Prognostičko značenje ekspresije proteina Cox-2 u bolesnica s rakom dojke

Milas, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:944693

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Središnja medicinska knjižnica

Milas, Ivan (2005) *Prognostičko značenje ekspresije proteina Cox-2 u bolesnica s rakom dojke.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

http://medlib.mef.hr/161

University of Zagreb Medical School Repository

http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

IVAN MILAS

PROGNOSTIČKO ZNAČENJE EKSPRESIJE PROTEINA Cox-2 U BOLESNICA S RAKOM DOJKE

Doktorska disertacija

Zagreb, 2005.

Ovaj je rad izrađen u Klinici za tumore i u Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. Božene Šarčević

Želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. Boženi Šarčević za svu pomoć, podršku te savjete i kolegijalan odnos pri izradi ovog rada.

Hvala svima koji su na bilo koji način pomogli pri izradi ovog rada.

SADRŽAJ **Str.**

1. UVOD **1**

1. 1. Rak dojke 1

1. 2. Podjela tumora dojke 2

1.2.1. Dobroćudni epitelni tumori 3

1.2.1.1.Intraduktalni papilom 3

1.2.1.2.Adenom bradavice 3

1.2.1.3.Ostali adenomi 3

1.2.2. Zloćudni epitelni tumori 3

1.2.2.1. Neinfiltrirajući zloćudni epitelni tumori 5

1.2.2.2. Infiltrirajući zloćudni epitelni tumori 5

1.2.2.2.1. Invazivni duktalni karcinom (NST, NOS) 5

1.2.2.2.2.. Invazivni lobularni karcinom 7

1.2.2.2.3. Tubularni karcinom 8

1.2.2.2.4. Invazivni kribriformni karcinom (IKK) 9

1.2.2.2.5. Medularni karcinom 9

1.2.2.2.6. Mucinozni karcinom 9

1.2.2.2.7. Neuroendokrini tumori 10

1.2.2.2.8. Papilarni karcinom 10

1.2.2.2.9. Invazivni mikropapilarni karcinom 11

1.2.2.2.10. Apokrini karcinom 11

1.2.2.2.11. Karcinom s metaplazijom 11

1.2.2.2.12. Karcinom bogat lipidima 12

1.2.2.2.13. Sekretorni (juvenilni) karcinom 12

1.2.2.2.14. Onkocitni karcinom 12

1.2.2.2.15. Adenoidni cistični karcinom 13

1.2.2.2.16.Inflamatorni karcinom (IK) 13

1. 3. Određivanje kliničkog stadija raka dojke 13

1. 4. Prognostčki čimbenici kod raka dojke 17

1.4.1. Stanje limfnih čvorova 17

1.4.2. Veličina tumora 18

1.4.3. Histološki gradus 19

1.4.4. Histološki tip 21

1.4.5. Limfovaskularna invazija 21
1.4.6. Nekroza 22
1.4.7. Reakcija strome 22
1.4.8. Limfoplazmocitna infiltracija strome 23
1.4.9. Angiogeneza 23
1.4.10 Perineuralna invazija (PNI) 23
1.4.11. Obim intraduktalne komponente 24
1.4.12. Hormonski receptori 24
1.4.13. Molekularni biljezii 25
1.4.13.1. Receptori čimbenika rasta tip I (EGF receptori) 25
1.4.13.2. Tumor-supresorski geni 28
1.4.13.3. Ostali čimbenici 28
1.4.14. Proliferacijska aktivnost 32
1.4.15. Morfometrija jezgre 32
1.4.16. Cox-2 33
1. 5. Liječenje i prognoza karcinoma dojke 34
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 39
3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA 40
3.1. Bolesnice i materijal 40
3.2. Imunohistokemija 40
3.3. Protočna citometrija 41
3.4. Statistička obrada podataka 42
4. REZULTATI 43
4.1. Analiza kliničkih i laboratorijskih podataka u odnosu na histološku diferenciranost tumora 43
4.2. Analiza kliničkih i laboratorijskih podataka u odnosu na izražajnost Cox-2 u tumorima 56
4.3. Kaplan-Meierova analiza dobivanja metastaza 59
4.4. Kaplan-Meierova analiza preživljenja 69
4.4.1. Ukupno preživljenje 69
4.4.2. Preživljenje u odnosu na prognostičke čimbenike 70
4.5. Multivarijantna analiza preživljenja – Coxov regresijski model 84
5. RASPRAVA 87
6. ZAKLJUČCI 96

7. SAŽETAK **97**
8. SUMMARY **99**
9. POPIS CITIRANE LITERATURE **101**
10. ŽIVOTOPIS **112**

1. UVOD

1.1. Rak dojke

Karcinom dojke je najčešći zloćudni tumor u žena. Rijetko se javlja prije 25. i poslije 80. godine života (1,2,3). U muškaraca je karcinom dojke rijedak. Od raka dojke oboli 1-2 muškarca na sto oboljelih. Ukupno u oba spola rak dojke nalazi se na trećem, odnosno na četvrtom mjestu po učestalosti, ovisno o zemljopisnom položaju (4,5,6).

U Hrvatskoj prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, rak dojke čini 22% novih slučajeva raka kod žena (7).

U većini razvijenih zemalja broj žena oboljelih od raka dojke u stalnom je porastu, a isti se trend primjećuje i u Hrvatskoj. Tako je 1969. godine registrirano 900, a posljednjih godina i više od 2200 novooboljelih žena godišnje. Podaci Republičkog registra za rak pored toga pokazuju da raste broj oboljelih žena u mlađim dobnim skupinama (7). Pojava raka dojke u mlađih žena objašnjava se promjenama načina življenja suvremene žene, uključujući kasniji prvi i zadnji porod, nedojenje, učestalije prekide trudnoće, porast broja nerotkinja, hormonsku terapiju, promjene životnih navika, u načinu ishrane veća je zastupljenost hrane bogate mastima i proteinima, povećana izloženost kancerogenim tvarima u hrani i okolini, te naposljetku izloženost radioaktivnosti (1,6). Na temelju navedenih čimbenika i nekih drugih obilježja, uključujući ranu pojavu prve menstruacije, trajanje generativne dobi duže od 30 godina, prisutnost karcinoma dojke u ostalih članova obitelji, primjerice majke, sestara, te ostalih rođaka ženskog spola, prisutnost mutacije BRCA gena, mogu se definirati rizične skupine za nastanak karcinoma dojke koje zahtijevaju detaljnije i češće kontrole što bi moglo omogućiti bolju ranu dijagnostiku i liječenje takvih žena. Usprkos napretku dijagnostike i terapije, rak dojke je najčešći uzrok smrti žena u dobi 35-59 godina života (1-4,6).

Jedan od glavnih problema u liječenju raka dojke je raznoliko biološko ponašanje tumora dojke. Unatoč prepoznavanju bolesnica s nepovoljnim tradicionalnim prognostičkim čimbenicima, u kliničkom praćenju bolesnica izdvajaju se dvije skupine bolesnica: a) one koje će biti izliječene ili će ući u razdoblje dugotrajne remisije bolesti, te b) one kod kojih će razmjerno brzo doći do ponovnog pojavljivanja bolesti. Prepoznavanje ove druge skupine bolesnica, koje treba liječiti agresivnijom kemoterapijskom shemom, od velikog je značenja za uspješno liječenje bolesnica s rakom dojke. Stoga su danas brojna istraživanja usmjerena

na prepoznavanje novih pokazatelja koji mogu predvidjeti biološko ponašanje tumora, odnosno tijek bolesti (8).

Unatoč brojnim publikacijama o prognostičkim čimbenicima, koji obogaćuju spoznaje o biološkom ponašanju tumora, kao i o njihovom utjecaju na daljnji tijek bolesti, tzv. tradicionalni prognostički čimbenici još uvijek imaju najveću važnost za predviđanje tijeka bolesti i način liječenja bolesnica. U tzv. tradicionalne prognostičke čimbenike ubrajaju se veličina tumora, histološki tip, stupanj diferenciranosti tumora, odsustvo ili postojanje metastaze u limfnim čvorovima, hormonski steroidni receptori (estrogenski i progesteronski). No danas se sve više analiza tumora nadopunjuje i dopunskim prognostičkim čimbenicima, tako da se određuje: prisutnost i stupanj diferenciranosti intraduktalne komponente, analiza čimbenika rasta, određivanje DNK sadržaja protočnom citometrijom, određivanje raznih onkogena, vaskularne invazije i kromosomskih nenormalnosti (8,9,10).

Tumori dojke općenito se dijele se na dobroćudne i zloćudne. S obzirom na histološki tip Svjetska zdravstvena organizacija (Lyon 2003) predložila je klasifikaciju zloćudnih tumora dojke koja se danas koristi (11).

1.2. Podjela tumora dojke

I EPITELNI TUMORI
- a) benigni
- b) maligni

II MIJEŠANI, VEZIVNI I EPITELNI TUMORI
- a) fibroadenom
- b) filoidni tumor
- c) karcinosarkom

III OSTALI TUMORI
- a) tumori mekih tkiva
- b) tumori kože
- c) tumori hematopoetskog i limfatičkog tkiva

IV NEKLASIFICIRANI TUMORI

V FIBROCISTIČNA BOLEST DOJKE

VI TUMORIMA SLIČNE PROMJENE

VII METASTATSKI TUMORI

Epitelni tumori dojke dijele se u dvije glavne skupine i to na dobroćudne i zloćudne epitelne tumore.

1.2.1 Dobroćudni epitelni tumori

1.2.1.1 Intraduktalni papilom

Intraduktalni papilom je najčešće pojedinačna tumorska tvorba resičastog izgleda, promjera do 1 cm, koja nastaje u glavnim izvodnim kanalićima dojke blizu bradavice. Klinički je obilježena seroznim ili sukrvavim iscjetkom iz dojke, prisutnošću malog subareolarnog tumora i rijetko uvlačenjem bradavice. Razlikovanje dobroćudnog intraduktalnog papiloma od intraduktalnog papilarnog karcinoma može biti vrlo teško. Preporučuje se kompletna ekscizija zbog mogućnosti recidiviranja tumora (1-3,9).

1.2.1.2. Adenom bradavice

Najčešće se javlja u četvrtom i petom desetljeću, skoro uvijek jednostrano, a često je praćen seroznim ili sukrvavim iscjetkom iz bradavice (1-3,9). Naziva se i floridna papilomatoza kanalića bradavice. Klinički se može zamijeniti s Pagetovom bolesti.

1.2.1.3. Ostali adenomi

Adenomi dojke dijele se na tubularni, adenom laktacije i apokrini. Obično su žućkasti, oštro ograničeni i čvršći, a laktacijski adenom može se javiti multiplo (1-3,9).

1.2.2. Zloćudni epitelni tumori

Karcinom dojke može nastati iz duktalnog (90%) ili lobularnog epitela (10%), a dijeli se na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinfiltrirajući) i na one koji to jesu (infiltrirajući).

Histološka klasifikacija karcinoma dojke SZO-e (11)**:**

1. *Invazivni duktalni karcinom, NOS*
   - -miješani karcinom
   - -pleomorfni karcinom
   - -karcinom s orijaškim stanicama tipa osteoklasta
   - -karcinom s koriokarcinomskim elementima

-karcinom s melanotskim elementima

2. *Invazivni lobularni karcinom*
3. *Tubularni karcinom*
4. Invazivni kribriformni karcinom
5. *Medularni karcinom*
6. Mucinozni karcinom i drugi tumori s obilnim stvaranjem sluzi
   -mucinozni karcinom
   -cistadenokarcinom i mucinozni karcinom cilindričnog epitela
   -karcinom stanica tipa prstena pečatnjaka
7. *Neuroendokrini tumori*
   -solidni neuroendokrini karcinom
   -atipični karcinoid
   -sitnostanični karcinom
   -velikostanični neuroendokrini karcinom
8. Invazivni papilarni karcinom
9. Invazivni mikropapilarni karcinom
10. Apokrini karcinom
11. Metaplastični karcinomi
    -čisti epitelni metaplastični karcinomi
    -planocelularni karcinom
    -adenokarcinom sa metaplazijom tipa vretenastih stanica
    -adenoskvamozni karcinom
    -mukoepidermoidni karcinom
    -miješani epitelno-mezenhimalni metaplastični karcinomi
12. Karcinom bogat lipidima
13. Sekretorni karcinom
14. Onkocitni karcinom
15. Adenoidno cistični karcinom
16. Karcinom acinarnih stanica
17. Karcinom svijetlih stanica-bogat glikogenom
18. Sebacealni karcinom
19. Inflamatorni karcinom

1.2.2.1. Neinfiltrirajući zloćudni tumori

Duktalni karcinom in situ (DCIS) je tumor koji nastaje od epitela kanalića dojke, ali koji ne probija bazalnu membranu kanalića i ne infiltrira okolnu stromu. Postoji više morfoloških tipova, uključujući solidni tip, komedo tip, papilarni tip, mikropapilarni i kribriformni tip. Obično se pojavljuju miješane slike, iako najčešće jedan tip dominira. Tumor se može širiti intraepitelno u lobule dojke. Papilarni karcinom koji raste unutar ciste i ograničen je na nju, naziva se neinvazivni cistični papilarni karcinom. U posljednje vrijeme se češće određuje stupanj diferenciranosti intraduktalne komponente. Zadnjih desetak godina bilježi se porast DCIS s nekih 5% na 15-30 % zahvaljujući sve većem mamografskom otkrivanju (1-3,10-12).

Lobularni karcinom in situ (LCIS) zahvaća intralobularne duktuse, koji su prošireni i ispunjeni gustim nakupinama stanica koje ne infiltriraju stromu. Stanice su relativno jednolične, male ili srednje velike, okruglih jezgara i s pokojom rijetkom mitozom. Tumorske stanice se mogu širiti i u ekstralobularne izvodne kanaliće i nadomjestiti duktalni epitel. Lobularni karcinom in situ obično se javlja multicentrično, često obostrano, te je udružen s invazivnim duktalnim i lobularnim karcinomom. Ne smatra se premalignom lezijom nego biljegom povećanog rizika za razvoj raka dojke (1-3,11,13).

1.2.2.2. Infiltrirajući zloćudni tumori

1.2.2.2.1. Invazivni duktalni karcinom (NST, NOS)

To je najčešći tip raka dojke, koji čini ukupno 65-80% svih karcinoma dojke. Njegova histološka slika ne odgovara ni jednom posebnom tipu karcinoma dojke, dakle, dijagnoza se postavlja isključivanjem. Neki autori (Page, Elston, Ellis) dodaju mu oznaku NST ("no special type" - nikakav poseban tip), a neki (Fisher, Rosen) NOS ("not otherwise specified" - koji nije drugačije određen) (1,14).

Više od 50% ukupne tumorske mase mora imati histološke osobine ovog tumora da bi se on klasificirao kao duktalni invazivni, NST. Ako se u tumoru nalazi i druga komponenta (ili više njih) koja odgovara nekom specijalnom (posebnom) tipu, a čini više od 50% ukupne tumorske mase, tumor se klasificira kao miješani karcinom (duktalni invazivni + posebni tip). Sam naziv duktalni karcinom nije potpuno precizan i ne označava sasvim sigurno podrijetlo

tumorskih stanica jer se danas smatra da većina ovih karcinoma nastaje iz epitela terminalne duktulo-lobularne jedinice, a ne iz duktalnog epitela.

Tumor se najčešće otkriva kao palpabilni bezbolan čvor ili mamografski, kod žena u 50-im godinama. Rijetko se prezentira kao Pagetova bolest, međutim, karcinom kod Pagetove bolesti dojke gotovo je uvijek duktalni invazivni NST, a vrlo rijetko se radi o nekom posebnom tipu (tubularni, medularni, papilarni, lobularni).

Veličina varira od nekoliko milimetara (kod onih koji su mamografski otkriveni) do 10mm i više cm. Obično su čvrsti (zbog dezmoplastične strome) pa su nekad bili poznati i kao scirozni karcinomi (grč. skirrhos - čvrst). Najčešće su zvjezdolika izgleda, s nepravilnim rubom, ali nekad su i okruglasti pa se doimaju dobro ograničeni. Oni zvjezdolika izgleda češće su udruženi s metastazama u pazušnim limfnim čvorovima u odnosu na tumore okruglaste konfiguracije. Boja je obično sivo-bijela, a kod celularnijih tumora i žućkasto-smeđa (1,3,15).

Histološka slika je karakteristično raznolika s obzirom na način rasta, izgled stanica, mitotsku aktivnost, rubove tumora, izgled strome i pridruženu intraduktalnu komponentu.
Tumorske stanice mogu stvarati gnijezda, tračke, solidne nakupine ili žljezdane oblike. Mogu se vidjeti i pojedinačne stanice koje se redaju "poput Indijanaca" (tzv. "Indian file") ili koncentrično oko duktusa i krvnih žila (tzv. targetoidno redanje), ali nemaju citomorfološke osobine invazivnog lobularnog karcinoma pa se ta slika ne smije zamijeniti s invazivnim lobularnim karcinomom!

Stanice obično imaju obilniju eozinofilnu citoplazmu, a jezgre mogu pokazivati blag, umjeren ili izrazit polimorfizam. Mitotska aktivnost varira od slabe do izražene.
Mikroskopski rubovi tumora mogu biti infiltrativni ili gurajući ("pushing" rubovi), a može se vidjeti i kombinacija oba tipa. Stromalna komponenta također varira od oskudne vezivne do obilne dezmoplastične strome. Nekad se uočavaju i žarišta elastoze, pogotovo periduktalno. U manjem broju slučajeva nađe se obilniji limfoplazmocitni upalni infiltrat i te slučajeve se ne smije zamijeniti s medularnim karcinomom čija dijagnoza počiva na strogim histološkim kriterijima (1,3,16).

U većini slučajeva (više od 80%) nađe se i intraduktalna komponenta koja varira od oskudne do obilne, a koja izgledom često odgovara invazivnoj komponenti. Za sada još nije sigurno da li je sama proporcija in situ komponente neovisan prognostički pokazatelj. Veličina intraduktalne komponente važnija je kao čimbenik rizika za recidiv tumora nakon poštednih zahvata na dojci jer upućuje na veću vjerojatnost da su zahvaćeni i rubovi ekscizije. Invazivni karcinomi s ekstenzivnom in situ komponentom (EIC), definirani kao invazivni

karcinomi s intraduktalnom komponentom koja zauzima 25% ili više ukupne tumorske mase te se prostire i izvan glavne tumorske mase, imaju znatno veću učestalost lokalnih recidiva od karcinoma bez EIC-e, a znatan broj tih recidiva je u obliku invazivnog karcinoma (10,14,15,16,17).

Prognoza invazivnog duktalnog NST karcinoma dojke, gledano općenito, je najlošija od svih invazivnih karcinoma dojke. Međutim, radi se o izrazito heterogenoj skupini tumora unutar koje se nalazi čitav spektar od prognostički povoljnih do izuzetno nepovoljnih karcinoma pa se prognoza procjenjuje individualno prema čitavom nizu prognostičkih čimbenika o kojima će kasnije biti više rečeno, a od kojih su najvažniji status limfnih čvorova, histološki gradus i veličina tumora te prediktivnih čimbenika, kao što su status estrogenskih receptora i HER2/neu status (oko 70-80% duktalnih NST karcinoma ima pozitivne estrogenske receptore, a 15-30% je HER2/neu pozitivno) (17).

Prognoza mikroinvazivnog karcinoma je u pravilu dobra. Nerijetko je histološka dijagnoza mikroinvazije problematična, a i sam pojam mikroinvazije nije precizno definiran. Danas je najšire prihvaćena definicija AJCC-a (American Joint Comission on Cancer) iz 1997. koja kaže da je mikroinvazija "širenje karcinomskih stanica izvan bazalne membrane u okolno tkivo, u žarištima veličine do 0,1 cm". Ako postoje multipla žarišta mikroinvazije uzima se u obzir samo promjer najvećeg žarišta (ne zbrajaju se promjeri pojedinačnih žarišta!). Ovakve lezije prema TNM klasifikaciji spadaju u T1mic stadij (17,18).

1.2.2.2.2.. Invazivni lobularni karcinom

Invazivni ili infiltrativni lobularni karcinom je na drugom mjestu po učestalosti među invazivnim karcinomima dojke i na njega otpada od 5-10% (po nekim studijama od 0,7 do 15%) svih karcinoma dojke. Spomenute razlike u učestalosti najvećim dijelom se odnose na različite dijagnostičke kriterije jer je od vremena ranih 40.-ih, kad su Foote i Stewart opisali klasični tip invazivnog lobularnog karcinoma, opisano više različitih varijanti koje su proširile spektar lobularnog karcinoma. Ne zna se sa sigurnošću da li svi ti karcinomi nastaju iz lobularnog epitela, ali ih se smatra varijantama lobularnog karcinoma jer su u 40-90% slučajeva udruženi s lobularnim neinvazivnim karcinomom, a morfološki i klinički se razlikuju od duktalnog invazivnog karcinoma, NST.

Javlja se u širokom dobnom rasponu (26-86 god.), najčešće od 45. do 56. godine, kao neoštro ograničena masa ili nejasno zadebljanje, obično u gornjem vanjskom kvadrantu dojke. Kod ovih tumora često je zahvaćena i druga dojka (8-19% slučajeva), bilo sinkrono (unutar 2 mjeseca od otkrivanja prvog tumora) ili metakrono. Tumor u drugoj dojci je najčešće

invazivan, a u većini slučajeva se radi o lobularnom karcinomu ili miješanom karcinomu s lobularnom komponentom (1-3,19,20,21).

Veličina lobularnog karcinoma varira od mikroskopskih žarišta do difuzne zahvaćenosti čitave dojke. Najčešće se prezentira kao zvjezdoliki, sivkasto-bjelkasti, čvrsti čvor koji se teško može razlikovati od duktalnog invazivnog karcinoma, ali se mogu vidjeti i neke neobične forme, primjerice nejasno ograničena induracija dojke ili razbacani sitni, čvrsti čvorići poput zrna pijeska. Obično nema degenerativnih promjena (kalcifikata, krvarenja, nekroze, cistične degeneracije).

U histološkoj slici dominiraju dvije osnovne karakteristike lobularnog invazivnog karcinoma - izgled stanica i način rasta - različito su izražene u pojedinim podtipovima. Treća važna karakteristika je prisutnost lobularnog neinvazivnog karcinoma koji se nađe u oko 90% slučajeva klasičnog lobularnog karcinoma te u 40-60% slučajeva s varijantnom histološkom slikom.

Prognostički nema značajnije razlike u preživljenju između bolesnica s invazivnim duktalnim i lobularnim karcinomom. Prema veličini tumora nema razlike u učestalosti metastaza u pazušne limfne čvorove kod duktalnih i lobularnih invazivnih karcinoma. Čak prema nekim studijama nema ni značajnije razlike u učestalosti kontralateralnog karcinoma.
Učestalost metastaza u limfne čvorove pazuha kod lobularnih invazivnih karcinoma je od 30 do 40%. Najvažniji prognostički čimbenik su veličina tumora i status limfnih čvorova (19-21).

1.2.2.2.3. Tubularni karcinom

Tubularni karcinom je dobro diferencirani invazivni karcinom dojke građen od tubularnih formacija u obilnoj vezivnoj stromi, obloženih jednim slojem jednoličnih epitelnih stanica. Tumor ima ograničen metastatski potencijal i odličnu progozu. Ne smije se zamijeniti s duktalnim invazivnim karcinomom niskog gradusa koji stvara tubule (obloženi su slabije diferenciranim epitelom!).

Rijedak je i na njega otpada 1-4% svih simptomatskih karcinoma dojke, a nešto je učestaliji (7,7-27%) u skupini mamografski otkrivenih karcinoma. Danas se 60-70% tubularnih karcinoma otkriva mamografski u pretkliničkoj fazi (22).
Javlja se u svim dobnim skupinama a najčešće u dobi 44-49 godina. Opisani su i rijetki slučajevi kod muškaraca (manje od 1% svih karcinoma muške dojke).
Obično se radi o solitarnim lezijama koje se javljaju u perifernim dijelovima dojke. Međutim, u 10-20% bolesnica nađeno je više odvojenih žarišta tubularnog karcinoma u jednom ili više

kvadranata dojke, često udruženo s multiplim žarištima hiperplazije cilindričnih stanica (23,24).

1.2.2.2.4. Invazivni kribriformni karcinom (IKK)

IKK je dobro diferencirani invazivni karcinom dojke, koji ima specifičnu histološku sliku i dobru prognozu. Rijedak je i čini od 0,6 do 3,5% tumora dojke (25,26).

Kribriformna slika mora zauzimati najmanje 90% tumora da bi se on svrstao u kategoriju čistog (klasičnog) invazivnog kribriformnog karcinoma. Pravilo 90% ne važi samo u slučaju kad je druga komponenta tubularna, kada je dovoljno da tumor ima kribriformnu sliku u više od 50% tumora. Ako je prisutna neka druga invazivna komponenta, tumor se klasificira kao miješani karcinom (27-30).

1.2.2.2.5. Medularni karcinom

Medularni karcinom je tip invazivnog karcinoma dojke koji od 1949., kad je prvi put detaljnije definiran (Moore i Foote), još uvijek izaziva dijagnostičke probleme. Više studija je pokazalo neslaganje dijagnostičkih kriterija među različitim patolozima, a shodno tome i njegova učestalost varira od 2 do 10%.

Javlja se u nešto mlađoj dobi (45-54 godine) i na njega otpada 10% karcinoma u žena mlađih od 35 godina. Rijedak je u starijih osoba. Najčešće se prezentira kao palpabilni čvor u vanjskom gornjem kvadrantu dojke. Zanimljivo je da su pazušni limfni čvorovi često povećani, ali se histološki ne nalazi metastatskih depozita, već reaktivna slika s folikularnom hiperplazijom i sinus histiocitozom (31-33).

1.2.2.2.6. Mucinozni karcinom

Ovaj tip karcinoma dojke poznat je i kao koloidni, mukoidni ili gelatinozni karcinom. Na njega otpada 1-3% svih invazivnih karcinoma dojke, a spada u skupinu prognostički povoljnih karcinoma.

Prema najnovijoj klasifikaciji tumora dojke SZO-e, spada u širu skupinu karcinoma dojke koji stvaraju sluz, zajedno s karcinomom sa stanicama tipa prstena pečatnjaka (koji je opisan u okviru lobularnog karcinoma) te mucinoznim cistadenokarcinomom i mucinoznim karcinomom cilindričnih stanica.

Glavna je karakteristika ovog tumora prisutnost obilne ekstracelularne sluzi, vidljive i golim okom. Javlja se u rasponu od 21-94 god., a najčešći je u 7. desetljeću, dakle bolesnice

su nešto starije no one s duktalnim invazivnim karcinomom. Obično se prezentira kao mekša, palpabilna masa, a bol, iscjedak i povlačenje kože su rijetki (34-37).

1.2.2.2.7. Neuroendokrini tumori

U ovu skupinu nekad su se ubrajali karcinomi dojke koji su pokazivali morfološke, histokemijske ili imunohistokemijske znakove neuroendokrine (NE) diferencijacije. Neki autori smatraju da ovi tumori ne predstavljaju specifičnu histopatološku kategoriju već oblik endokrine ili biokemijske metaplazije koji se može naći u različitim tipovima karcinoma dojke (38).

Dijagnostički kriteriji su bili različiti (morfološki, histokemijski, imunohistokemijski) pa je to bila vrlo heterogena skupina tumora. Najveći broj studija uzimao je u obzir karcinome s histokemijski definiranom NE diferencijacijom, dakle one u kojima je histokemijskim metodama (Grimelius) dokazano postojanje argirofilnih zrnaca u citoplazmi pa je prema njima učestalost ovih karcinoma bila 3-25% (negdje čak do 52%!) svih karcinoma dojke. Argirofilija je nađena u 8-80% invazivnih mucinoznih karcinoma, 50-100% invazivnih lobularnih karcinoma te 15-71% duktalnih NST karcinoma. Znakovi NE diferencijacije mogu se naći i u intraduktalnoj komponenti tumora (38-40).

Prema kriterijima SZO, NE tumori dojke imaju karakteristične morfološke osobine NE tumora poput onih iz pluća ili probavnog sustava i imunohistokemijski pokazuju ekspresiju NE biljega (kromogranin, sinaptofizin, neuron specifična enolaza) u više od 50% stanica.
Prognoza NE karcinoma dojke posebno ne odudara od prognoze drugih karcinoma dojke i vezana je uz uobičajene prognostičke čimbenike (38-41).

1.2.2.2.8. Papilarni karcinom

Potrebno je razlikovati invazivni od neinvazivnog papilarnog karcinoma dojke. Invazivni papilarni karcinom je prilično rijedak i ima relativno dobru prognozu. Neinvazivni papilarni karcinom je nešto češći, a predstavlja oblik intraduktalnog karcinoma. Invazivna komponenta može imati papilarnu sliku ili sliku duktalnog invazivnog karcinoma. Tumor može biti cističan ili solidan.

Na njega otpada manje od 1-2% svih karcinoma dojke u žena. Javlja se kod nešto starijih žena, najčešće u dobi 63-67 godina, kao čvor u centralnom dijelu dojke (u gotovo 50% slučajeva), često s iscjetkom iz bradavice (22-34% slučajeva). Pazušni limfni čvorovi često su povećani, međutim, radi se o benignim reaktivnim promjenama, a metastaze su rijetke. Tumor je sporog rasta i dobre prognoze (42-44).

1.2.2.2.9. Invazivni mikropapilarni karcinom

Invazivni mikropapilarni karcinom je rijetka i tek nedavno opisana varijanta invazivnog duktalnog karcinoma dojke, a može se javiti u čistom obliku (vrlo rijetko) ili u kombinaciji s drugim tipom invazivnog karcinoma dojke. Žarišni mikropapilarni rast opisan je u 3-6% karcinoma dojke.

Javlja se u dobnom rasponu od 36 do 81 god., kao palpabilni, najčešće unilateralni čvor, često već od samog početka s pazušnim metastazama (72-77% slučajeva).

Limfatička invazija opisana je u 50-72,7 % slučajeva i to je jedna od istaknutih osobina ovog tumora. Čak i vrlo mala komponenta mikropapilarnog karcinoma u tumoru dojke jako povećava rizik limfatičke invazije i zahvaćanja regionalnih limfnih čvorova (45-48).

1.2.2.2.10. Apokrini karcinom

Znakovi apokrine diferencijacije mogu se naći u gotovo 30% karcinoma dojke, ali se dijagnoza apokrinog invazivnog karcinoma postavlja tek ako više od 90% tumorskih stanica ima histološki i imunohistokemijski apokrine karakteristike.

Na ovaj tip karcinoma otpada 1-4% invazivnih karcinoma dojke.

Klinička prezentacija odgovara onoj kod invazivnih duktalnih karcinoma, NST. Bol, iscjedak ili Pagetova bolest su neuobičajeni.

Bilateralni apokrini karcinomi su izuzetno rijetki, a opisani su rijetki slučajevi neapokrinog karcinoma u kontralateralnoj dojci.

Javlja se u dobi od 34 do 78 godina, a najčešće u šestom i sedmom desetljeću. Rijetki slučajevi su opisani u muškoj dojci (49-51).

1.2.2.2.11. Karcinom s metaplazijom

To je morfološki heterogena skupina karcinoma dojke čija je osnovna karakteristika metaplazija jednog dijela tumorskih žljezdanih epitelnih stanica u neki drugi stanični tip, bilo epitelni ili mezenhimalni. Metaplazija se u karcinomima dojke može javiti u obliku manjih mikroskopskih žarišta pa sve do zahvaćanja većeg dijela tumorske mase.

Ne zna se sigurno iz kojeg tipa stanica nastaje metaplastični karcinom, da li iz žljezdanih epitelnih stanica (što je najvjerojatnije), iz mioepitelnih stanica ili multipotentnih

primitivnih matičnih stanica. Ultrastrukturni i imunohistokemijski nalazi uglavnom govore u prilog epitelnog podrijetla.

U ovu skupinu se svrstavaju svi oblici karcinoma u kojima se mogu naći žarišta pločaste metaplazije unutar invazivnog karcinoma, te područja hrskavičnog i koštanog izgleda odnosno žarišta vretenastih stanica (52-55).

1.2.2.2.12. Karcinom bogat lipidima

U ovu kategoriju svrstavaju se rijetki karcinomi dojke građeni od stanica koje sadrže obilje lipida u citoplazmi. Na rutinskom hemalaun eozinskom (HE)preparatu ove stanice imaju obilniju svijetlu, vakuoliziranu citoplazmu jer su lipidi otopljeni u procesu pripreme preparata. Lipidi se mogu dokazati u svježem, nefiksiranom materijalu posebnim histokemijskim bojanjima (Sudan) ili elektronskim mikroskopom.

Klinički se ne razlikuju od uobičajenih karcinoma dojke. Najčešće se radi o duktalnom invazivnom, slabije diferenciranom karcinomu, mada se mogu vidjeti i drugi histološki tipovi. Neutralni lipidi moraju se nalaziti u većini (>90%) stanica da se tumor svrsta u ovu kategoriju. Stanice su obično difuzno pozitivne na α-laktalbumin. U stanicama se ne nalaze mucini.

Treba ih razlikovati od metastaze karcinoma bubrega te drugih karcinoma dojke građenih od svijetlih stanica (karcinom bogat glikogenom, apokrini karcinom, "signet ring" karcinom) (56-58).

1.2.2.2.13. Sekretorni (juvenilni) karcinom

Radi se o karcinomu s blijedim stanicama koje imaju izraženu sekretornu aktivnost kakva je vidljiva u trudnoći i laktaciji. U citoplazmi tumorskih stanica i žljezdolikim prostorima prisutan je PAS pozitivan materijal. Javlja se češće u mlađih osoba i ima dobru prognozu. Ne smije se zamijeniti s duktalnim invazivnim karcinomom u trudnoći (59,60).

1.2.2.2.14. Onkocitni karcinom

To je vrlo rijetka varijanta karcinoma dojke građena od stanica obilne eozinofilne zrnate citoplazme koje imunohistokemijski pokazuju jaku reaktivnost s protumitohondrijskim serumom, a negativne su na GCDFP-15, što odgovara onkocitnim stanicama. Više od 70% tumorske mase mora biti građeno od takvih stanica da se tumor svrsta u ovu kategoriju.
Ultrastrukturno, onkociti sadrže brojne okrugle do ovalne, nekad nabubrele mitohondrije izravnatih krista, koji su difuzno raspoređeni u 60% ili više ukupne citoplazmatske površine,

bez luminalnog ili bazalnog nakupljanja, a ne vide se sekretorna zrnca, vezikule niti lizosomi (61,62).

1.2.2.2.15. Adenoidni cistični karcinom

Mikroskopski pokazuje karakterističnu kribriformni izgled. Ovakav histološki tip tumora je inače karakterističan za žlijezde slinovnice. Tumor se rijetko javlja u dojci. Prognoza je bolja od prognoze duktalnog invazivnog karcinoma (63).

1.2.2.2.16.Inflamatorni karcinom (IK)

Inflamatorni karcinom nije poseban histološki tip već se radi o specifičnoj kliničkoj prezentaciji karcinoma dojke. Klinička slika može upućivati na netumorsku, upalnu bolest (nagli početak, bol, crvenilo, toplina, često povećani regionalni limfni čvorovi), a smatra se da nastaje uslijed limfatičke opstrukcije tumorom. Na njega otpada 1-3% svih karcinoma dojke. Inflamatorni karcinom klasificira se prema TNM klasifikaciji kao T4d odnosno stadij IIIb i oblik je uznapredovalog karcinoma dojke.

Koža dojke je zadebljana, edematozna (izgled narančine kore – peau d'orange), crvena, topla. Ovakve promjene, prema Haagensenu, moraju zahvaćati bar trećinu kože dojke, ali prema drugima, i karcinomi s manjim inflamatornim kožnim promjenama imaju jednako lošu prognozu. Obično se palpira veći tumor centralno ili je dojka difuzno indurirana, bez jasnog tumora. Pagetova bolest se rijetko vidi.

Liječenje obično započinje s primarnom kemoterapijom, nastavlja se kirurgijom, adjuvantnom kemoterapijom te lokoregionalnim zračenjem. Liječenje ovakvih tumora je još uvijek nezadovoljavajuće i samo oko 30% liječenih bolesnica je živo nakon 5 godina (64,65).

Ostali: Ovdje spada primjerice karcinom bogat glikogenom, karcinom acinarnih stanica, sebacealni karcinom.
Pored toga rijetko se javljaju karcinom malih stanica i karcinom stanica poput prstena pečetnjaka, građeni su od stanica za koje nije jasno da li su lobularnog ili duktalnog podrijetla (25,66).

1.3. Određivanje kliničkog stadija raka dojke

Poradi izbora najprikladnijeg načina liječenja, procjene prognoze i mogućnosti usporedbe različitih terapijskih protokola bolesnice se, ovisno o proširenosti bolesti, svrstavaju u određene stupnjeve. Najprimjenjivaniji sustav stupnjevanja je TNM sustav koji je

prihvatilo i udruženje International Union Against Cancer (UICC) i American Joint Comission on Cancer Staging and Results Reporting (AJCC).

TNM sustav uključuje veličinu primarnog tumora (T), proširenost tumora u regionalne limfne čvorove (N) i udaljene metastaze (M). Klinička podjela nastaje na temelju fizikalnog pregleda, te laboratorijskih i radioloških nalaza.

TNM klasifikacija tumora dojke (67):

T - primarni tumor

T_X - primarni tumor se ne može odrediti

T_0 - primarni tumor nije dokazan

T_{IS} - karcinom in situ: intraduktalni karcinom, lobularni karcinom in situ, Pagetova bolest bradavice bez tumora

T_1 - tumor $\leq$ 2 cm

T_{1a}: tumor > 0.1 cm ali ne veći od 0.5 cm

T_{1b}: tumor > 0.5 cm ali ne većo od 1 cm

T_{1c}: tumor > 1cm ne veći od 2 cm

T_2 - tumor veći od 2 cm, ali manji od 5 cm

T_3 - tumor veći od 5 cm

T_4 - tumor bilo koje veličine s širenjem u kožu ili pričvršćen uz prsnu stijenku

T_{4a}: tumor pričvršćen uz prsnu stijenku

T_{4b}: edem ili ulceracija kože ili satelitski kožni čvorovi u istoj dojci

T_{4c}: T_{4a} i T_{4b}

T_{4d} : inflamatorni karcinom

N - regionalni limfni čvorovi

pN_X - regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti

pN_0 - nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki

pN_0(i-) – nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativna imunohistokemijska analiza (IHC)

pN_0(i+) – nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, pozitivna IHC analiza, IHC izilirane tumorske stanice ne prelaze 0.2 mm

pN_0(mol-) - nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativna molekularna analiza (RT-PCR)

pN_0(mol+) - nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, pozitivna molekularna analiza (RT-PCR)

pNmi – mikrometastaza (od 0.2 mm do 2 mm)

pN_1 – metastaze u ipsilateralnim pazušnim limfnim čvorovima (do 3 limfna čvora) i/ili u limfnom čvoru uz unutarnju mamarnu arteriju koji je utvrđen biopsijom limfnog čvora čuvara (sentinel čvora)

pN_{1a} – metastaze u jednom do tri limfna čvora

pN_{1b} – metastaze u limfnom čvoru uz unutarnju mamarnu arteriju koji je uvrđen biopsijom sentinel limfnog čvora

pN_{1c} – metastaze u jednom do tri limfna čvora i u limfnom čvoru uz unutarnju mamarnu arteriju koji je otkriven biopsijom sentinel limfnog čvora

pN_2 - metastaze u četiri do devet pazušnih limfnih čvorova, ili u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju koji su otkriveni kliničkim pretrgama

pN_{2a} - metastaze u četiri do devet pazušnih limfnih čvorova (najmanje jedno žarište mora biti veće od 2 mm)

pN_{2b} - metastaze u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz odsustvo metastaza u pazušnim limfnim čvorovima

pN_3 - metastaze u 10 ili više aksilarnih limfnih čvorova ili u infraklavikularnom limfnom čvoru, ili metastaze u čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju koje su otkrivenene klinički uz prisustvo jedne ili više metastaza u pazušnim limfnim čvorovima; ili metastaza u tri ili više pazušna limfna čvora uz klinički negativne limfne čvorove uz unutarnju mamarnu arteriju ali s mikrometastazama u njima; ili metastaza u suprakalvikularnom limfnom čvoru

pN_{3a} – metastaze u 10 ili više pazušnih limfnih čvorova (s najmanje jednom metastazom većom od 2 mm) ili u infraklavikularnom limfnom čvoru

pN_{3b} – metastaze u čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju koje su otkrivene klinički uz prisustvo jedne ili više metastaza u pazušnim limfnim čvorovima; ili metastaza u tri ili više pazušna limfna čvora uz klinički negativne limfne čvorove uz unutarnju mamarnu arteriju ali s mikrometastazama u njima koje su otkrivene biopsijom sentinel limfnog

čvora

pN_{3c} – metastaze u supraklavikularnim limfnim čvorovima

M - udaljene metastaze

M_X - postojanje udaljenih metastaza ne može se odrediti

M_0 - nema udaljenih metastaza

M_1 - udaljene metastaze

Tablica 1 prikazuje TNM stadije za karcinom dojke (AJCC) (67):

Tablica 1. Stadiji karcinoma dojke prema TNM klasifikaciji

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

1.4. Prognostički čimbenici kod raka dojke

Karcinomi dojke su izuzetno heterogena skupina tumora čija je prognoza vrlo različita od slučaja do slučaja te se određuje individualno prema čitavom nizu kliničkih i patoloških prognostičkih pokazatelja.

Prognostičke čimbenike kod raka dojke može se u grubo podijeliti na one tradicionalne i novije gdje spada cijeli niz čimbenika od kojih su mnogi još predmet ispitivanja i kliničkih studija.

1.4.1. Stanje limfnih čvorova

Važnost disekcije i analize limfnih čvorova je u prvom redu u dobivanju važnih prognostičkih informacija, ali također i u kontroli bolesti. Ovo je najvažniji prognostički čimbenik u bolesnica s karcinomom dojke. Bolesnice s negativnim limfnim čvorovima imaju 5-ogodišnje preživljenje bez bolesti preko 80%, a ako su čvorovi pozitivni, preživljenje je ispod 65%. Rizik pojave recidiva te ukupno preživljenje ovise i o broju zahvaćenih limfnih čvorova (68, 69).

Lokalizacija limfnih čvorova unutar pazuha također je važna. Pazuh se može dijeliti u tri razine, ovisno o odnosu prema malom pektoralnom mišiću (ispod, iza te iznad malog pektoralnog mišića - I, II te III razina). Prognoza je lošija ako su zahvaćene više razine (II, III). U pravilu se nađe progresivno širenje metastaza iz I prema III etaži, ali su moguće i tzv. "skip" (preskakajuće) metastaze (70-72).

Ako se pregledom limfnog čvora (na HE preparatu, imunohistokemijski ili molekularnim metodama) nađu tek pojedinačne tumorske stanice ili manje nakupine čiji promjer nije veći od 0,2 mm, takav nalaz izdvaja se u posebnu kategoriju – *izolirane tumorske stanice* – i klasificira kao pN_0, a spada u klinički stadij I (ovisno o veličini primarnog tumora) (73).

Prognostički lošije značenje ima širenje tumorskog tkiva izvan kapsule limfnog čvora u okolnu mast (ekstranodalno širenje) kao i invazija hilusa (hilarno meko tkivo i/ili eferentne žile)(72). Danas je prihvaćen stav da opseg odstranjenja limfnih čvorova iz aksile treba obuhvatiti razinu I i II limfnih čvorova. Razina III limfnih čvorova pazuha rutinski se ne odstranjuje. Također se rutinski ne odstranjuju interpektoralni (Rotterovi) limfni čvorovi prilikom disekcije pazuha a rijetko se i nađu. Danas je dosta kontroverznih podataka u literatur je li za klinički negativni pazuh potrebno raditi kompletnu disekciju ili samo biopsiju

limfnog čvora stražara tzv. sentinela. "Sentinel" čvor je prvi pazušni čvor kroz koji prolazi limfatička drenaža dojke (stražar na vratima pazuha). Najčešće se radi o jednom čvoru, ali može ih biti i više. Pozitivan ili negativan sentinel određuje da li primjeniti disekciju ili ne. Odstranjenje limfnih čvorova iz pazuha uzrok je poslijeoperacijskog morbiditeta. Gotovo u pravilu praćeno je u poslijeoperacijskom toku nakupljanjem seroma, često žene imaju parestezije područja pazuha koje je trajno, a nerijetko se razvije i limfedem ruke. U kirurgiji se nastoji izbjeći disekcija pazuha kad god je to moguće a za klinički negativne čvorove pazuha biopsija sentinela predstavlja alternativni zahvat. U Europi i SAD-u su u toku brojne prospektivne randomizirane studije koje će nam donijeti odgovore na ta pitanja. Disekcija aksile se ne preporuča u slučajevima neinvazivnog karcinoma, mikroinvazivnog karcinoma te kod tubularnih karcinoma manjih od 1 cm (mali rizik zahvaćenosti aksile, dobra prognoza) (72,74,75).

Nakon pazuha, drugo po važnosti drenažno područje je u limfne čvorove duž unutarnje mamarne arterije. Oni su zahvaćeni ukupno u 22% slučajeva, češće kod tumora u medijalnoj polovini dojke i kod pozitivne aksile (zahvaćeni su u >50% slučajeva s tumorom u medijalnoj polovini dojke, s pozitivnom aksilom, a u <1% slučajeva tumora u vanjskoj polovini dojke, s negativnom aksilom).

Supraklavikularni limfni čvorovi zahvaćeni su u oko 20% slučajeva s pozitivnom aksilom, a gotovo nikad nisu zahvaćeni kod negativne aksile (76).

1.4.2. Veličina tumora

Veličina tumora je jedan od važnijih prognostičkih čimbenika, pogotovo u bolesnica s negativnim pazušnim limfnim čvorovima.

Između veličine tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova te veličine tumora i preživljenja postoji linearni odnos. Prognostičko značenje veličine tumora neovisno je o stanju limfnih čvorova .

Bolesnice s manjim tumorima imaju bolju prognozu. Kod tumora manjih od 1 cm u promjeru, s negativnom aksilom, 20-ogodišnje preživljenje bez bolesti je 88%.

Pojam *minimalni karcinom dojke* ("minimal breast carcinoma") odnosi se na karcinome koji imaju izuzetno dobru prognozu, a obuhvaća slučajeve neinvazivnog karcinoma te invazivne karcinome promjera do 10 mm (American College of Surgeons, UK National Breast Screening Programme). Neki autori, međutim, uzimaju granicu od 5 mm odnosno 9 mm (17,72).

Prognoza se pogoršava s veličinom tumora, ali je zanimljivo da ekstremno veliki tumori imaju nešto bolju prognozu od tumora srednje veličine.

Veličina tumora se može odrediti na razne načine - klinički, mamografski, makroskopski ili mikroskopski. Uobičajeni način je makroskopsko mjerenje najveće dimenzije nefiksiranog tumora (preporuča se mjerenje u 3 dimenzije, a najveća se uzima kao veličina tumora), ali je najprecizniji način mikroskopsko mjerenje najvećeg promjera invazivne komponente. Važno je da se tumor primi netaknut, što omogućava da se palpatorno odredi konfiguracija i rezanje tumora duž najvećeg promjera (76).

Kod multifokalnih tumora još se ne zna sa sigurnošću da li prognoza korelira s promjerom najvećeg žarišta ili ovisi o ukupnoj veličini svih žarišta zajedno. Prema jednoj studiji, promjer najvećeg žarišta je najpouzdanija mjera za staging, ali je prognoza multifokalnih tumora ipak lošija od unifokalnih tumora sličnih dimenzija (češće aksilarne metastaze). Preporuča se izmjeriti i navesti veličinu svih žarišta (77).

1.4.3. Histološki stupanj diferenciranosti tumora (gradus)

Invazivni karcinomi dojke su histološki i klinički raznolika skupina tumora, međutim njihovo biološko ponašanje korelira s histološkim izgledom pa je stupnjevanje ovih tumora prognostički neobično važno. Prognostička vrijednost gradusa neovisna je o veličini tumora i statusu limfnih čvorova.

Stupnjevanje može biti bazirano samo na karakteristikama jezgri tumorskih stanica kada se govori o tzv. gradusu jezgre (na njemu se zasnivala nekadašnja Blackova metoda) ili na kombinaciji građe i karakteristika jezgre, kada se govori o histološkom gradusu. Danas se najviše koristi (u Europi) histološko stupnjevanje po metodi Scarff-Bloom-Richardson koju preporučuje i SZO (78), odnosno modifikacija te metode po Elstonu i Ellisu (tzv. Nottinghamska metoda)(79) koja se razlikuje od originalne prilično subjektivne metode u tome što daje precizne i stroge kriterije za svaku od tri ocjenjivane morfološke osobine: stvaranje tubula, polimorfizam jezgara i broj mitoza (tablica 2). Svaka od te tri osobine ocjenjuje se s 1-3 boda, a konačni gradus dodjeljuje se prema zbiru svih bodova:

3-5 bodova: gradus 1 (dobro diferencirani tumori)

6-7 bodova: gradus 2 (srednje diferencirani tumori)

8-9 bodova: gradus 3 (slabo diferencirani tumori).

Tablica 2. Kriterije za ocjenjivane morfoloških osobina

Osobina				**Bodovi**
Stvaranje tubula				
>75% tumorske mase				1
10-75% tumorske mase				2
<10% tumorske mase				3
Polimorfizam jezgre				
blag				1
umjeren				2
izražen				3
Broj mitoza				
promjer vidnog polja (mm)	0,44	0,59	0,63	
mitoze	0-5	0-9	0-11	1
	6-10	10-19	12-22	2
	>11	>20	>23	3

Kombinacija histološkog tipa i histološkog gradusa omogućava precizniju procjenu prognoze no sam histološki tip (17). Histološki gradus izgleda da je i važan prediktivni čimbenik jer se pokazalo da tumori višeg gradusa bolje reagiraju na neke kemoterapijske protokole.

Prognostička vrijednost histološkog gradusa raste u kombinaciji s drugim prognostičkim čimbenicima od kojih su najvažniji veličina tumora i histološki status limfnih čvorova, na osnovi čega je napravljen *Nottinghamski prognostički index* (NPI – tablica 3) (79).

Tablica 3. Nottinghamski prognostički indeks

NPI = promjer tumora (cm) x 0,2 + status limfnih čvorova (1-3) + histološki gradus (1-3)

NPI	Prognoza	15-god. preživljenje
<3,4	Dobra	80%

3,4-5,4	Osrednja	42%
>5,4	Loša	13%

1.4.4. Histološki tip

Karcinomi dojke se mogu podijeliti u 4 prognostičke grupe prema histološkom tipu:

1. odlična prognoza (10-godišnje preživljenje >80%)
   -tubularni karcinom
   -mucinozni karcinom
   -invazivni kribriformni karcinom
   -intracistični papilarni karcinom
   -adenoidno-cistični karcinom
   -tubulolobularni karcinom.
2. dobra prognoza (10-godišnje preživljenje 60-80%)
   -tubularni miješani karcinom
   -miješani karcinom (duktalni invazivni, NST + specijalni tip)
   -klasični tip lobularnog karcinoma.
3. umjereno dobra prognoza (10-godišnje preživljenje 50-60%)
   -invazivni papilarni karcinom
   -miješani tip lobularnog karcinoma
   -medularni karcinom
   -atipični medularni karcinom.
4. loša prognoza (10-godišnje preživljenje <50%)
   -duktalni invazivni, NST
   -solidni tip lobularnog karcinoma
   -miješani karcinom (duktalni invazivni, NST + lobularni invazivni).

Mišljenja su podijeljena o prognostičkim razlikama između duktalnog invazivnog, NST karcinoma i lobularnog karcinoma. Ono što je sigurno je povezanost između prognoze bolesti i morfološkog podtipa lobularnog karcinoma (17, 79).

1.4.5. Limfovaskularna invazija

Više je studija pokazalo da nalaz tumorskih stanica unutar lumena krvnih ili limfnih prostora znači lošiju prognozu. Prisutnost tumorskih stanica u dermisu povezan je s kliničkim izgledom inflamatornog karcinoma.

Prisutnost limfovaskularne invazije određuje se u limfnim i krvnim žilama u tkivu dojke izvan glavne tumorske mase, ali ne treba zanemariti ni vaskularnu invaziju unutar tumora (mada njeno prognostičko značenje nije sasvim jasno).

Vaskularna invazija nađe se u gotovo četvrtini slučajeva karcinoma dojke, a češće se vidi kod slabo diferenciranih, većih tumora, uz duktalni invazivni NST karcinom te u slučajevima s pozitivnom aksilom (17,80).

Nekad je teško razlikovati krvnožilni prostor od retrakcijskih artefakata pa u tim slučajevima pomaže imunohistokemija (CD31, CD34, faktor VIII). Osobito izražena limfatička invazija vidi se u slučajevima invazivnog mikropapilarnog karcinoma i povezana je s lošijom prognozom (46).

1.4.6. Nekroza

Nekroza u karcinomima dojke, kao i u drugim tumorima, predstavlja loš prognostički znak. Može biti jače ili slabije izražena, ali ne postoji usaglašen stav koji opseg nekroze je klinički značajan. Najčešće se vidi u duktalnom invazivnom karcinomu, NST.

Budući da je nekroza povezana s veličinom i slabijom diferencijacijom tumora, teško je reći da li predstavlja neovisan prognostički čimbenik.

1.4.7. Reakcija strome

Stroma invazivnih karcinoma dojke može pokazivati promjene poput fibroze, elastoze ili orijaških stanica, za koje se vjeruje da ih uzrokuju citokini koje oslobađaju tumorske stanice ili stanice strome okolnog tkiva dojke.

Fibroza je česta promjena, ali najvjerojatnije ne predstavlja neovisan prognostički čimbenik. Neki autori je povezuju s pojačanom ekspresijom progesteronskih receptora.

Elastoza se može vidjeti i u benignim i u malignim lezijama dojke, a o njenu značenju u karcinomima dojke postoje oprečna mišljenja. Obično se vidi u tumorima koji imaju relativno dobru prognozu (tubularni, tubularni miješani, invazivni kribriformni karcinom) i pojačanu ekspresiju estrogenskih receptora. Najvjerojatnije nije neovisan prognostički čimbenik.

Orijaške stanice tipa osteoklasta mogu se naći u različitim tipovima karcinoma dojke, u stromi ili unutar tumora, a smatra se da su histiocitnog podrijetla. Njihov nastanak vjerojatno uvjetuju neki čimbenici (interleukin-1?) koje luče tumorske stanice, a koji djeluju i na angiogenezu. Tumori s većim brojem orijaških stanica izdvajaju se kao poseban podtip karcinoma dojke - karcinomi s orijaškim stanicama tipa osteoklasta - ali ne radi se o

posebnom kliničko-patološkom entitetu već o slikovitoj histološkoj varijanti karcinoma dojke. Prognostičko značenje ovih tumora za sada nije dovoljno poznato, ali izgleda da orijaške stanice ne utječu bitnije na prognozu.

1.4.8. Limfoplazmocitna infiltracija strome

Medularni karcinomi imaju nešto povoljniju prognozu, što se povezuje i s izraženim limfoplazmocitnim infiltratom, međutim, manje je jasno značenje limfoplazmocitne infiltracije u drugim tipovima karcinoma dojke. Različiti autori našli su nešto povoljniju, jednaku ili lošiju prognozu u odnosu na karcinome bez infiltracije.

Infiltrat se najčešće sastoji od zrelih limfocita, nešto plazma stanica te makrofaga, a rijetko dominiraju plazma stanice ili eozinofili. Limfociti su uglavnom T-fenotipa. Makrofazi su nešto obilniji u slabo diferenciranim karcinomima te onima s pojačanom ekspresijom HER2/neu onkogena.

Medularni karcinomi i duktalni karcinomi s izraženom limfoplazmocitnom reakcijom gotovo su uvijek estrogen i progesteron negativni.

1.4.9. Angiogeneza

Pojava novih krvnih žila unutar i u okolini tumora važan je čimbenik rasta tumora. Neovaskularizacija je izražena u okolini neinvazivnog karcinoma i u invazivnim tumorima dojke, a u invazivnim tumorima povezana je s većim rizikom pojave regionalnih i udaljenih metastaza (17, 81).

Neki autori su našli da je angiogeneza izraženija u tumorima mlađih bolesnica, u većim tumorima i tumorima većeg histološkog gradusa. Također, prema nekima, neovaskularizacija je povezana s histološkim tipom tumora pa je slabija u lobularnim invazivnim karcinomima u odnosu na duktalne te u tom histološkom tipu nije značajniji prognostički čimbenik (82). Nije nađena značajna povezanost neovaskularizacije i onkogena. Drugi autori nisu našli da je neovaskularizacija značajan prognostički čimbenik, ali ona ima važnu prediktivnu vrijednost, odnosno ukazuje na veću vjerojatnost odgovora na specifičnu terapiju (terapijsko djelovanje Taxola dijelom je bazirano na inhibiciji angiogeneze) (17,83).

1.4.10 Perineuralna invazija (PNI)

PNI se može naći u otprilike 10% invazivnih karcinoma dojke, obično u tumorima visokog histološkog gradusa te često uz limfatičku invaziju. Nije sigurno da predstavlja neovisan prognostički čimbenik.

1.4.11. Intraduktalna komponenta

Neki autori smatraju da tumori s obilnijom intraduktalnom komponentom imaju povoljniju prognozu, ali je vjerojatnije da sam obim intraduktalne komponente ne predstavlja neovisan prognostički čimbenik.

Obilna intraduktalna komponenta, međutim, upućuje na povećani rizik lokalnog recidiva nakon poštednih zahvata na dojci (zbog veće vjerojatnosti da su promjenom zahvaćeni rubovi ekscizije) (17,84)

1.4.12. Hormonski receptori

Prije su se steroidni receptori određivali u citosolu tumorskog tkiva DC metodom (dekstran-aktivni ugljen). Parametri hormonskog vezivanja određeni su Scatchardovom analizom temeljem koje su rezultati kompjuterski obrađeni i izraženi u femtomolima na mg proteina (85).

Biokemijska metoda određivanja hormonskih receptora iz citosola do nedavno je bila nezamjenjiva, međutim, danas se s jednakim uspjehom status hormonskih receptora može odrediti imunohistokemijski na parafinskim rezovima. Postoji dobra korelacija imunohistokemijskih i biokemijskih rezultata (84%), a imunohistokemijska metoda je jednostavnija, jeftinija i točnija (iako je semikvantitativna) jer se imunoreaktivnost odnosi samo na tumorske stanice.

Estrogenski i progesteronski receptori su nestabilni, termolabilni proteini koji se nalaze u jezgrama tumorskih, ali i normalnih epitelnih stanica dojke. Da bi se reaktivnost receptora sačuvala, važna je brza i dobra fiksacija tkiva.

H-score se izračunava na 300 stanica, a uzima u obzir broj reaktivnih stanica kao i intenzitet bojanja jezgara. Tumorske stanice se svrstavaju u četiri grupe prema intenzitetu bojanja, a H-score se dobije tako da se intenzitet ekspresije pomnoži s postotkom stanica koje pokazuju takvu ekspresiju i rezultati se zbroje:

0 x % negativnih tumorskih stanica
+
1 x % slabo pozitivnih tumorskih stanica
+
2 x % umjereno pozitivnih tumorskih stanica
+
3 x % jako pozitivnih tumorskih stanica

=
H-score

Dakle, vrijednost H-score-a može biti od minimalno 0 (0x100% negativnih stanica) do maksimalno 300 (3x100% jako pozitivnih tumorskih stanica (17,86).

Hormonski receptori u karcinomima dojke imaju veće značenje kao prediktivni (vjerojatnost odgovora na terapiju) nego prognostički čimbenik. Tumori s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima (ER+PR+) reagirat će na hormonsku terapiju u 78% slučajeva, ER+PR- tumori u 34% slučajeva, a ER-PR+ tumori reagirat će u 45% slučajeva. Međutim, zanimljivo je da će i tumori koji su ER-PR- u oko 10% slučajeva reagirati na hormonsku terapiju. Tumori s većom razinom hormonskih receptora reagirat će jače na hormonsku terapiju od onih s nižim razinama. Novije studije pokazuju bolje rezultate u liječenju s inhibitorima aromataze od dosad najčešće upotrebljavanog blokatora hormonskih recepora tamoksifena (87). ER- tumori bolje reagiraju na kemoterapiju u odnosu na ER+ tumore. Pacijenti s ER+ tumorima imaju duže preživljenje bez bolesti u odnosu na one s ER- tumorima. ER+ tumori češći su kod starijih žena, češće su dobro diferencirani, diploidni, niže mitotske aktivnosti te rjeđe pokazuju ekspresiju p53 i HER2/neu.

Smatra se da su ER- tumori obično lošije prognoze, slabije diferencirani, međutim, to nije sasvim točno. Grupa ER- tumora je heterogena i sadrži tumore različitih histoloških tipova. Progesteronski receptor je protein čija je sinteza pod kontrolom estrogenskih receptora pa njegova prisutnost upućuje na funkcionalnost ER. Međutim, oko 5% karcinoma dojke su ER-PR+ što se može objasniti ili lažno negativnim rezultatom u određivanju ER ili sinteza PR može biti inducirana neovisno o ER. Vrijednost PR kao neovisnog prognostičkog čimbenika je vjerojatno vrlo mala (88).

1.4.13. Molekularni biljezi

1.4.13.1. Receptori čimbenika rasta tip I (EGF receptori)

Epitelne stanice dojke pod utjecajem su različitih hormona i čimbenika rasta. U receptore čimbenika rasta tip I (EGF receptori) spadaju receptor epidermalnog čimbenika rasta, HER2/neu, HER3 i HER4. Njihova uloga u rastu i diferencijaciji stanice je vrlo kompleksna. Vezanjem liganda za receptor obično dolazi do njegove aktivacije, ali moguća je i međusobna aktivacija ovih receptora (89).

a) Receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR)

EGFR (poznat i kao c-erbB-1) prisutan je u malim količinama u normalnom epitelu dojke te u drugim tkivima. Više od trećine duktalnih neinvazivnih karcinoma visokog gradusa te 35-60% invazivnih karcinoma dojke pokazuje prekomjernu ekspresiju EGFR. Smatra se da doprinosi rastu tumora potičući proliferaciju i angiogenezu. Može se određivati biokemijski ili imunohistokemijski (konvencionalna ili radioimunohistokemija).

Tumori koji su EGFR+ obično su ER- ili PR-, slabije diferencirani, agresivniji, s povišenom proliferacijskom aktivnošću.

EGFR je, izgleda, loš prognostički čimbenik, pogotovo u slučajevima koekspresije EGFR i c-erbB-2. Njegova prediktivna vrijednost (predviđanje odgovora na hormonsku terapiju) je još značajnija. EGFR- tumori, pogotovo ako su ER+, pokazuju dobar odgovor na hormonsku terapiju (80% slučajeva reagira na terapiju, s parcijalnom ili kompletnom remisijom u 45% slučajeva).

Razvijena su i monoklonalna protutijela na EGFR, a efekt takve specifične nove terapije još je predmet proučavanja (povoljan efekt postignut je u eksperimentalnim modelima i u terapiji nekih uznapredovalih karcinoma debelog crijeva) (17,89,90).

b) HER2/neu (c-erbB-2)

HER2/neu onkogen nalazi se na lokusu 17q21, a odgovara neu onkogenu koji je otkriven ranih 80-ih u neuroblastomima štakora. Njegova amplifikacija dovodi do prekomjerne ekspresije HER2/neu glikoproteina koji je član porodice transmembranskih receptora epidermalnih čimbenika rasta, s funkcijom tirozin kinaze (u malim količinama nalazi se u epitelnim i mioepitelnim stanicama normalnog tkiva dojke). Aktivacija receptora (vezanjem liganda) potiče niz događanja koji uvode stanicu u S-fazu staničnog ciklusa. HER2/neu receptor nema za sada poznatog vlastitog liganda ("orphan" receptor), ali se može aktivirati sam (spontana homodimerizacija u slučajevima prekomjerne ekspresije) ili ga aktiviraju drugi članovi porodice EGF receptora (heterodimerizacija) (91).

Amplifikacija HER2/neu proto-onkogena i/ili prekomjerna ekspresija HER2/neu proteina nađena je u 10-40% invazivnih duktalnih karcinoma dojke (rijetko u invazivnom lobularnom karcinomu) (17).

Prekomjerna ekspresija HER2/neu vidi se u slabije diferenciranim tumorima, u većim tumorima, tumorima s negativnim hormonskim receptorima i onima s zahvaćenim limfnim čvorovima. Povezana je s lošijom prognozom, pogotovo u bolesnica s pozitivnom aksilom. Koekspresija HER2/neu i EGFR loš je prognostički znak (sinergističko djelovanje), dok koekspresija s HER4 donekle ublažava loše prognostičko značenje HER2/neu (89,91).

Povoljna strana prekomjerne ekspresije HER2/neu je mogućnost terapije Herceptinom (trastuzumab) tj. monoklonalnim protutijelom na HER2/neu protein i to na njegovu ekstracitoplazmatsku domenu, za koju je dokazano da inhibira rast tumorskih stanica in vitro i in vivo. Za sada je terapija Herceptinom indicirana u bolesnica s metastatskom bolesti i prekomjernom ekspresijom HER2/neu, a u tijeku su randomizirane multicentrične studije koje će pokazati učinkovitost Herceptina u kombinaciji s različitim citostaticima.
Najvažnija nuspojava terapije Herceptinom je kardiotoksičnost (pogotovo kod pacijenata koji primaju ili su primali antracikline) (91).

Procjena HER2/neu statusa najčešće se radi imunohistokemijski (HercepTest) ili FISH-om, a podudarnost ovih dviju metoda je 80-95%. Imunohistokemijska metoda je jednostavnija, brža i jeftinija pa se češće izvodi. Kod HercepTesta koristi se poliklonsko protutijelo na epitope intracitoplazmatske domene HER2/neu proteina. Postoje različite interpretacije rezultata bojanja (nema standardiziranog "scoring" sistema), a najčešće se koristi ova:

0: nema membranskog bojanja ili u <10% tumorskih stanica

1: slabo/jedva vidljivo membransko bojanje u >10% tumorskih stanica (djelomično obojane membrane)

2: slabo/umjereno, kompletno membransko bojanje u >10% tumorskih stanica

3: jako, kompletno membransko bojanje koje se nalazi u >10% tumorskih stanica.

Ocjenjuje se samo invazivna komponenta, a pozitivnim se smatra samo membransko bojenje (amplifikacija onkogena veća od 3x povezana je s membranskom lokalizacijom HER2/neu proteina, a citoplazmatska reaktivnost je manjeg značenja). Samo rezultati intenziteta 3+ (difuzno, jako pozitivno, membransko bojanje) smatraju se prekomjernom ekspresijom HER2/neu i te se bolesnice smatraju kandidatima za terapiju Herceptinom. Prije započimanja terapije nalaz imunohistokemije potvrđuje se fluorescentnom in situ hibridizacijom (FISH) u onim slučajevima kada je imunohistokemijski nalaz bio označen kao 2+ (92). Niska ekspresija HER2/neu proteina, iako nedovoljna za imunoterapiju, mogla bi imati vrijednost kao prognostički čimbenik (17,93,94).

c) HER3 (c-erbB-3)

HER3 ekspresija (citoplazmatska!) nađe se u oko četvrtini karcinoma dojke. Povezana je s prekomjernom ekspresijom HER2/neu i zahvaćenim limfnim čvorovima, ali je veza slaba i vjerojatno se ne radi o važnijem prognostičkom čimbeniku (89).

d) HER4 (c-erbB-4)

HER4 receptor ima važnu ulogu u rastu i diferencijaciji stanice, a njegova ekspresija izgleda je povezana s povoljnijom prognozom i diferenciranijim histološkim podtipovima tumora. Dakle, on funkcionira drugačije od ostalih članova porodice receptora epidermalnih čimbenika rasta.

Njegova ekspresija nađe se u oko 80% tumora, a povezana je s dužim preživljenjem bez bolesti. U slučajevima u kojima se nađe koekspresija HER4 i HER2/neu, HER4 ublažava loš prognostički efekt HER2/neu (89).

1.4.13.2. Tumor-supresorski geni

a) p53

p53 je tumor-supresorski gen koji se nalazi na kromosomu 17p i važan je regulator staničnog ciklusa ("čuvar staničnog genoma"). Kad se pojavi oštećenje DNA, akumulacija normalnog p53 proteina zaustavlja stanični ciklus u G_1 fazi i omogućava popravak DNA. Mutacije tog gena jedna su od najčešćih molekularnih abnormalnosti u solidnim tumorima. Proizvod mutacija gena su stabilni, mutirani proteini koji se nakupljaju u jezgri i u većini slučajeva mogu se imunohistokemijski dokazati (za razliku od normalnog «divljeg» tipa p53 proteina koji je vrlo nestabilan i ne može se, u pravilu, imunohistokemijski dokazati). Oko 20% mutacija ne dovodi do stvaranja stabilnog proteina pa se takvi slučajevi ne mogu prikazati imunohistokemijski.

Akumulacija mutiranog p53 proteina nađe se u 27-54% invazivnih karcinoma dojke i 25% duktalnih neinvazivnih karcinoma (u pravilu visokog gradusa). Povezana je s lošijom prognozom, višim gradusom jezgre i histološkim gradusom, negativnim hormonskim receptorima te u nekim studijama, s prekomjernom ekspresijom HER2/neu proteina.

Ispituje se i njegova uloga kao prediktivnog biljega za uspjeh hormonske i kemoterapije, sa, za sada, različitim rezultatima (17,95,96,97).

b) nm23

Smanjena ekspresija nm23 proteina povezana je s lošijom prognozom, metastazama u aksilarne limfne čvorove, vaskularnom invazijom i češćim recidivima karcinoma dojke (98,99).

1.4.13.3. Ostali čimbenici

a) Katepsin D

Katepsin D kisela je lizosomska proteaza koja se može naći u stanicama karcinoma dojke, ali i okolnim stromalnim stanicama, naročito makrofazima. Danas se više ne smatra značajnim prognostičkim čimbenikom (17,100).

b) bcl-2

bcl-2 ("B-cell leukemia/lymphoma-2") onkogen smješten na lokusu 18q21, kodira mitohondrijalni membranski protein koji inhibira apoptozu i sudjeluje u kontroli proliferacije. Opisan je prvi put u folikularnim limfomima vezano uz t(14;18), ali je kasnije nađen u čitavom nizu limfoproliferacijskih poremećaja bez t(14;18), u raznim nehematološkim tumorima te u normalnim embrionalnim, fetalnim i odraslim tkivima.

Citoplazmatska reaktivnost vidi se u normalnom i hiperplastičnom epitelu dojke, a u neinvazivnim karcinomima ekspresija varira ovisno o gradusu pa je najjača u dobro diferenciranim lezijama niskog gradusa, a najslabija u komedo tipu intraduktalnog karcinoma. U invazivnim karcinomima ekspresija bcl-2 je nađena u 58-79% slučajeva, a povezana je značajno s ekspresijom hormonskih receptora. U karcinomima dojke nije nikad nađena t(14;18).

Neki autori našli su inverzan odnos ekspresije bcl-2 i HER2/neu te p53. Tumori s nižom proliferacijskom aktivnosti češće su bcl-2 pozitivni. Prema nekima, bcl-2 je koristan i u diferencijalnoj dijagnozi metastatskog karcinoma (dojka vs. pluća ili želudac) jer je značajno češće pozitivan, i s većim intenzitetom, u karcinomima dojke (79,3%) nego u karcinomima pluća (5,6%) ili želuca (8,3%), a taj imunofenotip se zadržava i u metastazama. Ekspresija bcl-2 povezana je s dobrim odgovorom na hormonsku terapiju te predstavlja povoljan prognostički čimbenik neovisan o statusu limfnih čvorova (101,102).

c) Kadherini

Kadherini su Ca^{2+}-ovisne adhezijske molekule na površini stanica, važne za održavanje međustaničnih veza. Spadaju u nedavno otkrivenu skupinu gena koji koče invaziju (16q22) i smatra se da imaju važnu ulogu u aktiviranju mehanizma diseminacije tumorskih stanica. *E-kadherin* (E-KD) je epitelna adhezijska molekula, a njegova smanjena ekspresija loš je prognostički pokazatelj u karcinomu dojke. Dokazuje se imunohistokemijski, a lokalizacija mu je membranska dok se citoplazmatsko bojanje smatra nespecifičnim (nefunkcionalni E-kadherin).

Smanjena ekspresija se vidi u slabije diferenciranim duktalnim invazivnim tumorima, a povezana je s ranijom pojavom metastaza. Zanimljiva je činjenica da u metastazama dolazi do reekspresije ove molekule. Nije nađena povezanost ekspresije E-KD i HER2/neu. Tumori s pozitivnim hormonskim receptorima obično su E-KD +. Stanice lobularnog karcinoma, neinvazivnog i invazivnog, u pravilu ne pokazuju ekspresiju E-KD (oko 10% invazivnih lobularnih karcinoma pokazuje samo citoplazmatsku reaktivnost) što je dijagnostički važno za razlikovanje nekih neinvazivnih duktalnih i lobularnih karcinoma. Smatra se da je smanjena ekspresija E-KD odgovorna za smanjenu kohezivnost stanica lobularnog karcinoma (103,104,105,106,107).

P-kadherin (P-KD) ili placentalni kadherin (prvi put opisan u tkivu posteljice) je adhezijska molekula koja se u normalnom tkivu dojke nalazi samo u mioepitelnim stanicama. Međutim, u 35-60% duktalnih invazivnih karcinoma nađe se aberantna ekspresija ove molekule (ekspresija P-KD nije vezana uz mioepitelni fenotip karcinoma!). Mucinozni, papilarni i lobularni karcinomi obično su P-KD negativni, dok je većina medularnih i metaplastičnih karcinoma pozitivna.

Pojačana ekspresija P-KD vidi se u većim, slabije diferenciranim tumorima, s negativnim hormonskim receptorima, češćim pazušnim metastazama i smanjenom ekspresijom E-KD. Smatra se lošim prognostičkim pokazateljem, prema nekima, čak važnijim od E-KD (105,108,109).

N-kadherin (neuralni kadherin) je neepitelna adhezijska molekula, za sada bez većeg značenja kao prognostički čimbenik u tumorima dojke (110).

d) telomeraza

Telomeraza je enzim odgovoran za održavanje telomernih segmenata na krajevima kromosoma. DNA tijekom replikacije gubi terminalne segmente (telomere) što nakon niza replikacija dovodi do kritičnog skraćenja koje blokira daljnju diobu te stanica stari i umire. Povećana aktivnost telomeraze povezana je s oporavkom telomera te produženim vijekom stanice (imortalizacija).

U normalnim tkivima ovaj enzim je prisutan u vrlo oskudnim količinama, ali mu aktivnost značajno raste u različitim karcinomima, uključujući neinvazivne i invazivne karcinome dojke. Aktivacija telomeraze nađena je u 73-93% karcinoma dojke, a povezana je s prekomjernom ekspresijom p53 i ciklina D1 ili ciklina E. Prema većini studija, spada u nepovoljne prognostičke čimbenike (111).

e)ostali čimbenici

Ekspresija *P-glikoproteina* vezana je uz razvoj rezistencije na kemoterapeutike. Javlja se obično kao kasni fenomen pa nema većeg kliničkog značenja (17).

CD10 (CALLA) površinska je endopeptidaza koja se može naći u stanicama strome u određenom broju slučajeva invazivnih karcinoma dojke. Povezana je s agresivnijim ponašanjem (invazivnost!). Nije opisana ekspresija CD10 u stanicama strome normalne dojke (osim, nekad, u dojci u razvoju) (112).

CD138 (Syndecan-1) je površinski proteoglikan, uglavnom na epitelnim stanicama, a igra ulogu u proliferaciji i migraciji stanica te interakcijama stanica i matriksa. Prekomjerna ekspresija se često vidi u karcinomima dojke, a povezana je s agresivnijim tumorima i lošijom prognozom (113).

Epitelni membranski antigen *(EMA, MUC1, HMFG* ili *Ca 15.3)* je, u prvom redu, diferencijacijski biljeg, a zatim prognostički. U normalnom epitelu dojke nalazi se na površini lumena, a u tumorima je najčešće citoplazmatski. Dobro diferencirani tumori (tubularni karcinom) zadržavaju lokalizaciju prema lumenu, dok se u slabo diferenciranim tumorima (duktalni NST, medularni) ekspresija nekad potpuno gubi. Neki autori smatraju ga neovisnim prognostičkim čimbenikom čija je smanjena ekspresija povezana s lošijom prognozom (17, 114).

Ciklin D1 jedan je od regulatora staničnog ciklusa. Kontrolira progresiju iz G_1 faze u S-fazu. Pojačana ekspresija vidi se u više od 50% duktalnih neinvazivnih karcinoma te u oko 80% invazivnih duktalnih karcinoma, a povezana je s povećanom proliferacijskom aktivnosti i pojačanom ekspresijom estrogenskih receptora (115).

I prekomjerna ekspresija *ciklina E* može ubrzati G_1 fazu staničnog ciklusa. Pojačana ekspresija nađena je u oko 25% karcinoma dojke. Povezana je s proliferacijskim biljezima i višim histološkim gradusom. Za sada se ne zna radi li se o neovisnom prognostičkom čimbeniku (111,116).

p27/kip1 je inhibitor CDK koji također sudjeluje u kontroli progresije iz G_1 u S-fazu staničnog ciklusa (inhibitor progresije), a novija istraživanja pokazuju da igra ulogu u diferencijaciji stanica, apoptozi, inhibiciji rasta te međustaničnim adhezijama. Njegova ekspresija je smanjena u tumorima dojke (neinvazivnim i invazivnim) (117).

pS2 protein nastaje pod utjecajem estrogena i njegova ekspresija upućuje na funkcionalnost estrogenskih receptora pa je važan u prvom redu kao prediktivni čimbenik (vjerojatnost odgovora na hormonsku terapiju) (118).

"Heat shock" proteini (HSP) ili stres proteini nastaju kao reakcija na različiti stres (infekcija, upala, ishemija, oksidansi) i važni su za preživljenje oštećenih stanica pa ih zovu i "molekularnim nadglednicima" ili chaperoninima. U tumorima dojke imaju veće značenje kao prediktivni čimbenici jer su povezani (HSP27) s rezistencijom na citotoksične lijekove, posebno doksorubicin (118).

Metaloproteinaze su skupina enzima koji razgrađuju kolagen i druge proteine ekstracelularnog matriksa. Smatra se da su oni i njihovi aktivatori i inhibitori važni u progresiji i razvoju metastatskog potencijala karcinoma dojke (119).

1.4.14. Proliferacijska aktivnost

Proliferacijska aktivnost je vrlo važan prognostički parametar kod raka dojke. Razvijeno je više metoda za procijenu proliferacijske aktivnosti tumora.

Određivanje S faze staničnog ciklusa na protočnom citometru je valjana metoda za određivanje tumorske proliferacije. Protočna citometrija nije u širokoj primjeni, a glavni nedostatak je potreba veće količine tkiva za analizu (120). Alternativne metode za određivanje proliferacijske aktivnosti tumora, uključujući i imunohistokemiju, detektiraju antigene koji su karakteristični za pojedine faze staničnog ciklusa a koriste znatno manju količinu tumorskog tkiva.

Mitotski indeks je sastavni dio histološkog gradusa i rutinski se određuje u svim karcinomima dojke.

Od imunohistokemijskih metoda najviše se koristi određivanje antigena jezgre Ki-67 koji se nalazi samo u stanicama u proliferaciji (kasna G_1, S, M i G_2 faza staničnog ciklusa). MIB-1 je monoklonsko protutijelo specifično za Ki-67 protein u tumorskom tkivu pohranjenom u parafin. Nađena je bliska podudarnost između Ki-67 pozitiviteta te gradusa tumora, dobi i mitotskog indeksa (121,122).

Bolesnice čiji tumori imaju Ki-67 izražen u više od 50% tumorskih stanica su u velikom riziku da razviju relaps bolesti (122, 123).

Mitosin je jezgrin fosfoprotein koji je izražen u kasnoj G_1 fazi, S fazi , G_2 fazi i M fazi staničnog ciklusa ali nije izražen u G_0 fazi. Povezan je sa S fazom (dobivenom protočnom citomerijom) te negativnim estrogenskim receptorima i s relapsom bolesti (124).

1.4.15. Morfometrija jezgre

Kompjuterskom metodom analize slike mogu se mjeriti različiti parametri (celularnost, mitotski indeks, veličina i oblik stanica i jezgri, gustoća novostvorenih krvnih

žila, itd.). Morfometrija jezgre odnosi se na mjerenje veličine i oblika jezgri stanica, a najčešće mjere su promjer, površina te opseg jezgri. U pravilu je vrijednost sva tri parametra u obrnutom odnosu s prognozom. Mjerenje se može izvesti na citološkim razmazima ili na pažljivo pripremljenim, tankim histološkim rezovima (17).

1.4.16. Cox-2

Metaboliti arahidonske kiseline, kao što su prostaglandini, tromboksani, leukotrieni i različiti lipoksini proizvode se u većini tkiva i odgovorni su za razne biološke odgovore. Oni su snažni medijatori utječući na nekoliko transdukcijskih signalnih puteva odgovornih za stanični rast i diferencijaciju. Sama arahidonska kiselina nastaje djelovanjem fosfolipaza na fosfolipide stanične membrane. Dalje u stvaranju metabolita arahidonske kiseline sudjeluju dvije glavne grupe enzima a to su**: a) ciklooksigenaze** i **b) lipooksigenaze.**

Ciklooksigenaze sudjeluju u stvaranju prostaglandina i tromboksana a lipooksigenaze sudjeluju u stvaranju leukotriena i lipoksina.

Ciklooksigenaza (Cox) je enzim koji djeluje na konverziju arahidonske kiseline u prostaglandine. Postoje dvije izoforme enzima Cox i to Cox-1 i Cox-2. Cox-1 se smatra konstitutivnim enzimom i ujedno odgovornim za sintezu prostaglandina koji sudjeluju u mnogim fiziološkim procesima u organizmu uključujući produkciju proagregatornih prostaglandina preko trombocita i hemostazu, citoprotekciju želuca, vazodilataciju bubrega, plodnost, bol i temperaturu. Za razliku od toga, Cox-2 je tzv. induktivni enzim. Veličine je 71-kDa i teško ga je otkriti u zdravom tkivu. Njegova povišena izražajnost udružena je s kroničnim upalnim procesima kao što su reumatoidni artritis i maligni tumori (125). S obzirom da je Cox-2 odgovoran za sintezu prostaglandina, posljedica povišene izražajnosti Cox-2 je povišena produkcija prostaglandina. Njihova pojačana sinteza može na više načina sudjelovati u karcinogenezi. Prostaglandini mogu direktno stimulirati stanični rast epitelnih stanica i istovremeno dovesti do smanjene produkcije nekih stanica posebice imunološkog sustava (126). U tkivu dojke prostaglandini mogu stimulirati proliferaciju stanica indirektno na način da povise biosintezu estrogena (127). Također je nedavno dokazano da prostaglandin E2 povisuje aromataznu aktivnost direktnim djelovanjem na aromatazni gen CYP19(128) . Također Cox-2 sudjeluje u karcinogenezi kočeći apoptozu na način da potiče stvaranje Bcl-2 ili pojačanijom razgradnjom arahidonske kiseline što do kraja nije razjašnjeno (129,130). Također je pronađena povezanost pojačane expresije Cox-2 i angiogeneze (131). U eksperimentalnim modelima je ukazano kako Cox-2 inducira razvoj intestinalnih polipa i tumora dojke (132,133). Povišena izražajnost Cox-2 proteina pronađena je kod

gastrointestinalnih karcinoma, karcinoma glave i vrata, karcinoma pluća i karcinoma kože (134-139).

Rak dojke je tumor kod kojeg se već prije tridesetak godina počela istraživati povezanost između njegovih metastaza i prostaglandina kao odraza biološke agresivnosti tumora (140-143).

Sintezom selektivnih inhibitora, Cox-2 sve više postaje ciljni protein za kemoprevenciju raka različitih lokalizacija u tijelu (137,138). Dosadašnja istraživanja su pokazala povišenu izraženost proteina Cox-2 u karcinomu dojke, ali samo prognostičko značenje tog nalaza još nije jasno (131,144,145).

1.5. Liječenje i prognoza karcinoma dojke

Liječenje invazivnog karcinoma je multidisiplinarno i temelji se na rezultatima liječenja prospektivnih randomiziranih multicentričnih studija s većim brojem bolesnica i s dužim periodom praćenja (71,74,75,79,80,87,146-152). Liječenje bolesnica stadija I i II bolesti započinje operacijskim zahvatom. Otprilike 75% bolesnica s karcinomom dojke ima tumor manji od 5 cm u promjeru. Danas se najčešće primjenjuju slijedeći operacijski zahvati:

1. poštedni kirurški zahvat
2. modificirana radikalna mastektomija
3. modificirana radikalna mastektomija s trenutnom ili odgođenom rekonstrukcijom
4. mastektomija s poštedom kože (i areole).

Već je dugo poznato da se mnogi bolesnici mogu učinkovito liječiti poštednim operacijskm zahvatom (146,148). Od sedamdesetih godina do današnjih dana više različitih istraživanja u kojima su uspoređivane metode očuvanja dojke s radikalnom ili modificiranom radikalnom mastektomijom uspjela su dokazati isto preživljenje za obje vrste operacijskih zahvata. Među ovim istraživanjima najpoznatija su ona Veronesija i sur. na Nacionalnom Institutu za rak u Milanu (146) i drugo Fishera i sur. u suradnji s NSABP u SAD-u (148). U milanskoj studiji promatran je stadij I karcinoma dojke s tumorima manjim od 2 cm u najvećem promjeru i negativnim aksilarnim čvorovima, te je uspoređena radikalna mastektomija s poštednim zahvatima očuvanja dojke uključujući kvadrantektomiju, aksilarnu disekciju i radioterapiju. Kvadrantektomija je uključivala radijalne incizije s odstranjenjem kože iznad tumora te odstranjenje pektoralne fascije ispod tumora i minimalno 1-2 cm zdravog tkiva oko tumora. Navedena studija danas ima 20 godišnje praćenje i rezultat studije

pokazuje da nema razlike u ukupnom preživljenju kod bolesnica operiranih poštedno ili radikalno.

NSABP protokol B-06 je ispitao populaciju žena s primarnim tumorom do 4 cm u promjeru i s N0 ili N1 statusom limfnih čvorova (148). Bolesnice su podijeljene u jednu od tri skupine glede načina liječenja: 1. bolesnice s modificiranom radikalnom mastektomijom, 2. lumpektomijom s disekcijom aksile i radioterapijom, te 3. lumpektomijom i samo aksilarnom disekcijom bez radioterapije. Histološki negativni resekcijski rubovi su posebno važni u skupinama 2 i 3. Također operacijski zahvat je bio nešto konzervativniji nego kvadrantektomija. Incizije su bile zakrivljene, nije se odstranjivala koža iznad tumora, ni pektoralna fascija ispod tumora. Nisu opažene razlike u preživljenju među tim skupinama, međutim su lokalni recidivi značajno smanjeni dodatkom radioterapije (10% prema 39% u 8 godina). Ovakvi su rezultati podržali poštedne operacijske zahvate u liječenju bolesnica s karcinomom dojke stadija I ili II i pokazale da je kirurško liječenje neophodno nadopuniti s lokoregionalnim zračenjem.

Iako je očigledno da je metoda očuvanja dojke po rezultatima jednaka mastektomiji, za bolesnice s I i II stadijem bolesti, odluka o načinu liječenja mora biti individualna za svaku bolesnicu. Mnogobrojni čimbenici utječu na donošenje ovakve odluke o poštednom liječenju (146,148). Bolesnica mora biti snažno motivirana i željeti očuvanje dojke jer svakodnevna izloženost zračenju traje 5-6 tjedana. Bolesnica također mora prihvatiti rizik od 10% mogućnosti pojave recidiva (152). Drugi čimbenici koji pridonose izboru kirurške metode liječenja uključuju veličinu dojke, veličinu i smještaj tumora, histologiju tumora i dob bolesnice. Za bolesnice s izrazito malim grudima, estetski rezultat lokalne ekscizije može biti neprihvatljiv, osobito kad se radi o većim tumorima. U bolesnica s velikim, opuštenim grudima, neujednačenost kod doziranja zračenja može rezultirati fibrozom i uvlačenjem tkiva. Bolesnice s izrazito velikim dojkama mogu imati i estetsku korist od mastektomije ako se sinkronizirano učini rekonstrukcija s kirurškim povećanjem ili smanjenjem kontralateralne dojke. Za bolesnice s većim tumorom najbolje rješenje je također mastektomija. Još uvijek ne postoje podaci koji upućuju na to da se T3 lezije adekvatno liječe metodom očuvanja dojke. S praktičnog aspekta je lokalna ekscizija velikih tumora rijetko estetski prihvatljiva (148).

Zadnjih 10-ak godina trend operacijskih zahvata kreće se prema mastektomiji sa očuvanjem kože, odnosno mastektomiji sa očuvanjem kože, areole i po mogućnosti bradavice (153,154). Nerijetko je primarni tumor udružen sa ekstenzivnom intraduktalnom komponentom, multicentričan ili centralno položen te je kontraindicirano raditi poštedne kirurške zahvate (10,77,84,148,154). Kod takvih bolesnica je idealno raditi subkutanu

mastektomiju ili modificirano radikalnu mastektomiju. I jedan i drugi tip operacije nakon što se odstrani kompletno žljezdano tkivo dojke, nadopunjuje se rekonstrukcijskim operacijskim zahvatom (istovremenim ili odgođenim). Operacijski zahvat je u pogledu radikaliteta maksimalan, a s druge strane ženama daje jedan zadovoljavajući kozmetski rezultat (153,154,155).

Veliki dio bolesnica s karcinomom dojke ima u vrijeme postavljanja dijagnoze prisutne metastaze u aksilarnim čvorovima, čak i u slučajevima kad se kliničkim pregledom ne nađu povećani limfni čvorovi. Aksilarna disekcija ostaje važna komponenta poštednog zahvata ili modificirane radikalne mastektomije i uzrok mogućeg postoperacijskog morbiditeta. Aksilarna disekcija pridonosi malo ili potpuno preživljenju, ali ostaje važna za određivanje stadija i za lokalnu kontrolu (146,148).

Doprinos aksilarne disekcije lokalnoj kontroli je malen, ali uvjerljiv. U NASBP protokolu B-04 usporedbom radikalne mastektomije s jednostavnom mastektomijom sa ili bez zračenja, u 40% bolesnica s klinički negativnom aksilom otkriveni su pozitivni čvorovi pri radikalnoj mastektomiji (148). U bolesnica s neoperiranom aksilom u 18% je naknadno utvrđeno povećanje limfnih čvorova koje je zahtijevalo kasniju disekciju aksile. U bolesnica kod kojih je učinjena naknadna disekcija umjesto trenutne, nije primijećena značajna razlika u prognozi. Zračenje je manje učinkovito od aksilarne disekcije u prevenciji eventualne pogrešne procjene aksile poglavito u bolesnica s klinički pozitivnim čvorovima (148).

Pored lokalne kontrole bolesti disekcija aksile omogućava točno stupnjevanje i prognostičke podatke. Status limfnih čvorova pazuha je najveći pokazatelj eventualnog metastatskog potencijala tumora. Aksilarna disekcija se preporučuje svim bolesnicama stadija I i II bolesti koje idu na poštedni zahvat ili mastektomiju (146,148). Disekcija se eventualno ne mora provesti u bolesnica koje moraju primati adjuvantnu terapiju bez obzira na status čvorova. Za bolesnice koje se liječe poštednim operacijskim zahvatom aksilarnu disekciju treba izvršiti posebnom aksilarnom incizijom koja se ne širi naprijed prema pektoralnom naboru. Aksilarna disekcija treba biti usmjerena prema uklanjanju I i II razine limfnih čvorova Pri odstranjenju limfnih čvorova iz aksile treba očuvati dugi torakalni živac te torakodorzalni živčanovaskularni splet, a ako je moguće i interkostobrahialne živce (70,71,146,148).

Kao što smo već naveli za klinički negativne aksile sve više u praksu ulazi biopsija limfnog čvora stražara. No za potpunu primjenu biopsije limfnog čvora stražara, kao standarda u liječenju bolesnice stadija I i II bolesti, bit će potrebno sačekati završetak studija koje su u tijeku. Od njih će se dobiti vrijedni podaci ne samo da li je vrijeme napustiti disekciju aksile nego i odgovore na pitanja kako je najbolje identificirati čvor stražar (samo

boja, radioaktivni izotop ili kombinacija) gdje injicirati (peritumoralno ili periareolarno ili oboje) te koliko limfnih čvorova odstranit (jedan, dva, tri ili više) (74,75, 156,157).

Kemoterapija kod raka dojke može se podijeliti u adjuvantnu, primarnu kemoterapiju i kemoterapiju metastatske bolesti raka dojke.

Odluka o primjeni adjuvantne kemoterapije mora biti individualna za svaku bolesnicu s pozitivnim i negativnim čvorovima. Pri donošenju takve odluke u obzir se mora uzeti niz čimbenika uključujući dob bolesnice, opće zdravstveno stanje, hormonalni status (pre i menopauzalno), veličinu tumora, ekspresiju estrogenskih receptora, status limfnih čvorova, amplifikaciju Her-2/neu proteina, Ki-67 i eventualno druge prognostičke čimbenike koji se još istražuju (8,17,68,73,74,93).

Prve prave rezultate da adjuvantna kemoterapija pridonosi boljoj lokoregionalnoj kontroli bolesti objavljeni su ranih 60-tih godina prošlog stoljeća (158). Učinak adjuvantne kemoterapije, kasnije je pokazan kao definitivno bolji ako se uspoređuje ukupno preživljenje bolesnica s onima koje su uzimale placebo (159,160). Te su rane studije koristile ili L-fenilalanin mustard (L-PAM) ili ciklofosfamid, metotrexat, 5-fluorouracil (CMF) i promijenjen je tretman bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima. Postupno, uvođenjem antraciklina u kemoterapijske protokole oni su postali standard u liječenju u zadnjem desetljeću i čak i danas.

U osamdesetim je analizirana mogućnost doprinosa adjuvantne terapije bolesnica s negativnim limfnim čvorovima. Iako su nakon nekih studija postojale kontroverze (150,161) o potrebi adjuvantne terpije u bolesnica s negativnim limfnim čvorovima i negativnim vrijednostima estrogenskih receptora, novije studije (151,162) su proširile indikacije za adjuvantnu terapiju i na žene s negativnim limfnim čvorovima. No također danas je prihvaćeno i mišljenje da je većina bolesnica u skupini s negativnim limfnim čvorovima i tumorom veličine 1-2 cm, samo lokalnom terapijom je izlječena u više od 70% slučajeva i ipak nema benefit od kemoterapije. Otprilike iz te skupine 20-30% žena će razviti metataze i upravo su novija istraživanja usmjerena na otkrivanje podskupine bolesnica s negativnim limfnim čvorovima kojima bi adjuvantna terapija najviše pomogla. U grupiranju bolesnica s negativnim čvorovima analizirani su brojni potencijalni prognostički čimbenici, uključujući veličinu tumora, stupnjevanje jezgara, Ki-67, status steroidnih receptora, c-erb B-2 onkogen i ekspresiju katepsina D, sadržaj DNK i frakcije S-faze koji bi mogli pomoći u utvrđivanju neophodnosti adjuvantne terapije (8,17,68,73,74,93,).

Zadnjih godina, u više studija ispitivan je učinak taksana (paclitaxel i docetaxel) kao adjuvantne terapije kod bolesnica s pozitivnim i negativnim limfnim čvorivima. Za sada je

dokazan učinak taksana u metastatskoj bolesti no podaci o uvođenja taksana u adjuvantnu terapiju su još uvijek kontroverzni (163,164).

U bolesnica s pozitivnim estrogenskim receptorima u obzir svakako dolazi adjuvantna terapija tamoksifenom. Među ženama s pozitivnim limfnim čvorovima upotreba tamoksifena kao jedinog adjuvantnog čimbenika ograničena je na postmenopauzalne bolesnice. Učinkovitost antiestrogenske terapije kao adjuvantne terapije, pokazana je u više istraživanja (44,70). Bolesnice su primile adjuvantnu terapiju tamoksifenom (20 mg/dnevno kroz pet godina) ili su samo kontrolirane nakon mastektomije. Rezultati su pokazali značajno manju učestalost lokalnih recidiva u bolesnica koje su primale tamoksifen, pri čemu je najbolji ishod primjećen u postmenopauzalnih bolesnica (44). No danas studije navode bolje rezultate liječenjem s nekim od inhibitora aromataze (Arimidex, Aromasin). Jedna od najvećih adjuvantnih hormonalnih studija ATAC (Arimidex, Tamoxifen, alone or in combination) pokazuje u preliminarnim rezultatima prednosti terapije sa inhibitorom aromataze nad tamoxifenom (87).

Vrijednost kombiniranja kemoterapeutika i hormonske terapije još treba ustanoviti.

Lokalno uznapredovali karcinom dojke obuhvaća tumore s širokim opsegom biološkog ponašanja. Takva definicija općenito uključuje tumore koji su veliki ili su prošireni na regionalne limfne čvorove bez znakova udaljenih metastaza (167,168). Ovi bolesnici su klasificirani kao skupina s III stupnjem bolesti prema AJCC (67). Otprilike 10-20% svih bolesnica s karcinomom dojke ima III stupanj bolesti. Približno 25-30% karcinoma dojke III stupnja je inoperabilno u vrijeme postavljanja dijagnoze (169).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je utvrditi:

1. imunohistokemijsku izražajnost Cox-2 u primarnim tumorima dojke,
2. povezanost izražajnosti Cox-2 u tumorskim stanicama raka dojke s ishodom liječenja bolesnica i njegovu povezanost s ostalim, do sada prihvaćenim prognostičkim čimbenicima za rak dojke (veličina tumora, diferenciranost, dob bolesnice, zahvaćenost limfnih čvorova, status estrogenskih i progesteronskih receptora),
3. povezanost izražajnosti Cox-2 s rezultatima protočne citometrije kao pokazateljem proliferacijske aktivnosti tumora
4. ispitati razliku u izražajnosti Cox-2 proteina u bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima dojke u odnosu s lokalnim recidivom, pojavom udaljenih metastaza i dužinom preživljenja.

3. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

3.1. Bolesnice i materijal

U ovom radu napravljena je retrospektivna studija na uzorku od 150 bolesnica koje su započele liječenje zloćudnog tumora dojke na Odjelu onkološke kirurgije u Klinici za tumore (KZT) tijekom 1995., 1996. i 1997. godine. U ukupnom broju od 150 bolesnica nalazi se istraživana skupina, ukupno 50 bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima i dvije kontrolne skupine, svaka s po 50 bolesnica. Jedna kontrolna skupina su bolesnice sa slabo diferenciranim tumorom i druga skupina bolesnica s dobro diferenciranim tumorom.

Operacijski materijal analiziranih bolesnica fiksiran je u l0% puferiranom formalinu, uklopljen u parafin, rezan i bojen standardnom rutinskom patohistološkom metodom hemalaun eozin kako bi se svjetlosnim mikroskopom postavila patohistološka dijagnoza. Stupanj diferenciranosti tumora određen je prema Bloomu i Richardsonu (78). Kako se radi o retrospektivnoj studiji, steroidni receptori određivani su u citosolu tumorskog tkiva DC metodom (dekstran-aktivni ugljen). Parametri hormonskog vezivanja određeni su Scatchardovom analizom temeljem koje su rezultati kompjuterski obrađeni i izraženi u femtomolima na mg proteina (85). Receptori se smatraju pozitivnima ukoliko su vrijednosti za estrogenske receptore veće od 5 fmola/mg proteina, a za progesteronske receptore veće od 10 fmola na /mg proteina.

Iz arhive Klinike za tumore gdje su pohranjene povijesti bolesti bolesnica izvadili smo sve podatke o bolesnicama, kliničke podatke o primarnom tumoru te načinu liječenja bolesnica.

Iz računalne baze podataka KZT izvađeni su podaci o zdravstvenom stanju dijela bolesnica koje se redovito kontroliraju u Klinici za tumore.

Iz datoteke Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ) dobili smo podatke o bolesnicama sa smrtnim ishodom bolesti.

Ostale bolesnice smo na osnovi adresa pozivali na kontrolne pregled u Kliniku.

3.2. Imunohistokemija

Uzorci tumorskog tkiva dojke svih 150 bolesnica, fiksirani su u formalinu i uklopljeni u parafin. Osim rezova za standardnu metodu bojenja od svakog tumora učinjen je dodatni rez debljine 5 μm za imunohistokemijsko bojenje za koje je upotrebljeno mišje monoklonsko

protutijelo na Cox-2 (Cayman Chemical; N^{o} 160112; 1:50). Imunohistokemijsko bojenje učinjeno je prema standardnim uvjetima, što uključuje deparafiniranje, tretiranje preparata u mikrovalnoj pećnici upotrebom «target retrival solution» DAKO i primjenu primarnog monoklonskog protutijela na Cox-2. Spomenuto protutijelo ostavljeno je na preparatima preko noći u vlažnoj komori u hladnjaku. Nastavak metode dovršen je upotrebom aparata (DakoCytomation TechMate^{TM} Denmark) i pokrenut je postupak automatiziranog procesa imunohistokemijske obrade preparata metodom MSIP prema preporuci proizvođača.

Rezultati imunohistokemijskog bojenja izraženi su semikvantitativnom metodom, što znači: nema obojenja u tumorskim stanicama (-); do 10% tumorskih stanica ima pozitivnu reakciju, slabo pozitivna reakcija (+); 10-50% tumorskih stanica pozitivno, umjereno pozitivna reakcija (++); više od 50% tumorskih stanica pozitivno, jako pozitivna reakcija (+++). Tumori u kojima nije došlo do obojenja i tumori koji su imali do 10% pozitivnih tumorskih stanica smatrani su negativni za Cox-2. Tumori koji su imali umjereno pozitivnu reakciju (++) i jako pozitivnu reakciju (+++) smatrani su Cox-2 pozitivni.

3. 3. Protočna citometrija

Protočna citometrija napravljena je na tkivu uklopljenom u parafinske blokove i obrađeno metodom koju su opisali Hedley i sur (170). Iz parafinskih blokova napravljeni su dodatni rezovi u tri sloja debljine 40 μm potrebna za analizu na protočnom citometru. Rezovi tkiva deparafinizirani su u ksilenu, rehidrirani u različitim koncentracijama etanola (redom 100%-tnom, 95%-tnom i 70%-tnom), te su na kraju isprani destiliranom vodom. Tkivo je zatim suspendirano 0,5%-tnim pepsinom, 0,9%-tnim natrij-kloridom (pH=7,5) te inkubirano u vodenoj kupelji na 37^{0}C, 1 sat. Stanice su isprane u RPMI mediju, filtrirane kroz 42-mikronski najlonski filter i centrifugirane 5 minuta na 800 G. Nakon toga dodana je ribonukleaza A (Sigma-R-4875) u koncentraciji od 1 mg/ml te su jezgre suspendirane u propidium jodidu (Sigma-P-4170) koncentracije 50 μg/ml. Kao biološki standard upotrijebljeno je normalno tkivo dojke.

Sadržaj DNA i proliferativna aktivnost analizirane su FACS Calibur protočnim citometrom (Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD), pri valnoj duljini od 488 nm, snazi lasera od 15 mW i uz crveni filter. Kroz uređaj se propušta 20 000 jezgara po uzorku, a DNA histogrami su analizirani ModFit LT programom.

3.4. Statistička obrada podataka

Svi podaci su tablično pohranjeni (Excel) i pripremljeni za statističku obradu.

Svi dobiveni rezultati obrađeni su deskriptivnim statističkim metodama. Za testiranje razlike u vrijednostima kvantitativnih varijabli primjenjena je ANOVA (jednosmjerna analiza varijance), odnosno njezin neparametrijski ekvivalent kada distribucije prikupljenih podataka nisu slijedile normalnu raspodjelu.

Za testiranje razlike u vrijednostima kvalitativnih varijabli primjenjen je χ^2 test.

Za ocjenu povezanosti Cox-2 s ostalim obilježjima primijenjen je regresijski model.

Za analizu preživljenja primjenjena je metoda po Kaplan-Meieru i Cox-ov regresijski model.

4. REZULTATI

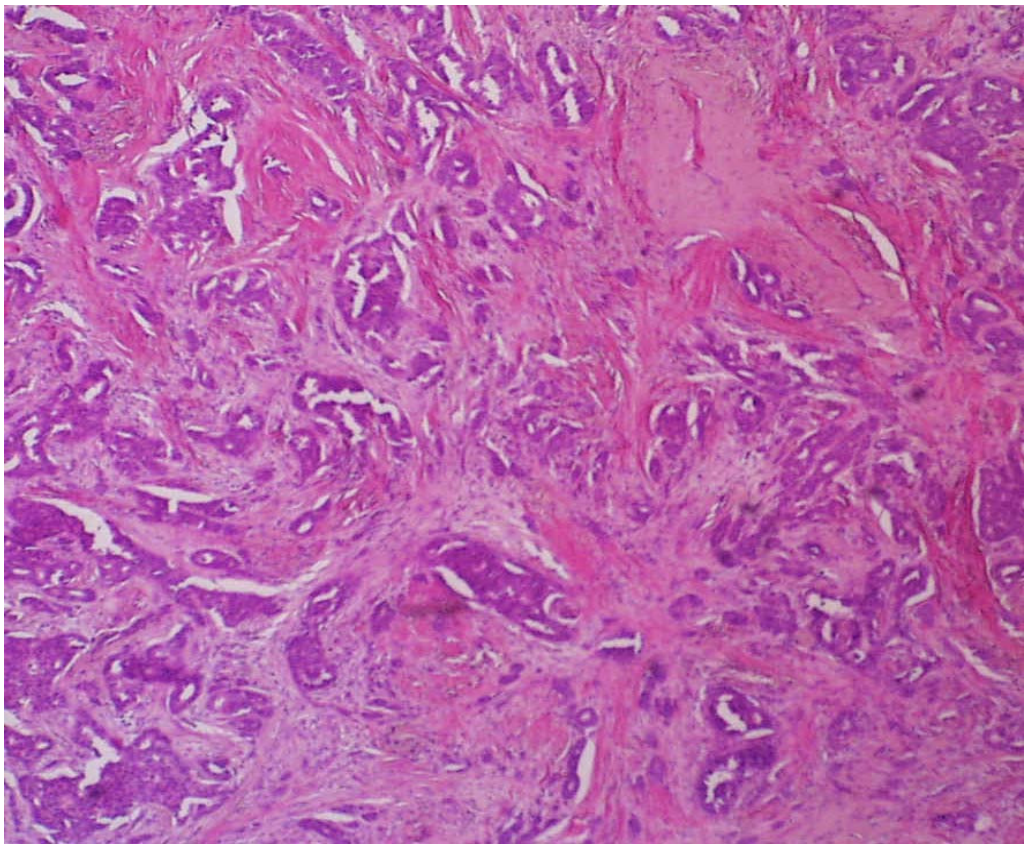
4.1. Analiza kliničkih i laboratorijskih podataka u odnosu na histološku diferenciranost tumora

U trenutku postavljanja dijagnoze bolesnice su bile u rasponu od 30 do 86 godina (prosječno 57,5 god), a po gradusima prosječno: gradus I, 58,4 ; gradus II 56,6 ; gradus III 57,6. U tablici 4 prikazane je odnos prognostičkih pokazatelja karcinoma dojke prema stupnju diferenciranosti tumora. Na slici 1 prikazan je karcinom dojke, bojanje hemalaun eozinom, a na slikama 2-4 prikazani su primjeri rezultata imunohistokemijskog bojanja. Na slikama 5 i 6 prikazani su primjeri histograma dobivenih protočnom citometrijom diploidnog i aneuploidnog karcinoma dojke.

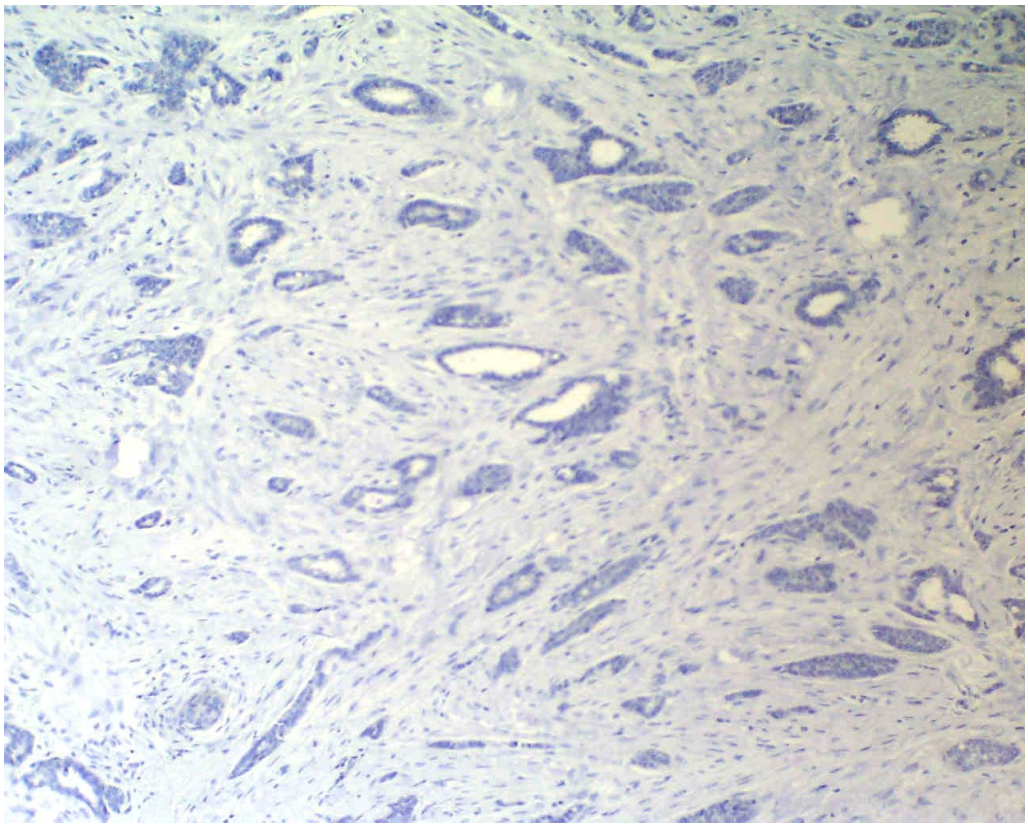
U skupini dobro diferenciranih tumora bolesnice su u trenutku postavljanja dijagnoze bile najčešće u prvom stadiju blesti (26 bolesnica) dok je samo 5 bolesnica u skupini slabo diferenciranih tumora bilo u prvom stadiju bolesti. Bolesnice skupine srednje diferenciranih tumora su u čak u 20 slučajeva bile u prvom stadiju bolesti, a prvi i drugi stadij bolesti čini ukupno 48 slučajeva. Najviše bolesnica u trećm stadiju bolesti (n=12) bilo je u grupi sa slabo diferenciranim tumorima ($P<0,001$). Bolesnice sa slabije diferenciranim tumorima imale su značajno veće tumore ($P<0,001$) (slika 7), veći broj limfnih čvorova s metastazama ($P=0,002$) (slika 8), bile su u višem stadiju bolesti ($P<0,001$) (slika 9), češće imale negativne estrogenske receptore ($P=0,02$) (slika 10), aneuploidne tumore ($P<0,001$) (slika 11) te višu proliferacijsku aktivnost tumora ($P<0,001$) (slika 12). Najveći broj bolesnica pozitivnih na Cox-2 bio je u skupini bolesnica s srednje diferenciranim tumorima ($P=0,02$) (slika 13). Odnos veličine tumora i Cox-2 u tumorima prikazan je na slici 14 ($P=0,061$), a odnos ploidnosti i Cox-2 na slici 15 ($P=0,031$) .

Tablica 4. Odnos prognostičkih čimbenika i stupnja diferenciranosti karcinoma dojke

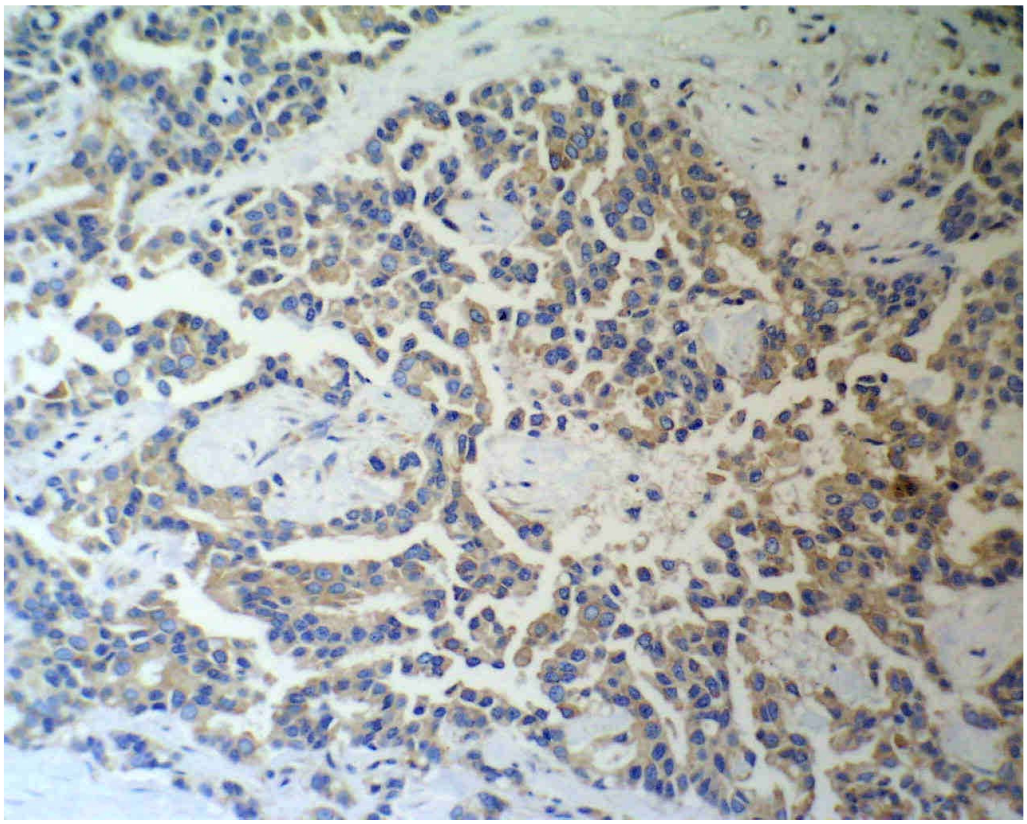
Karakteristike bolesnica	gradus I	gradus II	gradus III	χ^2	*df*	P
Broj bolesnica	50	50	50			
Dob (sr. vrijednost)	58,4	56,6	57,6			P=0,717
Veličina tumora						
T1 (<2cm)	**34**	**31**	**15**	**21,4**	**6**	**P<0,001**
T2 (2-5 cm	**12**	**18**	**25**			
T3 (5-10 cm)	**1**	**0**	**1**			
T4 (>10 cm i exul.)	**3**	**1**	**9**			
Limfni čvorovi						
N0	**30**	**27**	**15**	**11,17**	**4**	**P=0,024**
N1	**20**	**22**	**33**			
N2	**0**	**1**	**2**			
Stadij bolesti						
I	**26**	**20**	**5**	**26,2**	**4**	**P<0,001**
II	**20**	**28**	**33**			
III	**4**	**2**	**12**			
Hormonski receptori						
ER (-)	**12**	**22**	**26**	**7,42**	**2**	**P=0,024**
ER (+)	**34**	**27**	**23**			
PR (-)	17	23	27	3,1	2	P=0,207
PR (+)	29	26	22			
Cox-2						
(-,+)	**32**	**20**	**28**	**8**	**2**	**P=0,018**
(++, +++)	**15**	**30**	**20**			
Ploidnost tumora						
Diploidni tumori	**31**	**14**	**7**	**32,3**	**2**	**P<0,001**
Aneuploidini tumori	**13**	**31**	**42**			
S faza tumora						
Visoka proliferacija	**4**	**20**	**34**	**36,3**	**2**	**P<0,001**
Niska proliferacija	**40**	**25**	**14**			



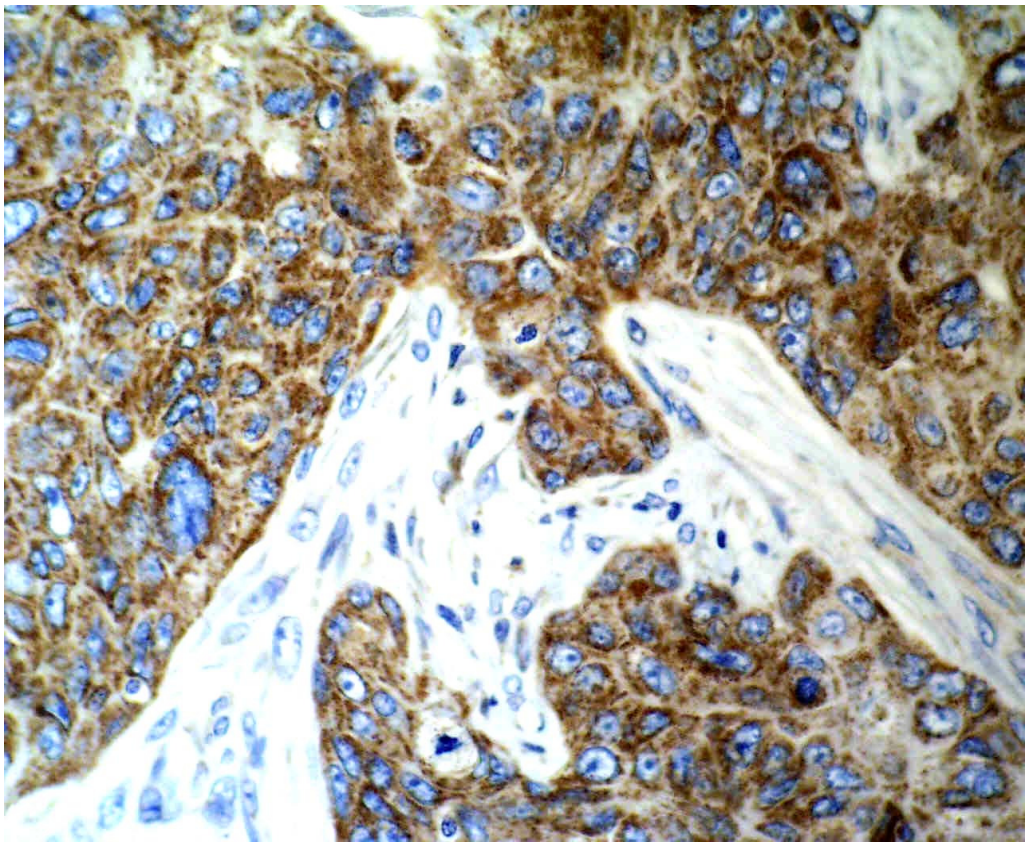
Slika 1. Duktalni invazivni krcinom (H.E. 200x)



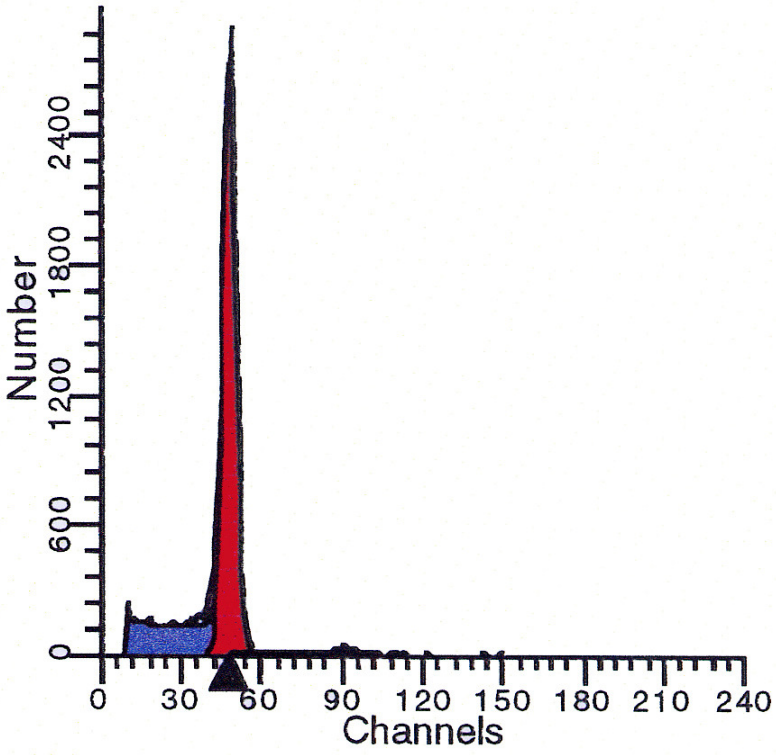
Slika 2. Negativna reakcija na Cox-2 protein u tumorskim stanicama (IMH, Cox-2, 200x)



Slika 3. Srednje jaka reakcija u citoplazmi stanica karcinoma dojke (IMH, Cox-2, 400x)

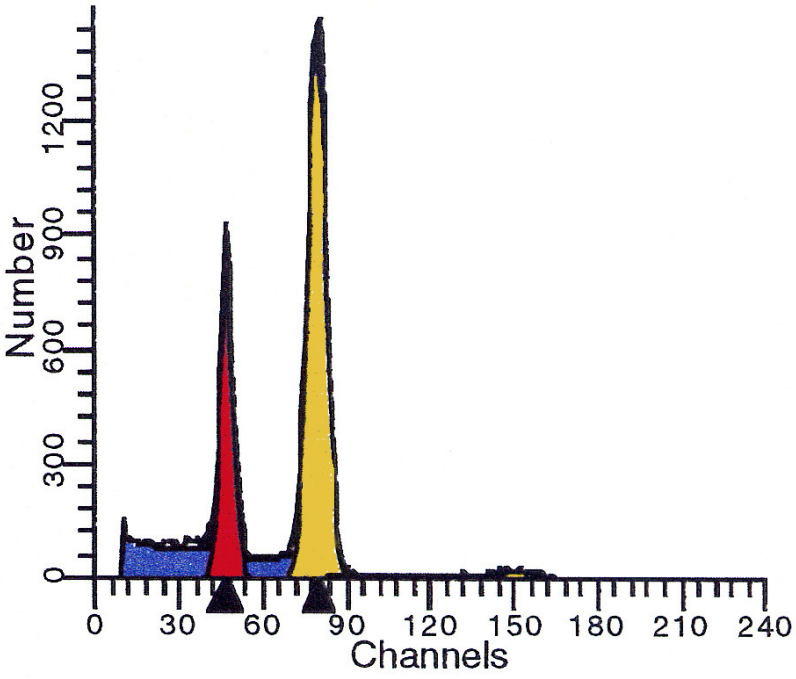


Slika 4. Jaka zrnata citoplazmatska reakcija u tumorskim stanicama (IMH, Cox-2, 400x)



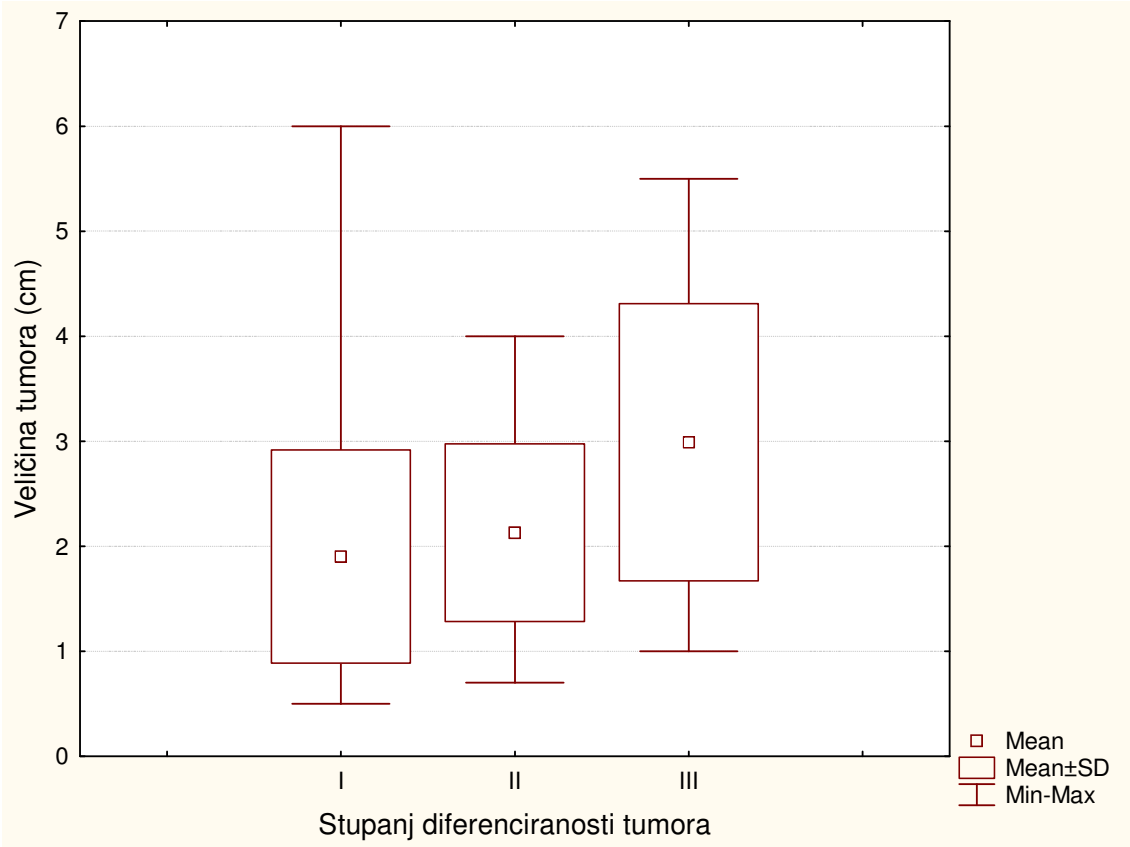
Diploidni tumor:
G0/G1: 97,74 %
G2/M : 1,39 %
Frakcija S faze:0,87%
CV : 4,88%

Slika 5. Histogram dobiven protočnom citometrijom diploidnog karcinoma dojke

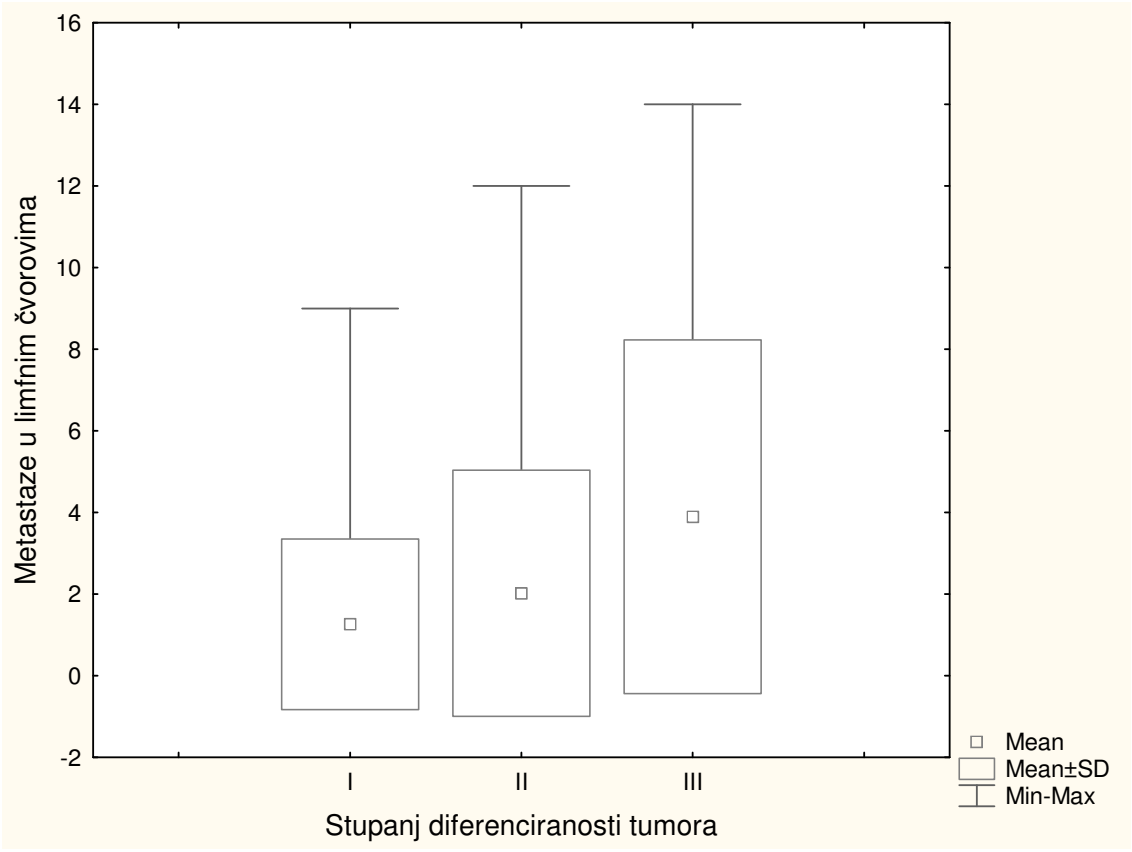


Aneuploidni tumor:
Diploidna frakcija:
29,56 %
Aneuploidna frakcija:
71,44 %
Ukupna S faza:3,46 %
DNA Index (DI)=1,68

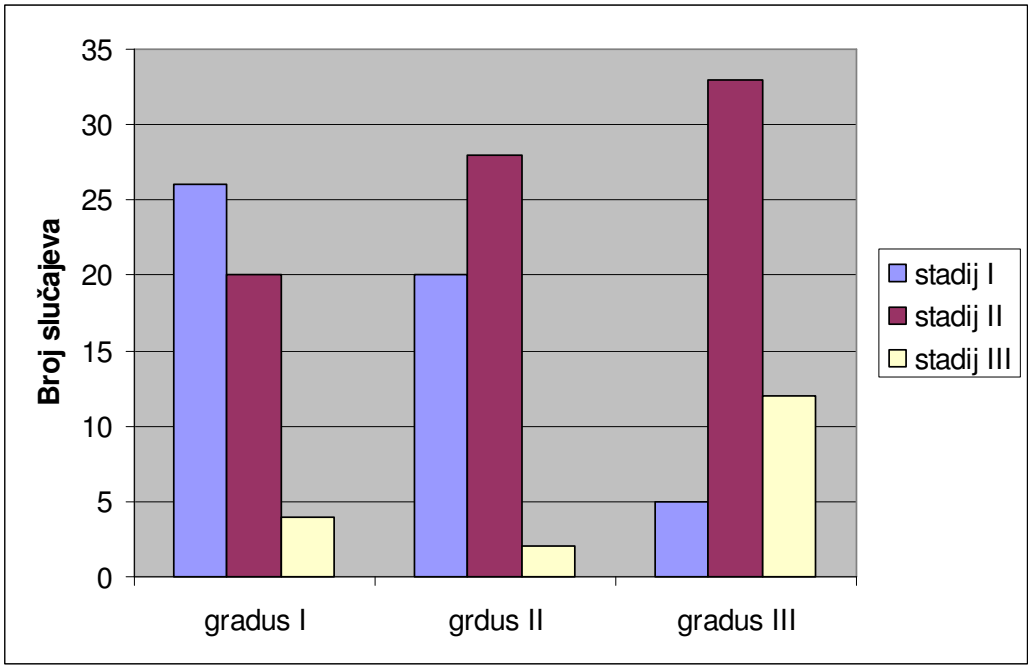
Slika 6. Histogram dobiven protočnom citometrijom aneuploidnog karcinoma dojke



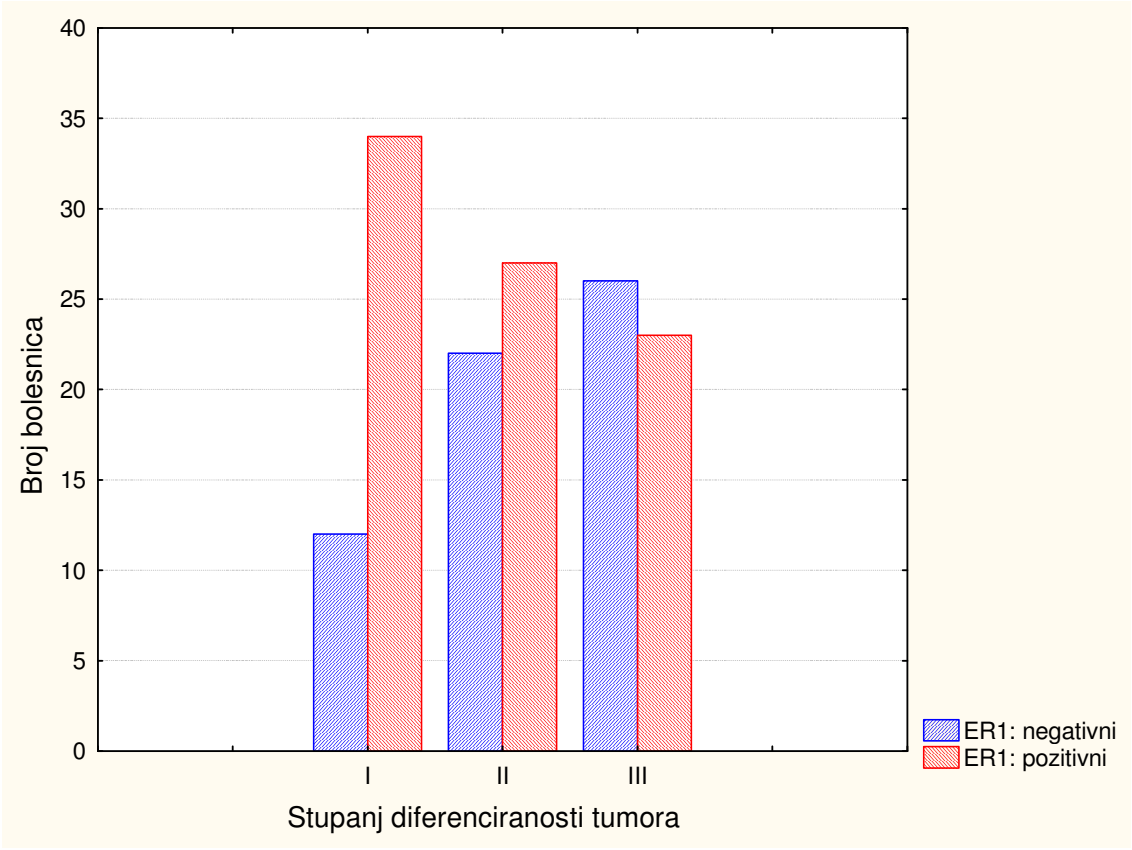
Slika 7. Odnos stupnja diferenciranosti tumora i veličine tumora: F(2; 145)=0,278; P<0,001.



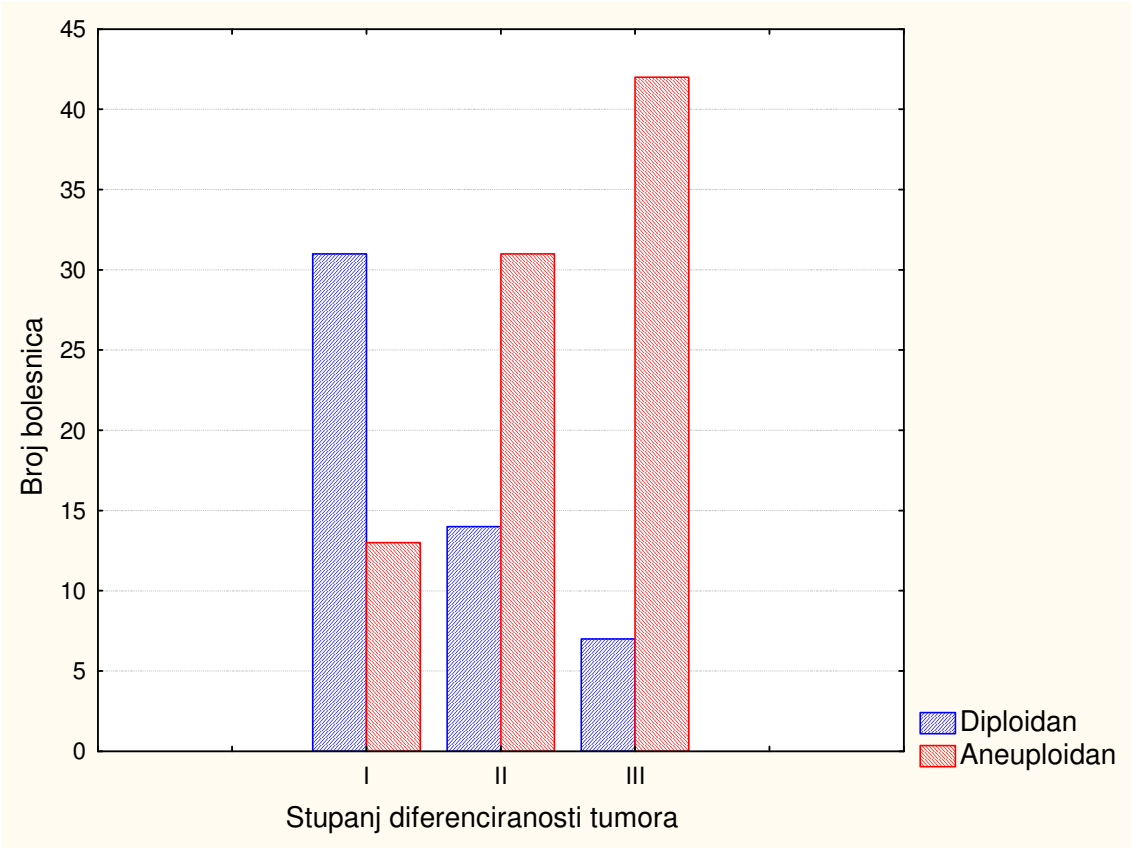
Slika 8. Odnos stupnja diferenciranosti tumora i statusa limfnih čvorova: F(2;145)=8,494; P=0,002.



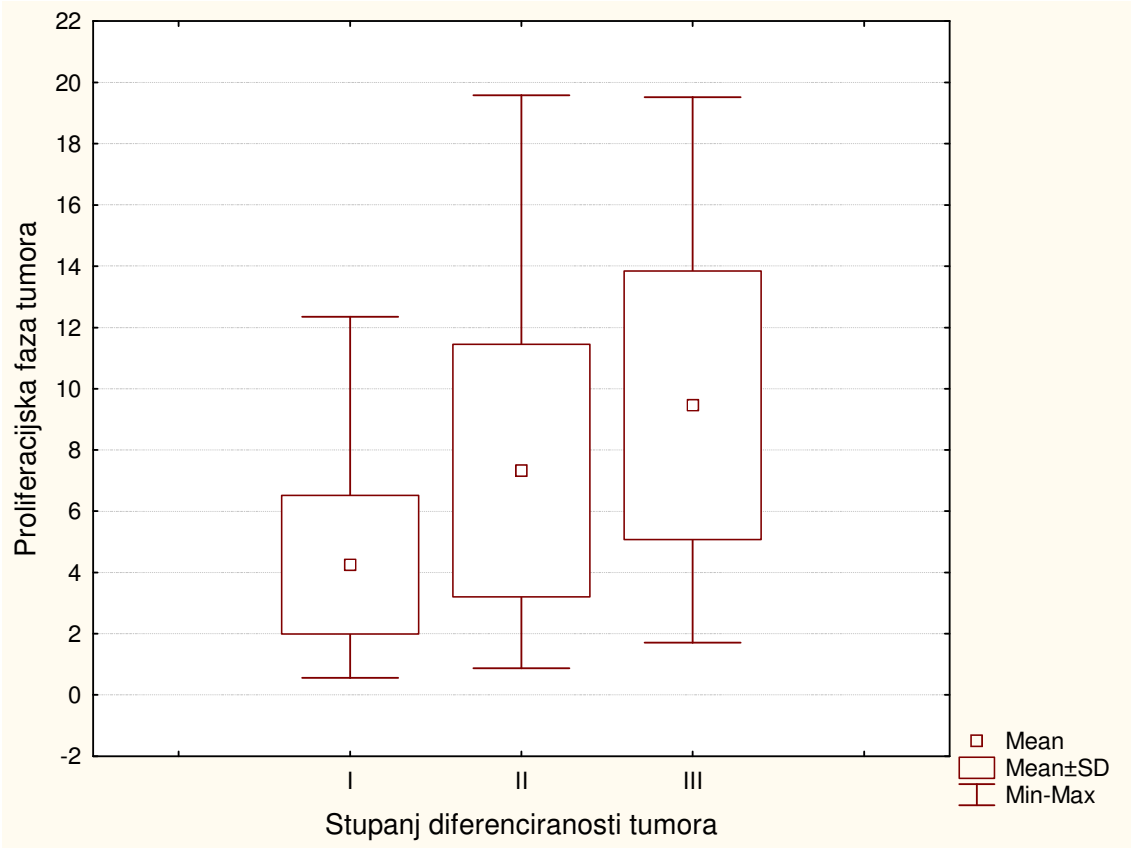
Slika 9. Odnos stupnja diferenciranosti tumora i stadija bolesti (χ^2=26,2, df=4, P<0,001).



Slika 10. Odnos stupnja diferenciranosti i statusa estrogenskih receptora (χ^2=7,421, df=2, P=0,024)



Slika 11. Odnos stupnja diferenciranosti i ploidnosti tumora (χ^2=32,3, df=2, P<0,001).



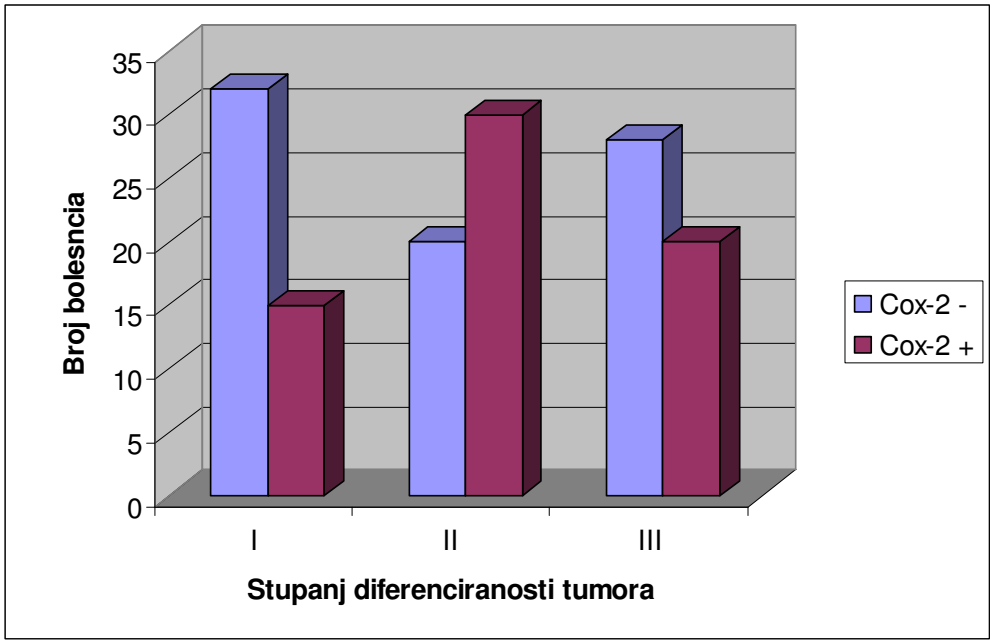
Slika 12. Odnos stupnja diferenciranosti s proliferacijskom fazom tumora(S-faza), F(2;134)=5,240; P<0,001).

4.2. Analiza kliničkih i laboratorijskih podataka u odnosu na izražajnost Cox-2 u tumorima

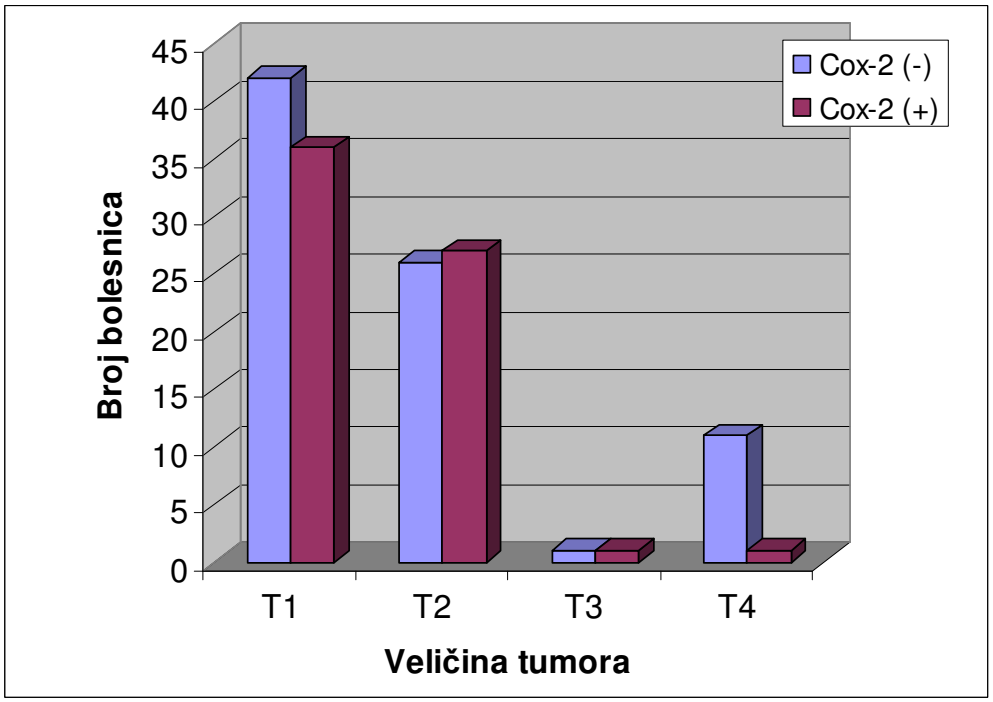
U tablici 5 prikazan je odnos ukupnog broja Cox-2 pozitivnih i Cox-2 negativnih bolesnica te njihova povezanost s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima. Bolesnice sa srednje diferenciranim tumorima i bolesnice s aneuploidnim tumorima bile su najčešće pozitivne na Cox-2 protein.

Tablica 5. U tablici su prikazani ukupni rezultat analize Cox-2 i njegova povezanost s kliničkim i laboratorijskim pokazateljima.

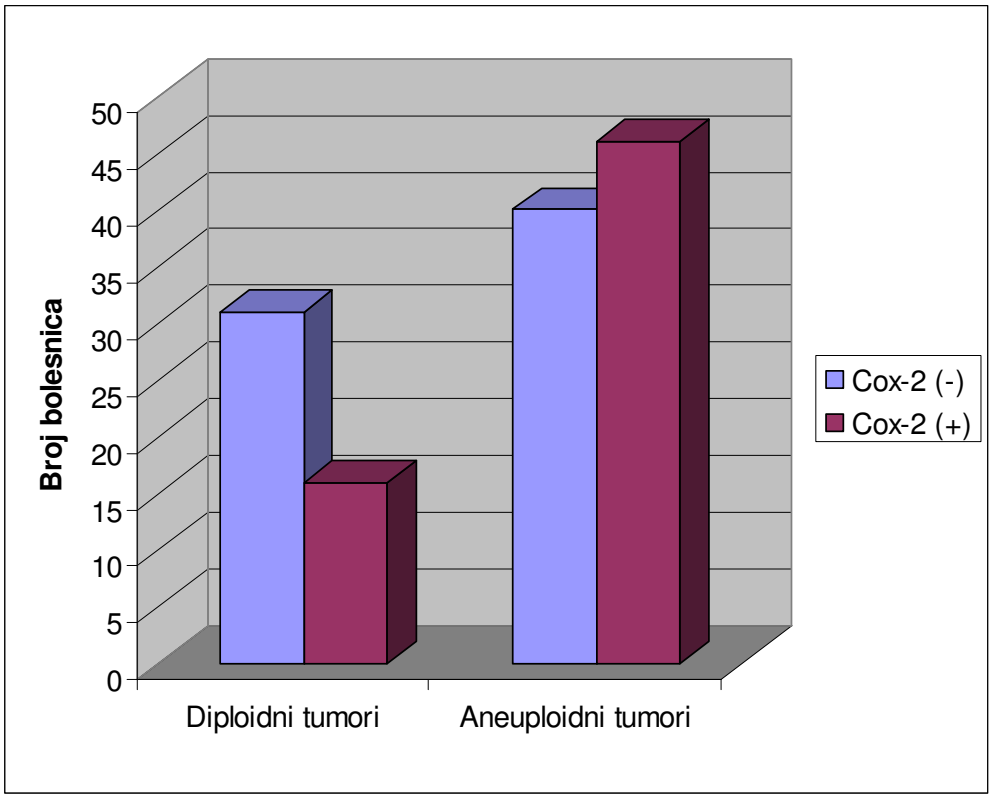
Karakteristike bolesnica	Cox-2 negativan	Cox-2 pozitivan	χ^2	*df*	P
Gradus tumora					
I	**32**	**15**	**8,01**	**2**	**P=0,018**
II	**20**	**30**			
III	**28**	**20**			
Veličina tumora					
T1 (<2cm)	42	36	7,34	3	P=0,061
T2 (2-5 cm	26	27			
T3 (5-10)	1	1			
T4 (>10 i exulc.)	11	1			
Limfni čvorovi					
N	38	32	0,69	2	P=0,707
N1	41	31			
N2	1	2			
Hormonski receptori					
ER (-)	29	30	0,68	1	P=0,407
ER (+)	45	35			
PR (-)	34	32	0,14	1	P=0,698
PR (+)	40	33			
Ploidnost tumora					
Diploidni tumori	**31**	**16**	**4,61**	**1**	**P=0,031**
Aneuploidini tumori	**40**	**46**			
S faza tumora					
Visoka proliferacija	41	34	0,05	1	P=0,816
Niska proliferacija	30	27			



Slika 13. Odnos stupnja diferenciranosti i izražajnosti Cox-2 u tumorima (χ^2=8,01, df=2, P=0,018).



Slika 14. Odnos veličine tumora i izražajnosti Cox-2 u tumorima (χ^2=7,34, df=3, P=0,061).



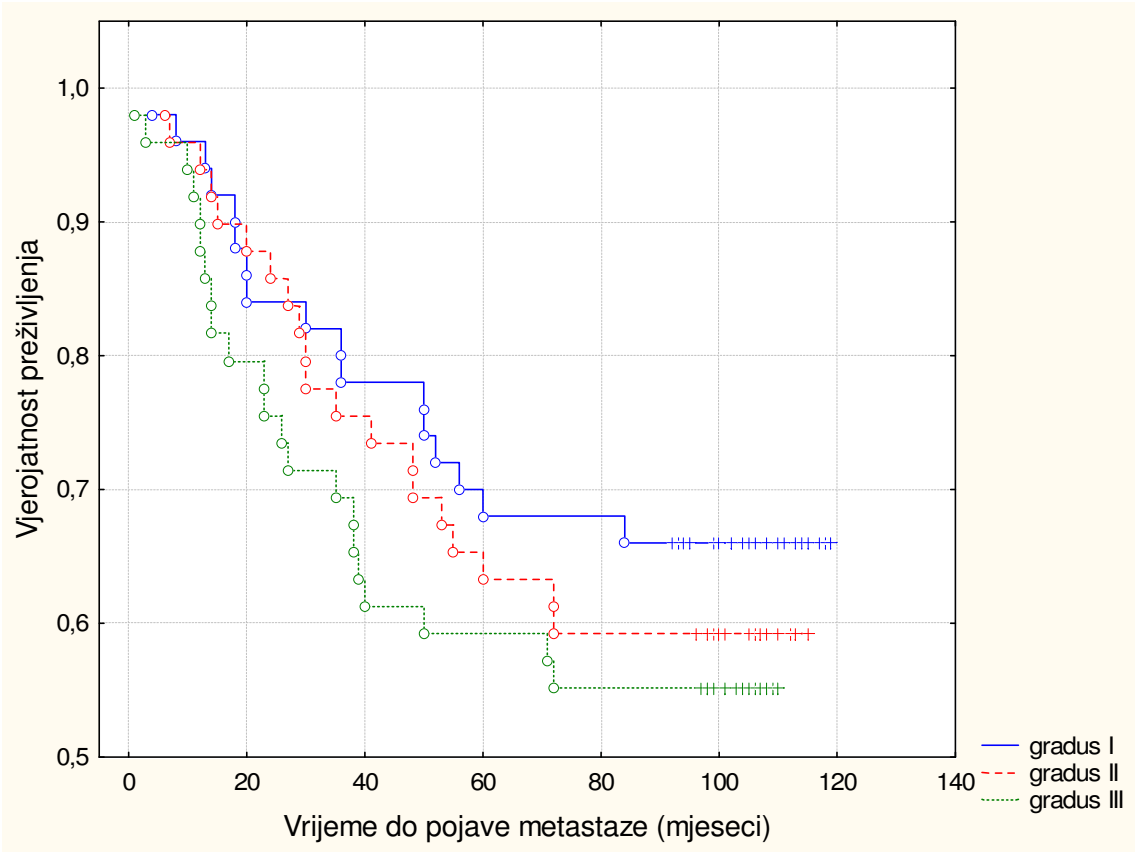
Slika 15. Odnos ploidnosti tumora i izražajnosti Cox-2 u tumorima (χ^2=4,61, df=1, P=0,031).

4.3. Kaplan-Meierova analiza dobivanja metastaza

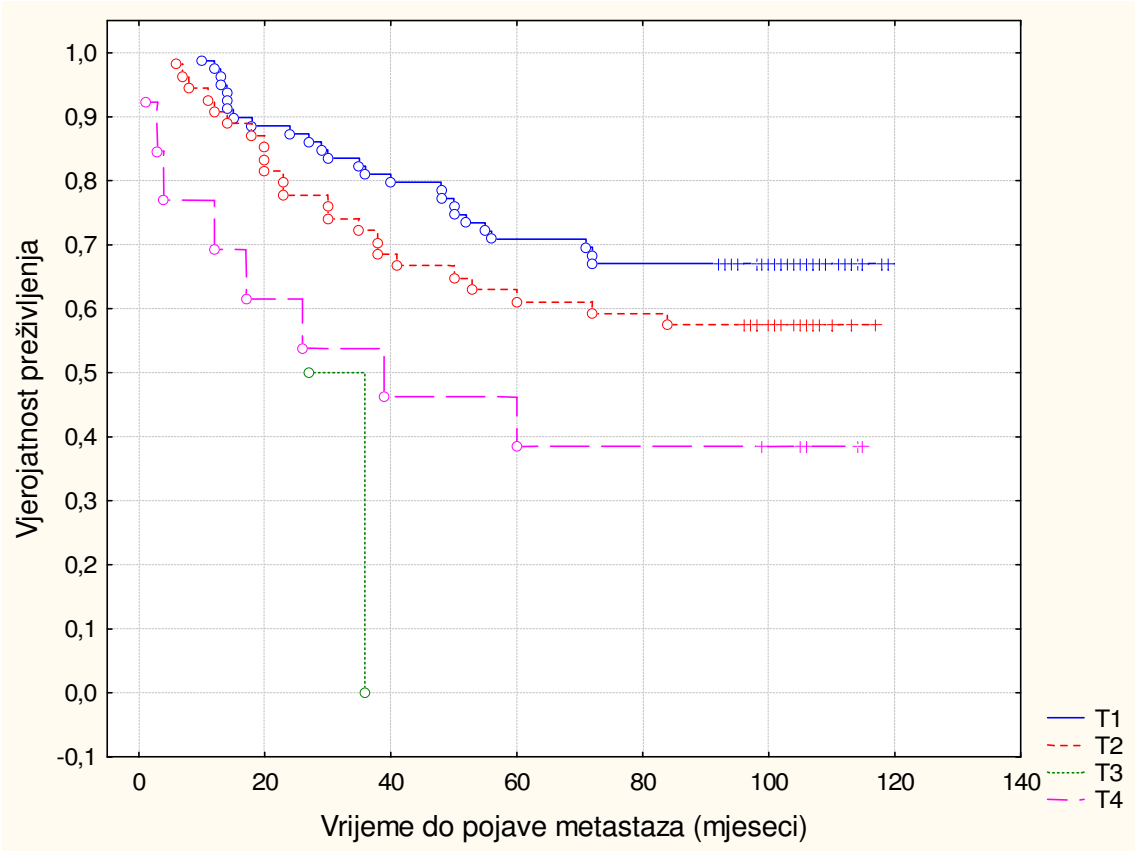
Na tablici 6 prikazani su podaci o odnosu ispitivanih kliničkih i laboratorijskih podataka o dobivanju metastaza. Na slikama 16-23 prikazane su krivulje dobivanja metastaza u odnosu na ispitivane kliničke i laboratorijske pokazatelje (○ bolesnice koje su dobile metastaze, + bolesnice koje nisu dobile metastaze). Od ukupno 150 ispitanica tijekom praćenja od 120 mjeseci (1995-2004.) njih 59 (39,3%) dobilo je metastaze. Od bolesnica koje su dobile metastaze nakon završnog praćenja (12. mjesec, 2004.) samo je 5 (8,5%) živo dok su 54 umrle (91.5%). Raspon u kojem su bolesnice dobivale metastaze je od 1 do 84 mjeseci.

Tablica 6. Kaplan-Meierova analiza dobivanja metastaza

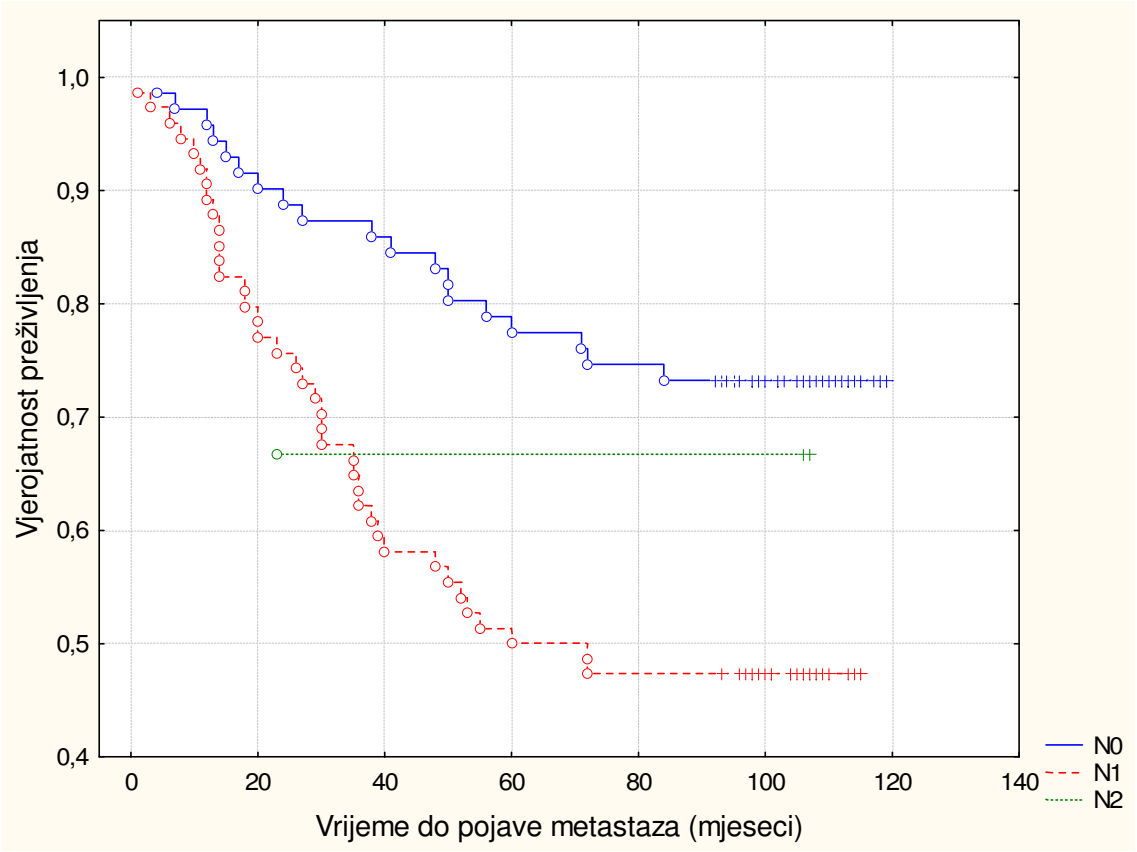
ISTRAŽIVANI POKAZATELJI	**Dobivanje metastaza (mjeseci)**		***N/C****	***χ^2 /Z****	***P***
	X±SD	*Medijan*			
HISTOLOŠKI GRADUS					
1	82,2±38,2	101	17/33	1,947	0,378
2	77,4±38,2	99	20/29		
3	69,3±41,0	98	22/27		
VELIČINA TUMORA					
T1	**83,2±36,1**	**101**	**26/45**	**9,19**	**0,027**
T2	**73,4±39,6**	**98**	**23/28**		
T3	**31,5±6,4**	**31**	**2/0**		
T4	**53,9±47,2**	**39**	**8/5**		
LIMFNI ČVOROVI					
N0	**88,2±34,0**	**102**	**19/45**	**11,34**	**0,003**
N1	**64,8±40,8**	**66**	**39/32**		
N2	**78,6±48,2**	**106**	**1/1**		
ESTROGENSKI RECEPTORI					
Negativni	**65,8±41,9**	**92**	**29/27**	**-2,267***	**0,023**
Pozitivni	**82,8±35,9**	**102**	**29/46**		
PROGESTERONSKI RECEPTORI					
Negativni	**68,2±41,9**	**95**	**31/33**	**-1,92***	**0,054**
Pozitivni	**82,3±35,8**	**99**	**27/40**		
Cox-2					
Negativan (-,+)	74,5±39,9	98	32/47	-0,50*	0,616
Pozitivan (++, +++)	79,5±38,3	99	25/39		
PLOIDNOST TUMORA					
Diploidni	83,0±35,7	100	18/32	1,450*	0,147
Aneuploidni	72,3±40,7	98	37/41		
S FAZA TUMORA					
Niska	80,1±38,4	100	30/48	0,977*	0,328
Visoka	70,9±39,9	98	25/32		
TIP OPERACIJE					
Poštedna	**90,6±28,7**	**101**	**7/18**	**-2,238***	**0,025**
Radikalna	**72,8±40,7**	**98**	**52/60**		
KEMOTERAPIJA					
+	**67,3±41,1**	**97**	**29/30**	**1,991***	**0,046**
-	**82,8±36,7**	**101**	**30/48**		
RADIOTERAPIJA					
+	76,2±38,6	98	40/50	-0,119*	0,905
-	76,6±40,9	101	19/28		
HORMONOTERAPIJA					
+	77,3±37,9	99	25/30	-.252*	0,801
-	75,6±40,4	98	34/48		
LOKALNI RECIDIV					
+	**55,5±32,4**	**60**	**9/2**	**2,109***	**0,035**
-	**78,0±39,3**	**99**	**50/76**		



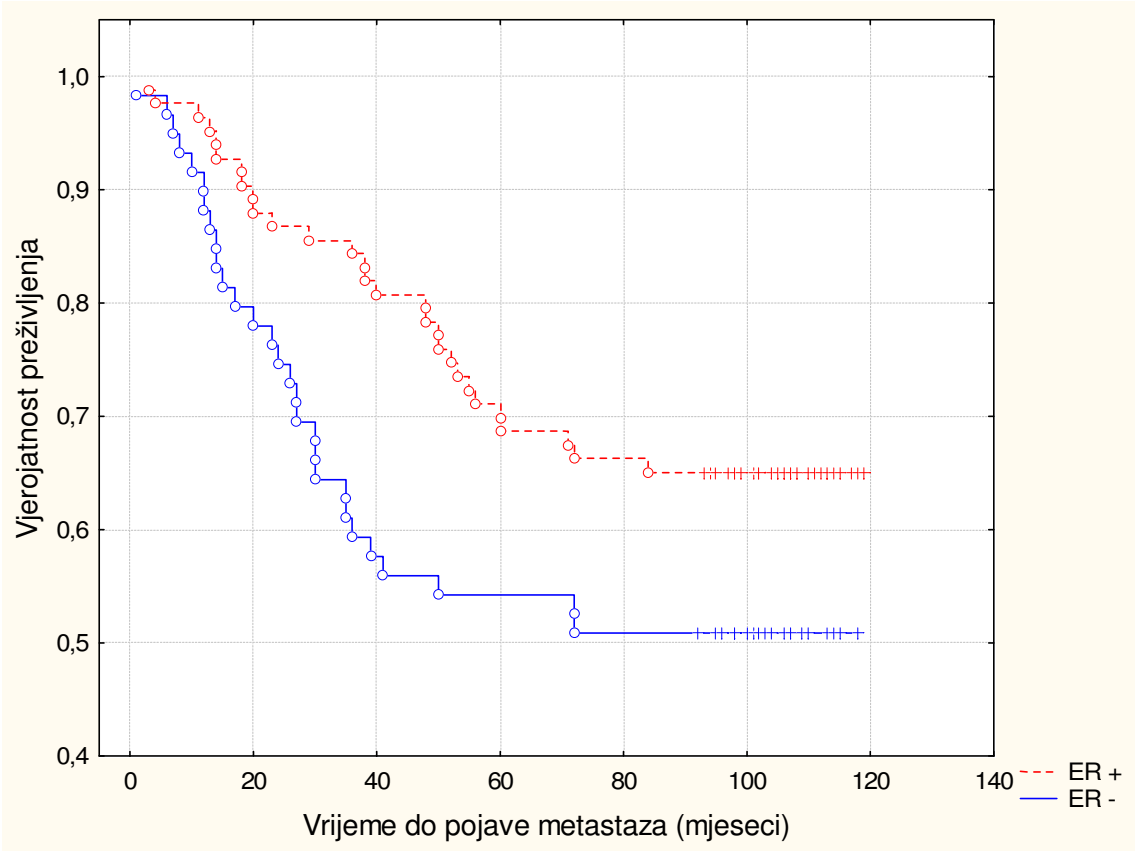
Slika 16. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema stupnju diferenciranosti tumora (P=0,378)



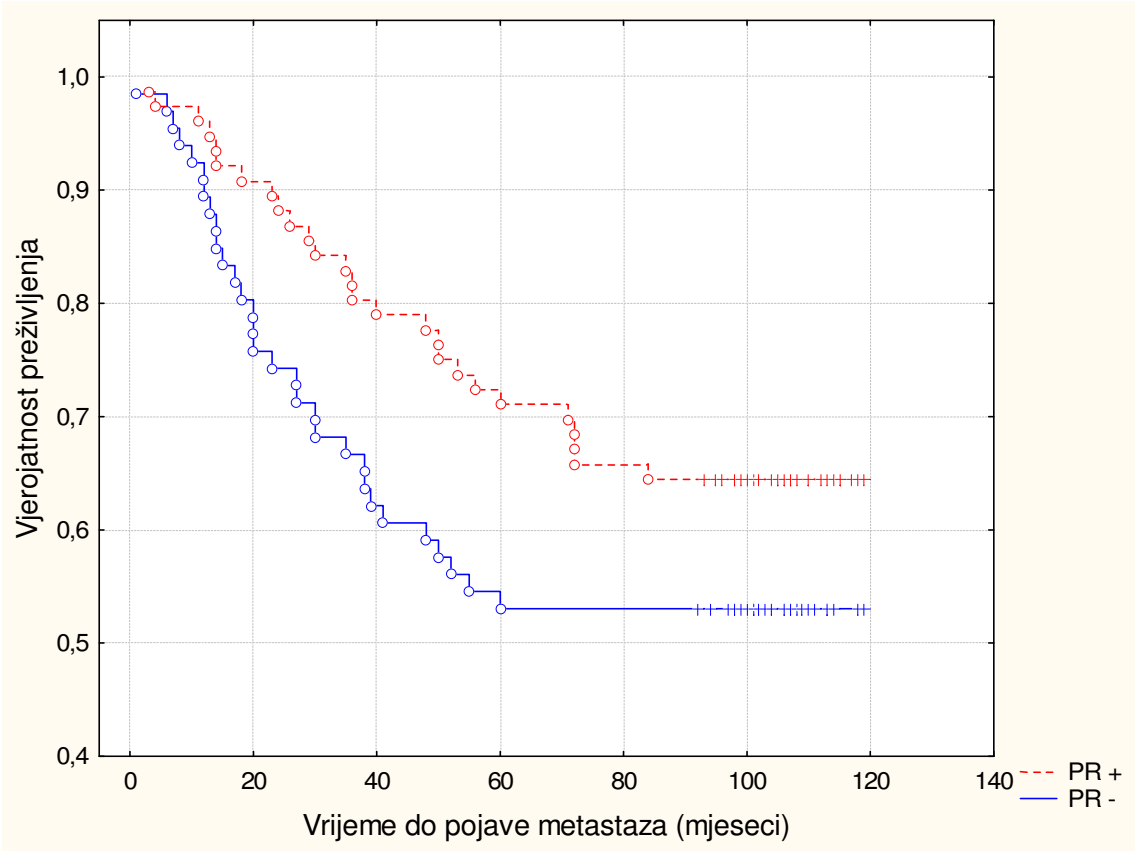
Slika 17. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema veličini tumora (T1-T4) (P=0,027)



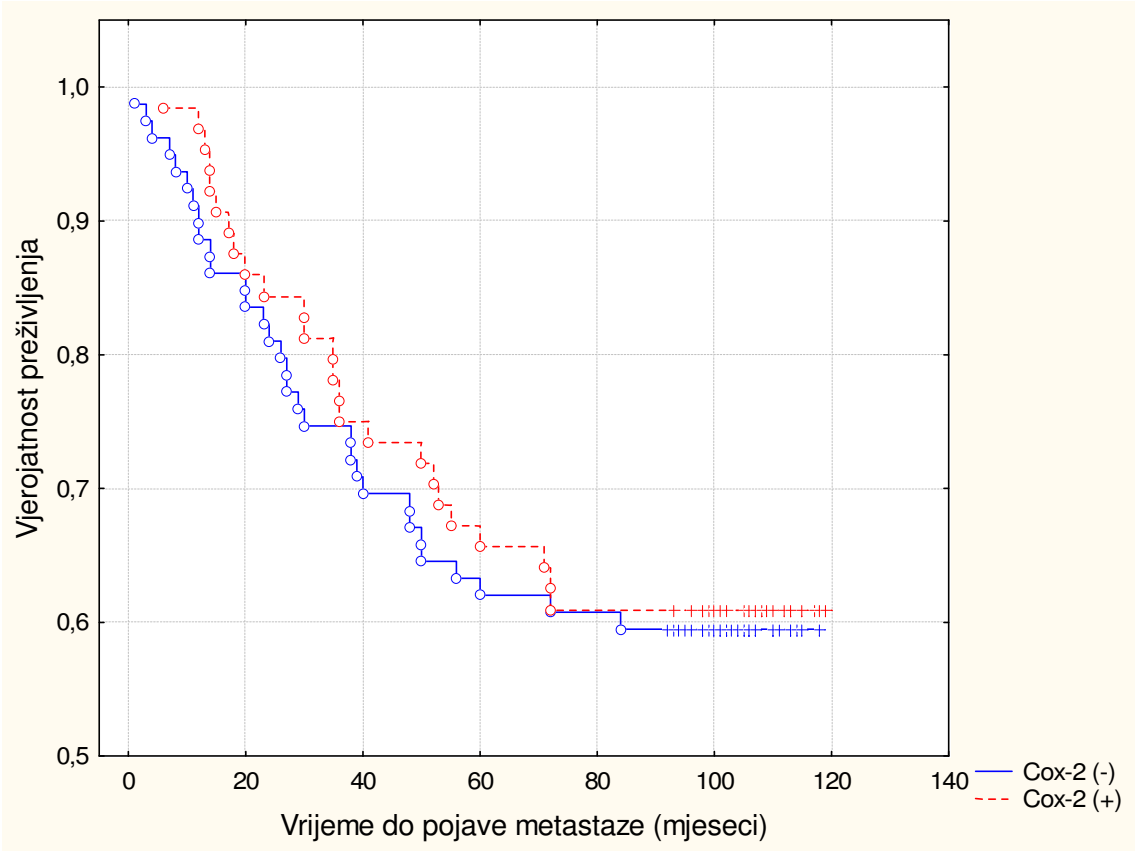
Slika 18. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema zahvaćenosti limfnih čvorova (P=0,003)



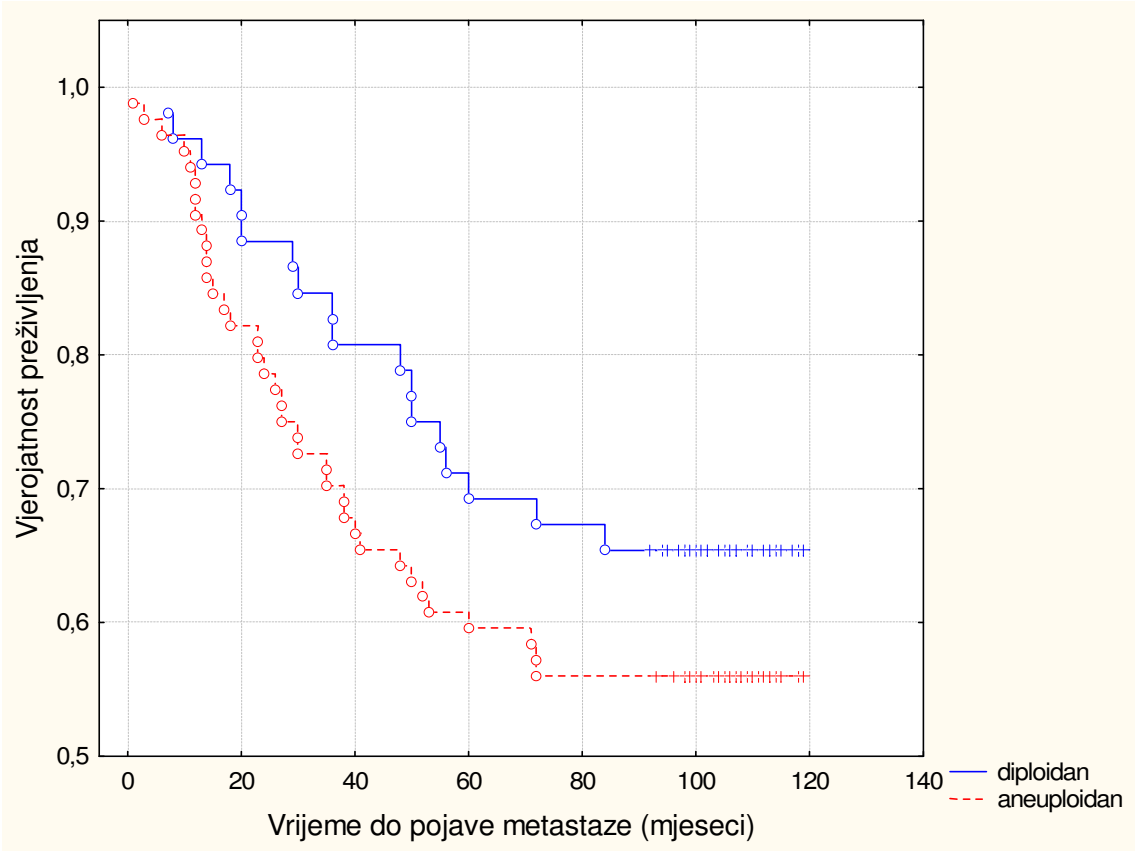
Slika 19. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema statusu estrogenskih receptora (P=0,023)



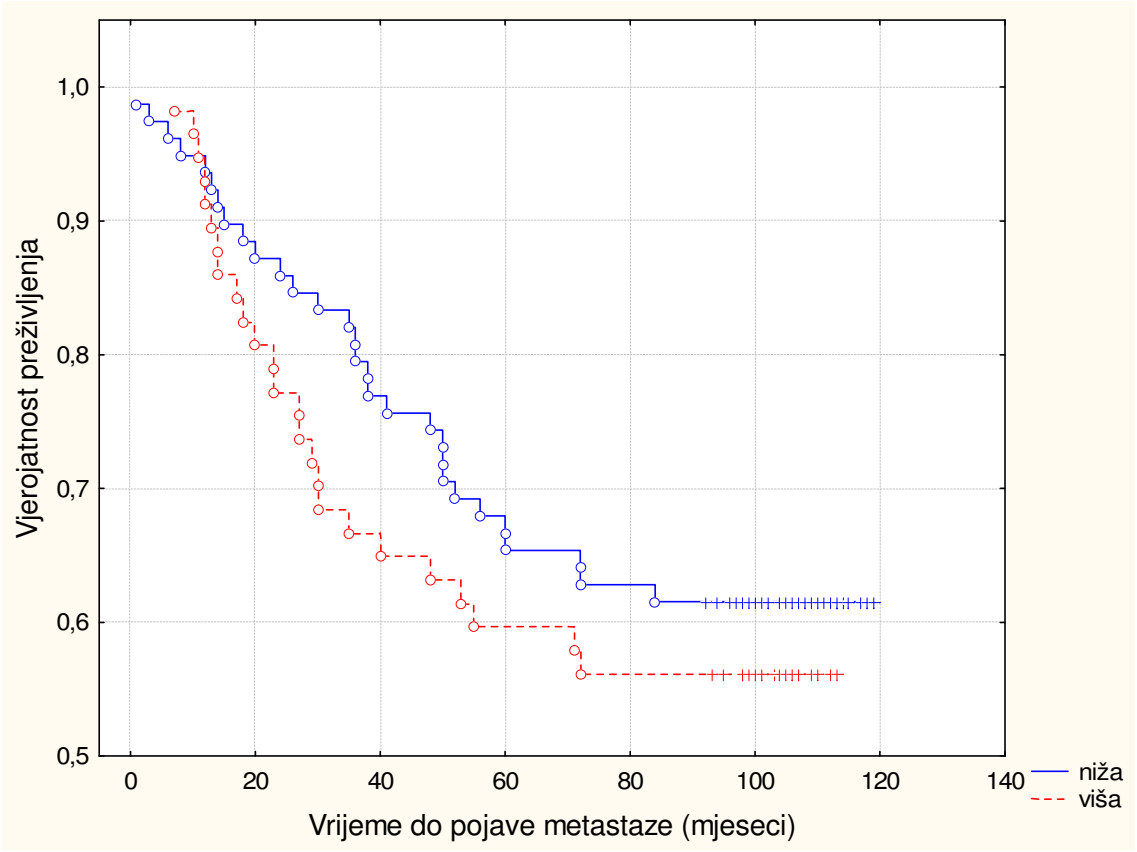
Slika 20. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema statusu progesteronskih receptora (P=0,054)



Slika 21. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema izražajnosti Cox-2 proteina (P=0,616)



Slika 22. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema ploidnosti tumora (P=0,147)

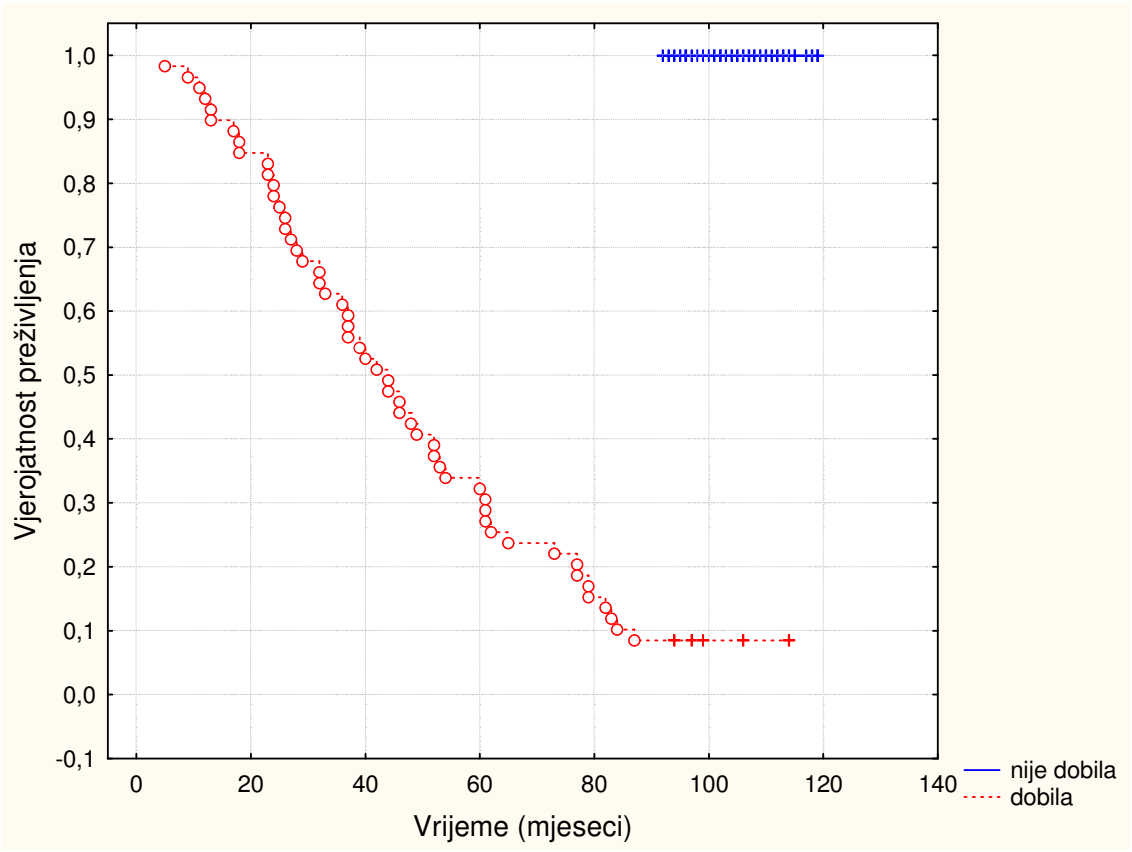


Slika 23. Pojava metastaza u u bolesnica s rakom dojke prema proliferacijskoj fazi (S faza) (P=0,328)

4.4. Kaplan-Meierova analiza preživljenja

4.4.1. Ukupno preživljenje

Na slici 24 prikazano je preživljenje u 150 ispitanica s rakom dojke operiranih u periodu od siječnja, 1995. do svibnja, 1997. godine (○ umrle bolesnice, + žive bolesnice). Od ukupno 150 ispitanica tijekom istraživanja (1995-2004.) umrle su 54 (36,49%) ispitanice, dok je 94 (63,51%) živih (cenzorirani podaci). Dvije bolesnice koje u toku 5 godišnjeg praćenja nisu imale recidiv bolesti, izgubili smo iz daljnjeg praćenja. Raspon preživljenja umrlih bolesnika bio je od 5 do 87 mjeseci. Prosjek (aritmetička sredina) preživljenja je 91 mjeseci (95% interval pouzdanosti: 85-98 mjeseci). Nakon 2 godine praćenja vjerojatnost preživljenja je 91%, a nakon 5 godina je 73%. Nakon 9 godina praćenja (koliko je trajalo istraživanje) vjerojatnost preživljenja je 63%.



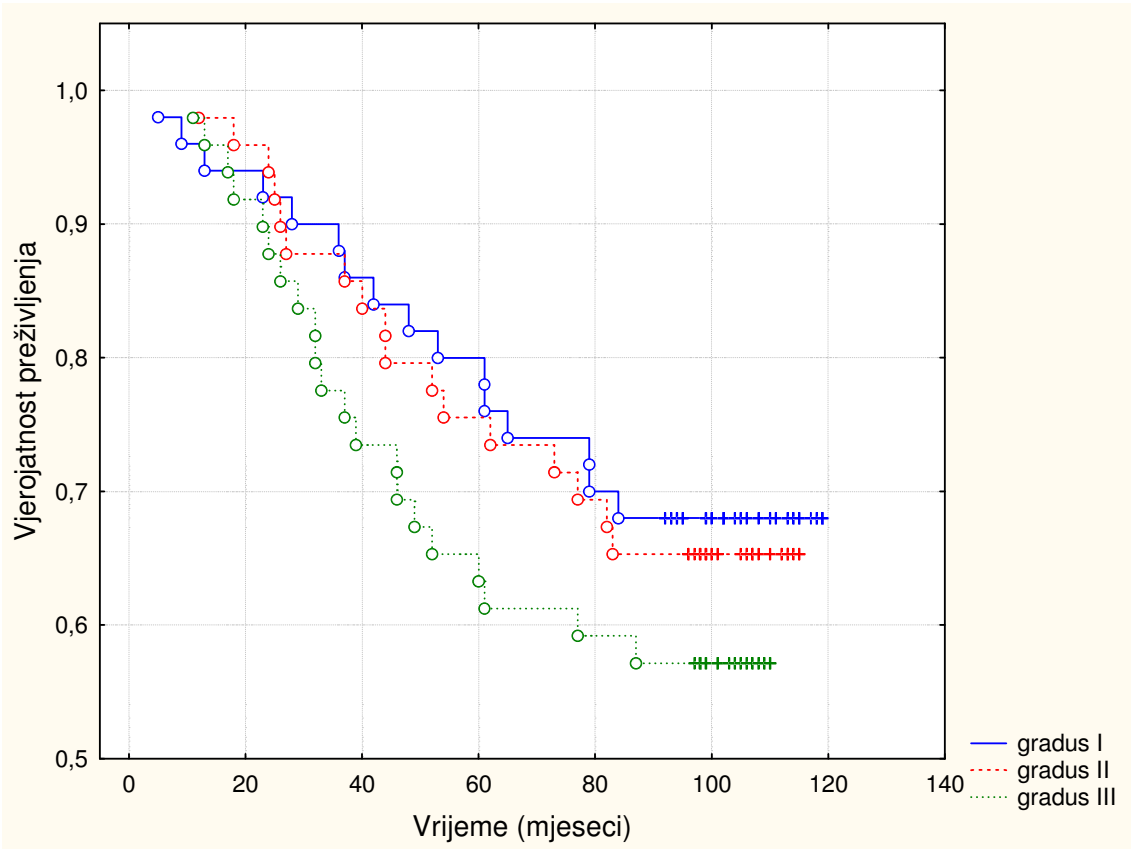
Slika 24. Ukupno preživljenje bolesnica

4.4.2. Preživljenje u odnosu na prognostičke čimbenike

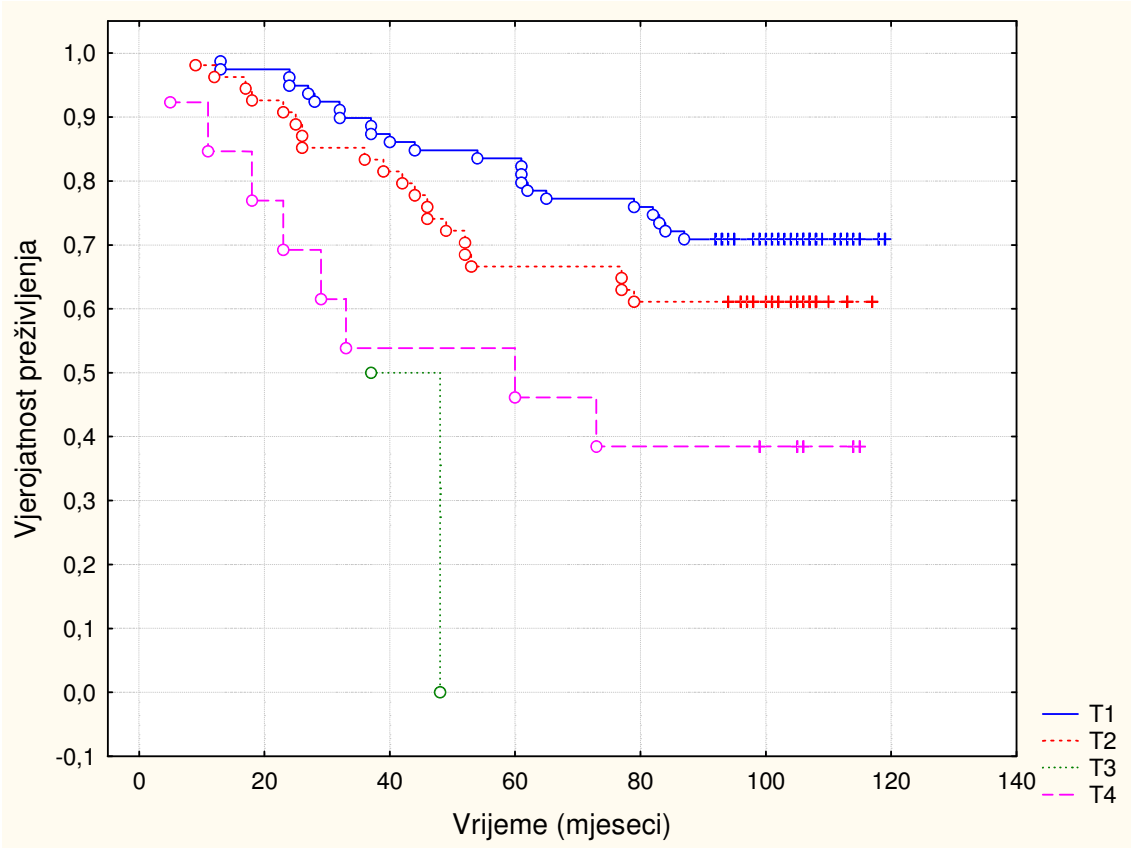
U tablici 7 prikazani su rezultati Kaplan-Meierove analize povezanosti istraživanih prognostičkih čimbenika u odnosu na ukupno preživljenje u 150 ispitanica s rakom dojke. Na slikama 24-32 prikazane su krivulje preživljenja u odnosu na ispitivane kliničke i laboratorijske pokazatelje (○ umrle bolesnice, + žive bolesnice). Na slikama 33-36 prikazane se krivulje preživljenja u odnosu na način liječenja (○ umrle bolesnice, + žive bolesnice). Za testiranje povezanosti prognostičkih čimbenika i preživljenja upotrijebljena Kaplan-Meierova analiza preživljenja. Nađena je statistički značajna povezanost između veličine tumora (P=0,010), statusa limfnih čvorova i preživljenja (P=0,007) te estrogenskih (P=0,032) i progesteronskih receptora (P=0,027) i preživljenja ispitanica.

Tablica 7. Kaplan-Meierova analiza preživljenja

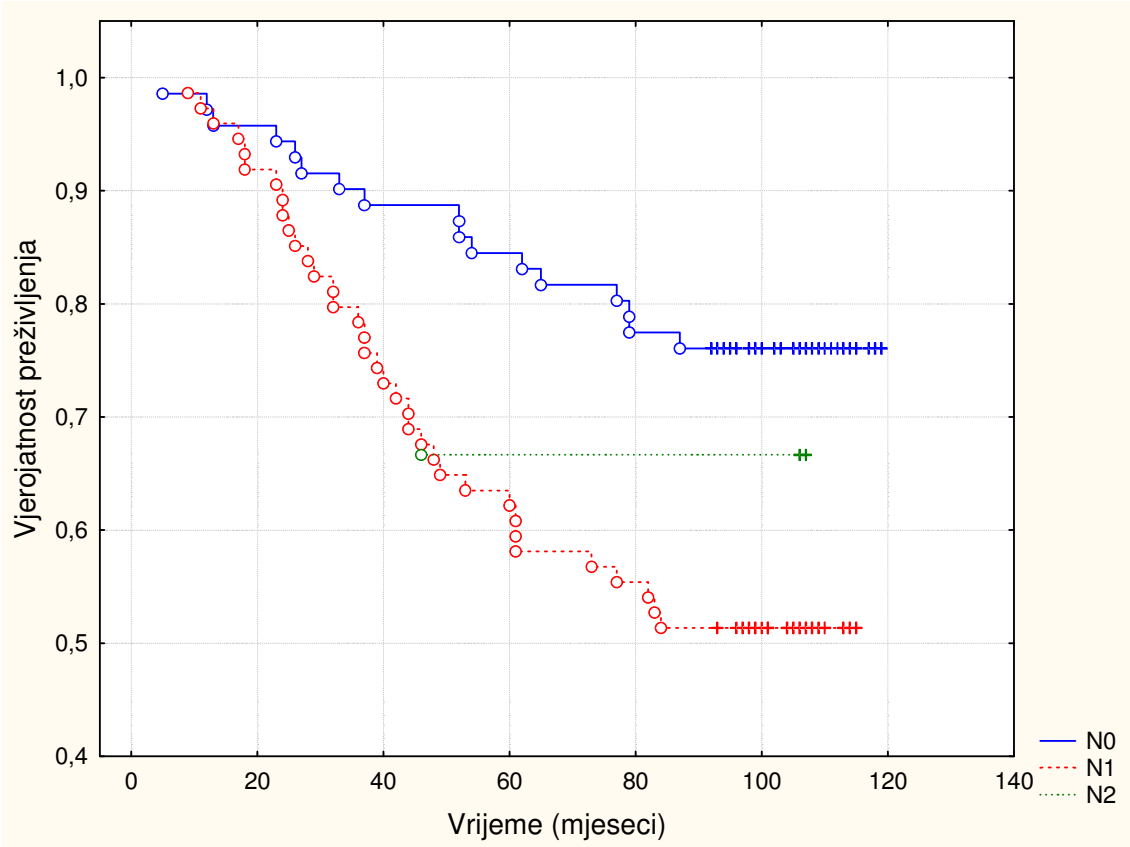
ISTRAŽIVANI POKAZATELJI	PREŽIVLJENJE (mjeseci)		*N/C**	χ^2 /Z*	*P*
	X±SD	Medijan			
HISTOLOŠKI GRADUS					
1	87,1±33,1	101	16/34	1,964	0,374
2	85,4±32,4	100	17/32		
3	76,0±35,3	98	21/28		
VELIČINA TUMORA					
T1	**89,9±29,8**	**102**	**23/56**		
T2	**79,4±34,3**	**98**	**21/33**	**11,267**	**0,010**
T3	**42,5±42,5**	**42**	**2/0**		
T4	**60,8±42,8**	**60**	**8/5**		
LIMFNI ČVOROVI					
N0	**92,0±29,6**	**102**	**17/54**	**9,912**	**0,007**
N1	**73,9±35,4**	**94**	**36/38**		
N2	**86,3±34,9**	**106**	**1/2**		
ESTROGENSKI RECEPTORI					
Negativni	**74,0±36,5**	**96**	**27/32**	**-2,147***	**0,032**
Pozitivni	**88,5±30,5**	**102**	**26/57**		
PROGESTERONSKI RECEPTORI					
Negativni	**75,3±36,6**	**97**	**30/36**	**-2,208***	**0,027**
Pozitivni	**88,7±30,1**	**99**	**23/53**		
Cox-2					
Negativan (-,+)	80,6±34,6	99	29/50	-0,456*	0,648
Pozitivan (++,+++)	87,0±31,8	101	23/41		
PLOIDNOST TUMORA					
Diploidni	88,2±31,1	100	16/36	1,322*	0.186
Aneuploidni	80,0±34,8	99	34/50		
S FAZA TUMORA					
Niska	86,6±32,8	101	27/51	0,924*	0,355
Visoka	78,1±34,4	98	23/34		
TIP OPERACIJE					
Poštedna	**95,4±23,7**	**101**	**5/24**	**-2,497***	**0,012**
Radikalna	**79,8±35,2**	**98**	**49/70**		
KEMOTERAPIJA					
+	75,7±35,6	98	26/36	1,592*	0,111
-	88,0±31,6	102	28/58		
RADIOTERAPIJA					
+	82,2±33,5	98	37/63	0,158*	0,874
-	84,2±34,5	102	17/31		
HORMONOTERAPIJA					
+	83,9±31,9	99	24/38	0,019	0,985
-	82,1±35,2	98	30/56		



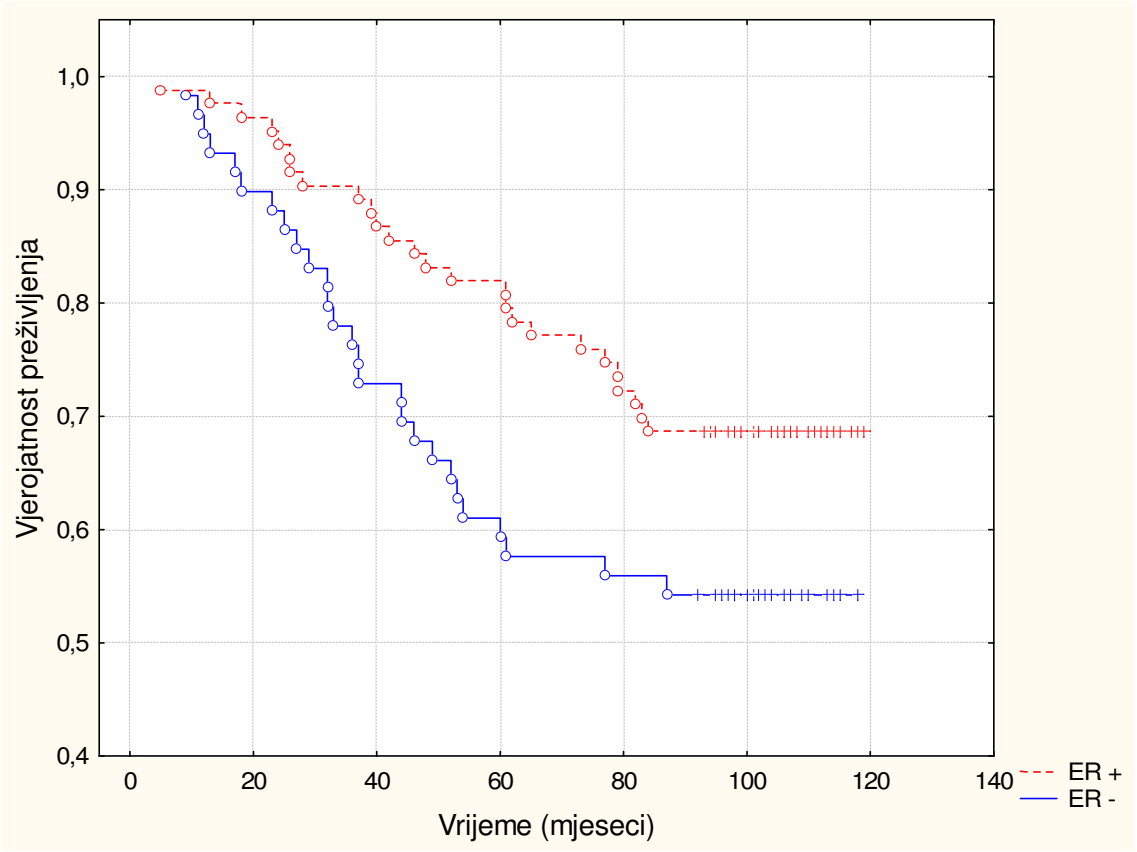
Slika 25. Preživljenje bolesnica u odnosu na stupanj diferenciranosti tumora (P=0,374)



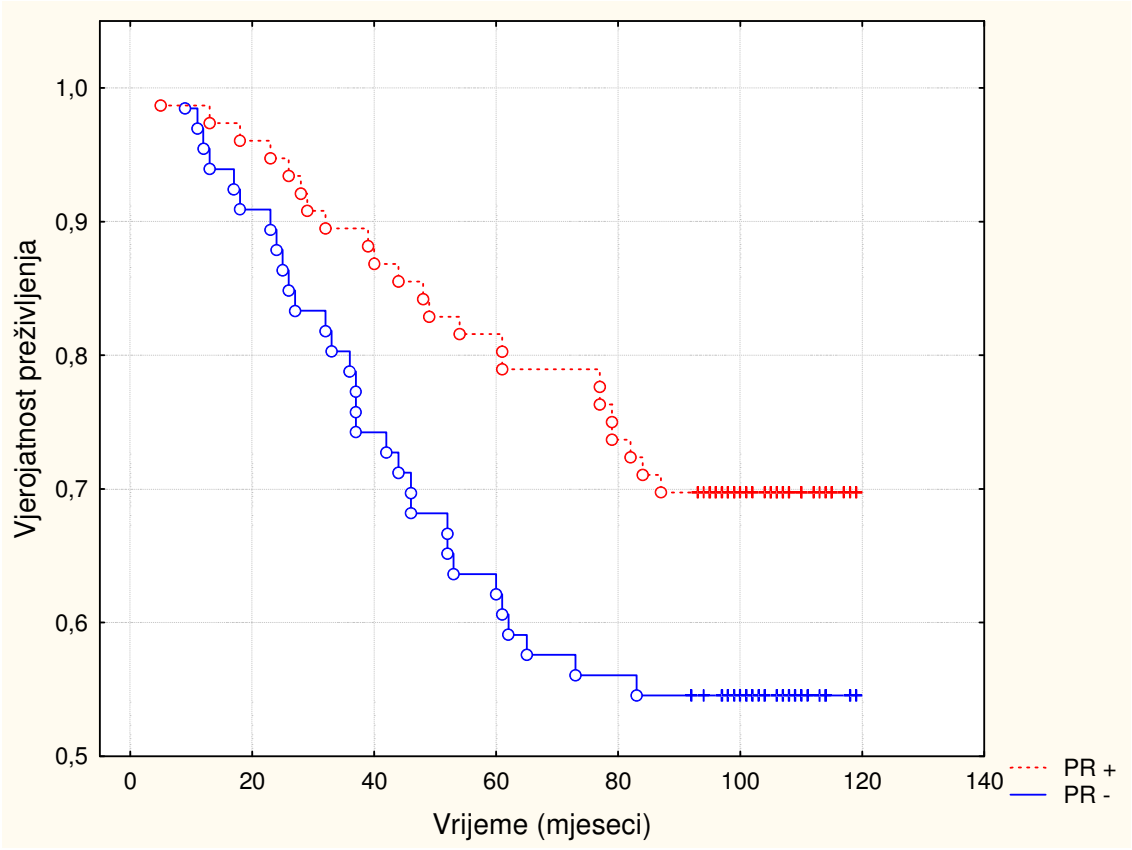
Slika 26. Preživljenje u odnosu na veličinu tumora (T1-T4) (P=0,010)



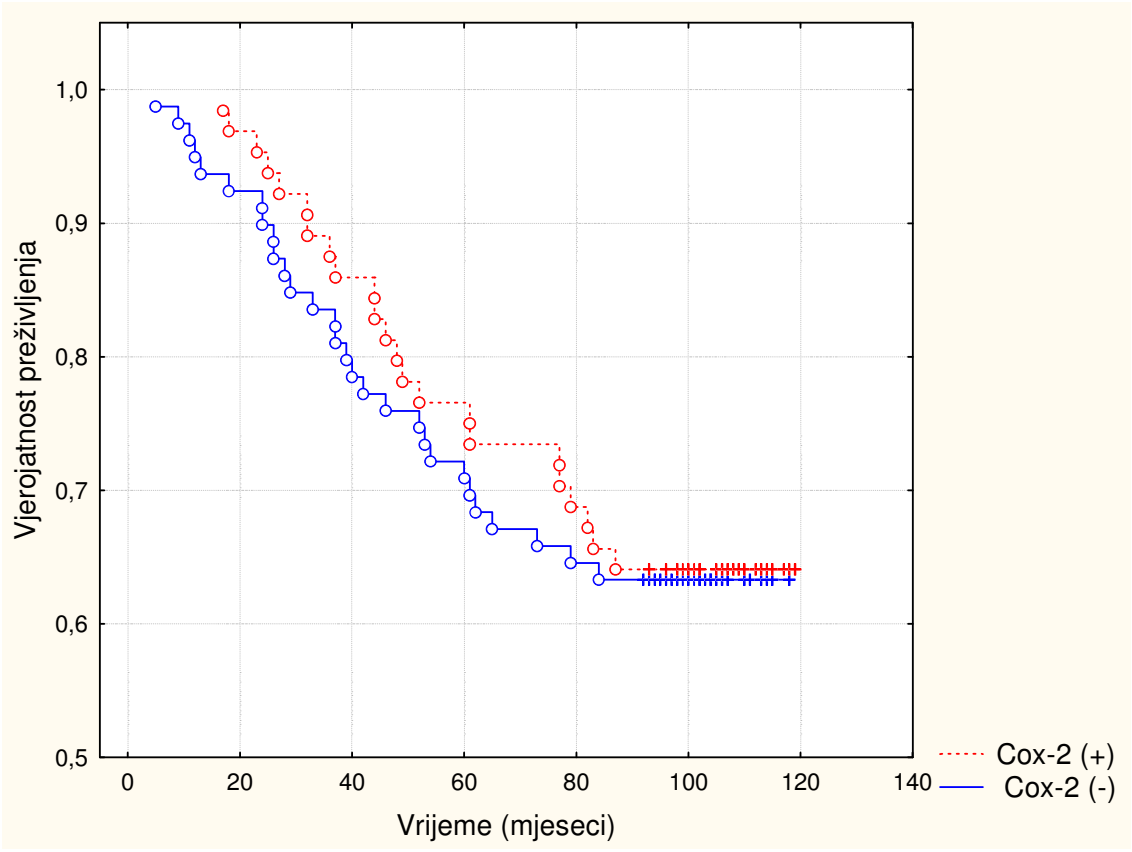
Slika 27. Preživljenje u odnosu na status limfnih čvorova (P=0,007)



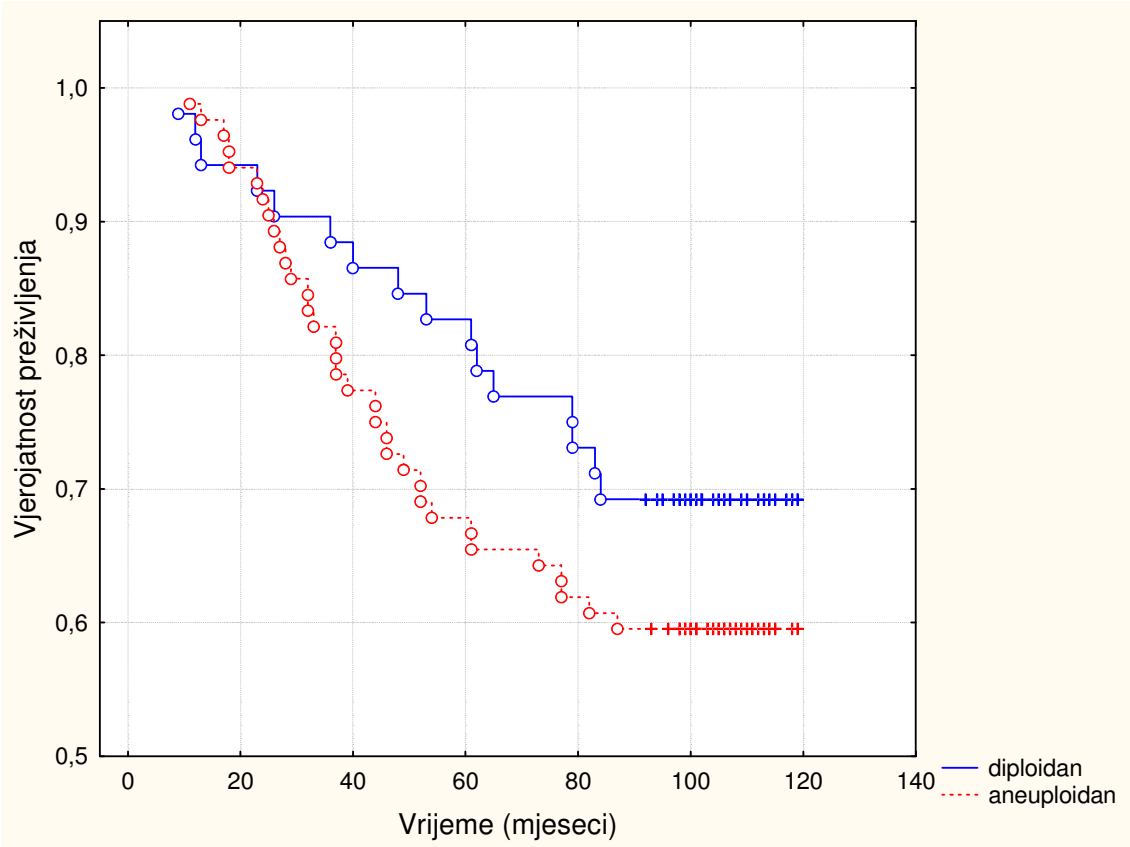
Slika 28. Preživljenje u odnosu na status estrogenskih receptora (P=0,032)



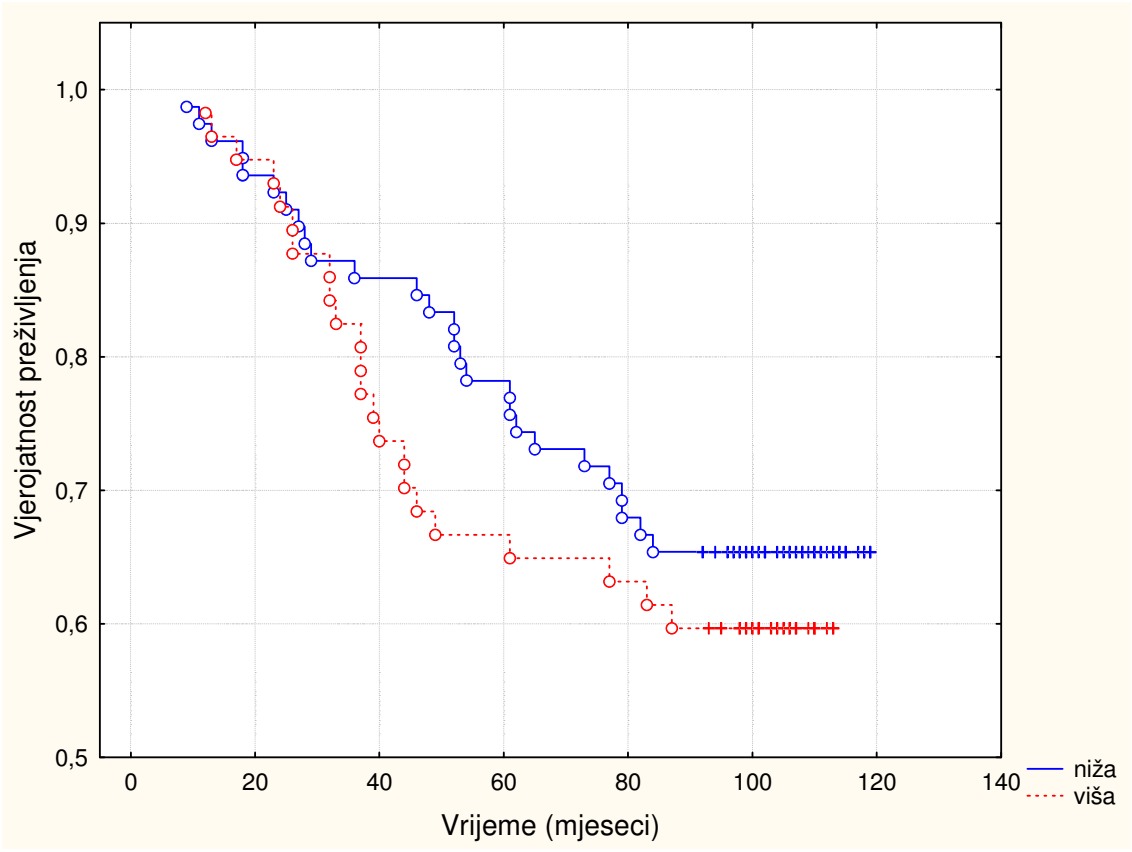
Slika 29. Preživljenje u odnosu na status progesteronskih receptora (P=0,027)



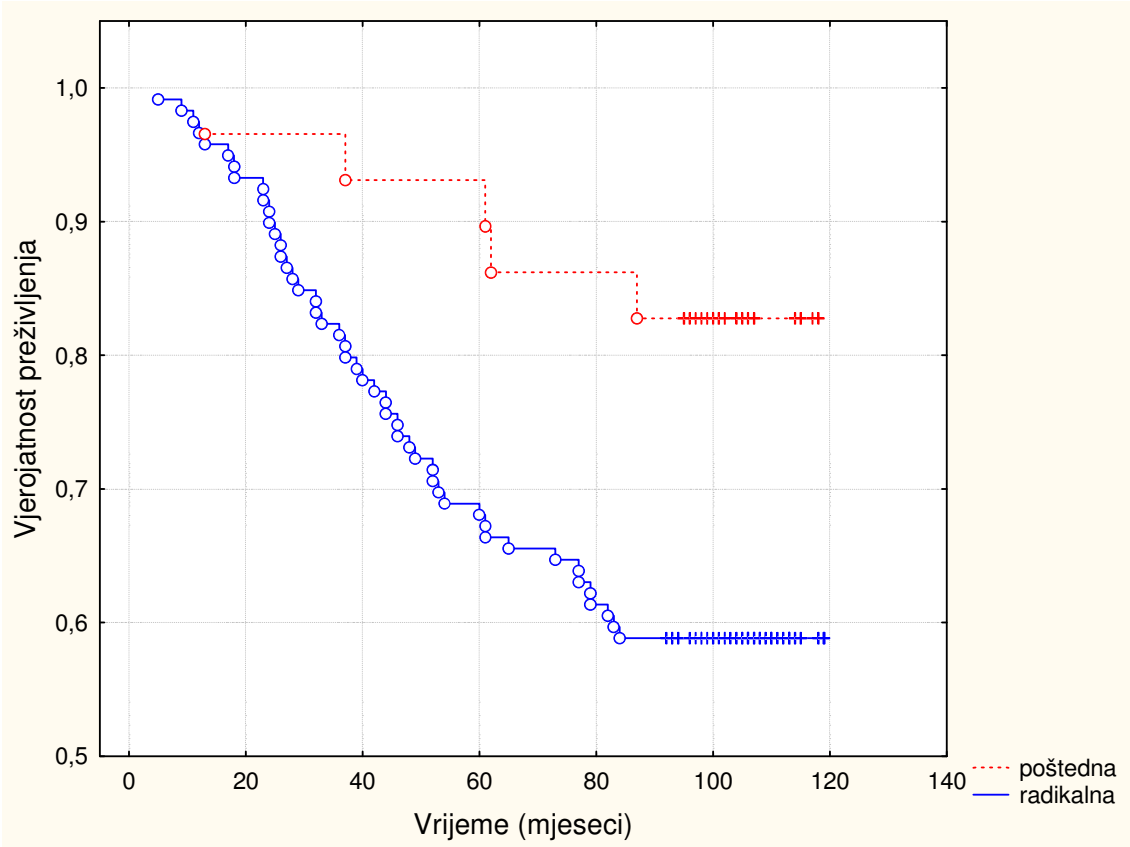
Slika 30. Preživljenje u odnosu na izražajnost Cox-2 (P=0,648)



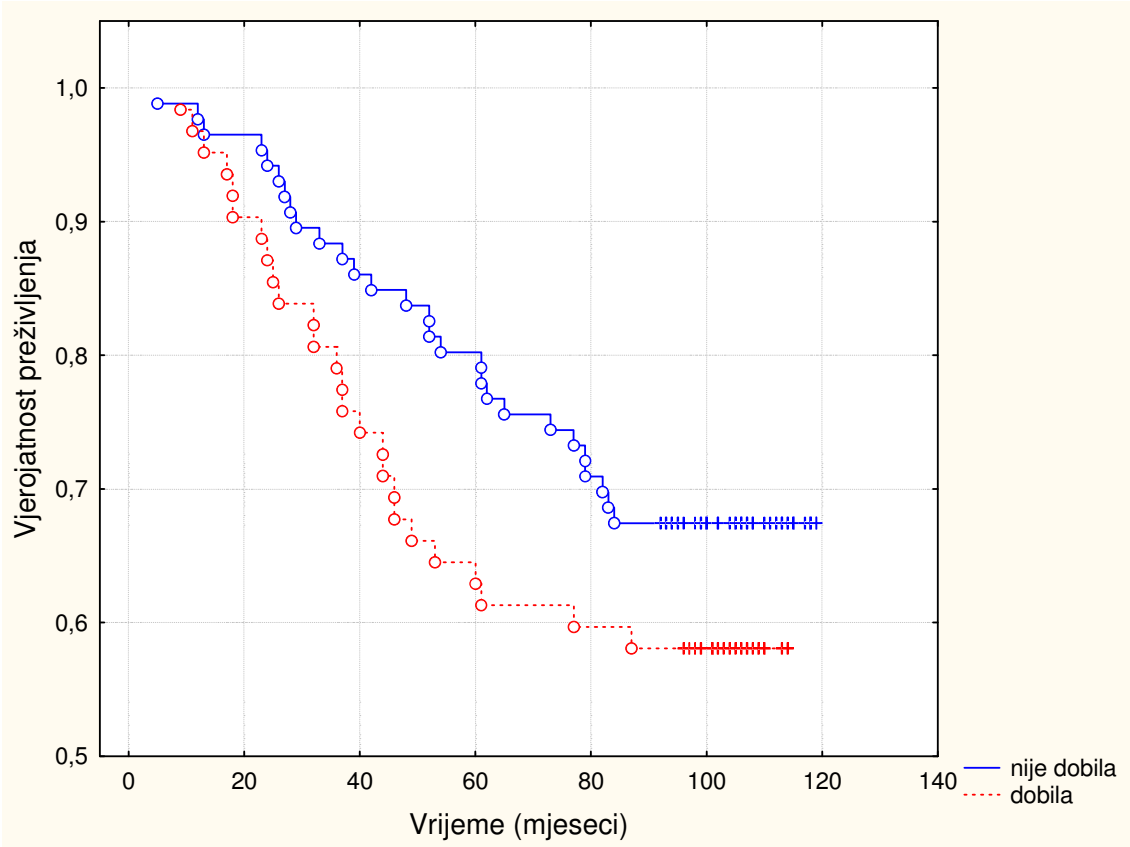
Slika 31. Preživljenje u odnosu na ploidnost tumora (P=0,186)



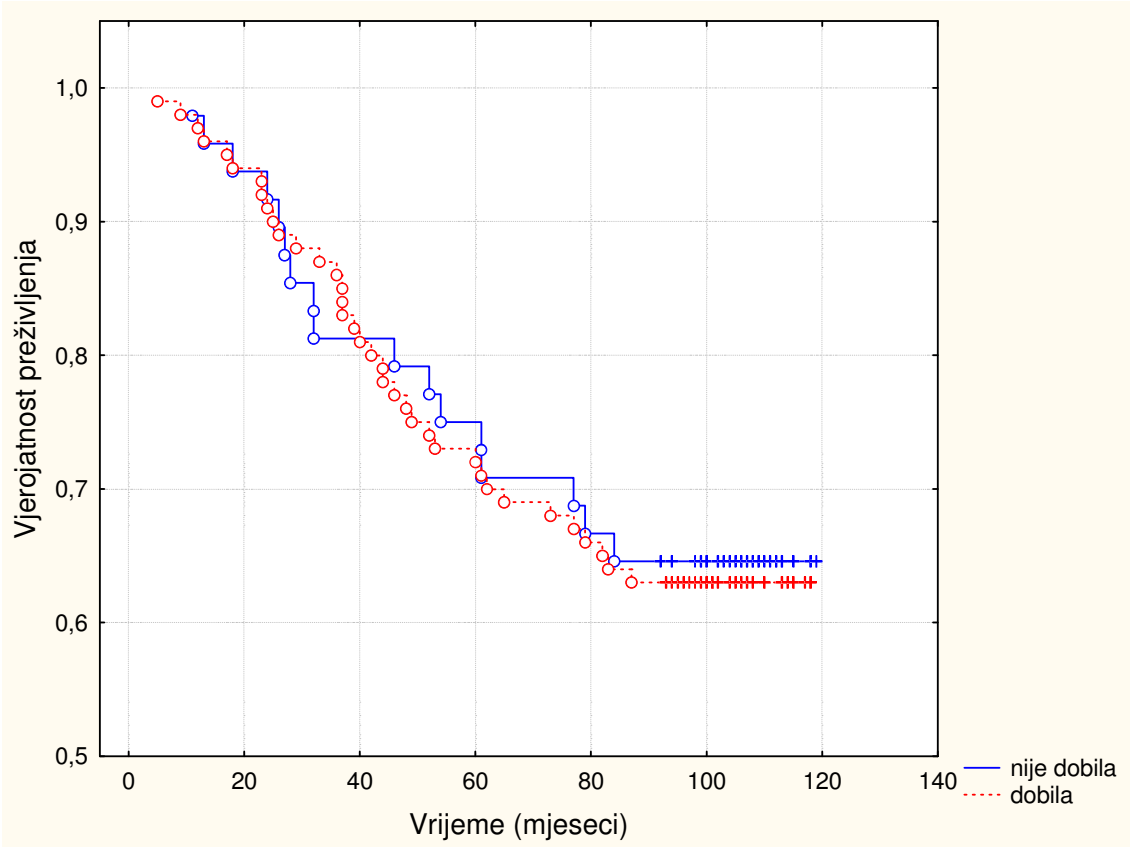
Slika 32. Preživljenje u odnosu na proliferacijsku aktivnost tumora (P=0,355)



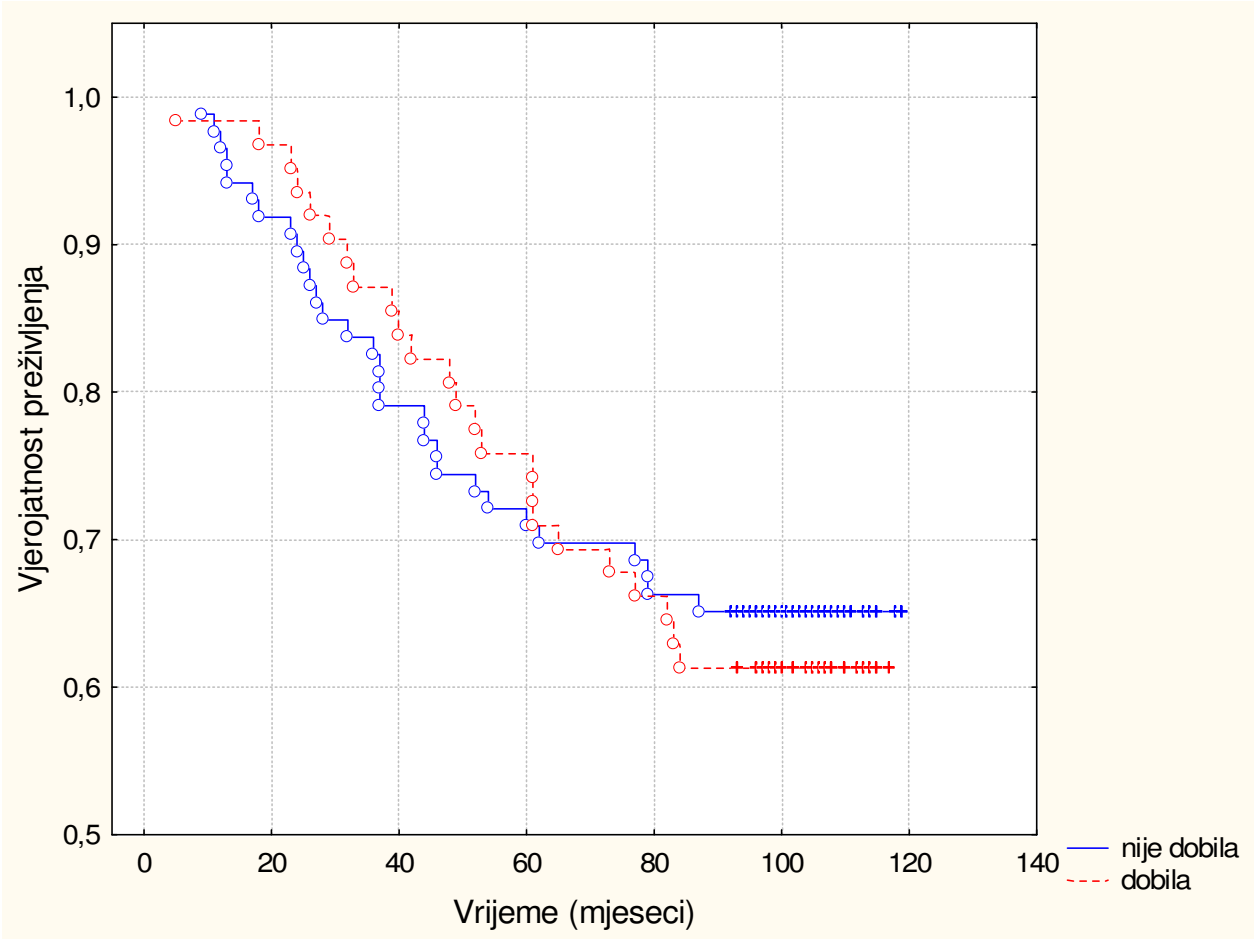
Slika 33. Preživljenje u odnosu na tip operativnog zahvata (P=0,012)



Slika 34. Preživljenje u odnosu na kemoterapiju (P=0,111)



Slika 35. Preživljenje u odnosu na lokoregionalnu terapiju zračenjem (P=0,874)



Slika 36. Preživljenje u odnosu na hormonalnu terapiju (P=0,985)

4.5. Multivarijantna analiza preživljenja – Coxov regresijski model

Primijenjen multivarijatni Coxov regresijski model statistički je značajan (χ^2=26,465; df=16; P=0,048). Rezultati Coxove regresije prikazani su u tablicama 8 i 9. Kao značajni prediktori pri procjeni hazarda smrtnosti kod ispitanica s karcinomom dojke izdvojili su se sljedeći pokazatelji: veličina tumora, status limfnih čvorova i estrogenski receptori u tumorskim stanicama.

Relativni hazard smrti za ispitanice s tumorom veličine T3 je 5 puta veći nego za ispitanice s tumorom veličine T1. Relativni hazard smrti za ispitanice sa statusom limfnih čvorova N1 je 2,4 puta veći nego za ispitanice sa statustom limfnih čvorova N0. Relativni hazard smrti za ispitanice negativnim estrogenskim receptorima je 2,1 puta veći nego za ispitanice s pozitivnim estrogenskim receptorima.

Tablica 8. Rezultati Coxove regresije (regresijski koeficijenti, Waldov χ^2- test)

ISTRAŽIVANI POKAZATELJI	**β**	**S.E.**	***Wald* χ^2**	***df***	***P***
DOB	0,019	0,017	1,312	1	0,252
HISTOLOŠKI GRADUS			0,864	2	0,649
II : I	0,270	0,485	0,309	1	0,578
III : I	-0,114	0,566	0,040	1	0,841
VELIČINA TUMORA			5,430	3	0,143
T2 : T1	0,250	0,378	0,438	1	0,508
T3 : T1	***1,606***	***0,817***	***3,866***	***1***	***0,049***
T4 : T1	1,018	0,624	2,664	1	0,103
STATUS LIMFNIH ČVOROVA			5,051	2	0,080
N1 : N0	***0,890***	***0,406***	***4,799***	***1***	***0,028***
N2 : N0	0,374	1,136	0,109	1	0,742
ESTROGENSKI RECEPTORI					
negativni : pozitivni	***0,755***	***0,383***	***3,882***	***1***	***0,049***
PROGESTERONSKI RECEPTORI					
negativni : pozitivni	0,611	0,338	3,256	1	0,071
COX-2					
pozitivni : negativni	0,151	0,333	0,206	1	0,650
PLOIDNOST TUMORA					
višeploidan : diploidan	-0,126	0,398	0,099	1	0,752
S-FAZA					
viša : niža	0,235	0,383	0,377	1	0,539
KEMOTERAPIJA					
dobila : nije dobila	-0,006	0,496	0,000	1	0,990
IRADIJACIJSKA TERAPIJA					
dobila : nije dobila	-0,527	0,389	1,835	1	0,175
HORMONSKA TERAPIJA					
dobila : nije dobila	0,142	0,431	0,108	1	0,742

Tablica 9. Rezultati Coxove regresije (relativni hazard smrti s 95% granicama pouzdanosti)

ISTRAŽIVANI POKAZATELJI	RELATIVNI HAZARD SMRTI	*95% GRANICE POUZDANOSTI*	
		DONJA	***GORNJA***
DOB	1,020	0,986	1,054
HISTOLOŠKI GRADUS			
II : I	1,309	0,507	3,385
III : I	0,893	0,294	2,706
VELIČINA TUMORA			
T2 : T1	1,284	0,612	2,694
T3 : T1	***4,981***	***1,005***	***24,686***
T4 : T1	2,768	0,815	9,400
STATUS LIMFNIH ČVOROVA			
N1 : N0	***2,436***	***1,098***	***5,402***
N2 : N0	1,454	0,157	13,470
ESTROGENSKI RECEPTORI			
negativni : pozitivni	***2,127***	***1,004***	***4,508***
PROGESTERONSKI RECEPTORI			
negativni : pozitivni	1,842	0,949	3,575
COX-2			
pozitivni : negativni	1,163	0,606	2,235
PLOIDNOST TUMOFA			
višeploidan : diploidan	0,882	0,404	1,925
S-FAZA			
viša : niža	1,265	0,597	2,680
KEMOTERAPIJA			
dobila : nije dobila	0,994	0,376	2,630
IRADIJACIJSKA TERAPIJA			
dobila : nije dobila	0,590	0,276	1,265
HORMONALNA TERAPIJA			
dobila : nije dobila	1,152	0,495	2,679

5. RASPRAVA

Rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena. Incidencija mu je u stalnom porastu. Za uspješno liječenje najvažnija je rana dijagnostika. Dio kliničara smatra da su žene s tumorima manjim od 1 cm gotovo u pravilu izliječene. Dio kliničara zastupa mišljenje da je karcinom dojke od samog početka sistemska bolest. Tome u prilog govori raznoliko biološko ponašanje raka dojke, posebice duktalnog NOS karcinoma koji je i najčešći tip raka dojke. To je i glavni problem u liječenju raka dojke, kako predvidjeti na osnovu kliničke klasifikacije i morfoloških osobina tumora, njegovo daljnje ponašanje.

U praksi se uvriježio naziv tzv. tradicionalnih prognostičkih čimbenika. Oni uključuju veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova te status hormonskih receptora. Navedeni prognostički čimbenici su još uvijek nezaobilazni u odluci o daljnjem liječenju. Nekad je odluka o potrebi adjuvantnog liječenja kemoterapijom lakša jer je kombinacija prognostičkih čimbenika nepovoljna. No vrlo često niti kombinacija navedenih prognostičkih čimbenika ne daje sigurnost i odgovor o potrebi provođenja adjuvantne kemoterapije. Poznato je da je princip modernog terapijskog pristupa u bolesnica s rakom dojke, pronaći one koje imaju povećani rizik od razvoja relapsa bolesti i kraće preživljenje uzimajući u obzir tradicionalne i nove prognostičke čimbenike.

U ovom radu analizirana je skupina od 150 bolesnica, po 50 bolesnica s dobro, srednje i slabo diferenciranim tumorima. Analizirani su svi do sada prihvaćeni prognostički čimbenici za sve tri skupine, analiza stanične DNA na protočnom citometru te analiza Cox-2 proteina. Bolesnice su bile većinom u prva dva stadija bolesti, njih ukupno 132 (88%). U prvom stadiju bolesti nalazilo se 51 bolesnica, u II stadiju bolesti 81 bolesnica, dok je u III stadiju bilo 18 bolesnica (12%).

Liječenje su započele s operacijskim zahvatom koji je uključivao radikalni operacijski zahvat, odnosno odstranjenje dojke (121 bolesnica) ili poštedni kirurški zahvat koji je uključivao odstranjenje dijela dojke (19 bolesnica). U obje skupine bolesnica učinjeno je kompletno odstranjenje limfnih čvorova pazuha. Zadnjih godina uočava se znatan porast poštednih kirurških zahvata zahvaljujući brojnim studijama među kojima su i one s najdužim praćenjima koje su proveli Fisher i Veronesi sa suradnicima (146-148). Nakon operacijskog zahvata, bolesnice su na osnovi veličine tumora, statusa limfnih čvorova, diferenciranosti tumora te hormonske ovisnosti tumora nastavile liječenje jednim od vidova adjuvantne terapije. Bolesnice sa slabo diferenciranim tumorima najčešće su dobivale adjuvantnu

kemoterapiju (39 bolesnica, 78%). Od 50 bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima njih 17 (34%) je primalo kemoterapiju dok je u skupini dobro diferenciranih tumora samo njih 8 (16%) primalo kemoterapiju.

Ako se usporedi smrtnost nakon 9 godina praćenja u skupini bolesnica sa slabo diferenciranim tumorima, umrle su 21 bolesnica, u skupini srednje diferenciranih njih 17, a u skupini dobro diferenciranih 16 bolesnica (P=0,3). Iako se bilježi manje smrtnosti u bolesnica s nižim gradusom nije zabilježena statistički značajna razlika u smrtnosti u odnosu na gradus tumora. Iz ovih rezultata nameće se pitanje da li je kod nekih bolesnica nepotrebno provedena kemoterapija ili neke bolesnice samo na osnovi tzv. tradicionalnih prognostičkih čimbenika nisu dobile adjuvantnu kemoterpiju, iako se po ishodu bolesti može zaključiti da bi bilo bolje da su je dobile ?

U ovom radu analiziran je odnos stupnja diferenciranosti (gradusa) tumora s ostalim kliničkim i laboratorijskim pokazateljima. Za testiranje razlika u vrijednostima kvantitativnih varijabli između gradusa primjenjana je ANOVA a za analizu vrijednosti kvalitativnih varijabli primjenjen je X^2 test. Analiza je pokazala statistički značajne razlike po gradusima za veličinu tumora, status limfnih čvorova, vrijednosti estrogenskih receptora, izražajnosti Cox-2 u tumorima, ploidnosti tumora i S frakcije tumora.
Kaplan-Meierova analiza preživljenja primijenjena je za analizu dobivanja metastaza i dužinu preživljenja (univarijatna analiza).

Rezultat studije pokazuje da su bolesnice s bolje diferenciranim tumorima imale prosječno manje tumore (P< 0,001), manji broj limfnih čvorova je bio zauzet metastazama (P=0,002) te češće pozitivne estrogenske receptore (P=0,02). Usporedbu između mikroskopskog izgleda tumora i stupnja malignosti prvi je sugerirao na kraju 19. stoljeća von Hansemann (171). Danas se za histološko gradiranje najviše primjenjuje tzv. Nottinghamska metoda (79). Samo određivanje gradusa tumora visoko korelira s prognozom bolesti. Bolesnice s dobro diferenciranim tumorima imati će šansu 10 godišnjeg preživljenja 85% nakon dijagnoze, dok u bolesnika sa slabo diferenciranim tumorima šanse padaju na 45%. U ovoj studiji ni univarijatna analiza pojave metastaza (P=0,2) ni analiza preživljenja ovisno o gradusu tumora(P=0,37) nisu pokazale statistički značajnu razlike. Također ni multivarijatna analiza nije pronašla značajnije razlike u preživljenju u odnosu na gradus tumora. U studijama koje su proveli Bloom (78), Elston te Le Dousal (172) sa suradnicima potvrđena je povezanost histološkog gradusa i preživljenja bez znakova bolesti. Mogući odgovor za dobiveni rezultat na vlastitom materijalu je analiza skupina bolesnica s različitim veličinama tumora i različitim statusom limfnih čvorova. Iako se pregledom medicinske literature nalaze

brojni radovi koji potvrđuju prognostičko značenje histološkog gradusa, ipak se naglašava uz prognostičku njegova prediktivna važnost pri donošenju odluka o adjuvantnoj terapiji za bolesnice s negativnim limfnim čvorovima i graničnom veličinom tumora (173).

Analizirajući veličinu tumora i status limfnih čvorova na pojavu metastaza i preživljenje, u vlastitoj studiji od ukupno 150 bolesnica njih 59 dobilo je metastaze. Od bolesnica koje su dobile metastaze samo je 5 još živih. Univarijatna analiza pokazala je statistički značajnu korealaciju između veličine tumora i pojave metastaza (P=0,02), veličine tumora i preživljenja (P=0,01), statusa limfnih čvorova i pojave metastaza (P=0,003), statusa limfnih čvorova i preživljenja (P=0,007). Također multivarijatna analiza potvrdila je značenje veličine tumora na dužinu preživljenja (P=0,04), (i to tumora većih od 5 cm u odnosu na tumore veličine do 2 cm) i pozitivne aksile u odnosu na negativnu aksilu (P=0,02). Dobiveni rezultat sličan je brojnim studijama koje potvrđuju veličinu tumora kao prognostičkog čimbenika (79, 173, 174, 175). Bolesnice s manjim tumorima imaju bolje preživljenje nego bolesnice s većim tumorima. Carter i suradnici su u skupini od 24 740 bolesnica pokazali da su bolesnice s tumorima manjim od 1 cm imale ukupno petogodišnje preživljenje oko 99% u usporedbi s bolesnicama koje su imale tumor između 1-3 cm i imale preživljenje 89% (174). Sam naziv minimalno invazivnog karcinoma koristi se za označavanje vrlo malih tumora s vrlo dobrom prognozom. Podaci iz NTPBCS studije (Nottingham Tenovus Primary Breast Cancer Study) sugeriraju da nije neophodno smatrati samo veličinu do 1 cm kao pokazatelj dobre prognoze jer su pokazali da između tumora veličine do 9 mm i onih veličine između 10 i 14 mm nema statistički značajnih razlika u preživljenju (175). U ovom radu bolesnice s tumorima veličine do 2 cm, nakon 9. godišnjeg praćenja imale su 78% vjerojatnost preživljenja.

Vlastita studija je pokazala važnost metastaza u limfnim čvorovima i za pojavu udaljenih metastaza i za dužinu preživljenja. I univarijatna i multivarijatna analiza potvrdile su da su bolesnice s metastazama u limfnim čvorovima imale statistički kraće vrijeme do pojave metastaza i kraće preživljenje u odnosu na one bez metastaza u limfnim čvorovima. Nakon 9 godina praćenja, bolesnice s metastazama u limfnim čvorovima imale su 47% vjerojatnost preživljenja, dok su bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima imale 74% vjerojatnost preživljenja.

Važnost disekcije i analize pazušnih limfnih čvorova je u prvom redu u dobivanju važnih prognostičkih informacija, ali također i u kontroli bolesti. Ovo je najvažniji prognostički čimbenik kod bolesnica s karcinomom dojke. Analiza rezultata limfnih čvorova obrađenih bolesnica slična je rezultatima drugih studija koje su nađene na znatno većem broju

bolesnica. Bolesnice s negativnim limfnim čvorovima imaju 5-godišnje preživljenje bez bolesti preko 80%, a ako su čvorovi pozitivni, preživljenje je ispod 65% (71, 72, 173-175). Za bolesnice je također lošija prognoza što je veći broj limfnih čvorova zahvaćen metastazama i što su oni istovremeno smješteni i na višoj razini u pazuhu (71).

Univarijatna naliza hormonskih receptora i pojave metastaza u ovoj studiji pokazala je da su bolesnice s pozitivnim estrogenskim receptorima kasnije razvijale udaljene metastaze (P=0,02), kao i bolesnice s pozitivnim progesteronskim receptorima no statistički nije zabilježena značajna razlika (P=0,05). Analiza hormonskih receptora i dužine preživljenja pokazala je i za bolesnice s pozitivnim estrogenskim receptorima (P=0,03) i progesteronskim receptorima (P=0,02) statistički značajnije duže preživljenje. Također je i multivarijatna analiza vrijednosti hormonskih receptora pokazala statistički značajno lošije preživljenje u bolesnica s negativnim estrogenskim receptorima u odnosu na one s pozitivnim receptorima (P=0,04).

Vrijednost hormonskih receptora je prvenstveno u predviđanju odgovora na terapiju. Ukupno 30% bolesnica s rakom dojke imat će odgovor na endokrinu terapiju. Ako se promatraju pozitivni estrogenski i progesteronski receptori, ukupni odgovor na endokrinu terapiju je 78%, a ako su i estrogenski i progesteronski receptori negativni odgovor je ispod 10%. Rezultati ove studije su usporedivi s rezultatima drugih studija u kojima je potvrđena povezanost pozitivnih receptora s nižim tumorskim gradusom i dužinom preživljenja (86-88). Analiza bolesnica koje su dobivale hormonsku terapiju nije pokazala da su imale statistički značajniju kasniju pojavu metastaza i duže preživljenje za razliku od bolesnica koje nisu dobivale hormonsku terapiju. Rezultat ove studije je vjerojvatno takav jer su hormonsku terapiju dobivale i bolesnice s blago pozitivnim hormonskim receptorima te bolesnice u kojih je u praćenju došlo do pojave metastatske bolesti pa je uvedena hormonska terapija. Kako to i nije bio jedan od primarnih ciljeva studije, bolesnice su tijekom praćenja označene kao da su dobivale hormonsku terapiju, neovisno o tome da li je bila uvedena kao adjuvantna ili kao terapija metastatske bolesti. Rezultati ATAC studije na više od 9000 bolesnica nedvojbeno pokazuju vrijednost adjuvantne hormonske terapije u bolesnica s pozitivnim receptorima te prednost inhibitora aromatasa u odnosu na tamoxifen (87).

Također u ovoj studiji napravljena je analiza utjecaja ostalih vidova terapije na pojavu mestastaza i dužinu preživljenja. S obzirom da se radi o heterogenoj skupini bolesnica, kod kojih neke radi visoke dobi nisu bili kandidati za kemoterapiju, a također nisu postavljeni jasni kriteriji za uvođenje hormonske terapije kao adjuvantne terapije ili terapije metastatske bolesti, te je rezultate teško interpretirati. No studija ipak pokazuje neke interesantne

pokazatelje. Tako su bolesnice kod kojih je učinjen poštedni kirurški zahvat u prosjeku kasnije razvijale metastaze (P=0,02) i imale duže preživljenje (P=0,01). Rezultat se objašnjava time da su bolesnice kod kojih je učinjen poštedni zahvat uglavnom imale manje tumore (veličine do 2 cm) s klinički negativnim pazušnim limfnim čvorovima. To su ujedno i kriteriji za izvođenje poštednih zahvata u jednoj od prvih takvih studija (146).

Bolesnice koje su dobile kemoterapiju čine ujedno i skupinu s lošijim tradicionalnim prognostičkim čimbenicima. Tako je u studiji potvrđeno da su bolesnice koje su dobivale kemoterapiju ujedno i razvijale češće udaljene metastaze (P=0.04), dok se razlika u preživljenju između bolesnica koje su dobivale i nisu dobivale kemoterapiju, nakon devet godina praćenja gubi (P=0,1). Bolesnice kod koji je došlo do pojave lokalnog recidiva bolesti također su imale značajno veću pojavu udaljenih metastaza (P=0,02). Ostali vidovi terapije, uključujući hormonsku terapiju, i terapiju zračenjem zbog navedenih razloga u ovoj studiji nisu pokazali statistički značajne rezlike među bolesnicama koje su dobivale ili nisu dobivale jednu od terapija.

Analiza tumora protočnom citometrijom je također pokazala da su bolesnice s nižim gradusom tumora imale statistički značajno veći broj diploidnih tumora (P<0,001) i tumore s nižom proliferacijskom «S» fazom (P<0,001). Ni univarijatna ni multivarijatna analiza pojave metastaza i preživljenja nisu pokazale statistički značejne razlike između žena s diploidnim i aneuploidnim tumorima te između žena s nižom i višom proliferacijom. Rezultat ove studije je usporediv s rezultatima studije koju su proveli Wenger i sur. na velikom broju bolesnica s rakom dojke (127 000) i pokazali da broj aneuploidnih tumora i visoka proliferacijska faza raste s veličinom tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova histološkim gradusom te s negativnošću hormonskih receptora ali kao samostalni nisu imali prognostičku važnost (176). Rezultati drugih autora, koji su analizirali odnos između histološkog gradusa i ploidije invazivnih duktalnih karcinoma, pokazali su postojanje korelacije između tih parametara (177, 178). Slično kao i rezultat ove studije, pokazuje multicentrična studija Chasseventa i suradnika kod 633 bolesnice s T1 i T2 tumorima dojke (179). Oni nisu zabilježili razlike u pojavi metastaza i dužini preživljenja (long rank) između bolesnica s diploidnim tumorima i bolesnica s aneuploidnim tumorima. U njihovoj studiji je zabilježena razlika u dužini preživljenja ovisno o proliferacijskoj aktivnosti tumora. Tako su bolesnice s nižom proliferacijskom aktivnošću tumora imale duže preživljenje. Za razliku od vlastite studije koja je provedena na tumorskom materijalu pohranjenom u parafin, studija Chasseventa i suradnika provedena je na smrznutom tumorskom materijalu (179).

Danas se primjenjuje više metoda za procjenu tumorske proliferacije, uključujući mitotski indeks i imonohistokemijske metode određivanja jezgrinih antigena (121). Unatoč širokoj primjeni zadnjih desetak godina te brojnim radovima koji pokazuju vezu između visoke proliferacijske faze tumora i povišenog rizika za razvoj metastaza, protočna citometrija još nije našla širu primjenu u kliničkoj praksi radi potrebe veće količine tkiva, poteškoća s standardiziranjem pripreme i analize preparata, te analize histograma (123, 179).

Glavni cilj ove studije bio je analizirati izražajnost Cox-2 proteina u bolesnica s rakom dojke, njegovu povezanost s proliferacijskom aktivnošću tumora i ostalim prognostičkim čimbenicima, te s ishodom liječenja. Izražajnost Cox-2 određena je imunohistokemijski, a rezultati izraženi semikvantitativnom metodom. U studiji je korišteno mišje monoklonsko protutijelo i semikavantitativna metoda kao i u studijama koje su proveli Half i (144) Ristimaki (145).

Pozitivnost na Cox-2 protein u tumorskim stanicama očitovala se zrnatim citoplazmatskim bojenjem. Nalaz je sukladan lokalizaciji Cox-2 koja je potvrđena metodom imunoelektronske mikroskopije u radu Spencera i suradnika (180). U vlastitoj studiji Cox-2 bio je pozitivan u 65 bolesnica (43,3%) a negativan u 80 bolesnica (53,3), dok u 5 bolesnica (3,4%) nalaz nije interpretiran radi tehničkih poteškoća u imunohistokemijskom bojenju. Studije koje koriste različite tehnike za detekciju Cox-2 proteina još uvijek imaju različite, a katkada i oprečne rezultate. Hwang i suradnici, koristeći imunobloting u analizi 44 bolesnice s rakom dojke, našli su povišenu ekspresiju Cox-2 u 4,5% slučajeva, dok Parret sa suradnicima, u svojoj studiji od 13 bolesnica s rakom dojke, koristeći rtPCR pronalazi 100% izraženost Cox-2 proteina (181, 182). Half i Ristimaki u svojim studijama, koristeći imunohistokemijsku metodu, imali su 43% slučajeva pozitivnu izraženost Cox-2, odnosno 37% slučajeva pozitivan Cox-2 protein što je sukladno rezultatima provedene vlastite studije (144, 145). Ristimaki u svojoj studiji koristi «tissue arrays» i imunohistokemiju.

Analiza Cox-2 i gradusa pokazala je statistički značajnu razliku izraženosti Cox-2 u bolesnica s različitim gradusima (P=0,01). Tako je Cox-2 u bolesnica s dobro diferenciranim tumorima u 32 bolesnice bio negativan, dok je u njih 15 bio pozitivan. U bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima taj je odnos bio gotovo obrnut, 30 bolesnica imalo je pozitivan Cox-2 protein, dok njih 20 nije imalo izražen Cox-2 protein. Za bolesnice sa slabo diferenciranim tumorima analiza Cox-2 proteina pokazala je suprotne rezultate nego u dobro i srednje diferenciranim tumorima. Više bolesnica imalo je negativnu reakciju na Cox-2 protein (njih 28), dok je 20 bolesnica imalo pozitivnu reakciju na Cox-2 protein.

Također analiza Cox-2 i veličine tumora pokazuje da je Cox-2 u skupini T1 tumora (ukupno 78 bolesnica) bio pozitivan u 36 bolesnica (46,1%), dok je kod T2 tumora od ukupno 53 bolesnice njih 27 (50,9%) bilo pozitivno na Cox-2. U skupini T3 tumora samo su dvije bolesnice imale pozitivan Cox-2 te je taj rezultat teško interpretirati, dok u skupini T4 od ukupno 12 tumora, 11 tumora je imalo negativu reakciju na Cox-2 protein. Razlika ne dostiže statističku značajnost, ali joj se primiče (P=0,06). Analiza izražajnosti Cox- 2 s metastazama i pazušnim limfnim čvorovima nije pokazala statistički značajne razlike između Cox-2 pozitivnih i Cox-2 negativnih tumora u odnosu na status pazušnih limfnih čvorova.

Rezultat ove studije sličan je rezultatu studije koju su proveli Soslow i suradnici (184). Oni su slično vlastitoj studiji zabilježili veću izražajnost Cox-2 proteina u dobro i srednje diferenciranim tumorima, dok su slabo diferencirani tumori imali manju izražajnost Cox-2. Soslow navodi i veću izražajnost Cox-2 u pretečama invazivnih karcinoma, kao što su tubularni i tubulovilozni adenomi kolona, atipična adenomatozna hiperplazija pluća te duktalni neinvazivni karcinom dojke te se naglašava njegova važnost u ranijim stadijima nastanka karcinoma, tj. u karcinogenezi. Time se može objesniti i vlastiti rezultat da su manji tumori T1 i T2 bili više pozitivni na Cox-2 nego T4 tumori. U studijama koje su proveli Half i Davis nije pronađena povezanost s drugim kliničkim pokazateljima (144, 184), dok Ristimaki na većem broju bolesnica (1576) nalazi povezanost povišene izraženosti Cox-2 s veličinom tumora, stupnjem diferencijacije, zauzetošću limfnih čvorova s metastazama i negativnim hormonskim statusom (145).

U provedenoj vlastitoj studiji analizirana je povezanost pojačane izraženosti Cox-2 proteina s rezultatima protočne citometrije. Prema vlastitim saznanjima pregledom medicinske literature ovo je prva studija koja je usporedila izraženost Cox-2 proteina s rezultatima protočne citometrije kod karcinoma dojke.

U studiji je pronađeno da su tumori pozitivni na Cox-2 protein u većem broju bili aneuploidni od tumora negativnih na Cox-2, koji su češće bili diploidni (P=0,03). Diploidni tumori imali su skoro dvostruko veći broj bolesnica kod kojih je Cox-2 bio negativan (31:16). Kod aneuploidnih tumora bio je veći broj bolesnica s pozitivnim Cox-2, od ukupno 86 njih 46 je bilo pozitivno, dok je 40 bilo negativno na Cox-2. Po rezultatima drugih studija učestalost aneuploidnih tumora raste s veličinom tumora, zauzetošću limfnih čvorova metastazama te negativnošću hormonskih receptora (177, 178, 179). Dobiveni rezultat pokazuje da bi skupina aneuploidnih i Cox-2 pozitivnih tumora mogla predstavljati skupinu tumora većeg malignog potencijala.

Vlastita studija nije pokazala povezanost između povećane izraženosti Cox-2 i proliferacijske aktivnosti tumora mjerene na protočnom citometru. Podaci iz literature o odnosu Cox-2 proteina i proliferacijske aktivnosti raka dojke su još uvijek nedovoljni i međusobno suprostavljeni. Druge studije koje su uspoređivale Cox-2 i proliferaciju koristile su imunohistokemijsku metodu određivanja Ki-67 kao biljega povećane proliferacijske aktivnosti (144, 145, 184). Half i Davis u svojim studijama nisu pronašli povezanost između povećane izraženosti Cox-2 proteina i proliferacijske aktivnosti tumora (144, 184). Ristimaki u svojoj studiji nalazi povezanost Cox-2 s proliferacijskom aktivnošću tumora mjerene preko Ki-67, a i s ostalim kliničkim pokazateljima kod raka dojke.

Tumori pozitivni na Cox-2 bili su češći kod bolesnica koje su imale negativne estrogenske i progesteronske receptore, za razliku od tumora negativnih na Cox-2 koji su bili češći kod bolesnica s pozitivnim hormonskim receptorima no ta razlika nije bila statistički značajna. Literaturni podaci o povezanosti Cox-2 s hormonskim receptorima su oprečni. Dok Ristimaki (145) u svojoj studiji nalazi povezanost pojačane izraženosti Cox-2 s negativnim hormonskim receptorima, drugi autori takvu povezanost ne nalaze (144,184). Također moguća veza Cox-2 s pozitivnim estrogenskim receptorima, ide preko metabolita Cox-2, prostaglandina E2 i enzima aromataze koji uzrokuje povećanu produkciju estrogena u tkivu dojke i na taj način Cox-2 može ubrzati rast tumora koji su estrogen pozitivni (185,186).

Analiza izraženosti Cox-2 s pojavom metastaza i preživljenjem (univarijatna i multivarijatna analiza) nije pokazala statistički značajne razlike između bolesnica s negativnim i pozitivnim Cox-2 proteinom. Iako je vlastita studija pokazala pojačanu izraženost Cox-2 proteina kod raka dojke njegovo prognostičko značenje nije pokazano. Ristimaki (145) i Shim (187) u svojim studijama navode njegovo prognostičko značenje kod raka dojke, dok drugi autori uglavnom dovode Cox-2 kod raka dojke u vezu s nekim od negativnih prognostičkih čimbenika, ili tzv. tradicionalnih, ili molekularnih, kao što su pojačana izražajnost Her-2/neu, angiogeneza i proliferacija, te se njegova pojačanija izraženost smatra jednim od pokazatelja malignijeg potencijala raka dojke (144, 181-185).

Na početku rasprave napomenut je problem uvođenja adjuvantne kemoterapije za granične slučajeve gdje postoji vrlo mali rizik od pojave metataza. Zadnjih desetak godina brojni radovi govore o potrebi uvođenja i kemoprevencije koja se bazira na uvođenju blokatora Cox-2 proteina, što bi bila dodatna mogućnost liječenja. Za bolesnice kod kojih nije indicirana kemoterapija blokatori Cox-2 enzima mogli bi se uvesti u terapiju u vidu kemoprevencije, a za bolesnice kod kojih je indicirana kemoterapija ili hormonoterapija kao dodatak tim terapijama. Meta analiza nekoliko studija indicira da korištenje aspirina ili

nesteroidnih antireumatika kao neselektivnih inhibitora ciklooksigenaze (i Cox-1 i Cox-2 enzima) smanjuje rizik od nastanka karcinoma dojke oko 20% (188). Jedan od selektivnih inhibitora Cox-2, kao što je Celecoxib (Celebrex) odobren je kao lijek za liječenje obiteljske polipoze kolona. Također Celecoxib u eksperimentalnim modelima pokazuje znatan učinak na karcinom dojke i to na smanjenje incidencije, smanjenje broja tumora i njegovog volumena (189). U tijeku su studije koje će pokazati njegovu učinkovitost u pogledu prevencije i tretmana kod raka dojke (189, 190,191).

Rezultati istraživanja koje su proveli Mamdani i sur. na Rofexocib-u (Vioxx), koji je također selektivni blokator Cox-2 upućuju nas na oprez kod uvođenja u terapiju neselektivnih i selektivnih inhibitora Cox-2 radi pojave kardiotoksičnosti kod bolesnika koji su duže vremena svakodnevno uzimali Cox-2 inhibitore (192). Također noviji rad upućuje da bi pojačana ekspresija Cox-2 proteina mogla imati učinak preko medijatora prostaglandina E2 tek ako je u tkivu dojke izražen receptror za prostaglandin E2 (193).

Prethodna rasprava upućuje na potrebu daljnjih istraživanja o ulozi Cox-2 proteina kod raka dojke jer je i vlastiti rad pokazao pojačanu izraženost kod duktalnog invazivnog karcinoma dojke koji je i najčešći zloćudni tumor dojke. Također široka upotreba lijekova koji su neselektivni inhibitori Cox-2 proteina i zadnjih godina selektivnih inhibitora Cox-2 proteina traži odogovor o njihovoj sigurnosti. Ako se utvrdi njihova sigurnost, bolesnice kod kojih se analizom potvrdi pojačana izraženost Cox-2 mogle bi biti kandidati za uvođenje kemoprevencije i terapije blokatorima Cox-2 proteina.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Cox-2 je pojačano izražen kod karcinoma dojke.
2. Bolesnice s različitim gradusom tumora imale su značajne razlike u izraženosti Cox-2 proteina (P=0,01), a skupina sa srednje diferenciranim tumorima imala je najveći broj bolesnica pozitivnih na Cox-2 protein.
3. Cox-2 bio je češće pozitivan u aneuploidnim nego u diploidnim tumorima što je potvrđeno i statistički (P=0,03)
4. Povećana izraženost Cox-2 nije povezana s povećanom proliferacijskom aktivnošću tumora.
5. Povećana izraženost Cox-2 nije povezana s veličinom tumora, statusom limfnih čvorova te statusom hormonskih receptora.
6. Izraženost Cox-2 nije povezana s pojavom metastaza i preživljenjem jer nije nađena statistički značajna razlika između bolesnica sa negativnim i pozitivnim Cox-2 proteinom u tumoru.
7. Premda Cox-2 ne razriješava prognostički problem bolesnica s srednje diferenciranim tumorima dojke, on ipak predstavlja mogući prognostički pokazatelj s obzirom da skupina aneuploidnih i Cox-2 pozitivnih tumora predstavlja skupinu tumora većeg zloćudnog potencijala.

Bez obzira na dobivene rezultate potrebna su daljna istraživanja Cox-2 proteina zbog njegove evidentne pojačane izraženosti kod karcinoma dojke, te mogućeg terapijskog dijelovanja u tih bolesnica.

7. SAŽETAK

U ovom radu analizirani su podaci dobiveni od 150 bolesnica koje su započele liječenje zloćudnog tumora dojke na Odjelu Onkološke kirurgije Klinike za tumore u periodu od 1995. do 1997. godine. Bolesnice su svrstane u tri skupine, ovisno o diferenciranosti tumora, a svaka skupina sadržavala je po 50 bolesnica s dobro, srednje i slabo diferenciranim tumorima. Sve bolesnice su imale duktalni invazivni karcinom. U vrijeme dijagnoze nitko od bolesnica nije imao udaljenih metastaza. Kod bolesnica su analizirani slijedeći klinički i patohistološki čimbenici: dob, klinički stupanj bolesti, stupanj diferenciranosti tumora, veličina tumora, status limfnih čvorova, status hormonskih receptora te način liječenja bolesnica. Kod bolesnica je analiza izražajnosti Cox-2 proteina učinjena imunohistokemijskom metodom te analiza sadržaja stanične DNA na protočnom citometru. Praćenje tijeka bolesti napravljeno je do 31.12. 2004. godine. Od ukupnog broja bolesnica tijekom praćenja (1995-2004.) njih 59 (39,3%) dobilo je metastaze. Od 59 bolesnica koje su dobile metastaze nakon završenog praćenja 54 bolesnice su umrle (91.5%) dok ih je 5 (8,5%) živih. Cilj rada bio je utvrditi izražajnost Cox-2 proteina u primarnim tumorima dojke; utvrditi povezanosti izražajnosti Cox-2 u stanicama raka dojke s ishodom liječenja i njegovu povezanost s ostalim prognostičkim čimbenicima kod raka dojke; ispitati povezanost izražajnosti Cox-2 s rezultatima protočne citometrije kao pokazateljem proliferacijske aktivnosti tumora te razliku izražajnosti Cox-2 u bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima u odnosu na tijek bolesti. Rezultat studije pokazuje da su bolesnice s bolje diferenciranim tumorima imale statistički značajno manje tumore ($P<0,001$), manji broj limfnih čvorova je bio zauzet metastazama ($P=0,002$) te češće pozitivne estrogenske receptore ($P=0,02$). Ni univarijantna ni multivarijantna analiza dobivanja metastaza i preživljenja ovisno o gradusu tumora nisu pokazale statistički značajne razlike. Veličina tumora i status limfnih čvorova pokazale su prognostičko značenje i univarijantnom i multivarijantnom analizom ($P=0,049$). Bolesnice s negativnim estrogenskim receptorima brže su razvijale udaljene metastaze ($P=0,023$), dok za bolesnice s negativnim progesteronskim receptorima nije zabilježena statistički značajna razlika u pojavljivanju metastaza ($P=0,054$). Univarijantna analiza hormonskih receptora i dužine preživljenja pokazala je i za bolesnice s negativnim estrogenskim ($P=0,032$) i progesteronskim receptorima ($P=0,027$) statistički značajnije kraće preživljenje. Također je i multivarijantna analiza vrijednosti hormonskih receptora pokazala statistički značajno lošije preživljenje u bolesnica s negativnim estrogenskih receptorima u

odnosu na one s pozitivnim receptorima (P=0,049). Analiza tumora protočnom citometrijom pokazala je da su bolesnice s nižim gradusom tumora imale statistički značajno veći broj diploidnih tumora (P<0,001)i tumore s nižom proliferacijskom «S» fazom tumora (P<0,001). Ni univarijantna ni multivarijatna analiza pojave metastaza i preživljenja nisu pokazale statistički značajne razlike između žena s diploidnim i aneuploidnim tumorima te između žena s nižom i višom proliferacijom. Pozitivnost na Cox-2 protein u tumorskim stanicama očitovala se u granularnom citoplazmatskom bojenju. U našoj studiji Cox-2 bio je pozitivan u 65 bolesnica (43,3%). Analiza izražajnosti Cox-2 proteina i gradusa pokazala je statistički značajnu razliku izraženosti Cox-2 u bolesnica s različitim gradusima (P=0,018) dok analize izražajnosti Cox-2 i veličine tumora te Cox-2 i statusa limfnih čvorova nisu pokazale statistički značajne razlike. Studija je pokazala da su tumori pozitivni na Cox-2 protein u većem broju bili aneuploidni dok su tumori negativni na Cox-2 češće bili diploidni (P=0,031). Naša studija nije pokazala povezanost između povećane izražajnosti Cox-2 i proliferacijske aktivnosti tumora (S-faze tumora) mjerene na protočnom citometru . Također u studiji nije pronađena razlika u izražajnosti Cox-2 proteina ovisno o hormonskom statusu tumora. Analiza izražajnosti Cox-2 s pojavom metastaza i preživljenjem (univarijatna i multivarijantna analiza) nije pokazala statistički značajne razlike između bolesnica s negativnim i pozitivnim Cox-2 proteinom. Studija je pokazala povišenu izražajnost Cox-2 proteina u bolesnica s rakom dojke. Cox-2 najčešće je bio povišen u bolesnica sa srednje diferenciranim tumorima. Studija nije pokazala prognostičko značenje Cox-2 proteina.

8. SUMMARY

The present thesis analyses data on 150 female patients who started their breast cancer treatment at the Oncological Surgery Department, University Hospital for Tumors between 1995 and 1997. The patients are divided in three groups, according to the tumor differentiation, and each group includes 50 patients with well, moderately and poorly differentiated tumors, respectively. All patients were diagnosed with invasive ductal carcinoma. In time of diagnosis none of patients had distant metastases. The following clinical and patohistological factors were analyzed: age, clinical stage, tumor differentiation grade, tumor size, lymph node status, hormone receptor status, and method of treatment. Cox-2 protein expression was studied using immunohistochemical method, and the tumor cell DNA content was analyzed with flow cytometer. The disease course was followed up until the end of 2004. Fifty-nine (39.3%) of patients followed up during the period 1995-2004 developed metastases, of which 54 patients (91.5%) died and 5 (8.5%) survived until the end of the study period. The aim of the study was to determine expression of Cox-2 protein in primary breast tumors, and establish association between the Cox-2 expression in breast cancer cells and an outcome of therapy and its relation to other prognostic factors, to analyze relation between the Cox-2 expression and the flow cytometry results as an indicator of proliferating tumor, and different Cox-2 expressions in patients with moderately differentiated tumors related to the disease course. The study results show that the well differentiated tumors were statistically significantly smaller in size (P<0,001), metastases spread on a smaller number of lymph nodes (P=0,002), and the estrogen receptors were positive in more cases (P=0,02). No statistically significant difference was determined for metastasizing and survival relation to the tumor grade by either univariate or multivariate analyses. However, the tumor size and lymph node status have proven as prognostically significant in both univariate and multivariate analyses (P=0,049). Patients with negative estrogen receptors developed distant metastases faster (P=0,023), while in patients with negative progesterone receptors no statistically significant difference in development of metastases was recorded (P=0,054). Univariate analysis of hormone receptors and overall survival showed that, statistically, survival time of patients with negative estrogen (P=0,032) and progesterone receptors (P=0,027) is significantly shorter. The multivariate analysis of hormone receptors also showed statistically significant poor survival of patients with negative estrogen receptors as compared to the patients with positive receptors (P=0,049). Tumor analysis with flow cytometry showed

that, statistically, the patients with lower tumor grade had significantly more diploid tumors (P<0,001) and tumors with lower proliferating S phase (P<0,001). Neither univariate nor multivariate analysis of metastasis development and survival showed statistically significant difference between the patients with diploid vs. aneuploid tumors or between the patients with lower vs. higher proliferation rate. Cox-2 protein positive tumor cells were presented by granular cytoplasm staining. In our study, 65 patients (43.3%) were Cox-2 positive. Analysis of Cox-2 protein expression and tumor grade revealed a statistically significant difference in Cox-2 expression in patients with different tumor grades (P=0,018), while no statistically significant difference was found by analyses of relations between Cox-2 expression and tumor size, and Cox-2 and lymph node status. The study shows that the Cox-2 positive tumors are prevalently aneuploid and the Cox-2 negative tumors are more frequently diploid (P=0,031). The study does not show interrelation between elevated Cox-2 expression and tumor proliferation rate (S phase) measured with the flow cytometer. The study also did not detect a difference in Cox-2 protein expression depending on tumor hormone receptor status. Analysis of association of Cox-2 expression with development of metastases and survival (univariate and multivariate analysis) showed no statistically significant difference between the Cox-2 negative and positive patients. The study indicates that Cox-2 protein expression in the breast cancer patients is increased. In most cases Cox-2 was increased in patients with moderately differentiated tumors. However, the study did not confirm a prognostic value of Cox-2 protein.

9. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
2. Turić M, Kolarić K, Eljuga D (ur.) Klinička onkologija. Zagreb: Globus; 1996, str.577-628.
3. Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology of tumors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1995, str. 35-82.
4. Doll R, Muir CS, Waterhoouse J, Vicc J. Cancer incidences in five continents. Berlin-New York; Springer-Verlag; 1970.
5. Haagensen CD. Diseases of the breast. 2. izd. Philadelphia:W. B. Saunders; 1971, str. 380-390.
6. Boyle P, Autier P, Bertelink H, Baselga J i sur. European Code Against Cancer and scientific justification: Third version(2003). Annals of Oncology 2003;14:973-1005.
7. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2002. Bilten 2004;25.
8. Esteva FJ, Hortobagy GH. Prognostic molecular markers in early breast cancer. Breast Cancer Res 2004;6:109-118.
9. Cotran RE, Kumar V, Collins T. Pathologic basis of disease. 6. izd. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999, str. 1093-119.
10. Šarčević B, Šeparović R, Šeparović V i sur. Prognostička vrijednost određivanja prisutnosti i histološkog stupnja intraduktalne komponente invazivnog duktalnog karcinoma dojke nakon poštednog liječenja. Liječ Vjesn 1998;120:4-7.
11. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organisation Classification of Tumors. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. France: IARC Press; 2003.
12. Holland R, Peterse JL, Millis RR i sur. Ductal carcinoma in situ: A proposal for a new classification. Semin Diagn Pathol 1994;11:167-80.
13. Renshaw AA, Cartagena N, Derhagopian RP, Gould EW. Lobular neoplasia in breast core needle biopsy specimens is not associated with an increased risk of ductal carcinoma in situ or invasive carcinoma. Am J Clin Pathol. 2002 May;117(5):797-9.
14. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Invasive carcinoma of no special type (ductal NST). U: Elston CW, Ellis IO, (ur). The Breast, London: Churchill Livingstone,1998;284-287.
15. Rosen PP. Invasive duct carcinoma. U: Rosen's breast pathology. ur. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;325-364.
16. Elston CW, Ellis IO. Assessment of histological grade. U: Elston CW, Ellis IO, (ur). The Breast. London: Churchill Livingstone,1998;365-384.
17. Elston CW, Ellis IO, Goulding H, i sur. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. U: Elston CW, Ellis IO, (ur). The Breast, London: Churchill Livingstone,1998;385-433.
18. Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, i sur. (ur): AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 1997.
19. Page DL, Anderson TJ, Sakamoto G. Infiltrating carcinoma: major histological types. U: Page DL, Anderson TJ, (ur). Diagnostic histopathology of the breast. London: WB Saunders,1987;219-226.

20. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Infiltrating lobular carcinoma. U: Elston CW, Ellis IO, (ur). The Breast. London: Churchill Livingstone,1998;288-300.
21. Rosen PP. Invasive lobular carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;627-652.
22. Rosen PP, Oberman HA. Tumors of the mammary gland.Atlas of tumor pathology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1993:175-181.
23. Rosen PP. Tubular carcinoma. U: Rosen's breast pathology, ur. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;365-380.
24. Winchester DJ, Sahin AA, Tucker SL, i sur. Tubular carcinoma of the breast. Predicting axillary nodal metastases and recurrence. Ann Surg 1996; 223:342-347.
25. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, i sur. Invasive breast carcinoma. U: Tavassoli FA, Devilee P, ur. WHO: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon 2003;13-59.
26. Križanac Š. Kribriformni karcinom. U: Fajdić J i sur. Suvremena dijagnostika bolesti dojke. Zagreb: Medicinska naklada, 2001;316-317.
27. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Invasive cribriform carcinoma. U: The Breast. Ur:Elston CW, Ellis IO. London: Churchill Livingstone,1998;308-312.
28. Ellis IO, Pinder SE, Lee AHS i sur. Tumors of the breast. U: Fletcher CDM (ur). Diagnostic histopathology of tumors. London: Churchill Livingstone, 2000; 896-897.
29. Rosen PP. Cribriform carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;551-553.
30. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG. Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. Hum Pathol 1990; 3:333-338.
31. Schnitt SJ, Guidi AJ. Pathology of invasive breast cancer. Medullary carcinoma. U: Harris JR i sur, ur. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:435-437.
32. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Medullary carcinoma. U: The Breast. Ur:Elston CW, Ellis IO. London: Churchill Livingstone,1998;300-303.
33. Rosen PP. Medullary carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;405-424.
34. Rosen PP. Mucinous carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;463-481.
35. Schnitt SJ, Guidi AJ. Pathology of invasive breast cancer. Mucinous carcinoma. U: Harris JR i sur. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:433-435.
36. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Mucinous carcinoma. U: The Breast. Ur:Elston CW, Ellis IO. London: Churchill Livingstone,1998;315-319.
37. Rosen PP. Mucocele-like tumors of the breast. Am J Surg Pathol 1986; 10:464-469.
38. Rosen PP. Mammary carcinoma with endocrine features. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;497-501.
39. Sapino A, Righi L, Cassoni P, i sur. Expression of apocrine differentiation markers in neuroendocrine breast carcinomas of aged women. Mod Pathol 2001; 14(8): 768-776.
40. Schnitt SJ, Guidi AJ. Pathology of invasive breast cancer. Invasive carcinoma with neuroendocrine differentiation. U: Harris JR i sur. Ur. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:443-444.

41. Shin SJ, DeLellis RA, Ying L, i sur. Small cell carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical study of nine patients. Am J Surg Pathol 2000;24:1231-1238.
42. Rosen PP. Papillary carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;381-404.
43. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Invasive papillary carcinoma. In: The Breast. Ur:Elston CW, Ellis IO. London: Churchill Livingstone,1998;319-322.
44. Lefkowitz M, Lefkowitz W, Wargotz ES. Intraductal (intracystic) papillary carcinoma of the breast and its variants: a clinicopathological study of 77 cases. Hum Pathol 1994;25:802-809.
45. Paterakos M,Watkin WG, Edgerton SM, i sur. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. Hum Pathol 1999;30:1459-1463.
46. Middleton LP, Tressera F, Sobel ME, i sur. Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. Mod Pathol 1999;12:499-504.
47. Rosen PP. Invasive micropapillary carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;561-564.
48. Walsh MM,Bleiweiss IJ. Invasive micropapillary carcinoma of the breast: eighty cases of an underrecognized entity. Hum Pathol 2001;32:583-589.
49. Rosen PP. Apocrine carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;483-495.
50. Eusebi V, Foschini MP, Bussolati G, i sur. Myoblastomatoid (histiocytoid) carcinoma of the breast. A type of apocrine carcinoma. Am J Surg Pathol 1995;19:553-562.
51. Raju U, Zarbo RJ, Kubus J, i sur. The histologic spectrum of apocrine breast proliferations: a comparative study of morphology and DNA content by image analysis. Hum Pathol 1993;24:173-181.
52. Schnitt SJ, Guidi AJ. Pathology of invasive breast cancer. Metaplastic carcinoma. U: Harris JR i sur. ed. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:440-443.
53. Rosen PP. Carcinoma with metaplasia. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;425-453.
54. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Metaplastic carcinoma. U: The Breast. Ur:Elston CW, Ellis IO. London: Churchill Livingstone,1998;323-330.
55. Foschini MP, Dina RE, Eusebi V. Sarcomatoid neoplasms of the breast: proposed definitions for biphasic and monophasic sarcomatoid mammary carcinomas. SemDiagnPathol 1993;0:128-136.
56. Rosen PP. Lipid-rich carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;555-556.
57. Križanac Š. Lipidima bogat karcinom. U: Fajdić J i sur.Suvremena dijagnostika bolesti dojke. Zagreb: Medicinska naklada, 2001;318.
58. Dina R, Eusebi V. Clear cell tumors of the breast. Semin Diagn Pathol 1997; 14: 175-182.
59. Lamovec J, Bracko M. Secretory carcinoma of the breast: light microscopical, immunohistochemical and flow cytometric data. Mod Pathol 1994;7:475-479.
60. Schnitt SJ, Guidi AJ. Pathology of invasive breast cancer. Secretory carcinoma. U: Harris JR i sur. ur. Diseases of the breast. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2000:446-447.
61. Damiani S, Eusebi V, Losi L, i sur. Oncocytic carcinoma (malignant oncocytoma) of the breast. Am J Surg Pathol 1998;22 (2):221-230.

62. Costa MJ, Silverberg SG. Oncocytic carcinoma of the male breast. Arch Pathol Lab Med 1989;113:1396-9.
63. Pastolero G, Wedad Hanna, Zbieranowski I, i sur. Proliferative activity and p53 expression in adenoid cystic carcinoma of the breast. Mod Pathol 1996;9:215-219.
64. Rosen PP. Inflammatory carcinoma. U: Rosen's breast pathology. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2001;676-683.
65. Somlo G, Frankel P, Chow W, Leong L i sur. Prognostic indicators and survival in patients with stage IIIB inflammatory breast carcinoma after dose-intense chemotherapy. J Clin Oncol. 2004;22(10):1839-48.
66. Fisher ER, Tavares J, Bulatao IS, i sur. Glycogen-rich, clear cell breast cancer: with comments concerning other clear cell variants. HumPathol 1985;16:1085-1090.
67. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW i sur. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. Surg Clin North Am. 2003;83:803-19
68. Jakić-Razumović J, Unušić J. Patohistološka analiza aksilarnih limfnih čvorova s posebnim osvrtom na postupak kod biopsije "sentinel" limfnog čvora. U: Bolesti dojke (zbornik radova XI. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke"). Prpić I i sur. (ur). Zagreb 2001; 107-118.
69. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. J Clin Oncol. 2001;19:3817-27.
70. Dobrila F, Strčić M, Lovasić F, i sur. Uloga kirurškog odstranjenja aksilarnih limfnih čvorova kod operabilnog raka dojke. U: Bolesti dojke (zbornik radova XI. znanstvenog sastanka "Bolesti dojke"). Prpić I i sur. (ur). Zagreb 2001; 93-99.
71. Tominaga T, Takashima S, Danno M. Randomized clinical trial comparing level II and level III axillary node dissection in addition to mastectomy for breast cancer. Br J Surg. 2004;91:38-43.
72. Goldstein NS, Mani A, Vicini F, i sur. Prognostic features in patients with stage T1 breast carcinoma and 0,5 cm or less lymph node metastasis. Am J Clin Pathol 1999;11:21-28.
73. Weaver DL. Sentinel lymph nodes and breast carcinoma. Which micrometastases are clinically significant? Am J Surg Pathol 2003;27:842-845.
74. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrida S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. N Engl J Med. 2003;349:546-53.
75. Goyal A, Mansel RE. Current status of sentinel lymph node biopsy in solid malignancies. World J Surg Oncol. 2004;2:9.
76. Rosai J. Breast. In: Ackerman's surgical pathology, ur. Rosai J, ed. St.Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1996:1621-1622.
77. Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. Cancer 2004;100:20-7.
78. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer.Br J Cancer 1957;11:359-77.
79. 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.

80. Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A, i sur. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. Hum Pathol 1985;16:1212-1218.
81. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. Hum Pathol. 1992;23(7):755-61.
82. Fernandez Acenero MJ, Galindo Gallego M, Arangoncillo Ballesteros P, i sur. Vascular density as a prognostic indicator for invasive ductal breast carcinoma. Virchows Arch 1998;432:113-117.
83. Masterson J, Wu DW, Sarta C, i sur. Antiangiogenic effect of taxane chemotherapy in the treatment of locally advanced breast cancer. Mod Pathol 2001;14:31.
84. Šeparović V, Šarčević B, Šeparović R, i sur. Prognostic value of prominent DCIS component in the breast-conserving therapy of stage I and II invasive ductal breast cancer. Breast 1999;8: 1-5.
85. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules ions. Ann NY Acad Sci 1949;51:660-70.
86. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of Tissue Estrogen and Progesterone Receptor Levels: A Survey of Current Practice, Techniques, and Quantitation Methods. Breast J. 2000;6:189-196.
87. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, Sahmoud T; ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet. 2002;359(9324):2131-9.
88. Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor negative breast carcinoma. ArchPatholLabMed 2002;126:325-330.
89. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, i sur. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. J Pathol 2002;196:17-25.
90. Milas L, Mason KA, Ang KK. Epidermal growth factor receptor and its inhibition in radiotherapy: in vivo findings. Int J Radiat Biol. 2003;79:539-45.
91. Schnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: Neu opportunities and Neu challenges. Mod Pathol 2001;14:213-218.
92. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, i sur. Determination of HER2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Mod Pathol 2000;13:37-45.
93. Jakić-Razumović J. Prognostic value of HER2/neu in breast carcinoma patients. Acta Clin Croat 2002;41:145-148.
94. Bhargava R, Naeem R, Marconi S, i sur. Tyrosine kinase activation in breast carcinoma with correlation to HER2/neu gene amplification and receptor overexpression. Hum Pathol 2001;32:1344-1350.
95. Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, i sur. Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: an important new independent indicator of prognosis? Hum Pathol 1993;24:469-476.
96. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, i sur. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. Hum Pathol 1993;24:463-468.
97. Thor AD, Moore DH, Edgerton SM, i sur. Accumulation of p53 tumor supressor gene protein is an independent marker of prognosis in breast cancers. Mod Pathol 1992;5:18A.
98. Alerić I. Uloga proteina nm23 na klinički tijek i preživljenje bolesnica s karcinomom dojke. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Magistarski rad 2000.
99. Rosenthal SI, Depowski PL, Ross JS. Decreased expression of nm23-H1 is associated with increased recurrence of breast cancer. Mod Pathol 2000;13:45.

100. Aziz S, Pervez S, Khan S, i sur. Immunohistochemical Cathepsin-D expression in breast cancer: correlation with established pathological parameters and survival. Pathol Res Pract 2001;197:551-557.
101. Alsabeh R, Wilson CS, Ahn CW, i sur. Expression of bcl-2 by breast cancer: a possible diagnostic application. Mod Pathol 1996;9:439-444.
102. Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DLM. bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. VirchowsArchiv 1995;426:163-168.
103. Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, i sur. Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. Mod Pathol 2001;14:423-427.
104. Palacios J, Benito N, Pizarro A, i sur. Relationship between ERBB2 and E-cadherin expression in human breast cancer. Virchows Arch 1995;427:259-263.
105. Gamallo C, Moreno-Bueno G, Sarrió D, i sur. The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma. ModPathol 2001; 14: 650-654.
106. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. Reduced or absent E-cadherin expression predicts early metastases in breast cancer. Mod Pathol 2001;14:29.
107. Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, i sur. Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. J Pathol 1993;169:245-250.
108. Peralta Soler A, Knudsen KA, Salazar H, i sur. P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival. Cancer 1999;86:1263-1272.
109. Palacios J, Benito N, Pizarro A, i sur. Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Am J Pathol 1995;146:605-612.
110. Saad RS, Ming M, Brown HG. N-cadherin expression in breast cancer with and without lymph node metastases. Mod Pathol 2001;14:35.
111. Landberg G, Hilmer Nielsen N, Nilsson P, i sur. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. Can Res 1997;57:549-554.
112. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, i sur. The stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma. Mod Pathol 2001;14:28.
113. Barbareschi M, Aldovini D, Maisonneuve P, i sur. Syndecan-1 (CD138) expression is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis in breast carcinoma. Mod Pathol 2001;14:21.
114. Luna-Moré S, Rius F, Weil B, i sur. EMA: a differentiation antigen related to node metastatic capacity of breast carcinomas. Pathol Res Pract 2001;197:419-425.
115. Barnes DM. Cyclin D1 in mammary carcinoma. J Pathol 1997; 181: 267-269.
116. Donnellan R, Kleinschmidt I, Chetty R. Cyclin E immunoexpression in breast ductal carcinoma: pathologic correlations and prognostic implications. Hum Pathol 2001;32:89-94.
117. DePaola F, Vecci AM, Granato AM, i sur. p27/kipI expression in normal epithelium, benign and neoplastic breast lesions. J Pathol 2002;196:26-31.
118. Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, Batsis Ch, Karavasilis V, Charchanti A, Pavlidis N, Agnantis NJ. Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. Breast. 2003;12:111-9.
119. Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. Clin Cancer Res. 2004;10:1057-63.
120. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. N Engl J Med. 1989;320:627-33.

121. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, Smith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. Cancer. 1991;68:549-57.
122. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. Am J Clin Pathol. 1995;104:42-9.
123. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. Cancer. 1993 Jun 15;71:3926-31.
124. Clark GM, Allred DC, Hilsenbeck SG, Chamness GC, Osborne CK, Jones D, Lee WH. Mitosin (a new proliferation marker) correlates with clinical outcome in node-negative breast cancer. Cancer Res. 1997;57:5505-8.
125. Simon Ls. Role and regulation of cyclooxigenase-2 during inflamation. Am J Med 1999;106:37-42.
126. Mornett Lj: Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. Cancer res 1992;52:5575-5589.
127. Harris RE, Robertson FM, Abou-Issa HM, Farrar WB, Brueggemeier R. Genetic induction and upregulation of cyclooxygenase (COX) and aromatase (CYP19): an extension of the dietary fat hypothesis of breast cancer. Med Hypotheses. 1999;52:291-2.
128. Zhao Y, Agarwal VR, Mendelson CR, Simpson ER. Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene. Endocrinology 1996;137:5739-42.
129. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. Cancer Res. 1998 Jan 15;58:362-6.
130. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:11280-5.
131. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. J Clin Pathol 2002;55:429-34.
132. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell. 1996;87:803-9.
133. Liu CH, Chang S, Narko K, Trifan OC, Wu M, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. J Biol Chem 2001;276:18563-18569.
134. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994;107:1183-8.
135. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. Cancer Res 1997;57:1276-80.
136. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. Cancer Res 1999;59:198-204.
137. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. Head Neck 2002;24:792-9.

138. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. Int J Cancer 2000;86:667-71.
139. Milas I, Komaki R, Hachiya T, Bubb RS, Ro JY, I sur. Epidermal Growth Factor Receptor, Cyclooxygenase-2, and BAX Expression in the Primary Non- Small Cell Lung Cancer and Brain Metastases. Clin Cancer Res. 2003;9:1070-76.
140. Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, i sur. Prostaglandins and breast cancer. Lancet 1977;2:624-6.
141. Rolland PH, Martin PM, Jacquemier J, Rolland A, Toga M. Prostaglandins in human breast cancer: evidence suggesting that elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. J Natl Cancer Inst 1980;64:1061-1070.
142. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J Clin Immunol 1983;3:295-314.
143. Karmali RA, Welts S. Thaler HT, Lefevre F. Prostaglandins in breast cancer. Relationship to disease stage and hormone status. Br J Cancer 1983;48:689-696.
144. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. Cancer Res 2002;62:1676-81.
145. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. Cancer Res 2002;62:632-5.
146. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. N Engl J Med. 2002;347(16):1227-32.
147. Fisher B, Jeong JH, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N. Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. N Engl J Med 2002;347:567-75.
148. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong JH, Wolmark N. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. N Engl J Med. 2002;347:1233-41.
149. Fisher B, Dignam J, Mamounas EP, Costantino JP, i sur. Sequential methotrexate and fluorouracil for the treatment of node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-negative tumors: eight-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-13 and first report of findings from NSABP B-19 comparing methotrexate and fluorouracil with conventional cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil. J Clin Oncol 1996;14:1982-92.
150. Fisher B, Redmond C, Dimitrov NV i sur. A randomised clinical trial evaluating sequential methotrexate and fluorouracil in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-negative tumors. N Engl J Med,1989;320:473
151. Cardoso F, Piccart MJ. The best use of chemotherapy in the adjuvant setting. Breast. 2003;12:522-8.
152. Recht A, Edge SB, Solin LJ, Robinson DS, i sur. American Society of Clinical Oncology. Postmastectomy radiotherapy: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 2001;19:1539-69.
153. Laronga C, Kemp B, Johnston D, Robb GL, Singletary SE. The incidence of occult nipple-areola complex involvement in breast cancer patients receiving a skin-sparing mastectomy. Ann Surg Oncol. 1999;6:609-13.

154. Gerber B, Krause A, Reimer T, Muller H, Kuchenmeister I, Makovitzky J, Kundt G, Friese K. Skin-sparing mastectomy with conservation of the nipple-areola complex and autologous reconstruction is an oncologically safe procedure. Ann Surg 2003;238:120-7.
155. Kronowitz SJ, Hunt KK, Kuerer HM, Babiera G, McNeese MD, Buchholz TA, Strom EA, Robb GL. Delayed-immediate breast reconstruction. Plast Reconstr Surg 2004;113:1617-28.
156. Krag DN, Julian TB, Harlow SP, Weaver DL, Ashikaga T, Bryant J, Single RM, Wolmark N. NSABP-32: Phase III, randomized trial comparing axillary resection with sentinal lymph node dissection: a description of the trial. Ann Surg Oncol 2004;11:208-10.
157. Mansel RE, Goyal A. European studies on breast lymphatic mapping. Semin Oncol. 2004;31:304-10.
158. Fisher B, Ravdin RG, Ausman RK, Slack NH, Moore GE, Noer RJ. Surgical adjuvant chemotherapy in cancer of the breast: results of a decade of cooperative investigation. Ann Surg 1968;168:337-56.
159. Fisher B, Carbone P, Economou SG, Frelick R, Glass A, Lerner H, Redmond C, Zelen M, Band P, Katrych DL, Wolmark N, Fisher ER. 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. N Engl J Med. 1975;292:117-22.
160. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnatelli L, Brambilla C, De Lena M, Tancini G, Bajetta E, Musumeci R, Veronesi U. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. N Engl J Med. 1976;294:405-10.
161. Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G. Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in node-negative and estrogen receptor-negative breast cancer. Updated results. Ann Oncol. 1996;7:481-5.
162. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ Jr, Deshler A, Fulton S, Hendricks CB, Kemeny M, Kornblith AB, Louis TA, Markman M, Mayer R, Roter D. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. J Natl Cancer Inst. 2001;93:979-89.
163. Nabholtz JM. Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2003;79:3-9.
164. Cardoso F, Piccart MJ. The best use of chemotherapy in the adjuvant setting. Breast. 2003;12:522-8.
165. Fisher B, Constantino J, Redmond C i sur. A randomised clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive rumors. N Engl J Med,1989;320:4
166. Early Breast Cancer Trial's Collaborative Group. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer: An overview of 61 randomized trials among 28 896 womens. N Engl J Med 1988;319:1681
167. Hortobagyi GN, Buzdar AU. Locally advanced breast cancer: A review including the MD Anderson Experience. U: Ragaz J Jr, IM Ariel (ur), High risk breast cancer. Berlin:Springer-Verlag, 1991
168. Somlo G, Frankel P, Chow W, Leong L, i sur. Prognostic indicators and survival in patients with stage IIIB inflammatory breast carcinoma after dose-intense chemotherapy. J Clin Oncol. 2004;22:1839-48.
169. Shenkier T, Weir L, Levine M, Olivotto I, Whelan T, Reyno L; Steering Committee on Clinical Practice Guidelines for the Care and Treatment of Breast Cancer. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 15. Treatment for women with stage III or locally advanced breast cancer. CMAJ. 2004;170:983-94.

170. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem, 1983;31:1333-5.
171. von Hansemann D Ueber assymetrishe Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeztung. Virchiws Arch (A) Pathol Anat 1890;119:299-326.
172. Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, Spyratos F, Brunet M. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. Cancer. 1989;64:1914-21.
173. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Oncologist. 2004;9:606-16.
174. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. Cancer 1989;63:181-187.
175. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology 1999;31:209-223.
176. Wenger CR, Beardslee S, Owens MA. Pounds G, Oldaker T, Vendely P, Pandian MR, Harrington D, Clark GM, McGuire WL. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. Breast Cancer Res. 1993;28:9-20.
177. Frierson HF Jr. Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. Hum Pathol 1993;24:24-9.
178. Frierson HF Jr, Wilbur DC, Gaffey MJ i sur. Quantitative image cytometry of infiltrating ductal carcinoma: comparison with prognostic parameters and reproducibility of histological grade. Hum Pathol 1996;27:821-6.
179. Chassevent A, Jourda ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, Bolla M, and Frederique S for Multicenter Study Group PHRC95. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. Clin Cancer Res. 2001;7:909-917.
180. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localisation of prostaglandin endoperoxidase H synthases-1 and 2 by immunoelectron microscopy. J Biol Chem 1998;273:9886-93.
181. Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxigenase-2 in human breast cancer. J Natl Cancer Inst 1998;90:455-60.
182. Parret ML, Harris RL, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxigenase-2 gene expression in human breast cancer. Int J Oncol 1997;10:503-8.
183. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. Cancer 2000;89:2637-45.
184. Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. Clin Cancer Res. 2003;9:2651-56.
185. Brodie AM, Lu Q, Long BJ, Fulton A, Chen T, Macpherson N, DeJong PC, Blankenstein MA, Nortier JW, Slee PH, van de Ven J, van Gorp JM, Elbers JR, Schipper ME, Blijham GH, Thijssen JH. Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers. J Steroid Biochem Mol Biol. 2001;79:41-7.
186. Singh-Ranger G, Kirkpatrick KL, Clark GM, Mokbel K. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression correlates with progesterone receptor positivity in human breast cancer. Curr Med Res Opin. 2003;19:131-4.
187. Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. Mod Pathol. 2003;16:1199-1204.

188. Khuder SA, Mutgi AB: Breast cancer and NSAID use: A meta-analysis. Br J Cancer. 2001;84:1188-1192.
189. Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, et al: Chemotherapeutic evaluation of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model. Oncol Rep. 2000;7:1377-1381.
190. Dang CT, Dickler MN, Moasser MM, et al: Celecoxib (C) and trastuzumab (Herceptin) (H) is feasible after H for HER-2/neu overexpressing (H2) metastatic breast cancer (MBC) patients (pts). Proc Am Soc Clin Oncol 21:48b, 2002. Chow LWC, Toi M: Prospective pilot study of the preoperative use of celecoxib (CELEBREX) and FEC for the treatment of locally advanced breast cancer. Breast Cancer Res Treat 76:S54, 2002
191. Chow LW, Wong JL, Toi M.: Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant (CAAN) trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003;86:443-7.
192. Mamdani M, Juurlink DN, Lee DS, Rochon PA, Kopp A, Naglie G, Austin PC, Laupacis A, Stukel TA. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors versus non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study. Lancet. 2004;363:1751-6.
193. Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxigenase-2 mediated mammary hyperplasia. Cancer Res. 2005;65:4496-99.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 27. 08. 1967. u Imotskom gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Studij medicine upisao sam 1987. godine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu i diplomirao sam na istom 1992. godine. Oženjen sam i otac sam troje djece.

Pripravnički staž obavio sam u Klinici za tumore u Zagrebu, stručni ispit položio sam 1994., a od 1995. do 1999. specijalizant sam kirurgije. Specijalistički ispit položio sam 1999. god. u KB "Sestre Milosrdnice" u Zagrebu. Nakon položenog ispita radim kao kirurg u Klinici za tumore.

Poslijediplomski studij iz Medicinskih znanosti na Medicinskom fakultetu u Zagrebu upisao sam 1999. godine. Nakon dvije godine završenog poslijediplomskog studija, od 2001. do 2002 boravio sam godinu dana kao "Visiting scientist" u MD Anderson Cancer Center, Houston, University of Texas gdje sam radio na projektu "biomarkeri kao prediktori moždanih metastaza u raka pluća". Po povratku iz SAD završio sam 3. godinu doktorskog studija i 3. studenog, 2003. javno obranio temu doktorske disertacije.

Konzultant sam na projektu pod nazivom "Biomarkeri oštećenja genoma stanice u ekogenetičkim istraživanjima".

Član sam Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog kirurškog društva, Hrvatskog senološkog društva.

Objavio sam više znanstvenih i stručnih radova te aktivno sudjelovao na više domaćih i međunarodnih stručnih skupova.