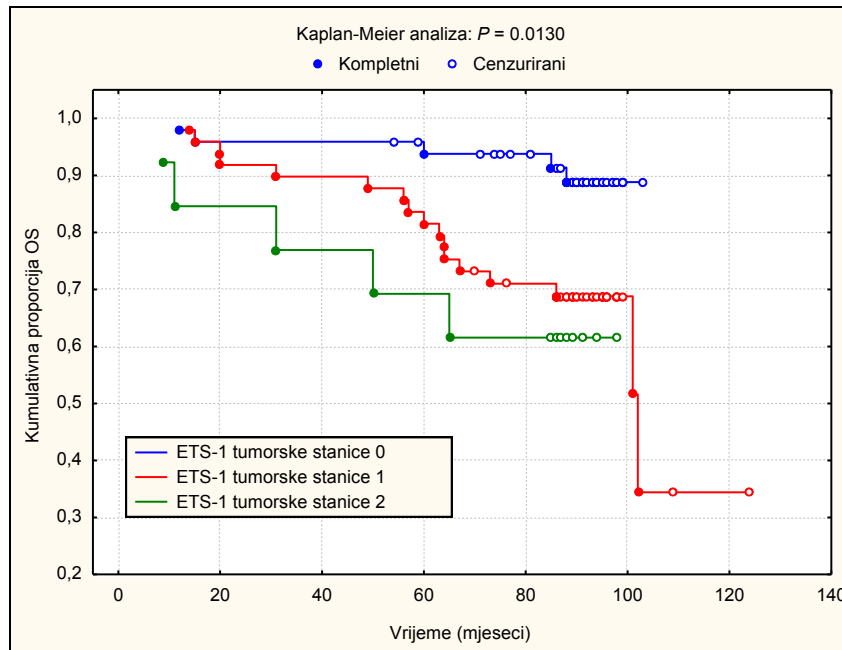
Slika 33. Preživljenje bez znakova bolesti kod pacijentica s koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9.



Slika 34. Preživljenje bez znakova bolesti kod pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima s koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9.

Postoji statistički značajna razlika u sveukupnom preživljenju pacijentica s obzirom na ekspresiju ETS-1 u tumorskim stanicama. One s negativnim nalazom imale su bolju vjerojatnost preživljenja nego pacijentice s pozitivnim nalazom. Pacijentice s umjerenom i jakom ekspresijom ETS-1 imaju manju vjerojatnost preživljenja kroz promatrano vrijeme, nego one s negativnom i blagom ekspresijom. Jedna je

pacijentica s jakom ekspresijom ETS-1 u tumorskim stanicama priključena skupini IHI 2 (slika 35).



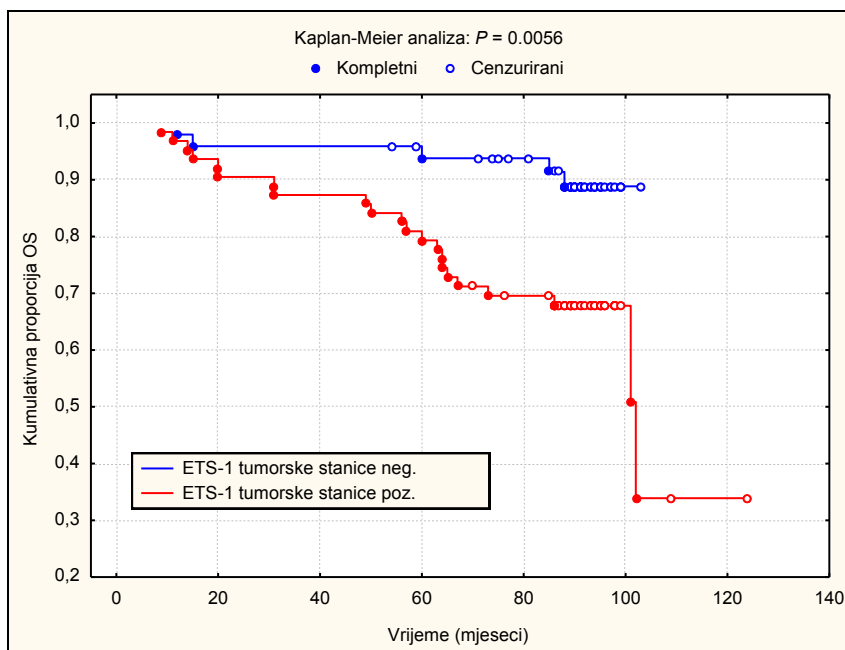
Slika 35. Ukupno preživljenje pacijentica s ekspresijom ETS-1 u tumorskim stanicama.

Ako se spoje nalazi IHI 0 i 1, te IHI 2 i 3, razlika između takvih skupina nije statistički značajna. Krivulje pokazuju da su pacijentice s nalazom 2 ili 3 ETS-1 u tumoru imale manju vjerojatnost preživljenja nego one s nalazom 0 ili 1, ali ta razlika nije statistički značajna ( $P=0.0772$ ).

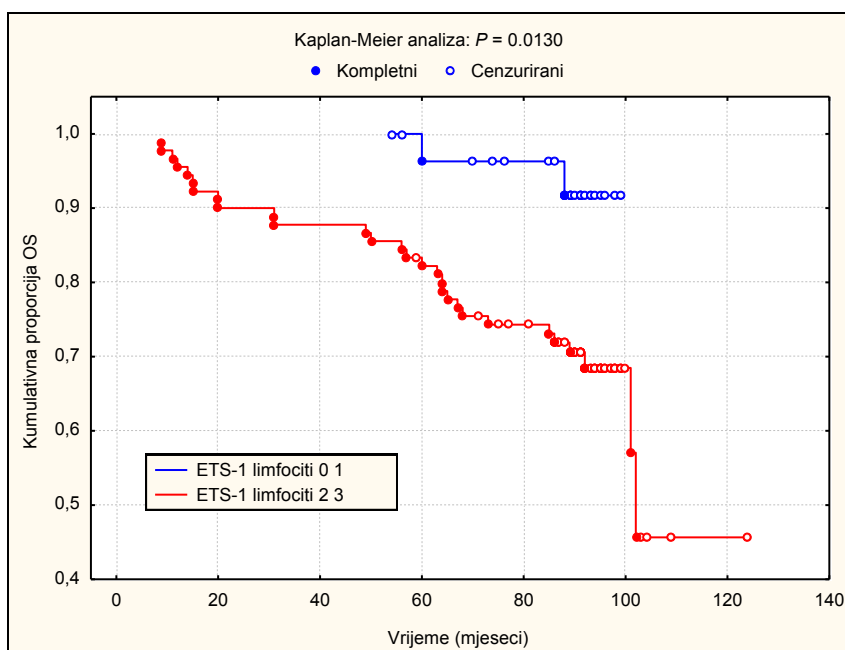
U grupiranju uzoraka na negativne i pozitivne uzorke, pacijentice s ETS-1 pozitivnim tumorima su imale manju vjerojatnost ukupnog preživljenja u odnosu na pacijentice s negativnim tumorima (slika 36). Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju između MMP-2 i MMP-9 pozitivnih i negativnih tumora ( $P=0.723$  odnosno  $P=0.335$ ).

Ekspresija ETS-1 nađena je u tumoru infiltrirajućim limfocitima u 95% pacijentica. Nakon grupiranja ekspresija u negativne i slabo pozitivne tumore te umjereno i jako pozitivne tumore (IHI 0,1 i IHI 2,3), dobivena je statistički značajna razlika između krivulja preživljenja. Pacijentice s umjerenom i jakom ekspresijom imaju znatno manju vjerojatnost preživljenja, nego one s negativnom ili slabom ekspresijom ETS-1 u limfocitima (slika 37).

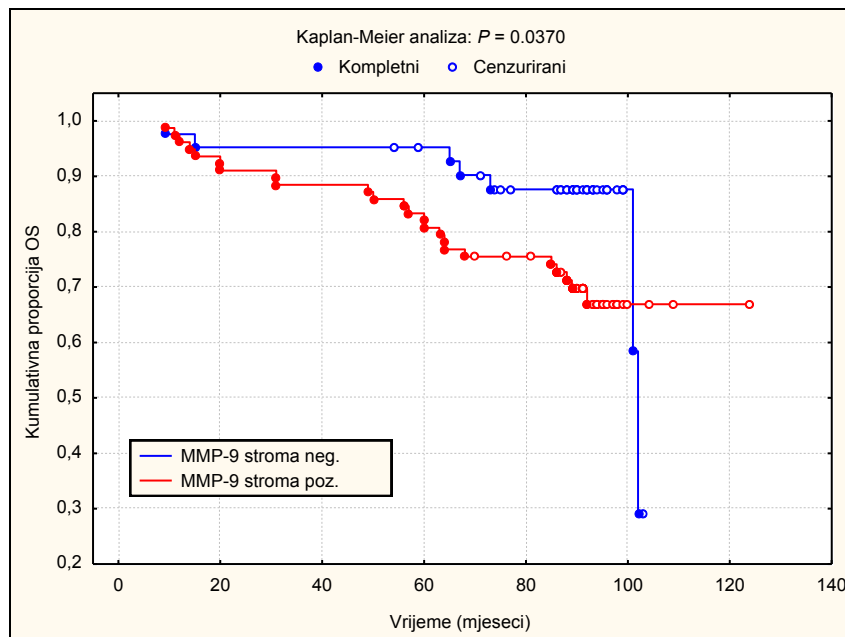
Pacijentice s pozitivnom ekspresijom MMP-9 u stromi imaju znatno manju vjerojatnost preživljenja kroz promatrano vrijeme, nego one s negativnom ekspresijom (slika 38).



Slika 36. Krivulja ukupnog preživljenja pacijentica s negativnim i pozitivnim ETS-1 u tumorskim stanicama.



Slika 37. Krivulje ukupnog preživljenja bolesnica s ETS-1 pozitivnim i negativnim tumorskim limfocitima.



Slika 38. Krivulja ukupnog preživljenja za pacijentice s pozitivnom i negativnom ekspresijom MMP-9 u stromi.

Kod podjele uzoraka na molekularne podtipove nema statistički značajne razlike u preživljenju pacijentica.

Značajan utjecaj na preživljenje u cjelokupnoj populaciji pacijentica bez podjele na skupinu s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima imaju sljedeće koekspresije (Kaplan-Meier analiza):

1. MMP-2 i MMP-9 koekspresija u tumorskim stanicama ( $P=0.0526$ )
2. MMP-9 u tumorskim stanicama i u stromi ( $P=0.0308$ )
3. ETS-1 u tumorskim stanicama i limfocitima ( $P=0.049$ )
4. MMP-2 i ETS-1 u tumorskim stanicama ( $P=0.004$ )
5. MMP-2 u tumorskim stanicama i ETS-1 u limfocitima ( $P=0.0512$ )
6. MMP-9 i ETS-1 u tumorskim stanicama ( $P=0.0017$ )
7. MMP-9 u stromi i ETS-1 u limfocitima ( $P=0.0293$ )

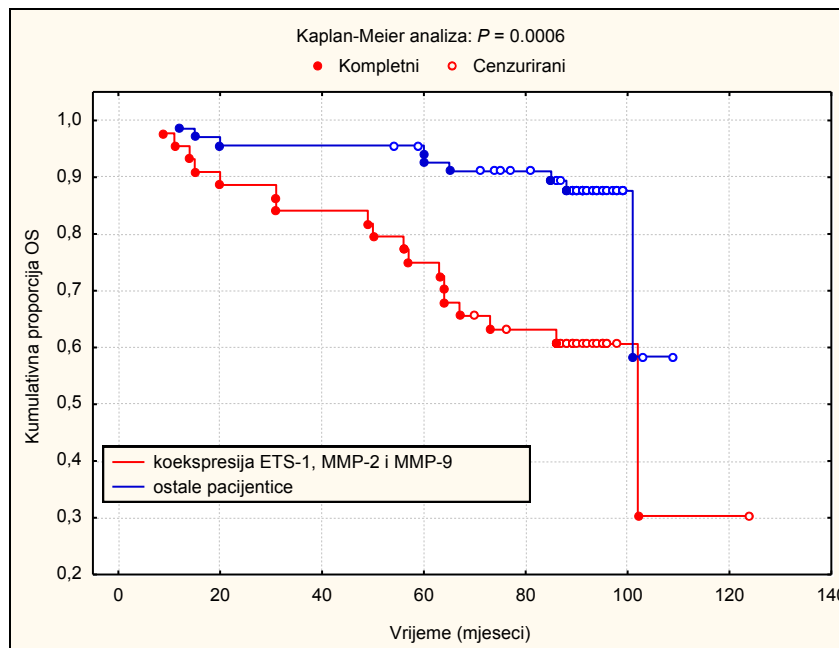
Značajan utjecaj na preživljenje kod pacijentica s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima imaju sljedeće koekspresije:

1. Koekspresija MMP-2 i ETS-1 u tumorskim stanicama. Pacijentice s oba pozitivna nalaza imaju kraće preživljenje od ostalih. Isti je rezultat i u odvojenim skupinama s pozitivnim ( $P=0.0274$ ) i s negativnim limfnim čvorovima ( $P=0.0136$ ).
2. Koekspresija MMP-9 i ETS-1 u tumorskim stanicama. U skupini s pozitivnim limfnim čvorovima nema razlike u preživljenju s obzirom na koekspresiju dok u skupini s negativnim limfnim čvorovima pacijentice imaju kraće preživljenje ( $P=0.0095$ ).

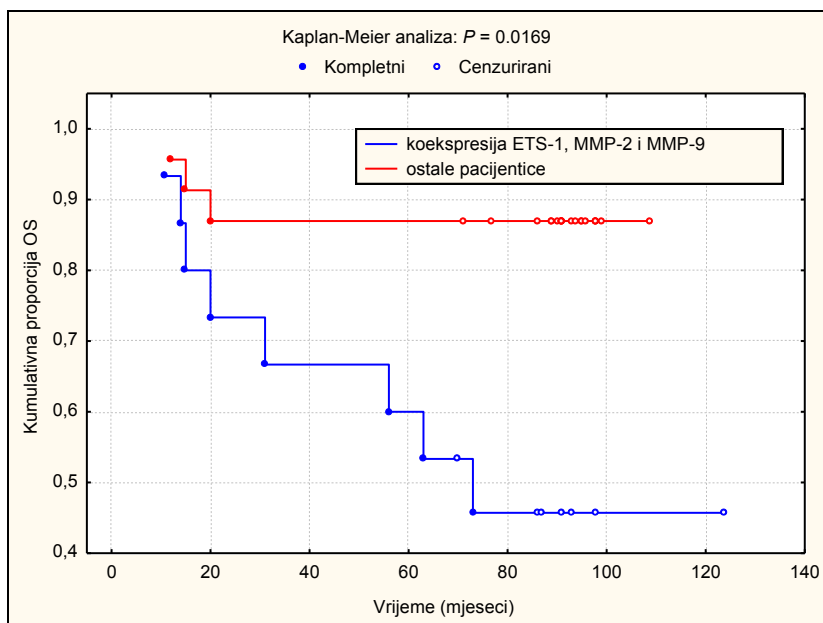
3. Koekspresija MMP-9 u tumorskoj stromi i ETS-1 u tumorskim stanicama. U skupini s pozitivnim limfnim čvorovima nema razlike u preživljenju s obzirom na koekspresiju ( $P=0.0835$ ) dok u skupini s negativnim limfnim čvorovima pacijentice imaju kraće preživljenje ( $P=0.023$ ).

4. Koekspresija MMP-2 i ETS-1 u tumorskim stanicama. Pacijentice s oba pozitivna nalaza imaju lošije preživljenje od ostalih. Isti je rezultat i u odvojenim skupinama s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima. Pacijentice koje imaju koekspresiju imaju lošije preživljenje, ako uz to imaju i pozitivne limfne čvorove, nego pacijentice s pozitivnom koekspresijom i negativnim limfnim čvorovima ( $P=0.0274$ ).

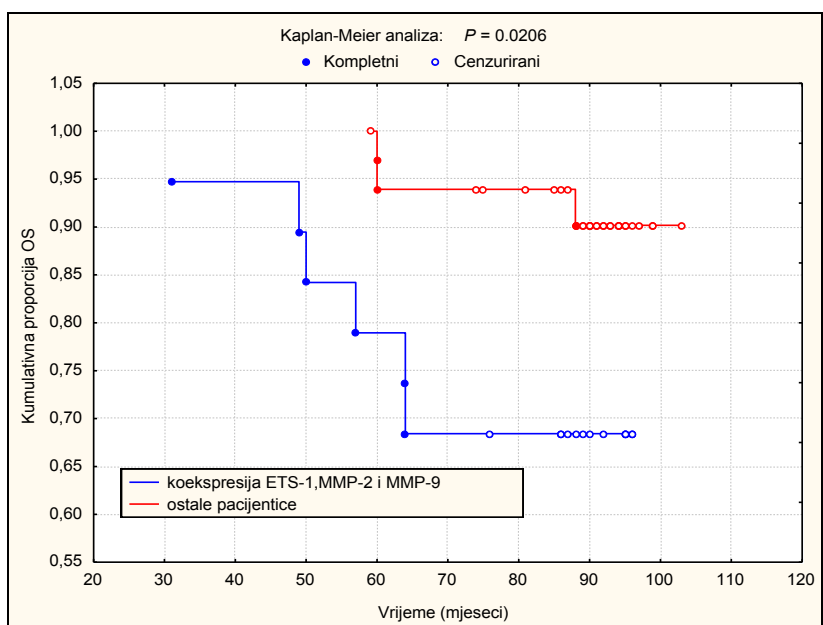
5. Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 ima statistički značajan utjecaj na preživljenje, kako u cijelom uzorku (slika 39) tako i kod pacijentica s pozitivnim ili negativnim limfnim čvorovima (slika 40 i 41).



Slika 39. Krivulja ukupnog preživljenja za pacijentice s koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP9 (nema i ima).



Slika 40. Krivulja ukupnog preživljenja za pacijentice sa pozitivnim limfnim čvorovima i koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9.



Slika 41. Krivulja ukupnog preživljenja za pacijentice sa negativnim limfnim čvorovima i koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9.

#### 4.5.2. Univarijatna logistička regresija

Rizični čimbenici za DFS i OS dobiveni univarijatnom logističkom regresijom prikazani su u tablici 14 i 15.

Tablica 14. Rizični čimbenici za recidiv bolesti.

	Omjer izgleda	95 % granice pouzdanosti		P
		Donja	Gornja	
Umjerena i jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama	3.89	1.21	12.48	<b>0.0226</b>
Pozitivan ETS-1 u tumorskim stanicama	7.04	2.43	20.36	<b>0.0004</b>
Jaka ekspresija ETS-1 u TIL	2.90	1.14	7.40	<b>0.0261</b>
Pozitivnost MMP-2 u stromi	0.36	0.14	0.94	<b>0.0363</b>
Koekspresija ETS-1 u limfocitima i tumorskim stanicama	10.37	1.99	54.05	<b>0.0059</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-2 u tumorskim stanicama	5.10	2.02	12.90	<b>0.0007</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-9 u tumorskim stanicama	3.56	1.48	8.57	<b>0.0050</b>
Koekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama i MMP-9 u stromi	4.01	1.69	9.53	<b>0.0019</b>
Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u tumorskim stanicama.	2.93	1.26	6.84	<b>0.0133</b>
Tumor > 2 cm	2.47	1.07	5.72	<b>0.0348</b>
Ekspresija MMP-2 u tumorskim stanicama	2.15	0.57	8.18	0.2570
Ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama	0.73	0.24	2.19	0.5692
Koekspresija MMP-2 i MMP-9 u tumorskim stanicama	1.51	0.76	2.61	0.5773
Pozitivni limfni čvorovi	1.58	0.61	4.09	0.3443
ER +	0.69	0.29	1.65	0.3971
PgR +	1.32	0.57	3.05	0.5140

HER-2 +	1.15	0.42	3.18	0.7876
Ki67 >14%	1.21	0.66	2.21	0.5321
Histološki gradus 3	1.70	0.73	3.93	0.2138
Nuklearni gradus 3	1.80	0.78	4.18	1.1696



Tablica 15. Rizični čimbenici za ukupno preživljenje.

	Omjer izgleda	95 % granice pouzdanosti		P
		Donja	Gornja	
Pozitivan ETS-1 u tumorskim stanicama	4.72	1.62	13.79	<b>0.0049</b>
Umjerena i jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama	6.14	1.33	28.26	<b>0.0202</b>
Koekspresija ETS-1 u limfocitima i tumorskim stanicama	4.60	1.12	18.89	<b>0.0344</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-2 u tumorskim stanicama	6.93	2.36	20.34	<b>0.0005</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-9 u tumorskim stanicama	4.29	1.62	11.36	<b>0.0038</b>
Koekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama i MMP-9 u stromi	3.46	1.39	8.62	<b>0.0081</b>
Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP9 u tumorskim stanicama	4.54	1.78	11.55	<b>0.0017</b>
Tumor > 2 cm	3.86	1.53	9.76	<b>0.0047</b>
Histološki gradus 3	2.84	1.16	6.96	<b>0.0233</b>
Nuklearni gradus 3	3.00	1.22	7.39	<b>0.0173</b>
Koekspresija MMP-2, MMP-9 u tumorskim stanicama	3.5	0.62	8.7	0.0856
Ekspresija MMP-2 u tumorskim stanicama	4.82	1.61	15.3	0.0799
Ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama	1.58	0.41	6.05	0.5032
Pozitivni limfni čvorovi	1.99	0.72	5.50	0.1815
ER+	0.55	0.22	1.37	0.1961

PgR+	1.20	0.49	2.93	0.6833
HER-2+	1.23	0.42	3.59	0.6997
Ki67>14%	1.72	0.93	3.17	0.0826

#### 4.5.3. Multivarijatna logistička regresija

U multivarijatnoj analizi, korišteni je model logističke regresije pokazao da za procjenu rizika smrti ima značenje koekspresija ETS-1 i MMP-2 u tumorskim stanicama te tumor veći od 2 cm (tablica 16). Dijagnostički pokazatelji (tablica 18) su izračunati iz tablice 17.

*Tablica 16. Rizični čimbenici za ukupno preživljenje u multivarijatnoj analizi.*

	Omjer izgleda	95 % granice pouzdanosti		P
		Donja	Gornja	
Tumor > 2cm	2.91	1.09	7.77	<b>0.0335</b>
Koekspresija ETS-1 i MMP-2 u tumorskim stanicama	5.74	1.91	17.24	<b>0.0021</b>

Ostali čimbenici koji su po univarijatnoj analizi značajni za rizik smrti, pokriveni su utjecajem ovih dviju varijabli ili je njihov doprinos modelu previše mali da bi ga poboljšao.

Tablica 17. 2x2 tablica iz koje su izračunati dijagnostički pokazatelji.

Opaženo	Predviđeno		Ukupno
	Umrle	Nisu umrle	
Umrle	17	14	31
Nisu umrle	16	74	90
Ukupno	33	88	121

Osjetljivost= stvarno pozitivni/ (stvarno pozitivni + lažno negativni)

Specifičnost= stvarno negativni/ (stvarno negativni + lažno pozitivni)

Pozitivna prediktivna vrijednost = stvarno pozitivni / (stvarno pozitivni + lažno pozitivni)

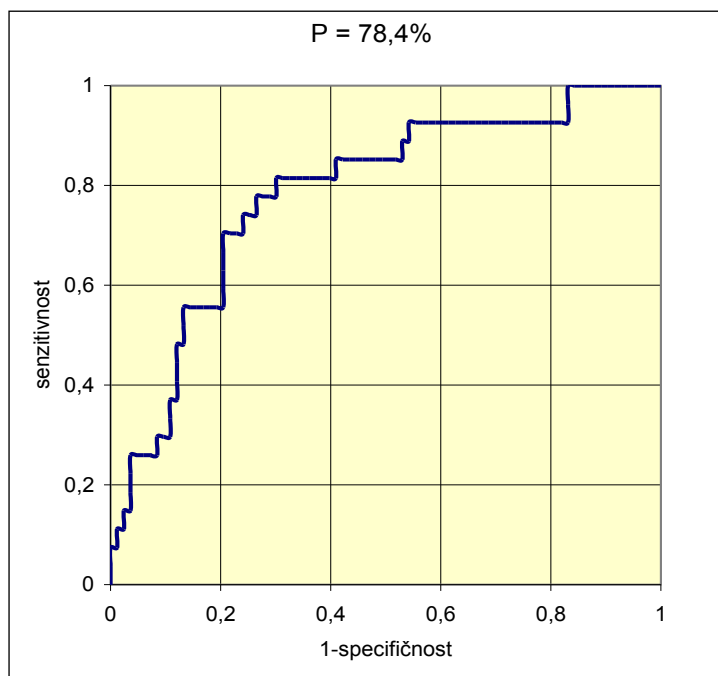
Negativna prediktivna vrijednost = stvarno negativni / (stvarno negativni + lažno negativni)

Efikasnost = (stvarno pozitivni + stvarno negativni) / ukupni broj

Tablica 18. Dijagnostički pokazatelji.

Dijagnostički pokazatelji	
Osjetljivost	0.5161
Specifičnost	0.8131
Pozitivna prediktivna vrijednost	0.4848
Negativna prediktivna vrijednost	0.8409
Efikasnost	0.7438

Omjer 1-specifičnosti i osjetljivosti prikazan je ROC krivuljom. Dobiven je model čija je površina ispod krivulje 78.4%, što spada u kategoriju relativno dobrog modela (slika 40).



Slika 40. ROC krivulja modela logističke regresije za rizik smrti.

## 5. RASPRAVA

Prognostički čimbenici predstavljaju osobitost tumora ili pacijentice u vrijeme postavljanja dijagnoze koji, neovisno o adjuvantnoj sistemnoj terapiji, određuju ili koreliraju s prirodnim tijekom i ishodom bolesti te su time odraz agresivnosti tumora (46-48). Tradicionalni prognostički čimbenici karcinoma dojke su histološki tip tumora, histološki i nuklearni gradus, veličina tumora, dob pacijentice, status limfnih čvorova, status steroidnih receptora, imunohistokemijska razina ekspresije Her2/neu proteina ili amplifikacija HER2/neu gena te proliferacijski indeks Ki67. Pozitivni limfni čvorovi ostaju najvažniji prognostički čimbenik u karcinomu dojke, no većina pacijentica u trenutku dijagnoze ima negativne limfne čvorove (181). Patohistološka analiza ne može uvijek identificirati metastatski potencijal karcinoma preko postojećih prognostičkih i prediktivnih čimbenika (140). Također, zbog povećanja incidencije karcinoma dojke gotovo svuda u svijetu te visoke stope smrtnosti i povrata bolesti, veliki se naglasak u medicinskoj znanosti stavlja na otkrivanje novih molekularnih prognostičkih i prediktivnih čimbenika koji bi omogućili individualiziranje terapije te odvajanje one skupine pacijentica koja bi imala koristi od agresivnijeg liječenja u smislu duljeg preživljenja (3, 4). Uz prethodno navedene tradicionalne prognostičke čimbenike, do danas su proučavani brojni drugi čimbenici čija se klinička vrijednost još mora ustvrditi.

Na uzorku tumora od 121 pacijentice s NST karcinomom dojke koje su uključene u ovo istraživanje, samo se veličina tumora od tradicionalnih prognostičkih čimbenika pokazala statistički značajnim za preživljenje bez znakova bolesti dok su se za sveukupno preživljenje pokazali značajnim veličina tumora te histološki i nuklearni gradus 3.

Matriks metaloproteinaze (MMP-e) pripadaju najvećoj skupini proteaza u ljudskom organizmu. Nekoliko članova iz obitelji matriks metaloproteinaza ima središnju ulogu u invaziji i metastaziranju tumora zbog svoje sposobnosti razgradnje elemeneta bazalne membrane, a to su dvije gelatinaze: metaloproteinaza 2 (MMP-2) i metaloproteinaza 9 (MMP-9). Kolagenaze razgrađuju tip IV kolagena koji je glavna sastavnica bazalne membrane te su time jako zanimljive u istraživanju patogeneze i prognoze tumora pa tako i u pacijentica s karcinomima dojke (97-99).

ETS-1 spada u najveću obitelj transkripcijskih čimbenika (119, 120). Brojne su studije pokazale korelaciju ekspresije ETS-1 s prognozom, patogeneзом i metastatskim potencijalom brojnih malignih tumora, uključujući karcinom dojke. Između ostalih funkcija, ETS-1 regulira i ekspresiju MMP-2 i MMP-9 vezujući se na promotor njihovih gena (117, 118) te je stoga ETS-1, prema rezultatima nekoliko studija, uključen u ocjenu prognoze različitih zloćudnih tumora uključujući i karcinom dojke.

S obzirom na prisutnost ETS-1 veznog mjesta na promotorima obje gelatinaze te potrebe dodatnih istraživanja u području prognostičkih vrijednosti ETS-1 i gelatinaza, postavili smo hipotezu da njihove koekspresije predstavljaju bitan čimbenik koji utječe na sveukupno preživljenje i na preživljenje bez znakova bolesti pacijentica s karcinomom dojke (117, 118). U tom slučaju, kod prisutne koekspresije moguće je da se radi o skupini pacijentica s kraćim preživljenjem. U radu smo usporedili međusobne ekspresije proteina metodom imunohistokemije, njihov odnos prema ostalim patohistološkim pokazateljima te njihov utjecaj na preživljenje.

Uloga metaloproteinaza u kancerogenezi karcinoma dojke povezuje se s tumorskom inicijacijom i rastom, prvenstveno promocijom angiogeneze u tumoru, aktiviranjem stimulirajućih čimbenika rasta i degradacijom njihovih inhibitora (100, 106). Dok većina publiciranih studija govori u prilog pozitivne korelacije ekspresije gelatinaza s tumorskom inicijacijom i progresijom (99, 106, 107, 110, 111, 182), postoje i kontroverze o učinku MMP na progresiju karcinoma (183). Za MMP-2 i MMP-9 također se pokazalo da su prekomjerno eksprimirane i u biološki agresivnijim tumorima (92, 99, 100). Metaloproteinaze se mogu određivati imunohistokemijski te drugim metodama kao što su PCR, in situ hibridizacija, ELISA i zimografija (105, 107, 112-114, 138, 139, 184-191). U imunohistokemijskoj su se analizi uvele metode koje objektiviziraju interpretaciju patološkog nalaza, tako da se semikvantitativna metoda često zamjenjuje s nekim od patohistoloških imunohistokemijskih indeksa kao što je HSSCORE, Allred, Quick score itd. U imunohistokemijskoj smo interpretaciji naših rezultata, slično kao Katayama (140) i Okuducu (184), uzeli u obzir intenzitet bojenja te postotak obojenih tumorskih stanica i njihovim umnoškom kreirali jedinstveni imunohistokemijski indeks. Donje se granice pozitivnosti uzoraka u imunohistokemijskoj analizi razlikuju od studije do studije i najčešće iznose 1 i 5%, a u našem istraživanju smo koristili vrijednost od 1%. U našim su uzorcima metaloproteinaze u jačem intenzitetu i postotku izražene unutar tumorskih stanica te je MMP-2 pokazala pozitivnost u 77% uzoraka, a MMP-9 u 90% uzoraka. Stromalna je ekspresija MMP-2 i MMP-9 bila u slabijem intenzitetu i to u 80.61%, odnosno 65.3% uzoraka. Naš nalaz visoke pozitivnosti MMP-2 i MMP-9 u tumorskim uzorcima potvrđuje prethodne nalaze visokih ekspresija gelatinaza u invazivnim karcinomima dojke. Scorilas je u svom radu opisao 80% pozitivnost MMP-9 unutar tumorskih stanica (116). Talvensaaari-Matilla i Nakopoulou (113, 185) također izvještavaju o pozitivnosti MMP-2 u oko 75 % tumorskih stanica. Li i suradnici opisuju slabiju pozitivnost MMP-2 i MMP-9 unutar tumorske strome, a intenzivnu u tumorskim epitelnim stanicama, no u nešto manjem postotku (56.7% odnosno 59.6% uzoraka) (114).

S obzirom na to da je ekspresija MMP-2 prikazana u tumorskim stanicama, endotelu, fibroblastima, osteoblastima, makrofazima, a MMP-9 u tumorskim stanicama, polimorfonuklearima, pericitima, makrofazima i keratinocitima, in vivo

izvor gelatinaza unutar tumorskog tkiva ostaje nejasan (116). Neki autori nalaze ekspresiju MMP-2 u stromalnim elementima i/ili tumorskim stanicama (107, 185, 192) dok drugi nalaze pozitivnost samo u tumorskim stanicama (112, 113). Navedene razlike u ekspresiji gelatinaza vjerojatno nastaju zbog drugačijih metoda detektiranja te razlika u vrsti protutijela koja su korištena. Kim i suradnici objašnjavaju kako određivanje MMP-a u tumorima, metodama kao što je ELISA, "Northern blotting", zimografija i in situ hibridizacija, češće prikazuju pozitivnosti MMP u tumorskoj stromi nego unutar tumorskih epitelnih stanica. U suprotnosti s tim metodama, detektiranje MMP-a imunohistokemijski pokazalo je veću ekspresiju u tumorskim epitelnim stanicama, a manju u tumorskoj stromi (186).

Vjerojatno je tumorska stroma veći izvor metaloproteinaza od samih tumorskih epitelnih stanica. Chabottaux (99) naglašava kako tumorske stanice mogu stimulirati fibroblaste u sintezi MMP u parakrinom načinu signaliziranja putem interleukina, citokina, faktora rasta i pomoću CD147 (EMMPRIN, basigin). EMMPRIN je imunoglobulin na membranama koji sudjeluje u pretvorbi fibroblasta u CAF (engl. cancer associated fibroblasts) koji imaju ulogu u epitelno-mezenhimalnoj tranziciji tumorskih stanica. Danas se zna da EMMPRIN može aktivirati produkciju metaloproteinaza što sugerira da tumorske stanice preko CD147 stimuliraju fibroblaste na lučenje gelatinaza (193, 194).

Pozitivna ekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama naših uzoraka je bila češća kod negativne ekspresije MMP-2 u tumorskoj stromi ( $P=0.0492$ ). Moguće je da tumorske stanice unose gelatinaze u svoju citoplazmu iz tumorske strome te parakrinim mehanizmima negativno djeluju na sintezu MMP-2 unutar fibroblasta. Također, postoje radovi koji izještavaju o znatno većoj količini MMP-9 mRNA u neoplastičnim epitelnim stanicama dok je MMP-2 mRNA primjećena u znatno većim količinama u stanicama tumorske strome (187). Moguće je da tumorske stanice koje imaju veliku količinu MMP-9 u svojoj citoplazmi, parakrinim mehanizmima inhibiraju ekspimiranje druge gelatinaze u stromalnim stanicama. U našim smo rezultatima dobili statistički značajnu povezanost ekspresije MMP-2 i MMP-9 u stromalnim stanicama ( $P=0.0458$ ). Nalaz je u skladu s biološkom sličnosti obje gelatinaze i govori u prilog rezultata radova koji stavljaju u prvi plan stromu kao izvor gelatinaza u tumorskom tkivu.

Postoje brojni radovi koji su korelirali gelatinaze s ostalim prognostičkim čimbenicima. U našem radu nismo dobili značajnu povezanost ekspresije MMP-9 s ostalim patohistološkim pokazateljima, što se slaže s nekoliko prethodnih autora (186, 188, 189). Li i suradnici nalaze pozitivnu korelaciju MMP-2 s tumorskim gradusom i veličinom, MMP-9 s tumorskim gradusom te ne nalaze povezanost gelatinaza s menopauzalnim statusom i steroidnim receptorima (114).

Za razliku od ekspresije MMP-9, naši rezultati govore o negativnoj korelaciji ekspresije MMP-2 u tumorskoj stromi i veličine tumora. Nalaz sugerira postojanje nekog drugog faktora u većim tumorima koji negativno djeluje na ekspresiju MMP-2 kao npr. TIMP-2. Postoje i prethodni izvještaji o negativnim korelacijama ekspresije MMP-2 u tumorskoj stromi s prognostičkim čimbenicima koji su, kao i veličina tumora, tradicionalno odraz biološke agresivnosti tumora. Nakopoulou i suradnici, u svome radu, navode negativnu korelaciju imunohistokemijske ekspresije MMP-2 u tumorskoj stromi s proliferacijskim indeksom Ki67 i p53 unutar tumorskih stanica (185). Isti autor navodi i kako stope preživljenja kod pacijentica ovise o omjeru TIMP-2 i MMP-2 u fibroblastima jer su pacijentice s oba pozitivna nalaza imale bolje preživljenje nego pacijentice s negativnom ekspresijom oba proteina. Niemiec i suradnici su multivarijatnom analizom dobili da su tumorski gradus 3, negativna ekspresija MMP-2 u fibroblastima i visoko rizična skupina pacijentica prema St.Gallenu iz 2011. g., neovisni prognostički markeri koji utječu na preživljenje pacijentica (101). To je bio prvi rad koji je pokazao da je negativnost MMP-2 u fibroblastima pokazatelj goreg preživljenja u skupini pacijentica s histološkim gradusom 3 i kako bi se ta činjenica mogla iskoristiti za procjenu prognoze kod pacijentica s luminalnim B/HER2 pozitivnim i trostruko negativnim tumorima. U našoj studiji, ekspresija MMP-2 i MMP-9 te MMP-2/MMP-9 koekspresija u tumorskim stanicama nije pokazala statistički značajnu povezanost s DFS i OS u logističkoj regresijskoj analizi. Neki su rezultati povezanosti ekspresije unutar tumorskih stanica granični i govore kako su pacijentice s ekspresijom MMP-2 i koekspresijom MMP2/9 u tumorskim stanicama imale tendenciju kraćeg OS, ali ti rezultati nisu bili statistički značajni ( $P=0.0799$ , odnosno  $0.0856$ ). U Kaplan-Meierovoj analizi, značajan utjecaj na preživljenje u cjelokupnoj populaciji pacijentica, bez podjele na skupinu s pozitivnim i negativnim limfnim čvorovima, ima koekspresija MMP-9 u tumorskim stanicama i u stromi ( $P=0.0308$ ) te granično i koekspresija MMP-2 i MMP-9 u tumorskim stanicama ( $P=0.0526$ ). Za razliku od navedenog, za DFS se u univarijatnoj logističkoj regresiji pokazala statistički značajna ekspresija MMP-2 u stromi ( $P=0.0363$ ). Kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima, Kaplan-Meierovom je analizom dobivena statistički značajna razlika za DFS s obzirom na ekspresiju MMP-9 u tumorskoj stromi. Pacijentice su u toj skupini imale veću vjerojatnost recidiva nego one s negativnom ekspresijom. Naši su rezultati djelomično slični rezultatima ranijih studija gdje je u većini slučajeva pokazana povezanost između ekspresije gelatinaza u tumorskim stanicama i stromi s lošijom prognozom. Li i suradnici su univarijatnom analizom dobili statistički značajnu razliku u DFS kod MMP-2, MMP-9 te MMP-2/9 pozitivnih i negativnih pacijentica. Isti autori nisu našli povezanost ovih čimbenika s ukupnim preživljenjem pacijentica s rakom dojke (114). Daidone i suradnici su pokazali korelaciju između ekspresije MMP-2 s lokalnim povratom bolesti kod žena s negativnim limfnim čvorovima (DFS), ali nisu pokazali nikakvu povezanost MMP-2 sa sveukupnim preživljenjem (115). Za razliku od njih, Hirvonen i suradnici su našli da je



MMP-2 povezan s OS i DFS (190). Da je MMP-2 unutar tumorskih stanica korelirao s kraćim preživljenjem neovisno o ostalim prognostičkim faktorima, pokazali su Talvensaari-Matilla i suradnici u multivarijatnoj analizi te sugeriraju da bi negativan nalaz MMP-2 u tumorskim stanicama mogao služiti kao marker povoljne prognoze u tumorima s negativnim steroidnim receptorima (113). Isti su autori u prospektivnoj studiji univarijatnom analizom pokazali da je MMP-2 prognostički faktor kod postmenopausalnih žena s pozitivnim limfnim čvorovima i manjom veličinom tumora (112).

Ogura i suradnici su pokazali povezanost ekspresije MMP-2 kod pacijentica s karcinomom dojke stadija T1N0 koje su imale recidiv unutar 10 godina te time ukazali na moguće korištenje MMP-2 kao prognostičkog čimbenika za DFS kod pacijentica s ranim stadijem karcinoma dojke (195). Druge studije, kao što je Pellikainenov rad, nisu našli nikakvu prognostičku vrijednost gelatinaza (MMP-2) u tumorskim stanicama (107).

Objavljen je manji broj studija koje su istraživale prognostičku vrijednost ekspresije MMP-9, a rezultati su različiti. Tako su Li i Pellikainen pokazali da je visoka ekspresija MMP-9 povezana s lošom prognozom u karcinomima dojke neovisno u kojim se stanicama eksprimira (107, 114). Scorilas međutim objavljuje rezultate univarijatne i multivarijatne studije koja govori da ekspresija MMP-9 u stromi kod pacijentica s pozitivnim čvorovima nije imala utjecaj na DFS ili OS, ali da je u pacijentica s negativnim limfnim čvorovima nađena povezanost pozitivne ekspresije MMP-9 s dužim DFS i OS (116).

Za razliku od ekspresija MMP-2 i MMP-9, nema puno radova koji su istraživali povezanost njihovih koekspresija s ostalim prognostičkim čimbenicima i preživljenjem.

Li i suradnici su pokazali da je MMP-2/MMP-9 koekspresija koju su dobili u 45.9% uzoraka, znatno povezana s kraćim DFS, ali ne i OS, osobito kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima. Fan i suradnici su pokazali da je MMP-2/MMP-9 koekspresija povezana s kraćim vremenom preživljenja (114, 191).

Transkripcijski se čimbenik ETS-1 određuje različitim metodama kao što su: "western blotting", ELISA, PCR, knock out miševi, imunohistokemija, imunocitokemija, in situ hibridizacija i "microarray" tehnike (145). U našoj smo imunohistokemijskoj analizi, analizirali ekspresiju ETS-1 u tumorskim stanicama i u limfocitima, ali se u određenoj mjeri prikazala pozitivnost i u drugim elementima strome kao što su endotelne stanice krvnih žila i fibroblasti. Kvantifikacija ekspresije nije napravljena za stromalne stanice (osim za TIL) s obzirom na to da je ETS-1 bio unimorfno blago eksprimiran u gotovo svim uzorcima. Topografska različitost ekspresije ETS-1 je pokazana u prethodnim studijama. Po nekim autorima, ETS-1

pozitivnost je bila veća u epitelnim stanicama, a mala u stromalnim elementima (122, 140) dok neki autori primjećuju veću pozitivnost u stromalnim elementima (138, 196, 197). Katayama i suradnici su odredili količinu ETS-1 mRNA u stanicama strome i unutar tumorskih stanica. Primijetili su da je količina mRNA ETS-1 mala u endotelnim stanicama i fibroblastima te izrazita unutar tumorskih epitelnih stanica (140). Također, nisu našli statistički značajnu korelaciju između ekspresije ETS-1 u stromalnim elementima s drugim patohistološkim pokazateljima. Metodom PCR-a na staničnim linijama karcinoma dojke, dokazali su produkciju ETS-1 unutar samih stanica te su zaključili da protein vjerojatno ima ključnu ulogu u progresiji karcinoma dojke. Isti su autori imunohistokemijski u 83.2% uzoraka dobili pozitivnost bojenja unutar tumorskih stanica što je za oko 30% više u odnosu na našu studiju. Wernert u svom radu naglašava kako je ETS-1 bio prisutan u stromalnim fibroblastima dok je bio negativan u tumorskim stanicama. Najveće je imunohistokemijsko bojenje bilo u fibroblastima blizu tumorskih stanica dok su fibroblasti u benignim, kao i in situ lezijama, bili negativni (196).

Postoje i radovi koji naglašavaju bitnu razliku u topografskoj ekspresiji ETS-1 unutar tumorskih stanica i unutar različitih dijelova tumorskog tkiva. Nuklearna je lokalizacija ETS-1, po radu Mylonne i suradnika, bila povezana sa smanjenim apoptotičkim potencijalom tumorskih stanica preko p53 dok je citoplazmatska ekspresija bila povezana s povoljnijim fenotipom tumora. Isto tako, autori su pokazali da je stromalna ekspresija u fibroblastima bila povezana s tumorskom invazijom (146). To je, po našim spoznajama, prvi rad koji je razlučio ekspresiju ETS-1 topografski unutar same stanice, no mi smo, kao i svi drugi autori, gledali jedinstvenu pozitivnost tumorskih stanica u jezgri i citoplazmi. Citoplazmatska lokalizacija ETS-1 vjerojatno predstavlja onu količinu proteina koja je prekomijerno proizvedena i koja bi se u kasnijim fazama mogla ugraditi u jezgru za potrebe transkripcije (140, 146). Još jedan od modela koji objašnjava citoplazmatsku ekspresiju ETS-1 je rad Laitema i suradnika koji navode da p27, novootkrivena izoforma proteina, odstranjuje p51 izoformu iz same jezgre u citoplazmu te na taj način jedna izoforma proteina ima dominantno negativan učinak na transkripcijsku aktivnost (148).

Unutar tumorskih stanica naših uzoraka ETS-1 je eksprimiran u 56.2% ispitivanih tumora, a povezan je s histološkim gradusom, veličinom tumora i ekspresijom steroidnih receptora. Ovi su se rezultati djelomično potvrdili u prethodnim studijama dok se u Spanovoj studiji ETS-1 pokazao neovisnim prognostičkim markerom za DFS i nije bio u korelaciji s ostalim prognostičkim čimbenicima kao što su veličina tumora, status limfnih čvorova, histološki gradus i status receptora (137). U studiji Myersa i suradnika stupanj ekspresije ETS-1 je također korelirao s veličinom tumora te histološkim i nuklearnim gradusom (198).

Nismo dokazali povezanost ETS-1 s HER2/neu statusom kako je pokazano u nekim prethodnim radovima gdje postoji i sugestija da bi blokiranje ETS-1 funkcije moglo dovesti do poboljšanja terapije Herceptinom (140). Buggy i suradnici nisu dobili statističku povezanost između ETS-1 i veličine tumora, nodalnog statusa, histološkog tipa te ER i PgR (122). Oni su, slično kao i Katayama (140), dobili statistički značajnu povezanost između ETS-1 i HER2/neu koristeći nekoliko metoda detekcije. Metodom određivanja mRNA, pokazali su prisutnost ekspresije i u benignim i u malignim lezijama, ali bitno različitu količinu proteina čime sugeriraju da se translacija događa samo u malignim lezijama.

U našim uzorcima općenito nije nađena povezanost ekspresije ETS-1 s MMP-2 i MMP-9 u tumorskim stanicama, ali je nađena povezanost umjerene ekspresije ETS-1 kod pacijentica koje imaju negativan nalaz MMP-2 u stromalnim stanicama te u tumorima negativnim na ETS-1 koji su češće imali pozitivan nalaz MMP-2 u stromi. Ovo je još jedan primjer negativne korelacije ekspresije MMP-2 u stromi s čimbenikom za koji se općenito smatra da je pokazatelj goreg biološkog ponašanja tumora.

Premda postoje radovi koji su pokazali povezanost ekspresije ETS-1 s metaloproteinazama u staničnim linijama karcinoma dojke (199), u većini studija povezanost ekspresija unutar tumorskih epitelnih stanica nije dokazana. Rezultati Parkove studije govore da je ekspresija MMP-1 bila povećana u uzorcima koji su imali povećanu ekspresiju HER2/neu i ETS-1 čime su dokazali povezanost i međuovisnost tih ekspresija (139). Međutim, naglašavaju i kako nisu našli korelaciju ETS-1 s gelatinazama što se većim dijelom potvrđuje i u našoj studiji. Gilles i suradnici također na staničnim linijama karcinoma dojke ne nalaze povezanost ekspresije ETS-1 s proteinazama, osim što kada su proteinaze bile eksprimirane, bile su eksprimirane samo u ETS-1 pozitivnim linijama (200).

Prethodne su studije pokazale pozitivnu korelaciju ETS-1 i gelatinaza u stanicama tumorske strome karcinoma dojke. Jedan od radova koji stavlja tumorsku stromu u prvi plan je i rad Behrensa i suradnika (138). Metodom *in situ* hibridizacije, PCR i imunohistokemijom, pokazali su pozitivnu korelaciju ETS-1, MMP-1 i MMP-9 unutar stromalnih stanica *in situ* karcinoma čime su sugerirali ulogu ETS-1 u invaziji i karcinogenezi karcinoma dojke.

Poznato je da je ekspresija metaloproteinaza dijelom regulirana na posttranslacijskom, ali znatno više na transkripcijskom nivou. Transkripcijski faktori koji najviše sudjeluju u tome su AP-1 i ETS-1 (196). Naši rezultati sugeriraju da neki drugi transkripcijski čimbenik, kao što je AP-1, imaju veći utjecaj na ekspresiju metaloproteinaza unutar tumorskih epitelnih stanica karcinoma dojke ili da tumorske stanice unose gelatinaze iz strome gdje se proizvode od strane stromalnih stanica (201). Danas se također zna da se pojedini ETS transkripcijski čimbenici mogu ponašati

i kao aktivatori i kao inhibitori transkripcije, ovisno o staničnom kontekstu, a za svoju preciznu transkripcijsku regulaciju nužna im je interakcija s ostalim čimbenicima koji povećavaju ili inhibiraju transkripcijsku aktivnost i određuju ciljne gene (120). Interakcija s nekim proteinima može dovesti i do inhibicije transkripcije metaloproteinaza pa tako interakcija ETS-1 s Daxx/EAP1 inducira supresiju *BCL-2* gena i *MMP-1* gena (121). Moguće je da se u našim uzorcima neki drugi kofaktor, nužan za interakciju ETS-1 i promotora *MMP-2* i *MMP-9*, nije ekspimirao ili da postoji neki drugi inhibitory mehanizam na njihovu interakciju.

Kod podjele tumora s obzirom na molekularni podtip, pokazali smo da je umjerena i jaka ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama češća kod trostruko negativnih tumora. Osim toga, pokazano je da je kod luminalnog B tipa s HER2/neu negativnim receptorima češća negativna i blaga ekspresija ETS-1. Možemo zaključiti da je ekspresija ETS-1 povezana s molekularno agresivnijim podtipom karcinoma što je prethodno pokazao i Bosman sa suradnicima. ETS-1 je u njihovom radu bio ekspimiran u trostruko negativnim tumorima te je njegova transkripcijska aktivnost pozitivno korelirala s ekspresijom  $\alpha$ - $\beta$  kristalina, inače markerom loše prognoze u toj skupini tumora. U prilog naših rezultata govori i činjenica da je ETS-1 jače ekspimiran u agresivnijim, bazalnim staničnim linijama kao što su MCF-10A (202, 203). Iako se molekularni podtip karcinoma pokazao kao bitan čimbenik koji utječe na preživljenje pacijentica s karcinomom dojke (18), u našoj skupini pacijentica nismo pokazali taj utjecaj. U studiji Parkera i suradnika, istraživanje je provedeno na skupini od 761 pacijentici, a moguće je da su u našem istraživanju dobivene molekularne podgrupe premale da bi imale statistički značajan utjecaj na preživljenje.

U našim rezultatima postoji statistički značajna razlika u pojavi recidiva bolesti kod različitih ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama kod pacijentica s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima. Također, postoji statistički značajna razlika u sveukupnom preživljenju pacijentica s obzirom na ekspresiju ETS-1 u tumorskim stanicama gdje su pacijentice s negativnim nalazom imale bolje preživljenje nego pacijentice s pozitivnim nalazom. Mylona i suradnici su u univarijatnoj analizi pokazali da je nuklearna ekspresija ETS-1 u korelaciji s kraćim sveukupnim preživljenjem postmenopausalnih pacijentica (146). Ekspresija ETS-1 se u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi Spanove studije pokazala kao znatan prognostički čimbenik za DFS. Autori nisu našli nikakvu poveznicu ekspresije proteina s ukupnim preživljenjem, ali su rezultati granični ( $P=0.055$ ). U multivarijatnoj analizi su isti parametri zadržali prognostičku vrijednost s 95% pouzdanosti (137).

Limfociti koji infiltriraju tumor (TIL) jedan su od glavnih imunih mehanizama u eradikaciji malignih stanica međutim nema konsenzusa što se tiče njihove prognostičke vrijednosti za NST karcinom (77, 78). Iako su TIL aktivirani u većini karcinoma dojke, stanično je posredovana imunost očito neadekvatna te karcinom

progresivno raste i širi se, unatoč prisutnosti imunih stanica unutar tumorskog tkiva. Kvantificiranje i kvalificiranje TIL-a u karcinomu dojke u odnosu na progresiju i prognozu još je uvijek stvar rasprave. Prema nekim je autorima infiltrat TIL-a umjereno do jako obilan u oko 60-90% karcinoma dojke. Zbog toga su potrebna dodatna istraživanja u području TIL-a i molekula koje ekspimiraju u svrhu potencijalnih prognostičkih čimbenika. U našim su slučaju limfociti bili prisutni gotovo u svim uzorcima (95%), a semikvantitativnim određivanjem količine limfocita najviše je tumora imalo malo limfocita (oko 50%), umjerenu količinu 33%, te veći broj limfocita oko 10% pacijentica. Nekoliko je studija pokazalo da se infiltrati imunih stanica u tumorskom tkivu sastoji od T i B limfocita, makrofaga i NK stanica međutim omjeri pojedinih subtipova T stanica, kao i količina ostalih, B i NK stanica, razlikuju se od studije do studije (78-81). Gledajući cjelokupnu populaciju limfocita u našim uzorcima, primijetili smo da ekspimiraju ETS-1 u različitom intenzitetu i u različitom postotku. To smo iskoristili za kvantifikaciju pomoću imunohistokemijskog indeksa korelirajući ga s ETS-1 u tumorskim stanicama, ekspresijom gelatinaza te ostalim patohistološkim pokazateljima. Zbog želje za objektivnijom interpretacijom ekspresije proteina u limfocitima te zbog činjenice da postoje brojni oprečni radovi u sastavu limfocitnog infiltrata u tumoru, nismo dijelili populaciju limfocita dodatnim imunohistokemijskim bojenjima na CD3, CD20 i CD56 već smo gledali cjelokupnu populaciju limfocita unutar tumora koja je ekspimirala ETS-1 protein. Uloga ETS-1 u razvoju limfocita je neosporna i za ETS-1 se u samim počecima njegovog istraživanja pokazalo da je ekspimiran u limfocitima i da sudjeluje u njihovoj diferencijaciji (124). Pokazano je da ETS-1 djeluje na ekspresiju brojnih citokina, limfokina i kemokina te je mogućnost njihove regulacije potencijalni uzrok onkogenih učinaka ETS-1 proteina (123). Također, moguće je da ekspresija ETS-1 divljeg ili mutiranog tipa ima negativan učinak na sposobnost imunog sustava u borbi protiv tumora. Ekspresija ETS-1 u limfocitima uzoraka koje smo uključili u studiju, nađena je gotovo u svim uzorcima i to najčešće umjerena ekspresija (52,06%), zatim jaka ekspresija u 22,31% te slaba ekspresija u 20,66% uzoraka. Jača je ekspresija u limfocitima u korelaciji sa slabom ekspresijom ETS-1 u tumorskim stanicama, ali se kod jače ekspresije ETS-1 u tumorskim stanicama ta statistička povezanost gubi. ETS-1 u limfocitima korelira i sa starijom dobi pacijentica, većim tumorima, visokim histološkim gradusom, tumorima s negativnim PR i tumorima s višim proliferacijskim indeksom Ki67. Vidimo da je ETS-1 u limfocitima većinom povezan s tradicionalno lošim prognostičkim čimbenicima. To se potvrdilo i u našoj analizi preživljenja gdje se pokazalo da pacijentice s umjerenom i jakim ekspresijom ETS-1 u limfocitima imaju manju vjerojatnost preživljenja kroz promatrano vrijeme, nego one s negativnom ili slabom ekspresijom. Ovo je, po našim saznanjima, prva studija koja je korelirala ETS-1 u tumor infiltrirajućim limfocitima karcinoma dojke s ostalim patohistološkim pokazateljima te preživljenjem.

Nismo našli podatke u dostupnoj literaturi o korelaciji koekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 s ostalim prognostičkim čimbenicima te utjecaj koekspresije na

preživljenje pacijentica s rakom dojke. Premda ne postoji statistički značajna međusobna povezanost ekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9, vidimo da je većina koekspresija pokazala statistički značajan utjecaj na preživljenje. Posebno važna skupina pacijentica za ocjenu prognostičkih i prediktivnih čimbenika je ona unutar koje pacijentice imaju negativne limfne čvorove jer se u trenutku postavljanja dijagnoze svrstavaju u skupinu pacijentica s povoljnijom prognozom. Na preživljenje pacijentica s negativnim limfnim čvorovima utječe koekspresija MMP-2 i ETS-1 te MMP-9 i ETS-1 unutar epitelnih tumorskih stanica. Osim toga, nađena je ista povezanost koekspresije MMP-9 u tumorskoj stromi i ETS-1 u tumorskim stanicama. Postoji jak utjecaj koekspresije ETS-1, MMP-2 i MMP-9 na OS i DFS u Kaplan-Meierovoj analizi kao i u univarijantnoj logističkoj regresiji kod pacijentica s negativnim i pozitivnim limfnim čvorovima. Navedena koekspresija korelira s veličinom tumora (tumori veći od 2cm), histološkim i nuklearnim gradusom 3 kao i s negativnim ER i PgR. Svi pokazatelji govore u prilog biološki agresivnijih tumora.

Rezultati našeg istraživanja mogu poslužiti u procjeni rizika smrti i povrata bolesti kod pacijentica s karcinomom dojke, posebno kod skupine pacijentica s negativnim limfnim čvorovima. Prema rezultatima ekspresije i koekspresije proteina unutar samih tumorskih epitelnih stanica, izgleda da je za eventualnu kliničku primjenu procjene rizika smrti i povrata bolesti dovoljno određivati samo ekspresiju ETS-1, s obzirom na to da smo pokazali da i minimalna ekspresija ETS-1 unutar tumorskih stanica korelira s lošijim OS i DFS te s većinom tradicionalno loših prognostičkih čimbenika s kojima korelira i koekspresija sva tri proteina. Svakako su potrebna dodatna prospektivna istraživanja koja će vjerojatno moći do kraja definirati njihovu prognostičku i prediktivnu vrijednost. Od gelatinaza je trenutno samo MMP-9 uključena u prognostički i prediktivni test Mammaprint. Postoji vjerojatnost da će se vremenom razvijati i novi lijekovi koji će moći selektivno inhibirati učinak gelatinaza i transkripcijskog čimbenika ETS-1 u karcinomima dojke. Ohrabrujuća je činjenica da se u terapiji karcinoma dojke u novije vrijeme spominju i PARP inhibitori. Legrand i suradnici su otkrili PARP-1 kao novi partnerski protein ETS-1, a PARP-1 inhibitori su uzrokovali akumulaciju DNA ostećenja samo unutar stanica s prekomjernom ekspresijom ETS-1(204). MMP su također, unatoč lošim rezultatima prethodnih istraživanja, i dalje jako zanimljive kao potencijalne mete u antitumorskoj terapiji. Danas su jasniji razlozi zašto je došlo do promašaja u terapiji s inhibitorima MMP-a (133, 135). Jedno od objašnjenja je da su inhibitori upotrebljavani u kasnim stadijima bolesti i da su neselektivno inhibirali MMP-e. Isto se tako zna da većina gelatinaza nema isti mehanizam djelovanja, a nisu opisane ni u istim fazama tumorskog rasta (99). U uporabi je oko 50-tak anti-MMP lijekova koji se istražuju u pretkliničkim i animalnim modelima te oko 15 u kliničkim fazama istraživanja 1-3, od kojih je desetak u antitumorskoj terapiji (205). Nadamo se da će buduća istraživanja dovesti do efektivnih molekula koje će biti osnova novih bioloških terapija s mogućnošću inkorporacije u postojeće protokole liječenja invazivnog karcinoma dojke.

## 6. ZAKLJUČAK

1. U populaciji pacijentica uključenih u istraživanje s invazivnim NST karcinomom dojke, ekspresija ETS-1 unutar tumorskih stanica i tumor-infiltrirajućih limfocita, kao i koekspresija ETS-1 i gelatinaza unutar tumorskih stanica je povezana s biološki agresivnijim pokazateljima i kraćim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez znakova bolesti.
2. Rezultati Kaplan-Meier analize i univarijatne logističke regresije su se djelomično potvrdili i u multivarijatnoj analizi, u kojoj su se koekspresija ETS-1 i MMP-2 u tumorskim stanicama te tumor veći od 2 cm pokazali kao statistički značajnim pokazateljima preživljenja.
3. Općenito, nismo našli povezanost ekspresije ETS-1 s gelatinazama, osim s negativnim nalazom MMP-2 u stromalnim stanicama. Ekspresija MMP-2 u stromi je također negativno korelirala sa veličinom tumora, što su dva primjera negativne korelacije MMP-2 u stromalnim stanicama s čimbenicima koji se općenito smatraju lošim pokazateljima u tumorima dojke.
4. Nismo našli utjecaj ekspresije gelatinaza unutar tumorskih stanica na preživljenje, ali u kombinaciji sa ekspresijom ETS-1 rezultati dobivaju statističku značajnost.
5. S obzirom da ekspresija ETS-1 u tumorskim stanicama korelira s većinom pokazatelja kao i koekspresija sva tri proteina unutar tumorskih stanica, čini se da bi za eventualnu kliničku primjenu procjene prognoze bolesti bilo dovoljno određivati ekspresiju ETS-1 unutar tumorskih stanica.
6. Rezultati našeg istraživanja mogu poslužiti za izdvajanje one skupine pacijentica koja bi imala korist od agresivnijeg adjuvantnog liječenja, pogotovo u skupini pacijentica sa negativnim limfnim čvorovima.

## 7. LITERATURA:

1. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of tumours of the breast. 4. izd. Lyon: IARC Press; 2012.
2. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol* 2005;16:481-8.
3. Ferlay J, Hery C, Autier P. Global burden of breast cancer. U: Li CI, ur. *Breast cancer epidemiology*. New York: Springer; 2010, str. 1-19.
4. American Cancer Society. *Global cancer, facts and figures*. 2. izd. Atlanta: American Cancer Society; 2008, str 11-12., dostupno na <http://www.cancer.org>.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak, 2010, dostupno na <http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm>.
6. Hrvatski Zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012 godinu. 2012, dostupno na [http://www.hzjz.hr/publikacije/00\\_2012\\_WEB.pdf](http://www.hzjz.hr/publikacije/00_2012_WEB.pdf).
7. Duffy SW. *Epidemiology of female breast cancer*. U: Michelle M, ur. *Breast cancer*. New York: Cambridge University Press; 2010, str. 1-12.
8. Phipps AI, Li CI. *Breast Cancer Biology and Clinical Characteristics*. U: Li CI, ur. *Breast cancer epidemiology*. New York: Springer; 2010, str. 21-46.
9. Willett WC, Tamimi RM, Hunter DJ, Colditz GA. Nongenetic factors in the causation of breast cancer. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 248-290.
10. Strnad M, Hrabak-Žerjavić V, Šamija M. *Epidemiologija, prevencija i rano otkrivanje raka dojke*. U: Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V i sur., ur. *Tumori dojke*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 27-39.
11. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. *Epidemiology of breast cancer*. *Lancet Oncol* 2001;2:133–40.
12. Palcios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. *Pathobiology* 2008;75:85-94.
13. Honrado E, Benitez J, Palacios J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005;18:1305–20.
14. Tachendorff AF, Caldas C. The breast cancer somatic mutation: taking the complexity. *Breast Cancer Res* 2009;11:301-305.
15. Poola I, Shokrani B, Bhatnagar R, DeWitty RL, Yue Q, Bonney G. Expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 oncoprotein in atypical ductal hyperplastic tissues is associated with the development of invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:4773–83.
16. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *American Joint Committee On Cancer: AJCC Cancer staging manual*. 7. izd. Chicago: Springer; 2010, str. 345-377.
17. Ogino S, Fuchs SC, Giovannucci E. How many molecular subtypes? Implications of the unique tumor principle in personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn*



- 2012;12:621–628.
18. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU i sur. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27:1160–67.
  19. Smith RA, D'Orsi C, Newell MS. Screening of breast cancer. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 87-115.
  20. Gøtzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. 2. izd. Nordic Cochrane center: 2012, dostupno na <http://www.cochrane.dk>.
  21. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009;151:716-26.
  22. Butler JA, Vargas HI, Worthen N, Wilson SE. Accuracy of combined clinical-mammographic-cytologic diagnosis of dominant breast masses. A prospective study. *Arch Surg* 1990;125:893-6.
  23. Scott S, Morrow M. Breast cancer: Making the diagnosis. *Surg Clin N Am* 1999;79:991-1005.
  24. Winchester DP. Physical examination of the breast. *Cancer* 1992;69:1974-9.
  25. McKenna RJ Sr, Greene P, Winchester DP i sur. Breast self-examination and breast physical examination. *Cancer* 1992;69:2003-4.
  26. Nystrom L, Anderson I, Bjurstam N, Frisell J, Nordenskjold B, Rutquist LE. Long-term effects of mammography screening: updated overview of the Swedish randomised trials. *Lancet* 2002;359:909-919.
  27. Burnside ES, Sickles EA, Bassett LW i sur. The ACR BI-RADS Experience: Learning From History. *J Am Coll Radiol* 2009;6:851–860.
  28. Ciatto S, Houssami N, Bernardi D i sur. Integration of 3D digital mammography with tomosynthesis for population breast-cancer screening (STORM): a prospective comparison study. *Lancet Oncol* 2013;14:583–89.
  29. Crystal P, Strano SD, Shcharynski S, Koretz MJ. Using sonography to screen women with mammographically dense breasts. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:177-182.
  30. Cortesi L, Turchetti D, Marchi I i sur. Breast cancer screening in women at increased risk according to different family histories: an update of the Modena Group experience. *BMC Cancer* 2006;6:210.
  31. Popiela TJ, Kibil W, Herman-Sucharska I, Urbanik A. The use of magnetic resonance mammography in women at increased risk for developing breast cancer *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne* 2013;8:55-62.
  32. Bedrosian I, Mick R, Orel SG. Changes in the surgical management of patients with breast carcinoma based on preoperative magnetic resonance imaging. *Cancer* 2003;98:468-473.
  33. Morrow M. Magnetic resonance imaging in preoperative evaluation of breast cancer: primum non nocere. *J Am Coll Surg* 2004;198:468-473.
  34. Morrow M. Magnetic resonance imaging in breast cancer: is seeing always believing? *Eur J Cancer* 2005;41:1368-69.

35. Saslow D, Boetes C, Burke W. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *Ca Cancer J Clin* 2007;57:75-89.
36. Funovics MA, Philipp MO, Lackner B, Fuchsjaeger M, Funovics PT, Metz M. Galactography: method of choice in pathologic nipple discharge? *Eur Radiol* 2003;13:94-99.
37. Lamont JP, Rachel P, Dultz RP, Kuhn JA, Grant MD. Galactography in patients with nipple discharge. *Proc(Bayl Univ Med Cent)* 2000;13:214-216.
38. Yu YH, Wei W, Liu JL. Diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy for breast mass: a systematic review and meta analysis. *BMC Cancer* 2012;12:41.
39. Willems SM, Van Deurzen CHM, Van Diest PJ. Diagnosis of breast lesions: fine-needle aspiration cytology or core needle biopsy? A review. *J Clin Pathol* 2012;65:287-292.
40. Pilgrim S, Ravichandran D. Fine needle aspiration cytology as an adjunct to core biopsy in the assessment of symptomatic breast carcinoma. *The Breast* 2005;14:411-414.
41. Agarwal T, Patel B, Rajan P, Cunningham DA, Darzi A, Hadjiminias DJ. Core biopsy versus FNAC for palpable breast cancers. Is image guidance necessary? *Eur J Cancer* 2003;39:52-56.
42. Evers K. Image-guided biopsy of nonpalpable breast lesion. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 193-205.
43. Andreu FJ, Saez A, Sentis M i sur. Breast core biopsy reporting categories—An internal validation in a series of 3054 consecutive lesions. *The Breast* 2007;16:94-101.
44. Freedmann MT. Imaging: New Techniques. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 171-192.
45. Šeparović V, Knežević F, Kosanović S i sur. *Patologija tumora dojke*. U: Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V i sur., ur. *Tumori dojke*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 113-261.
46. Chang CJ, Hilsenbeck SG. Prognostic and Predictive Markers. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str.443-457.
47. Colozza M, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccard MJ. Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic. *Clinical Breast Cancer* 2005;6:61-76.
48. Yarden Y. The Biological Framework: Translational research from Bench to Clinic. *The Oncologist* 2010;15:8-17.
49. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 2004;9:606-16.
50. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D i sur. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
51. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer.I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term

- follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
52. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R i sur. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1656–64.
  53. De Azambuja E , Cardoso F, de Castro G Jr i sur. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 2007;96:1504-13.
  54. Van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004;57:675-681.
  55. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. *Breast Cancer Res* 2006;8:216.
  56. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA i sur. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:773–81.
  57. Knight WAI, Livingstone RB, Gregory EJ, McGuire WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977;37:4669-71.
  58. Clark GM, Mc Guire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988;15:20-4.
  59. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG i sur. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res* 2004;10:2751–60.
  60. De Vivo I, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the progesterone receptor gene is associated with an increase in breast cancer risk. *Cancer Res* 2003;63:5236–8.
  61. Ghayad S. Steroid receptors and associated 9 transcriptional cofactors in predicting the response to endocrine therapy. U: Walker RA, Thompson AM, ur. Prognostic and predictive factors in breast cancer. 2. izd. London: Informa; 2008, str. 108-121.
  62. Clark GM. Interpreting and integrating risk factors for patients with primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;30:17-21.
  63. Duffy MJ. Estrogen receptors: role in breast cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006;43:325-47.
  64. Zoon CK, Starker EQ, Wilson AM, Emmert-Buck MR, Libutti SK, Tangrea MA. Current molecular diagnostics of breast cancer and the potential incorporation of microRNA. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9:455–67.
  65. Ross JE, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3:237-252.
  66. Stern DF. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res* 2000;2:176-83.
  67. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548-57.
  68. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA i sur. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene

- in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707–12.
69. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP i sur. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 2003;8:307–325.
70. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005;5:341-354.
71. Zwick E, Wallash C, Ullrich A. HER2/neu: target for breast cancer therapy. *Breast Disease* 2000;11:7-18.
72. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:2334-56.
73. Epstein M, Ma Y, Press MF. ERBB2 Testing: Assessment of Status for Targeted Therapies. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 431-442.
74. Nelson NJ. Experts debate value of HER2 testing methods. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:292-94.
75. Jakić-Razumović J. Prognostic value of HER-2/neu in breast carcinoma patients. *Acta Clin Croat* 2002;41:145-148.
76. Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F i sur. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIa expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res and Treat* 1999;55:61-71.
77. Valdivia-Silva J. Novel insights into the role of inflammation in promoting breast cancer development. U: Gunduz M, Gunduz E, ur. *Breast cancer - focusing tumor microenvironment, stem cells and metastasis*. Rijeka: In tech; 2011, str. 129-164.
78. Macchetti AH, Marana HR, Silva JS, de Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S. Tumor-infiltrating CD4 T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics* 2006;61:203-8.
79. Gisterek I, Frydecka I, Swiatoniowski G, Fidler S, Kornafel J. Tumour-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Rep Pract Oncol Radiother* 2008;13:205-208.
80. Marsigliante S, Biscozzo L, Marra A i sur. Computerised counting of tumour infiltrating lymphocytes in 90 breast cancer specimens. *Cancer Lett* 1999;139:33-41.
81. Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N i sur. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett* 2006;102:229-36.
82. Schmitt M, Mengele K, Gkazepis A i sur. Assessment of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Breast Cancer Tissue: Historical Aspects and Future Prospects. *Breast Care* 2008;3:3–10.
83. Duffy MJ. Proteases as a prognostic marker in cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:613-618.
84. Harbeck N, Schmitt M, Paepke S. Tumor - associated proteolytic factors uPA and PAI- 1: Critical appraisal of their clinical relevance in breast cancer and their integration into decision - support algorithms. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2007;44:179-201.

85. Pedersen AN, Christensen IJ, Stephens RW, Briand P, Mourdisen HT, Dano K. The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer: relation to survival. *Cancer Res* 2000;60:6927-34.
86. Radisky ES. Cathepsin D, regulation in mammary gland remodeling, misregulation in breast cancer, cancer. *Cancer Biol Ther* 2010;10:467-70.
87. Woessner FJ. The matrix metalloproteinase family. U: Parks WC, Mecham RP, ur. *Matrix metalloproteinases, Biology of extracellular matrix series*. San Diego: Academic press; 1998, str.1-13.
88. Puente XS, Sanchez LM, Overall CM, Lopez-Otin C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 2003;4:544-558.
89. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:1362-78.
90. Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 2004, 48:411-24.
91. Somerville R, Oblander S, Apte S. Matrix metalloproteinases : old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003;4:216.
92. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research* 2006;69:562-73.
93. Alaaho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005;87: 273–86.
94. Oh J, Takahashi R. The Membrane-Anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001;107:789–800.
95. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719–27.
96. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–839.
97. Liotta LA, Tryggvasson K, Garbisa S, Hart I, Fottz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagene. *Nature* 1980;248:67-68.
98. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* 1993;9:541–73.
99. Chabottaux V, Noel A. Breast cancer progression: insights into multifaceted matrix metalloproteinases. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:647–656.
100. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7:14-23.
101. Niemiec J, Adamczyk A, Małecki K, Ambicka A, Ryś J. Tumor grade and matrix metalloproteinase 2 expression in stromal fibroblasts help to stratify the high-risk group of patients with early breast cancer identified on the basis of st Gallen recommendations. *Clin Breast Cancer* 2013;13:119-28.

102. Espinosa Neira R, Salazar EP. Native type IV collagen induces an epithelial to mesenchymal transition-like process in mammary epithelial cells MCF10A. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:2194-203.
103. Thiennu H. Gelatinase B. U: Parks WC, Mecham RP, ur. *Matrix metalloproteinases, Biology of extracellular matrix series*. San Diego: Academic press; 1998, str.115-137.
104. Yu AE, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG. 72 kDa Gelatinase, structure, activation, regulation and substrate specificity. U: Parks WC, Mecham RP, ur. *Matrix metalloproteinases, Biology of extracellular matrix series*. San Diego: Academic press; 1998, str. 85-106.
105. Djonov V, Cresto N, Aebersold DM i sur. Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *Int J Oncol* 2002;21:25–30.
106. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000;2:252–7.
107. Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, Her2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:7621–8.
108. Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V i sur. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:171-8.
109. Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 2004;25:1543-9.
110. Szabo KA, Singh G. Modulation of monocyte matrix metallo-proteinase-2 by breast adenocarcinoma cells. *Br Cancer Res* 2005;7:661–8.
111. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:37–43.
112. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Blanco-Sequeiro G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001;65:55-61.
113. Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:1270-5.
114. Li HC, Cao DC, Liu Y i sur. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88:75-85.
115. Daidone MG, Silvestrini R, D'Errico A i sur. Laminin receptors, collagenase IV and prognosis in node-negative breast cancers. *Int J Cancer* 1991;48:529–532.

116. Scorilas A, Karameris A, Arnogiannaki N i sur. Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favorable indicator in node-negative patients. *Br J Cancer* 2001;84:1488-96.
117. Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N. Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 2006;28:487-96.
118. Zhao X, Benveniste EN. Transcriptional activation of human matrix metalloproteinase-9 gene expression by multiple co-activators. *J Mol Biol* 2008;383:945–956.
119. Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003;303:11-34.
120. Seth A, Watson DK. Ets transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2462-78.
121. Dittmer J. The Biology of the Ets1 Proto-Oncogene. *Mol Cancer* 2003;2:29.
122. Buggy Y, Maguire TM, McGreal G i sur. Overexpression of the Ets-1 transcription factor in human breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91:1308-15.
123. Russell L, Garrett-Sinha LA. Transcription factor Ets-1 in cytokine and chemokine gene regulation. *Cytokine* 2010;51:217–226.
124. Chen JH. The protooncogene c-ets is preferentially expressed in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1985;5:2993-3000.
125. Koskela K, Lassila O. Single-cell analysis of Ets-1 transcription factor expression during lymphocyte activation and apoptosis. *Scand J Immunol* 2003;57:56-61.
126. John SA, Clements JL, Russell LM, Garrett-Sinha LA. Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem* 2008;283:951–62.,
127. Eyquem S, Chemin K, Fasseu M i sur. The development of early and mature B cells is impaired in mice deficient for the Ets-1 transcription factor. *Eur J Immunol* 2004;34:3187–96.
128. Bories JC, Willerford DM, Grevin D i sur. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* 1995;377:635–8.
129. Walunas TL, Wang B, Wang CR, Leiden JM. Cutting edge: the Ets1 transcription factor is required for the development of NK T cells in mice. *J Immunol* 2000;164: 2857–60.
130. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;90:127-56.
131. Xu D, Wilson TJ, Chan D i sur. Ets1 is required for p53 transcriptional activity in UV-induced apoptosis in embryonic stem cells. *EMBO J* 2002;21:4081-93.
132. Li R, Pei H, Watson DK. Regulation of Ets function by protein–protein interactions. *Oncogene* 2000;19:6514–23.

133. Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. Ets proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2004;91:896–903.
134. Benz CC, O'Hagan RC, Richter B i sur. HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* 1997;15:1513–25.
135. Feldman RJ, Sementchenko VI, Gayed M, Fraig MM, Watson DK. Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res* 2003;63:4626–31.
136. Chotteau-Lelievre A, Revillion F, Lhotellier V i sur. Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004;10:7297–7303.
137. Span PN, Manders P, Heuvel JJ i sur. Expression of the transcription factor Ets-1 is an independent prognostic marker for relapse-free survival in breast cancer. *Oncogene* 2002;21:8506–09.
138. Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, Wernert N. The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* 2001;194:43–50.
139. Park YH, Jung HH, Ahn JS, Im YH. Ets-1 upregulates HER2-induced MMP-1 expression in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:389–94.
140. Katayama S, Nakayama T, Ito M, Naito S, Sekine I. Expression of the ets-1 proto-oncogene in human breast carcinoma: differential expression with histological grading and growth pattern. *Histol Histopathol* 2005;20:119–126.
141. Lindemann RK, Ballschmieter P, Nordheim A, Dittmer J. Transforming growth factor b regulates parathyroid hormone-related protein expression in MD-MB-231 breast cancer cells through a novel Smad/Ets synergism. *J Biol Chem* 2001;276:46661–70.
142. Kars MD, Iseri OD, Gunduz U. Drug resistant breast cancer cells overexpress ETS1 gene. *Biomed Pharmacother* 2010;64:458–462.
143. Oda N, Abe M, Sato Y. ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* 1999;178:121–32.
144. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996;169:522–531.
145. Sementchenko VI, Watson DK. Ets target genes: past, present and future, *Oncogene* 2000;19:6533–48.
146. Mylona EE, Alexandrou PT, Giannopoulou IA i sur. Study of the topographic distribution of ets1 protein expression in invasive breast carcinomas in relation to tumor phenotype. *Cancer Detect Prev* 2006;30:111–117.
147. Watabe T, Yoshida K, Shindoh M i sur. The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int J Cancer* 1998;77:128–137.



148. Laitem C, Leprivier G, Choul-Li S. Ets-1 p27: a novel Ets-1 isoform with dominant-negative effects on the transcriptional properties and the subcellular localization of Ets-1 p51. *Oncogene* 2009;28:2087-99.
149. Walerych D, Napoli M. The rebel angel : mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 2012;33:2007-17.
150. Chen Y, Olopade OI. MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1689–98.
151. Perez EA, Jenkins RB, Dueck AC i sur. C-MYC alterations and association with patient outcome in early-stage HER2-positive breast cancer from the north central cancer treatment group N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol* 2011;29:651-9.
152. Liao DJ, Dickson RB. C-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2000;7:143-164.
153. Nadler Y, Camp RL, Giltnane JM i sur. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10:R35.
154. Van Diest PJ. Prognostic value of proliferation and apoptosis in breast cancer. U: Walker RA, Thompson AM, ur. *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. 2. izd. London: Informa; 2008, str. 18-37.
155. Pusztai L. Gene expression profiles, prognosis and prediction of responses to endocrine therapy and chemotherapy. U: Walker RA, Thompson AM, ur. *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. 2. izd. London: Informa; 2008, str. 139-147.
156. Tsoi DT, Inoue M, Kelly CM, Verma S, Pritchard KI. Cost-effectiveness analysis of recurrence score-guided treatment using a 21-gene assay in early breast cancer. *Oncologist* 2010;15:457–65.
157. Paik S, Shak S, Tang G i sur. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
158. Turaga K, Acs G, Laronga C. Gene expression profiling in breast cancer. *Cancer Control* 2010;17:177-82.
159. Vrdoljak DV, Juzbašić S, Mužina D i sur. *Kirurgija tumora dojke*. U: Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V i sur., ur. *Tumori dojke*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 263-290.
160. Golsham M. *Mastectomy*. U: Harris JR, ur. *Diseases of the breast*. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 501-506.
161. Martin MA, Meyricke R, O'Neill T, Roberts S. Mastectomy or breast conserving surgery? Factors affecting type of surgical treatment for breast cancer - a classification tree approach. *BMC Cancer* 2006;6:98.
162. Nissen MJ, Swenson KK, Ritz LJ, Farrell JB, Sladek ML, Lally RM. Quality of life after breast carcinoma surgery: a comparison of three surgical procedures. *Cancer* 2001;91:1238-46.
163. Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Ugeskr Laeger* 1955;117:822-3.

164. Rimawi MF. Adjuvant Systemic Therapy: Endocrine Therapy. U: Harris JR, ur. Diseases of the breast. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 610-630.
165. National Comprehensive Cancer Network. Practice Guidelines in Oncology - Breast Cancer, V.3.2013. dostupno na <http://www.nccn.org>.
166. Mayer EL. Adjuvant Systemic Therapy: Chemotherapy. U: Harris JR, ur. Diseases of the breast. 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010, str. 631-644.
167. Clark M, Collins R, Darby S i sur. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-717.
168. Yarden Y. The Biological Framework: Translational Research from Bench to Clinic. *The Oncologist* 2011;16:23-29.
169. Giani L. The „other“ signaling of trastuzumab: antibodies are imunocompetent drugs. *J Clin Oncol* 2008;11:1778-80.
170. Mc Keage K, Perry CM. Trastuzumab. *Drugs* 2002;62:20-24.
171. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S i sur. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER 2 for metastatic breast cancer that overeypress HER-2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
172. Piccard-Gebhard MJ, Procter M, Leyland-Jones B i sur. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005;353:1659-72.
173. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P i sur. Adjuvant docetaxel or vinorelbin with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-820.
174. Perez EA, Romoned EH, Suman VJ. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2011;29:3366-73.
175. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tributions. *Science* 2002;295:2387–92.
176. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002;2:657–672.
177. Hirata H, Ueno K, Shahryari V i sur. Oncogenic miRNA-182-5p Targets Smad4 and RECK in Human Bladder Cancer. *PLoS One* 2012;7:e51056.
178. De Marzo A, Fedor H. Tissue Microarrays at Johns Hopkins; 2010. dostupno na <http://apps.pathology.jhu.edu/blogs/pathology/tissue-microarrays>.
179. Međunarodna konferencija o raku dojke. St. Gallen 2007.
180. Harris L, Fritsche H, Mennel R i sur. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287.
181. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.

182. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* 2009;9:188.
183. Bendrik C, Robertson J, Gauldie J, Dabrosin C. Gene transfer of matrix metalloproteinase-9 induces tumor regression of breast cancer in vivo. *Cancer Res* 2008;68:3405-12.
184. Okuducu AF, Okuducu AF, Zils U, Michaelis SA, Mawrin C, von Deimling A. Increased expression of avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 in World Health Organization grade 1 meningiomas is associated with an elevated risk of recurrence and is correlated with the expression of its target genes matrix metalloproteinase-2 and MMP-9. *Cancer* 2006;107:1365-72.
185. Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P i sur. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 77:145-55.
186. Kim JH , Park CI. Expression of MT-1MMP, MMP2, MMP9 and TIMP2 mRNAs in ductal Carcinoma in situ and invasive Ductal Carcinoma of the breast. *Yonsei Med J* 2006;47:333-42.
187. Maatta M, Soini Y, Lliakka A, Autio-Hermainen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: Implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res* 2000;6:2726-34.
188. Jones JL, Glynn P, Walker RA. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol* 1999;189:161-168.
189. Rhako E, Jukkola A, Melkko J. Matrix metalloproteinase-9 (MMP- 9) immunoreactive protein has modest prognostic value in locally advanced breast carcinoma patients treated with an adjuvant antiestrogen therapy. *Anticancer Res* 2004;24:4247-54.
190. Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T1-2N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77:85– 91.
191. Fan SQ, Wei QY, Li MR, Zhang LQ, Liang QC. Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in breast carcinoma. *Ai Zheng* 2003;22:968-73.
192. González LO, Corte MD, Junquera S i sur. Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:1224-33.
193. Caudroy S, Polette M, Tournier JM, Burlet H, Toole B, Zucker S, Birembaut P. Expression of the extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and the matrix metalloproteinase-2 in bronchopulmonary and breast lesions. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1575-80.
194. Xu J, Lu Y, Qiu S, Chen ZN, Fan Z. A novel role of EMMPRIN/CD147 in transformation of quiescent fibroblasts to CAF by breast cancer cells. *Cancer Lett* 2013;335:380-386.

195. Ogura S, Ohdaira T, Hozumi Y, Omoto Y, Nagai H. Metastasis-related factors expressed in pT1 pN0 breast cancer: assessment of recurrence risk. *J Surg Oncol* 2007;96:46-53.
196. Wernert N, Gilles F, Fafeur V i sur. Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res* 1994;54:5683-88.
197. Vandebunder B, Queva C, Desbiens X, Wernert N, Stehelin D. Expression of the transcription factor c-Ets-1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion Metastasis* 1994–1995; 14:198–209.
198. Myers E, Hill AD, Kelly G i sur. Associations and interactions between Ets-1 and Ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2111–22.
199. Dittmer J, Vetter M, Blumenthal SG, Lindemann RK, Kölbl H. Importance of ets1 proto-oncogene for breast cancer progression. *Zentralbl Gynakol* 2004;126:269-71.
200. Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brünner N, Thompson EW. Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1997;15:519-26.
201. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010;141:52–67.
202. Bosman JD, Yehiely F, Evans JR, Cryns VL. Regulation of alphaB-crystallin gene expression by the transcription factor Ets1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:63-70.
203. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F i sur. Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogenomics* 2006;25:2273-84.
204. Legrand AJ, Choul-Li, Spriet C i sur. The level of Ets-1 protein is regulated by poly (ADP-Robose) polimerase -1 (PARP-1) in cancer cells to prevent DNA damage. *PLoS One* 2013;8:e55883.
205. Fingleton B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Curr Pharm Des* 2007;13:333-46.

## 8. SAŽETAK

Cilj je istraživanja odrediti ekspresiju i koekspresiju ETS-1, MMP-2 i MMP-9 u uzorcima invazivnih karcinoma dojke te zaključiti o njihovoj mogućoj prognostičkoj vrijednosti kod pacijentica. Ekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 je imunohistokemijski analizirana TMA metodom u uzorcima karcinoma dojke 121 pacijentice koje su operirane na KBC Zagreb tijekom 2002. g. Izraženost ETS-1, MMP-2 i MMP-9 je uspoređena međusobno te s ostalim kliničko-patološkim parametrima. Na temelju dostupnih kliničkih podataka napravili smo analizu preživljenja.

ETS-1 je bio pozitivan u jezgrama i citoplazmama tumorskih epitelnih stanica, ali i u limfocitima, endotelu krvnih žila te u fibroblastima. MMP-2 i MMP-9 su pokazale pozitivnost u citoplazmi tumorskih epitelnih i stromalnih stanica. Za našu smo analizu koristili ekspresiju ETS-1 unutar tumorskih stanica (56,2% uzoraka) te u tumorskim limfocitima (95% uzoraka). MMP-2 i MMP-9 su bile pozitivne u tumorskim epitelnim stanicama 77,7%, odnosno 90% tumora dok je njihova stromalna pozitivnost prikazana u 80%, odnosno 65% tumora. ETS-1 je u tumorskim stanicama korelirao s veličinom tumora, histološkim gradusom, steroidnim receptorima te molekularnim tipom tumora. Ekspresija ETS-1 u limfocitima je korelirala s veličinom tumora, histološkim i nuklearnim gradusom, steroidnim receptorima te Ki67. Samo se jedna korelacija ekspresije gelatinaza s drugim patohistološkim pokazateljima pokazala statistički značajna, a to je negativna korelacija MMP-2 u stromi i veličina tumora. Koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 je prisutna u 40,5% tumora, češće u tumorima većim od 2 cm, većeg histološkog gradusa, kao i u ER i PgR negativnim tumorima. Nije bilo statistički značajne povezanosti koekspresije s pozitivnim limfnim čvorovima, HER2 statusom i Ki67. Statistički značajan negativan utjecaj na OS i DFS je nađen kod tumora s ekspresijom ETS-1 te kod tumora s koekspresijom ETS-1, MMP-2 i MMP-9.

Naši rezultati sugeriraju da ekspresija ETS-1 unutar tumorskih stanica i limfocita, kao i koekspresija ETS-1, MMP-2 i MMP-9 unutar tumorskih stanica, može poslužiti kao loš prognostički čimbenik kod pacijentica s karcinomom dojke.

Ključne riječi: rak dojke, ETS-1, MMP-2, MMP-9, transkripcijski čimbenici, prognostički čimbenici.

## 9. SUMMARY

The aim of this study was to analyse expression of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 and their possible prognostic value in breast carcinoma patients. The expression of MMP-2, MMP-9 and ETS-1 was immunohistochemically analysed using TMA method in 121 consecutive primary breast carcinoma patients who underwent surgery at the Clinical Hospital Centre Zagreb during 2002. ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expressions and co-expressions were correlated with other clinico-pathological parameters and based on the available clinical follow up data, survival analysis was performed.

The ETS-1 protein is found to be expressed in tumour cells nuclei and cytoplasm as well as in stromal lymphocytes, fibroblasts and endothelial cells. MMP-2 and MMP-9 were found to be expressed in cytoplasm of both, tumour and stromal cells. For our analysis we used ETS-1 expression in tumour cells (56,2%) as well in tumour infiltrating lymphocytes (95%). MMP-2 and MMP9 were positive in tumour epithelial cells of 77,7% and 90% of tumours, while they were positive in stromal cells of 80% and 65% of patients, respectively.

ETS-1 expression in tumour cells and TIL was correlated with tumour size and grade, receptors expression as well with tumour molecular type. ETS-1 in TIL also correlated with higher nuclear grade and Ki67 proliferation index. As for the expression of gelatinases, only stromal MMP-2 negatively correlated with tumour size. The observed MMP-2, MMP-9 and ETS-1 co-expression was found in 40,5 % of tumour cells, more common in tumours larger than 2 cm, grade III, as well as ER and PgR negative tumours. Statistically significant negative impact on OS and DFS was found in patients with ETS-1 expression an co-expression of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 in tumour cells. There was no statistically significant association between ETS-1, MMP-2 and MMP-9 co-expression with positive lymph nodes, HER2 positivity and higher proliferation index.

These results suggest that expression of ETS-1 as well as MMP-2, MMP-9 and ETS-1 co-expression might be used as a poor prognostic factor in breast cancer patients.

Key words: breast cancer, ETS-1, MMP-2, MMP-9, transcription factors, prognostic factors.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Dubrovniku 1982. g. gdje sam završio Osnovnu školu i Gimnaziju. 2000. g. upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu koji i završavam 2006. g. s prosjekom ocjena 4,34. Od 2003. g. sam korisnik stipendije Sveučilišta u Zagrebu, a 2004. g. sam dobitnik Rektorove nagrade za studentski rad "Utjecaj pentadekapeptida BPC-157 na tupu ozljedu mišića kod štakora", pod vodstvom prof.dr.sc. Predraga Sikirića. Do rujna 2007. g. radim kao pripravnik u Općoj bolnici Dubrovnik, a iste godine na Sveučilištu u Splitu upisujem poslijediplomski znanstveni studij "Biologija novotvorina". Tijekom 2008. i 2009. g. radim kao asistent na razvojnom radnom mjestu Sveučilišta u Dubrovniku u Laboratoriju za molekularne bioznanosti. 2009. g. se zapošljam u Općoj bolnici Dubrovnik kao specijalizant patološke anatomije. U siječnju 2010. g. dolazim na KBC Zagreb u sklopu programa specijalizacije pod vodstvom mentorice, prof.dr.sc. Jasminke Jakić-Razumović. Poslijediplomski specijalistički studij iz patologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završavam 2010/2011. g. Specijalistički sam ispit položio u prosincu 2013. g. Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva patologa i sudskih medicinara. Aktivno se koristim talijanskim i engleskim jezikom. Otac sam jednog djeteta.