Uloga i značenje telomeraze u raku dojke

Kulić, Ana

Doctoral thesis / Disertacija

2010

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:105:307669

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Kulić

Uloga i značenje telomeraze u raku dojke

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ana Kulić

Uloga i značenje telomeraze u raku dojke

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena u Zavodu za patofiziologiju i znanstveno istraživanje Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: prof. dr. sc. Damir Vrbanec

Najljepše zahvaljujem mome mentoru prof.dr Damiru Vrbanecu na pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada.

Najljepše zahvaljujem djelatnicima Zavoda za patofiziologiju i znanstveno istraživanje pročelniku prof. dr Zdenku Kovaču, mr.Sandi Jelisavac-Ćosić,Ljubici, Nedi, Dubravki i Ani na pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jasminki Jakić-Razumović na pomoći pri izradi i interpretaciji rezultata imunohistokemijske analize kao i podršci u izradi ovog rada.

Najljepše zahvaljujem doc. dr Maji Sirotković-Skerlev na stručnim savjetima i prijateljskoj pomoći pri izradi ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem akademiku Stjepanu Gamulinu na pomoći pri konačnom oblikovanju ovoga rada kao i za podršku tijekom mog znanstvenog i stručnog rada.

Svim prijateljima velika hvala na podršci i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Nezamjenjivi oslonac u ovom radu bila je moja obitelj Petar, Marija i Josip te njima posvećujem ovaj rad.

POPIS OZNAKA I KARTICA

BRCA-1 –od eng. Breast cancer 1; gen vezan uz rak dojke -1

BRCA-2- od eng. Breast cancer 2; gen vezan uz rak dojke -2

CCND1- gen koji kodira ciklin D1

CD- od eng. Cluster of differentiation; limfocitni biljeg

CDC25C-gen koji kodira fosfatazu 3 u M-fazI

CHEK 2- od eng. Cell – cycle checkpoint kinase

CK- od eng. cytokeratin; citokeratin

DCC –od engl. dextran coated charcoal; ugljenom obložen dekstran

EIA- od eng. enzyme immunoassay; enzimski imunotest

ELISA- od eng. enzyme-linked immunosorbent assay:enzimski imunotest

EGF- od eng. *epidermal growth factor-epidermalni čimbenik rasta*

ER- estrogenski receptor

GST-pi- glutation S transferaza pi

HER-2 –od eng. human epidermal growth factor receptor 2; receptor epidermalnog čimbenika rasta

HSP- od eng. heat shock protein; stanična stresna bjelančevina

hTERT-od engl. human telomerase reverse transcriptase:katalitička podjedinica telomeraze

hTR- od engl. RNA component telomerase RNA podjedinica telomeraze

IGF-1- od eng. insulin-like growth factor 1; inzulinu sličan čimbenik rasta 1

LDH-B- laktat dehidrogenaza B

MALDI-TOF- od eng. Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight; vrsta masene spektroskopije

MAP- od eng. mitogen activated

MMP- Matriks metaloproteinaze

PAI-1- inhibitor plazminogen aktivatora

PCR – od eng. polymerase chain reaction

PR- progesteronski receptor

SELDI-TOF- od eng. Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight; kombinacija masene spektroskopije i kromatografije

uPA- urokinaza plazminogen aktivator

TRAP - od engl. telomeric repeat amplification protocol

SADRŽAJ

1.UVOD
1.1. Čimbenici rizika raka dojke 1
1.1.1.Epidemiološki čimbenici 1
1.1.2. Čimbenici nasljeđa 2
1.2. Podjela raka dojke 4
1.2.1. Luminalni tip karcinoma dojke 5
1.2.2. Karcinom dojke sličan normalnoj dojci 6
1.2.3. HER-2 tip karcinoma dojke 6
1.2.4. Karcinom dojke nalik bazalnim stanicama 7
1.3. Prognostički čimbenici raka dojke 7
1.3.1. Veličina tumora 8
1.3.2. Zahvaćenost limfnih čvorova pazuha tumorom 9
1.3.3. Histološki gradus 9
1.3.4. Estrogenski i progesteronski receptori u tumorskom tkivu 11
1.3.5. Proliferacijska aktivnost tumora i ploidni status tumora 12
1.3.6. Proteaze 14
1.3.6.1. Katepsin D 14
1.3.6.2. Matriks metaloproteinaze 14
1.3.6.3. Urokinazni aktivator plazminogena (PA) i inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-1) 15
1.3.7.Limfovaskularna invazija 16
1.4. Onkogeni i tumor-supresorski geni u raku dojke 16
1.4.1. p53 17
1.4.2. C-myc 17
1.4.3. Nm23 18

1.4.4. Bcl-2 18
1.5. Transkripcijski profil 19
1.6. Proteinski profil 20
1.7. Telomere 21
1.8. Telomeraza 22
1.9. Histološka klasifikacija raka dojke 27
1.9.1. Neinvazivni (neinfiltrirajući) karcinomi dojke 27
1.9.2. Invazivni (infiltrirajući) karcinomi 28
1.10. Benigne promjene dojke 31
1.10.1. Fibrocistične promjene dojke 31
1.10.2. Benigni tumori 32
2. CILJ I HIPOTEZA 33
3. BOLESNICE, MATERIJALI I METODE 35
3.1. BOLESNICE I UZORCI 35
3.2. Priprema ekstrakta tkiva 36
3.3. TRAP reakcija 37
3.4. Analiza estrogenskih i progesteronskih receptora i katepsina D 38
3.5 Analiza HER-2 39
3.6. Analiza Ki-67 41
Statistička raščlamba 44
4. REZULTATI 46
4.1. Obilježja bolesnica sa zloćudnim bolestima 46
4.2. Rezultati aktivnosti telomeraze u tkivima dojke 50
4.3. Povezanost aktivnosti telomeraze s drugim patohistološkim pokazateljima 53
4.4. Povezanost koekspresije estrogenskog i progesteronskog receptora 64

4.5. Povezanost vrijednosti aktivnosti telomeraze i koekspresije estrogenskog, progesteronskog receptora i statusa HER-2 66
4.6. Kaplan-Meierove krivulje 67
4.7. Analiza Coxove regresije 69

4.8. Utjecaj pojedinih čimbenika na preživljenje bolesnica i relaps bolesti 70
4.9. Binarna logistička regresija 73
5. RASPRAVA 77
6. ZAKLJUČCI 91
7. SAŽETAK 94
8. SUMMARY 96
9. LITERATURA 98
10. ŽIVOTOPIS 116

.

1.UVOD

1.1. ČIMBENICI RIZIKA RAKA DOJKE

Rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena i drugi uzrok smrtnosti od raka u žena. Svake godine dijagnosticira se oko 1,2 milijuna novih slučajeva, što predstavlja 10-12 % svjetske populacije žena i svake godine oko 500 000 žena umre od karcinoma dojke (1,2). Sukladno podatcima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Republici Hrvatskoj je 2007 godine zabilježeno 2574 novooboljelih od raka dojke (111/100000) s najvećom učestalošću od 50-79 godine života, a 960 bolesnica je umrlo od te bolesti (43/100000) (3). Učestalost raka dojke u pojedinim dijelovima svijeta je različita, najniža je u nekim azijskim zemljama, a najviša je u Zapadnoj Evropi i Sjedinjenim američkim državama (4). Postoje razlike u incidenciji i smrtnosti u raku dojke u pojedinim rasama, afro-amerikanke oboljevaju u mlađoj dobi (< 50 godina) i imaju veću smrtnost od žena bijele rase, koje učestalije oboljevaju u dobi iznad 50 godina.

1.1.1. Epidemiološki čimbenici

Brojna epidemiološka istraživanja pokazala su povezanost različitih egzogenih i endogenih čimbenika s višim rizikom nastanka raka dojke. Epidemiološki čimbenici, kao što su starija životna dob, visoke serumske koncentracije inzulinu sličnog čimbenika rasta 1 (IGF-1, eng. Insulin-like growth factor 1) u premenopauzi i estrogena u postmenopauzi, mjesto rođenja u razvijenim zapadnim zemljama kao i pozitivna obiteljska

anamneza bližih srodnika povećavaju rizik za nastanak raka dojke za više od četiri puta. Benigne proliferacijske lezije u dojkama, mamografijom uočene nepravilne promjene ili visoka doza ionizirajućeg zračenja u područje prsnog koša, dobar ekonomski status, kasna prva trudnoća (iznad 35 godine života), pozitivna obiteljska anamneza daljnjih srodnika povećavaju rizik raka dojke 2-4 puta. Rana menarha (<11 godine) i kasna menopauza (> 55 godina), pretilost u postmenopauzi, prehrana bogata zasićenim masnim kiselinama, nuliparitet, crna rasa uz dob mlađu od 45 godina i žene bijele rase uz dob stariju od 45 godina povećavaju rizik nastanka raka dojke 1-2 puta. Poznati su i protektivni čimbenici u nastanku karcinoma dojke: kasna menarha (> 15 godine), dojenje koje traje duže od godine dana, prehrana bogata nezasićenim masnim kiselinama kao i povećana tjelesna aktivnost (1,4-6).

1.1.2. Čimbenici nasljeđa

Obiteljska povezanost uočava se u oko 5-10% slučajeva raka dojke, ali prema najnovijim istraživanjima na jednojajčanim blizancima, čini se da se nasljednim čimbenicima može pripisati čak do 27% karcinoma dojke. U 30-40% oboljelih od karcinoma dojke nađene su mutacije supresorskih gena ili antionkogena, BRCA1 i BRCA2 (eng. Breast cancer 1 i 2). U literaturi je opisano više od 400 mutacija gena BRCA1 i više od 200 mutacija gena BRCA2. U žena s nasljednim oblikom karcinoma dojke, učestalost mutacije gena BRCA1 je do 70%, a u drugih bolesnica 3%. U žena kojima je potvrđena mutacija gena BRCA1 vjerojatnost nastanka karcinoma dojke je 60-80% (7). U obiteljima s visokim rizikom nastanka karcinoma dojke i jajnika mutacije gena BRCA2 nađene su u 10-20 % slučajeva. Oba gena su tumor supresorski geni, glavna im je uloga u

popravcima oštećenja DNA i u održavanju integriteta genoma; gubitak njihove funkcije doprinosi genomskoj nestabilnosti, mehanizmima koji još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (8-10,). Bolesnice s BRCA1 i BRCA2 mutacijama imaju lošiju prognozu i kraće preživljenje od bolesnica koje nemaju mutirane te gene (11). U raku dojke nađene su brojne nasljedne i stečene mutacije *p53,* nasljedne mutacije u Li-Fraumeni-jevom sindromu karakteriziraju učestalu i ranu pojavu tumora dojke, leukemije, sarkome, tumore mozga i karcinome kore nadbubrežne žlijezde (12,13). Nasljedne mutacije gena CHEK 2 (engl. Cell – cycle checkpoint kinase) povećavaju sklonost nastanka tumora dojke i prostate (14). CHEK2 ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi i popravcima DNA oštećenja kroz fosforilaciju p53 i BRCA1. Pokazano je da je amplifikacija ili prekomjerna izraženost gena CCND1 (gen koji kodira ciklin D1) učestalija u estrogen-negativnim tumorima. CCND1 ima ulogu u metabolizmu, diferencijaciji i rastu stanice, te je koaktivator i korepresor acetilacije i remodeliranja proteina kromatina (15). Stečene somatske mutacije su odgovorne za oko 90% karcinoma dojke. Međutim, samo jedna somatska mutacija, amplifikacija HER-2, koristi se u kliničkom definiranju karcinoma dojke (16).

1.2. PODJELA RAKA DOJKE

Rak dojke je heterogena bolest koja obuhvaća brojne biološke entitete sa specifičnim patološkim obilježjima i različitim biološkim ponašanjem. Nastaje poput drugih vrsta karcinoma, kao posljedica oštećenja gena koji sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa. Konstitutivna ekspresija oštećenih onkogena, gubitak funkcije tumor supresorskog gena uslijed mutacija ili bilo kojih drugih genskih promjena dovodi do

nekontrolirane diobe i rasta stanica te besmrtnosti stanica, što dovodi do daljnjeg oštećenja genoma. U prognozi i planiranju terapije bolesnica s rakom dojke koriste se slijedeći čimbenici: izraženost estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR), receptora epidermalnog čimbenika rasta c-erb-B2 (HER-2), prisutnost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, veličina tumora, tip tumora i histološki gradus. Ekspresija ER i PR godinama se upotrebljavaju kao pokazatelji hormonske ovisnosti tumora i čimbenik u primjeni hormonske terapije. Dvije trećine žena mlađih od 50 godina ima ER pozitivne tumore. Bolesnice s takvim tumorima, imaju bolju prognozu, manju smrtnost (26%) i smanjenu pojavu recidiva bolesti (47%) u odnosu na bolesnice s negativnim ER. ER su proteini jezgre, poznata su dva tipa Erα i Erβ, oba su transkripcijski čimbenici i posreduju u djelovanju estrogena. Erα i Erβ vežu estradiol ali s različitim afinitetom. PR nalazimo u 50% svih ER pozitivnih tumora dojke. Ekspresija PR ovisi o ekspresiji funkcionalnog ER. PR su transkripcijski čimbenici čija je aktivnost isprepletena s drugim unutarstaničnim signalnim putevima koji imaju važnu ulogu u hormonski reguliranom poticanju rasta tkiva (10,17). HER-2 spada u skupinu receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGF). Do sada su poznata četiri EGF receptora: EGFR (HER-1), c-erbB-2 (HER-2/neu), c-erbB-3 i c-erbB-4. Pripadaju skupini transmembranskih-tirozin kinaznih receptora, koji imaju važnu ulogu u diferencijaciji, adheziji i pokretljivosti stanica. Na receptor HER-2 pozitivno je 18-20% karcinoma dojke što je povezano s visokim histološkim gradusom i većom učestalosti metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima (18-21). U karcinomu dojke najveće molekulske razlike se očituju između transkriptoma estrogen receptor pozitivnih karcinoma i transkriptoma estrogen receptor negativnih karcinoma, i s obzirom na profil genske ekspresije mogu biti podijeljeni u pet skupina: luminalni tip

A, luminalni tip B, tip sličan normalnoj dojci (engl. normal-breast-like), tip nalik bazalnim stanicama (engl. basal-like) HER-2 tip (tip s prekomjernom HER-2 ekspresijom) (22).

1.2.1. Luminalni tip karcinoma dojke

Kod luminalnog tipa karcinoma dojke, matične stanice nastaju iz luminalne epitelne stanice. Ovaj tip karcinoma može se podijeliti u najmanje dvije različite skupine; luminalni tip A i luminalni tip B, koji se razlikuju u molekularnim karakteristikama tumora i kliničkom tijeku bolesti. Karcinom dojke luminalnog tipa A, obično ima niski histološki gradus, izvrsnu prognozu, visoku ekspresiju ER (estrogen receptor)-aktiviranih gena, nisku ekspresiju gena proliferacije i ekspresiju citokeratina male molekulske mase. Karcinomi luminalnog tipa B uglavnom imaju pozitivne ER i amplifikaciju HER-2, visoki histološki gradus, visoki stupanj proliferacije i lošiju prognozu nego oni luminalnog tipa A (22,23).

1.2.2. Karcinom dojke sličan normalnoj dojci

Tumori tipa koji su slični normalnoj dojci, slabo su karakterizirani tumori. Glavno obilježje ovih tumora je sličnost s uzorcima fibroadenoma i normalnih dojki uz visoki sadržaj stromalnih stanica. Tumorske stanice izražavaju epitelno-mezenhimalne markere vimetin (filamentni protein) TWIST1 (transkripcijski faktor) i gene koji su izraženi u adipoznom tkivu, te gene karakteristične za stanice bazalnog epitela. Imaju veliki sadržaj glikoproteinskih antigena kaveolina1 i mucina 1 (24).

1.2.3. HER-2 tip karcinoma dojke

Karcinomi HER-2 tipa su obično ER negativni i imaju visoku izraženost HER-2 i gena povezanih s HER-2 signalnim putevima. Sadržaj proliferacijskih markera je visok i tumori imaju visoki histološki gradus. Amplifikacija HER-2 gena povećava staničnu proliferaciju, koči apoptozu, potiče angiogenezu, invazivni rast i metastaziranje. U terapijske svrhe koriste se dva tipa inhibicije HER-2: monoklonsko protutijelo protiv ekstracelularne domene (trastuzumab) i male molekule inhibitori protein kinaze (lapatinib) (25).

1.2.4. Karcinom dojke nalik bazalnim stanicama

Karcinomi dojke tipa nalik bazalnim stanicama su skupina ER negativnih karcinoma čije stanice konstitutivno izražavaju gene koji su izraženi u normalnim bazalnim/mioepitelnim stanicama dojke. To uključuje gene za citokeratine visoke molekulske mase, P-kadherin, kaveolin 1 i 2 i receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) (26-30). Ovi karcinomi imaju visoki histološki gradus, visoki mitotički indeks, prisustvo centralnih nekrotičkih zona te infiltrate limfocita. Sinonim ovih tumora je „tripl″-negativni tumori jer ne izražavaju ER, PR i HER-2. Međutim prema nekim autorima tripl-negativni tumori su više heterogeni nego bazalni tumori (20,21,26-28).

1.3. PROGNOSTIČKI ČIMBENICI RAKA DOJKE

Svojstva zloćudne preobrazbe su pretjerano umnažanje ili nakupljanje tumorskih stanica, stvaranje tumora i metastaziranje. Brzina rasta tumora ovisi o omjeru nastanka novih stanica i gubitka. Rak dojke se

dugo razvija i potrebno je 5-7 godina da tumor dosegne veličinu 1 cm i postane klinički zamjetljiv. Postoji biološka heterogenost raka dojke i znatna razlika u kliničkom očitovanju bolesti. Veliki broj istraživanja proveden je radi definicije čimbenika koji bi bili pokazatelji prognoze bolesnica s karcinomom dojke. Prognostički pokazatelji raka dojke trebali bi zadovoljiti ove kriterije: 1) značajna i neovisna vrijednost potvrđena kliničkim studijama; 2) utvrđivanje prisutnosti čimbenika treba biti izvedivo, reproducibilno, jednostavno i specifično; 3) mogućnost korištenja u kliničke svrhe s utjecajem na odluke o terapiji. Prognostički čimbenici koji se koriste u prognozi raka dojke su: veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova pazuha zloćudnim stanicama, stupanj diferencijacije tumora, estrogenski i progesteronski receptori, prisutnost HER-2 u tumorskom tkivu, proliferacijska aktivnost i stanje ploidnosti, te još neke značajke tumora kao što su katepsin D, uPA (urokinaza plazminogen aktivator) i PAI-1 (inhibitor plazminogen aktivatora), status onkogena i protonkogena, proteomske analize karcinoma dojke i analize multiparametarske ekspresije gena (31).

1.3.1 Veličina tumora

Nakon operacijskog zahvata u bolesnica s rakom dojke veličina tumora se određuje rutinski, i to je jedan od važnijih prognostičkih čimbenika, pogotovo u bolesnica s negativnim limfnim čvorovima pazuha. Postoji linearan odnos između preživljenja bolesnica i veličine tumora. Bolesnice s manjim tumorima imaju bolju prognozu. Kod tumora manjih od 1 cm u promjeru, s negativnom aksilom, 10-ogodišnje preživljenje bez bolesti je 88%, a u onih s tumorima većim od 5 cm 70% . Tzv. *minimalni karcinom dojke* ("minimal breast carcinoma") odnosi se na karcinome koji

imaju izuzetno dobru prognozu, a obuhvaća slučajeve neinvazivnog karcinoma (*in situ)* te invazivne karcinome promjera do 10 mm. Neki autori, medutim, uzimaju granicu od 5 mm odnosno 9 mm (31,32).

1.3.2. Zahvaćenost limfnih čvorova pazuha tumorom

Disekcijom i analizom limfnih čvorova moguće je dobivanje važnih prognostičkih informacija kako u pogledu preživljenja bolesnica tako i u slučaju slobodnog intervala (vremena do pojave metastaza). 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 bez bolesti je ispod 65%. Rizik pojave recidiva te ukupno preživljenje ovise i o broju zahvaćenih limfnih čvorova, prognoza je tim lošija što je broj limfnih čvorova veći. Ako su zahvaćena 1-3 limfna čvora, 10. preživljenje je 54%, a ako su zahvaćena više od 4 limfna čvora preživljenje je 26 %. Bolesnice kojima nisu zahvaćeni limfni čvorovi pazuha imaju u pravilu bolju prognozu bolesti, ali i unutar te skupine postoje razlike. Oko 20-30% bolesnica s negativnim limfnim čvorovima imat će recidiv bolesti, te je potrebno utvrditi čimbenike koji će pomoći u prepoznavanju agresivnijeg oblika bolesti (33,34).

1.3.3. Histološki gradus

Histološki gradus ili histološki stupanj diferenciranosti tumora je prognostička vrijednost neovisna o veličini tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova pazuha tumorom. 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. 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 gradusa i karakteristika jezgre, kada se govori o histološkom gradusu. Danas se najviše određuje histološki gradus prema Scarff-Bloom-Richardsonu (35), odnosno modifikacija te metode po Elstonu i Ellisu (tzv. Nottinghamska metoda) (32) 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. 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).

Dobro diferencirani tumori (gradus 1) imaju petogodišnje preživljenje u oko 75% bolesnica, a deset godina preživi 47% bolesnica. S umjereno diferenciranim tumorima (gradus 2) pet godina preživi 53% bolesnica, a deset godina preživi 27% bolesnica. U skupini bolesnica sa slabo diferenciranim tumorima (gradus3) pet godina preživi 31%, a deset godina preživi 18% (35). Histološki gradus važan je 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 aksilarnih limfnih čvorova, na osnovi čega je napravljen *Nottinghamski prognostički indeks* (36).

1.3.4. Estrogenski i progesteronski receptori u tumorskom tkivu

Estrogenski i progesteronski receptori rutinski se određuju već tridesetak godina u karcinomima dojke i imaju prognostičko i prediktivno značenje, te daju podatak o hormonskoj ovisnosti tumora. Uz određivanje estrogenskih receptora važno je odrediti i progesteronske receptore, jer estrogeni pored ostalih učinaka potiču i ekspresiju progesteronskih receptora. Određivanje oba receptora daje bolji uvid u hormonsku aktivnost stanica karcinoma i bolji je pokazatelj hormonske ovisnosti tumora. Tumori s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima (ER+PR+) reagirat će na hormonsku terapiju u 78% bolesnica, ER+PR- tumori u 34% bolesnica, a ER-PR+ tumori reagirat će u 45% bolesnica. Medutim, zanimljivo je da će i tumori koji su ER-PR- u oko 11% bolesnica reagirati na hormonsku terapiju. Tumori s većom razinom hormonskih receptora bolje će reagirati na hormonsku terapiju od onih s nižim razinama. Liječenje se provodi antagonistima hormona - tamoksifenom ili inhibitorima aromataze (37). ER- tumori bolje reagiraju na kemoterapiju u odnosu na ER+ tumore. Bolesnice s ER+ tumorima imaju duže preživljenje bez bolesti u odnosu na one s ER- tumorima, češće 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. Oko 5% karcinoma dojke su ER-PR+ što se može objasniti ili lažno negativnim rezultatom u metodi određivanju ER ili sinteza PR može biti inducirana neovisno o ER. Vrijednost PR kao neovisnog prognostičkog čimbenika je vjerojatno vrlo mala (38). Steroidni receptori u tumorskom tkivu mogu se određivati biokemijskim, imunokemijskim i molekularno genetičkim metodama. U biokemijskim metodama najčešće se koristi DCC metoda (od

engl. Dextran Coated Charcoal), koja se temelji na analizi vezivanja liganda na receptor. Imunokemijske metode primjenjuju se na pripravku citosola kao enzimski imunotest (EIA-od engl. Enzyme immunoassay) ili *in situ* kao imunohistokemijsko ili imunocitokemijsko bojanje. Molekularno genetičkim metodoma moguće je analizirati gene za receptore kao i određivati mRNA (39).

1.3.5. Proliferacijska aktivnost tumora i ploidni status tumora

Proliferacijska aktivnost tumorskih stanica može se određivati različitim metodama, kao što su protočna citometrija (određivanje postotka stanica u S-fazi staničnog ciklusa), imunohistokemijski testovi i testovi ugradnje radioaktivno obilježenog timidina. Proliferacijska aktivnost tumorskih stanica vrlo je važan prognostički parametar kod raka dojke. Mitotski indeks je sastavni dio histološkog gradusa i rutinski se odreduje u svim karcinomima dojke (40). Od imunohistokemijskih metoda najviše se koristi određivanje antigena jezgre Ki-67 (Ki-67 prema Kiel University, a 67 prema rednom broju u mikrotitarskim pločicama kada je otkriven (ukupno 96). Ki-67 je nehistonski protein molekulske mase 395 KD. Nalazi se u stanicama u svim fazama staničnog ciklusa (G1, S, M i G2 faza staničnog ciklusa), dok u fazi mirovanja stanice nije prisutan (G0 fazi) (41). MIB-1 je monoklonsko protutijelo specifično za Ki-67 protein u tumorskom tkivu pohranjenom u parafinu. Nađena je povezanost izmedu prisutnosti Ki-67 antigena i dobi bolesnica , mitotskog indeksa te histološkog gradusa (42). U tumorima u kojima je povećana prisutnost ERβ, nađeno je povećano očitovanje proliferacijskih markera Ki-67 i ciklin A. Bolesnice čiji tumori imaju očitovanje Ki-67 u više od 50% tumorskih stanica, imaju veliki rizik razvoja relapsa bolesti (43,44). Rezultati

ispitivanja proliferacijskog indeksa nisu jednoznačni. Prema nekim autorima tumori koji imaju veću proliferacijsku aktivnost imaju lošiju prognozu i kraći interval do pojave recidiva (45) , dok drugi autori pokazuju povećanu proliferacijsku aktivnost u prepoznavanju bolesnica kod kojih se očekuje raniji relaps bolesti (32). Podatci o ploidnom statusu tumora mogu se dobiti metodom protočne citometrije, pa tako aneuplodni tumori tj. oni koji imaju izmjenjenu količinu DNA imaju lošiju prognozu od diploidnih (46). Mjerenje proliferacije moguće je i pomoću DNA-modificirajućih enzima, topoizomeraze IIα (topo IIα) ključnog enzima u metabolizmu DNA. To je ključni enzim za topo IIα inhibitore: antracikline, epipodofilotoksine, aktinomicine, mitoksantrone i neke druge lijekove. Pokazana je direktna korelacija između unutarstaničnog sadržaja enzima i stupnja osjetljivosti na te lijekove. Gen topo IIα smješten je na dugom kraku kromosoma 17 u blizini HER-2. Rezultati su pokazali da umnažanje gena topo IIα u HER-2 pozitivnih bolesnica može dati prednost terapijskom protokolu koji sadrži antracikline i trastuzumab (47).

1.3.6. Proteaze

1.3.6.1. Katepsin D

Katepsin D je lizozomalna aspartil proteaza izražena u svim tkivima, sudjeluje u procesuiranju antigena, staničnoj proliferaciji, obnavljanju tkiva te aktivaciji različitih prohormona. Razgrađuje bazalnu membranu tumora i tako ima važnu ulogu u rastu i metastaziranju tumora (48). Mnoge imunohistokemijske studije su pokazale da bolesnice koje imaju visoki sadržaj katepsina D u tumoru imaju veći histološki gradus i kraće

preživljenje (49), dok su neke studije pokazale duže preživljenje i vrijednost katepsina D kao neovisnog čimbenika (50). Novija istraživanja odvojeno analiziraju prognostičke vrijednosti katepsina D u stromalnim i tumorskim stanicama. Prisutnost katepsina D u stromalnim stanicama ali ne i u tumorskim stanicama korelira s lošijom prognozom bolesti i kraćim preživljenjem (49) . Mnoge studije potvrdile su povezanost katepsina D u citosolu i lošiju prognozu oboljelih od karcinoma dojke u ukupnoj populaciji bolesnica, ali i bolesnica s negativnim čvorovima u aksili (51).

1.3.6.2. Matriks metaloproteinaze

Matriks metaloproteinaze (MMPs) su obitelj funkcionalno i strukturno povezanih endopeptitaza (o cinku ovisne proteinaze) te je do danas poznato oko četrdesetak MMPs. Prema njihovom specifičnom substratu dijele se u šest skupina: kolagenaze, želatinaze, stromelizinaze, matrilizinaze, membranski tip MMPs i druge. Sudjeluju u degradaciji vezivnog stromalnog tkiva i bazalne membrane, što su ključni događaji u invaziji i metastaziranju tumora. Cijepaju čimbenike rasta, receptore na površini stanice, adhezijske molekule, kemokine i citokine, te proapoptičke čimbenike i tako sudjeluju u agresivnijem biološkom ponašanju tumora. Ove proteaze reguliraju angiogenezu u tumoru putem aktivacije proangiogeničkih čimbenika ili je inhibiraju kroz nastajanje inhibitornih čimbenika (52). Aktivnost enzima regulirana je tkivnim inhibitorima matriks metaloproteinaza i očuvanom ravnotežom između enzima i inhibitora unutar stanice. Visoka ekspresija MMPs u karcinomu dojke , posebno MMP-2 i MMP-9 , povezana je s visokim histološkim gradusom, relapsom bolesti i kraćim preživljenjem (53,54).

1.3.6.3. Urokinazni aktivator plazminogena (uPA) i inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-1)

Urokinaza plazminogen aktivator (uPA) sistem, serinska proteza, proteolitički razara bazalnu membranu i izvanstanični matriks. uPA i njegov inhibitor PAI-1 (inhibitor-1 aktivator plazminogena) su čimbenici invazije tumora i imaju prognostičko i prediktivno značenje. Studije su pokazale da bolesnice s negativnim limfnim čvorovima pazuha i niskim vrijednostima omjera uPA/PAI-1 imaju izvrsnu prognozu bez primjene sistemske adjuvantne terapije i petogodinje preživljenje više od 90%, dok bolesnice s visokim vrijednostima omjera uPA/PAI-1 imaju visoki rizik relapsa tumora (55). Visoke vrijednosti uPA i PAI-1 u bolesnica s primarnim rakom dojke povezane su s većom koristi od adjuvantne kemoterapije u usporedbi s bolesnicama koje su imale niže vrijednosti. PAI-1 je loš

prognostički pokazatelj u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima pazuha, a uPA je loš prognostički pokazatelj u svim skupinama bolesnica (56).

1.3.7. Limfovaskularna invazija

Metastaze predstavljaju diseminaciju malignih stanica izvan mjesta tumora i povezane su s mortalitetom i morbiditetom kod raka dojke. Određivanje skupine bolesnica, koje imaju rizik metastaziranja raka dojke, bitno je u liječenju i praćenju tijeka bolesti. 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 (njeno prognostičko značenje nije sasvim jasno). Vaskularna invazija nađe se u gotovo četvrtini slučajeva karcinoma dojke i loš je prognostički pokazatelj, a češće je prisutna kod slabo diferenciranih i većih

tumora, te u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima. Imunohistokemijski je moguće razlikovati prisustvo invazije u limfnim žilama izražaenošću limfatičkih markera (podoplanina ili D2-4) i prisustvo invazije u krvnim žilama izraženošću krvno žilnih markera (CD31, CD34, faktor VIII i tip IV kolagena) (57).

1.4. ONKOGENI I TUMOR-SUPRESORSKI GENI U RAKU DOJKE

Zloćudna preobrazba je višestepeni proces u kojem značajnu ulogu ima poremećaj ravnoteže između onkogena i tumor-supresorskih gena s pomakom u smislu povećane aktivnosti onkogena.

1.4.1. p53

Mutacije gena *p53* pripadaju najčešćim molekularnim promjenama u solidnim tumorima. *p53* je tumor-supresorski gen koji se nalazi na kromosomu 17p13,1 i važan je regulator staničnog ciklusa ("čuvar staničnog genoma"). Sudjeluje u popravcima oštećenja DNA. Mutirani geni kodiraju za mutirane proteine koji se nakupljaju u jezgri i u većini slučajeva mogu se imunohistokemijski dokazati (za razliku od normalnog «divljeg» tipa proteina p53 koji je vrlo nestabilan i ne može se, u pravilu, imunohistokemijski dokazati). Oko 20% mutacija ne dovodi do stvaranja mutiranog-stabilnog proteina. Akumulacija mutiranog proteina p53 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 višim histološkim gradusom tumora, negativnim hormonskim receptorima te u nekim studijama, s prekomjernom ekspresijom proteina HER-2/neu (58). Mutirani proteini p53 kao i

protutijela na p53 mogu biti prisutni u serumu bolesnica s rakom dojke. Prisustvo mutiranog proteina p53 u serumu upućuje na agresivniji fenotip tumora i kraće preživljenje bolesnica (59).

1.4.2. C-myc

Gen c-*myc* kodira transkripcijski čimbenik koji se veže s proteinima iz Max i Myc (Myc associated factor X) obitelji i ima važnu ulogu u rastu, proliferaciji i diferencijaciji stanica, progresiji
staničnog ciklusa, stabilnosti genoma i apoptozi. Prekomjerna ekspresija gena *c-myc* je jedna od najčešćih genetskih promjena u oboljelih od raka dojke, a javlja se u jedne trećine bolesnica. Amplifikacija gena c-*myc* povezana je s lošijom prognozom bolesti i kraćim preživljenjem bolesnica s rakom dojke (60).

1.4.3. Nm23

Gen *nm23* kodira enzime nukleozid difosfat kinaze, koje kataliziraju prijelaz nukleozid trifosfata u nukleozid difosfat. Ovaj enzim sudjeluje u razvoju, proliferaciji i diferencijaciji stanice. Nukleozid difosfat kinaze imaju ulogu u genskoj ekspresiji, staničnoj migraciji i apoptozi (61). Smanjena izraženost proteina nm23 povezana je s lošijom prognozom, metastazama u limfne čvorove pazuha, vaskularnom invazijom i češćim recidivima raka dojke (62).

1.4.4. Bcl-2

Protonkogen bcl-2 programira protein koji inhibira programiranu staničnu smrt (apoptozu). Bcl-2 blokira apoptozu preko mitohondrijskog puta inhibirajući oslobađanje citokroma C iz mitohondrija. Visoka izraženost bcl-2 prisutna je u ER i PR pozitivnim tumorima i dobar je

prognostički pokazatelj, tj. bolesnice s rakom dojke i visokom izraženošću bcl-2 imaju bolje preživljenje. Poznata je njegova uloga kao prediktivnog čimbenika. Tako je pokazano da bolesnice s ER-PR pozitivnim rakom dojke imaju bolji odgovor na tamoksifen ako je priutna visoka izraženost bcl-2 (63).

1.5. TRANSKRIPCIJSKI PROFIL

U posljednjem desetljeću došlo je do značajnog razvoja metoda analize profila genske ekspresije. Određivanje transkripcijskog profila tumora poboljšat će dijagnozu, prognozu, klasifikaciju tumora dojke, a isto tako predstavlja prediktivni čimbenik za kemoterapiju i individualizaciju terapije u bolesnika s tumorom. Geni i proteini uključeni u proces metastaziranja karcinoma mogu se u najvećem dijelu utvrditi u ranim i nasljednim svojstvima te pri dijagnozi u ranoj fazi maligne bolesti. Danas postoje prognostičke studije (Mamaprint i Roterdam) koje određuju transkripcijski profil raka dojke povezanog s metastaziranjem (64,65). Mamaprint studija analizira ekspresiju 70 gena koji su povezani s pojavom udaljenih metastaza i relapsom bolesti, a to su: geni koji reguliraju stanični ciklus, invaziju, metastaziranje, prijenos signala i angiogenezu u raku (64). Roterdamska studija prati prognostički značaj izražaja 76 „dobrih“ i „loših“ gena kod bolesnica s negativnim limfnim čvorovima pazuha, kod koji nije primjenjena adjuvantna kemoterapija, prati njihov utjecaj na pojavu udaljenih metastaza u petogodišnjem periodu praćenja. Dosadašnji rezultati su pokazali da skupina od 76 gena može s određenom preciznošću predvidjeti pojavu udaljenih metastaza. Određivanje transkripcijskog profila tumora također pomaže i u predviđanju odgovora na kemoterapiju. Oncotype studija je uključila ER pozitivne bolesnice i bolesnice koje

nemaju limfne čvorove zahvaćene bolešću. Ovom studijom moguće je pri dijagnostici primarnog tumora izdvojiti bolesnice (iz ove skupine) koje će imati visoki rizik relapsa bolesti i shodno tome potrebu za dodatnim liječenjem (66).

1.6. PROTEINSKI PROFIL

Proteomika je sustavna analiza izraženosti proteina pod specifičnim uvjetima u organizmu, a uključuje njihovu separaciju, identifikaciju i karakterizaciju. Cijeloukupni sadržaj proteina koje organizam proizvodi tijekom života naziva se proteom. Zadatak proteomike je praćenje statusa proteoma s obzirom na vrstu stanice ili tkiva, bolesno ili zdravo stanje, kao i statusa proteoma tijekom različitih faza razvoja organizma. Proteomske analize otkrivaju nepoznate mehanizme aktivacije proteina i postranslacijske promjene koje su direktno odgovorne za fenotip tumorskih stanica i procese koje se u njima zbivaju. Izraženost proteinskog profila je individualan za svakog pojedinca, specifičan za svako pojedino tkivo, te je podložan stalnim promjenama ovisno o dobi, prehrambenim navikama, tjelesnoj aktivnosti ali i nizu drugih parametara. Tijekom zadnjih godina proveden je čitav niz proteomskih istraživanja i otkriven veliki broj proteina koji su ključni u razumijevanju molekulskih mehanizama nastanka raka. Istražen je proteomski profil zdravog i malignog uzorka tkiva dojke, gdje je pronađeno nekoliko proteina s povećanom ekspresijom u malignom tkivu. Tako je utvrđena povećana ekspresija proteina kazein kinaze, p53, aneksin XI, CDC25C, elF-4E i MAP kinaza 7, dok je ekspresija multifunkcionalnog regulatora 14-3-3e bila smanjena. Cilj proteomike je razdvajanje proteinskih smjesa i otkrivanje proteinskog profila izraženosti, metodama dvodimenzionalne gel elektroforeze za razdvajanje proteina i

identifikacija uz pomoć metoda spektrometrije masa MALDI-TOF (eng. *Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*).

Ovakva naliza proteina identificirala je brojne proteine koji su vezani uz nastanak i progresiju bolesti kao što su aneksin-1 i aneksin-5, galektin-1, LDH-B, GST-pi, aktin, vimentin, HSP 70, CK 18 i moezin (67). Otkriven je i čitav niz proteina koji su povezani s metastaziranjem tumora, osteopontin i osteonektin, dok su matriks metaloproteinaza 1 i aneksin 1 povezani s tumorima koji ne metastaziraju (68). Analizom proteina metodama SELDI-TOF (eng. *Surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight*) uspoređeno je tumorsko i zdravo tkivo što je rezultiralo identifikacijom 38 proteina s povećanom izraženosti i 15 proteina sa sniženom izraženosti ekspresijom (69).

1.7. TELOMERE

Poznato je da karcinom dojke nastaje kao rezultat višestrukih poremećaja u genskoj izraženosti uzrokovanih genskom nestabilnošću i epigenetskim mehanizmima. U literaturi se najčešće opisuju dvije klase genske nestabilnosti:

1. Mikrosatelitska nestabilnost, koja se očituje promjenom dužine mikrosatelita.
2. Kromosomska nestabilnost koja uključuje, strukturne promjene u kromosomu kao i promjene u broju kromosoma.

Istraživanja su pokazala da značajnu ulogu u kromosomskoj nestabilnosti zauzima izmjenjena funkcija telomera.

Telomere igraju važnu ulogu u održavanju kromosomske stabilnosti. Telomere su DNA-proteinski kompleks na kraju kromosoma koje štite i stabiliziraju kromosomski kraj. Telomeričku DNA u čovjeka čini šest

nukleotidnih sekvenci TTAGGG, koje se tandemski ponavljaju 1000-2000 puta. Telomerička DNA je dinamična, sa svakom staničnom diobom progresivno se gubi oko 150 bp telomera na 5' kraju DNA molekule, ukazujući na nemogućnost konvencionalne DNA polimeraze da replicira ekstremne krajeve telomera i učinak tzv. 5'-3' egzonukleaze. Kada stanica prođe veliki broj dioba telomere se skrate na kritičnu dužinu i stanica odlazi u tzv. stanje mirovanja (70) . Telomere se mogu produžiti preko telomerički DNA sintetizirajućeg enzima telomeraze i telomeraza-neovisnim rekombinantnim putem poznatim kao alternativno produživanje telomera (71,72*)*.Ispitivanja dužine telomera u bolesnica s karcinomom dojke pokazala su da tkiva karcinoma imaju kraće telomere od telomera zdravog tkiva dojke. Visoki histološki gradus bolesnica i veličina tumora koreliraju s kraćim telomerama, kraće telomere koreliraju s niskim sadržajem estrogenskih i progesteronskih receptora u tumoru. Bolesnice s kraćim telomerama imaju brži relaps bolesti i kraće preživljenje (72,73).

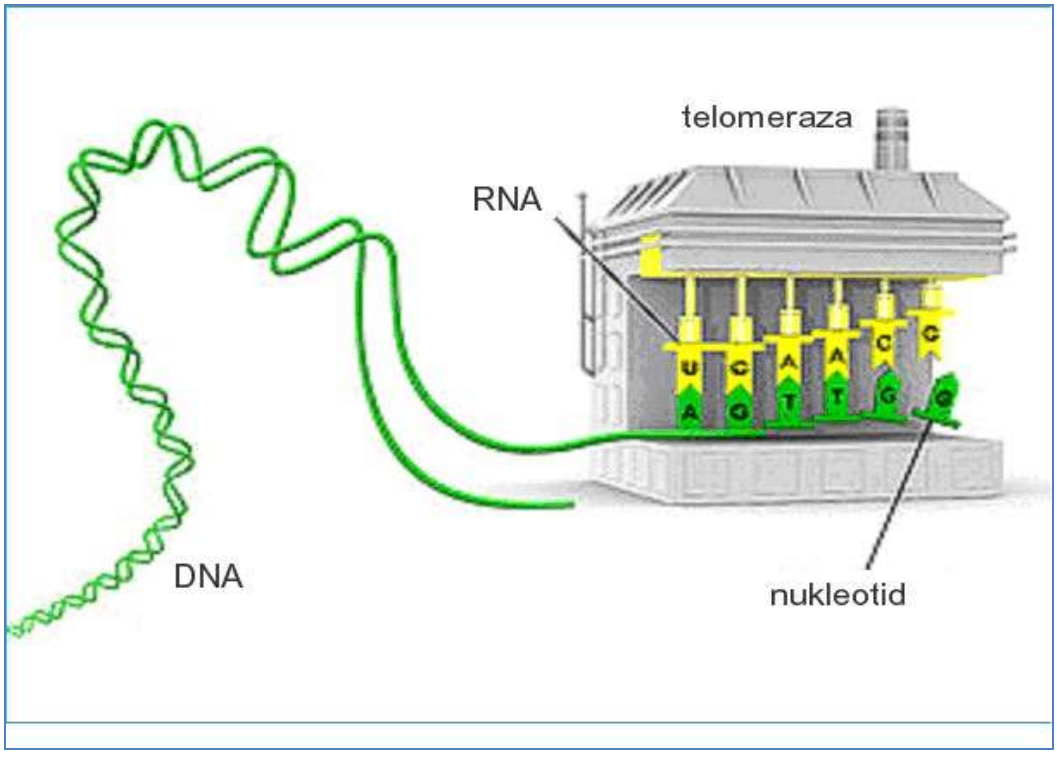
1.8. TELOMERAZA

Telomeraza je ribonukleoproteinski kompleks koji se sastoji od tri podjedinice (slika 1):

1. katalitičke proteinske podjedinice (engl. human telomerase reverse transcriptase (hTERT)),
2. telomeraza RNA podjedinice (engl. RNA component telomerase (hTR)) koja sadrži kalup za dodavanje telomera i
3. proteinske podjedinice koja pomaže skupljanju telomeraze u holoenzim (74).

RNA podjedinica telomeraznog kompleksa konstitutivno je izražena u svim stanicama, dok je izraženost katalitičke podjedinice povezana s telomeraznom aktivnosti koja se odvija tijekom diferencijacije i neoplastična transformacije).

Aktivnost telomeraze primarno je regulirana na razini transkripcije katalitičke podjedinice (hTERT) (75,76). Tumor supresorski gen p53 snižava ekspresiju katalitičke podjedinice hTERT, smanjujući proliferacijsko stanje stanice, dok c-myc aktivira transkripciju hTERT vežući se direktno u promotorsku regiju (77-80). BRCA1 je negativni regulator ekspresije katalitičke podjedinice, tako što se veže s onkogenom c-myc (81,82). Estrogeni stimuliraju transkripciju katalitičke podjedinice direktnom interakcijom estrogenom- aktiviranog estrogenskog receptora s estrogen odgovornim elementom u hTERT 5 regulatornoj regiji (83,84).



Slika 1. Ribonukleoproteinski kompleks telomeraze.

Karcinomi, starenje i bolesti matičnih stanica su biološki procesi u kojima telomeraza zauzima važno mjesto. Najnovija istraživanja su pokazala ulogu telomeraze i u staničnim procesima koji su neovisni o telomerama, a to su apoptoza, popravak DNA oštećenja i kontrola genske izraženosti (85). U većini normalnih somatskih stanica aktivnost telomeraze nije prisutna. Aktivnost telomeraze prisutna je u germinativnim stanicama (jajnici i testisi), matičnim stanicama limfocita B i T, neurona, kože, bubrega i epitelnih stanica pankreasa, te u tumorskim stanicama (85-89*)*. Telomerazna aktivnost nađena je u većini tumorskih tkiva, kao npr. kolorektuma, dojke, prostate, ovarija, pluća, pankreasa ali i u drugim tumorima organskih sustava. Isto tako

njezina je aktivnost prisutna, u premalignim lezijama dojke što pokazuje da se aktivnost telomeraze događa u ranoj fazi karcinogeneze. Telomeraza u tumorskoj stanici ima ulogu u održavanju kromosomske stabilnosti i kapaciteta neograničenog dijeljenja tumorskih stanica odnosno besmrtnosti tumorske stanice. Prisutnost telomerazne aktivnosti u tkivima može biti ispitivana na različite načine. Prisustnost gena katalitičke proteinske podjedinice i kalupa RNA može se određivati s RT-PCR ili tehnikama *in situ* hibridizacije. Prisustvo enzimske aktivnosti određuje se u tkivnim lizatima upotrebom osjetljivog PCR eseja (lančana reakcija polimeraze, engl. **P**olymerase **C**hain **R**eaction), koji se naziva TRAP-esej (engl. telomeric repeat amplification protocol) (87). U većini istraživačkih studija koje su rađene ovim tehnikama aktivnost telomeraze bila je prisutna u 80-90% karcinoma dojke. Aktivnost telomeraze nije pronađena u benignim promjenama kao ni u zdravom tkivu dojke u većini studija, ali su neki autori u svom istraživanju pokazali prisutnu aktivnost telomeraze u 43-50% fibrocističnih promjena i fibroadenoma (88). Aktivnost telomeraze prisutna

je u normalnim tkivima dojke tijekom luteinske faze ali ne i za vrijeme folikulske faze menstruacijskog ciklusa, što govori u prilog da sadržaj telomerazne aktivnosti može biti reguliran i u normalnom tkivu dojke. Različite studije pokazale su različitu povezanost između aktivnosti telomeraze i patohistoloških pokazatelja karcinoma dojke. Rha i sur. su našli da je aktivnost telomeraze u tkivu karcinoma dojke povezana s metastazama u limfnim čvorovima, ali ne i s veličinom tumora i sadržajem ER i PR receptora (90,91) , dok su Hoos i sur. pokazali značajnu povezanost između telomerazne aktivnosti i veličine tumora, metastaza u limfnim čvorovima i stadija bolesti (92). U istraživanjima Papadopoulou i sur. nije nađena povezanost između telomerazne aktivnosti i kliničko-patoloških parametara karcinoma dojke (93). Karcinomi dojke u kojima nije prisutna aktivnost telomeraze imaju učestalije kromosomske promjene u odnosu na one karcinome u kojima je prisutna aktivnost telomeraze (94). Svi ovi rezultati pokazuju da je aktivnost telomeraze vjerojatno povezana s agresivnošću bolesti, makar rezultati istraživanja nisu u potpunosti jednoznačni te da određivanje aktivnosti telomeraze može biti prognostički i dijagnostički čimbenik. Određivanje aktivnosti telomeraze u tumorskom tkivu može biti značajno i za terapiju maligne bolesti (95,96,97). Mogući su terapijski postupci koji uključuju potiskivanje aktivnosti telomeraze. U terapiju tumora mogu biti uključeni antisens oligonukleotidi za RNA kalup, dominatno negativna proteinska podjedinica telomeraze, analozi nukleotida, polifenoli kao i male inhibitorne molekule. U terapiji se također mogu koristiti promotori telomeraze (aktivni u karcinomima) (98,99) koji mogu biti cilj genske terapije ili onkolitičkih virusa za tumore. Za inhibicije telomerazne aktivnosti razvijena su i monoklonska protutijela koja su specifična za hTERT, koja ne prepoznaju hTERT u nativnim stanicama, nego samo djeluju na aktivnost telomeraze. Rezultati terapije

rađeni su uglavnom *in vitro* pokusima, tako da daljnja istraživanja trebaju obuhvatiti i *in vivo* ispitivanja (100, 101). Međutim, potencijalno prisustvo aktivnosti telomeraze u normalnim tkivima i visoko proliferacijskim tkivima može biti problem specifičnosti ove terapije. U nekim studijama pokazana je povezanost aktivnosti telomeraze u tumorskom tkivu i odgovora na kemoterapiju (100,102,103). U staničnim kulturama ezofagealnog karcinoma pokazana je veća osjetljivost onih stanica na terapiju cisplatinom koje su imale prisutnost aktivnosti telomeraze (104).

1.9. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA RAKA DOJKE

Prema svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) rak dojke histološki se klasificira u slijedeće skupine (105,106):

1.9.1. Neinvazivni (neinfiltrirajući) karcinomi dojke

Ovi karcinomi se nazivaju i karcinomi *in situ* :
Intraduktalni karcinom (DCIS)
Intraduktalni papilarni karcinom
Lobularni karcinom *in situ* (LCIS)

Intraduktalni karcinom (DCIS) nastaje od epitela kanalića dojke. Proliferacija zloćudnih stanica ograničena je unutar kanalića bez prodora kroz bazalnu membranu i infiltracije strome. Postoji nekoliko morfoloških tipova, a to su 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 karcinomi koji rastu unutar ciste i ograničeni su na nju, nazivaju se neinvazivni cistični papilarni karcinom. U posljednje vrijeme se češće

određuje stupanj diferenciranosti intraduktalne komponente. U zadnjih desetak godina bilježi se porast DCIS s nekih 5% na 15-30 % zahvaljujući sve većem mamografskom otkrivanju (106).

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 tako 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 negobiljegom povećanog rizika za razvoj raka dojke (107).

1.9.2. Invazivni (infiltrirajući) karcinomi

Invazivni karcinomi najčešće nastaju iz epitela kanalića ili lobula i dijele se u duktalne i lobularne karcinome .

Duktalni invazivni karcinomi:
-miješani karcinomi
-pleomorfni karcinomi
-karcinomi s orijaškim stanicama tipa osteoklasta
-karcinomi s koriokarcinomskim elementima
-karcinomi s melanotskim elementima
Invazivni lobularni karcinom
Medularni karcinom
Koloidni (mucinozni) karcinom
-mucinozni karcinom

-cistadenokarcinom i mucinozni karcinom cilindričnog epitela
-karcinom stanica tipa prstena pečatnjaka
U invazivne karcinome ubrajaju se i:
Pagetova bolest
Tubularni karcinomi
Adenoidni cistični karcinomi
Invazivni komeoidni karcinomi
Apokrini karcinomi
Invazivni papilarni karcinomi

Kod invazivnog raka dojke zloćudne stanice razaraju bazalnu membranu i infiltriraju stromu. U ovoj skupini najčešći su duktalni invazivni karcinomi (75-80%), koji može biti čisti (50-60%) ili u kombinaciji s drugim histološkim tipovima. Invazivni ili infiltrativni lobularni karcinom je na drugom mjestu po učestalosti medu invazivnim karcinomima dojke i na njega otpada od 5-10% (po nekim studijama od 0,7 do 15%) svih karcinoma dojke (104). Medularni karcinom je tip invazivnog karcinoma dojke, javlja se u nešto mladoj dobi (45-54 godine) i na njega otpada 10% karcinoma u žena mladih od 35 godina (105,106). 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. Rijedak je i na njega otpada 1-4% svih simptomatskih karcinoma dojke, a nešto je učestaliji (7,7-27%) u skupini mamografski otkrivenih karcinoma. (103,104). Mucinozni karcinom 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. 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 (107-109).

1.10. BENIGNE PROMJENE DOJKE

Razlikuje se nekoliko benignih promjena dojke (105-110):

1. Fibrocistične promjene
2. Benigni tumori dojke
3. Promjene u poremećaju razvoja dojke i upalne promjene

1.10.1. Fibrocistične promjene dojke

Fibrocistične promjene dojke su najčešće dobroćudne promjene dojke. Promjene u dojci variraju od bezazlenih do onih koje su povezane s većim rizikom oboljevanja od karcinoma dojke. Prema patohistološkim kriterijima ove promjene se dijele u tri skupine:

a. Jednostavne fibrocistične promjene- ciste i fibroza, su najčešće promjene koje se vide u tkivu dojke, a karakterizrane su umnažanjem vezivne strome, dilatacijom kanalića i stvaranjem ciste.
b. Proliferacijske fibrocistične promjene- epitalna hiperplazija, karakterizirane su povećanim brojem stanica koje se nalaze na bazalnoj membrani. Razlikujemo običnu i atipičnu hiperplaziju koja je povezana s povećanim rizikom raka dojke.
c. Sklerozirajuća adenoza, promjene karakterizirane umnažanjem acinusa režnjića i okolne strome.

1.10.2. Benigni tumori dojke

Razlikuje se nekoliko podskupina dobroćudnih tumora dojke:

a. Dobroćudni epitelni tumori
b. Dobroćudni mezenhimski tumori
c. Fibroepitelni tumori

Najčešći benigni tumor dojke je fibroadenom koji se ubraja u podskupinu fibroepitelnih tumora. Mikroskopski, fibroadenom se sastoji od proliferacije epitelnih i mezenhimalnih stanica.

Od drugih promjena izdvajaju se upale dojke (akutni mastitis, proširenje vodova dojke, nekroza masnog tkiva i dr.). To su rijetke promjene, no značajne su zbog toga što makroskopski i mamografski mogu sličiti tumorima (110).

2. CILJ I HIPOTEZA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1.) Ispitati prisutnost telomerazne aktivnosti u tkivu karcinoma dojke, benignim promjenama dojke (fibrocistične promjene i fibroadenom) i zdravom tkivu dojke.

2.) Ispitati da li postoji povezanost između aktivnosti telomeraze u tkivu karcinoma dojke i poznatih prognostičkih čimbenika karcinoma dojke (dob bolesnica, veličina tumora, prisutnost odnosno odsutnost metastaza u regionalne limfne čvorove, histološki gradus, sadržaj estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR), izraženost katepsina D, HER-2/neu, proliferacijskog markera Ki-67 , prisutnost odnosno odsutnost udaljenih metastaza i preživljenje bolesnica.

3.) Ispitati da li je aktivnost telomeraze u lizatu tumorskog tkiva povezana s progresijom bolesti i s preživljenjem bolesnica.

Hipoteza: Današnja saznanja i rezultati istraživanja o povezanosti aktivnosti telomeraze i karcinoma dojke s njegovim agresivnim ponašanjem i s preživljenjem bolesnica nisu jednoznačni niti jasni. Aktivnost telomeraze ima bitnu ulogu u besmrtnosti tumorske stanice, te se smatra da određivanje aktivnosti telomeraze u tkivima karcinoma dojke može doprinjeti spoznaji o agresivnosti tumora. Usporedba s

dosadašnjim kliničko patohistološkim pokazateljima može doprinjeti boljoj spoznaji o biološkom ponašanju tumora, što može imati utjecaja i na promjene u terapijskim postupcima u liječenju bolesnica s karcinomom dojke.

3. BOLESNICE, MATERIJALI I METODE

3.1. BOLESNICE I UZORCI

U istraživanje je uključeno 102 uzorka tkiva karcinoma dojke, 40 uzoraka benignih promjena tkiva dojke i 20 uzoraka zdravih tkiva dojke koja se nalaze u Banci tumora na Zavodu za patofiziologiju i znanstveno istraživanje, KBC Rebro Zagreb. Tkiva su uzeta od bolesnica tijekom 1993-2000 godine, na Klinici za kirurgiju pri operacijskom zahvatu. Sakupljeni tumori su stavljeni u fosfatni pufer i na ledu odnešeni na Zavod za patologiju KBC Rebro. Patolog je odvojio tumorsko, benigno i zdravo tkivo dojke. Tkivo je zamrznuto u tekućem dušiku i nakon toga spremljeno u hladnjak na -70ºC. Operirane bolesnice s karcinomom dojke kontrolirane su na Zavodu za onkologiju KBC Zagreb. Iz povijesti bolesti bolesnica koristili su se nalazi o prisutnosti odnosno odsutnosti udaljenih metastaza (ovisno o tome kako često su bolesnice dolazile na kontrolu) i patohistološki nalazi tumora dojke. Postoperacijsko praćenje bolesnica s karcinomom dojke bilo je deset godina.

Iz datoteke Hrvatskog registra za rak dobiveni su podatci o bolesnicama sa smrtnim ishodom bolesti.

Istraživanje na tumorskim tkivima učinjeno je u skladu sa svim važećim primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje postupka i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse,

Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03. Identitet ispitanika uvijek će ostati povjerljiv i zaštićen. Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb, kao i Etičko

povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu dalo je suglasnost za istraživanje na prijedlog projekta kojeg je ovaj rad sastavni dio, kao i za sam rad.

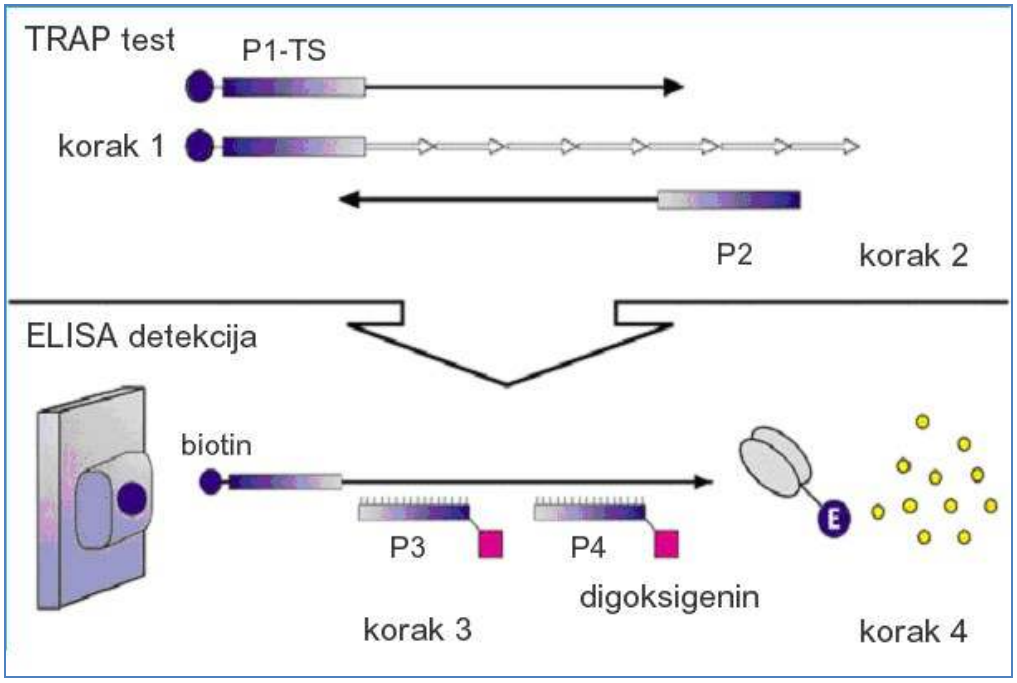
3.2. Priprema ekstrakta tkiva

Zamrznuto tkivo dojke (oko 0,1mg) se usitni i prebaci u lizirajući pufer, zatim homogenizira i inkubira 30 minuta, sve radnje izvode se na ledu. Nakon inkubacije lizat se centrifugira na 16000xg 20 minuta na 4ºC. U supernatantu (tkivnom ekstraktu) se odredi koncentracija ukupnih proteina po Löwry-ju. Tkivni ekstrakt se prebaci u nove epruvete, zamrzne u tekućem dušiku i čuva na -70ºC do izvođenja TRAP reakcije (od engl. telomeric repeat amplification protocol). Koncentracija proteina u tkivnom ekstraktu normalizirana je na 1-50 μg i u tkivni ekstrakt se doda sterilna voda do volumena od 50μl u sterilnu epruvetu (ependorficu) u kojoj se nalazi reakcijska smjesa (tris pufer, supstrat telomeraze, začetnici, nukleotidi i Taq polimeraza) Epruveta se prenese u PCR (lančana reakcija polimeraze, eng. **P**olymerase **C**hain **R**eaction) aparat i namjesti program koji je zadan TRAP reakcijom. Nakon završenog PCR procesa izvodi se hibridizacija i ELISA (111) .

3.3.TRAP reakcija

Standardna metoda za mjerenje aktivnosti telomeraze, temelji se na sposobnosti staničnog ekstrakta da dodaje telomerička ponavljanja na 3' kraju sintetičkog deoksinukleotidnog začetnika obilježenog biotinom,

ukoliko je u tkivu prisutna aktivnost telomeraze. Produkt telomerazne aktivnosti se amplificira u PCR. Biotinizirani substratni začetnik se upotrebljava za imobilizaciju denaturiranog PCR produkta preko streptovidinom obloženih mikrotitarskih pločica. Produkt se hibridizira s digoksigeninom obilježenim probama i detektira s protutijelima na digoksigenin koja su konjugirana s peroksidazom (slika 2) (111). Prema Bednareku i sur aktivnost telomeraze se izražava kao apsorbancija peroksidazom metaboliziranog kromogena tetrametil benzidina pri valnoj dužini 450 nm (112). Vrijednosti apsorbancije ispod 0,2 smatraju se negativnima, a one iznad 0,2 pozitivnima. Pozitivne vrijednosti telomeraze podjeljene su u dvije skupine: umjerena aktivnost telomeraze (vrijednost apsorbancije 0,2-0,8) i jako pozitivna aktivnost telomeraze (vrijednosti apsorbancije više od 0,8) (113).



Slika 2. Shematski prikaz TRAP reakcije.

3.4. Analiza estrogenskih i progesteronskih receptora i katepsina D

Dio tumorskog tkiva koristio se i za dobivanje citosola. Smrznuto tkivo se usitnilo u tekućim dušikom ohlađenom metalnom mortalu (oko 0,5 mg) i homogeniziralo u četverostukom volumenu fosfatnog pufera (0,1 M fosfatni pufer pH 7,4). Homogenat se centrifugirao 10 minuta na 4000g na temperaturi 4ºC. Supernatant se prebacio u nove epruvete i centrifugirao 1 sat na 60 000g na 4ºC. Dobiveni supernatant predstavlja citosol u kome se odredila koncentracija proteina po Löwry-ju. Koncentracija proteina podešena je s fosfatnim puferom na 1-1,5 mg/ml citosola.

Estrogenski i progesteronski receptori određivani su Scatchardovom analizom preporučenom od Horwitz i McGuire (114,115). 0,2 ml citosola inkubira se s rastućom koncentracijom ^{3}H-estradiola (0,05 do 0,8x10^{-9}) za određivanje estrogenskih receptora, a sa rastućim koncentracijama ^{3}H-R5020 (0,05 do 0,8x10^{-8}) za određivanje progesteronskih receptora. Uz najvišu koncentraciju radioaktivno označenog hormona paralelno se dodaje i sto puta veća koncentracija neoznačenog hormona da se odredi nespecifično vezivanje. Uzorci se inkubiraju 18 sati na 4°C i nakon inkubacije nevezani, radioaktivno označeni hormon, uklanja se vezanjemna na DCC (eng. Dextran-coated charcoal) (0,25 Norit A; 0,0025% dekstran; u TRIS-HCl puferu pH 8). Uzorci s DCC-om se mućkaju na 4°C 30 minuta, centrifugiraju 15 minuta na 7000xg i 0,5 ml supernatanta se prenese u fiolice i doda otopina za brojenje te izmjeri radioaktivnost.

Pozitivni receptorski status je definiran koncentracijom estrogenskih receptora većom od 10 fmola/mg proteina i koncentracijom progesteronskih receptora većom od 20 fmola/mg proteina (116) .

Koncentracija katepsina D određivana je u citosolu imunoradiometrijskom metodom ((Elsa-CATH-D Cis bio international). Vrijednosti katepsina D iznad 45 pmol/mg proteina smatrane su visokim koncentracijama (117).

3.5. Analiza HER-2

HER-2 status određivan je metodom imunohistokemije (HercepTest) (118). U metodi imunohistokemije koristi se poliklonsko protutijelo na epitope intracitoplazmatske domene HER-2 proteina. Interpretacija rezultata:

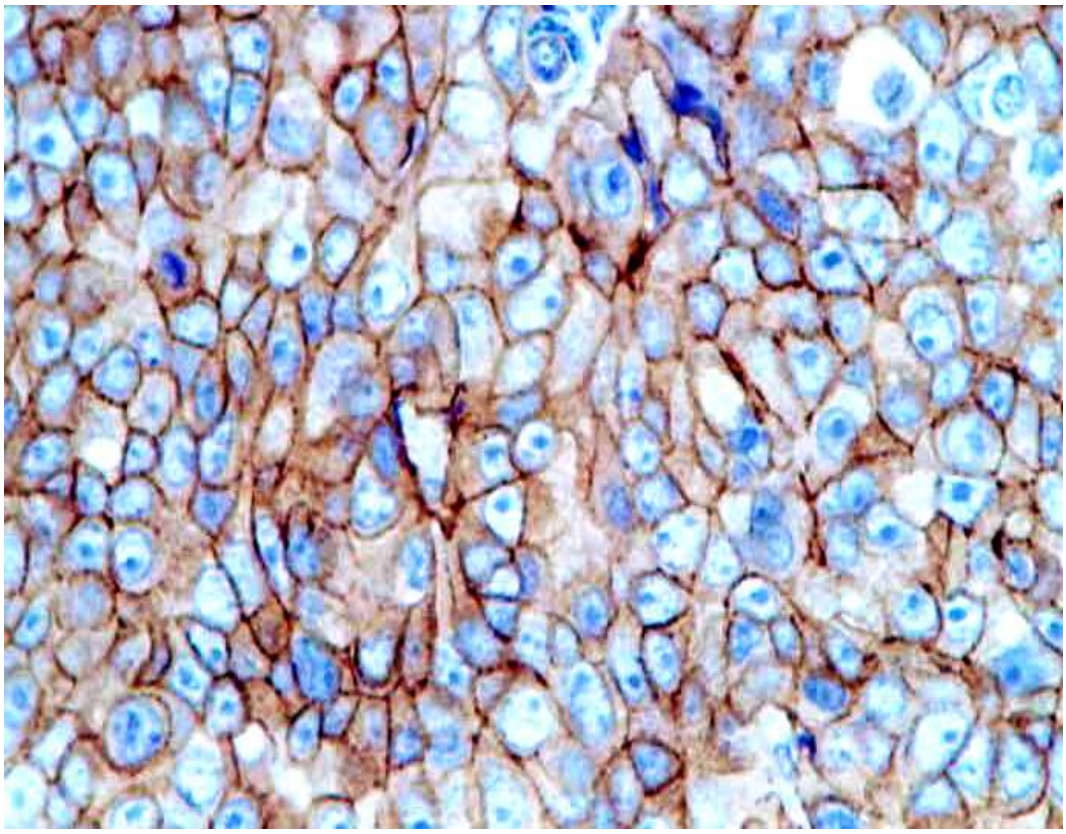
0-- nema membranskog bojanja ili u <10% tumorskih stanica

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.

Ocjenjivala se samo invazivna komponenta, a pozitivnim se smatra samo membransko bojenje (amplifikacija onkogena veća od 3x povezana je s membranskom lokalizacijom proteina HER-2, a citoplazmatska reaktivnost je manjeg značenja). Samo rezultati intenziteta 3+ (difuzno, jako pozitivno, membransko bojanje) smatraju se prekomjernim očitovanjem HER-2 (slika 3).



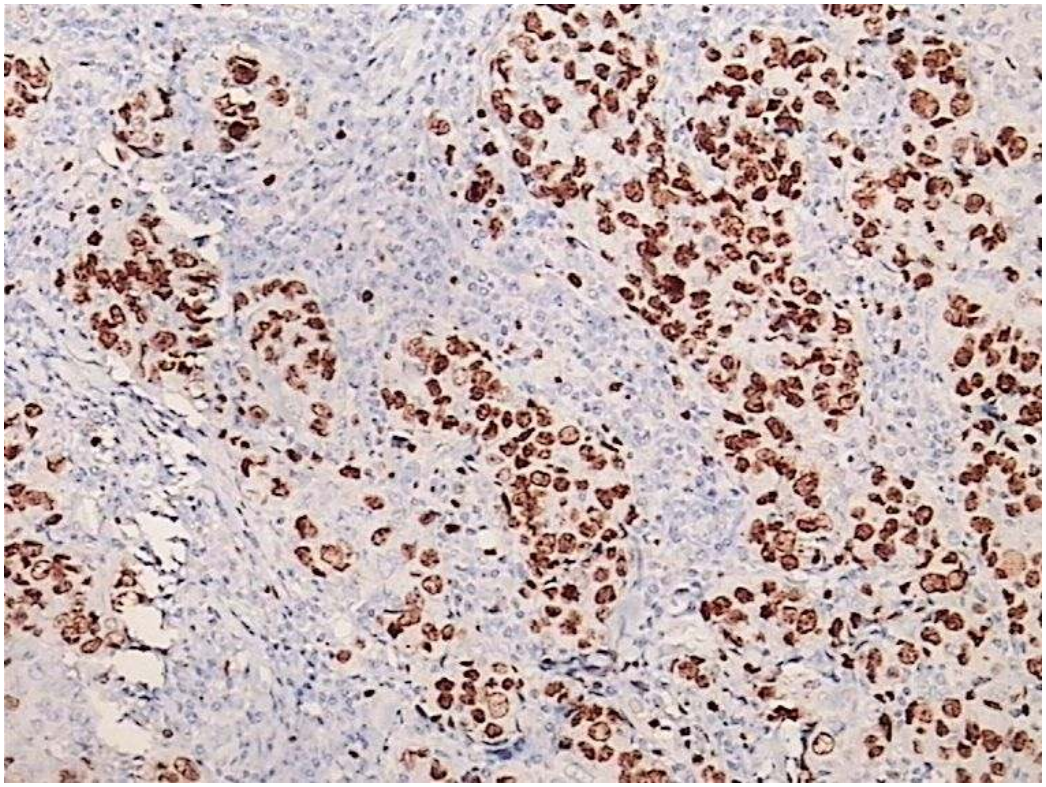
Slika 3. Imunohistokemijsko bojenje s anti-HER-2 protutijelom. Tumorsko tkivo pokazuje očitovanje HER-2 u intenzitetu 3+ na svim tumorskim stanicama (pozitivan nalaz, IMH 400x).

3.6. Analiza Ki-67

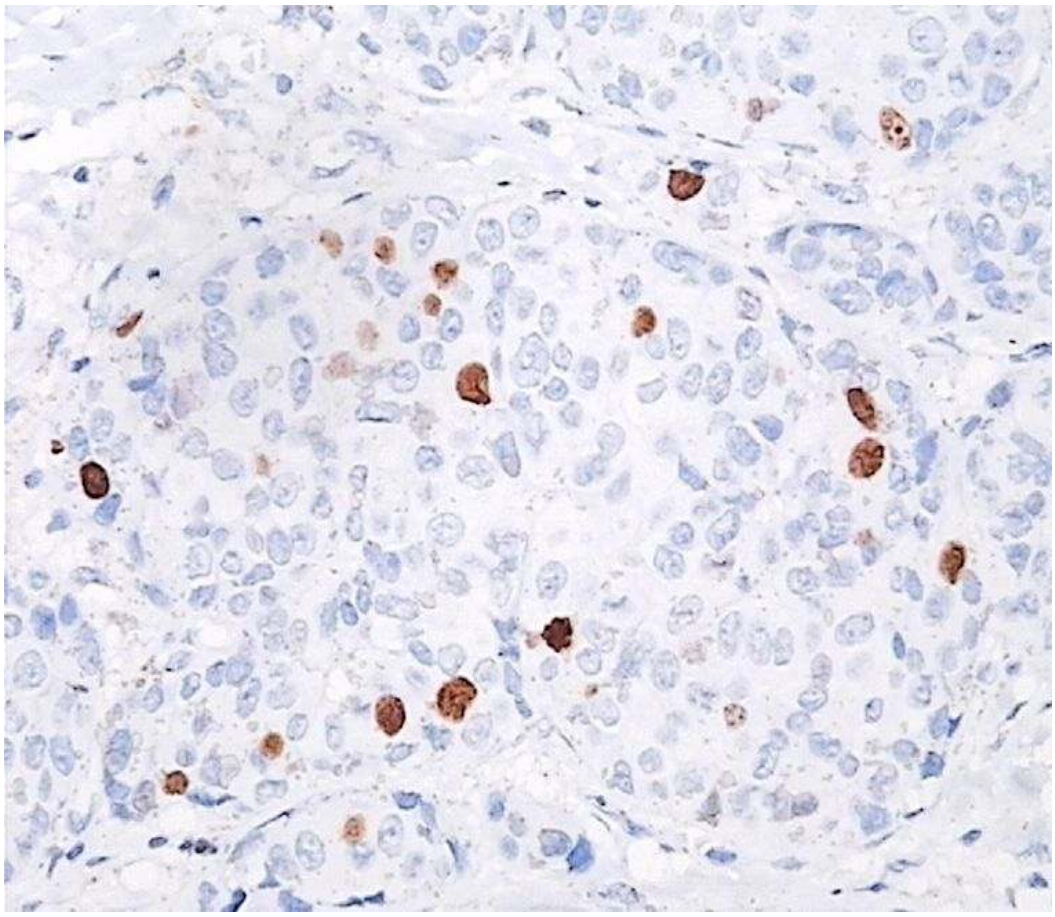
Za ispitivanje jačine očitovanja Ki-67 proteina koristila se metoda imunohistokemije (44).

Za imunohistokemijsko bojenje su korišteni parafinski blokovi Zavoda za patologiju KBC. Blokovi su rezani u 5µm debele rezove i bojani su antiKi-67 (Dako, Clostrup, Denmark) standardnom avidin-biotin-imunoperoksidaza metodom i brojani uz pomoć automatskog brojača (TechMate,Dako). Proliferacijski indeks udređen je brojanjem pozitivnih jezgara na Ki-67 u 100 tumorskih stanica i izražen postotkom . Vrijednost proliferacije iznad 10% stanica koje su Ki-67 pozitivne smatrale

su se pozitivnim nalazom (slika 4). Proliferacijski indeks manji od 10% je negativan nalaz (slika 5) .



Slika 4. Imunohistokemijsko bojenje s anti-Ki67 protutijelom. Tumorsko tkivo ima proliferacijski indeks veći od 90% (IMH 300x)



Slika 5. Imunohistokemijsko bojenje s anti-Ki67 protutijelom. Tumorsko tkivo ima proliferacijski indeks manji od 10% (IMH 400x).

Statistička raščlamba

Normalnost raspodjele podataka ispitana je Smirnov Kolmogorovljevim testom. Za analizu razlike između dviju skupina u pojedinim varijablama korišteni su Mann Whitneyev test za podatke koji nisu imali normalnu raspodjelu, te Studentov t-test za podatke s normalnom raspodjelom. Povezanost između varijabli je istražena pomoću Spearmanovog rho testa

zbog nepravilne raspodjele većine podataka. Utvrđen je koeficijent korelacije te je značajnost prihvaćena uz $p<0,05$. Podaci su analizirani statističkim postupcima ispitivanja razlika i povezanosti pomoću SPSS 17 (IBM, NY, USA). Normalnom raspodjelom kontinuirane varijable smatrala se svedenost i zaobljenost raspodjela manja od 1. Također se pravilnost raspodjele provjerila Smirnov-Kolmogorovljevim testom. Srednje vrijednosti kontinuiranih varijabli su izražene medijanom i rasponom za varijable koje se ne raspodjeljuju normalno. Za utvrđivanje razlika između više od dva nezavisna uzorka je upotrijebljen Kruskal-Wallisov test za neparametrijsku analizu, pa potom Mann-Whitney U-test za *post hoc* neparametrijsku analizu. Za utvrđivanje razlika između dva nezavisna uzorka upotrijebljen je Mann-Whitneyev U-test za neparametrijsku anali te Studentov t-test za one uzorke s normalnom raspodjelom. Za utvrđivanje povezanosti uzorka upotrijebljen je Spearmanov rho test za neparametrijsku raščlambu. Za utvrđivanje prediktivne vrijednosti nezavisnih varijabli na činjenicu je li bolesnica umrla ili nije tj. je li imala ralaps bolesti ili nije korištena je metoda binarne linearne regresije. Zavisna varijabla je bilo stanje bolesnice je li bolesnica umrla ili nije odnosno je li imala ralaps bolesti ili ne, a nezavisne varijable pozitivna tj. negativna izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora, HER 2, proliferacijskog markera Ki67, katepsina D i aktivnosti telomeraze. Nezavisne varijable su preuređene na način da se ispitivano svojstvo smatralo negativnim odnosno pozitivnim, ovisno o koncentraciji ili aktivnosti ispitivanog svojstva. Ispitivanje prediktivnih vrijednosti ispitivanih svojstava na preživljenje bolesnice izvršeno je metodom Coxove regresije. Ista metoda je korištena i za ispitivanje prediktivnih vrijednosti ispitivanih svojstava na pojavu relapsa bolesti ili ne, Kaplan – Meierovom metodom. Statistička značajnost je prihvaćena uz $p<0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Obilježja bolesnica sa zloćudnim tumorima

Uzorak se sastojao od 102 bolesnice s malignim tumorima dojke, 40 bolesnica s benignim promjenama dojke (20 bolesnica s fibrocističnim promjenama i 20 bolesnica s fibroadenomom) te 20 zdravih tkiva dojke .

Tablica 1. Podaci o bolesnicama s malignim tumorima

Bolesnice s malignim tumorima	**N=102**	
	Broj	%
Dob		
< 50	44	43,13
≥ 50	58	56,87
Veličina tumora		
< 2 cm	41	40,19
≥ 2 cm	61	59,81
Histološki gradus		
dobro (I)	27	26,47
umjereno (II)	38	37,25
slabo (III)	37	36,28
Aksilarni limfni čvorovi		
negativni	60	58,82
pozitivni	42	41,18
Estrogenski receptori (ER)		
< 10 fmol/mg proteina	64	62,74
≥ 10 fmol/mg proteina	38	37,26
Progesteronski receptor (PR)		
< 20 fmol/mg proteina	58	56,86
≥ 20 fmol/mg proteina	44	43,14
ER/PR koekspresija		

+/+	38	37,25
+/-	26	25,49
-/+	21	20,58
-/-	17	16,68
HER-2		
Negativno (1,2)	76	74,50
Pozitivno (3)	26	25,50
Koekspresija ER/PR/HER-2		
+/+/+	4	3,92
-/+/+	9	8,82
-/-/+	10	9,80
-/-/-	6	5,82
+/-/+	3	2,94
+/+/-	34	33,33
+/-/-	24	23,52
-/+/-	12	11,85
Ki-67		
< 10 %	46	45,09
≥ 10%	56	54,91
Katepsin D		
Niska vrijednost < 45 pmol/mg proteina	60	58,82
Visoka vrijednost ≥ 45 pmol/mg proteina	42	41,18

Prosječna dob bolesnica s malignim tumorima je bila 56,7±13,2 s rasponom od 25 do 84 godine. Većim djelom (56,87%), bolesnice s malignim tumorima dojke bile su starije od 50 godina (tablica 1).

U skupini malignih tumora je prosječna veličina tumora bila 2,72±1,6 cm, s rasponom 0,3-9 cm odnosno u 41 bolesnice (40,9 %) je tumor bio manji od 2 cm, a u 61 (60%) bolesnice tumor je bio veći ili jednak 2 cm (tablica 1).

Histološki gradus (stupanj diferencijacije) u 27 (26,47%) malignih tumora bio je dobro diferenciran, 38 (37,25%) tumora bilo je umjereno, a 37 tumora (36,28%) slabo diferencirano (tablica 1).

Limfni čvorovi pazuha u 60 (58,82%) bolesnica bili su negativni, a 42 bolesnice (41,18%) bile su pozitivne. Raspon pozitivnih limfnih čvorova pazuha bio je 1-16, a prosječan broj pozitivnih limfnih čvorova bio je 4 (tablica 1) .

Estrogenski receptori bili su pozitivni u 64 tumora (62,74%), dok su progesteronski receptori bili pozitivni u 58 karcinoma dojke (56,86%). Oba receptora (ER/PR +/+ bila su pozitivna u 38 tumora (37,25%), estrogenski receptor (ER/PR +/-) bio je pozitivan u 26 tumora (25,49%), progesteronski receptor (ER/PR -/+) u 21 tumoru (20,58%), dok su oba receptora bila negativna u 17 tumora (16,68%). HER-2 bio je pozitivan u 26 tumora (25,50%), a negativan u 76 malignih tumora (74,50%). Sva tri receptora (ER/PR/HER-2 +/+/+) bila su pozitivna u 4 tumora (3,92%), progesteronski receptor i HER-2 (ER/PR/HE R-2 -/+/+) u 9 tumora (8,82%), samo HER-2 (ER/PR/HE R-2 -/-/+) bio je pozitivan u 10 tumora (8.82%). U 6 tumora (5,82%) bila su negativna sve tri receptora (ER/PR/HE R-2 -/-/-), estrogenski receptori i HER-2 (ER/PR/HE R-2 +/-/+) bili su pozitivni u 3 tumora (2,94%), estrogenski i progesteronski receptori (ER/PR/HE R-2 +/+/-) u 34 tumora (33,33%). Samo estrogenski receptori (ER/PR/HE R-2 +/-/-) bili su pozitivni u 24 tumora (23,52%), a progesteronski receptori (ER/PR/HE R-2 -/+/-) u 12 tumora (11,85%).

Proliferacijski marker Ki-67 bio je pozitivan u 56 tumora (54,91%) u rasponu od 10-80%, a negativno je bilo 46 tumora (45,09%). Niske vrijednosti katepsina D (što upućuje na nizak stupanj metastaziranja)

nađene su 60 tumora (58,82%), a visoke vrijednosti (što upućuje na visok rizik metastaziranja) u 42 tumora (41,18%).

4.2. Rezultati aktivnosti telomeraze u tkivima dojke

Aktivnost telomeraze ispitivana je u 20 zdravih tkiva dojke. Aktivnost telomeraze nije bila prisutna niti u jednom uzorku, apsorbancije su bile niže od 0,2. Prosječna apsorbancija bila je 0,0530±0,0206 s rasponom od 0,0170 do 0,0890 (tablica 2,slika 6).

Analiza prisutnosti aktivnosti telomeraze u fibrocističnim promjenama dojke nije pokazala prisutnost telomeraze, apsorbancije su bile niže od 0,2. Raspon apsorbancija bio je od 0,0180 do 0,128, a prosječna apsorbancija bila je 0,0525±0,0277(tablica 2,slika 6).

Aktivnost telomeraze u tkivima fibroadenoma bila je negativna, apsorbancija je bila niža od 0,2. Prosječna apsorbancija bila je 0,104±0,02463 s rasponom 0,066-0,104 (tablica 2, slika 6).

Tablica 2. Aktivnost telomeraze u uzorcima tkiva dojke.

Zdravo tkivo dojke	**N=20**	
	Broj	%
< 0,2 negativno	20	100
≥ 0,2 pozitivno	0	0

Fibrocistične promjene	**N=20**

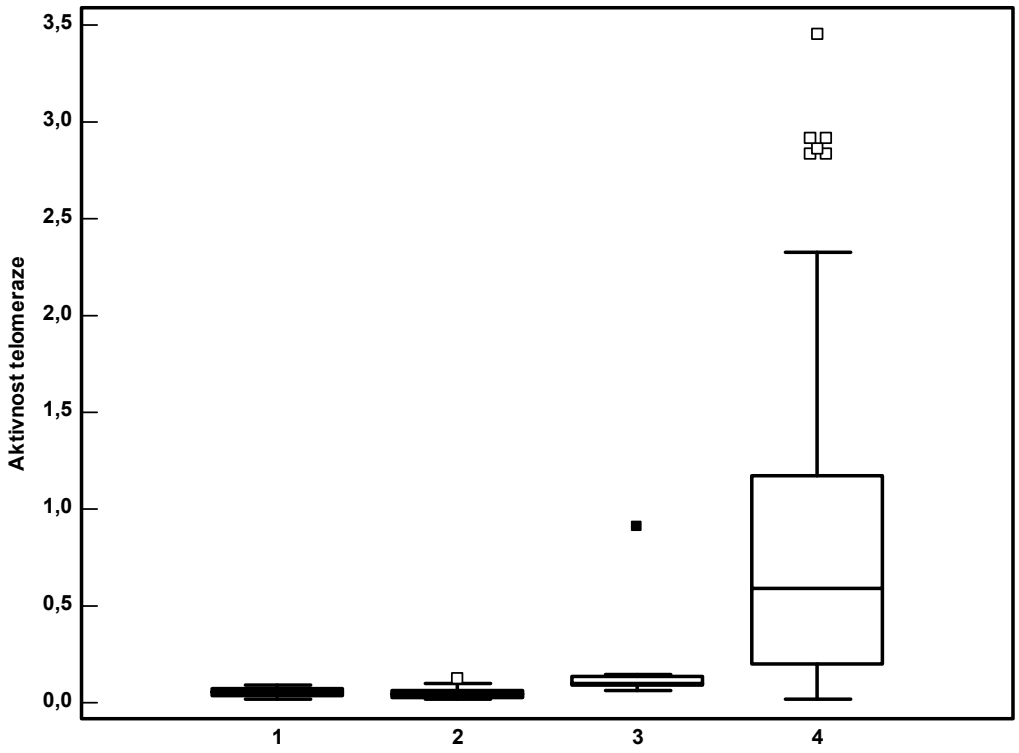
	Broj	%
< 0,2 negativno	20	100 ≥ 0,2
pozitivno	0	0

Fibroadenomi **N=20**

	Broj	%
< 0,2 negativno	20	100
≥ 0,2 pozitivno	0	0

Maligni tumori **N=102**

	Broj	%
< 0,2 negativno	25	24,51
≥ 0,2 pozitivno	77	75,49
0,2-0,8 umjereno pozitivno	36	46,76
≥ 0,8 jako pozitivno	41	53,24



Slika 6. Aktivnost telomeraze u različitim tkivima dojke
(1-zdravo tkivo N=20, 2-fibrocistične promjene N=20,
3-fibroadenomi N=20, 4-maligno tkivo N=102).
Rezultati su raspon vrijednosti ±SD.

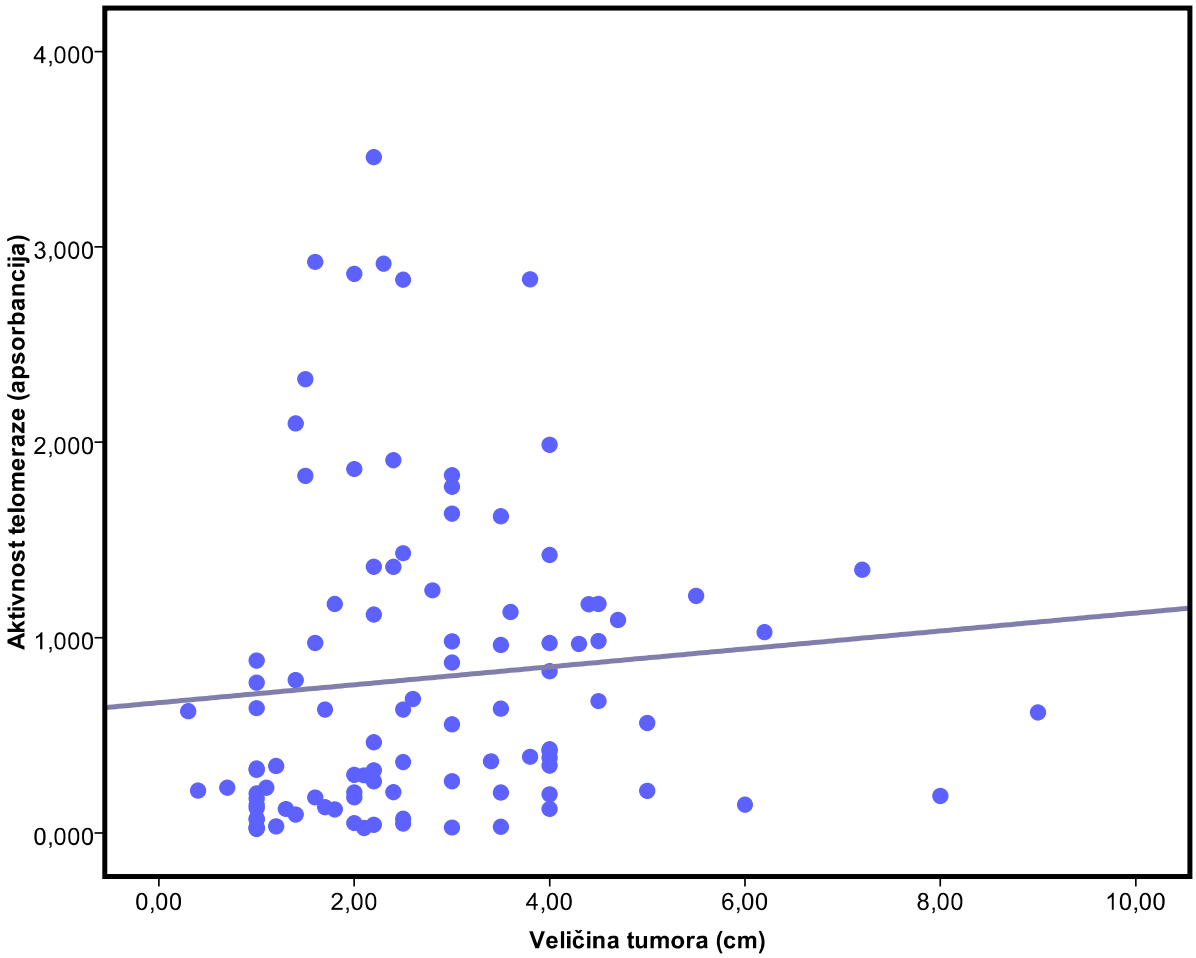
Aktivnost telomeraze u malignim tumorima dojke bila je prisutna u 77 tumora (75,49%) dok u 25 tumora (24,51%) nije bila prisutna. Telomerazna aktivnost s apsorbancijom ispod 0,2 smatrala se negativnom, iznad 0,2 pozitivnom. Apsorbancija skupine koje su bile pozitivne bila je od 0,202 do 3,4590, a prosječna 1,032±0,872. U skupini pozitivnih malignih tumora 36 tumora (46,76%) bila su umjereno pozitivna (od 0,202 do 0,783, prosječna apsorbancija 0,4204±0,1818), a 41 tumor (53,24%) visoko pozitivan (apsorbancije od 0,828 do 3,4590, a prosječna 1,5537± 0,700) (tablica 2, slika 6).

4.3. Povezanost aktivnosti telomeraze s drugim patohistološkim pokazateljima

Povezanost između varijabli je istražena pomoću Spearmanovog rho testa zbog nepravilne raspodjele većine podataka. Utvrđen je koeficijent korelacije te je značajnost prihvaćena uz $p<0,05$.

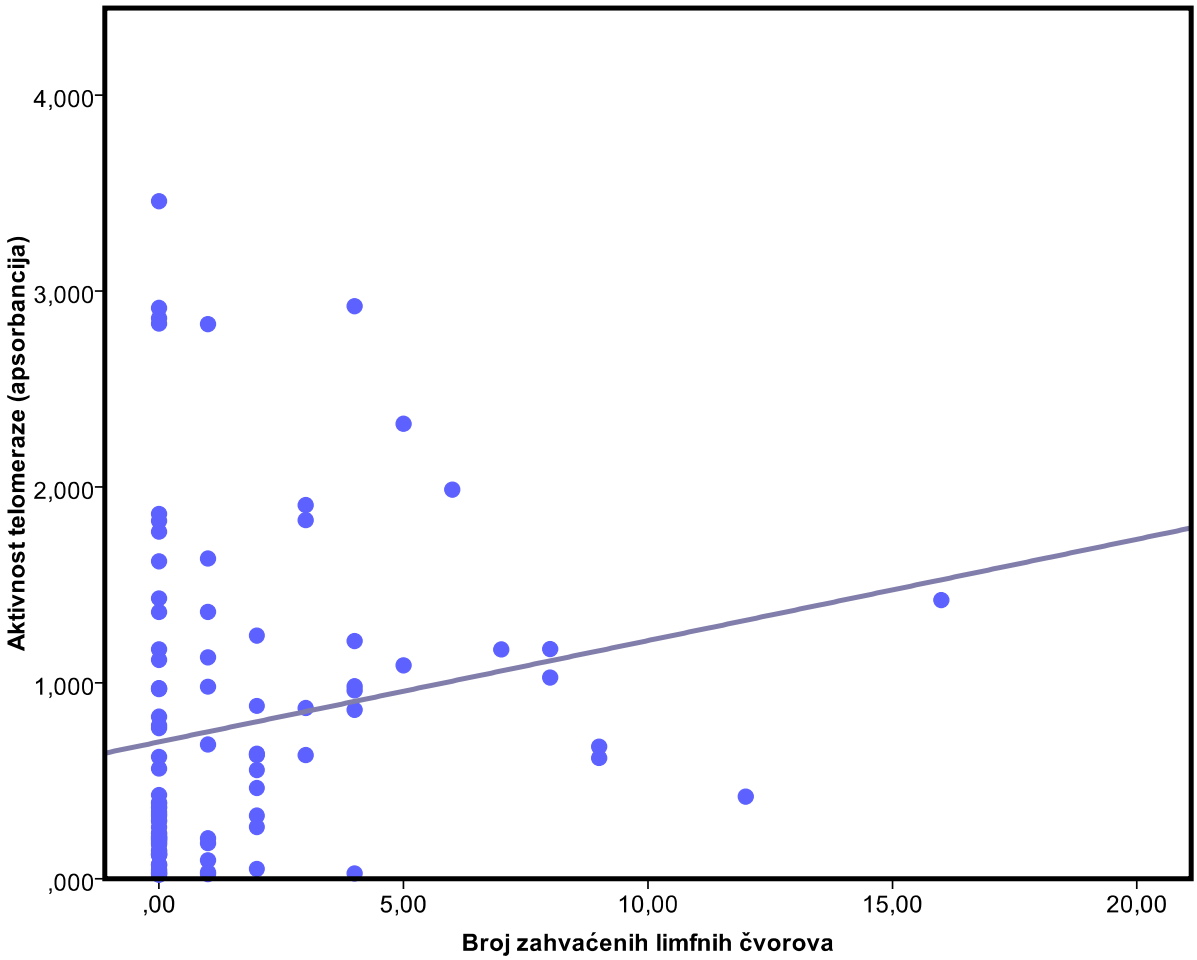
Rezultati utvrđivanja povezanosti između aktivnosti telomeraze i kliničko patohistoloških pokazatelja za bolesnice s karcinomom dojke su slijedeći:

1. Utvrđena je niska pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i veličine tumora ($r=0,288$; $p=0,004$), odnosno što je veći tumor veća je vrijednost apsorbancije (slika 7).



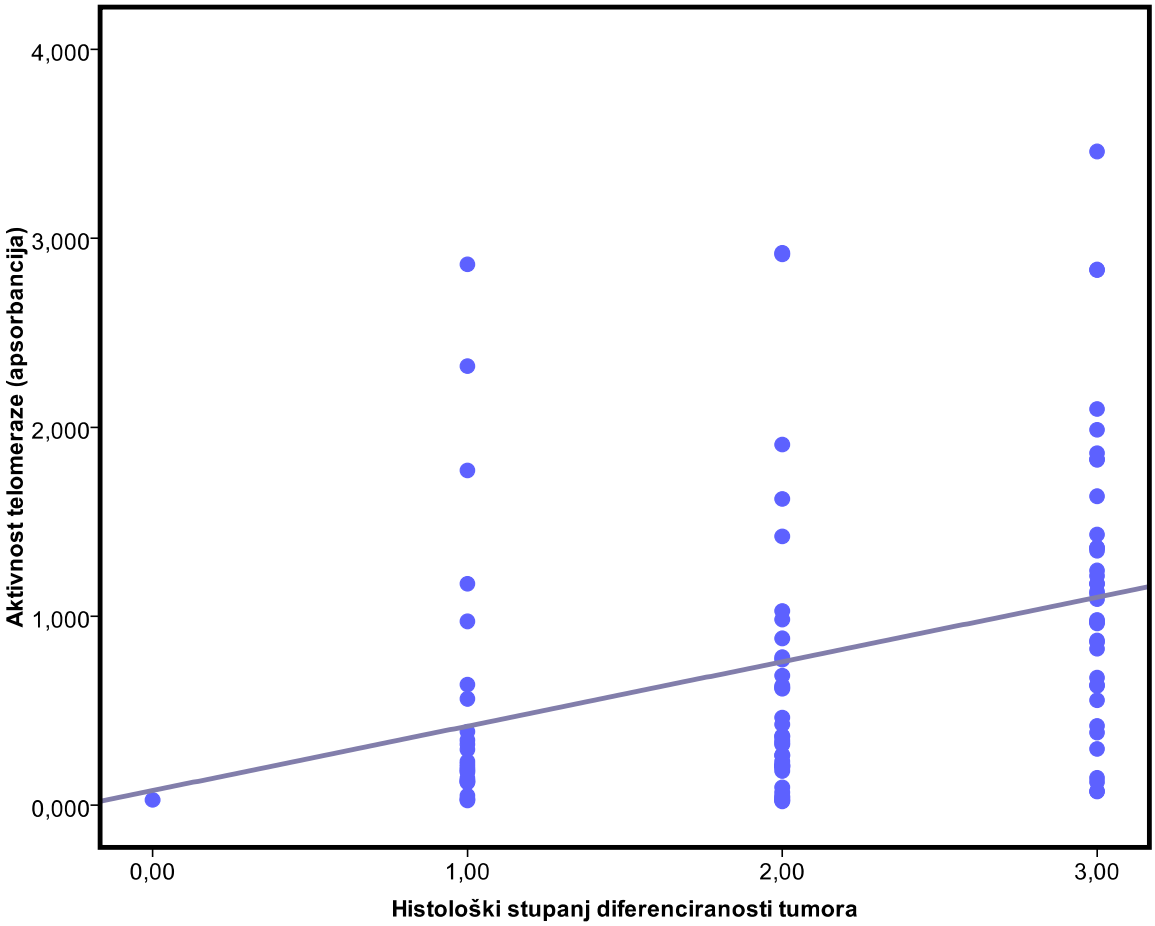
Slika 7. Povezanost aktivnosti telomeraze i veličine tumora.

2. Utvrđena je umjerena pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i broja zahvaćenih limfnih čvorova ($r=0,355$; $p<0,001$), odnosno što je veći broj zahvaćenih limfnih čvorova veća je i aktivnost telomeraze (slika 8).



Slika 8. Povezanost aktivnosti telomeraze i broja zahvaćenih limfnih čvorova .

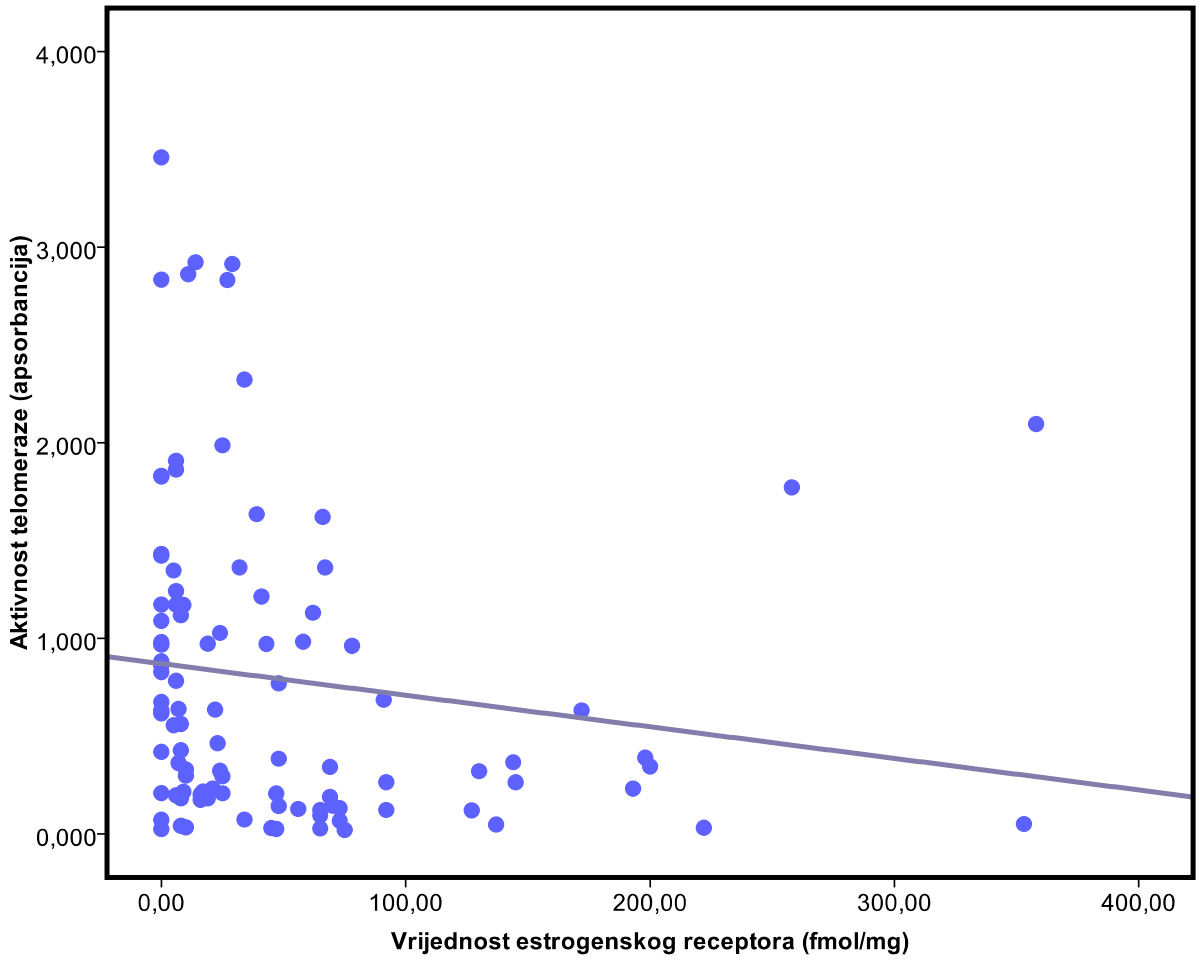
3. Utvrđena je umjerena pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i histološkog stupnja diferenciranosti tumora ($r=0,454$; $p<0,001$), odnosno što je veći histološki stupanj diferenciranosti tumora veća je aktivnost telomeraze (slika 9).



Slika 9. Povezanost aktivnosti telomeraze i histološkog stupnja diferenciranosti tumora.

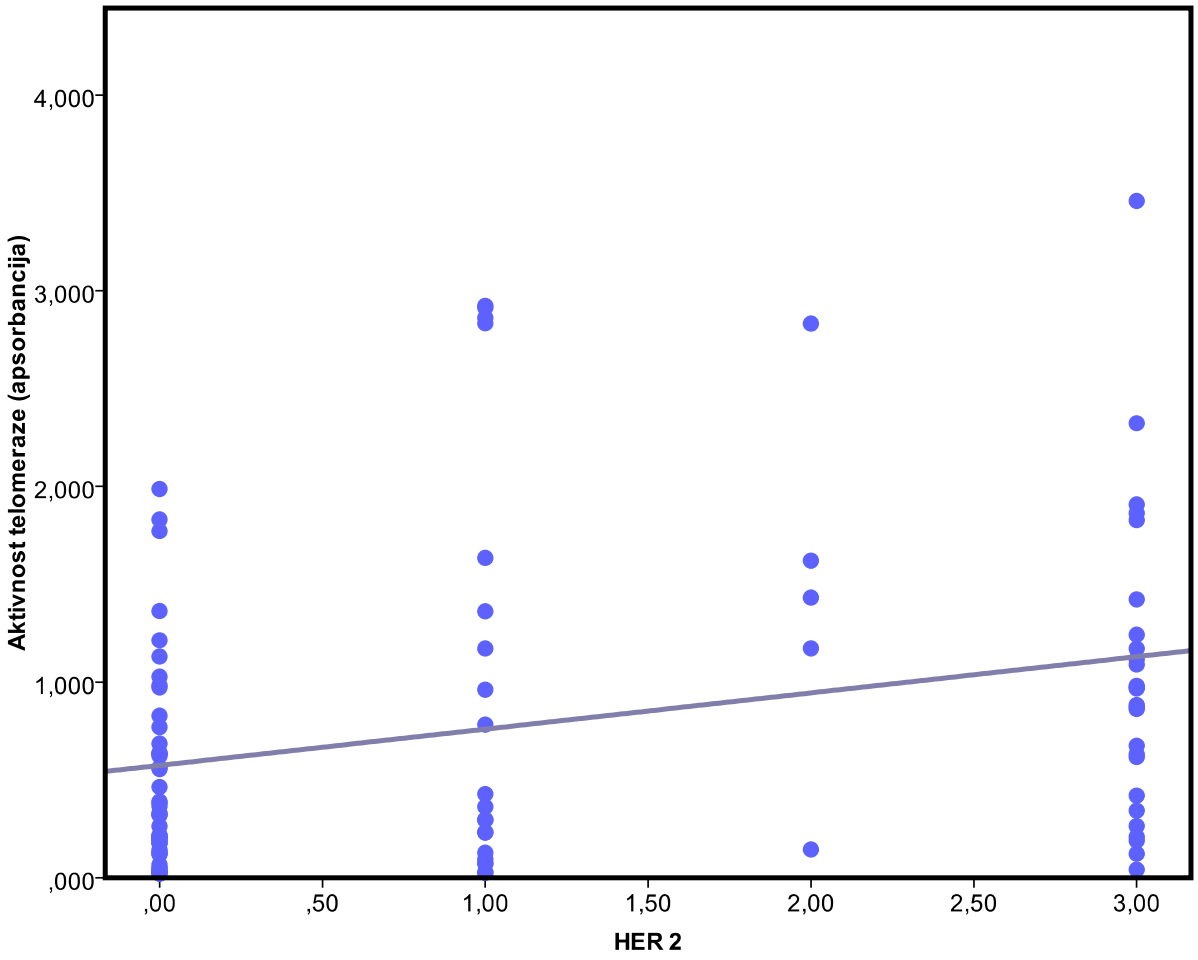
.

4. Utvrđena je umjerena negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i koncentracije estrogenskog receptora ($r=-0,319$; $p<0,001$), odnosno što je veća aktivnost telomeraze manja je koncentracije estrogenskih receptora (slika 10).



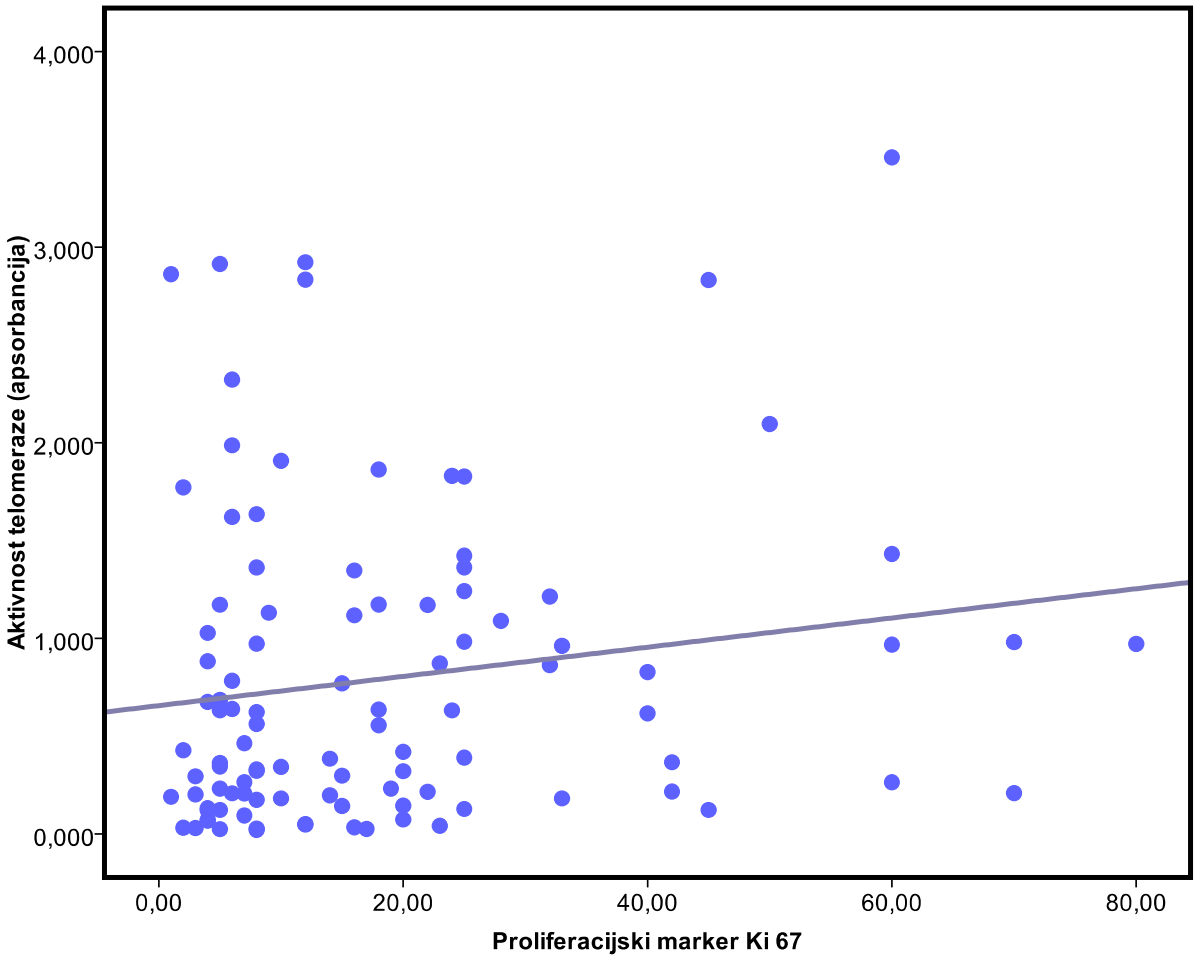
Slika 10. Povezanost aktivnosti telomeraze
i koncentracije estrogenskih receptora.

5. Utvrđena je niska pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i učestalosti pozitivnog HER-2 (r=0,292; p=0,003), odnosno što je veća aktivnost telomeraze veća je učestalost pozitivnog HER-2 (slika 11).



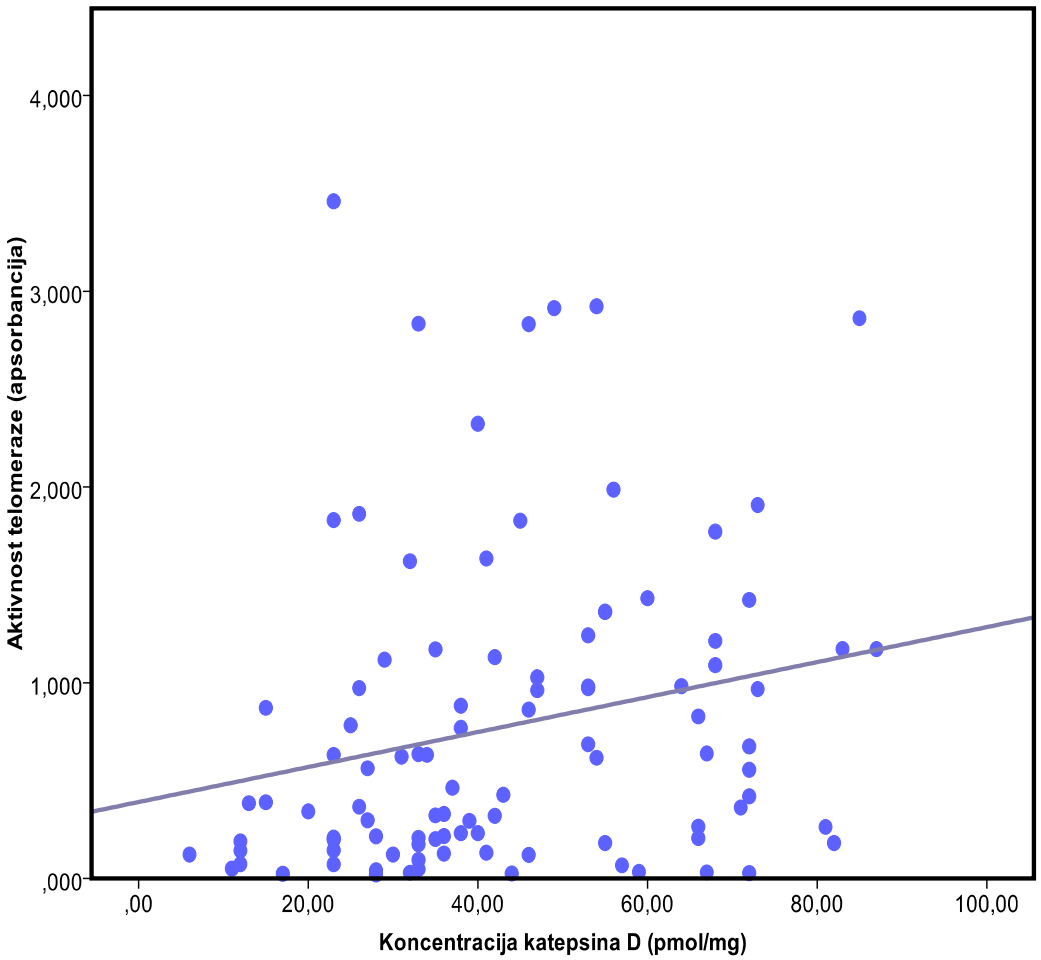
Slika 11. Povezanost aktivnosti telomeraze i učestalosti pozitivnog HER-2.

6. Utvrđena je niska pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i vrijednosti postotka pozitivnog proliferacijskog markera Ki-67 (r=0,205; p=0,038), odnosno što je veća aktivnost telomeraze veća je vrijednost postotka pozitivnog proliferacijskog markera (slika 12).



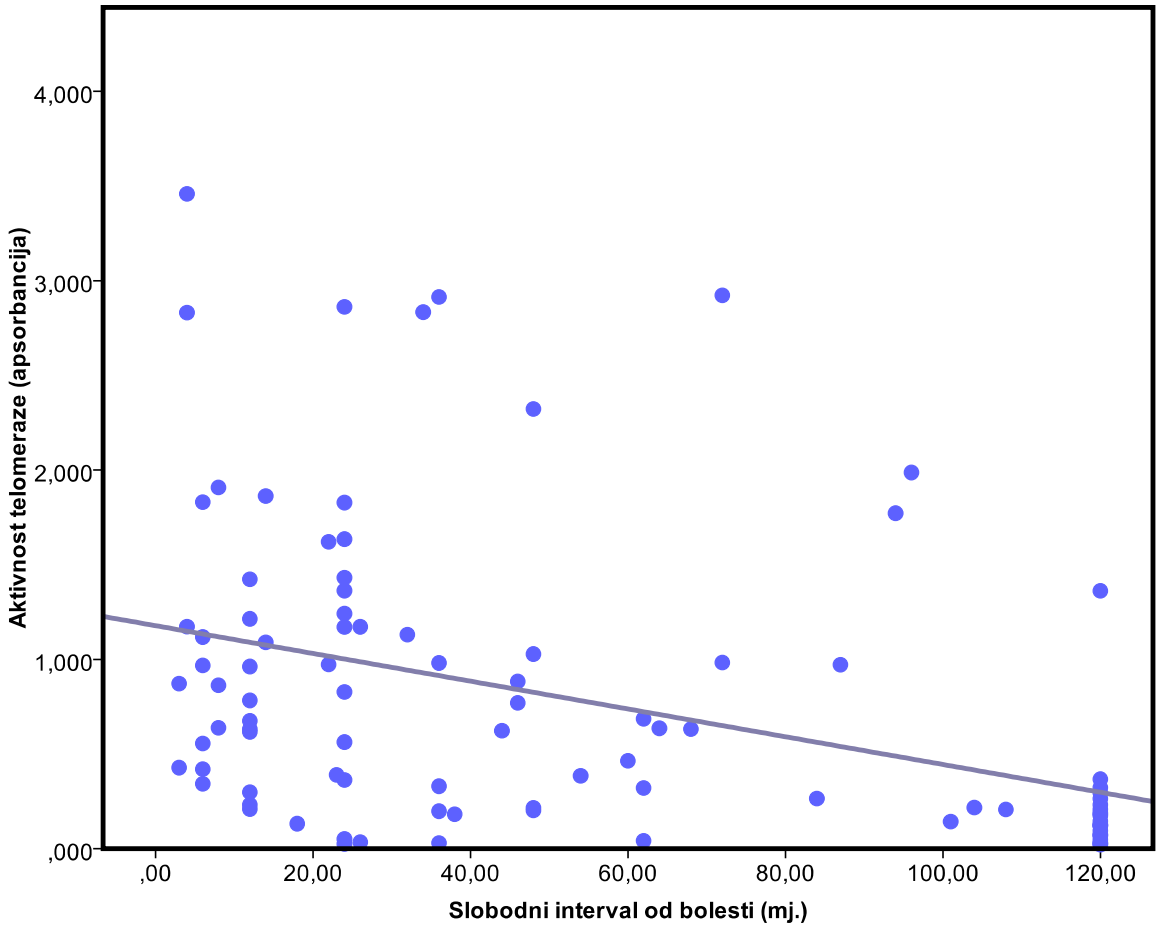
Slika 12. Povezanost aktivnosti telomeraze
i postotka pozitivnog proliferacijskog markera Ki-67.

7. Utvrđena je umjerena pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i koncentracije katepsina D (r=0,313; p=0,001), odnosno što je veća aktivnost telomeraze veća je i koncentracija katepsina D (slika 13).



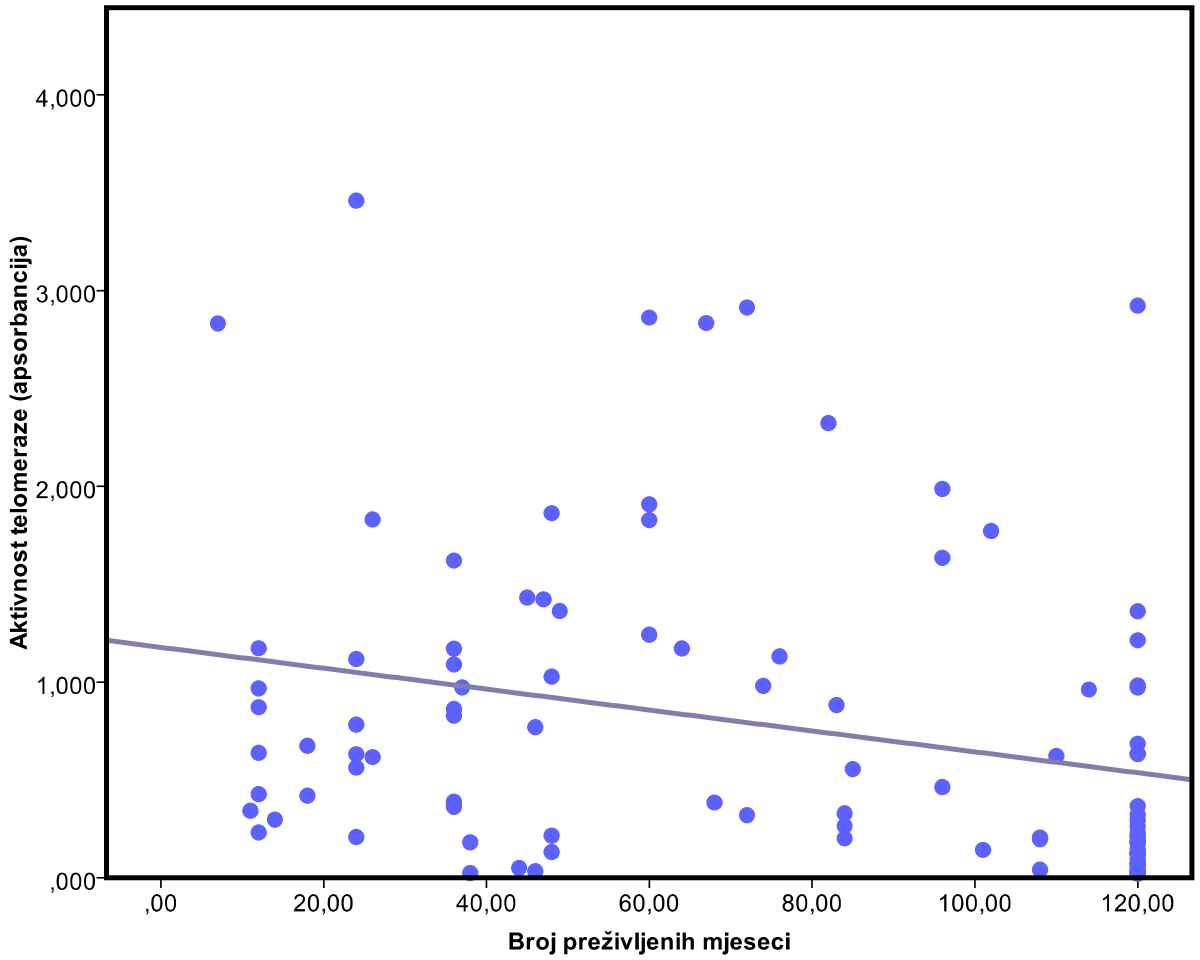
Slika 13. Povezanost aktivnosti telomeraze i koncentracije katepsina D.

8. Utvrđena je visoka negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i broja mjeseci od trenutka postavljanja dijagnoze do ponovne pojave bolesti (relapsa) ($r=-0,507$; $p<0,001$), odnosno što je veća aktivnost telomeraze manji je slobodni interval od bolesti (slika 14).



Slika 14. Povezanost aktivnosti telomeraze i slobodnog intervala od bolesti.

9. Utvrđena je umjerena negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i broja preživjelih mjeseci od trenutka postavljanja dijagnoze ($r=-0,374$; $p<0,001$), odnosno što je veća aktivnost telomeraze manji je broj preživjelih mjeseci od trenutka postavljanja dijagnoze (slika 15).



Slika 15. Povezanost aktivnosti telomeraze i broja preživjelih mjeseci.

Nije nađena statistički značajna povezanost između aktivnosti telomeraze i slijedećih patohistoloških pokazatelja:

- Nema statistički značajne povezanosti između avrktivnosti telomeraze i dobi bolesnica (r=-0,105; p=0,295)

- Nema statistički značajne povezanosti između aktivnosti telomeraze i koncentracije progesteronskih receptora (r=0,006; p=0,951)

4.4. **Povezanost koekspresije estrogenskog i progesteronskog receptora**

Korištenjem Kruskal – Wallisovog testa za utvrđivanje razlika između 4 skupine različite koekspresije estrogenskog i progesteronskog receptora i aktivnosti telomeraze utvrđena je statistički značajna razlika između skupina (χ^2= 11,566; p=0,009). U tablici 3 prikazane su aktivnosti telomeraze po svakoj od navedenih skupina.

Tablica 3. Aktivnosti telomeraze po pojedinim skupinama temeljenih na koekspresiji estrogenskih i progesteronskih receptora

ER/PR	Aktivnost telomeraze (apsorbancija)

koekspresija	N	
+/+*	36	0,37 (0,032 - 2,923)
+/-	27	0,26 (0,021 - 2,914)
-/+	21	0,739 ± 0,51
-/-	18	1,04 (0,025 - 3,459)

* + označava vrijednost estrogenskog receptora ≥10 fmol/mg, te progesteronskog receptora ≥20 fmol/mg

Korištenjem Mann-Whitneyevog testa za *post - hoc* statističku analizu utvrđena je statistički značajna razlika u aktivnostima telomeraze između pojedinih skupina. Rezultati, zajedno s vrijednošću i značajnošću testa su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz rezultata usporedbe aktivnosti telomeraze između pojedinih skupina.

ER/PR koekspresija	Statistika*	
+/+ vs. +/ -	z=-1,181	p=0,238
+/+ vs. -/+	z=-0,827	p=0,408
+/+ vs. -/-	**z=-2,119**	**p=0,034**
+/- vs. -/+	**z=-2,182**	**p=0,029**
+/- vs. -/-	**z=-2,757**	**p=0,006**

-/+ vs. -/-	z=-1,859	p=0,063

*Korišten je Mann – Whitneyev test za *post – hoc* analizu

4.5. Povezanost vrijednosti aktivnosti telomeraze I koekspresije estrogenskog, progesteronskog receptora i statusa HER-2

Korištenjem Kruskal – Wallisovog testa za utvrđivanje razlika između koekspresije 8 skupina različite pozitivnosti estrogenskog i progesteronskog receptora te pozitivnosti HER-2 i aktivnosti telomeraze nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina (χ^2= 12,527; p=0,084). U skladu s tim nije provedena *post – hoc* analiza (tablica 5).

Tablica 5. Aktivnost telomeraze po pojedinim skupinama koekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora te pozitivnog HER-2.

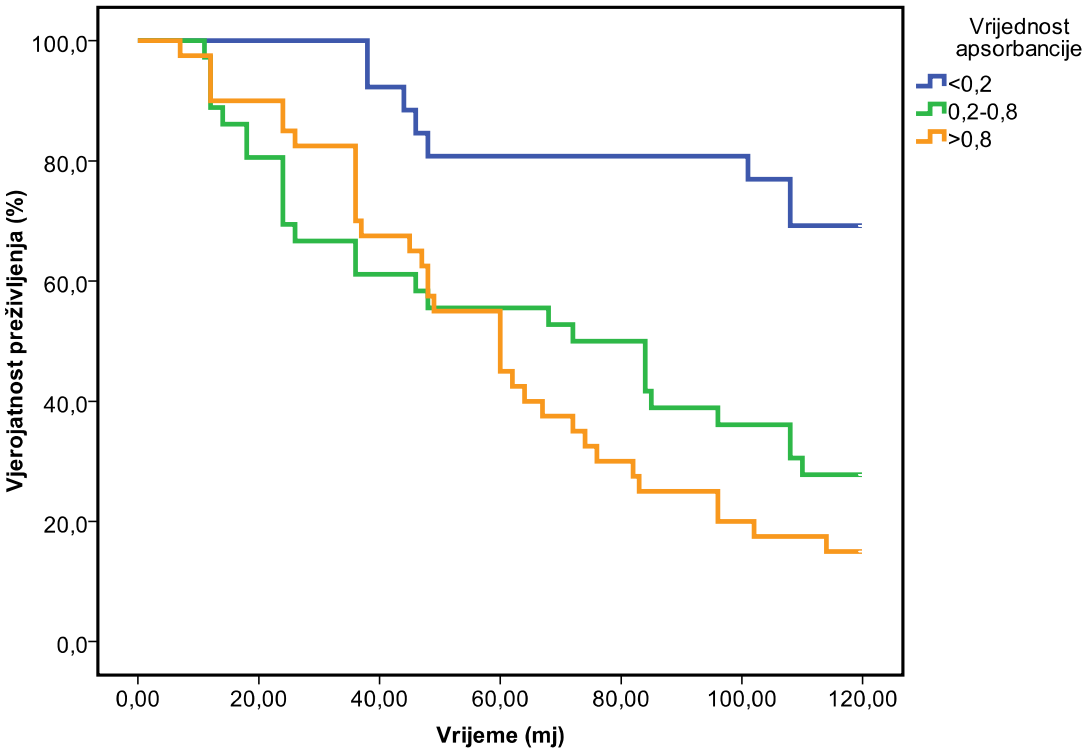
ER/PR/HER-2 koekspresija	N	Aktivnost telomeraze (apsorbancija)
+/+/+	3	0,35 (0,27 - 2,32)

-/+/+	9	0,84 ± 0,59
-/-/+	11	1,09 (0,62 - 3,46)
-/-/-/	7	1,06 ± 1,00
+/-/+	4	0,27 (0,12 - 0,97)
+/+/-	33	0,39 (0,03 - 2,92)
+/-/-	23	0,26 (0,02- 2,91)
-/+/-	12	0,66 ± 0,44

* + označava vrijednost estrogenskog receptora ≥10 fmol/mg, progesteronskog receptora ≥20 fmol/mg, te pozitivan HER 2

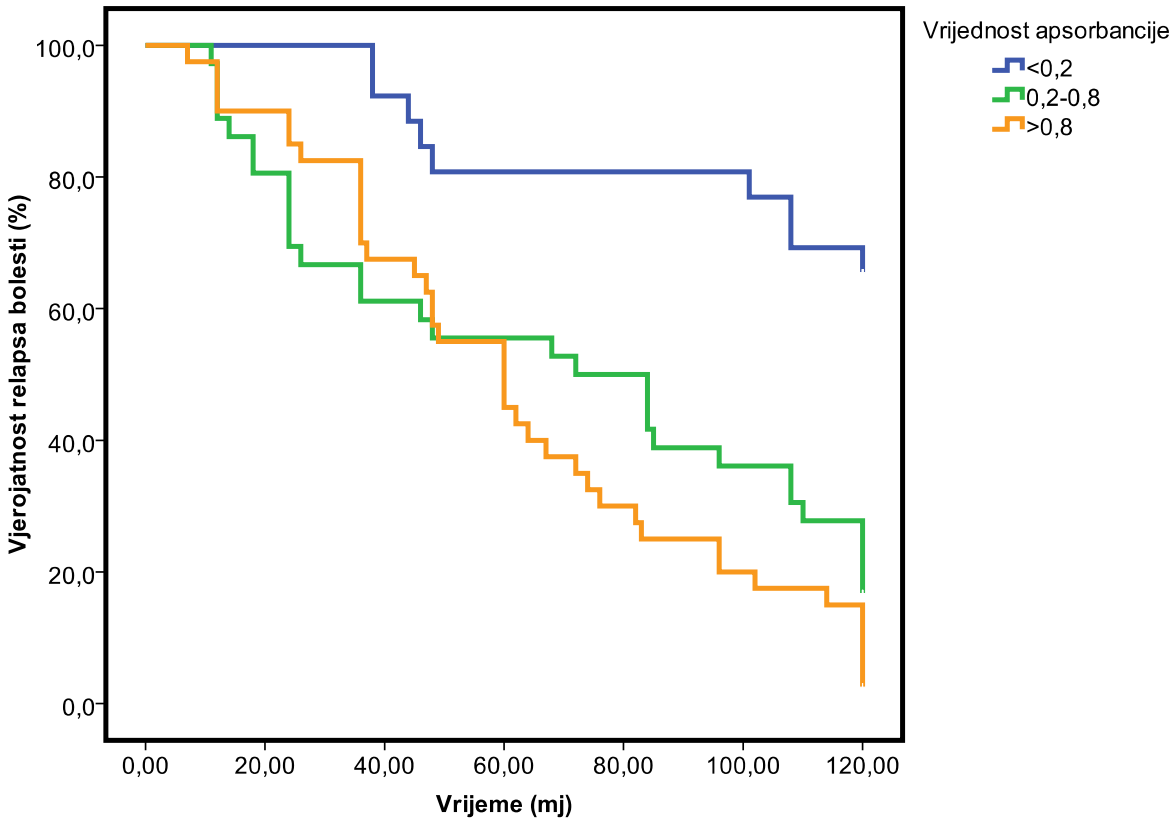
4.6. Kaplan – Meierove krivulje

Za analizu odnosa različitih aktivnosti telomeraze na preživljenje bolesnica korištena je Kaplan – Meierova analiza preživljenja (slika 16). Prosječno vrijeme preživljenja u skupini s aktivnosti telomeraze ispod 0,2 bilo je 103,5 mjeseci, u skupini s aktivnosti telomeraze od 0,2 d0 0,8 bilo je 69 mjeseci, dok je u skupini aktivnosti telomeraze iznad 0,8 bilo 62 mjeseca.



Slika 16. Kaplan – Meierova krivulja preživljenja bolesnica u odnosu na aktivnost telomerase ($p<0,0001$).

Za analizu odnosa aktivnosti telomeraze i broja mjeseci od dijagnoze do ponovne pojave bolesti (relapsa) kao kofaktora na vjerojatnost ponovne pojave bolesti korištena je Kaplan – Meierova analiza (slika 17). Prosječno vrijeme slobodnog intervala od bolesti u skupini s aktivnosti telomeraze ispod 0,2 bilo je 116 mjeseci, u skupini s aktivnosti telomeraze od 0,2 d0 0,8 bilo je 84 mjeseca, dok je u skupini aktivnosti telomeraze iznad 0,8 bilo 24 mjeseca.



Slika 17. Kaplan – Meierova krivulja ponovne pojave bolesti (relapsa) bolesnica u odnosu na aktivnost telomeraze ($p<0,0001$).

4.7. Coxova regresija

Pomoću metode Coxove regresije ispitan je utjecaj dobi bolesnica, veličine tumora,zahvaćenosti limfnih čvorova, stupnja diferencijacije, estrogenskih i progesteronskih receptora, statusa HER-2, Ki-67, katepsina D i aktivnosti telomeraze na preživljenje bolesnica. Utvrđeni su statistički značajni čimbenici na preživljenje bolesnica ($\chi^2= 49,25$; $p<0,001$):

- koncentracija estrogenskih receptora. Bolesnice koje su imale pozitivne koncentracije estrogenskih receptora (>10 fmola/mg

proteina) imale su 69,7% veće izglede preživljenja (CI 95%; 0,17-0,55; p<0,001

- Aktivnost telomeraze. Bolesnice s pozitivnom aktivnosti telomeraze (apsorbancija>0,2) su imale 4,69 puta veći rizik od umiranja nego skupina bolesnica s aktivnosti telomeraze nižom od 0,2 (CI 95%; 2,07-10,54;p<0,001).

Coxova regresija utjecaja dobi bolesnica, veličine tumora,zahvaćenosti limfnih čvorova, stupnja diferencijacije, estrogenskih i progesteronskih receptora, statusa HER-2, Ki-67, katepsina D i aktivnosti telomeraze na ponovnu pojavu bolesti pokazala je utjecaj slijedećih čimbenika:

- koncentracija estrogenskih receptora. Ukoliko je bolesnica imala pozitivnu koncentracije estrogenskih receptora (>10 fmola/mg proteina) imala je 68,7% veće izglede da neće imati relaps bolesti (CI95%;0,18-0,55;p<0,001).
- Aktivnost telomeraze. Bolesnice s pozitivnom aktivnosti telomeraze (apsorbancija>0,2) su imale 4,82 puta veći rizik od pojave relapsa bolesti nego skupina bolesnica s aktivnosti telomeraze nižom od 0,2 (CI 95%; 2,40-10,39;p<0,001).

4.8. Utjecaj pojedinih čimbenika na preživljenje bolesnica i relaps bolesti

Analizom utjecaja pojedinih čimbenika između skupine bolesnica s relapsom i bez utvrđena je statistički značajna povezanost u broju zahvaćenih limfnih čvorova, koncentraciji estrogenskog receptora,

učestalosti pozitivnog HER-2, broju mjeseci od dijagnoze do relaps, broju preživjelih mjeseci kao i aktivnosti telomeraze.

U tablici 6. prikazane su vrijednosti pojedinih čimbenika u odnosu na relaps bolesti. Također su prikazane vrijednosti testova razlike između varijabli i statistička značajnost.

Tablica 6. Prikaz vrijednosti čimbenika u odnosu na relaps bolesti

	Relaps bolesti		Statistika
	Ne (n=24)	Da (n=78)	p
Godine bolesnice	55,5 ± 12,43	56,65 ± 13,24	0,96
Broj zahvaćenih limfnih čvorova	**0 (0 - 4)**	**1 (0 - 16)**	**0,001**
Histološki gradus	1,83 ± 0,82	2,18 ± 0,8	0,068
Koncentracija estrogenskog receptora (fmol/mg)	65 (0 - 222)	10 (0 - 358)	**<0,001**
Koncentracija progesteronskog receptora (fmol/mg)	7,05 (0 - 248)	24,5 (0 - 620)	0,11
Učestalost pozitivnog HER 2	**0,63 ± 0,92**	**1,24 ± 1,32**	**0,013**
Vrijednost proliferacijskog markera (%)	8 (1 - 60)	15 (1 - 80)	0,13
Veličina tumora (cm)	2,05 (1 - 8)	2,5 (0,3 - 9)	0,78
Slobodni interval od bolesti	**0**	**24 (3 - 108)**	**<0,001**
Broj preživljenih mjeseci	**120**	**61,71 ± 36,75**	**<0,001**
Koncentracija katepsina (pmol/mg)	39,33 ± 20,58	44,88 ± 19,25	0,227
Vrijednost apsorbancije	**0,13 (0,21 – 1,36)**	**0,81 (0,03 – 3,46)**	**<0,001**

*Studentov t-test, † Mann - Whitneyev test

Analizom utjecaja pojedinih čimbenika između skupine bolesnica koje su umrle i one koje nisu utvrđena je statistički značajna razlika u broju zahvaćenih limfnih čvorova, koncentraciji estrogenskog receptora, učestalosti pozitivnog HER-2, broju mjeseci od dijagnoze do relaps, broju preživjelih mjeseci kao i aktivnosti telomeraze.

	Preživjele 120 mjeseci (n=34)	Nisu preživjele 120 mjeseci (n=68)	Statistika
			p
Godine bolesnice	56,382 ± 12,412	56,735 ± 13,361	0,898
Broj zahvaćenih limfnih čvorova	**0 (0-8)**	**0 (0 -16)**	**0,048**
Histološki gradus	1,941 ± 0,814	2,177 ± 0,809	0,17
Koncentracija estrogenskog receptora (fmol/mg)	**57 (0-222)**	**8,5 (0-358)**	**p<0,001**
Koncentracija progesteronskog receptora (fmol/mg)	16,5 (0-309)	23,5 (0-620)	0,533
Učestalost pozitivnog HER 2	**0,588 ± 0,925**	**1,353 ± 1,336**	**0,001**
Vrijednost proliferacijskog markera (%)	8 (1-80)	14,5 (1-70)	0,365
Veličina tumora (cm)	2,15 (0,4-8)	2,5 (0,3-9)	0,333
Slobodni interval od bolesti	**0 (0 -104)**	**24 (3 – 108)**	**<0,001**
Broj preživljenih mjeseci	**120 ± 0**	**53,1471 ± 31,158**	**<0,001**
Koncentracija katepsina (pmol/mg)	41,177 ± 19,08	44,779 ± 19,903	0,384
Aktivnost telomeraze (vrijednost apsorbancije)	**0,186 (0,021-0,923)**	**0,806 (0,025-3,459)**	**<0,001**

Tablica 7. Prikaz vrijednosti čimbenika u odnosu na preživljenje.

*Studentov t-test, † Mann - Whitneyev test

U tablici 7. su prikazane vrijednosti ispitivanih čimbenika u istraživanju. Prikazane su srednjom vrijednošću i standardnom devijacijom i medijanom te najnižom i najvišom vrijednošću, ovisno o njihovoj normalnosti raspodjele.

4.9. Binarna logistička regresija

Binarna logistička regresija je učinjena kako bi se istražio utjecaj različitih čimbenika na preživljenje bolesnice (tj. činjenicu je li bolesnica preživjela 120 mjeseci od trenutka postavljanja bolesti ili nije) . Zavisna varijabla je bilo stanje bolesnice je li umrla ili ne, a nezavisne varijable su bile koncentracija estrogenskih i progesteronskih receptora, učestalost pozitivnog HER 2, učestalost pozitivnog proliferacijskog markera Ki67, koncentracija katepsina D i aktivnost telomeraze. Nezavisne varijable su preuređene na način da se ispitivano svojstvo smatralo negativnim odnosno pozitivnim, ovisno o koncentraciji ili aktivnosti ispitivanog svojstva. Korišteni model je imao vrijednost testa χ^2= 38,742; n=102; p<0,001. Pojedinačno, statistički značajnog utjecaja na činjenicu je li bolesnica umrla ili nije imale su koncentracija estrogenskih receptora i aktivnost telomeraze (tablica 8).

Tablica 8. Tablični prikaz utjecaja pojedinih čimbenika na preživljenje bolesnice.

	Koeficijent B	Standardna pogreška	Vrijednost Waldovog testa	Stupnjevi slobode	p vrijednost	Omjer izgleda
Pozitivna koncentracija estrogenskih receptora	**-2,115**	**0,727**	**8,474**	**1**	**0,004**	**0,121**
Pozitivna koncentracija progesteronskih receptora	0,761	0,534	2,028	1	0,154	2,140
Pozitivan HER 2	0,956	0,820	1,359	1	0,244	2,602
Pozitivan proliferacijski marker Ki 67	0,148	0,529	0,079	1	0,779	1,160
Pozitivan katepsin D	-0,047	0,547	0,007	1	0,931	0,954
Pozitivna aktivnost telomeraze	**1,910**	**0,581**	**10,816**	**1**	**0,001**	**6,756**

U tablici 8 je vidljivo kako su bolesnice koje su imale pozitivne estrogenske receptore (≥10 fmol/mg) imale 87,9% veće izglede preživljenja nego li bolesnice s vrijednošću estrogenskih receptora <10 fmol/mg. Također se vidi kako su bolesnice s aktivnošću telomeraze ≥0,2 imale 6,76 puta veću vjerojatnost da će umrijeti u odnosu na bolesnice čija je aktivnost telomeraze bila manja od 0,2.

Binarna logistička regresija je učinjena i kako bi se istražio utjecaj različitih čimbenika na pojavu relapsa bolesti (tj. činjenice je li bolesnica imala relaps bolesti ili nije). Zavisna varijabla je bilo stanje bolesnice je li imala ralaps bolesti ili ne, a nezavisne varijable koncentracija estrogenskih i progesteronskih receptora, učestalost pozitivnog HER 2, učestalost pozitivnog proliferacijskog markera Ki67, koncentracija katepsina D i aktivnost telomeraze. Nezavisne varijable su preuređene na način da se ispitivano svojstvo smatralo negativnim odnosno pozitivnim, ovisno o koncentraciji ili aktivnosti ispitivanog svojstva. Korišteni model je imao vrijednost testa χ^2=48,321; n=102; p<0,001. Pojedinačno, statistički značajnog utjecaja na činjenicu je li bolesnica imala relaps ili nije imale su koncentracija estrogenskih receptora, koncentracija progesteronskih receptora i aktivnost telomeraze (tablica 9).

Tablica 9. Tablični prikaz utjecaja pojedinih čimbenika na pojavu relapsa bolesti.

	Koeficijent B	Standardna pogreška	Vrijednost Waldovog testa	Stupnjevi slobode	p vrijednost	Omjer izgleda
Pozitivna koncentracija estrogenskih receptora	**-2,030**	**1,005**	**4,081**	**1**	**0,043**	**0,131**
Pozitivna koncentracija progesteronskih receptora	**1,500**	**0,670**	**5,010**	**1**	**0,025**	**4,481**

Pozitivan HER 2	,919	1,149	0,640	1	0,424	2,506
Pozitivan proliferacijski marker Ki 67	1,091	0,672	2,638	1	0,104	2,977
Pozitivan katepsin D	0,194	0,704	0,076	1	0,783	1,214
Pozitivna aktivnost telomeraze	**2,902**	**0,679**	**18,279**	**1**	**<0,001**	**18,211**

U tablici 9 vidljivo je kako su bolesnice koje su imale pozitivne estrogenske receptore (≥10 fmol/mg) imale 86,9% veće izglede da neće imati relaps bolesti nego li bolesnice s vrijednošću estrogenskih receptora <10 fmol/mg. Bolesnice s pozitivnim vrijednostima progesteronskih receptora (≥20 fmol/mg) imale su 4,48 puta veću vjerojatnost da će imati relaps bolesti u odnosu na bolesnice kojima je vrijednost progesteronskih receptora bila manja od 20 fmol/mg.

Također se vidi kako su bolesnice s aktivnošću telomeraze ≥0,2 imale 18,21 puta veću vjerojatnost da će imati relaps bolesti u odnosu na bolesnice čija je aktivnost telomeraze bila manja od 0,2.

4. RASPRAVA

Rak dojke je najčešći zloćudni tumor u žena i incidencija mu je u stalnom porastu. To je višestruki proces karakteriziran multiplim genskim promjenama u epitelnim stanicama. Epitelni karcinomi dojke prolaze kroz seriju morfološki prepoznatljivih preneoplastičnih lezija kao što su epitelna hiperplazija, atipična hiperplazija, neinvazivni karcinom. Invazivni karcinomi mogu nastati iz preneoplastičnih lezija, ali i neovisno o njima. Za uspješno liječenje raka dojke najvažnija je rana dijagnostika, te kako predvidjeti na osnovu kliničke klasifikacije i morfoloških osobina tumora, njegovo daljnje ponašanje.

U praksi se koriste prognostički čimbenici, koji uključuju, veličinu tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova u pazuhu, histološki gradus, te status hormonskih receptora i HER-2.

No, vrlo često niti kombinacija navedenih prognostičkih čimbenika ne daje sigurnost i odgovor o potrebi provođenja odgovarajuće terapije. 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.

Telomeraza je ribonukleoproteinski enzim koji sintetizira telomere poslije svake stanične diobe i na taj način održava dužinu i stabilnost kromosoma. Aktivnost telomeraze prisutna je u

reproduktivnim stanicama, tkivima s brzom proliferacijom stanica, besmrtnim stanicama i stanicama karcinoma, ali nije prisutna u normalno diferenciranim somatskim stanicama. Telomerazna aktivnost u malignoj

progresiji, vjerojatno odgađa odlazak stanice u mirovanje, što ima za posljedicu nakupljanje multiplih genskih promjena u malignoj stanici (119). Aktivnost telomeraze prisutna je u više, od 80% malignih tumora različite kolokalizacije kao što su pluća, dojka, pankreas, žučni vodovi, želudac i drugi.

Aktivnost telomeraze prisutna je u 67-95% karcinoma dojke. Hiyama i sur. su našli aktivnost telomeraze u 130 (93%) od 140 karcinoma dojke dok su Roos i sur. potvrdili aktivnost telomeraze u 85% tumora u analizi 106 karcinoma dojki (120,121). Na relativno malom broju karcinoma dojke (24) Mokbel i sur. su u studiji iz 1999. godine utvrdili aktivnost telomeraze u 16 tumora (67%), a u studiji iz 2000 godine u 47 karcinoma dojke utvrdili su pozitivnu telomerazu u 72% tumora (34 tumora) (122, 123). U evaluacijskoj studiji Baykala i sur. koji su analizirali literaturne podatke, aktivnost telomeraze bila je pozitivna u 13-100% karcinoma dojke (97). Ovi rezultati pokazuju da većina malignih tumora dojke sadrži stanice koje imaju svojstvo besmrtnosti vezanu uz aktivaciju telomeraze (120).

Različiti rezultati glede aktivnosti telomeraze u tumorima nastaju zbog različitosti u sadržaju staničnih frakcija i različitim stupnjevima proliferacije epitelnih stanica. U vlastitom radu istraživana je prisutnost aktivnosti telomeraze u tkivu 102 bolesnice s rakom dojke i u tkivu 40 bolesnica s benignim lezijama dojke (20 fibrocističnih

lezija i 20 fibroadenoma), te prisutnost telomeraze u tkivu dojke 20 zdravih ispitanica. Dobiveni rezultati korelirani su s različitim kliničkim, patohistološkim i biokemijskim pokazateljima te ponovnom pojavom bolesti i preživljenjem bolesnica praćenih 10 godina.

U ovoj studij kao i u većini drugih studija (122, 123) , 77 malignih tumora dojke (75,49%) bilo je pozitivno na prisutnost aktivnosti telomeraze. Prema nekim autorima za tumorski rast potrebna je kritična duljina telomera, odnosno minimalan broj telomeričkih ponavljanja na svakome kromosomu. Pretpostavka je , da tumori koji nemaju prisutnu aktivnost telomeraze , telomere produžuju alternativnim putevima (procesom homologne rekombinacije ili intratelomeričke duplikacije DNA sekvence) i tako održavaju proliferaciju i besmrtnost stanice (124,125).

Temeljem vlastitog istraživanja nije nađena prisutnost aktivnosti telomeraze u zdravom tkivu dojke, fibrocističnim lezijama i fibroadenomima.

U nekim studijama ustanovljena je prisutnost aktivnosti telomeraze u fibroadenomima. U analizi Hiyama i sur. nađena je aktivnost u 45% fibradenoma 9/ 20 ispitivanih, a u studiji Sugina i sur. u jednom fibroadenomu od ispitivanih 15 nađena aktivnost telomeraze (120,126). Fibroadenom u studiji Sugina i sur. bio je velik 8 cm i bolesnica je imala 15 godina. Aktivnost telomeraze nije nađena u 60 fibroadenoma u studiji Mokbella i sur. (123), što je u skladu s vlastitim istraživanjem.

Fibroadenomi su benigne neoplazme dojke koje se najčešće dijagnosticiraju u žena između 20 i 30 godina. Smatra se da je aktivnost telomeraze u fibradenomu posljedica proliferacije matičnih epitelnih stanica (122,126).

Neki autori su utvrdili malu prisutnost aktivnosti telomeraze u fibrocističnim lezijama i zdravom tkivu dojke, što može biti fiziološka posljedica prisutnosti aktivnosti telomeraze u proliferaciji regenerativnih stanica dojke (127). Negativna aktivnost telomeraze nađena je analizama

Hiyama i sur. i Mokbell i sur., što je utvrđeno i u vlastitom istraživanju (120,122,123).

Rezultati većine studija također su pokazali da aktivnost telomeraze nije prisutna u zdravom tkivu dojke (120,128). Rezultati vlastitog istraživanja su u skladu s tim istraživanjima. Međutim, Yashima i sur. utvrdili su malu prisutnost aktivnosti telomeraze u zdravom tkivu (127). Pretpostavili su da je ova aktivnost vjerojatno rezultat fiziološke prisutnosti telomeraze u proliferativno-regeneracijskim stanicama dojke.

U vlastitoj , kao i u nekim drugim studijama nije ustanovljena povezanost između dobi bolesnica i aktivnosti telomeraze u bolesnica s karcinomom dojke (96,112, 128, 129) . Hyama i sur su našli 100% prisutnost aktivnosti telomeraze u karcinomima dojke bolesnica koje su u premenopauzi , te 91% bolesnica koje su postmenopauzi (120). Većina bolesnica u ovom radu bile su u dobi iznad 50 godina (66 %), pa se pretpostavlja da je i količina epitelnih stanica u proliferaciji mala i aktivnost telomeraze vjerojatno potječe od tumorskih stanica.

Veličina tumora i aktivnost telomeraze prema ispitivanjima nekih studija nije bila povezana (96,126,129). Prema drugim autorima aktivnost telomeraze i veličina tumora bilu su međusobno povezani (92,119, 120). Temeljem vlastitih rezultata potvrđeni su rezultati Umbrichta i sur., Hiyama i sur. i Hoos i sur.(92,119,120). Utvrđena je pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i veličine tumora. Vrijednost apsorbancije telomeraze povećavala se s veličinom tumora.

Temeljem vlastitog istraživanja ustanovljena je pozitivna povezanost aktivnosti telomeraze s postojanjem metastaza u limfnim čvorovima pazuha, što je veći broj pozitivnih limfnih čvorova, veća je i vrijednost apsorbancije telomeraze u tumorima. Dobiveni rezultati u skladu su s

rezultatima Hoos i sur. i nekih drugih autora (92,120,122,128). Sugino i sur. kao i neka druga istraživanja nisu pokazala povezanost između postojanja metastaza u limfnim čvorovima pazuha i aktivnosti telomeraze (96, 126,129).

Aktivnost telomeraze u studijama Mokbell i sur. i Hiyame i sur. korelira s lošijim (višim) histološkim gradusom tumora (120,121). Vlastiti rezultati su pokazali povezanost aktivnosti telomeraze i višeg histološkog gradusa tumora, što je u skladu s istraživanjima gore spomenutih autora. Međutim neka istraživanja nisu pokazala povezanost aktivnosti telomeraze i histološkog gradusa (96,126,129).

U zadnjih tridestak godina poznato je da su estrogenski i progesteronski receptori dobar prognostički i prediktivni čimbenik u bolesnica s karcinomom dojke. Bolesnice koje imaju pozitivne

estrogenske i progesteronske receptore imaju manji rizik od ponovne pojave bolesti i dulje preživljenje. U većini studija nije nađena povezanost između statusa estrogenskih i progesteronskih receptora i aktivnosti telomeraze (96,112, 120,130). U ovom istraživanju, također, nije pronađena korelacija između aktivnosti telomeraze i statusa progesteronskih receptora, dok je utvrđena negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i statusa estrogenskih receptora. Broj bolesnica koje imaju pozitivnu aktivnost telomeraze veći je u skupini onih koje imaju negativne estrogenske receptore. Ovi rezultati slažu se s rezultatima Kalogeraki-ja i sur. Studija Roos-a pokazala je korelaciju aktivnosti telomeraze i negativnih estrogenskih i progesteronskih receptora. (121,131). U vlastitoj analizi koekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora u karcinomima dojke, pokazano je da su najviše vrijednosti

apsorbancije telomeraze prisutne u tumorima u kojima su oba receptora bila negativna. U tumorima u kojima su bila pozitivna oba receptora ili je bio pozitivan samo estrogenski receptor utvrđene su statistički značajne niže vrijednosti apsorbancije aktivnosti telomeraze. Pretraživanjem literature o koekspresiji steroidnih receptora i povezanosti aktivnosti telomeraze, pronađena je samo jedna studija. Bednarek i sur. su analizirali koekspresiju steroidnih receptora i aktivnosti telomeraze u 104 karcinoma dojke (112). Oni nisu pronašli povezanost između estrogenskih i progesteronskih receptora i aktivnosti telomeraze u tumorima, niti su pronašli povezanost između različite koekspresije steroidnih receptora i aktivnosti telomeraze.

Poznato je da estrogen i estrogenski receptori sudjeluju u regulaciju transkripcije katalitičke podjedinice (hTERT) telomeraze.
Aktivirani estrogenski receptori α i β dinamički se vežu na promotorska mjesta na hTERT gena i sudjeluju u remodeliranju kromatina koji korelira s aktivnošću genske transkripcije. Najnovija istraživanja su pokazala da je za remodeliranje kromatina potrebna i aktivirana endotelna NO-sintetaza (eng. Nitric oxide), koja se zajedno s aktiviranim estrogenskim receptorom veže na promotorsko mjesto na hTERT gena. (132,133). U zloćudnim stanicama javljaju se brojni poremećaji genske izraženosti, pa tako i gubitak estrogenskih i progesteronskih receptora. Moguće je da je u malignim tumorima dojke s negativnim estrogenskim receptorima, izmjenjena i regulacija aktivnosti telomeaze. Pretpostavlja se da bolesnice s negativnim estrogenskim receptorom i visokom aktivnošću telomeraze predstavljaju skupinu s visokim rizikom napredovanja bolesti.

Postoji vrlo malo radova o povezanosti aktivnosti telomeraze i HER-2 u karcinomu dojke. U vlastitom istraživanju pronađena je povezanost između aktivnosti telomeraze i prisutnosti HER-2 kao i u radu Kalogeraka i sur (131) . U skupini bolesnica s pozitivnim HER-2 bilo je više bolesnica koje su imale prisutnu višu aktivnost telomeraze. Poznato je da HER-2 inducira transkripciju katalitičke podjedinice telomeraze preko ERK MAP kinaze (eng. ERK MAP, extracellular signal regulted kinase, mitogen activated protein kinase). U analizama Goueli i sur.,ali i nekih drugi autora u uzorcima karcinoma dojke nađena je velika povezanost između prisutnosti
hTERT-a i HER-2 (134). Povezanost aktivnosti telomeraze i HER-2 stausa pronađena je i u staničnim linijama karcinoma dojke. Navedeni autori su pretpostavili da su ti tumori agresivniji i povezani s lošijom prognozom (134) .

Vlastito istraživanje analiziralo je i povezanost koekspresije steroidnih receptora i HER-2 statusa s aktivnosti telomeraze u karcinomima dojke. Rezultati nisu pokazali statistički značajnu povezanost aktivnosti telomeraze i različite koekspresije steroidnih receptora i HER-2 stausa. Međutim iz ovih rezultata vidljivo je da su više vrijednosti apsorbancije prisutne u skupini u kojima je koekspresija sva tri receptora negativna odnosno u trostruko negativnim tumorima, ali isto tako i u skupini u kojoj je pozitivan samo HER-2. Niske vrijednosti telomeraze prisutne su u skupinama koekspresije, ako je pozitivan estrogenski receptor bez obzira na prisutnost odnosno odsutnost druga dva receptora. U dostupnoj literaturi nisu pronađene slične studije koje su istraživale povezanost telomerazne aktivnosti i koekspresije ova tri receptora.

Mnoga istraživanja su potvrdila da je proliferacija dominantno obilježje multigenetskih promjena u karcinomu dojke, te korelira s

prognozom bolesti. Korištenjem protutijela protiv Ki-67 , moguće je točno pokazati udio proliferacijskih stanica u karcinomu dojke (44 , 135). U meta analizi Azambuja i sur. na 12 155 bolesnica s karcinomom dojke pokazano je da visoko pozitivne bolesnice na Ki-67 imaju veliki rizik relapsa bolesti i kraće preživljenje (136). U vlastitom istraživanju je nađena povezanost između povećanog prisustva Ki-67 i aktivnosti telomeraze u karcinomima dojke. Rezultati su u skladu s malobrojnim istraživanjima korelacije Ki-67 i aktivnosti telomeraze (114, 121).

Prekomjena ekspresija katepsina D korelira s metastatskim potencijalom tumora. Katepsin D razgrađuje bazalnu membranu oko primarnog tumora i proteinske substrate, što doprinosi invaziji tumora i metastaziranju. Zadnji niz godina ispituje se povezanost prisutnosti katepsina D i prisutnosti odnosno odsutnosti metastaza u limfnim čvorovima. Rezultati nisu jednoznačni. Aziz i sur. su pokazali da nema povezanosti između katepsina D i metastaza u limfnim čvorovima s preživljenjem bolesnica i relapsom bolesti (137). Drugi autori su pokazali da povišena koncentracija katepsina D u bolesnica bez metastaza u limfnim čvorovima znači lošiju prognozu bolesti, neovisnu o drugim kliničko patološkim pokazateljima (138). Istraživanja povezanosti katepsina D i aktivnosti telomeraze u karcinoma dojke malobrojna su. U vlastitoj studiji nađena je povezanost između prisutnosti aktivnosti telomeraze i povišene koncentracije katepsina D u karcinomima dojke. Međutim, Clark i sur. u ispitivanju 150 karcinoma dojke nisu našli povezanost aktivnosti telomeraze i katepsina D (128).

Nekoliko studija je ispitivalo ulogu telomeraze kao prognostičkog čimbenika. Clark i sur. analizirali su 400 uzoraka primarnog karcinoma dojke u bolesnica koje su imale prisutne metastaze u limfnim čvorovima pazuha. Rezultati su pokazali povezanost između aktivnosti telomeraze i

preživljenja bolesnica te malu povezanost između ranijeg relapsa bolesti i aktivnosti telomeraze koja nije bila statistički značajna (128). Istraživanja ove studije

potvrđene su studijama Smickova i Kimura (139-141). Analiza s mikropostrojem 611 karcinoma dojke, pokazuje da su povećane izraženosti telomeraznih komponenti hTERT i hTR povezani s kraćim preživljenjem i ranijim relapsom bolesti (142). Međutim Carey i sur. nisu našli povezanost između aktivnosti telomeraze, relapsa bolesti i preživljenja (129). Analizirali su 203 karcinoma dojke s primarnim tumorom koje nisu imale metastaze u limfnim čvorovima. Autori su analizirali razlike u rezultatima u različitim studijama u pogledu povezanosti aktivnosti telomeraze, relapsa bolesti i preživljenja. Za razliku od njihove studije u drugim studijama analizirane su bolesnice s metastazama u limfnim čvorovima koje imaju lošiju prognozu bolesti i postojale su značajne razlike u uzorku tkiva i količini tkiva. Tako su oni koristili mikrorezove, a Clark i sur. usitnjeno tkivo tumora dojke (126), što je oko 10 puta više tkiva (127). Razlike su moguće i zbog prisutnosti nekroze i stanica koje nisu tumorske, a koje ne izražavaju aktivnost telomeraze.

U vlastitoj studiji u kojoj su bolesnice praćene 10 godina, utvrđena je visoka negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i broja mjeseci od trenutka postavljanja dijagnoze do ponovne pojave bolesti, ako je prisutna viša aktivnost telomeraze manji je broj mjeseci od trenutka postavljanja dijagnoze do ponavne pojave bolesti (relapsa) Kada su bolesnice podijeljene u tri skupine prema aktivnosti telomeraze (negativnu,umjerenu i visoku aktivnost), dobiveno je da se vrijeme do ponovne pojave bolesti skraćuje u svakoj slijedećoj skupini.

Također je u 10 godišnjem praćenju, utvrđena srednja negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i broja preživjelih mjeseci

od trenutka postavljanja dijagnoze. Preživljenje bolesnica bilo je najmanje u skupini u kojoj je prisutnost telomeraze bila visoka, dok su bolesnice u skupini umjerene izraženosti telomeraze imale kraće preživljenje u odnosu na bolesnice s negativnom prisutnosti telomeraze.

Coxova regresija, pokazala je da na preživljenje bolesnica statistički značajni utjecaj imaju koncentracija estrogenskih receptora i aktivnost telomeraze. Bolesnice koje su imale više koncentracije estrogenskih receptora i niže aktivnosti telomeraze imale su veće preživljenje.

Coxovom regresijom za relaps bolesti pokazan je statistički značajan utjecaj koncentracije estrogenskih receptora i aktivnosti telomeraze. Bolesnice koje su imale niže aktivnosti telomeraze i više koncentracije estrogenskih receptora imale su duže vrijeme do ponovne pojave bolesti.

Binarna logistička regresija za preživljenje bolesnica pokazala je utjecaj koncentracije estrogenskih receptora i aktivnosti telomeraze. U skupini bolesnica koje su umrle aktivnosti telomeraze su pozitivne, dok su koncentracije estrogenskih receptora bile negativne.

Binarnom logističkom regresijom za relaps bolesti pokazan je utjecaj koncentracije estrogenskih i progesteronskih receptora, te aktivnosti telomeraze. Bolesnice koje su imale relaps bolesti imale su pozitivnu aktivnosti telomeraze i pozitivne koncentracije progesteronskih receptora te negativne koncentracije estrogenskih receptora.

Multivarijatne analize drugih autora pokazale su neujednačene rezultate. Studija Clarka i sur. pokazala je povezanost kraćeg preživljenja bolesnica i zahvaćenosti većeg broja limfnih čvorova, negativnih

estrogenskih receptora i više aktivnosti telomeraze, a povezanost više aktivnosti telomeraze i kraćeg preživljenja potvrđena je i u multivarijatnoj studiji Hiyame i sur (118,126) . Međutim, u multivarijatnoj studiji Carey i sur. nađena je povezanost s kraćim preživljenjem i pozitivnim limfnim čvorovima, ali ne i povezanost s aktivnosti telomeraze niti drugim patohistološkim pokazateljima (127). U multivarijatnoj analizi Clarka i sur. utvrđene su također povezanosti između ponovne pojave bolesti i većeg broja zahvaćenih limfnih čvorova, negativnih estrogenskih receptora i viših vrijednosti telomeraze (118). Carey i sur. u multivarijatnoj analizi nisu dobili povezanost ponovne pojave bolesti s višim vrijednostima telomeraze, već samo povezanost s većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova i niže koncentracije estrogenskih receptora (124).
U analizi utjecaja vrijednosti pojedinih patohistoloških čimbenika na kraće preživljenje, utvrđena je povezanost s pozitivnim limfnim čvorovima, nižom koncentracijom estrogenskih receptora, pozitivnim HER-2 i pozitivnom aktivnosti telomeraze.

Vlastita analiza utjecaja pojedinih patohistoloških čimbenika na ponovnu pojavu bolesti u bolesnica s karcinomom dojke pokazala je povezanost s pozitivnim limfnim čvorovima pazuha, nižim koncentracijama estrogenskog receptora, pozitivnim HER-2 i višim vrijednostima aktivnosti telomeraze.

Rezultati ovog rada su pokazali da je aktivnost telomeraze u karcinomu dojke loš prognostički pokazatelj. Vlastiti rezultati kao i rezultati drugih studija upućuju na daljnju potrebu istraživanja uloge telomeraze u karcinomu dojke. U određivanju aktivnosti telomeraze u karcinomu dojke potrebno je uskladiti kriterije u pripremi tkiva kao i

metoda u određivanju aktivnosti telomeraze. U ovom radu nije nađena aktivnost telomeraze u benignim lezijama dojke kao ni u zdravom tkivu dojke, što može predstavljati dijagnostičku važnost telomeraze.

U vlstitom istraživanju nađena je pozitivna povezanost telomerazne aktivnosti i veličine tumora, pozitivnih limfnih čvorova aksile, višeg histološkog gradusa, pozitivnog HER-2,većeg postotka Ki-67 i viših vrijednosti katepsina D.

Negativna povezanost nađena je između aktivnosti telomeraze i vrijednosti estrogenskih receptora.

Praćenje bolesnica deset godina pokazalo ja da bolesnice koje imaju pozitivnu aktivnost telomeraze imaju brži relaps bolesti i kraće preživljenje ali isto tako da se vrijeme do ponovne pojave bolesti i preživljenje skraćuju s povećanjem aktivnosti telomeraze.

Multivarijatna analiza potvrdila je povezanost viših vrijednosti aktivnosti telomeraze i ponovne pojave bolesti te kraće preživljenje bolesnica s karcinomom dojke.

Zaključno se može ustvrditi da vlastiti rezultati pokazuju povezanost aktivnosti telomeraze u tkivu raka dojke s brojnim negativnim prognostičkim čimbenicima, te kraćim vremenom do
relapsa bolesti i kraćim preživljenjem bolesnica, što sve ukazuje na to da je aktivnost telomeraze negativni prognostički čimbenik u bolesnica s rakom dojke.

Važna su daljnja istraživanja aktivnosti telomeraze u cilju poboljšanja terapije karcinoma dojke, jer inhibicija telomeraze dovodi do smrti i regresije u proliferaciji malignih stanica. hTERT komponenta telomeraze inducira citotoksične T limfocite i može biti tumorski antigen kao i baza za razvoj cijepiva protiv tumora.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem vlastitog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1.) Aktivnost telomeraze bila je prisutna u 77 karcinoma dojke (75,49%).

2.) Aktivnost telomeraze bila je negativna u zdravom tkivu, te u benignim promjenama dojke (fibrocističnim promjenama i fibroadenomima) .

3.) Ustanovljena je pozitivna korelacija između aktivnosti telomeraze i veličine tumora, statusa limfnih čvorova pazuha, histološkog gradusa, HER-2, Ki-67 i katepsina D.

4.) Utvrđena je negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i estrogenskih receptora.

5.) Nije nađena statistički značajna povezanost između aktivnosti telomeraze i dobi bolesnica te progesteronskih receptora.

6.) Utvrđena je negativna povezanost između aktivnosti telomeraze i relapsa bolesti u 10 godina praćenja bolesnica, kao i aktivnosti telomeraze i 10. godišnjeg preživljenja.

7.) U našem istraživanju nekoliko elemenata upućuje na povezanost aktivnosti telomeraze i agresivnijeg fenotipa tumora:

- u skupini bolesnica koje imaju tumore veće od 2 cm više su aktivnosti telomeraze u tumoru,

- u skupini karcinom s pozitivnim limfnim čvorovima više su aktivnosti telomeraze u tumoru,
- u skupini slabo diferenciranih tumora više su aktivnosti telomeraze u tumoru,
- u skupini tumora koje imaju ekspresiju HER-2 više su aktivnosti telomeraze u tumoru,
- u skupini tumora koje imaju prisutnost Ki-67 više su aktivnosti telomeraze u tumoru,
- u skupini tumora koji imaju negativne estrogenske receptore viša je aktivnost telomeraze u tumoru,
- bolesnice koje imaju više aktivnosti telomeraze imaju raniju pojavu bolesti u 10 godina praćenja,
- preživljenje bolesnica praćeno 10 godina bilo je kraće u bolesnica s višom aktivnosti telomeraze.

8.) U Coxovoj regresiji različitih patohistoloških pokazatelja na preživljenje bolesnica i Binarnoj logističkoj regresiji ispitivanja utjecaja praćenih čimbenika na činjenicu da li je nastupila smrt ili nije pokazano je da su statistički značajni:

- Koncentracija estrogenskih receptora.
- Aktivnost telomeraze.

9.) Coxovom regresijom različitih patohistoloških pokazatelja na ponovnu pojavu bolesti bolesnica pokazano je da su statistički značajni slijedeći parametri:
- Koncentracija estrogenskih receptora.
-Aktivnost telomeraze.

Binarna logistička regresija ispitivanja utjecaja praćenih čimbenika na činjenicu da li je došlo do ponovne pojave

bolesti ili ne, pokazala je statističku značajnost:

-Koncentracija estrogenskih receptora

-koncentracija progesteronskih receptora

-Aktivnost telomerase

10.) Zaključno možemo ustvrditi da naši rezultati pokazuju povezanost aktivnosti telomeraze u tkivu raka dojke s brojnim negativnim prognostičkim čimbenicima, te kraćim vremenom do relapsa bolesti i kraćim preživljenjem bolesnica, što sve ukazuje na to da je aktivnost telomeraze negativni prognostički čimbenik u bolesnica s rakom dojke.

7. SAŽETAK

Rak dojke je heterogena bolest koja obuhvaća brojne biološke entitete sa specifičnim patološkim obilježjima i različitim biološkim ponašanjem. U našem istraživanju željeli smo ispitati prisutnost aktivnosti telomeraze u malignim i benignim bolestima dojke. Telomeraza je ribonukleoproteinski kompleks koji se sastoji od tri podjedinice: katalitičke proteinske podjedinice telomeraza reverzne transkriptaze, telomeraza RNA podjedinice i proteinske podjedinice. Aktivnost telomeraze prisutna je u različitim biološkim procesima kao što su starenje, bolesti matičnih stanica i maligni rast. Analizirali smo aktivnost telomeraze u tkivu 102 karcinoma dojke, 20 fibrocističnih promjena dojke, 20 fibroadenoma i 20 zdravih dojki. Rezultate dobivene TRAP analizom (engl. telomeric repeat amplification protocol) usporedili smo s različitim kliničkopatološkim pokazateljima: dobi bolesnica, veličinom i histološkim gradusom tumora, nalazom limfnih čvorova u pazuhu, vrijednostima steroidnih receptora, HER-2 statusom , nalazom Ki-67 i vrijednostima katepsina D. Također smo analizirali odnos aktivnosti telomeraze i razdoblja do ponovne pojave bolesti, te desetogodišnjeg preživljenja bolesnica s karcinomom dojke. Aktivnost telomeraze bila je prisutna u 77 karcinoma dojke (75,49%), dok je nalaz telomeraze u benignim promjenama i zdravom tkivu bio negativan. Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost između aktivnosti telomeraze i veličine tumora, broja zahvaćenih limfnih čvorova, histološkog gradusa, Ki-67, HER-2 statusa i vrijednosti katepsina D. Negativna povezanost nađena je između aktivnosti telomeraze i statusa estrogenskih receptora. Utvrđeno je da bolesnice koje imaju višu aktivnost telomeaze imaju kraće razdoblje do ponovne pojave

bolesti i kraće desetogodišnje preživljenje u odnosu na bolesnice s nižim ili negativnim vrijednostima. Nije nađena povezanost između aktivnosti telomeraze i dobi bolesnica i statusa progesteronskih receptora. Coxova regresija je pokazala statistički značajan utjecaj koncentracije estrogenskih receptora i aktivnosti telomeraze na desetogodišnje preživljenje i relaps bolesti. Binarna logistička regresija za desetogodišnje preživljenje je pokazala statistički značajan utjecaj koncentracije estrogenskih receptora i aktivnosti telomeraze, a za relaps bolesti statistički značajane koncentracije estrogenskih i progesteronskih receptora, te aktivnosti telomeraze.

8. SUMMARY

Breast cancer is a heterogeneous disease that includes numerous biological entities with specific pathological characteristics and variable biological behavior. In this study we intended to investigate the presence of telomerase activity in malignant and benign breast lesions. Telomerase is a ribonucleoprotein complex. It contains three subunits: catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase, telomerase RNA subunit and protein subunit. Telomerase activity is present in various biological processes like aging, stem cell diseases and malignant growth. We analyzed telomerase activity in 102 breast carcinomas, 20 fibrocystic lesions, 20 fibroadenomas and 20 samples of normal beast tissue. Results obtained by TRAP assay (telomeric repeat amplification protocol) were correlated with various clinicopathologic parameters: patient age, size and histological grade of tumor, axillary lymph node status, steroid receptors, HER-2 status, Ki-67 analysis and Cathepsin D values. We also analyzed relationship between telomerase activity and disease-free survival and relationship with ten-year survival. Telomerase activity was present in 77 breast cancers (75,49%). The analysis of telomerase activity in benign lesions and normal breast tissue was negative. Significant correlation was found between telomerase activity and tumor size, the number of axillary lymph nodes involved, histological grade, Ki-67 analysis, HER-2 status and Cathepsin D values. Negative correlation was found between telomerase activity and status of estrogen receptors. Patients with higher telomerase activity had shorter disease-free survival and shorter ten-year survival than those with lower or negative telomerase activity. No relationship was found between telomerase activity and patient age and progesterone receptor status. Cox regression revealed significant impact of

estrogen receptor status and telomerase activity on ten-year survival and disease-free survival. Binary logisitic regression showed significant impact of estrogen receptor status and telomerase activity on ten-year survival and significant impact of estrogen and progesterone status as well as telomerase activity on disease-free survival.

10. LITERATURA

1. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva F, Makris A, Jordan VC. Early breast cancer. Lancet 2009;373:1463-1479.
2. Cancer Facts and Figures. American Cancer Society 2010, dostupno na http://www.cancer.org, posljednji put pristupljeno 28.02.2010.
3. Registar za rak. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2010, dostupno na http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm, posljednji put pristupljeno 28.02.2010.
4. Andreson WF, Jatoi I, Devesa S.Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI´s SEER program:suggesting a possible link between etiology and outcome. Breast Cancer Res Treat 2005;90:127-132.
5. Cleary MP, Maihle NE. The role of body mass index in the relative rrisk of developing premenopausal versus postmenopausal breast cancer. Proc Soc Exp Biol Med 1997;216:28-43.
6. Anderson WF, Matsuno RK, Sherman ME. Estimating age-specific breast cancer risks:a descriptive tool to identify age interactions. Cancer Causes Control 2007;18:439-447.
7. Dornchek SM, Greenberg A. Breast cancer gene variants: separating the harmful from the harmless. J Clin Invest 2009;119:2895-2897.

8. Palcios J, Robles-Frias MJ, Castilla MA, Lopez-Garcia MA, Benitez J. The molecular pathology of hereditary breast cancer. Pathobiology 2008;75:85-94.
9. Campeau PM, Folkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic aveneus. Hum Genet 2008;124:31-42.
10. Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. N engl J Med 2003;348:2339-2347.
11. Narod SA, Offit K. Prevention and managment of hereditary breast cancer. J Clin Oncol 2005;23:1656-1663.
12. Malkin D, Li FP, Strong LC i sur. Germ line in p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasis. Science 1990;250:1233-1238.
13. Eccles DM. Identification of personal risk of breast cancer: genetics. Breast Cancer Res 2008;10:1-3.
14. Friedrichsen DM, Malone KE, Doody DR, Daling JR, Ostrander EA. Frequency of CHEK 2 mutations in population based, case-control study of breast cancer in young women. Breast Cancer Research 2004;6:R629-R635.
15. Mavaddat N, Dunning AM, Ponder BAJ, Easton DF, Pharoah PD. Common genetic variation in candidate genes and susceptibility to subtypes of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009;18:255-259.
16. Teschendorff AE, Caldas C. The breast cancer somatic muta-ome: tacking the complexity. Breast Cancer Res 2009;11:301-305.

17. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer-the present. Histopathology 2008;52:82-90.
18. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristic, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Res 2007;9:R6.
19. Burstein HJ. The distinctive nature of HER-2 positive breast cancers. N Eng J Med 2005:353;1652-1654.
20. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Puztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer-current status and future directions. Ann Oncol 2009;20:1913-1927.
21. Yamauchi H, Sterns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as predictive factor in breast cancer. J Clin Oncol 2001;19:2334-2356 .
22. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. Breast Cancer Res 2009;11:S11
23. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective oft he last decade. J Pathol 2010;220-263.
24. Seiuwerts AM, Kraan J, Bolt J, Spoel P, Elstradt F, Schutle M, et al. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. J Natl Cancer Inst 2009;10:61-66.

25. Ignatiadis M, Desmedt C, Sotiriou C, Azambuja E, Piccart M. HER-2 as a target for breast cancer therapy. Clin Cancer Res 2009;15:1848-1852.
26. Geyer FC, Marchio C, Reis-Filho JS. The role of molecular analysis in breast cancer. Pathology 2009;41:77-88.
27. Cianfrocca M, Gradishar DO, Gradishar W. New molecular cllassifications of breast cancer. CA Cancer J Clin 2009;59:303 -313.
28. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. J Pathol 2005;205:248-254.
29. Tang P, Wang JW, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same?. Hum Pathol 2008;39:506-513.
30. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. Histopathology 2008;52:108-118.
31. Mansour EG, Ravidin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. Cancer 1994;74:381-400.
32. Jakić-Razumović J, Hlupić Lj, Čorić M i sur. Buduća strategija u dijagnostici i liječenju raka dojke. U: Prpić I, ur. Rak dojke u XXI. Stoljeću. Zbornik radova desetog znanstvenog sastanka „Bolesti dojke“. Zagreb HAZU;2000, str.108-115.
33. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi V. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Cancer 1978;41:1170-1178.

34. Gamulin S. Temeljna načela sistemskog liječenja raka dojke. U; Fajdić.,ur. Bolesti dojke . Zagreb: Nakladni zavod Globus, Požega: Opća županijska bolnica Požega;1998, str.329-333.
35. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosing in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer 1957;11:359-377.
36. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostik factor in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term followop. Histopathology 1991;19:403-410.
37. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijin JG, Sahmoud T; ATAC Trialists Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet 2002;359:2131-2139.
38. Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor negative breast carcinoma. Arch Pathol Lab Med 2002;126:325-330.
39. Gamulin S. Uloga hormona u dijagnostici raka dojke. U: Fajdić J,ur. Suvremena dijagnostika bolesti dojke. Zagreb: Medicinska naklada; 2001, str.201-209.
40. Diest PJV, Wall EVD, Baak JPA. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. J Clin Pathol 2004;57:675-681.

41. Beresford MJ, Wilson GD, Makris A. Measuring proliferation in breast cancer: practicalities and applications. Breast Cancer Res 2006;8:216-227.
42. Azambuja ED, Cardoso F, Castro jr GD i sur. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. B J Cancer 2007;96:1504-1513.
43. Jensen EV, Cheng G, Palmieri C i sur. Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer. PNAS 2001;98:15197-15202.
44. Trihia H, Murray S, Price K i sur. Ki-67 expression in breast carcinoma. Cancer 2003;97:1321-1331.
45. Meyer JS, Province M. Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: prognostic power independenet of stage, estrogen and progesteron receptors. Breast Cancer Res Treat 1988;12:191-204.
46. Clark GM, Dressler LG, Owens MA i sur. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. N Engl J Med 1989;320:627-633
47. Zhu L, Li YF, Chen WG i sur. HER2 and topoisomerase IIalpha: possible predictors of response to neoadjuvant chemoteraphy for breast cancer patients. Chin Med J (Eng) 2008;121:1965 -1968.
48. Brujan I, Margaritescu C, Simeonascu C i sur. Cathepsin-D expression in breast lesion:on imunohistochemikal study. Rom J Morpholog embryol 2009;50:31-39.

49. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Wang CS, Bernard P, Blanchette C. Cathepsin D expression by cancer and stromal cells in breast cancer : an immunohistochemical study of 1348 cases. Breast Cancer Res Treat 1999;55:137-147.
50. Azis S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rohbar M. Imunohistochemical cathepsin-D expression in beast cancer: correlation with established pathological parameters and survival. Pathol Res Proct 2001;197:551-557.
51. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelde M, van Putten WLJ, Klijin JGM. Cathepsin D in primary breast cancer:prognostic evaluation 2810 patients. Br J Cancer 1999;79:300-307.
52. Del Casar JM, Gonzales-Reyes LO, Gonzales JM i sur. Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2009;136:811-819.
53. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. BMC 2009;9:188-208.
54. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. Ann Oncol 2008;19:1566-1572.

55. Pedersen AN, Christensen IJ, Stephens RW, Briand P, Mourdisen HT, Dano K. The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer: relation to survival. Cancer Res 2000;60:6927-6934.
56. Harbeck N, Schmitt M, Paepke S. Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI-1: Critical apprasial of their clinical relevance in breast cancer and their intergration into decision –support algorithms. Critical Rev Clin Laboratory Sciences 2007;44:179-202.
57. Mohammed RAA, Martin SG, Gill MS, Green AR, Paish EC, Ellis IO. Improved methodes of detection of lymphovascular invasion demonstrate that it is the predominant method of vascular invasion in breast cancer and has important clinical consequences. Am J Surg Pathol 2007;31:1825-1833.
58. Agrawal AK, Jelen M, Rudnicki J i sur. Molecular markers (c-erbB2, p53) in breast cancer. Folia Histochem Cytobiol 2008;46:449-455.
59. Müller M, Meyer M, Schilling E i sur.Testing for anti-p53 antibodies increases the diagnostic sensitivity of conventional tumor markers. Int J Oncol 2006;29:973-980.
60. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc/Max interaction and function. Oncogene 2003;22:6151-6159.
61. Fournier HN, Albiges-Rizo C, Block MR. New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. J Bioenerg Biomembr 2003;35:81-87.

62. Curtis CD, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM. Interaction of the tumor metastasis suppressor nonmetastatic protein 23 homologue H1 and estrogen receptor α alters estrogen-responsivegene expression. Cancer Res 2007;67:10600-10608.
63. Nadler Y, Camp RL, Giltnane JM i sur. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. Breast Cancer Res 2008;10:1-12.
64. Bogaerts J, Cardoso F, Buyes M i sur. TRANSBIRG consortium: Clinical application of the 70-gene profile: The Mindact Trial. J Clin Oncol 2008;26:729-735.
65. Oakman C, Bessi S, Zafarana E, Galardi F, Biganzoli L, Di Leo A. New diagnostic and biological predictors of outcome in early breast cancer. Breast Cancer Research 2009;11:1-11.
66. Ma S, Kosorok MR. Detectione of gene pathways with predictive power for breast cancer prognosis. Bioinformatics 2010;11:1-11.
67. Sun B, Zhang S, Zhang D i sur. Identification of metastasis -related proteins and their clinical relevance to triple-negative human breast cancer. Clin Cancer Res 2008;14:7050-7059.
68. Kreunin P, Urquidi V, Lubman DM, Goodison S. Identification of metastasis-associated proteins in a human tumor metastasis using the mass-mapping technique. Proteomics 2004;4:2754-2765.

69. Kim DH, Bae J, Lee JW i sur. Proteomic analysis of breast cancer tissue reveals upregulation of actin-remodeling proteins and its relevance to cancer invasiveness. Proteomic Clin 2009;3:30-40.
70. Wong JMY, Collins K. Telomere maintenance and disease. Lancet 2003;362:983-988.
71. Bisoffi M, Heaply CM, Griffith JK. Telomeres: Prognostic markers for solid tumors. Int J Cancer 2006;119:2255-2260.
72. Artandi SE. Complex roles for telomeres and telomerase in breast carcinogenesis. Breast Cancer Res 2003;5:37-41.
73. Schröder CP, Wisman GBA, De Jong S i sur. Telomere lenght in breast cancer patients before and after chemotherapy with or wihout stem cell transplation. Br J Cancer 2001;84:1348-1353.
74. Herbert BS, Wright WE, Shay JW. Telomerase and breast cancer. Breast Cancer Res 2001;3:146-149.
75. Sealey DC, Zheng L, Taboski MA, Cruickshank J, Ikura M, Harrington LA. The N-terminus of the hTERT contains a DNA -binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization. Nucleic Acid Research 2010;38:2019-2035.
76. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A. Reverse transcriptaze motifs in the catalytic subunit of telomerase. Science 1997;276:561-567.
77. Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. Mol Biotechnol 2009;41;194-199.

78. Flores I, Blasco MA. A p53-dependent response limits epidermal stem cell functionality and organismal size in mice with short telomeres. Plos One 2009;4:e4934. Epub 2009 Mar 19.
79. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H,Yutosudo K, at al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcriptionof the human telomerase reverse transcriptase gen (hTERT). Nucleic Acid Res 2000;28:669-677.
80. Li H, Cao Y, Berndt MC, Fender JW, Liu JP. Molecular interactions betwen telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. Oncogene 1999;18:6785-6794
81. Burger AM, Bibby MC, Double JA. Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy. Br J Cancer 1997;75:516-522.
82. Zhou C, Liu J. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expresion by BRCA1 in human ovarian cancer. Biochem Biophys Res Commun 2003;303:130-136.
83. Kyo S, Takakura M, Kanaya T. Estrogen activates telomerase. Cancer Res 1999;59:5917-5921.
84. Murillo-Ortiz B, Astudillo-De la Vega H, Castilo-Medina S, Malacara JM, Benitez-Bribiesca L. Telomerase activity, estrogen receptors (α, β), Bcl-2 expression in human breast cancer and treatment response. BMC Cancer 2006;6:1-9.
85. Cong Y, Shay WJ. Actions of human telomerase beyond telomeres. Cell Res 2008;18:725-732

86. Nam WK, MieczyslawAP, Prowse KR. Specific association of human telomerase activity with immortal cell and cancer. Science 1994;266:2011-2015.
87. Torre DCA, Maciel RMB, Pinherio NA, Andrade JAD, Toledo SRC, Villa LL. TRAP-silver staining, a highly sensitive assay for measuring telomerase activity in tumor tissue and cell lines. BraZ j Med Biol Res 2002;35:65-68.
88. Hiyama E, Gallahan L, Kataoka T i sur. Telomerase activity in human breast cancer. J Natl Cancer Inst 1996;89:116-122.
89. Hiyama E, Hiyama K. Telomere i telomerase in stem cell. Br J Cancer 2007;96:1020-1024
90. Yang BC, Lee MH, Lan RS, Chen JK. Telomerase acticity in pleural effusions: diagnostic significance. J clin Oncol 1998;16:567-573.
91. Rha SY, Park KH, Kim TS, Yoo NC, Yang WI, Roh JK, et al. Changes of telomerase and telomere lenghts in paired normal and cancer tissues of breast. Int J Oncol 1999;15:839-845.
92. Hoos A, Hepp H, Kaul S, Ahlert T, Bastert G, Wallweiner D. Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. Int J Cancer 1998;79:8-12.
93. Papadopoulou A, Tranges T, Teixeira MR, Heim S, Dimitriadis E, Tsarouha H, et al. Telomerase activity and genetic alterations in primary breast carcinomas. Neoplasis 2003;5:170-178.
94. Meeker AK, Argani P. Telomere shortening occurs early during breast tumorigenesis: a cause of chromosome destabilization underlying malignant transformation?. J

Mammary Gland Biol Neoplasia 2004;9:285-293.

95. Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. Oncogene 2002;21:643-649.

96. Loveday RL, Greenman J, Drew PJ, Monson R, Kerin MJ. Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer. Int J Cancer 1999;84:516-520.

97. Baykal A, Rosen D, Zhou C, Liu J, Sahin A. Telomerase in breast cancer: A critical evaluation. Adv Anat Pathol 2004;11:262 -268.

98. Chen H, Yuauyman L, Tollefrbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition. Mol Biotechnol 2009;41:194-199.

99. Biroccio A, Leonetti C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. Endocr Relat Cancer 2004;11:407-421

100. Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition a therrapeutic treatment. Mol Pharmacol 2005;68:779-786.

101. Kaur H, Richardson E, Murty L. Preparation of monoclonal antibodies against human telomerase. Hybridoma 2001;20:183-188.

102. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994;266:2011-2015.

103. Kirkpatrick KL, Newbold R, Kefah M. The mRNA expression of hTERT in brest carcinoma correlates with VEGF expression. J Carcinog 2004;3:1-9.

104. Zhang X, Kamaku R, Wong L, Fang B, Chang IY. Treatment of radioresistent stem-like esophagel cancer cells by on apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus. Clin Cancer Res;14:2813-2823.

105. The World Health Organisation. Histological typing of breast tumors. Am J Clin Pathol 1982;78:806-816.

106. Čović D, Milas I, Vukas D, Čakalo I. Tumori dojke. U: Šamija M,ur. Onkologija Zagreb: Medicinska naklada;2000, str. 316-326.

107. Fletcher CDM. Diagnostic Histopathology of tumors. Edinburgh: Churchil Livingstone 1995, str. 35-82.

108. 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 carcinomain situ or invasive carcinoma. Am J Clin Pathol 2002;797-799.

109. Fajdić J, Šarčević B. Netumorske bolesti dojke. U: Fajdić J, ur. Bolesti dojke, Zagreb: Nakladni zavod Globus, Požega: Opća županijska bonica Požega; 1998, str. 45-72.

110. Guray M, Sahin MM. Benign breast diseases: Classification, diagnosis, and management. Oncologist 2006;11:435-449.

111. Fajkus J. Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. Clin Chim Acta 2006;371:25-31.

112. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnston DA, Aldaz CM. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer:positive detection at the in situ breast carcinoma stage. Clin Cancer Res 1997;3:11-16.

113. Landberg G, Nielsen NH, Nilsson P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human. Cancer Res 1997;57:549-554.

114. Horwitz KB, McGuire WL. Progesterone and progesterone receptors in experimental breast cancer. Cancer Res 1977;37:1733-1738.

115. Romić-Stojković R, Gamulin S. Relationship of cytoplasmic and nuclear estrogen and progesterone receptor in human breast cancer. Cancer Res 1980;40:4821–4825.

116. Nikolić-Vukosavljević D, Markičević M, Kanjer K, Raković-Todorović N, Nešković-Konstatinović Z. Immunoradiometric assay of cathepsin D: Estrogen-regulated vs. nonestrogen-regulated cathepsin D expression in relation to clinicopathological features of breast cancer. Arh Oncol 2002;10:115-117.

117. Razumović JJ, Stojković RR, Petrovečki M, Gamulin S. Correlation of two methods for determination of cathepsin D in breast carcinoma (immunohistochemistry and ELISA in cytosol). Breast Cancer Res Treat 1997;43:117-122.

118. Jiminez RE, Wallis T, Tabasezka P i sur. Determination of HER2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of imunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. Mol Pathol 2000;13:37-45.

119. Umbricht CB, ME Sherman, Dome J i sur. Telomerase activity in ductal carcinoma *in situ* and invasive breast cancer. Oncogene 1999;18:3407-3418.

120. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T i sur. Telomerase activity in human breast tumors. J Natl Cancer Inst 1996;88:116-122.

121. Roos G, Nilsson P, Cajander S, Niels-Hilmer N, Arnerlov C, Landberg. Telomerase activity in relation to p53 status and clinico-pathological parameters in breast cancer. Int J Cancer 1998;79:343-348.

122. Mokbell K, Parris CN, Ghlichik M, Newbold RF. Telomerase activity int he human breast. Breast 1999;8:208-211.

123. Mokbell KM, , Parris CN, Ghlichik M, Amerasingen CN, Newbold RF. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cance. Eur J Surg Oncol 2000;26:30-33.

124. Gancarcikova M, Zemanova Z, Brezinova J i sur. The role of telomeres complex in hematological neoplasia: the length of telomeres as marker carcinogeness and prognosis disease. Prague Med Rep 2010;111:91-105.

125. Subhawong AP, Heophy CM, Argani P i sur. The alternative lenghtening of telomeres phenotype in breast carcinoma is associated with HER-2 overexpression. Mod Pathol 2009;22:1423-1431.

126. Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J i sur. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: Diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. Int J Cancer 1996;69:301-306.

127. Yashima S, Milchgrub, Gollahon LS i sur. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. Clin Cancer Res 1998;4:229-234.

128. Clark GM, Osborne CK, Levin D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. J Natl Cancer Inst 1997;89:1874-1881.

129. Carey LA, Kim NW, Goodman S i sur. Telomerase activity and prognosis in primary breast cancer. J Clin Oncol 1999;17:3075-3081.

130. Tsao JI, Zhao Y, Lukas J i sur. Telomerase activity in normal and neoplastic breast. Clin Cancer Res 1997;3:627-631.

131. Kalogeraki A, Koafonsi M, Ieramonachou P i sur. Telomerase activity as a marker of invasive ductal breast carcinomas on FNABs

and relationship to other prognostic variables. Anticancer Res 2005;25:1927-1930.

132. Grasselli A, Nanni S, Colussi C i sur. Estrogen receptor-α and endothelial nitric oxide siynthase nuclear complex regulates transcription of humane telomerase. Circ Res 2008;103:34-42.

133. Kyo S, Takakura M, Kanaya T i sur. Estrogen activates telomerase. Cancer Res 1999;59:5917-5921.

134. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription faxtor ER81 and oncogenic HER2/neu, Ras or Raf. Mol Cell Biol 2004;24:25-35.

135. Dowsett M, ÅHern R, Salter J, Zabaglo L,Smith IE. Who have thought a single Ki67 measurement would predict long-term outcome? Breast Cancer Res 2009;11:1-2.

136. Azambuja E, Cardoso F, Castro G i sur. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. Br J Cancer 2007;96:1504-1513.

137. Aziz S, Pervez S, Khan S, Kayani N, Rahbar M. Immunohistochemical cathepsin D expression in breast cancer: corelation with established pathological parameters and survival. Pathol Res Pract 2001;197:551-557.

138. Ferno M, Baldetrop B, bary A i sur. Cathepsin D, both a prognostic factor and a predictive factor for the efect of adjuvant tamoxifen in breast cancer. Sweden breast cancer group. Eur J Cancer 1994;30A:2042-2048.

139. Swellam M, Ismail M, Eissa S, Hamdy M, Mokhtar N. Emerging role of p53, bcl-2 and telomerase activity in Egyptian breast cancer patients. IUMB Life 2004;46:483-490.

140. Kimura M, Koida T, Yanayita Y. A study on telomerase activity and prognosis in breast cancer. Med Oncol 2003;20:117-126.

141. Smickova M, Nekulova M, Pecen L, Cernoch M, Vagundova M, Pacovsky Z. Quantitative determination of telomerase activity in breast cancer and benign breast diseasse. Neoplasma 2001;48:267-273.

142. Poremba C, Heine B, Diallo R i sur. Telomerase as prognostic markers in breast cancer:high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. J Pathol 2002;198:181-189.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1963 godine u Kotor Varošu u Bosni i Hercegovini. Osnovnu i srednju školu završila sam u Požegi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet smjer medicinska biokemija završila sam 1987 godine. Iste godine počela sam raditi u laboratoriju Zavoda za patofiziologiju i znanstveno istraživanje gdje i danas radim. 1988 godine upisala sam poslijediplomski studiji na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, smjer Klinička laboratorijska dijagnostika i 1990 godine položila sve ispite. Magistarski rad na temu „Interakcija estrogena i nuklearnog matriksa″ obranila sam 1993 na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Specijalistički ispit iz Medicinske biokemije položila sam 2000 godine. 1999 godine boravila sam u Klinici Ependorf u Hamburgu četiri tjedna na stručnom usavršavanju. Sudjelovala sam u znanstvenim projektima tumora dojke pod vodstvom Prof dr Stjepana Gamulina i Prof dr Damira Vrbanca. Sudjelovala sam s posterskim prezentacijama i predavanjima na stručnim i znanstvenim skupovima u zemlji i inozemstvu.