

Praćenje promjena koncentracije topljivoga receptora za TGF beta III specifičnoga biomarkera u plazmi bolesnica s karcinomom dojke

Jurišić, Darko

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:581801>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Darko Jurišić

**Praćenje promjena koncentracije
topljivoga receptora za TGF beta III
specifičnoga biomarkera u plazmi
bolesnica s karcinomom dojke**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Darko Jurišić

**Praćenje promjena koncentracije
topljivoga receptora za TGF beta III
specifičnoga biomarkera u plazmi
bolesnica s karcinomom dojke**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena na Klinici za plastičnu, rekonstrukcijsku i estetsku kirurgiju i na Kliničkom zavodu za patologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu te u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

Mojoj obitelji kojoj i posvećujem ovaj rad hvala na ljubavi, podršci i razumijevanju.

Zahvaljujem se voditelju rada na ideji, vođenju i podršci, dr.sc. Karli Tomić, dr.med. na korisnim savjetima i pomoći te prim.dr.sc. Čedni Tomasović Lončarić, dr.med. i Mirjani Parać, dipl.med.techn. na pomoći pri sakupljanju uzoraka.

Posebna zahvala ide onima bez kojih izrada ovog istraživanja ne bi bila moguća: dr. sc. Igoru Erjavcu, dipl.ing. i ostalim zaposlenicima Laboratorija za mineralizirana tkiva Centra za translacijska istraživanja Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA DOJKE	1
1.2. PREVENCIJA RAKA DOJKE	4
1.3. RIZIČNI FAKTORI RAKA DOJKE	4
1.4. DIJAGNOSTIKA BOLESTI DOJKE	6
1.5. PATOHISTOLOGIJA RAKA DOJKE	13
1.6. STADIJI RAKA DOJKE	19
1.7. LIJEČENJE KARCINOMA DOJKE	23
1.7.1. Kirurško liječenje karcinoma dojke	23
1.7.2. Adjuvantno liječenje karcinoma dojke	29
1.8. PROGNOСТИČKI I PREDIKTIVNI FAKTORI RAKA DOJKE	38
1.8.1. Tumorski markeri	41
1.9. TRANSFORMIRAJUĆI FAKTOR RASTA BETA (TGF β)	48
1.10. ULOGA TRANSFORMIRAJUĆEG FAKTORA RASTA BETA (TGF β) U TUMOROGENEZI	50
1.11. TGF β RECEPTOR TIP III (T β RIII)	51
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	56
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	57
4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA	58
4.1. ISPITANICE	58
4.2. MATERIJALI ISTRAŽIVANJA	59

4.3. METODE ISTRAŽIVANJA	60
4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	64
5. REZULTATI	66
5.1. KIRURŠKO LIJEČENJE BOLESNICA OVISNO O RAZLIČITIM VELIČINAMA TUMORA	67
5.2. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE TGF β rIII U PLAZMI BOLESNICA PRIJE I NAKON OPERATIVNOG ZAHVATA.....	68
5.3. RAZLIKE U PREOPERATIVNOJ KONCENTRACIJI TGF β rIII OVISNO O HISTOLOŠKOM TIPU I PATOHISTOLOŠKIM ZNAČAJKAMA INVAZIVNIH TUMORA	72
5.4. PROMJENA KONCENTRACIJE TGF β rIII NAKON UČINJENOG OPERATIVNOG ZAHVATA.....	75
5.5. IMUNOHISTOKEMIJSKI PARAMETRI EKSPRESIJE TGF β rIII	76
5.6. KORELACIJA PREOPERATIVNE KONCENTRACIJE TGF β rIII U PLAZMI I UMNOŠKA INTENZITETA I UDJELA EKSPRESIJE TGF β rIII	83
5.7. PREŽIVLJENJE BOLESNICA BEZ NEPOVOLJNOG PRIMARNOG ISHODA TIJEKOM PET GODINA	83
6. RASPRAVA.....	93
7. ZAKLJUČCI	108
8. SAŽETAK	110
9. SUMMARY	111
10. LITERATURA	112
11. ŽIVOTOPIS	130

POPIS OZNAKA I KRATICA:

MR	Magnetska rezonanca (engl. Magnetic resonance)
CT	Kompjutorizirana tomografija (engl. Computed tomography)
MMG	Mamografija
UZV	Ultrazvuk
PET	Tomografija pozitronske emisije (engl. Positron emission tomography)
FNA	Aspiracijska biopsija finom iglom (engl. Fine needle aspiration)
CNB	Biopsija širokom iglom (engl. Core needle biopsy)
VABB	Vakumska biopsija dojke (engl. Vacuum Assisted Breast Biopsy)
SLNB	Biopsija limfnog čvora stražara (engl. Sentinel lymph node biopsy)
DCIS	Duktalni karcinom in situ (engl. Ductal carcinoma in situ)
LCIS	Lobularni karcinom in situ (engl. Lobular carcinoma in situ)
ALH	Atipična lobularna hiperplazija (engl. Atypical lobular hyperplasia)
VNPI	Van Nuys prognostički indeks (engl. Van Nuys prognostic index)
HNL	Hormonsko nadomjesno liječenje
ER	Estrogenski receptor
PR	Progesteronski receptor
HER2	Receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2
EBR	Ellston-Bloom-Richardson sistem gradiranja tumora
NST	Invazivni karcinom koji nije posebnog tipa (engl: No special type)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
AJCC	Američko udruženje za stupnjevanje karcinoma (engl: American Joint Comitee on cancer staging)
IHC	Imunohistokemijska analiza (engl: Immunohistochemistry)
ALND	Disekcija pazušnih limfnih čvorova (engl: Axillary lymph node dissection)
MRM	Modificirana radikalna mastektomija (engl: Modified radical mastectomy)
SNSM	Mastektomija s očuvanjem kože i bradavice (engl: Skin and nipple sparing mastectomy)
ISH	In situ hibridizacija (engl: In situ hybridization)
EGFR	Receptor epidermalnog faktora rasta (engl: Epidermal growth factor receptor)

VEGF	Vaskularni endotelni faktor rasta (engl: Vascular endothelial growth factor)
NPI	Nottinghamski prognostički indeks (engl: Nottingham prognostic index)
LN	Limfni čvor (engl: Lymph node)
CEA	Karcinoembrionalni antigen (engl: Carcinoembryonic antigen)
CA 15-3	Karcinomski antigen 15-3 (engl: Carcinoma antigen 15-3)
TGFβ	Transformirajući faktor rasta beta (engl: Transforming growth factor beta)
TGF β rIII (TβRIII)	Tip III receptor transformirajućeg faktora rasta beta (engl: Transforming growth factor beta receptor III)

1. UVOD

1.1. EPIDEMIOLOGIJA RAKA DOJKE

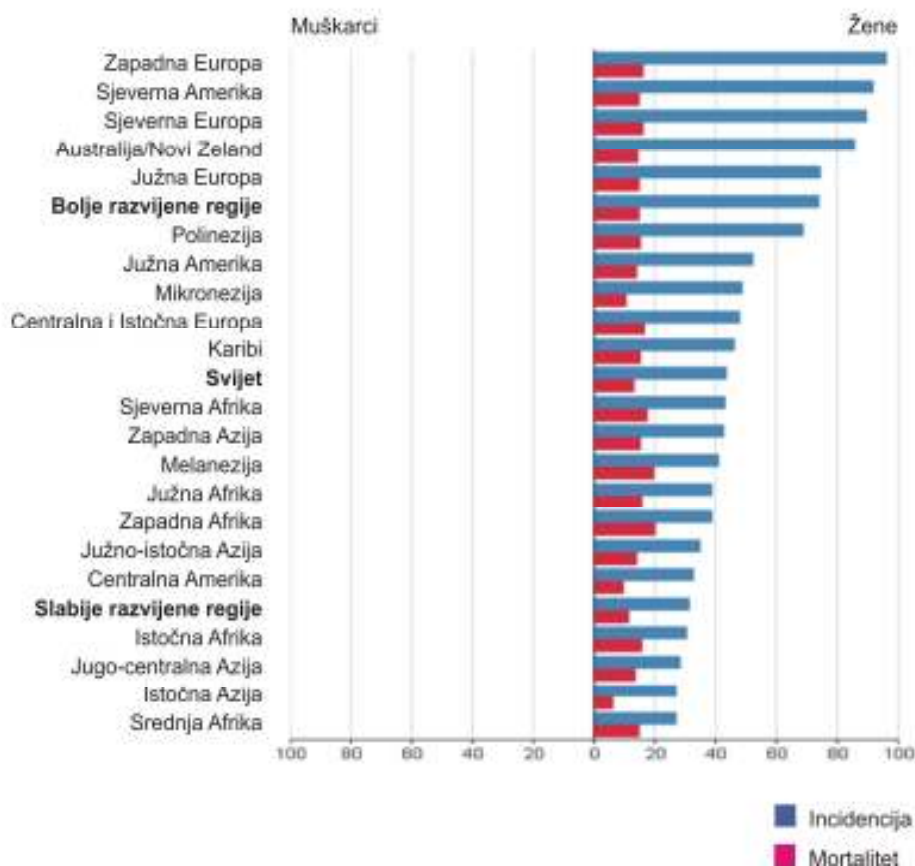
Karcinom dojke najčešće je maligno oboljenje kod žena od kojeg obolijeva četvrtina novooboljelih ženskih osoba u svijetu i Hrvatskoj. Jedna od osam žena će razviti invazivni karcinom dojke tijekom života dok je kod muškaraca rizik za razvoj karcinoma dojke 1 na 1000.

U usporedbi s ostalim europskim zemljama, Hrvatska je zemlja srednje incidencije i visokog mortaliteta od raka. Dugoročno gledajući, incidencija raka u Hrvatskoj u blagom je porastu (2,6% godišnje), dok mortalitet nakon dugotrajnog porasta od 2000-ih pokazuje stabilizaciju. Pad mortaliteta opažen je samo u dobnim skupinama mlađim od 50 godina. Dok su maligne bolesti drugi najčešći uzrok smrti u Hrvatskoj općenito, odmah iza kardiovaskularnih bolesti, rak pluća u muškaraca i rak dojke u žena nalaze se među deset najčešćih pojedinačnih uzroka smrti prema spolu. (1,2)

Postotak novooboljelih od karcinoma dojke kreće se oko 22% od svih karcinoma u žena u 2011. godini. Prema podacima Registra za rak Hrvatske, 2011. godine broj novooboljelih žena bio je 2094 (stopa 94,4/100 000), a u 2010. godini broj umrlih žena bio je 983 (stopa 42,7/100 000). (1,3,4) U razdoblju 2009. - 2010. godine 34% slučajeva raka dojke bilo je otkriveno u lokaliziranom stadiju, 34% u stadiju regionalnih metastaza, a 6% u stadiju udaljenih metastaza. Za ostatak stadij nije bio poznat. (2)

Na svjetskoj razini, prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (baza podataka GLOBOCAN za 2012. godinu), procjenjuje se oko 14,1 milijuna novih slučajeva karcinoma, 8,2 milijuna smrti od karcinoma te 32,6 milijuna živih bolesnika s karcinomom unutar 5 godina od inicijalne dijagnoze. Od zadnjih podataka iz 2008. godine, incidencija karcinoma dojke je u porastu za više od 20% dok je smrtnost porasla za 14%. Karcinom dojke je najčešći uzrok smrti od karcinoma kod žena, od kojeg obolijeva jedna četvrtina svih žena oboljelih od karcinoma te je najčešće dijagnosticirani karcinom kod žena u 140 od 184 zemlje u svijetu. U svijetu je 2012. godine umrlo 522 000 žena od karcinoma dojke. Kako još uvijek nema učinkovitih metoda za primarnu prevenciju, porast incidencije se bilježi kako u manje razvijenim zemljama tako i u najrazvijenijim zemljama svijeta iako stope incidencija

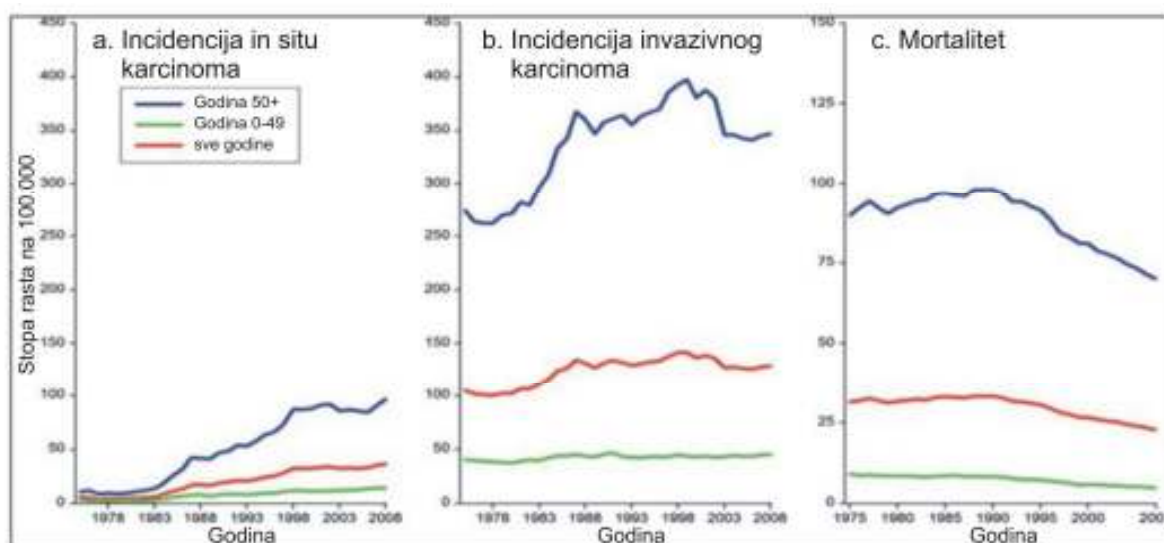
variraju u različitim područjima svijeta (Slika 1). U Europi godišnje od raka dojke obolijeva 425 147, a umire 128 737 žena. (5,6,7)



Slika 1. Standardizirana tablica stope incidencije i mortaliteta raka dojke u svijetu na 100 000. Preuzeto iz: <http://globocan.iarc.fr>. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, i sur. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Incidencija karcinoma dojke u SAD-u između 1987. i 1993. stabilizirala se za dobnu skupinu bolesnica iznad 50 godina, a potom je ponovno u porastu, ali sa slabijom stopom rasta (1,9% po godini). Uzrok je vjerojatno bio rast prevalencije mamografskog skrininga, povećana stopa pretilosti i menopauzalna upotreba hormonskih preparata. Između 2002. i 2003. godine došlo je do pada (oko 7%) incidencije karcinoma dojke, vjerojatno posljedično objavljenoj studiji koja povezuje povišeni rizik nastanka raka dojke s hormonskim nadomjesnim liječenjem, nakon čega opada upotreba HNL-a u SAD-u, ali i sve većem zamahu mamografskog skrininga te se stabilizira na maksimalnom nivou nakon 2000. godine. Kod bolesnica mlađih od 50 godina, incidencija je stabilna od 1985. godine. Stopa smrtnosti od karcinoma dojke u SAD-u rasla je u vremenu 1975. – 1990. oko 0,4% godišnje, nakon čega stopa smrtnosti od karcinoma dojke pada u razdoblju 1990. - 2007.

godine i to za bolesnice ispod 50 godina oko 3,2%, a za bolesnice iznad 50 godina starosti 2% godišnje. (8,9) (Slika 2)



Slika 2. Incidencija i stopa mortaliteta karcinoma dojke prema dobi bolesnica u SAD, 1975-2008. godine. Preuzeto iz: DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast Cancer Statistics, 2011. Ca Cancer J Clin 2011;61:409–18.

Procjenjuje se da je u SAD u 2011. godini dijagnosticirano oko 230 480 novih slučajeva invazivnog te 57 650 novih slučajeva neinvazivnog karcinoma dojke kod žena te oko 2140 novih slučajeva invazivnog karcinoma kod muškaraca. Procjenjuje se da je u 2011. godini karcinom dojke odgovoran za smrt oko 39 520 žena u SAD-u. U oko 78% slučajeva novootkrivenih karcinoma dojke te oko 87% smrti kao posljedica karcinoma dojke događa se u dobi bolesnica iznad 50 godina. (9)

Smrtnost od karcinoma dojke kod žena je veća od ostalih karcinoma, osim od karcinoma pluća. Smanjenje smrtnosti zadnjih godina u SAD-u i Europi pripisuje se poboljšanju adjuvantnog liječenja i kvalitetnijem ranom otkrivanju raka dojke u sklopu organiziranih programa ranog otkrivanja (palpacija i mamografija), boljoj edukaciji bolesnika i programima za prevenciju karcinoma. (9-14)

U Hrvatskoj se od 2006. godine provodi mamografski probir u sklopu Nacionalnog programa Ministarstva zdravlja i socijalne skrbi s ciljem ranog otkrivanja raka dojke pod nazivom „Mamma“ te obuhvaća dobnu skupinu od 50 do 69 godina. Mamografski nalazi se dvostruko očitavaju, a u slučaju urednog nalaza ponovna MMG se radi za dvije godine. U slučaju patološkog nalaza, obaviještava se bolesnica i liječnik obiteljske medicine i preporučuje se daljnja obrada. Ciljevi Nacionalnog programa su otkriti u većem postotku rak dojke u početnom stadiju u odnosu na

uznapredovale stadije bolesti i time smanjiti mortalitet od raka dojke za 25% pet godina nakon provođenja programa, smanjiti troškove liječenja te poboljšati kvalitetu življenja bolesnica s rakom dojke. (3,14,15)

1.2. PREVENCIJA RAKA DOJKE

Razlikujemo tri osnovne vrste prevencije: primarna, sekundarna i tercijarna.

PRIMARNA prevencija odnosi se na smanjenje izlaganja potencijalnom kancerogenu kako bi se izbjegao kancerogeni proces.

SEKUNDARNA prevencija podrazumijeva screening programe za rano otkrivanje karcinoma dojke.

TERCIJARNA prevencija odnosi se na rehabilitaciju bolesnica tijekom liječenja karcinoma u okviru fizičke i psihičke rehabilitacije.

1.3. RIZIČNI FAKTORI RAKA DOJKE

U faktore rizika ubrajamo sve što povećava šansu nastanka bolesti, u ovom slučaju karcinoma dojke. Postoje različite vrste faktora rizika, a različiti faktori različito utječu na razvoj bolesti. Na neke faktore rizika ne može se utjecati (primjerice spol, dob ili rasa), drugi su vezani uz način života (npr navike; konzumacija alkohola, pušenje), dok se neki nalaze u okolišu. Stoga se neki faktori vremenom mogu promijeniti, kao i njihov utjecaj na nastanak bolesti.

Važniji faktori rizika za nastanak karcinoma dojke:

Faktori rizika vezani uz način života:

- Rađanje i dob u vrijeme prve trudnoće: povećani (srednji) rizik od nastanka raka dojke je kod žena koje nisu rađale ili su prvo dijete rodile nakon 35 godine.
- Vrijeme prve menstruacije i vrijeme menopauze: pojava prve menstruacije prije 12. godine života i kasna menopauza nakon 55. godine je povećani (srednji) rizik od nastanka raka dojke.
- Laktacija: smanjuje rizik nastajanja karcinoma dojke vjerojatno smanjenjem ukupnog broja menstrualnih ciklusa tijekom života.

- Oralni kontraceptivi: Korištenje hormonske estrogensko - progesteronske terapije kontinuirano više od 10 godina pokazuje relativni rizik od nastanka raka dojke.
- Hormonska terapija nakon menopauze: kombinirana estrogensko-progesteronska terapija povećava mogućnost nastajanja karcinoma dojke; niski rizik tijekom prvih pet godina terapije.
- Svakodnevno konzumiranje alkohola povećava rizik od nastanka raka dojke, a rizik raste s količinom konzumiranog alkohola.
- Prekomjerna tjelesna težina i pretilost povećava rizik od nastanka raka dojke, posebice nakon menopauze kada većina estrogena dolazi iz masnog tkiva; niski rizik.
- Fizička aktivnost: sve je više podataka da smanjuje rizik od nastanka raka dojke.
- Pušenje povećava rizik od nastanka raka dojke.

Faktori rizika na koje se ne može utjecati:

- Spol: karcinom dojke je 100 puta češći kod žena.
- Dob: rizik nastanka raka dojke raste s dobi; 2 od 3 invazivna karcinoma dojke nastaju kod žena iznad 55 godina.
- Genetski faktori rizika: od 5 do 10% karcinoma dojke nastaje zbog naslijeđenih mutacija gena. Mutacije na genima BRCA1 i BRCA2 povećavaju rizik nastanka karcinoma dojke tijekom života za 50 - 85%. Mutacije ostalih gena koje povećavaju rizik nastanka raka dojke (ATM, p53, CHEK2, PTEN, CDH1, STK11) nisu tako česte kao mutacije kod gena BRCA1 i BRCA2.
- Familijarna pojava raka dojke: oko 5 % svih karcinoma dojke može se pripisati nasljednom faktoru; visoki rizik: dva srodnika u prvom obiteljskom koljenu, ili ako je jedan srodnik obolio prije 50. godine, ili ima bilateralni rak dojke; srednji rizik: jedan srodnik u prvom obiteljskom koljenu s rakom dojke.
- Karcinom dojke u anamnezi nosi 3–4 puta veći rizik za razvoj novog karcinoma dojke (visoki rizik).
- Gusto žljezdano tkivo dojke nosi povećani rizik razvoja karcinoma dojke.
- Benigne promjene u dojkama: većina dobroćudnih promjena u dojkama ima određeni proliferativni potencijal i nosi određeni rizik (niski) od nastanka karcinoma dojke.

- LCIS nosi 7–11 puta povećani rizik za razvoj karcinoma u obje dojke.
- Atipična lobularna hiperplazija nosi visoki rizik za razvoj karcinoma dojke.
- Izloženost prsnog koša terapijskom X-zračenju.

Faktori vanjske sredine:

Glavni mehanizam na koji faktori vanjske sredine povećavaju rizik za nastanak raka dojke je djelovanjem na organizam slično kao hormoni (posebno estrogen) ili povećavajući osjetljivost na karcinogenezu. Iako je bazirano na malom broju studija, postoji povezanost između karcinoma dojke i izlaganju različitim spojevima koji se većinom koriste u industriji i proizvodnji: policiklički aromatski spojevi, dioksini, organska otapala, benzen, DDT, vinil-klorid, duhan itd. (2, 16-18)

1.4. DIJAGNOSTIKA BOLESTI DOJKE

• NEINVAZIVNE DIJAGNOSTIČKE METODE

Samopregled

Samopregled je važan dio zdravstvenog odgoja žena i ima ulogu u ranom otkrivanju raka dojke. Nakon 25. godine života, sve bi žene jednom mjesečno trebale pregledati svoje dojke. Iako je to individualno, optimalno vrijeme za samopregled je od petog do desetog dana ciklusa odnosno pred kraj ili neposredno nakon menstrualnog krvarenja. Cilj samopregleda je naučiti i zapamtiti strukturu vlastite dojke. U slučaju da se otkrije novonastala kvržica, bolesnica bi se trebala obratiti liječniku obiteljske medicine koji će odlučiti o daljnjem postupku.

Anamneza i klinički pregled

Svaki dijagnostički postupak počinje dobro uzetom anamnezom od strane liječnika.

Anamneza se sastoji od obiteljske anamneze: podatci o bolestima u krvnih srodnika s naglaskom na podatcima o bolestima dojke ženske loze (majka, sestra, baka, tetka) te osobne anamneze.

Klinički pregled dojki koji se sastoji od inspekcije i palpacije obiju dojki u sjedećem i ležećem položaju bolesnice te pazušnih jama. Inspekcijom se registrira veličina, (a)simetrija, promjene u pigmentaciji kože, iscjedak iz bradavice, edem kože i drugo. Klinički pregled se preporučuje učiniti jedanput godišnje kod svih pacijentica starijih od 35 godina i onih mlađih ako pripadaju rizičnoj grupi.

Ultrazvuk

Ultrazvuk radi na principu bezopasnih, visokofrekventnih zvučnih valova koji se prolazeći kroz tkivo dojke, odbijaju od različitih struktura u dojci i vraćaju natrag do sonde nakon čega se pomoću prikladnog kompjutorskog programa pretvaraju u sliku. Ultrazvučni pregled dojki je neškodljiv, jeftin i može se višestruko ponoviti u kratkim intervalima. Ultrazvuk ne može zamijeniti mamografski pregled u probiru, ali se koristi kao dopunsko dijagnostičko sredstvo ili u tzv. sekundarnom probiru, kada je nakon probirne mamografije (uglavnom kod dojki s gustim žljezdanim tkivom) potrebno učiniti i ultrazvučni pregled dojke. U žena mlađih od 40 godina, ali i u onih starijih koje imaju gusto žljezdano tkivo, ultrazvučni pregled dojki metoda je prvog izbora. Pregled se izvodi linearnom ultrazvučnom sondom od 7,5 do 15 MHz. Senzitivnost ultrazvuka je 60-70%, a specifičnost 80-85% te je ovisan o educiranosti liječnika koji ga provodi. Ultrazvučni pregled je najbolje učiniti unutar prvih deset dana menstruacijskog ciklusa, kada su dojke manje bolne i napete, a utjecaj ženskih spolnih hormona nije toliko izražen kao u predmenstruacijskom periodu. Ultrazvuk se koristi i u invazivnim dijagnostičkim metodama: punkcijama, biopsijama kao i preoperativnom obilježavanju promjena u dojci.

Mamografija

Mamografija je radiografsko snimanje dojki. Moderna mamografija postoji od 1969. godine, a zbog svoje jednostavnosti, cijene i korisnosti još uvijek je zlatni standard u otkrivanju raka dojke te je osnovna dijagnostička slikovna radiološka metoda u dijagnostici bolesti dojki. Razina zračenja koja se koristi prilikom snimanja dojki je minimalna i iznosi oko 0,1 do 0,2 rada po rtg snimci, a ne povećava rizik za nastanak karcinoma dojke.

Razlikujemo *probirnu* i *dijagnostičku* mamografiju.

Probirna mamografija se radi u posebnim državnim programima odabira u zdravoj populaciji. Probirnoj ili screening mamografiji podvrgavaju se samo zdrave najugroženije žene, a to su žene od 50 do 69 godina među kojima se krije čak više od 50% od ukupnog broja novooboljelih na godinu u Hrvatskoj.

Dijagnostička mamografija se radi u svrhu dijagnostike bolesti dojki kod žena koje imaju simptome ili abnormalni nalaz na probirnoj mamografiji.

Mamografijom se otkrivaju karcinomi dojke već od 5 do 6 mm, a promjene kao što su nakupine mikrokalcifikata uočavaju se samo ovom metodom pregleda i mogu biti jedini znak bolesti. Međutim, mamografija kao dijagnostička metoda nije savršena, pa

se 10% do 15% karcinoma dojke ovom metodom ne može otkriti, posebice kod bolesnica s gustim žljezdanim tkivom, arhitekturnim deformacijama u žljezdanom tkivu te prisutnosti ožiljnih promjena nakon prethodnih biopsija. Stoga je ultrazvučni pregled izvrsna nadopuna mamografiji. Standardno se prilikom snimanja koriste dvije projekcije: kranio-kaudalna (oznaka na rtg filmu CC) i mediolateralna ili kosa projekcija (oznaka na rtg filmu ML) te se uobičajeno radi unutar prvih 10 dana menstruacijskog ciklusa. Senzitivnost mamografije je 60-70%, a specifičnost 50-60%. U mladih žena žljezdano tkivo zauzima gotovo cijelu dojku i mamografska slika je prilično nejasna, stoga se ženama mlađim od 35 godina mamografija radi samo iznimno. U toj dobi je osjetljivost i specifičnost ultrazvuka veća od mamografije.

Redovita primjena mamografije dokazano smanjuje smrtnost od raka dojke za 30% među ženama u dobi od 50 do 69 godina, a prema nekim podacima njezina podjednaka korisnost može se očekivati i u žena u dobi između 40. i 50. godine života. Kod bolesnica oboljelih od karcinoma dojke mamografija se radi jednom godišnje. Od 50. do 69. godine života preporuka je da se mamografija učini jednom godišnje, a nakon 70. godine života mamografiju je potrebno učiniti svake dvije godine.

Prema kliničkim smjernicama za onkoplastično liječenje raka dojke iz 2013. godine, u slučaju prisutnih čimbenika visokog ili srednjeg rizika za razvoj karcinoma dojke uz samopregled jednom mjesečno te klinički i UZV pregled svakih šest mjeseci, preporučuje se prvu MMG učiniti s 40 godina, odnosno 10 godina prije nego što je majka oboljela od raka dojke, ali ne prije 30. godine, potom jednom godišnje kontrolnu MMG. Kod niskog rizika za razvoj karcinoma dojke uz samopregled jednom mjesečno, prvi UZV pregled dojki potrebno je učiniti iza 35. godine života, a prvu mamografiju s 40 godina. Kontrolne MMG u slučaju urednog nalaza rade se jednom u dvije godine, a nakon 50. godine jednom godišnje. (2, 19-22)

Magnetska rezonanca

Najšire primijenjen dijagnostički modalitet je mamografija. Zajedno s ultrazvučnim i kliničkim pregledom u najvećem broju slučajeva se može postići uspješna dijagnostika. Međutim, zbog limitiranosti obiju metoda, primjerice u evaluaciji postterapijske dojke, razvija se MR-mamografija (MRM) kao najsuvremeniji dijagnostički modalitet u otkrivanju bolesti dojke. MR-mamografija koristi magnetske i radio valove umjesto rtg zraka radi stvaranja detaljnih presjeka tijela. Radi postizanja veće učinkovitosti i detaljnijeg prikaza, koristi se i.v. injicirani kontrastni materijal

(gadolinij). Obično se pregled izvodi na uređajima srednje i visoke jakosti magnetskog polja (0,5-2 T) te odgovarajućom programskom potporom za snimanje određenim pulsним sekvencijama. Detekcija patološkog procesa zasniva se na prepoznavanju promjena normalne anatomije te prepoznavanju razlika u apsorpciji kontrastnog sredstva u prvih 10 minuta nakon aplikacije. MRM odlikuje potpuna biološka neškodljivost, visoka senzitivnost i nešto niža specifičnost, sa nešto većim brojem lažno pozitivnih nalaza, zbog čega MRM nije preporučena kao screening pretraga kod žena s prosječnim rizikom za karcinom dojke. Za razliku od mamografije i ultrazvuka MRM pregled grudi ne pruža samo informacije o morfologiji nego i o funkcionalnim karakteristikama lezije.

- *Apsolutne indikacije za MR dojki :*

1. Evaluacija postterapijske dojke (nakon operacije i zračenja), minimalno 12 mjeseci nakon operacije.
2. Evaluacija dojki sa silikonskim implantatima.
3. Monitoring neoadjuvantne kemoterapije.

- *Relativne indikacije za MR dojki su:*

1. Denzna dojka.
2. Preoperativna priprema kod sumnje na multicentričnost i bilateralnost promjena (lobularni karcinom).
3. Komplicirani nalazi (diskrepanca između kliničkog i radiološkog nalaza).
4. Kod nepoznatog primarnog procesa, tj. postojanje metastaza u aksiliji čije je ishodište moguće u dojci, ali s nedefiniranim kliničko-radiološkim nalazom. (2,20,22,23)

Galaktografija: Vrsta mamografije kod koje se vrši prikaz mliječnih kanalića u koje je prethodno ubrizgano vodotopivo jedno kontrastno sredstvo (1 - 2 ml), a nakon sondiranja mliječnog kanalića iz kojeg je javlja sekrecija. Tipična indikacija za galaktografiju je krvav iscjedak i sumnja na postojanje intraduktalnog papiloma odnosno karcinoma.

Digitalna mamografija: Kao i standardna mamografija, digitalna mamografija koristi rtg snimke za slikovni prikaz, a razlikuju se po tome što se kod digitalne mamografije učinjena rtg snimka konvertira u digitalnu te sprema u kompjutor radi daljnje obrade i arhiviranja.

Kompjutorski vođena detekcija i dijagnoza : Zadnjih dvadesetak godina razvija se kompjutorski vođena detekcija i dijagnoza s ciljem veće točnosti u dijagnostici. Koristi

se u standardnoj ili digitalnoj mamografiji. Kompjutor „prepoznaje“ sumnjiva područja na prethodno skeniranoj rtg snimci ili digitalnom mamogramu te ih označava specijalisti radiologu radi detaljnije pretrage. Trenutne studije nisu pokazale značajniju korist korištenja kompjutorski vođene detekcije i dijagnoze.

Pneumocistografija: Ova pretraga služi za prikazivanje cističnih promjena u dojci. Najprije se punkcijom isprazni sadržaj ciste, potom se u cističnu tvorbu insuflira zrak, a naposljetku se učini standardna mamografija. Na taj način se prikazuje cista radi vizualizacije promjena na unutrašnjoj stijenci cistične tvorbe.

Limfoscintigrafija: Limfoscintigrafija je nuklearno-medicinska metoda prikaza limfnih čvorova i limfnih puteva radi terapijskih postupaka ili procjene zahvaćenosti limfnih čvorova metastatskim procesom. Za limfoscintigrafiju se koriste koloidne čestice humanog albumina veličine 50 - 200 nm obilježene s Tc-99m-pertehnetatom koje se injiciraju peritumoralno te se kompjutoriziranom gama kamerom prati dinamika limfnog protoka.

Tomografija pozitronske emisije, engl: PET (Positron Emission Tomography)

PET s fluorodeoxyglukosom predstavlja funkcijsku tehniku snimanja za detekciju malignih lezija. U novije vrijeme se kombinira CT i PET, te mamografija i PET, u cilju povećanja točnosti funkcijskih PET pretraga i CT-ovih i mamografskih anatomskih prikaza. PET detektira udaljene metastaze, procjenjuje odgovor na terapiju, te pokazuje rekurentnu bolest. Iako PET ne može identificirati mikroskopske lezije, može detektirati grupe (klastere) tumorskih stanica koje se nalaze u drugim tkivima ili organima tijela. PET-CT se uglavnom koristi za praćenje metastatske bolesti radi procjene učinka terapije, određivanje stupnja proširenosti bolesti kod bolesnika s dokazanom metastatskom bolešću te za određivanje inicijalnog stadija bolesti kod bolesnika s lokalno uznapredovalom bolešću radi odluke o operabilnosti i potencijalnoj neoadjuvantnoj terapiji. (2)

Kompjutorizirana tomografija (CT): CT je metoda koja je zasnovana na primjeni rendgenskog zračenja. Koristi se rendgenskom cijevi koja rotira oko bolesnika i pritom emitira snop rendgenskih zraka, koje prolaze kroz tijelo i padaju na detektore. Prilikom snimanja slojeva, izračunavaju se koeficijenti apsorpcije pojedinog tkiva. U dijagnostici bolesti dojke, CT se koristi u ocjeni stadija karcinoma te u planiranju i praćenju liječenja. Pouzdanost metode se povećava korištenjem jodnih vodotopivih kontrastnih sredstava prilikom snimanja.

Scintimamografija: Nuklearno-medicinska pretraga se koristi s ciljem detekcije karcinomskih stanica u dojčkama kod žena koje su imale abnormalni mamogram ili gusto žljezdano tkivo. Kod ove pretrage se radioaktivna test-supstanca (methoxy-isobutyl-isonitril vezan na tehnećij-99m) aplicira intravenski i potom prati njeno nakupljanje u karcinomskim stanicama s gama kamerom. Zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti, koristi se u slučaju dvojbenih mamografskih nalaza radi smanjenja mamografski indiciranih biopsija s negativnim patohistološkim nalazom.

Kompjutorizirana tomografija snimanjem jednokratne emisije fotona: Nuklearno-medicinska dijagnostička pretraga koja je vrlo slična scintimamografiji te se koristi radioizotopom i radioligandima s različitim afinitetima vezanja za različita tkiva, a za slojevni prikaz se koristi gama zrakama pomoću kojih se može dobiti trodimenzionalni prikaz tkiva.

Termografija dojke: Pretraga koja ima samo povijesno značenje budući da je zamijenjena pouzdanijim i suvremenijim metodama, a temelji se na elektromagnetskom zračenju tijela u obliku infracrvenog zračenja koje se pretvara u sliku.

- **INVAZIVNE DIJAGNOSTIČKE METODE**

Značajan broj identificiranih (i često nepalpabilnih) promjena u dojci postojećim slikovnim tehnikama nije moguće precizno dijagnosticirati te je potreban daljnji dijagnostički postupak citološkom ili patohistološkom verifikacijom. Pod kontrolom ultrazvuka, MRI-om ili mamografsko–stereotaksijskim navođenjem, moguće je uzeti materijal za citološku ili patohistološku dijagnozu.

Ciljana citološka punkcija, engl: FNA (Fine needle aspiration)

Citološka aspiracijska punkcija tankom iglom je brza, jednostavna i relativno jeftina orijentacijska dijagnostička metoda koja se koristi u prvom redu u dijagnostici površno smještenih tumorskih tvorbi i vodenastih kolekcija (ciste, hematomi i sl). Izvodi se pod kontrolom ultrazvuka iglom od 22 ili 23 G i jako je ovisna o educiranosti i vještini liječnika koji je izvodi i educiranosti citologa koji interpretira nalaz. U slučaju malignog nalaza ovom metodom nije moguće sa sigurnošću odrediti tip karcinoma i radi li se o in situ ili invazivnom karcinomu te je u tom slučaju indicirana biopsija širokom iglom.

Biopsija širokom iglom, engl: CB (Core – needle Biopsy)

Biopsija širokom iglom izvodi se specijalno konstruiranim bioptičkim iglama (najčešće od 14 G) i bioptičkim pištoljem. Biopsiju kod nepalpabilnih lezija (najčešće suspektni klasteri mikrokalcifikata) moguće je učiniti pod kontrolom ultrazvuka, mamografsko–stereotaksijskim navođenjem ili pod kontrolom MR-a. CB sve više zamjenjuje biopsiju tankom iglom u preoperativnoj dijagnostici te je metoda izbora u dijagnostici nepalpabilnih lezija s mikrokalcifikacijama. CB je sigurna metoda za dijagnosticiranje bolesti dojke s niskom incidencijom kliničkih komplikacija i s točnošću identifikacije benigne i maligne bolesti od preko 90 %. Osim preciznog dijagnosticiranja tipa tumora, omogućava i određivanje imunohistohemijskih parametara (HR, HER2 i Ki67) što je neophodno za određivanje prikladne kombinacije citostatika za neoadjuvantnu kemoterapiju kod uznapredovalog procesa.

Vakumska biopsija dojke, engl: VABB (Vacuum Assisted Breast Biopsy)

Vakum asistirana biopsija dojke vrši se specijalno konstruiranim aparatom: mamotomom. Kod biopsije mamotomom koriste se široke igle 8, 11 i 14 G, a materijal se uzima pod kontrolom ultrazvuka ili stereotaktičnim navođenjem. Držač i igla su priključeni na vakum i povezani sa specijalnim komoricama za prikupljanje bioptičkog materijala. Prednost nad biopsijom širokom iglom je reprezentativniji i veći uzorak tkiva (10 puta veći) te se izvodi kod nesukladnog nalaza CB i slikovnih metoda. (2,24)

Biopsija stražarskog limfnog čvora, engl: SNB (Sentinel Node Biopsy)

Tehnika SNB zasniva se na istraživanju Veronesija iz 1997. koji je dokazao da status limfnog čvora stražara – sentinel nodusa (prvi drenirajući limfni čvor u regionalnom limfonodusnom području koji drenira primarni tumor; Morton 1992) odražava status cijelog limfonodusnog područja.

Mapiranje stražarskog limfnog čvora prvi je korak u SNB, a radi se peritumoralnom, intradermalnom (iznad tumora) i subareolarnom aplikacijom boje (najčešće izosulfan plavo-Lymphazurin), radioaktivnim obilježivačem (koloidne čestice humanog albumina obilježene s tehnecijum – Tc-99 m) ili kombinacijom. Kombinacijom obiju tehnika moguće je u gotovo svih bolesnica s karcinomom dojke identificirati stražarski limfni čvor. Po aplikaciji radioaktivnog obilježivača (radiotracera), kompjuteriziranom gama kamerom se prati dinamika limfnog protoka do stražarskog limfnog čvora koji se obilježi na koži i potom intraoperativno gama-sondom locira te odstrani. U slučaju negativnog nalaza na prisutnost mikrometastaza, ne radi se daljnja evakuacija

pazušnih limfnih žlijezda već se provodi daljnja adjuvantna terapija kao u slučajevima N0 tumora dojke. (2,25)

Preoperativno markiranje

Kod svih suspektnih promjena, a posebno malih i nepalpabilnih tvorbi (<1 cm) koje su predviđene za kirurško odstranjenje, radi sigurnog i kompletnog odstranjenja, iste se označavaju. Preoperativno označavanje ili markiranje najčešće se radi pod kontrolom ultrazvuka pomoću specijalne žice za markiranje koja se uvodi što centralnije u promjenu. Markiranje se može učiniti i pomoću klipsi za markiranje ili bojom (najčešće metilen plavo) koje se ubrizga u promjenu pod kontrolom ultrazvuka. (2)

1.5. PATOHISTOLOGIJA RAKA DOJKE

Većina malignih tumora dojke su epitelni tumori koji se razvijaju od stanica koje oblažu kanaliće ili lobule; rjeđe su to neepitelni tumori potporne strome (angiosarkom, primarni stromalni sarkomi itd.).

S obzirom na zahvaćenost bazalne membrane i granice prema vezivnom tkivu koje okružuje maligne stanice u terminalnim duktalno-lobularnim jedinicama, karcinom dojke se dijeli na karcinom in situ (preinvazivna forma raka dojke) i invazivni karcinom.

• PREINVAZIVNA FORMA RAKA DOJKE

Duktalni karcinom in situ (DCIS)

DCIS čini ukupno oko 10-20% svih karcinoma dojke i oko 80% svih neinfiltrativnih "in situ" karcinoma. Obično se duktalni karcinom in situ (DCIS) otkriva tek mamografijom i ograničen je na jedno područje, a može postati invazivan. U simptomatskim slučajevima učestalost DCIS je oko 2-5% te se prezentira kao palpabilna masa, Pagetova bolest ili iscjedak iz bradavice. U screening programima frekvencija je oko 20-25%. Uz kalcifikate u 25- 59% slučajeva će se naći i DCIS. Ovaj se oblik pojavljuje u predmenopauzalnih i postmenopauzalnih žena te se javlja i u muškoj dojci.

U 10-15% slučajeva javlja se bilateralno i u 10% multicentrično. Prema obrascu rasta načinjena je histološka klasifikacija te se DCIS javlja u različitim formama: komedo,

solidni, kribriformni, mikropapilarni. U velikom broju slučajeva radi se o kombinaciji različitih formi, a opisani su i posebni rijetki tipovi DCIS koji uključuju apokrini, neuroendokrini, te oblik prstena pečatnjaka.

Noviji sistemi klasificiraju DCIS prema nuklearnom gradusu budući da je nuklearni gradus bolji pokazatelj prognoze od histoloških oblika. Određuje se na osnovi atipije jezgara i prisutnosti nekroze. Razlikuju se tri gradusa: niski gradus (gradus I), srednji gradus (gradus II) te visoki gradus (gradus III).

U oko 20% slučajeva DCIS dijagnosticiranog pomoću CNB po definitivnoj dijagnozi nakon kirurške biopsije biti će invazivni karcinom što je češće kod solidnih lezija nego kod mikrokalcifikacija.

Pri odluci o načinu liječenja DCIS, pomaže nam Van Nuys prognostički indeks (VNPI). Zasniva se na histološkom gradusu, veličini tumora i njegovim rubovima.

DCIS se liječi slično kao invazivni karcinom, pri čemu stoje dvije mogućnosti na raspolaganju: mastektomija s limfadenektomijom ili poštena operacija (široka ekscizija) s adjuvantnim liječenjem. Ukoliko se ne liječi, velika je vjerojatnost razvoja invazivnog karcinoma, a ako je primarno liječenje adekvatno (obično kirurško liječenje s radioterapijom), dugoročna prognoza DCIS je odlična, s 10–godišnjim preživljenjem većim od 95%.

Lobularna neoplazija (LN)

Termin lobularna neoplazija obuhvaća atipičnu lobularnu hiperplaziju (ALH), klasični lobularni karcinom in situ (LCIS) te pleomorfni lobularni in situ karcinom. Ovi procesi imaju sličnu morfologiju, biologiju i genetsko svojstvo. Lobularna neoplazija je obično slučajan nalaz kod bolesnika kod kojih je učinjena biopsija dojke. Razlika između ALH i LCIS je u veličini i u stupnju zahvaćenosti lobula.

LCIS se javlja s učestalošću 1-6% svih karcinoma dojke i 30-50% svih neinvazivnih karcinoma dojke. Zahvaća epitel najmanjih, terminalnih intralobularnih mliječnih kanalića (acinus), koji su prošireni i ispunjeni malignim stanicama, bez znakova prodora u stromu.

Tradicionalno su ALH i LCIS bili smatrani markerima za obostrani povećani rizik nastanka invazivnog karcinoma dojke prije nego direktni prekursor, ali se u zadnje vrijeme taj stav mijenja. Podatci danas govore da ALH i LCIS djeluju kao neobavezni prekursor invazivnog karcinoma slično kao i DCIS. Rizik je različit u odnosu na tip LN. Incidencija je povećana između 4 i 12 puta u odnosu na žene bez LN, a najčešće nastaje invazivni lobularni karcinom. Između 25 i 35% bolesnica s ovom dijagnozom

razvija invazivni oblik karcinoma nakon pritajenosti (nekad i do 40 godina), a jednako učestalo se pojavljuju na objema stranama. (16, 26-29)

Pleomorfni oblik LCIS ima agresivnu biologiju, najčešće je ER negativan, a HER2 pozitivan, prije često zamijenjivan s DCIS visokog stupnja, sada se lakše dijagnosticira zahvaljujući E-cadherinu te α i β cateninu.

Liječenje LCIS dijagnosticiranih s CNB je još uvijek kontroverzno. Lobularna neoplazija se ne očituje kao palpabilna masa, a nađe se u 1,2% svih biopsija. Promjena je često multifokalna i multicentrična te vrlo često bilateralna. Multicentričnost je u 60-85%, bilateralnost u 30-67% bolesnica, a kalcifikacije su prisutne u 8-53% pacijentica s LN-om.

Kod pozitivne obiteljske anamneze zbog visoke učestalosti multicentričnosti preporučuje se bilateralna mastektomija ili jednostrana mastektomija s kontralateralnom biopsijom. Otkriva se obično slučajno jer ne stvara nikakvu opipljivu masu, najčešće u predmenopauzalnih žena. (2,16, 27-29)

Pagetova bolest bradavice

Pagetova bolest bradavice oblik je duktalnog karcinoma in situ koji se širi na kožu bradavice i areole, a klinički se očituje u vidu upalne promjene. Kod ovog oblika karcinoma karakteristične stanice zvane Pagetove stanice nalaze se u epidermisu. U podlozi može biti i invazivni karcinom dojke.

• ZLOĆUDNI EPITELNI TUMORI DOJKE - KARCINOMI

Invazivni karcinom koji nije posebnog tipa (engl: NST No special type of invasive carcinoma); Stariji naziv; Duktalni invazivni karcinom. NST oblik je raka dojke u kojem prevladava tumorsko tkivo bez posebnih histoloških odlika iako dijelovi tog tumora mogu imati manja žarišta specifičnih tipova karcinoma dojke, ali oni ne smiju činiti više od 10% pregledanog tumora. Ovaj karcinom dojke je najčešći tip i čini 40 - 75% svih karcinoma dojke. Od svih invazivnih karcinoma dojke, invazivni karcinom koji nije posebnog tipa ima najlošiju prognozu. (2,17,30,31)

Invazivni lobularni karcinom dojke; drugi je po učestalosti i čini 5-15% svih invazivnih karcinoma dojke. Dijeli se na podtipove: klasični, alveolarni, solidni, tubulolobularni, pelomorfni i miješani. Klasični i miješani podtip čine oko 75% svih invazivnih lobularnih karcinoma dojke. Najbolju prognozu imaju bolesnice s klasičnim

podtipom, a najvažniji prognostički čimbenik su veličina tumora i status limfnih čvorova. ER su pozitivni u 80-95%, a PR u 60-70%. Ovaj tip raka je multicentričan u čak 31% slučajeva, a tumori su u 5-19% slučajeva obostrani. Učestalost aksilarnih metastaza se kreće 3-10%, a 5-godišnje preživljenje je oko 85%. (17,31,32)

Tubularni karcinom; prema SZO to je dobro diferencirani karcinom, kojeg karakterizira 90-postotna tubularna arhitektura. Češće se javlja u postmenopauzi, a javlja se u oko 2% svih epitelnih invazivnih karcinoma dojke. Većina je ER i PR pozitivna s niskim proliferativnim indeksom i negativnim HER2. Prognoza je jako dobra čak i kod bolesnica s metastazama u limfne čvorove. Preživljenje nakon mastektomije ili poštredne operacije dojke iznosi 99-100%. (17,31,33)

Mucinozni karcinom; karakterizira ga obilna produkcija ekstracelularne i intracelularne sluzi. Dijeli se na podtipove: čisti mucinozni, cistadenokarcinom i karcinom stanica prstena pečatnjaka. Čisti mucinozni se nalazi u 1-4% svih karcinoma dojke, najčešće u žena starijih od 75 godina. Većinom su dobro diferencirani, najčešće ER i PR pozitivni i HER2 negativni te imaju dobru prognozu s 5 i 10-godišnjim preživljenjem od 94 i 89%. (17,31,33)

Kribriformni karcinom; čini do 4% svih karcinoma dojke, a s obzirom na udio drugog histološkog tipa dijeli se na čistu i miješanu formu. ER su pozitivni u 100%, PR u 69%, a HER2 je negativan. Desetogodišnje preživljenje bolesnica s kribriformnim karcinomom dojke je između 90% i 100%. (31,33)

Karcinom s medularnim karakteristikama; dijagnoza medularnog karcinoma zahtjeva striktne dijagnostičke kriterije (oštro ograničen tumor, visoki histološki gradus sa sincicijalnim nakupinama tumorskih stanica i difuznim limfoplazmacitnim infiltratima između gnijezda tumorskih stanica). Zbog relativno niske reproducibilnosti u ovoj skupini tumora predlaže se termin karcinom s medularnim karakteristikama. Ovi tumori su češći u bolesnika s BRCA1 mutacijama, a relativno bolja prognoza veže se uz prisutnost izražene infiltracije B limfocitima i plazma stanicama. (17,31,33)

Karcinom s apokrinom diferencijacijom; fokalna apokrina diferencijacija je česta karakteristika invazivnih karcinoma ne specijalnog tipa (NST) i nekih karcinoma specijalnog tipa. Međutim, ekstenzivna apokrina diferencijacija nalazi se samo u oko 4% invazivnih karcinoma dojke. Ova vrsta karcinoma dojke obično je ER i PR negativna i HER2 pozitivna. Studije su pokazale da imaju sličnu prognozu kao invazivni karcinomi koji nisu posebnog tipa (NST) istog stupnja i gradusa. (17,31,33)

Invazivni mikropapilarni karcinom; čisti oblik ovog tumora je vrlo rijedak i čini oko 0,9-2% svih invazivnih karcinoma dojke. ER su pozitivni u 61-100% tumora, PR su pozitivni u 46-83%, a 10-35% tumora je HER2 pozitivno. Mikropapilarni karcinomi značajno češće invadiraju limfne i krvne žile te imaju metastaze u limfnim čvorovima u vrijeme dijagnoze u odnosu na karcinome ne specijalnog tipa (NST). Preživljenje se značajno ne razlikuje od karcinoma koji nije posebnog tipa (NST). (17,31,33-35)

Metaplastični karcinom; incidencija ovog tumora je 0,2-5% svih invazivnih karcinoma dojke. Najčešće se dijagnosticira kod žena starijih od 50 godina i u više od 90% slučajeva je ER, PR i HER2 negativan. Metaplastični karcinomi obuhvaćaju grupu neoplazmi karakteriziranih diferencijacijom neoplastičnog epitela u pločaste stanice i/ili mezenhimalne elemente (hrskavične, koštane, rabdomioidne stanice i sl.). Ove neoplazme mogu biti građene potpuno od metaplastičnih elemenata ili kombinacijom karcinoma sa metaplastičnim područjima.

Metaplastični karcinom dojke ima lošiji odgovor na adjuvantnu kemoterapiju i lošiji klinički ishod u odnosu na druge trostruko - negativne karcinome dojke, (17,26,31,33,36)

Ostali rijetki tipovi zloćudnih epitelnih tumora dojke; karcinom s neuroendokrinim karakteristikama, sekretorni karcinom, invazivni papilarni karcinom, karcinom acinarnih stanica, mukoepidermoidni karcinom, polimorfni karcinom, onkocitni karcinom, lipidima bogat karcinom, glikogenom bogat karcinom, sebacealni karcinom, karcinomi tipa adneksalnih žlijezda i kože, karcinomi s diferencijacijom prstena pečatnjaka. (17,31,33,37-39)

Invazivni epitelno – mioepitelni tumori; adenoidni cistični karcinom i adenomioepiteliom s karcinomom. (31,40)

Invazivne papilarne lezije; intraduktalni papilarni karcinom, enkapsulirani papilarni karcinom, solidni papilarni karcinom. (31)

• ZLOĆUDNI MEZENHIMALNI TUMORI – SARKOMI

Maligni mezenhimni tumori u dojci čine manje od 1% svih zloćudnih tumora dojke. Zajedničko im je da potječu iz mezenhimnih elemenata koji nisu osjetljivi na hormonalne utjecaje. Sarkomi najčešće metastaziraju krvlju, a metastaze u limfnim čvorovima su rijetke. (17)

Leiomyosarkom; tumor koji se javlja u manje od 1% svih neoplazmi dojke. Leiomyosarkom najčešće nastaje površno u koži, posebno oko areole i zahvaća oba spola, za razliku od rjeđeg oblika leiomyosarkoma koji nastaje u parenhimu, a koji se javlja samo kod žena. Leiomyosarkomi dojke se javljaju najčešće u odraslih i to u četvrtoj i sedmoj životnoj dekadi. Leiomyosarkomi u koži se liječe širokom ekscizijom dok se u leiomyosarkomi parenhima dojke liječe mastektomijom. (17,31)

Liposarkom; vrlo se rijetko javlja u dojci, a incidencija liposarkoma među sarkomima dojke je između 5% i 10%. Obično se javlja u dobi 19-76 godina i prezentira se kao spororastuća, ponekad bolna masa. Dobro diferencirani liposarkom dojke obično se potpuno izliječi širokom ekscizijom sa čistim rubovima. Lokalni recidiv u slučaju pozitivnih rubova nastupa u 20-30% slučajeva. Pleomorfni liposarkom u 30-50% daje udaljene metastaze, najčešće u pluća. Recidiv i smrt kod pleomorfnog tipa obično nastupi za dvije godine. (17,31)

Rabdomiosarkom; vrlo rijedak tumor u dojci, opisan je u dobi 11-70 godina i vrlo je agresivne prirode. Metastatski rabdomiosarkom u dojci (najčešće iz okrajina, nazofarinksa/paranasalnih sinusa ili tijela) češći je tip od primarnog rabdomiosarkoma, a obično se javlja kod djece i znak je diseminirane bolesti sa vrlo lošom prognozom. (17,31)

Osteosarkom; čini 12% od svih sarkoma dojke, a javlja se u prosječnoj dobi od 64,5 godine. Lokalni recidivi nastaju u više od dvije trećine bolesnika liječenih lokalnom ekscizijom te u 11% bolesnika liječenih mastektomijom. Osteosarkomi dojke su tumori iznimno agresivne prirode, s 5-godišnjim preživljenjem od 38%. (17,31)

Angiosarkom; javlja se u dobi 15-75 godina. Primarni angiosarkom javlja se u parenhimu dojke dok sekundarni nastaje u koži, prsnom košu ili parenhimu dojke kao rezultat postoperativne radioterapije karcinoma dojke. Metastazira obično u pluća, kožu, kosti i jetru, dok su metastaze u limfnim čvorovima rijetke. U pravilu je agresivan tumor, prosječno preživljenje za I. stadij bez znakova bolesti je 15 godina, za II. stadij 12 godina, a za III. stadij 15 mjeseci. (17,31)

- **OSTALE MALIGNNE LEZIJE DOJKE**

Ostale maligne lezije dojke uključuju: fibroepitelne tumore (maligni filodes, periduktalni stromalni tumor niskog stupnja), limfome (difuzni limfom velikih B stanica, Burkittov limfom, limfom T – stanica, limfom MALT tipa i folikularni limfom) i metastatske tumore.

1.6. STADIJI RAKA DOJKE

Pri određivanju kliničkog stadija raka dojke, koristimo se TNM klasifikacijom koju je prihvatilo udruženje AJCC (American Joint Commission on Cancer Staging and Results Reporting). S vremenom se TNM klasifikacija mijenjala i nadopunjavala, a posljednje izmjene učinjene su 2010. godine. Klasifikacija uključuje veličinu primarnog tumora (T), status limfnih čvorova (N) i prisutnost metastaza (M). (41)

TNM klinička i patološka klasifikacija karcinoma dojke

T - primarni tumor

TX: primarni tumor se ne može odrediti.

T0: primarni tumor nije dokazan.

Tis: karcinom in situ.

Tis (DCIS): Duktalni karcinom in situ.

Tis (LCIS): Lobularni karcinom in situ.

Tis (Paget): Pagetova bolest bradavice bez tumora, bez povezanosti sa invazivnim karcinomom i/ili karcinomom in situ (DCIS i/ili LCIS) u podležućem parenhimu dojke. Karcinomi u parenhimu dojke povezani s Pagetovom bolešću su kategorizirani na osnovu veličine i karakteristike parenhimalne bolesti iako se Pagetova bolest također treba naznačiti.

T1: Tumor ≤ 20 mm u najvećoj dimenziji.

T1mi: Mikroinvazija ≤ 1 mm u najvećoj dimenziji.

T1a: Tumor >1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećoj dimenziji.

T1b: Tumor >5 mm, ali ≤ 10 mm u najvećoj dimenziji.

T1c: Tumor >10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećoj dimenziji.

T2: Tumor >20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećoj dimenziji.

T3: Tumor >50 mm u najvećoj dimenziji.

- T4: Tumor bilo koje veličine s direktnim širenjem na torakalnu stijenku i/ili sa širenjem u kožu (ulceracija ili kožni čvorići).
- T4a: Širenje na torakalnu stijenku, osim izolirane adhezije i invazije velikog prsnog mišića.
- T4b: Ulceracije i/ili satelitski čvorići u istoj dojci i /ili edem kože (uključujući „peaud’orange“, odnosno kožu poput narančine kore).
- T4c: T4a i T4b.
- T4d: Inflamatorni karcinom.

N - Regionalni limfni čvorovi

Klinički

- NX: Regionalni limfni čvorovi ne mogu se odrediti (npr. prethodno uklonjeni).
- N0: Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima.
- N1: Metastaze u I. i II. redu ipsilateralnih pomičnih pazušnih limfnih čvorova.
- N2: Metastaze u I. i II. redu ipsilateralnih pazušnih limfnih čvorova klinički fiksirani ili otkriveni kliničkim pretragama; limfni čvorovi uz ipsilateralnu unutarnju mamarnu arteriju u odsutnosti klinički evidentnih metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.
- N2a: Metastaze u I. i II. redu ipsilateralnih pazušnih limfnih čvorova klinički fiksirane međusobno ili za druge strukture.
- N2b: Metastaze klinički dokazane u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz odsustvo klinički evidentnih metastaza u I. i II. redu pazušnih limfnih čvorova.
- N3: Metastaze u ipsilateralnim infraklavikularnim (III. red aksilarnih limfnih čvorova) limfnim čvorovima s ili bez zahvaćenosti I. i II. reda aksilarnih limfnih čvorova, ili kod klinički dokazanih ipsilateralnih limfnih čvorova uz unutarnju mamarnu arteriju s klinički evidentnim metastazama u I. i II. redu, ili metastazama u ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim čvorovima sa zahvaćenim ili bez zahvaćenih aksilarnih ili čvorova uz unutarnju mamarnu arteriju.
- N3a: Metastaze u ipsilateralnim infraklavikularnim limfnim čvorovima.
- N3b: Metastaze u ipsilateralnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju i aksilarnim limfnim čvorovima.
- N3c: Metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim čvorovima.

Patološki (pN)

- pNX: Regionalni limfni čvorovi ne mogu se odrediti (npr. prethodno uklonjeni ili nisu uklonjeni za patološki pregled).
- pN0: Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki.
- pN0(i-): Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativna imunohistokemijska analiza (IHC).
- pN0(i+): Maligne stanice u regionalnim limfnim čvorovima ne prelaze veličinu od 0,2 mm (detektirane H/E ili IHC).
- pN0(mol-): Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki, negativna molekularna analiza (RT-PCR).
- pN0 (mol+): Pozitivna molekularna analiza (RT-PCR), ali nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima histološki ili IHC.
- pN1: Mikrometastaze, ili metastaze u 1-3 aksilarna limfna čvora, i/ili u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju detektirani biopsijom limfnog čvora, ali ne i klinički.
- pN1mi: Mikrometastaze (veće od 0,2 mm i /ili više od 200 stanica, ali ne veće od 2 mm).
- pN1a: Metastaze u 1-3 aksilarna limfna čvora, najmanje jedna metastaza veća od 2 mm.
- pN1b: Metastaze u limfnom čvoru uz unutarnju mamarnu arteriju s mikrometastazama ili makrometastazama detektiranim biopsijom sentinel limfnog čvora, ali ne i klinički.
- pN1c: Metastaze u jednom do tri limfna čvora i u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju s mikrometastazama ili makrometastazama koje su otkrivene biopsijom sentinel limfnog čvora, ali ne i klinički detektirane.
- pN2: Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova, ili klinički detektirane metastaze u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz odsutnosti metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.
- pN2a: Metastaze u 4-9 aksilarnih limfnih čvorova (najmanje jedan tumorski depozit veći od 2 mm).
- pN2b: Metastaze u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz odsustvo metastaza u pazušnim limfnim čvorovima.

- pN3: Metastaze u deset ili više pazušnih limfnih čvorova, ili u infraklavikularnim (III. red aksilarnih limfnih čvorova) limfnim čvorovima, ili klinički otkrivene metastaze limfnih čvorova uz ipsilateralnu unutarnju mamarnu arteriju uz prisustvo jednog ili više pozitivnih limfnih čvorova u I. i II. redu aksilarnih limfnih čvorova ili u više od tri pazušna limfna čvora s mikrometastazama ili makrometastazama u limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju utvrđeno biopsijom sentinel limfnog čvora, ali ne i klinički, ili metastaza u ipsilateralnom supraklavikularnom limfnom čvoru.
- pN3a: Metastaze u 10 ili više pazušnih limfnih čvorova (najmanje jedan tumorski depozit je veći od 2 mm); ili metastaza u infraklavikularnom limfnom čvoru (III. red aksilarnih limfnih čvorova).
- pN3b: Klinički dokazane metastaze u ipsilateralnim limfnim čvorovima uz unutarnju mamarnu arteriju uz prisustvo jedne ili više metastaza u pazušnim limfnim čvorovima; ili više od tri aksilarna limfna čvora uz klinički negativne limfne čvorove uz unutarnju mamarnu arteriju, ali s mikrometastazama ili makrometastazama koje su otkrivene biopsijom sentinel limfnog čvora.
- pN3c: Metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim limfnim čvorovima.

M - udaljene metastaze

- MX: Postojanje udaljenih metastaza ne može se odrediti.
- M0: Nema kliničkih ili radiografskih dokaza za udaljene metastaze.
- cM0(i+): Bez kliničkih ili radiografskih dokaza udaljenih metastaza, ali depoziti molekularno ili mikroskopski detektiranih tumorskih stanica u cirkulirajućoj krvi, koštanoj srži ili drugom neregionalnom čvoru koji nije veći od 0,2 mm kod pacijenta bez simptoma ili znakova metastaza.
- M1: Udaljene detektabilne metastaze detektirane klasičnim i radiografskim sredstvima i/ili histološki dokazane veće od 0,2 mm.

Na osnovu TNM klasifikacije, AJCC određuje stadije karcinoma dojke koji se koriste prilikom određivanja prognoze bolesti te određivanja najprikladnijeg načina liječenja s obzirom na stupanj proširenost bolesti.

Tablica 1: Stadiji karcinoma dojke prema AJCC iz 2010. godine. (41)

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

* T1 uključuje i T1mi

** T0 i T1 tumori s

mikrometastazama u limfnim

čvorovima se isključuju iz Stadija

IIA i klasificiraju se kao Stadij IB.

1.7. LIJEČENJE KARCINOMA DOJKE

1.7.1. Kirurško liječenje karcinoma dojke

Moderno kirurško liječenje karcinoma dojke započinje u kasnom 19. stoljeću, kada američki kirurg William Halsted inspiriran istraživanjem njemačkog patologa Rudolfa Virchowa, opisuje radikalnu mastektomiju u liječenju karcinoma dojke. Operacija je uključivala odstranjenje dojke, oba pektoralna mišića te ipsilateralne aksilarne limfne čvorove, a na taj način je poštovana Virchowljeva hipoteza po kojoj se karcinom dojke širi u fascijalnim prostorima i limfnim putevima. Početkom 20-og stoljeća, radikalna mastektomija je postala standard liječenja karcinoma dojke. Naknadna istraživanja pokazala su da širenje u ipsilaterale pazušne limfne čvorove nije isključivi način širenja karcinoma te se krajem 20-og stoljeća ova metoda napušta, a usvajaju se manje radikalne metode kao što su modificirana radikalna mastektomija (MRM) i jednostavne ekscizije tumora dojke.

Razlog za usvajanje manje invazivnih metoda kirurškog liječenja odnosno razvoj poštenije kirurgije dojke vezan je uz razvoj dijagnostike koja omogućuje pronalaženje manjih tumora, pogodnih za takvu vrstu kirurškog liječenja, kao i razvoj radioterapije.

Potaknuti Halstedovom teorijom karcinoma dojke kao lokalno progresivnom bolešću na čije izlječenje utječe ekstenzivnost operativnog zahvata, posljednjih 30-ak godina učinjeno je šest prospektivnih randomiziranih studija na velikom broju bolesnica. U istraživanjima Milan I, NSABP-06, Instituta Gustav Roussy, Američkog nacionalnog instituta za rak, Europske organizacije za istraživanje i liječenje karcinoma (EORTC) i Danske grupe, uspoređivana je radikalna mastektomija ili modificirana radikalna mastektomija s manje radikalnim odnosno poštenim operacijama dojke s disekcijom aksile. Navedena istraživanja su pokazala da ekstenzivnost mastektomije nije imala utjecaj na preživljenje odnosno mortalitet od raka dojke. (42-48)

U najvećoj studiji od spomenutih NSABP-06, bolesnice su podijeljene u tri skupine: totalna mastektomija s aksilarnom disekcijom, tumorektomija s aksilarnom disekcijom te tumorektomija s aksilarnom disekcijom i naknadnom radioterapijom. U studiju su bile uključene bolesnice s tumorom do 5 cm, dok se tumorektomija radila do veličine tumora od 4 cm. U studiji nije dokazana razlika u preživljenju između bolesnica u trima skupinama, ali je dokazano značajno smanjenje recidiva kod bolesnica u skupini kojima je rađena tumorektomija s aksilarnom disekcijom i naknadnom radioterapijom. Rizik lokalnog recidiva je smanjen s 40% kod bolesnica s tumorektomijom bez naknadne radioterapije na 10%. Studija je pokazala vrijednost poštenih operacija dojke kao i važnost nadopunjavanja poštenih operacija dojke radioterapijom. (45)

Veliki doprinos razvoju poštenih operacija karcinoma dojke dala su istraživanja Veronesija i suradnika na Institutu za rak u Milanu, a odobrena od strane Svjetske zdravstvene organizacije (SZO). U Milanskoj studiji I uspoređivana je radikalna mastektomija s poštenom operacijom dojke koja je uključivala odstranjenje tumora, disekciju aksile i naknadnu radioterapiju mjesta tumora, a u studiju su uključene bolesnice s tumorom manjim od 2 cm te negativnim limfnim čvorom u aksili, odnosno bolesnice s T1N0 karcinomom dojke. Odstranjenje tumora bilo je nešto radikalnije te je uključivalo odstranjenje kože iznad tumora, slobodni rub oko tumora 2-3 cm te pektoralnu fasciju ispod tumora, a budući da je u osnovi to uključivalo odstranjivanje

cijelog kvadranta oboljele dojke, formirao se i naziv kvadrantektomija. Istraživanje je pokazalo da nije bilo razlike između radikalnog i poštjednog operativnog zahvata s naknadno provedenom radioterapijom. (43,49) Radi utvrđivanja doprinosa kirurškog zahvata i radioterapije u lokalnoj kontroli bolesti, provedena je Milanska studija II u kojoj su uspoređene dvije skupine bolesnica: bolesnice liječene kvadrantektomijom i disekcijom aksile s naknadnom lokalnom radioterapijom te bolesnice liječene tumorektomijom, disekcijom aksile i lokalnom radioterapijom. U obje skupine veličina tumora bila je do 2,5 cm. Studija je pokazala statistički značajnu razliku pojave lokalnog recidiva u korist skupine kod koje je učinjena samo tumorektomija, ali koji nije utjecao na ukupno preživljenje. Zaključak studije je da je ekstenzivna intraduktalna komponenta tumora negativni prognostički čimbenik za pojavu recidiva bolesti te da je za lokalnu kontrolu bolesti potrebno učiniti široku eksciziju tumora u smislu kvadrantektomije. (50) Milanska studija III pokazala je značajno veći rizik lokalnog recidiva u bolesnica koje nisu dodatno liječene radioterapijom te veći postotak recidiva u bolesnica mlađih od 55 godina. (51)

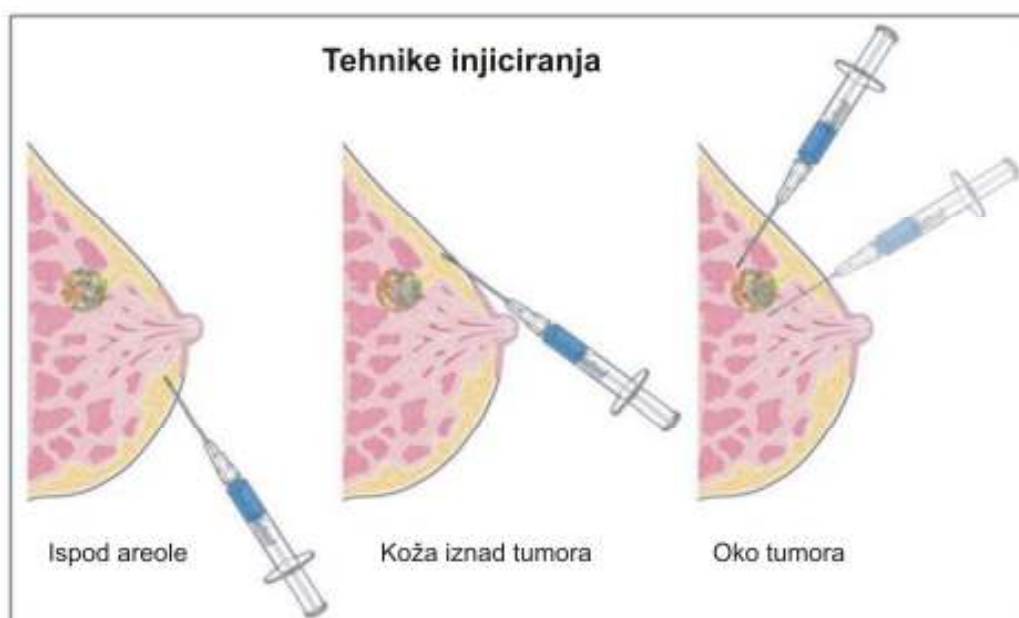
Zahvaljujući provedenim studijama, danas se u većini slučajeva (ovisno o lokalizaciji i veličini tumora) može učiniti **poštedna operacija dojke**. Poštedne operacije raka dojke obuhvaćaju zahvate kojima se uklanja tumor s različito širokim rubom zdravog tkiva oko tumora, ali ne i cijela dojka. U ovu skupinu zahvata spadaju: tumorektomija, segmentektomija i kvadrantektomija.

Integralni dio ovih operacija je uklanjanje limfnih čvorova iz pripadajuće pazušne jame. Aksilarna disekcija se vrši zbog dvaju bitnih razloga: provođenja regionalne kontrole bolesti i određivanja stadija bolesti (budući da je status limfnih čvorova najveći pokazatelj metastatskog potencijala tumora). Studije su pokazale da ukoliko nema ekstenzivne zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, disekcija prvih dvaju redova limfnih čvorova u 96 – 99 % slučajeva adekvatno pokazuje status aksilarnih limfnih čvorova. (42,52) Status aksilarnih limfnih čvorova smatra se važnim prognostičkim faktorom za bolesnice s karcinomom dojke i trenutno nema dokaza da se može izostaviti u liječenju bolesnica s invazivnim karcinomom dojke. Disekcija aksile nosi povećani rizik komplikacija od kojih je najteža limfedem ruke.

U novije vrijeme primjenjuje se tehnika odstranjenja "**sentinel čvora**" (čvora stražara - prvog limfnog čvora koji drenira područje tumora, a koji prima kontrastno sredstvo ubrizgano u ležište tumora (SLNB)). U slučaju negativnog nalaza, odnosno odsustva metastaza u čvoru stražaru, operativni zahvat se ovim završava. Kod

metastatske zahvaćenosti čvora stražara otklanjanju se i ostali limfni čvorovi aksile. (42,52) Kao kontrastno sredstvo za prikaz se koristi subareolarno, peritumoralno i/ili intradermalno injicirana limfotropna boja i/ili radioaktivni izotop koloid humanog albumina obilježen tehnecij-pertehnetatom. (Slika 3)

Navedenu tehniku je prvi opisao Cabanas kod karcinoma penisa, a potom i Morton kod staginga limfnih čvorova u liječenju melanoma. (53,54) Multicentrična randomizirana studija na 5611 bolesnica pokazala je da nema razlike u preživljenju i regionalnoj kontroli bolesti kod bolesnica kod kojih je rađena SLNB s ALND i ALND samo kod pozitivnih SLNB. (55) Kontraindikacije za tehniku SLNB su klinički pozitivni limfni čvorovi u aksili, udaljene metastaze te prethodna operacija aksile i zračenje aksile radi utjecaja na tok limfnih puteva. (56) Postotak lažno negativnih nalaza kod SLNB je od 0 do 15% sa srednjom vrijednosti od 8,8% u odnosu na 4% kod aksilarne disekcije, što može dovesti do pogrešnih odluka glede adjuvantne terapije i na taj način utjecati na ishod liječenja. Jednako tako, u kliničkim studijama se još uvijek provjerava dugotrajni efekt SLNB u smislu ostavljanja ostalih limfnih čvorova u aksili. S obzirom na pozitivne strane SLNB, u prvom redu dokazano manji morbiditet u odnosu na disekciju limfnih čvorova aksile, SLNB se smatra boljom alternativnom opcijom od standardne disekcije limfnih čvorova aksile. (42,57,58)



Slika 3: Mjesta injiciranja sredstva za praćenje kod SLNB (plava boja i radiokoloid). Preuzeto iz: Jatoi I, Kaufmann M. Management of breast diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

Iako su većina bolesnica s primarnim karcinomom dojke kandidati za poštenu kirurgiju dojke, postoje i kontraindikacije. Radi se o relativnim kontraindikacijama, ali upućuju na potrebu individualiziranja operativnog zahvata za svaku bolesnicu:

Kontraindikacije za poštenu kirurgiju dojke:

- želja bolesnice
- trudnoća
- prethodno provedena radioterapija prsnog koša
- veličina tumora u odnosu na dojk
- centralno smješten tumor
- sistemna bolest kolagena (sklerodermija)
- multicentrična bolest (zahvaćenost više od jednog kvadranta dojke)
- tumori s ekstenzivnom komponentom DCIS.

Zahvaljujući razvoju **onkoplastične kirurgije** koja uključuje tehnike parcijalne rekonstrukcije dojke remodeliranjem volumena dojke mobilizacijom lokalnog glandularnog ili dermoglandularnog reznja i transpozicijom u defekt ili transferom analognog tkiva s udaljenih mjesta u reseksijski defekt (kao zamjena za izgubljeni volumen resekcijom), omogućena je opsežnija resekcija tkiva dojke s boljim estetskim rezultatom.

S obzirom da je nakon poštedne kirurgije dojke, radi lokalne kontrole bolesti, u većini slučajeva potrebna lokoregionalna radioterapija, određeni broj bolesnica odlučuje se za mastektomiju. (59)

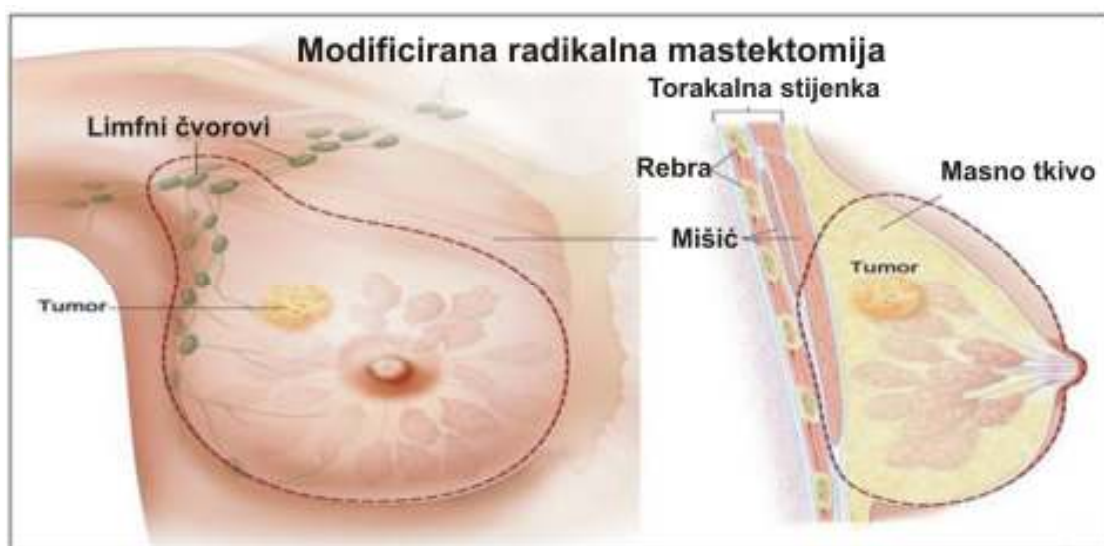
Današnja standardna operacija uznapređovalog raka dojke je **modificirana radikalna mastektomija** (MRM) s aksilarnom limfadenektomijom ukoliko je sentinel limfni čvor pozitivan. Kod ove operacije odstranjuje se dojka u cijelosti kao i površinski slojevi pektoralne fascije uz limfne čvorove pripadajuće aksile. Nakon operacije ovoga tipa, radioterapija je indicirana samo u slučajevima velikih tumora (većih od 5 cm) i/ili ekstenzivne zahvaćenosti limfnih čvorova. (42)

Relativna kontraindikacija modificiranoj radikalnoj mastektomiji lokalno je uznapređovali karcinom dojke koji zahtijeva preoperativno neoadjuvantno liječenje. U radikalne operacije dojke ubrajaju se i mastektomija s poštedom kože (engl: SSM, Skin Sparing Mastectomy) te mastektomija s poštedom kože i bradavice (engl: SNSM, Skin and Nipple-areola complex Sparing Mastectomy).

Indikacije za mastektomiju s poštedom kože i mamila areola kompleksa:

- profilaktička mastektomija (BRCA 1, 2)
- bolesnice s visoko rizičnim bolestima dojke (LCIS)
- DCIS (kada reekscizijom ne možemo postići negativan rub)
- multicentrični tumor (MR)
- T1, T2 (tumor u maloj dojci)
- difuzne mikrokalcifikacije
- recidiv nakon poštedne kirurgije dojke.

Kod bolesnica koje imaju obiteljsku predispoziciju za nastanak raka dojke, odnosno koje su nosioci BRCA1 ili BRCA2 genskih mutacija, opravdana je tzv. **profilaktička mastektomija**, radi povećane mogućnosti razvoja karcinoma i u zdravoj dojci.



Slika 4: Modificirana radikalna mastektomija. Preuzeto iz: www.cancer.gov.

Bolesnicama kojima je učinjena mastektomija, u prvom redu bolesnicama koje zbog relativnih kontraindikacija nisu kandidati za poštedne operacije dojke, trebala bi biti preporučena jedna od opcija rekonstrukcije dojke. Rekonstrukcije dojke se mogu učiniti istovremeno s mastektomijom (**primarna rekonstrukcija**) ili naknadno (**sekundarna rekonstrukcija dojke**). Iako je prvotno postojala bojazan da primarna rekonstrukcija dojke može maskirati recidiv bolesti, istraživanja su pokazala da primarna rekonstrukcija ne utječe na ishod bolesti. (42,60) Primarna rekonstrukcija je

superniornija u estetskom smislu, daje bolji rezultat i ne zahtijeva dodatni operativni zahvat. Sekundarna rekonstrukcija se radi ukoliko bolesnice ne žele primarnu rekonstrukciju ili ako je potrebno čim prije započeti s adjuvantnim liječenjem. (42)

Rekonstrukcija dojke nakon mastektomije ima vrlo veliki utjecaj na psihičko stanje i oporavak bolesnice, a moguće ju je učiniti pomoću implantata, mišićno-kožnog reznja ili kombinacijom.

Rekonstrukcija s upotrebom implantata moguća je na tri načina:

1. upotrebom ekspandera koji se nakon postignutog željenog volumena zamijeni trajnim implantatom
2. upotrebom trajnog implantata s mogućnošću ekspandiranja
3. upotrebom trajnog implantata bez mogućnosti ekspanzije.

Mišićno-kožni režanj u rekonstrukciji dojke radi se ili kao peteljasti režanj u slučaju upotrebe m. latissimus dorsi ili rectus abdominis mišićnog reznja gdje je potrebna mikrovaskularna tehnika pri preparaciji reznja, ali se režanj ne odvaja u potpunosti od svojih vaskularnih struktura ili kao mikrovaskularni režanj gdje je tkivo potpuno odvojeno od svojih vaskularnih struktura te se spaja na krvne žile primajuće regije, obično na arteriju mamariu prilikom rekonstrukcije dojke (rectus abdominis mišićni režanj, perforatorski reznjevi sa trbušne stijenke, glutealni režanj, gracilis režanj i sl.). Režanj latissimus dorsi ima manji broj komplikacija u odnosu na druge reznjeve, ali se zbog malog volumena samog reznja obično kombinira s trajnim implantatom radi postizanja većeg volumena i simetrije dojke. (2,61-63)

Iako postoje velike mogućnosti u rekonstrukciji dojke, još uvijek je postotak rekonstrukcija dojki nakon mastektomije u svijetu relativno nizak, najčešće radi nedovoljne informiranosti da rekonstruktivni postupak uglavnom ne interferira s daljnjim onkološkim liječenjem. (61,64)

1.7.2. Adjuvantno liječenje karcinoma dojke

Terapija koja se daje nakon kirurškog zahvata s ciljem eliminiranja eventualno preostalih stanica tumora i smanjenja rizika nastanka recidiva tumora naziva se adjuvanta terapija.

Kao adjuvantno liječenje karcinoma dojke koristi se:

- radioterapija
- kemoterapija
- hormonsko liječenje
- ciljana terapija karcinoma dojke.

Radioterapija

Radioterapija se koristi x-zrakama visoke energije ili drugim načinima zračenja za uništavanje ili sprečavanje rasta tumorskih stanica koje mogu zaostati nakon operativnog liječenja u dojci, prsnom košu ili limfnim čvorovima. Razlikujemo radioterapiju vanjskim snopom zraka i brahiterapiju. **Radioterapija vanjskim snopom zraka** obično se aplicira nakon poštredne kirurške terapije karcinoma dojke na cijelu dojk u tangencijalnim poljima s uobičajenom preporučenom tumorskom dozom od 45 do 50 Gy, raspodijeljena po frakcijama tijekom 5-6 tjedana s dodatnom dozom zračenja ili bez nje (boost) na ležište tumora od 10 do 16 Gy kod bolesnica s visokim rizikom (<50 godina i visoki gradus). **Brahiterapija ili intersticijska radijacija** može se aplicirati samostalno ili kao dodatna radioterapija uz radioterapiju vanjskim snopom zraka i izvodi se postavljanjem radioaktivne supstance pomoću igle, katetera ili žice u tumor, pored njega ili u područje mjesta izvađenog tumora. Izbor načina same radioterapije ovisi o vrsti karcinoma i stadiju bolesti.

Rizik recidiva karcinoma nakon poštrednog kirurškog liječenja je veći od 20% čak i kod N0 bolesnica te se nakon poštrednog kirurškog zahvata kod invazivnog karcinoma dojke liječenje obvezatno nastavlja zračenjem, tj. adjuvantnom radioterapijom radi sprečavanja recidiva bolesti. Pri tome se kod negativnih limfnih čvorova i T1-T2 tumora zrači ležište tumora (dojka i stijenka prsnog koša), a ukoliko su limfni čvorovi pozitivni, neophodno je ozračiti i regionalne limfne puteve. Površina zračenja ovisi o broju i lokalizaciji pozitivnih limfnih čvorova, a kod medijalne lokalizacije tumora potrebno je ozračiti i parasternalne limfne puteve. Radioterapija nakon poštredne kirurgije dojke smanjuje lokalni recidiv za oko 70% što je i dokazano u različitim studijama. Povezanost preživljenja i lokalne kontrole bolesti primjenom radioterapije dokazana je u meta-analizi iz 2005. godine. Navedena studija je pokazala da radioterapija nakon poštredne kirurgije dojke kod bolesnica s negativnim limfnim čvorovima smanjuje rizik za 5-godišnji recidiv bolesti za 16,1%, 15-godišnji mortalitet od karcinoma dojke za 5,1%, a 15-godišnje preživljenje povećava za 4,6%.

Kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima radioterapija poboljšava lokalnu kontrolu bolesti za 30%, 15-godišnju smrtnost smanjuje za 7,1%, a 15-godišnje preživljenje povećava za 8,2%. Ovo je istraživanje pokazalo da radioterapija nakon poštjednog kirurškog liječenja karcinoma dojke utječe pozitivno na lokalnu kontrolu bolesti kao i na preživljenje. (65,66) U dosada dostupnim kliničkim studijama na temelju kliničke i histološke slike nije se uspjelo utvrditi koja skupina bolesnica ima niži rizik za razvoj recidiva nakon poštjednog kirurškog liječenja bez dodatno provedene radioterapije, odnosno kojoj skupini bolesnica nakon poštjednog kirurškog liječenja radioterapija neće biti potrebna.

Postoji veliki broj tehnika kojima se postiže ubrzana radioterapija ograničenog dijela dojke, a uključuju intersticijsku brahiterapiju, ograničenu radioterapiju vanjskim zrakama, brahiterapiju unutar šupljine i ograničenu intraoperativnu radioterapiju. Radioterapija ograničenog dijela dojke još uvijek je u fazi istraživanja, a eventualne prednosti su smanjenje dužine trajanja liječenja radioterapijom aplikacijom većih dnevnih doza na ciljano područje, veća mogućnost korištenja poštjedne kirurgije dojke te smanjenje komplikacija izazvanih radioterapijom. Budući da su novija istraživanja pokazala da se mikroskopski bolest širi samo 1 do 2 cm izvan šupljine nakon tumorektomije, ciljana radioterapija većim dozama zračenja u područje zaostale šupljine nakon tumorektomije provodi se radi eradikacije tumorskih stanica u okolnom tkivu dojke. (65,67-70) Svi histološki tipovi invazivnog karcinoma dojke mogu se liječiti poštjednog kirurgijom dojke s naknadnom radijacijskom terapijom, a godišnji postotak recidiva kreće se oko 0,5%. Nakon poštjedne kirurgije dojke nije potrebno adjuvantno zračenje tkiva dojke u bolesnica starijih od 70 godina s negativnim aksilarnim limfnim čvorovima, pozitivnim estrogenskim receptorima i T1 tumorima. (2)

Postoperativna radioterapija je integralni dio liječenja nakon poštjedne kirurgije dojke, a moderne tehnike radioterapije reduciraju ili eliminiraju toksičnost zraka na ostale organe, posebice na pluća i srce. (70) Skupina bolesnica s najvećim rizikom recidiva nakon mastektomije, a kojima se preporučuje postoperativna radioterapija uključuje bolesnice s četiri ili više pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova, jasna ekstrakapsularna ekstenzija metastaza u limfnim čvorovima, T3 tumori, pozitivni ili minimalni reseksijski rubovi. (71,72)

Zračenje dojke i regionalnih limfnih čvorova kao adjuvantno liječenje ili liječenje recidiva bolesti može se provesti i nakon učinjene rekonstrukcije dojke. Kod zračenja

dojke rekonstruirane protezom povećana je mogućnost kapsularne kontrakcije, što dovodi do loših estetskih rezultata radi čega je potrebno vađenje implantata i druge rekonstrukcijske opcije.

Kemoterapija

Kemoterapija je način liječenja karcinoma lijekovima koji ubijaju stanice raka ili sprečavaju njihov rast i dijeljenje. Ukoliko se kemoterapeutik aplicira oralno, intravenski ili intramuskularno, lijek dolazi u krvotok, djeluje na tumorske stanice u cijelom tijelu i tada govorimo o **sistemskej kemoterapiji**. Ako se kemoterapeutik aplicira samo u predjelu određenog organa ili šupljine, primjerice intraabdominalno, tada se radi o **regionalnoj kemoterapiji**. Odabir kemoterapije ovisi o tipu i vrsti tumora. Kemoterapija se može aplicirati i prije operativnog zahvata i tada govorimo o **primarnoj ili neoadjuvantnoj kemoterapiji**. Cilj ovog liječenja je smanjenje veličine tumora i tkiva koji se treba naknadno ukloniti tijekom kirurškog zahvata. Smanjenje tumora omogućuje mastektomiju u prethodno neoperabilnih bolesnica ili poštediti kirurški zahvat, ovisno o veličini tumora. **Palijativnom kemoterapijom** nastoji se postići djelomična ili potpuna remisija bolesti te se primjenjuje dok postoji terapijski odgovor, s ciljem smanjenja simptoma bolesti odnosno poboljšanja kvalitete života. Kemoterapijom se ubijaju stanice raka djelujući na životni ciklus stanice, indukcijom apoptoze. Budući da normalne stanice djelovanjem kemoterapeutika također bivaju oštećene na isti način, javlja se kemoterapijom uzrokovana toksičnost.

Kemoterapija se počela razvijati 60-ih godina s ciljem eradikacije rezidualne mikrometastatske bolesti nakon lokalnog liječenja kako bi se smanjio rizik za recidiv i smrtnost od karcinoma. Početne studije tijekom 60-ih godina jasno su pokazale korist adjuvantne kemoterapije kod skupina bolesnica s visokim rizikom recidiva bolesti. Između različitih kemoterapeutskih protokola, kombinacije kemoterapeutika koje su uključivale ciklofosamid, metotreksat i 5-florouracil (CMF), pokazale su dugotrajan povoljan učinak operiranih bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima s godišnjom stopom smanjenja recidiva za 23% te smrti za 1 %. (73-76) Krajem 70-ih i početkom 80-ih godina u prospektivnim randomiziranim studijama testirani su kemoterapeutici koji su sadržavali antracikline. Za protokole FAC (Ciklofosamid, Doxorubicin i 5-Florouracil), FEC (Ciklofosamid, Epirubicin i 5-Florouracil) i AC (Doxorubiin i Ciklofosamid) dokazali su smanjenje recidiva za 11,2% te smrtnosti za 16 % u odnosu na prethodne CMF protokole. (76,77) Istraživanja su pokazala da šest ciklusa adjuvantne terapije po protokolu FEC daje bolje rezultate od tri ciklusa iste terapije

kod bolesnica s operabilnim karcinomom dojke i da nema razlike u preživljenju za liječenje istim protokolom dužim od šest mjeseci. (76,78) Stoga je 90-ih godina postignut konsenzus da je kombinacija triju različitih kemoterapeutika koja uključuje i antraciklin kroz šest ciklusa optimalan način adjuvantnog liječenja kod operabilnih karcinoma s pozitivnim limfnim čvorovima. Zadnjih se godina u adjuvantnom liječenju kemoterapijom sve više koriste taksani (paclitaxel i docetaxel) koji se 90-ih uvedeni kao standardno liječenje metastatske bolesti karcinoma dojke. (73)

Bolesnicama kojima rizik relapsa bolesti prelazi 10% obično se određuje adjuvantna kemoterapija, a faktori koji utječu na odabir operiranih bolesnica s negativnim limfnim čvorovima za adjuvantnu kemoterapiju su veličina tumora, status hormonskih receptora, limfovaskularna invazija te histološki i nuklearni gradus. Postojeće studije još uvijek nisu dale točan odgovor na pitanje koje podskupine bolesnica s karcinomom dojke ne trebaju, odnosno neće imati koristi od adjuvantnog liječenja kemoterapijom. Zahvaljujući programima probira, sve se ranije dijagnosticiraju mali karcinomi s negativnim limfnim čvorovima za koje je korist od kemoterapije upitna. Moguće je da određena podskupina bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima posebice čiji tumori imaju visoku ekspresiju estrogenskih receptora vjerojatno neće imati veće koristi od kemoterapije. (79) Trenutno postoje različiti programi i konsenzusi kojima se pokušava procijeniti rizik za recidiv bolesti nakon različitih vrsta liječenja bazirani na kliničkim i patološkim karakteristikama tumora. U posljednje vrijeme obećavajući rezultati su dobiveni genskim profiliranjem, u cilju što adekvatnijeg odabira bolesnica za adjuvantnu kemoterapiju. (80-82) Budući da kemoterapija ima važno mjesto u liječenju karcinoma dojke, postoji potreba za efektivnijim biomarker koji bi optimizirao kemoterapiju u dva smjera: točnom identifikacijom bolesnica koje mogu biti pošteđene toksične kemoterapije te definiranje individualnog optimalnog protokola kemoterapije za svaku bolesnicu.

Terapija visokim dozama kemoterapeutika s transplantacijom matičnih stanica je terapija u fazi ispitivanja, a uključuje davanje 5 - 10 puta većih doza kemoterapeutika za koje se smatra da će dovesti do boljeg ishoda bolesti. Budući da visoke doze kemoterapeutika uzrokuju mijelosupresiju, vrši se zamjena krvnih stanica prethodno uzetim i pohranjenim matičnim stanicama od bolesnice ili donora. Studije koje su do sada provedene nisu pokazale prednosti ovakve vrste liječenja. (80)

Hormonsko liječenje

Hormonska ili endokrina terapija je način liječenja karcinoma kod kojeg se nastoji blokirati djelovanje hormona koji potiču rast tumora. Ukoliko je dokazano da tumorske stanice posjeduju receptore za određene hormone, lijekovima, kirurškim putem ili radijacijom se nastoji ili smanjiti produkcija određenog hormona ili blokirati njegovo djelovanje vezanjem na karcinomske stanice.

Hormonsko liječenje prvi se put koristilo prije 100 godina u liječenju karcinoma dojke. Budući da se većina estrogena stvara u jajnicima, zaustavljanjem produkcije estrogena ovarijskom ablacijom kod predmenopauzalnih bolesnica s uznapredovalim karcinomom dojke postignuti su zapaženi rezultati, na kojima su postavljeni temelji kasnije hormonske terapije karcinoma dojke. (80,83) Estrogenski receptor (ER) identificiran je 60-ih godina prošlog stoljeća te je hormonska terapija zamijenila kiruršku i radioterapijsku ovarijsku ablaciju. ER kao većina hormonskih receptora smještenih u jezgri djeluju kao ligand-ovisni transkripcijski faktor koji prilikom vezanja hormona uzrokuje direktne promjene u genskoj ekspresiji. (83,84) Koncentracija receptora određuje se najčešće imunohistokemijskim metodama, a ekspresija estrogenskog (ER) i u manjoj mjeri progesteronskog receptora (PR) kod karcinoma dojke vrlo je bitna u predviđanju odgovora na adjuvantno hormonsko liječenje. Iako je još uvijek nejasna prognostička vrijednost PR-a, ipak se i dalje rutinski mjere oba receptora, budući da prisustvo PR-a sugerira prisutnost i aktivnost ER-a što je vrlo bitno za pozitivan odgovor na hormonsko liječenje. (80) Kod bolesnica s karcinomom dojke koji je hormonski ovisan ili je nepoznatog statusa hormonskih receptora u liječenje se uključuje i hormonsko liječenje.

Hormonsko liječenje ablativnom terapijom (medikamentozna ablacija) uključuje antagoniste hormona oslobađanja gonadotropina (LHRH antagoniste) koji su sintetski spojevi iste strukture kao hormoni izlučeni u hipotalamusu i koji zbog toga u početku primjene stimuliraju lučenje gonadotropina (luteinizirajući i folikulstimulirajući hormon; LH i FSH) što uzrokuje prolazno povećanje koncentracije estrogena. Nakon toga dolazi do potpunog prestanka lučenja LH i FSH te pada razine estrogena što zapravo odgovara efektu kirurške ili radioterapijske ablacije.

Drugi način liječenja je lijekovima koji se natječu s estrogenima u vezanju za ER. Vezanjem za ER onemogućava se vezanje estrogena za ER te se na taj način prekida njegovo djelovanje. Jedan od takvih lijekova je tamoxifen, koji je ujedno i najčešće upotrebljavan lijek za liječenje karcinoma dojke te spada u skupinu tzv.

selektivnih modulatora estrogenskih receptora, budući da u ovisnosti o ciljnom tkivu djeluju estrogen antagonistički, odnosno agonistički. Njegova vrijednost u liječenju metastatskog karcinoma dojke opisana je 1970. godine i od tada je lijek izbora za uznapredovalu bolest s postotkom odgovora 16 - 56% i prihvatljivom razinom toksičnosti. Upravo zbog prihvatljive razine toksičnosti, tamoxifen je lijek s visokom razinom tolerancije te se može koristiti puno duže od alternativnih lijekova. Kliničke studije su dokazale da tamoxifen značajno poboljšava preživljenje u adjuvantnoj primjeni u početnom stadiju raka dojke te da smanjuje učestalost raka dojke u bolesnica s povećanim rizikom za nastanak raka dojke. (83,85-89) Ozbiljnije nuspojave liječenja tamoxifenom su razvoj karcinoma endometrija i tromboembolijski incidenti. (90) Ograničenja u liječenju tamoxifenom u smislu primarne ili stečene rezistencije karcinoma na tamoxifen, njegovih nuspojava i njegove dokazane nedjelotvornosti nakon upotrebe duže od pet godina liječenja, stvara potrebu istraživanja novih oblika hormonskog liječenja kao i kombiniranja tamoxifena s drugim oblicima hormonske terapije. (91) Iz navedenih razloga, nakon pet godina liječenja tamoxifen se najčešće zamjenjuje inhibitorima aromataze.

Kod žena poslije menopauze najveći dio estrogena ne potječe iz jajnika, nego nastaje pretvorbom iz androstendiona, spolnog hormona koji se izlučuje u nadbubrežnoj žlijezdi. Glavni enzim u toj pretvorbi je aromataza. Učinak skupine lijekova koji se nazivaju inhibitori aromataze smanjuje količinu cirkulirajućeg estrogena blokirajući enzim aromatazu koji pretvara androgene u estrogene. Na temelju provedenih studija postavljene su preporuke različitih svjetskih organizacija prema kojima se inhibitori aromataze uključuju u adjuvantno liječenje kod postmenopauzalnih bolesnica s rakom dojke. Prema novijim preporukama, inhibitori aromataze trebali bi se koristiti kao inicijalno adjuvantno hormonsko liječenje kod svih bolesnica s novodijagnosticiranim hormon-receptor pozitivnim karcinomima dojke jer je dokazana veća korist i manje ozbiljnih nuspojava naspram liječenja tamoxifenom. Nadalje, tamoxifen bi trebalo zamijeniti inhibitorom aromataze nakon dvije do tri godine liječenja, a nakon pet godina liječenja tamoxifenom, liječenje se treba nastaviti narednih pet godina inhibitorom aromataze zbog dokazano manjeg rizika za recidiv bolesti. (92-96)

Traženjem što bolje zamjene za tamoxifen u kliničkim studijama testiraju se tzv. selektivni snižavatelji estrogenskih receptora, koji potpuno inhibiraju djelovanje

estrogena s pomoću molekula ER, čija se primjena u hormonskom liječenju karcinoma još nije definirala. (97,98)

Neoadjuvantno hormonsko liječenje karcinoma dojke slabije je istraženo od neoadjuvantnog liječenja kemoterapijom. Prema postojećim studijama preporučuje se bolesnicama u postmenopauzi s hormonski pozitivnim karcinomom dojke koje žele pošteno kirurško liječenje, a kod kojih se ne može provesti neoadjuvantna kemoterapija. Za postizanje kliničkog odgovora potreban je minimum od tri do četiri mjeseca neoadjuvantnog hormonskog liječenja. (80)

Ciljana terapija karcinoma dojke

Ciljana terapija karcinoma dojke koristi se lijekovima ili drugim sredstvima u identifikaciji i uništavanju tumorskih stanica, a bez uništavanja zdravih stanica. Monoklonalna protutijela su laboratorijski proizvedena protutijela koja se vežu na određeni receptor na samoj tumorskoj stanici ili na tvari koje pospješuju rast tumorskih stanica te na taj način blokiraju rast stanica raka, sprečavaju njihovo širenje ili ih ubijaju. Monoklonalna protutijela se mogu aplicirati samostalno, na karcinomsku stanicu mogu prenijeti određene lijekove, toksine ili radioaktivni materijal, a može se aplicirati i u kombinaciji s kemoterapijom.

Do 20% bolesnica s karcinomom dojke imaju amplificiran receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2), koji se povezuje s agresivnijim fenotipom, lošijom prognozom, višim postotkom recidiva i smanjenom stopom preživljenja. Određivanje amplifikacije HER2 receptora u tumoru vrši se imunohistokemijski (IHC) i/ili in situ hibridizacijom (ISH). Zahvaljujući rezultatima nekoliko randomiziranih studija u 2005. godini u kojima je ispitivan trastuzumab, humanizirano monoklonsko protutijelo protiv HER2 proteina u kombinacijama s različitim kemoterapeutskim protokolima, dokazano je smanjenje recidiva te poboljšanje preživljenja bolesnica s HER2 pozitivnim tumorom dojke. Istraživanja su rezultirala brzim uvođenjem trastuzumaba u standardne preporuke za liječenje bolesnica s HER2 pozitivnim karcinomom dojke. Trastuzumab je monoklono protutijelo koje, vežući se na ekstracelularnu domenu receptora, blokira efekt faktora rasta HER2 koji šalje signale rasta tumorskim stanicama. (99-102) Blokiranjem HER2 receptora indirektno se utječe na zaustavljanje životnog ciklusa stanice, potiče apoptozu tumorske stanice, što inhibira invaziju tumorskih stanica i nastanak metastaza. Najteža ozbiljnija nuspojava primjene trastuzumaba je kardiotoksičnost. (103,104)

U različitim kliničkim studijama ispituje se moguće sinergističko djelovanje trastuzumaba i pojedinih kemoterapeutskih lijekova s ciljem povećanja efektivnosti i smanjenja toksičnosti provedene terapije. Postotak HER2 pozitivnih tumora kod ER pozitivnih bolesnica kreće se između 11 i 35%. Karakteristika takvih tumora je rezistencija na hormonalno liječenje, posebno tamoxifenom. (105) Provedene studije kod takvih bolesnica pokazuju bolje rezultate kombinacijom trastuzumaba i tamoxifena te trastuzumaba i inhibitora aromataze. (103) Promatrajući efikasnost trastuzumaba kod HER2 pozitivnih bolesnica, do sada objavljene studije pokazuju 33-58-postotno smanjenje recidiva te 30-postotno smanjenje mortaliteta u odnosu na liječenje standardnim terapijskim protokolima. Pitanja koja su i dalje predmet studija je optimalno trajanje liječenja trastuzumabom (liječenje najčešće traje jednu godinu), najoptimalniji način kombiniranja trastuzumaba s različitim kemoterapeutskim lijekovima, kombinacija lijekova u kojoj su srčane komplikacije najrjeđe te uloga trastuzumaba u liječenju bolesnica s tumorima manjim od 1 cm i negativnim limfnim čvorovima. (99,103) Iako pokazuje odlične rezultate u liječenju, postoji određeni broj HER2 pozitivnih bolesnica koje inicijalno ne reagiraju na terapiju trastuzumabom ili koje naknadno razvijaju rezistenciju na trastuzumab. (99,106,107) Iz navedenog razloga, razvijaju se novi lijekovi kao što je lapatinib (inhibitor tirozin kinaze, dvostruki inhibitor EGFR i HER2 receptora), bevacizumab (antiangiogenetski lijek), HKI-272 (inhibitor tirozin kinaze), pertuzumab (potpuno rekombinantno humanizirano monoklonalno antitijelo koje se veže na drugi epitop na HER2 receptoru), trastuzumab DM1 (lijek-konjugirano monoklonalno antitijelo) i slični. (99,108) Poli ADP-riboza polimeraza inhibitori su u fazi istraživanja kod trostruko negativnih karcinoma dojke (ER-, PR-, HER2-), a odnose se na ciljanu terapiju koja ubija stanicu raka blokirajući popravak oštećene DNA. (109)

Ostali tipovi liječenja karcinoma dojke

Najnoviji tipovi liječenja uključuju imunoterapiju i genetsko modeliranje. Imunoterapija uključuje specifična aktivna karcinomska cjepiva (pr.: anti-HER2 cjepivo) ili nespecifičnu imunostimulaciju s citokinima. Trenutno se istražuje liječenje genotipa individualnog karcinoma. (110)

1.8. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI FAKTORI RAKA DOJKE

Prognostički faktori su parametri koji utječu na ishod bolesti (bez liječenja) i koriste se za predviđanje biološkog ponašanja karcinoma i kliničkog tijeka bolesti. Prediktivni faktori prvenstveno služe za procjenu učinkovitosti i planiranje najefikasnijeg modaliteta liječenja.

Veličina tumora

Veličina tumora važan je neovisni prognostički faktor i prediktor statusa limfnih čvorova. Što je tumor veći, veća je mogućnost metastaza u limfnim čvorovima kao i loše prognoze. Veličina tumora određuje se makroskopski i mikroskopski. Ako postoji nesrazmjer u nalazu, primjerice u pT1 tumoru ili u tumorima s ekstenzivnom in situ komponentom, mikroskopsko određivanje invazivne komponente uzima se kao vjerodostojnije za određivanje točne veličine tumora. Ukoliko tumor sadrži invazivnu i in situ komponentu, samo se invazivna komponenta koristi za određivanje veličine tumora. Kada je u dojci prisutno više od jednog tumora, svaki se zasebno mjeri i opisuje. Mjerenje tumora radi se najmanje u dvije dimenzije te se uzima najveća izmjerena dimenzija invazivnog tumora.

Učestalost metastaza u limfnim čvorovima kod bolesnica s tumorom manjim od 1 cm je 10-20%. Bolesnice bez metastaza u limfnim čvorovima s tumorom manjim od 1 cm imaju 10-godišnje preživljenje oko 90%. (111,112)

Stanje limfnih čvorova

Status aksilarnih limfnih čvorova najkorisniji je prognostički pokazatelj raka dojke kod bolesnica bez evidentnih udaljenih metastaza. Povećanjem broja zahvaćenih limfnih čvorova, prognoza se pogoršava kao i vjerojatnost udaljenih metastaza. Stopa recidiva kod bolesnica s negativnim limfnim čvorovima je 19%, dok je stopa recidiva kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima sljedeća: kada su pozitivna 1 - 3 limfna čvora 30-40%, 4 - 9 limfnih čvorova 44-70%, a više od 10 pozitivnih limfnih čvorova 72-82%.

Recidiv bolesti kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima unutar 10 godina javlja se u 60-70% slučajeva, a u 20-30% slučajeva kod bolesnica s negativnim limfnim čvorovima u aksili. Prognostička vrijednost mikrometastaza u limfnim čvorovima je još uvijek kontroverzna. (112-114)

Status limfnih čvorova godinama je određivao stupanj proširenosti bolesti, prognozu i liječenje karcinoma dojke. U novije vrijeme u određivanju zahvaćenosti limfnih čvorova koristi se biopsija limfnog čvora čuvara (SNB).

Dob bolesnice

Bolesnice mlađe od 35 godina imaju lošiju prognozu bolesti od bolesnica u starijoj životnoj dobi za isti stadij bolesti. (113)

Udaljene metastaze

Prisutnost udaljenih metastaza vezana je uz najlošiju prognozu (Stadij IV karcinoma).

Stadij tumora

Prva tri faktora (veličina tumora, stanje limfnih čvorova i udaljene metastaze) kombiniraju se u TNM klasifikaciji te daju stadij bolesti. Petogodišnje preživljenje izrazito je povezano sa stadijem bolesti: stadij 0 - preživljenje 99-100%, stadij I - preživljenje 95-100%, stadij II - preživljenje 86%, stadij III - preživljenje 57%, stadij IV - preživljenje 20%.

Histološki tip tumora

Pojedini histološki specijalni podtipovi invazivnih tumora nose bolju prognozu (primjerice tubularni, mucinozni, kribriformni).

Histološki gradus tumora

Histološki gradus invazivnih karcinoma temelji se na postotku formiranja žljezdanih i tubularnih struktura, nuklearnom polimorfizmu i broju mitozu.

Studije su pokazale da histološki gradus korelira s prognozom bolesti. Za gradiranje se koristi Scarff-Bloom-Richardsonova metoda modificirana po Bloom-Richardsonu, a potom po Elston-Ellisu. (17,41,115) Elston-Ellisova metoda za gradaciju uzima u obzir stvaranje tubula, polimorfizam jezgri i broj mitozu, koje se ocjenjuje s 1 – 3 boda. Na taj način svaki tumor može biti ocjenjen najmanje s tri odnosno najviše s devet bodova, a s obzirom na broj bodova kategorizira se u 3 skupine.

Ukupna ocjena prema Elston-Ellis metodi:

3 – 5 bodova: Gradus 1 tumora (G1: dobro diferencirani), najbolja prognoza

6 - 7 bodova: Gradus 2 tumora (G2: umjereno diferencirani), srednja prognoza

8 – 9 bodova: Gradus 3 tumora (G3: slabo diferencirani), najlošija prognoza.

Limfovaskularna invazija (limfatička ili vaskularna invazija)

Pod vaskularnom invazijom podrazumijeva se prodor tumora u lumene obložene endotelom, bez obzira radi li se o krvnim ili limfnim žilama. Upotrebom endotelinih markera (CD31, CD34) moguće je razlikovati artefakte od krvnih žila. Vaskularna invazija prisutna je u oko 26% oboljelih s negativnim limfnim čvorovima. Većina studija potvrdila je prisutnost limfovaskularne invazije kao loš prognostički znak, neovisno o stanju limfnih čvorova. Vaskularna invazija smatra se važnom za predviđanje ranog lokalnog recidiva i nastanak udaljenih metastaza. (17)

Reakcija strome

Stromalna fibroza česta je pojava koja znatno varira svojim opsegom. Različite studije stromalnoj fibrozi su pripisivale potpuno suprotna prognostička značenja. Jedni je smatraju povoljnim, drugi nepovoljnim, a treći beznačajnim prognostičkim znakom. Prisutnost elastoze također nije prognostički neovisan čimbenik. (17)

Odgovor na neoadjuvantno liječenje

Odgovor na neoadjuvantnu kemoterapiju i hormonsko liječenje pokazao se kao jaki prognostički faktor i vrlo koristan za evaluaciju protokola liječenja. Određivanje odgovora na neoadjuvantno liječenje najbolje se postiže patološkom evaluacijom uzorka nakon provedenog neoadjuvantnog liječenja. Postoje različiti bodovni sustavi za procjenu tumorskog odgovora na neoadjuvantno liječenje. (116-118)

Nottinghamski prognostički index

Jedan od najuspješnijih prognostičkih indeksa za rak dojke je Nottinghamski prognostički indeks (NPI), koji se može koristiti u selekciji pacijenata za adjuvantnu terapiju. Nottinghamski prognostički indeks koristi sljedeća tri dokazana prognostička indikatora: veličinu tumora, histološki gradus tumora i status limfnih čvorova, a računa se prema slijedećoj formuli:

$$NPI = [0,2 \times \text{veličina tumora u cm}] + \text{histološki gradus tumora [1 - 3]} + \text{status limfnih čvorova [1 - 3]}.$$

Dodatkom statusa progesteronskih receptora, angiogeneze i VEGF statusa, moguće je dodatno povećati prognostički kapacitet Nottinghamskog prognostičkog indeksa. (119)

1.8.1. Tumorski markeri

Tumorski markeri su molekule koje proizvode same stanice tumora ili normalne stanice u tijelu bolesnika ali u povišenim koncentracijama, a kao odgovor na zloćudnu bolest. Mogu se nalaziti u stanicama, tkivu, plazmi, serumu, cerebrospinalnoj tekućini, urinu ili drugoj tjelesnoj tekućini bolesnika sa zloćudnim tumorom. Tumorski markeri mogu koristiti u detekciji, dijagnozi, prognozi, predviđanju ili praćenju bolesnikovog odgovora na liječenje te za praćenje eventualnog recidiva bolesti.

Zbog nedovoljne specifičnosti i osjetljivosti, trenutno ne postoji idealan serumski tumorski marker za karcinom dojke. Niti jedan do sada dostupni tumorski marker nije specifičan samo za karcinom dojke, a niti jedan od njih, pa niti u kombinaciji, ne može otkriti rani rak dojke. Iz navedenih razloga, trenutno dostupni markeri ne koriste se u testovima pretraživanja, a ne koriste se niti kao dodatni parametri u postavljanju dijagnoze karcinoma dojke. Najčešće korišteni serumski tumorski markeri u praćenju i liječenju karcinoma dojke su CA 15-3 i CEA, a koriste se isključivo u kombinaciji s drugim dijagnostičkim metodama, anamnezom i kliničkim pregledom.

Od tumorsko-tkivnih markera u rutinskoj kliničkoj primjeni prihvaćena su samo tri biomarkera (ER, PR, HER2) za određivanje prognoze i prediktivnog ponašanja karcinoma dojke. Ekspresija hormonskih receptora za adjuvantnu hormonsku terapiju te ekspresija HER2 za anti-HER2 ciljnu terapiju jedini su markeri za koje postoji razina dokaza I. kategorije A, a koji opravdavaju njihovu upotrebu u svakodnevnoj kliničkoj primjeni. Za određivanje sva tri navedena biomarkera koristi se imunohistokemija. (113,120)

CA 15 - 3

Karcinomski antigen 15-3 nalazi se u povišenoj koncentraciji u krvi bolesnika s karcinomom dojke, karcinomom jajnika i karcinomom pluća, ali i u prvom trimestru normalne trudnoće, nekim benignim bolestima srca, cirozi jetre i hepatitisu. Zbog manjka osjetljivosti i specifičnosti, u rutinskoj primjeni se ne koristi za ranu detekciju bolesti. Za recidivirajući karcinom dojke, CA 15-3 ima osjetljivost oko 57% i specifičnost oko 87% te se stoga koristi za praćenje i detekciju recidiva bolesti. (17,121)

CEA

Karcinoembrionalni antigen (CEA) je glikoprotein na površini stanice, spada u skupinu onkofetalnih antigena koji se normalno sintetiziraju u embrionalnom i fetalnom razvoju i njegovo stvaranje se zaustavlja prije rođenja. Karcinoembrionalni antigen pojavljuje se u tumorskim stanicama kod kolorektalnog i želučanog karcinoma, karcinoma pankreasa, karcinoma pluća i kod karcinoma dojke. Povećanje koncentracije CEA u serumu bolesnica s karcinomom dojke nastaje kod primarnih tumora i u recidivu bolesti. Usporednim testovima je dokazano da je CA 15 - 3 pouzdaniji za detekciju progresije bolesti. (17,122)

Hormonski receptori

Estrogenski (ER) i progesteronski (PR) receptori služe za identifikaciju bolesnica koje će imati najviše koristi od hormonalne terapije kako u ranom stadiju, tako i kod metastatske bolesti. Imunohistokemijski određeni ER i PR znatno su bolji pokazatelji prognoze nego ER i PR određeni biokemijski te je imunohistokemijsko (IHC) određivanje ER i PR postala metoda izbora. Estrogenski i progesteronski receptori nalaze se u jezgrama normalnih epitelnih stanica dojke i tumorskim stanicama. Imunohistokemijski se određuje postotak pozitivnih tumorskih stanica na ER i PR i intenzitet bojenja. Hormonski pozitivni tumori imaju $\geq 1\%$ tumorskih stanica pozitivnih na ER i PR. Niti jedna hormonska analiza nije apsolutni pokazatelj terapijskog odgovora, a poznato je da jedan mali postotak hormonski negativnih tumora reagira na hormonsku terapiju. (17,112)

ER i PR trebaju biti određeni za svaki primarni invazivni karcinom dojke, kod recidiva i u metastazama. Mogu se odrediti u materijalima dobivenim biopsijom širokom iglom (CNB) ukoliko postoji dovoljno tkiva. Zbog nedovoljno podataka i dalje postoje kontroverzna mišljenja vezana uz rutinsko određivanje ER i PR kod bolesnica s duktalnim karcinomom in situ (DCIS). (119)

ER i PR pozitivni tumori imaju bolju prognozu i povezani su s manjom stopom mortaliteta u odnosu na ER i PR negativne tumore. ER i PR također su i prediktivni markeri jer predviđaju odgovor na terapiju inhibitorima aromataze i tamoxifenom (oralni selektivni modulator estrogenskih receptora). (123,124)

HER2 (Erb-B2; Neu) status

HER2 (receptor humanog epidermalnog faktora rasta 2) protein je čija je prekomjerna ekspresija vezana uz amplifikaciju onkogeni koji se nalazi na 17q21 kromosomu. HER2 se određuje imunohistokemijski (IHC) i/ili određivanjem amplifikacije gena *in situ* hibridizacijom (ISH). Radi nedostataka IHC testiranja u određivanju HER2 statusa, za određene slučajeve IHC se nadopunjuje s ISH metodom. Evaluacija HER2 je potrebna za svaki primarni karcinom dojke, recidiv i metastazu. HER2 pozitivni tumori imaju agresivniji fenotip i lošiju prognozu bolesti neovisno o ostalim kliničkim faktorima te su povezani s većim postotkom recidiva i mortaliteta. HER2 status je također i prediktivni faktor; predviđa odgovor ciljanom terapijom monoklonalnim antitijelom trastuzumab (Herceptin) na HER2 onkoprotein. (119,125)

Napredak u poznavanju molekularnih mehanizama koji utječu na rast normalnih i tumorskih stanica doveo je do prepoznavanja dodatnih biomarkera koji se mogu klasificirati na:

1. markeri proliferacije (Određivanje S-faze staničnog ciklusa, Ki-67, Ciklin E, Topoizomeraza II alfa, Bcl-2 mitotski indeks)
2. markeri invazivnosti (uPA i PA1, Tenascin C, Katepsin D, nm23)
3. markeri agresivnosti (p53, HER-2/neu, EGFR, VEGF, TGF-beta)

Budući da još ne postoji idealni biomarker za karcinom dojke, na temelju rezultata dosadašnjih istraživanja, pojedina stručna društva dala su preporuke korištenja pojedinih biomarkera u kliničkoj praksi. Tako Američko društvo za kliničku onkologiju na temelju pregleda dosadašnjih istraživanja na zadnjem konsenzusu 2007. godine, preporučuje CA 15-3, CA 27.29, CEA, ER, PR, HER2, uPA i PAI-1 i pojedine multiparametarske genske eseje za određene segmente u kliničkoj uporabi, dok za DNA ploidnost protočnom citometrijom, p53, katepsin D, Ciklin E, cirkulirajuće tumorske stanice, određene multiparametrijske testove i detekciju mikrometastaza u koštanoj srži nema dovoljno dokaza za podupiranje rutinske uporabe u kliničkoj praksi. (126)

CA 27.29

CA 27.29 je protein, proizvod MUC-1 gena. CA 27.29 nije specifičan za karcinom dojke te se može naći u povišenim vrijednostima u serumu kod karcinoma kolona, jetre, pluća, jajnika i prostate ali i netumorskim bolestima kao što su ovarijske ciste, benigne bolesti dojke, jetre i bubrega. Budući da u metastatskoj bolesti

povećanje vrijednosti CA 27.29 dobro korelira s kliničkom progresijom bolesti, CA 27.29 može se koristiti kao marker u praćenju bolesnica s karcinomom dojke nakon primarnog liječenja. (126,127)

p53

p53 je tumor supresor gen koji regulira stanični ciklus utječući na apoptozu, stabilnost genoma i inhibiciju angiogeneze, prevenirajući nastanak karcinoma. Oko jedne trećine karcinoma dojke ima mutacije gena supresora p53, a njegove mutacije mogu dovesti do prekomjerne ekspresije p53 proteina. Proučavanje markera p53 pomoglo je razumijevanju nastanka tumora, ali mjerenje njegove koncentracije kod bolesnica s karcinomom nije donijelo rezultata u predviđanju razlike u preživljenju. Pokazalo se da je p53 odgovoran za rezistenciju na tamoxifen. (119,128)

Bcl2

Protein bcl2 regulira apoptozu u normalnom staničnom ciklusu i sudjeluje u kontroli proliferacije. Povećanje koncentracije bcl2 u serumu nalazi se kod melanoma, karcinoma prostate, karcinoma pluća te kronične limfatičke leukemije. Kod karcinoma dojke povećanje je uzrokovano djelovanjem estrogena. Vjeruje se da ima ulogu u rezistenciji na konvencionalno liječenje, a budući da sam karcinom nastaje kao rezultat poremećaja balansa homeostaze između staničnog rasta i stanične smrti, smatra se da kao anti-apoptotična molekula ima veliku ulogu u samom razvoju karcinoma. Studije su pokazale da su povišene koncentracije bcl2 proteina povezane s boljim odgovorom na liječenje tamoxifenom, manjim postotkom relapsa bolesti te dužim preživljenjem. (113)

Topoizomeraza II alfa

Gen topo II lociran pored HER2 gena na kromosomu 17q12q21, a njegovo pojačanje može utjecati na prekomjernu ekspresiju topo II alfa proteina. Prediktivna vrijednost HER2 u odgovoru na antracikline pokušava se objasniti upravo zajedničkom amplifikacijom s topo II alfa genom. Budući da je ovaj enzim inhibiran antraciklinima te je ujedno i glavni cilj ovih lijekova, njegova prekomjerna ekspresija može dovesti do veće senzitivnosti stanica na topo II alfa inhibitore. Trenutne studije upućuju na mogućnost da upravo intratumorske koncentracije topo II alfa mogu objasniti rezistenciju na antracikline. (126)

uPA i PAI-1

Urokinazni tip plazminogenog aktivatora je serinska proteaza koja cijepa plazminogen u plazmin i izravno ili neizravno razgrađuje međustanični matriks.

Inhibitor plazminogenog aktivatora tipa 1 inhibira djelovanje uPA vežući se za slobodni ili za receptor vezani uPA. Pretpostavlja se da PAI-1 štiti proces angiogeneze i na taj način pospješuje rast tumora. uPA i PAI-1 su proteini koji potiču karcinomsku invaziju i metastaze. Visoke koncentracije uPA i PAI-1 povezane su sa agresivnom bolešću i lošim ishodom što je potvrđeno u više studija te je kod tih skupina bolesnica dokazana korist od adjuvantne terapije po CMF protokolu. Niske koncentracije oba markera povezane su s niskom stopom recidiva. Dokazano je da bolesnice s negativnim nalazom u limfnim čvorovima i niskim koncentracijama uPA i PA1 nemaju koristi od adjuvantnog liječenja kemoterapijom. (17,126,129)

Tenascin C

Tenascin C je protein izvanstaničnog matriksa, u niskim koncentracijama je prisutan u normalnom odraslom tkivu, a u visokoj koncentraciji kod različitih tumora, uključujući karcinom dojke. Prisutan je u različitim izoformama s različitim konačnim djelovanjem proteina. Učinak tenascina C je raznolik: potiče migraciju i proliferaciju stanice, inhibira adheziju, djeluje na preživljenje stanice, promovira angiogenezu te inducira ekspresiju gena koji modificiraju izvanstanični matriks kao što su matriks metaloproteinaze, a što je povezano s rastom i invazijom tumora. Tenascin C je prepoznat kao potencijalni protein za ciljanu terapiju, a visoke koncentracije tenascina C su povezane s lošom prognozom, lokalnim i udaljenim recidivima. Smatra se da je ekspresija tenascina C u DCIS prediktor buduće invazivnosti tumora. (130)

Katepsin D

Katepsin D je lizosomska endoproteaza koja sudjeluje u katabolizmu proteina normalnih stanica, a čija je sinteza značajno povećana u zloćudnim tumorima te doseže i do 50 puta veće koncentracije nego u žljezdanom tkivu. Proizvod je ekspresije gena Katepsin D, a pripisuju mu se brojne biološke funkcije: razgradnja međustaničnog matriksa, povećanje metastatske sposobnosti stanice te stimulacija proliferacije tumorskih stanica. Katepsin D služi kao prognostički marker, a odgovoran je za nastanak metastaza jer aktivira proteine koji u toj fazi imaju veliko značenje. (17,131)

Nm23

Smanjena ekspresija nm23 proteina u tumorima povećava metastatsku sposobnost tumorskih stanica te je povezana je s lošijom prognozom, vaskularnom invazijom, češćim recidivima karcinoma dojke i kraćim preživljenjem. (17)

Određivanje S faze

Određivanje S faze staničnog ciklusa protočnom citometrijom također služi kao proliferativni marker karcinoma dojke i zasniva se na postotku stanica u diobi. Postotak stanica u diobi veći je u većim i slabije diferenciranim tumorima te ER i PR negativnim tumorima. Općenito, veće koncentracije markera proliferativnosti povezane su s lošijom prognozom u neliječenih bolesnika, a mogu predvidjeti korist od kemoterapije. Implementacija određivanja S faze je komplicirana tehničkim varijacijama metoda pripreme tkiva, instrumentarija te samog načina određivanja S faze tako da još uvijek nije u rutinskoj primjeni. Alternativna metoda protočnoj citometriji je imunohistokemija koja zahtijeva manju količinu tumorskog tkiva, a detektira antigene karakteristične za pojedine faze staničnog ciklusa. (17,126)

Ki-67

Ki-67 je nehistonski protein koji je prisutan u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G_1 , S, G_2 , i mitozu), a nije prisutan u fazi mirovanja (G_0). Postotak Ki-67 pozitivnih stanica dobiven imunohistokemijskim obilježavanjem u jezgrama stanica, označava proliferativnu frakciju tumora. Studije su pokazale da tumori s visokim postotkom Ki-67 imaju lošiju prognozu i kraće preživljenje, ali i da takvi tumori imaju bolji odgovor na kemoterapiju. Tumori s visokim postotkom Ki-67 liječe se agresivnijom kemoterapijom. (17,132)

Ciklin E

Protein ciklin E jedan je od regulatora staničnog ciklusa, a izražen je u kasnoj G_1 fazi staničnog ciklusa. Vezanjem s CDK2 stimulira aktivnost kinaze i osigurava prijelaz u S fazu, dijeljenje stanice i sintezu DNA. Aktivnost ciklin E-CDK2 enzimskog kompleksa, inhibirana je proteinima p21 i p27. Povišene vrijednosti nađene su u raznim vrstama karcinoma (kolon, mokraćni mjehur, karcinom pluća, kože), a kod karcinoma dojke ciklin E se cijepa na fragmente manje molekularne mase elastazom i kalpainom 2. Ovi fragmenti imaju veći afinitet prema CDK2 te se opiru inhibiciji s proteinima p21 i p27. Ovi fragmenati ciklina E, smatraju se mogućim markerima za loše prognoze, rezistencije na tamoxifen i povećanja instabilnosti genoma. (126)

EGFR

Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR, ErB-1, HER1), receptor je površine stanice za EGF-obitelj izvanstaničnih proteina. Mutacije koje imaju za posljedicu promjenu ekspresije ili aktivnost EGFR mogu rezultirati nastankom tumora. Prekomjerna ekspresija EGFR uočena je u gotovo 50% bolesnika s

karcinomom dojke. Smatra se da je EGFR status važan faktor rizika za recidiv karcinoma dojke te prediktor relapsa i ukupnog preživljenja kod karcinoma dojke. Prekomjerna ekspresija EGFR opisana je kod različitih karcinoma i općenito se smatra lošim prognostičkim markerom, a posebno u bolesnica s ER negativnim tumorom. Prepoznavanje EGFR kao onkogeni, dovodi do razvoja ciljane terapije na EGFR, koja se trenutno koristi za liječenje karcinoma pluća i kolona. (17,133)

VEGF

Faktor rasta krvožilnog endotela je protein koji stimulira rast endotelinih stanica i stvaranje krvnih žila u tumoru, što doprinosi rastu, širenju i metastaziranju tumora. Prekomjerna ekspresija je povezana s bržim širenjem tumora te bi mogla biti uzrok ranoj fazi u procesu metastaziranja. Kod ER pozitivnih bolesnica povećana razina VEGF povezana je s kraćim ukupnim preživljenjem. Oko 10-15% bolesnica s karcinomom dojke pozitivno odgovara na anti-VEGF monoklonsko antitijelo - bevacizumab. (17)

Molekularni podtipovi karcinoma dojke

Novija istraživanja genske ekspresije koja su dovela do otkrića molekularnih podtipova karcinoma dojke stvorila su temelj nove klasifikacije tumora dojke te predstavljaju važan prognostički faktor budući da svaki podtip nosi i različitu prognozu. Molekularni podtipovi karcinoma podrazumijevaju razliku prema luminalnim i bazalnim epitelnim stanicama iz žlijezde dojke, biološki su različiti, pokazuju različito kliničko ponašanje, a uključuju pet podtipova:

1. Luminalni A: ER i PR pozitivan, HER-2 negativan, Ki-67 nizak (<20%)
2. Luminalni B (HER-2 negativan): ER pozitivan, HER-2 negativan i najmanje jedno od:
 - a) Ki-67 visok ($\geq 20\%$)
 - b) PR negativan ili nizak (manje od 20% pozitivnih stanica)
 - c) rizik za recidiv visok, a temeljen na engl: „multi-gene-expression assay“ (ako je dostupan)
3. Luminalni B (HER-2 pozitivan): ER pozitivan, HER-2 prekomjerna ekspresija ili amplifikacija, Ki-67 bilo kakav, PR bilo koji
4. HER-2 pozitivan: HER-2 prekomjerno izražen ili amplificiran, ER i PR negativni
5. Trostruko negativni: ER, PR i HER-2 negativni.

Istraživanja su pokazala da Luminalni A podtip tumora ima najbolju prognozu i preživljenje, dok su trostruko negativni i HER2 pozitivni tumori povezani s lošijom prognozom, najkraćim vremenom do pojave udaljenih metastaza i najkraćim ukupnim preživljenjem. Molekularni podtipovi su također i dobri prediktivni faktori odgovora na neoadjuvantno liječenje. Trostruko negativni i HER2 pozitivni tumori dojke su povezani s najboljim, a luminalni tumori s najlošijim odgovorom na neoadjuvantno liječenje. (134,135)

Gensko profiliranje

Korištenje genskog profiliranja u detekciji raka dojke pokazalo je da je različita ekspresija specifičnih gena jači prognostički indikator od tradicionalnih kao što su veličina tumora i status limfnih čvorova. Otkrivanje specifičnih gena kod bolesnica s dokazanim rakom dojke može pomoći u otkrivanju najboljih kandidata za adjuvantnu terapiju odnosno otkrivanja visoko rizičnih bolesnica. Rane studije pokazuju da ove genetske tehnike imaju veliki potencijal u budućem liječenju raka dojke te su dovele do prepoznavanja obrazaca simultanog izražavanja različitih gena ili „potpisa“ u predviđanju ishoda bolesti, od kojih su najpoznatiji MammaPrint i Oncotype DX . MammaPrint je „potpis“ od 70 gena, trenutno u fazi III kliničkog istraživanja s ciljem razlikovanja tumora s dobrom i lošom prognozom te njegove vrijednosti kao prediktora odgovora na različite kemoterapeutike primijenjene neoadjuvantno. (136,137) Oncotype DX je „potpis“ od 21 gena, također u fazi istraživanja s ciljem predviđanja relapsa bolesti kod bolesnica s ER pozitivnim tumorom liječenih tamoxifenom kao i njegove vrijednosti u određivanju neoadjuvantnog liječenja. (138,139)

Lista potencijalnih biomarkera je svakoga dana sve duža što će sigurno dovesti i do otkrića novih markera nezaobilaznih u kliničkoj primjeni.

1.9. TRANSFORMIRAJUĆI FAKTOR RASTA BETA (TGF β)

Normalna homeostaza u ljudskom tkivu zahtijeva složene i usklađene uzajamne odnose između stanice i mreže izlučenih proteina poznatih pod nazivom izvanstanični matriks. Ove interakcije podrazumijevaju djelovanje velikog broja citokina putem specifičnih staničnih receptora, dok prilikom poremećaja ravnoteže između stanice i izvanstaničnog matriksa dolazi do pojave različitih bolesti. Zadnjih dvadesetak godina učinjen je veliki napredak u poznavanju utjecaja izvanstaničnih

faktora na proliferaciju i diferencijaciju stanice, a jedan od izvanstaničnih proteina je i citokin transformirajući faktor rasta beta (TGF β).

TGF β pripada velikoj obitelji polipeptidnih faktora rasta koji uključuju aktivine, inhibine i koštani morfogenetski protein (BMP). Opisane su tri humane izoforme (TGF- β 1, TGF- β 2 i TGF- β 3) koje su strukturno i funkcionalno vrlo usko povezane. Izoforme se razlikuju po njihovom afinitetu vezanja na TGF β receptore, a delecija pojedine izoforme u miševa rezultira različitim fenotipom. (140,141)

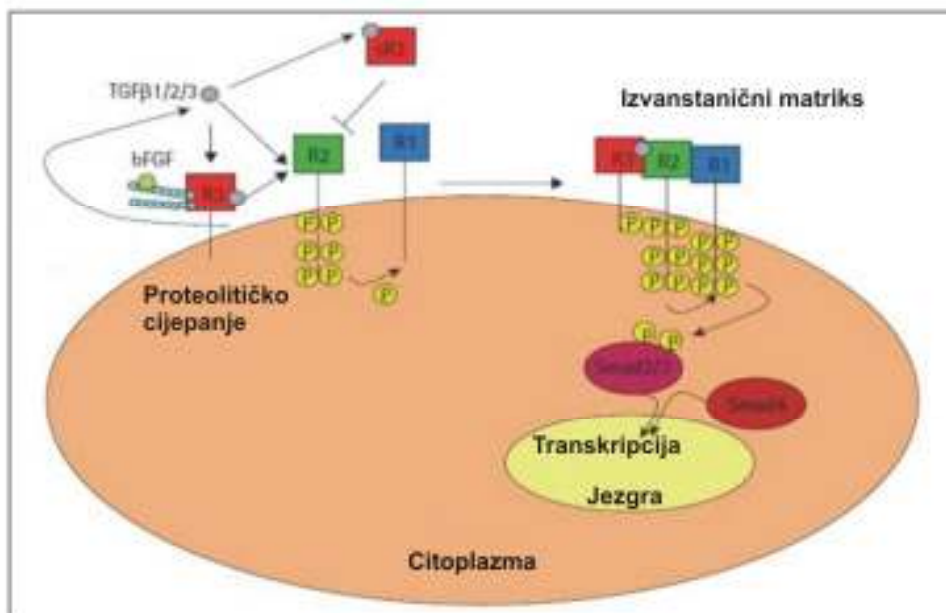
Na staničnom nivou, TGF β inhibira proliferaciju epitelnih, endotelnih i hematopoetskih stanica, regulira diferencijaciju imunih, neuronskih, mezenhimalnih i epitelnih staničnih tipova i regulira njihovu apoptozu. Nadalje, osim što regulira proliferaciju i diferencijaciju stanice, regulira i embrionalni razvitak, imunološki odgovor, cijeljenje rane, upalu, angiogenezu i tumorigenezu. Povećanje ili smanjenje stvaranja TGF β povezano je s različitim bolestima, a mutacije gena za TGF β , njegove receptore ili unutarstanične signalne molekule važne su za patogenezu različitih bolesti, a posebno karcinoma. (142)

Svaka stanica u tijelu, uključujući epitelne, endotelne, hematopoetske, neuralne i vezivne, proizvodi TGF β te ima receptore za njega. Nakon što se izluči, većina TGF β -a se nalazi u izvanstaničnom matriksu kao latentni prekursor u kompleksu TGF β , propeptida te proteina pod nazivom latentni TGF β - vezni protein (četiri različite vrste proteina). Prilikom aktivacije, TGF β se otpušta iz kompleksa pomoću multifunkcionalnog glikoproteina iz matriksa trombospondin-1 (utječući na stabilnost TGF β veznog proteina), proteolitičkim djelovanjem plazmina na kompleks ili promjenom pH vrijednosti okoline.

TGF β regulira stanične procese vežući se na tri visoko afinitetna receptora na površini stanice: receptori tip I, II i III. Većina receptora za faktore rasta su transmembranski proteini na staničnoj površini koji ili sadrže ili su povezani s citoplazmatskom tirozin kinazom. Prilikom interakcije velikog broja faktora rasta i receptora na površini stanice, prenose se različite signalne kaskade u jezgru gdje posljedično dolazi do poticaja za proliferaciju, diferencijaciju te transkripciju gena.

Najzastupljeniji su receptori tipa III (T β RIII), a njihova uloga je u vezanju TGF β i njegovu prenošenju do njegovih signalnih receptora tipa I i II (T β RI i T β RII). Aktivirani TGF β veže se ili direktno za T β RII ili za T β RIII koji potom prenosi TGF β do T β RII. Nakon što je aktiviran s TGF β , T β RII potom transfosforilira i veže u kompleks T β RI koji potom započinje brojne intracelularne kaskade od kojih je glavna putem

faktora transkripcije Smad, a nakon fosforilacije Smad 2 ili Smad 3 proteina. Fosforilirani Smad 2 ili Smad 3 se potom veže za Smad 4 (do sada je pronađeno 10 Smad proteina), a kompleks tada ulazi u jezgru gdje sudjeluje s različitim transkripcijskim faktorima u regulaciji transkripcije velikog broja gena. (140-153) (Slika 5.)



Slika 5. Signalna kaskada TGFβ. Preuzeto iz: Ajiboye S, Sissung TM, Sharifi N, Figg WD. More than an accessory: implications of type III transforming growth factor-beta receptor loss in prostate cancer. BJU Int. 2010;105:913-6.

1.10. ULOGA TRANSFORMIRAJUĆEG FAKTORA RASTA BETA (TGF β) U TUMOROGENEZI

U normalnim stanicama i stanicama početnih stadija tumora, TGFβ suprimira rast tumora kroz transkripcijsku kontrolu gena djelujući na životni ciklus stanice te indukcijom apoptoze. Kako tumorigeneza napreduje, tumorske stanice često postaju rezistentne na inhibiciju rasta uvjetovanu utjecajem TGFβ; mutacijom nekog od regulatora životnog ciklusa stanice kao što je tumorski supresor, genetskim gubitkom TGFβ signalnih komponenti ili utjecajem na neke od signalnih komponenti. Povezanost između TGFβ rezistencije tumorskih stanica s mutacijama na TGFβ receptorima prvo je uočena kod karcinoma kolona, gdje je dokazana mutacija TβRII. (143,144) Kod karcinoma dojke uočen je gubitak ekspresije TβRIII povezan s gubitkom heterozigotnosti TGFβR3 genskog lokusa. (154) Tumorske stanice koje ne uspiju inaktivirati mutacije tada prolaze kroz proces transdiferencijacije te počinju

odgovarati na TGF β pojačanom migracijom, invazijom, angiogenezom i metastazama. (144,145)

Postoje radovi koji potvrđuju povišenu razinu TGF β kod karcinoma dojke te povećanje koncentracije TGF β prilikom tumorske progresije, odnosno smanjenje koncentracije nakon kirurške resekcije. (155-158)

Uvođenje ciljane terapije radi inaktivacije TGF β signalnih puteva u uznapredovalim i metastatskim karcinomima otvara mogućnosti djelovanja na specifični tumor-promotorski efekt TGF β uključujući proangiogenetsku i imunosupresivnu funkciju *in vivo*.

1.11. TGF β RECEPTOR TIP III (T β RIII)

TGF β receptor tip III, poznat i kao betaglikan, u velikom broju stanica i staničnih linija najčešći je receptor na staničnoj površini u koncentraciji do 200 000 molekula po stanici. Ovaj protein je široko rasprostranjen u mezenhimalnim, epitelnim, neuralnim stanicama u fetalnom i odraslom tkivu te u ostalim staničnim tipovima, osim u endotelnim stanicama te u nekim tipovima mioblasta, epitelnih i hematopoetskih stanica. (140-143) Betaglikan je strukturno sličan membranskom glikoproteinu endoglinu koji je izražen na određenim staničnim tipovima, na endotelnim stanicama i na nekoliko hematopoetskih staničnih tipova.

T β RIII je transmembranski proteoglikan s 851 aminokiselinom koji se sastoji od velike izvanstanične domene sa 766 aminokiselina s višestrukim mjestima modifikacije glikana, hidrofobnog transmembranskog dijela i kratke citoplazmatske domene s 42 aminokiseline. Kratka domena zajedno s β -arestinom2 fosforilira aminokiseline Thr841 u citoplazmatskoj domeni. (159)

(Slika 6.)

Izvanstanična domena T β RIII sadrži N-terminalnu domenu sa nepoznatom homologijom, domenu zone pelucide (ZPD) i dvije TGF beta domene. (160-162) T β RIII veže TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP-2, BMP-4, BMP-7, GDF-5 i inhibin A preko domene za vezanje liganda glikozaminoglikan (GAG) modifikacijom postraničnih lanaca. (161,163-166) Kratka citoplazmatska domena nema enzimatsku aktivnost. Iako citoplazmatska domena T β RIII nije presudna u posredovanju prezentacije liganda, dokazano je da ima ulogu u regulaciji TGF- β posredovanog

signalnog puta. (167-169) Citoplazmatska domena T β RIII veže se za autofosforiliranu citoplazmatsku domenu tip II receptora (T β RII), što potiče formiranje aktivnog T β RII-T β RI signalnog kompleksa, a potom i disocijaciju T β RIII iz istog kompleksa. Citoplazmatska domena T β RIII fosforilirana je od strane T β RII i treonina (Thr)841, koji omogućava interakciju T β RIII s proteinom β -arestin2. (168,170) Interakcija T β RIII citoplazmatske domene i β -arestina2 rezultira kointernalizacijom kompleksa β -arestin2/T β RII/T β RIII u vezikule endocita i dovodi do podregulacije TGF- β signalnog puta. (170)

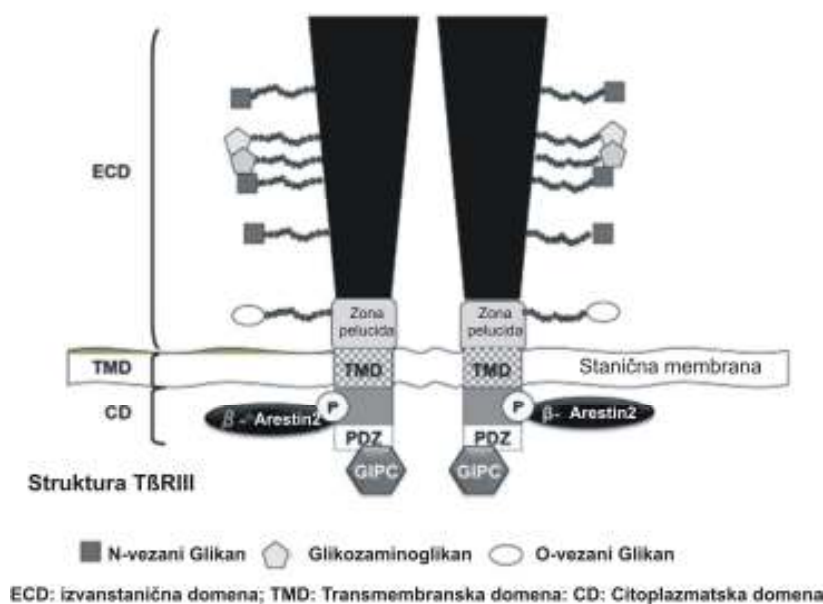
Dokazano je da interakcija između T β RIII i β -arestina2 regulira i BMP i TGF- β signalni put. (171)

Citoplazmatska domena T β RIII također uzajamno djeluje s GIPC (GAIP-interaktivni protein C kraja). Interakcija s GIPC vodi stabilizaciji ekspresije T β RIII na staničnoj površini i pojačavanja TGF- β signalnog puta. (167) Nadalje, dokazano je da interakcija između T β RIII i GIPC igra bitnu ulogu u T β RIII posredovanoj inhibiciji TGF- β signalnog puta, stanične migracije i invazije za vrijeme progresije karcinoma dojke. (172) (Slika 6.)

Sam protein T β RIII ima molekularnu masu od 100 kDa, a potpuno obrađen T β RIII dostiže masu od 180 do 300 kDa zahvaljujući glikozaminoglikanskim post-translacijskim modifikacijama. (160,161) Čini se da su post-translacijske modifikacije T β RIII bitne za funkciju T β RIII. Dokazano je da onkogeni Ras prilagođavaju post-translacijske modifikacije T β RIII, najvjerojatnije kroz GAG modifikacije, što dovodi do povećanog proliferacijskog odgovora na TGF- β i podregulaciju p21 kod tumorskih stanica karcinoma kolona. (173)

Kao najobilnije izraženi receptor TGF- β nadfamilije, T β RIII zapravo djeluje kao ko-receptor za ligande TGF- β nadfamilije, uključujući TGF- β 1, 2 i 3, inhibin, BMP-2, 4 i 7 te GDF-5. U većini slučajeva, sposobnošću T β RIII da prezentira ligand pojačavajući njihovo vezanje za srodne tip I i tip II receptore TGF- β nadfamilije, T β RIII pojačava njihov signal kroz Smad proteine (Smad – ovisan signalni put). (159, 161,163,164,166) Smanjenje T β RIII ekspresije smanjuje odgovor na TGF- β , redukcijom Smad2 fosforilacije i smanjenom aktivacijom TGF- β promotora. (174)

Osim u ligand ovisnom efektu, T β RIII posreduje i u ligand neovisnom efektu. T β RIII može utjecati na migraciju stanice posredno preko β -arrestin2 kroz aktivaciju Cdc42 u ligand neovisnom načinu, a p38 T β RIII može aktivirati ligand ovisno i neovisno. (159)



Slika 6: Struktura TGFβR III. Preuzeto iz: Gatza CE, Oh SY, Blobe GC. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. Cell Signal. 2010;22:1163-74.

Istraživanja su pokazala da osim transmembranskog proteina, postoji i topljivi betaglikan kojeg izlučuje veliki broj staničnih linija, a može se naći u otopinama staničnih kultura, serumu i izvanstaničnom matriksu. Topljivi TβRIII (sTβRIII) nastaje proteolitičkim cijepanjem na mjestu proksimalno od transmembranske domene TβRIII, pri čemu se oslobađa topljiva izvanstanična domena. Za razliku od transmembranske forme koja je hidrofobna, topljivi betaglikan nema mogućnost vezanja za membranu te se ne veže za liposome. (169, 175-177)

Dokazano je da razina sTβRIII korelira s ekspresijom TβRIII na staničnoj površini, međutim, malo je poznato o regulaciji produkcije sTβRIII, a specifično mjesto TβRIII cijepanja još uvijek nije utvrđeno. (169, 176) Iako mehanizam sTβRIII cijepanja nije dovoljno jasan, cijepanje sTβRIII može biti modulirano pervanadatom, tirozin fosfataza inhibitorom te može biti djelomično posredovano membranskim tipom matriks metaloproteaza (MT-MMP) MT1-MMP i/ili MT3-MMP i plazminom, serin proteinazom za koju je dokazano da cijepa ekstracelularnu domenu TβRIII. (159,178)

Zbog svoje sposobnosti vezivanja TGFβ solubilni ili topljivi betaglikan može kompetitivno inhibirati vezanje TGFβ za receptore na staničnoj površini. (Slika 7.) (179-182)

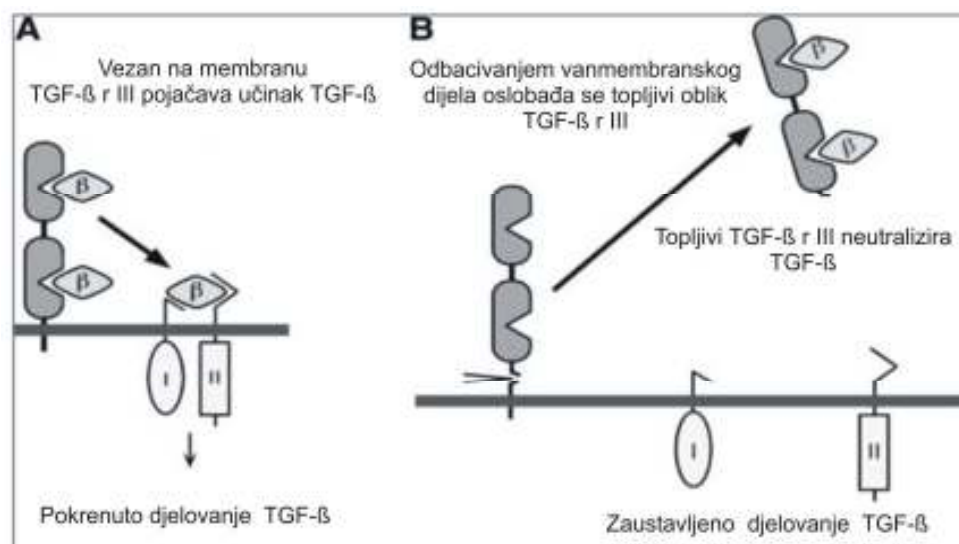
Samo TβRIII vezan za membranu sposoban je regulirati vezanje liganda TGF-β nadobitelji stanično autonomnim načinom. Osim toga, TβRIII je sposoban regulirati

vezanje liganda signalnog puta TGF- β nadobitelji stanično neautonomnim načinom prolazeći ektodomalno cijepanje te produkcijom sT β RIII tako da osim autokrinih i parakrinih učinaka, sT β RIII ima potencijal sistemskog utjecaja na signalni put. (176, 183)

Dokazano je da sT β RIII veže i sekvstrira ligande koji se na površini stanice vežu za T β RIII te na taj način inhibira njihov signalni put. (161,184) Također je dokazano da u malim koncentracijama TGF- β , sT β RIII pojačava vezanje TGF- β liganda na T β RII, sugerirajući kompleksnu ulogu sT β RIII u regulaciji signalnog puta TGF- β nadfamilije. (185) Specifična uloga sT β RIII u regulaciji BMP i inhibin/aktivin signalnom putu još uvijek ostaje nedefinirana.

Ponovno uspostavljanje ekspresije T β RIII u različitim tipovima karcinoma može inhibirati progresiju tumora *in vivo* djelomično kroz produkciju sT β RIII, koji veže i neutralizira TGF- β , antagonizirajući tumor promotorski efekt TGF- β signalnog puta u kasnim stadijima tumora. (154,159,177,180) Biološka važnost betaglikana i endoglina *in vivo* još uvijek nije u potpunosti razjašnjena.

Zbog dvostruke uloge u tumorigenezi, kao tumor supresora i onkogen, elementi signalne kaskade TGF β smatraju se potencijalnim prediktivnim biomarkerima i molekularnim ciljevima u prevenciji, dijagnostici i liječenju karcinoma i metastaza.



Slika 7: Funkcija topljivog TGF β III receptora. Preuzeto iz: Juarez P, Vilchis-Landeros M, Ponce-Coria J i sur. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in *db/db* mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:321-29.

2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Tehnikama proteomske analize u plazmi bolesnica s karcinomom dojke identificirali smo molekulu TGF-beta III receptor (TGF β rIII) u ljudskoj plazmi.

Određivanjem koncentracije topljivog receptora TGF beta III u plazmi bolesnica sa zloćudnim tumorom dojke prije i poslije operacije, želimo pokazati da će veće vrijednosti navedene molekule u plazmi ukazivati i na bolju prognozu.

Radi se o mogućem prognostički pozitivnom biomarkeru.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Razviti specifični esej za otkrivanje molekule topljivog TGF beta III receptora u ljudskoj plazmi i odrediti koncentraciju.
2. Odrediti koncentraciju TGF beta III receptora u plazmi bolesnica s karcinomom dojke i zdravih ispitanica.
3. Pokazati povezanost između koncentracije TGF beta III receptora u plazmi i karcinoma dojke.
4. Testirati pojavljivanje molekule receptora TGF beta III u tkivu karcinoma dojke.
5. Korištenjem specifičnih protutijela za navedenu molekulu metodom ELISA testa pratiti dinamiku u pojavljivanju molekule TGF beta III receptora kod bolesnica s karcinomom dojke.
6. Istražiti povezanost koncentracije TGF beta III receptora u plazmi s prognozom bolesti kod bolesnica s karcinomom dojke.

4. ISPITANICI, MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. ISPITANICE

U studiju su uključene ispitanice liječene između prosinca 2008. i svibnja 2009. godine na Klinici za plastičnu kirurgiju, Kliničke bolnice „Dubrava“ u Zagrebu.

Krv za analizu prikupljena je od dvije grupe ispitanica:

1. bolesnice s karcinomom dojke
2. zdrave ispitanice.

U skupinu bolesnica sa zloćudnim tumorom dojke uključene su 62 bolesnice u dobi od 25 do 85 godina, sa Tis te T1 i T2 tumorom dojke, bez obzira na N status prema TNM klasifikaciji. Histološki tipovi tumora uključivali su: invazivni karcinom koji nije posebnog tipa (NST), lobularni karcinom i DCIS.

Kontrolna skupina (zdrave ispitanice) su bolesnice bez zloćudnog tumora dojke, liječene na Klinici za plastičnu kirurgiju radi odstranjenja benignih tvorbi kože. Nakon što je izvršen uvid u povijest bolesti te nalaz UZV dojki i/ili MMG nalaz, kod zdravih ispitanica krv je uzimana isključivo prije operacije.

U skupinu zdravih ispitanica uključeno je 36 ispitanica u dobi od 20 do 85 godina.

Kriteriji za isključenje iz studije:

1. bolesnice s uznapredovalom bolešću (T3, T4)
2. bolesnice s recidivnim karcinomom
3. bolesnice s ostalim patohistološkim tipovima karcinoma
4. bolesnice s lokalnom ili sistemskom upalom
5. nerazumijevanje protokola studije zbog bilo kojeg razloga.

U studiju su uključene samo bolesnice koje su na to dobrovoljno pristale i vlastoručno potpisale informirani pristanak.

ETIČKA NAČELA

Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao i Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava donijeli su odluku kako je predloženo istraživanje etički prihvatljivo te se može provesti na način prikazan u obrazloženju teme disertacije.

4.2. MATERIJALI ISTRAŽIVANJA

1. Uzorci tkiva karcinoma dojke dobiveni su iz arhive Kliničkog odjela za patologiju KB Dubrava. Svi uzorci bili su fiksirani u 10 % puferiranom formalinu i uklopljeni u parafinske blokove. Studija je obuhvatila 62 uzastopne bolesnice operirane u KB Dubrava s histološki verificiranim karcinomom dojke u razdoblju od prosinca 2008. do svibnja 2009. godine, a za koje postoje potpuni klinički podatci i histološki nalaz te podatci o preživljenju. Uzorci tkiva identificirani su prema jedinstvenom broju biopsije iz otpusne patohistološke dijagnoze. Nakon identifikacije provjerena je tehnička ispravnost tkiva uklopljenog u parafin.
2. Silanizirana predmetna stakalca.
3. Kemikalije za imunohistokemijski analizu, ELISA test i testiranje specifičnosti protutijela Western blotting tehnikom.
4. Protutijela na TGF β rIII:
 - MAB242 – R&D komercijalno TGF β rIII monoklonsko protutijelo (MAB242, R&D, SAD)
 - T3 – zečje poliklonsko protutijelo na TGF β rIII proizvedeno u Laboratoriju za mineralizirana tkiva u sklopu HITRA projekta
 - sc-74511 – Santa Cruz komercijalno TGF β rIII monoklonsko protutijelo (sc-74511, Santa Cruz, SAD)
5. Medicinska dokumentacija iz arhive Kliničke bolnice Dubrava.

4.3. METODE ISTRAŽIVANJA

Postupak s ispitanicama

Nakon zaprimanja u bolnicu, bolesnicama se dan prije operacije uzimao uzorak krvi od 4 ml u citratnu antikoagulacijsku epruvetu. Isti se postupak ponavljao postoperativno ukupno 1-2 puta, za vrijeme boravka u bolnici odnosno prilikom redovnih kontrola. Prvi postoperativni uzorak je uzet između 3. i 30. dana, dok je kod jedne trećine bolesnica (oko 20 bolesnica) uzet i drugi uzorak krvi između 15. i 60. dana poslije operacije. Bolesnice kojima je uzimana krv dva puta poslije operacije nisu prethodno strogo određene. Drugi postoperativni uzorak uziman je samo u slučaju da je bolesnica došla na kontrolni pregled u tom periodu i ukoliko je bolesnica pristala na ponovno vađenje krvi.

Isti dan po vađenju krvi u laboratoriju se centrifugom od 1500 rpm od krvi odvajala krvna plazma koja je nakon toga pohranjena na -80 °C do daljnje analize. Budući da se radilo o malim volumenima po bolesnici (oko 2-3 ml) svi su uzorci potrošeni u istraživanju tako da nije bilo ostataka koje bi trebao uništavati i odbacivati.

Kod zdravih ispitanica (kontrolna skupina) krv je vađena samo jednom.

Klasična patohistološka analiza

Analiziran je arhivski patohistološki materijal Zavoda za patologiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu. Tkivo uzeto za histološku analizu fiksirano je 24 sata u 10% puferiranom formalinu. Nakon fiksacije i obrade uklopljeno je u parafin. Parafinski blokovi rezani su u rezove debljine 3-5 µm, a nakon toga bojani standardnom hemalaun-eozin (HE) metodom. Na tako dobivenim preparatima postavljena je patohistološka dijagnoza sa standardnim prognostičkim pokazateljima karcinoma dojke.

Za svaki tumor specijalist patolog je odredio histološki tip tumora, nuklearni i histološki gradus, pTNM, postojanje limfovaskularne invazije, status limfnih čvorova i imunohistokemijsku analizu za ER i PR, HER2. Iz kocke s tumorom napravljeni su dodatni rezovi za imunohistokemijsku analizu TGFβ rIII. Zbog objektivnosti nalaza, histološke preparate su pregledala uvijek dva specijalista patologa.

Analiza podataka iz medicinske dokumentacije

Pri skupljanju podataka, korištena je slijedeća medicinska dokumentacija:

1. povijesti bolesti
2. operacijski protokoli
3. patohistološki nalazi
4. ambulantni nalazi kontrolnih pregleda bolesnika.

Identitet pacijenata tijekom istraživanja bio je poznat samo istraživačima, nije bio korišten na bilo koji drugi način osim prilikom primarne identifikacije od kada su umjesto identiteta korišteni identifikacijski brojevi.

Iz dostupne medicinske dokumentacije analizirani su sljedeći parametri:

Od kliničkih parametara analizirali smo dob i vrstu operativnog zahvata.

Od patomorfoloških parametara analizirali smo; veličinu tumora, histološki tip tumora, status limfnih čvorova, TNM klasifikaciju tumora, status ER i PR, status HER2, prisutnost vaskularne invazije te nuklearni i histološki gradus tumora.

Testiranje specifičnosti protutijela na TGF β rIII

PUFERI: 1. Blokirajući pufer - 1x TBS, pH 7,4

- 2% BSA (Santa Cruz, SAD)

2. Pufer za pranje (1xTBS-T) – 1x TBS, pH 7,4

- 0,05% Tween-20 (Sigma, SAD)

Sva protutijela na TGF β rIII upotrijebljena prilikom eksperimentalnog rada provjerena su pomoću metode Western blottinga kako bismo potvrdili selektivnost i specifičnost protutijela.

PROTUTIJELA: 1. MAB242 – R&D komercijalno monoklonsko TGF β rIII protutijelo (MAB-242, R&D, SAD)

2. T3 – zečje poliklonsko protutijelo na TGF β rIII proizvedeno u Laboratoriju za mineralizirana tkiva

3. sc-74511 – Santa Cruz TGF β rIII komercijalno monoklonsko protutijelo (sc-74511, Santa Cruz, SAD).

Na 10% poliakrilamidnom gelu (NP0301, Invitrogen, SAD) u četiri jažice nanošeno je 1 μ g TGF β rIII standarda (242, R&D, SAD). Gel elektroforeza je provedena pri naponu od 170 V i jakosti struje od 65 mA tijekom 70 minuta. Nakon toga je izvršen prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (LC2001, Invitrogen, SAD) pri naponu od 35 V i jakosti struje od 165 mA tijekom 60 minuta. Nakon prijenosa membrana je izrezana u četiri dijela prema svakoj jažici od gela. Svaki dio je posebno inkubiran preko noći na sobnoj temperaturi sa specifičnim protutijelom. Nakon inkubacije membrane su oprane tri puta i inkubirane 60 minuta s odgovarajućim sekundarnim protutijelom konjugiranim s enzimom alkalna fosfataza, MAB242 i sc-74511 s mišjim, a T3 sa zečjim sekundarnim protutijelom. Nakon inkubacije membrane su oprane tri puta i inkubirane s BCIP/NBT supstratom, SigmaFast (B5655, Sigma, SAD) do pojave obojenja na membrani kada je reakcija zaustavljena pranjem u deioniziranoj vodi. Nakon sušenja membrane su skenirane i specifičnost protutijela za standard TGF β rIII je vizualno analizirana.

Određivanje koncentracije TGF β rIII u plazmi pacijentica

PUFERI : 1. Vežujući pufer – 1X PBS, pH 7,4

2. Blokirajući pufer – 1x PBS, pH 7,4
- 2% BSA (Santa Cruz, SAD)

3. Pufer za pranje (1xPBS-T) – 1x PBS, pH 7,4
- 0,05% Tween-20 (Sigma, SAD)

4. Citrat-acetatni pufer - 1M Na-acetat (Kemika, Hrvatska)
- pH=5,9 (namješteno s 1M citratnom kiselinom).

ELISA metoda temelji se na prepoznavanju određene molekule specifičnim protutijelima i provodi u pločicama s 96 bazenčića. Dno bazenčića je prekriveno protutijelima koja će specifično vezati određeni protein. Uzorci, standardi i kontrole nanose se na pločicu te se nakon perioda inkubacije ispiru pri čemu se uklanjaju slabo vezani proteini. Zbog otkrića prisutnosti traženih proteina, u svaki bazenčić se

dodaju sekundarna protutijela konjugirana s enzimom, najčešće peroksidazom ili alkalnom fosfatazom. Nakon određenog inkubacijskog razdoblja, otopina sa sekundarnim protutijelima ispiri se te se konačno dodaje supstrat za enzim. Tijekom inkubacije enzimi metaboliziraju supstrat te se pojavljuje obojenje u bazenčiću proporcionalno koncentraciji proteina u plazmi. U trenutku dovoljnog obojenja, reakcija se prekida te se očitava optička gustoća pri određenoj valnoj dužini. Na osnovi vrijednosti optičkih gustoća standarda izračunava se standardna krivulja iz koje se zatim računaju koncentracije uzoraka.

Monoklonsko protutijelo na TGF β rIII (MAB-242, R&D, SAD) koncentracije 2 μ g/ml imobilizirano je na površinu pločice za ELISA-u Immunolon 2 HB (Thermo Scientific, SAD) pomoću vezujućeg pufera te inkubirano preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije pločica je tri puta isprana puferom za pranje (1X PBS-T). Nespecifično vezanje na pločici spriječeno je dodavanjem blokirajućeg pufera u volumenu od 200 μ L i inkubacijom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, nanesen je standard (TGF β rIII – 242, R&D, SAD) u serijskom razrjeđenju s početnom koncentracijom 200 ng/mL te uzorci plazme u volumenu od 100 μ L. Svi standardi i uzorci nanесeni su u duplikatima i pločica je inkubirana 120 minuta na sobnoj temperaturi. Pločica je oprana od uzoraka i vezani TGF β rIII je detektiran s poliklonskim protutijelom T3, koje je nanесeno na pločicu u volumenu od 100 μ L i u koncentraciji od 0,1 μ g/mL te je pločica inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon pranja nanесeno je sekundarno protutijelo vezano s biotinom koje specifično prepoznaje imunoglobuline iz kunića (BAF008, R&D, SAD) u volumenu od 100 μ L i u koncentraciji od 40 ng/mL te je pločica inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog pranja, na pločicu je nanесen detektirajući reagens streptavidin povezan s HRP enzimom (DY998, R&D, SAD) u razrjeđenju 1 : 200 i volumenu od 100 μ L te je pločica inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za razvoj bojenja korišten je TMB (T2885, Sigma, SAD) supstrat. TMB je otopljen u DMSO (Sigma, SAD) u koncentraciji od 1 mg/mL te razrijeđen 1 : 10 u citrat-acetatnom puferu uz dodatak 0,003 % H₂O₂ (Kemika, Hrvatska). Tako pripremljena otopina dodana je u volumenu od 100 μ L i pločica je inkubirana 15 minuta u mraku. Nakon pojave obojenja 50 μ L 1M H₂SO₄ dodano je u bazenčice kako bi se zaustavila enzimatska reakcija. U roku od jedne minute očitana je vrijednost apsorbancije pri 450 nm na čitaču mikrotitarskih pločica BioTek EL808 (BioTek, SAD).

Izmjerene vrijednosti apsorbancije za sve uzorke određene su u dvostrukim uzorcima (duplikatima) te je za daljnje računanje korištena srednja vrijednost. Kako bi se izračunala vrijednost koncentracije TGF β rIII u uzorcima, korištena je krivulja standarda i nelinearna regresija s četiri parametra.

Imunohistokemijska analiza

Od istih parafinskih blokova učinjen je još jedan rez debljine 4 μ m za imunohistokemijsku analizu. Uzorci su deparafinirani u otopini ksilola (Kemika, Hrvatska), hidrirani u silaznom nizu alkohola (100%, 96%, 70%) i isprani u 1x PBS-u. Za otkrivanje epitopa korišten je pufer K5207 (Dako, Danska) inkubacijom u vodenoj kupelji 15 minuta u mikrovalnoj pećnici snage 600W. Endogena peroksidaza je blokirana inkubacijom reza u 3% H₂O₂ u metanolu. Za prepoznavanje TGF β rIII proteina korišten je Histostain-SP kit (959943, Invitrogen, SAD) prema uputama proizvođača.

Kao primarno protutijelo korišteno je monoklonsko protutijelo koje prepoznaje ljudski TGF β rIII (sc-74511, Santa Cruz, SAD) u koncentraciji od 1,5 μ g/mL dok je za vizualizaciju korišten DAB+ kromogen (K3468, Dako, Danska) u razrijeđenju 1 : 20. Kao pozitivna kontrola korišteno je tkivo bubrega prema uputama proizvođača iz arhive patologije KB Dubrava, a kao negativna kontrola metode korišten je isti postupak pri čemu je izostavljeno primarno protutijelo. Potom su preparati obojani hemalaun eozinom radi vizualizacije staničnih struktura.

Dobiveni preparati su snimljeni. Uzorci su pregledani i slikani pomoću Olympus Provis mikroskopa (Campbell, SAD) pri povećanju od 200 puta (objektiv 10x/0.30, UPlanFI Ph1).

Izražaj TGF β rIII proteina u uzorcima tumora dojke analiziran je semikvantitativnom metodom. Ukupni intenzitet bojenja izražen je u postocima, a vrijednost intenziteta ekspresije TGF β rIII skalom 1 - 3 (1 - slabo, 2 - umjereno, 3 - jako pozitivna reakcija).

4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je Shapiro Wilk testom. Razlike među varijablama s normalnom distribucijom testirane su Student T-testom ili T-testom parnih uzoraka, te gdje je bilo potrebno (tri skupine i više) „one-way“

ANOVOM s post hoc testom Tukey. Razlike među varijablama s nenormalnom distribucijom testirane su Mann-Whitney testom ili Wilcoxon signed ranks testom, odnosno Kruskal Wallis testom u slučaju analiza između triju ili više skupina. Korelacije između normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli testirane su Pearsonovim koeficijentom korelacije, a korelacije između nenormalno distribuiranih varijabli Spearmanovim testom korelacije. Za statistički značajne korelacije u procjeni vrijednosti korelacije kasnije je korištena linearna regresija.

Razlike među kategoričkim varijablama ispitivane su X^2 testom.

Za procjenu utjecaja promatranih varijabli na ishod bolesnica korištene su Kaplan-Meierove krivulje, s log rank Mentel Cox testom za procjenu statističke značajnosti razlika u ishodima među grupama bolesnica. Sve kliničke i patohistološke karakteristike uvrštene su u mješoviti linearni regresijski model za procjenu rizika nepovoljnog ishoda tijekom praćenja. Multivarijatnom analizom procijenjen je utjecaj koncentracije TGF β rIII kao neovisnog čimbenika na ishod bolesnica.

Statistička analiza učinjena je pomoću programskog paketa IBM SPSS Statistics 19, USA. Razina značajnosti podešena je na $p < 0,05$.

5. REZULTATI

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 98 žena, od čega su 62 bolesnice s karcinomom dojke, a 36 ispitanica je bilo u kontrolnoj skupini.

Prosječna dob bolesnica s karcinomom dojke bila je $57,3 \pm 12,7$ godina, dok su žene u kontrolnoj skupini imale prosječnu dob od $38,9 \pm 15,3$ godine, te su bile statistički značajno mlađe u odnosu na ispitivanu skupinu (Student t test, $p < 0,001$). Patohistološke karakteristike tumora bolesnica s karcinomom dojke u ispitivanoj skupini prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Patohistološke karakteristike tumora u bolesnica s karcinomom dojke.

Patohistološka karakteristika		Histološki tip tumora, N (%)		
		NST (N=48)	Lobularni (N=7)	DCIS (N=7)
Veličina tumora (pT)	T1a	4 (8)	/	NP
	T1b	10 (21)	2 (28)	NP
	T1c	20 (42)	/	NP
	T2	14 (29)	5 (72)*	NP
Pozitivni limfni čvor		17 (35)	3 (43)	NP
HER2 status pozitivan		6 (13)	1 (17)	NP
Histološki gradus	1	9 (19)	2 (29)	NP
	2	25 (52)	4 (57)	NP
	3	14 (29)	1 (14)	NP
Hormonski receptori pozitivni		36 (75)	6 (86)	4 (57)
Trostruko negativan		7 (15)	0 (0)	NP
Angioinvazija		10 (21)	0 (0)	NP

* $p < 0,001$, chi kvadrat test

NP – nije primjenjivo

5.1. KIRURŠKO LIJEČENJE BOLESNICA OVISNO O RAZLIČITIM VELIČINAMA TUMORA

Bolesnice su nakon dijagnostičke obrade bile podvrgnute operativnom zahvatu. U tablici 3. prikazana je učestalost kirurških zahvata kojima su bolesnice s različitim histološkim tipom tumora bile podvrgnute ovisno o veličini tumora (pT).

Tablica 3. Kirurški zahvati među bolesnicama s različitim histološkim tipom tumora ovisno o veličini tumora (pT).

Histološki tip tumora	Veličina tumora (pT)	Kirurški zahvat	Broj (%)
NST (N=48)	T1a (N=4)	Kvadrantektomija	2 (50)
		SNSM	1 (25)
		MRM	1 (25)
	T1b (N=12)	Kvadrantektomija	7 (58)
		SNSM	2 (17)
		MRM	3 (15)
	T1c (N=18)	Kvadrantektomija	11 (61)
		SNSM	3 (17)
		MRM	4 (22)
	T2 (N=14)	Kvadrantektomija	2 (14)
		SNSM	1 (7)
		MRM	11 (79)*
Lobularni (N=7)	T1a (N=1)	Kvadrantektomija	0
		SNSM	0
		MRM	0
	T1b (N=1)	Kvadrantektomija	2 (100)
		SNSM	0
		MRM	0
	T1c (N=0)	Kvadrantektomija	0
		SNSM	0
		MRM	0
	T2 (N=5)	Kvadrantektomija	1 (20)
		SNSM	2 (40)
		MRM	2 (40)
DCIS (N=7)		Kvadrantektomija	3 (42)
		SNSM	2 (29)
		MRM	2 (29)

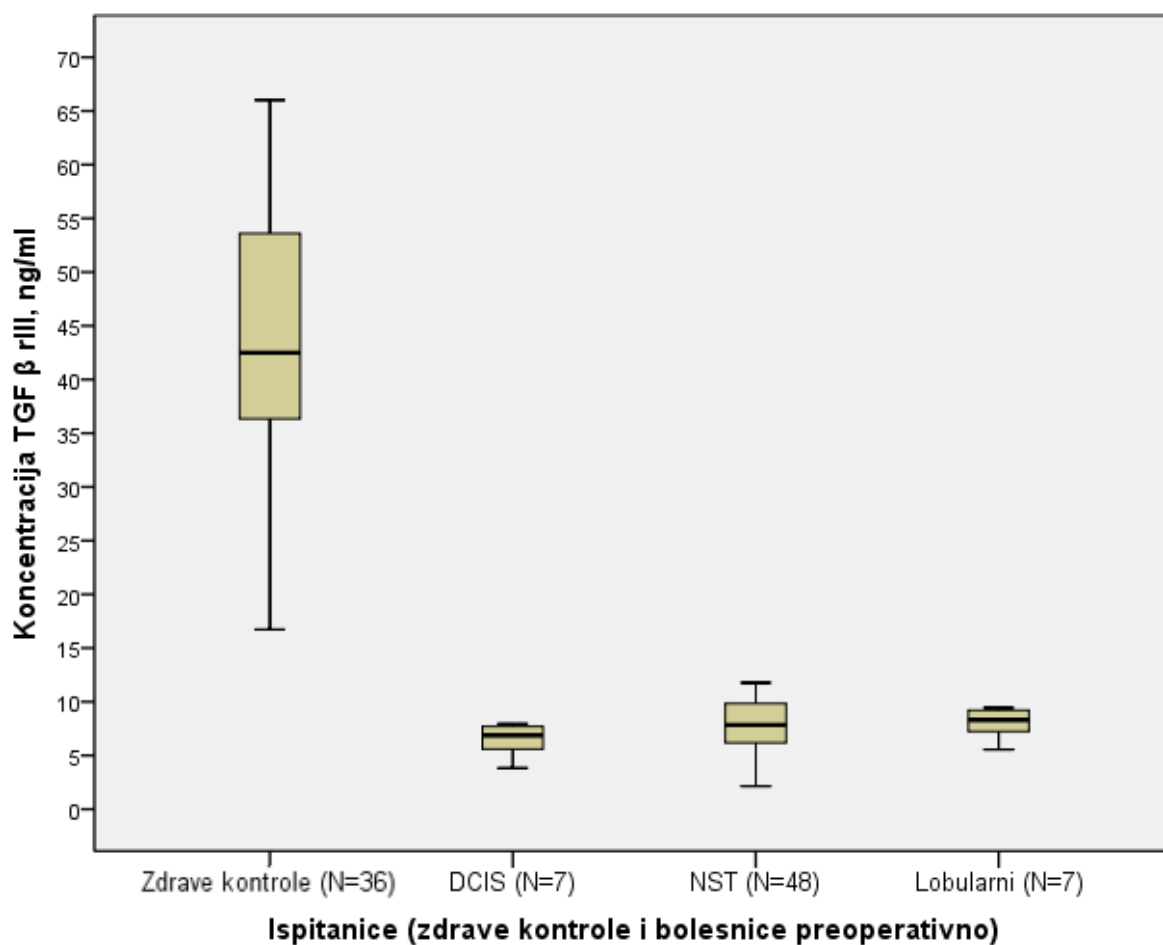
* chi kvadrat test, $p < 0,05$

Bolesnice s invazivnim karcinomom koji nije posebnog tipa (NST) s tumorima T2 značajno češće bile su podvrgavane zahvatu MRM nego ostale bolesnice (Tablica 3.). S obzirom na mali broj bolesnica s lobularnim karcinomom i DCIS, statistička analiza u tim skupinama nije bila provedena, iako je vidljiv trend učestalije kvadrantektomije u tih ispitanica (Tablica 3.).

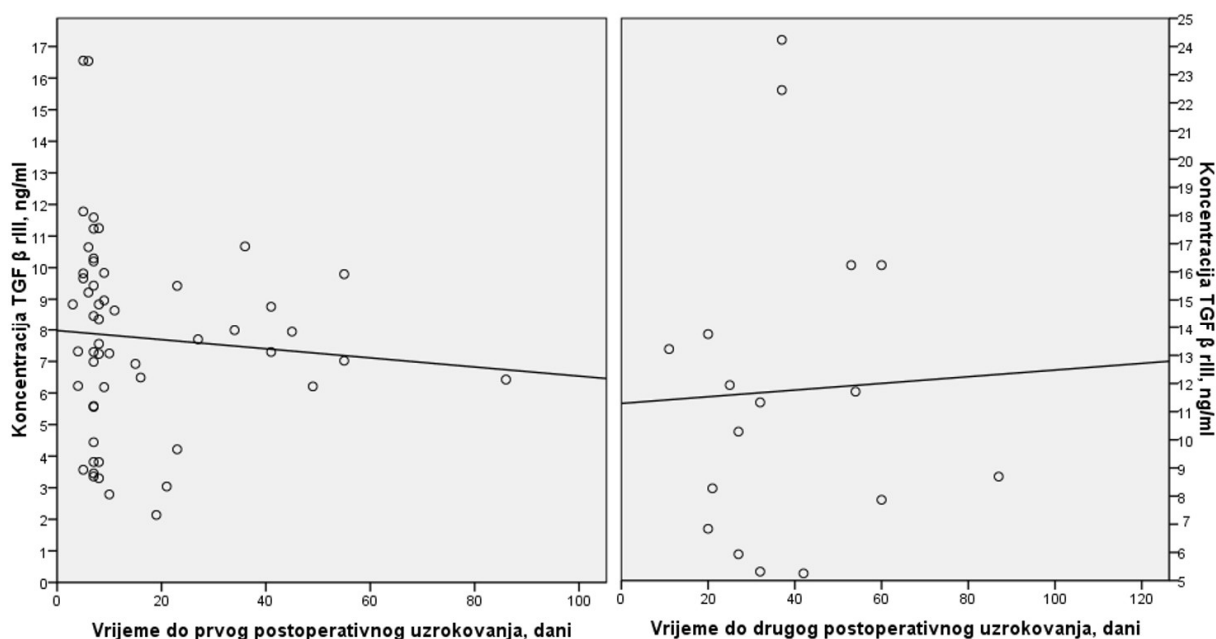
5.2. REZULTATI MJERENJA KONCENTRACIJE TGF β rIII U PLAZMI BOLESNICA PRIJE I NAKON OPERATIVNOG ZAHVATA

Prosječna koncentracija TGF β rIII u plazmi svih bolesnica s karcinomom dojke prije zahvata iznosila je 7,63 ng/ml (raspon 14,41 ng/ml), što je bilo statistički značajno manje od kontrolne skupine, čija je koncentracija TGF β rIII prosječno iznosila 42,50 ng/ml (raspon 49,29 ng/ml); (Mann-Whitney test, $p < 0,001$). Bez obzira na histološki tip tumora (DCIS, NST, lobularni) bolesnice iz svake pojedine skupine imale su značajno manje vrijednosti koncentracije TGF β rIII prije operativnog zahvata u usporedbi s kontrolnom skupinom (Mann Whitney test, $p < 0,001$) (Slika 8.).

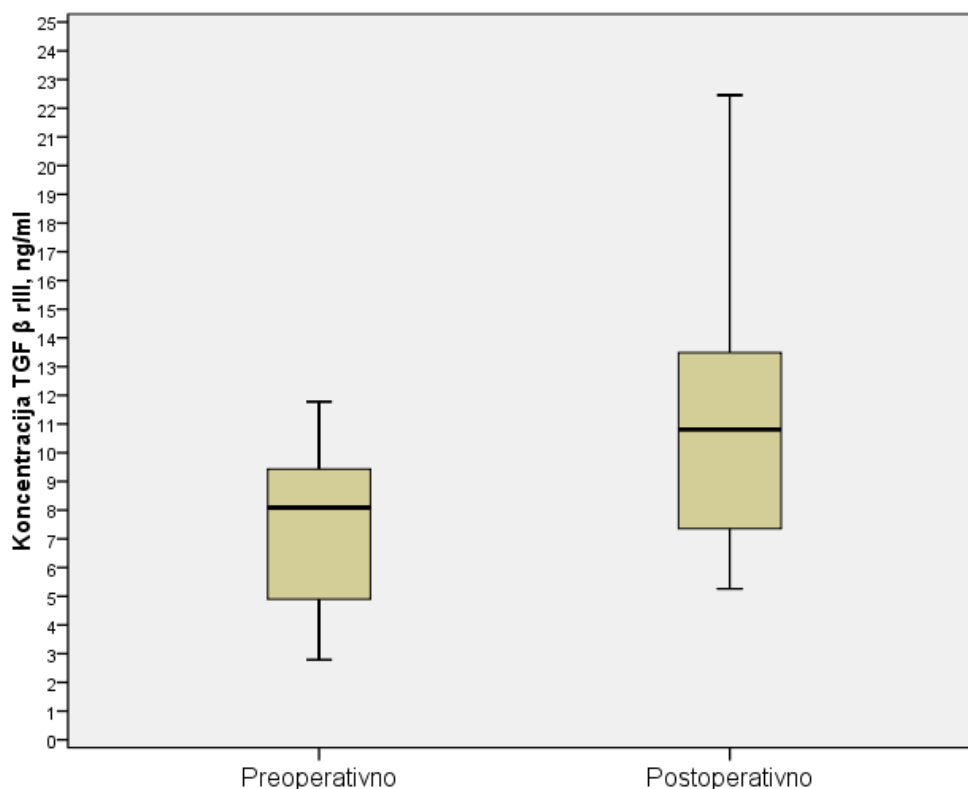
Podatci o porastu koncentracije TGF β rIII nakon operacije dobiveni su za 55 bolesnica u prvom postoperativnom uzorkovanju i za 32 bolesnice u drugom postoperativnom uzorkovanju (sve s NST ili lobularnim histološkim tipom tumora). Medijan vremena od uzorkovanja prije zahvata do prvog postoperativnog uzorkovanja iznosio je 8 dana (minimalno 3, maksimalno 86 dana). Medijan vremena od preoperativnog uzorkovanja do drugog postoperativnog uzorkovanja iznosio je 32 dana (minimalno 9, maksimalno 104 dana). Koncentracija TGF β rIII u plazmi porasla je nakon zahvata u 87% od svih bolesnica s dostupnim podacima (28 od 32 bolesnice), i to promatrano između preoperativnog i drugog postoperativnog uzorkovanja. Učinjenom procjenom krivulje trenda promjene koncentracije TGF β rIII između preoperativnog i prvog postoperativnog uzorkovanja uočen je nesignifikantan negativni trend promjene koncentracije (Slika 9.). Trend promjene koncentracije TGF β rIII u plazmi između preoperativnog uzorkovanja i drugog postoperativnog uzorkovanja bio je pozitivan (Slika 9.), a razlika u prosječnoj koncentraciji TGF β rIII kod 19 bolesnica prije operacije i u drugom postoperativnom mjerenju bila je statistički značajna (Slika 10.).



Slika 8. Razlike u koncentraciji TGF β rIII između bolesnica s različitim histološkim tipom karcinoma i zdravih kontrola.



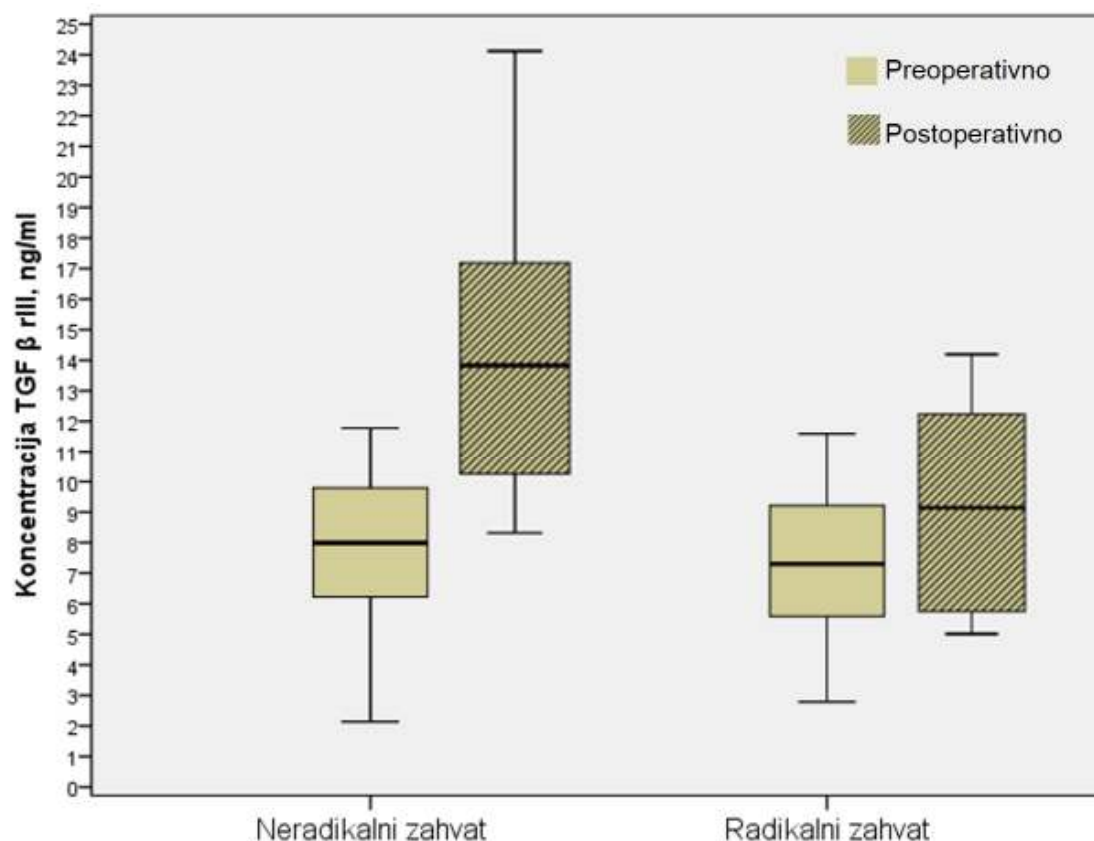
Slika 9. Trendovi promjene koncentracije TGF β rIII nakon operativnog zahvata u prvom i drugom uzorkovanju.



Slika 10. Značajan porast TGF β rIII u bolesnica u vremenu između preoperativnog i drugog postoperativnog uzorkovanja (Wilcoxon signed rank test, $Z=-3,574$, $p<0,001$).

Analizirane su razlike u porastu koncentracije TGF β rIII u drugom postoperativnom uzorkovanju ovisno o radikalnosti operativnog zahvata, gdje su bolesnice podijeljene u dvije skupine: bolesnice podvrgnute radikalnom operativnom zahvatu (SMSN i MRM) i bolesnice podvrgnute neradikalnom operativnom zahvatu (kvadrantektomija). Nije bilo značajnih razlika u koncentraciji TGF β rIII izmjerenoj u plazmi preoperativno (Mann-Whitney test, $p=0,696$) i izmjerenoj u drugom postoperativnom mjerenju (Mann-Whitney test, $p=0,118$) između bolesnica podvrgnutih radikalnom zahvatu i onih podvrgnutih neradikalnom zahvatu. (Slika 11.)

U objema skupinama došlo je do značajnog postoperativnog porasta koncentracije TGF β rIII u plazmi, i to s većom razinom značajnosti među skupinom podvrgnutom neradikalnom zahvatu (Wilcoxon signed ranks test, $p=0,018$ za radikalni zahvat i $p=0,007$ za neradikalni zahvat, Slika 11).



Slika 11. Preoperativne i druge postoperativne koncentracije TGF β rIII u bolesnica podvrgnutih neradikalnom i radikalnom zahvatu.

Učinjena je analiza korelacije koncentracije TGF β rIII u prvom i drugom postoperativnom uzorkovanju s vremenom proteklom između preoperativnog i postoperativnog uzorkovanja. Nađena je nesignifikantna negativna korelacija između vremena proteklog od prvog postoperativnog uzorkovanja i koncentracije TGF β rIII u prvom postoperativnom uzorkovanju (Spearmanov rho -0,231, $p=0,096$). Također je nađena nesignifikantna pozitivna korelacija između vremena proteklog od drugog postoperativnog uzorkovanja i koncentracije TGF β rIII u drugom postoperativnom uzorkovanju (Spearmanov rho 0,070, $p=0,789$).

5.3. RAZLIKE U PREOPERATIVNOJ KONCENTRACIJI TGF β rIII OVISNO O HISTOLOŠKOM TIPU I PATOHISTOLOŠKIM ZNAČAJKAMA INVAZIVNIH TUMORA

U tablici 4. prikazane su razlike u preoperativnoj koncentraciji TGF β rIII u plazmi bolesnica ovisno o patohistološkim značajkama tumora. Nije nađeno značajnih razlika ovisno o veličini tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova, statusu HER2 receptora, histološkom gradusu, statusu hormonskih receptora i angioinvazivnosti tumora. S obzirom na histološki gradus, vidljivo je kako su bolesnice s lobularnim karcinomom i histološkim gradusom 1 imale najnižu preoperativnu koncentraciju TGF β rIII u odnosu na ostale bolesnice, ali ta razlika nije bila statistički značajna (Kruskal Wallis test, $p=0,486$). Također, bolesnice s hormonski pozitivnim DCIS imale su nižu preoperativnu koncentraciju TGF β rIII u odnosu na bolesnice s hormonski pozitivnim NST ili lobularnim tumorima, ali ni ta razlika nije bila statistički značajna (Kruskal Wallis test, $p=0,317$).

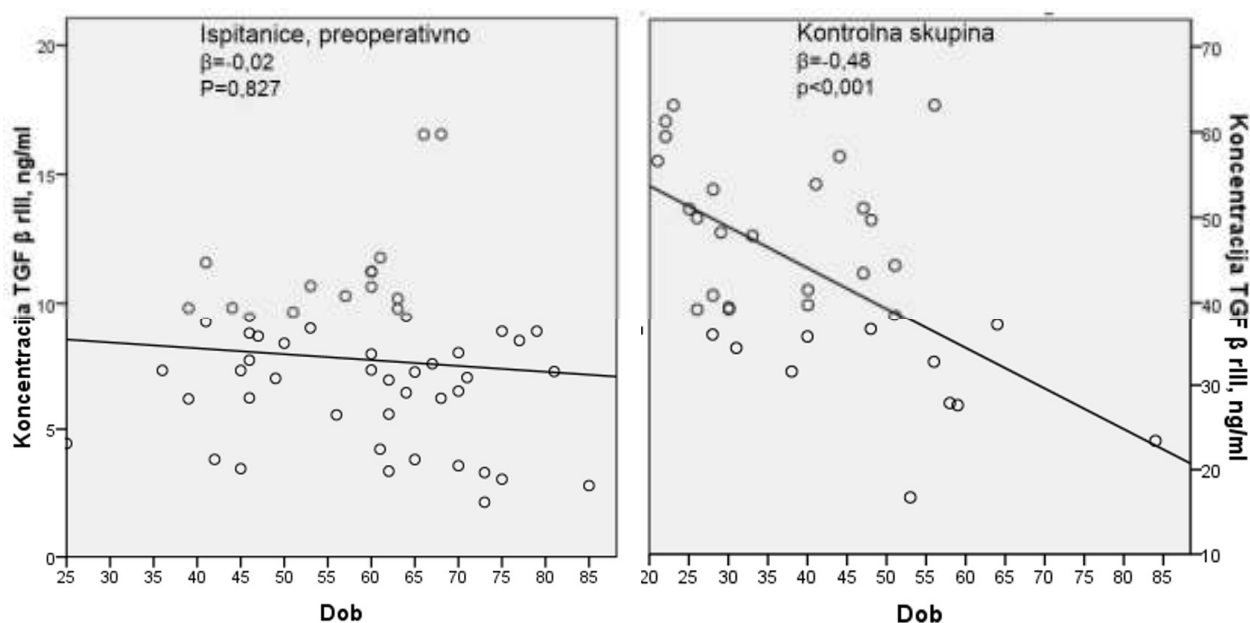
Učinjena je i analiza korelacije veličine tumora u centimetrima i preoperativne koncentracije TGF β rIII. Dobivena je nesignifikantna negativna korelacija između veličine tumora u centimetrima i preoperativne koncentracije TGF β rIII (Spearmanov rho $-0,148$, $p=0,290$).

Tablica 4. Preoperativne koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s različitim histološkim tipom tumora, ovisno o patohistološkim karakteristikama tumora.

Patohistološka karakteristika tumora		Histološki tip tumora; TGF β rIII, ng/mL, medijan (raspon)		
		NST	Lobularni	DCIS
Veličina tumora (pT)	T1a	10,65 (0)	NP	NP
	T1b	8,84 (4,33)	9,43 (3,92)	
	T1c	6,99 (9,64)	NP	
	T2	8,42 (13,75)	7,62 (3,65)	
Pozitivni limfni čvor	DA	7,30 (13,75)	8,23 (1,97)	NP
	NE	8,04 (9,64)	7,99 (3,87)	
HER2 pozitivan	DA	7,30 (5,02)	7,24 (0)	NP
	NE	8,36 (14,40)	8,60 (3,87)	
Histološki gradus	1	10,67 (12,97)	5,56 (0)	NP
	2	7,26 (9,00)	9,21 (1,44)	
	3	7,32 (9,45)	7,24 (0)	
Hormonski pozitivan	DA	7,32 (14,40)	8,00 (3,87)	5,01 (2,39)
	NE	7,89 (4,74)	7,24 (0)	7,70 (2,36)
Trostruko negativan	DA	9,79 (4,74)	NP	NP
	NE	7,31 (14,40)		
Angioinvazivnost	DA	7,30 (6,79)	NP	NP
	NE	7,89 (14,40)		

NP – nije primjenjivo

Uočena je značajna linearna međuovisnost dobi i koncentracije TGF β rIII u kontrolnoj skupini, za razliku od bolesnica, gdje te linearne međuovisnosti nije bilo (Slika 12.). Među bolesnicama je nađena nesignifikantna negativna korelacija između dobi i koncentracije TGF β rIII (Pearsonov faktor korelacije -0,097, $p=0,484$). Ti rezultati pokazuju kako značajna razlika izmjerenih koncentracija TGF β rIII između bolesnica i kontrolne skupine nije rezultat značajne razlike u dobi između te dvije skupine, jer je vidljivo kako dob ne utječe jednako na vrijednosti TGF β rIII u bolesnica i zdravih osoba.



Slika 12. Razlike u ovisnosti koncentracije TGF β rIII o dobi bolesnica i kontrolne skupine.

5.4. PROMJENA KONCENTRACIJE TGF β rIII NAKON UČINJENOG OPERATIVNOG ZAHVATA

Do porasta TGF β rIII u vremenu između operativnog zahvata i drugog postoperativnog uzorkovanja došlo je u 87 % bolesnica (28 od 32 bolesnice). Prosječno je, u toj skupini bolesnica, u prosječnom vremenu od 32 dana, TGF β rIII porastao za 48% (od prosječne vrijednosti 7,63 ng/ml do prosječne vrijednosti 11,32 ng/ml). Od 32 bolesnice, kod njih 11 (34%) došlo je do porasta TGF β rIII za više od 50%. Razlike u patohistološkim karakteristikama invazivnih tumora između bolesnica kod kojih je TGF β rIII porastao za ili više od 50% u odnosu na one kod kojih je porastao za manje od 50%, ili nije porastao, prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Porast TGF β rIII ovisno o patohistološkim karakteristikama tumora.

Patohistološka karakteristika		Porast TGF β rIII za $\geq 50\%$		Chi kvadrat
		DA N=11	NE N=21	
Veličina tumora (pT)	T1a	1 (9)	3 (14)	NS
	T1b	3 (27)	3 (14)	
	T1c	4 (37)	8 (38)	
	T2	3 (27)	7 (32)	
Pozitivni limfni čvor	DA	6 (55)	7 (33)	NS
	NE	5 (45)	14 (67)	
HER2 pozitivan	DA	3 (27)	3 (14)	NS
	NE	8 (73)	18 (86)	
Histološki gradus	1	2 (18)	3 (16)	NS
	2	6 (55)	12 (57)	
	3	3 (27)	6 (28)	
Hormonski receptori pozitivni	DA	9 (82)	13 (62)	NS
	NE	2 (18)	8 (38)	
Trostruko negativan	DA	1 (9)	6 (29)	NS
	NE	10 (91)	15 (71)	
Angioinvazivnost	DA	2 (18)	4 (19)	NS
	NE	9 (82)	17 (81)	

NS – nesignifikantna P vrijednost

Nije nađeno značajnih razlika u udjelima bolesnica kod kojih je došlo do porasta koncentracije TGF β rIII za više od 50% između preoperativnog i drugog postoperativnog uzorkovanja ovisno o veličini tumora, prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova, HER2 statusu, hormonskom ili receptorskom statusu, histološkom gradusu ili angioinvazivnosti tumora (Tablica 5.). S obzirom na to, nađen je statistički značajan porast plazmatske koncentracije TGF β rIII u drugom postoperativnom uzorkovanju opisan na slici 10. kod svih bolesnica, neovisno o histološkom tipu, veličini tumora, prisutnosti pozitivnih limfnih čvorova, hormonskom i HER2 statusu, histološkom gradusu i angioinvazivnosti.

5.5. IMUNOHISTOKEMIJSKI PARAMETRI EKSPRESIJE TGF β rIII

Imunohistokemijska ekspresija TGF β rIII analizirana je u tumorskom tkivu dojke, te u slučaju nalaza zdravog tkiva u istom uzorku, i u zdravom tkivu dojki bolesnica s karcinomom dojke. (Slika 13. i 14.)

Tablica 6. pokazuje značajne razlike u intenzitetu (skala od 0 do 3) imunohistokemijske ekspresije TGF β rIII u tumorskom i zdravom tkivu dojki bolesnica s karcinomom dojke, gdje zdravo tkivo dojke u značajnije većem udjelu slabo ili nikako ne eksprimira TGF β rIII, za razliku od tumorskog tkiva koje ga umjereno ili jako eksprimira u 65 % slučajeva.

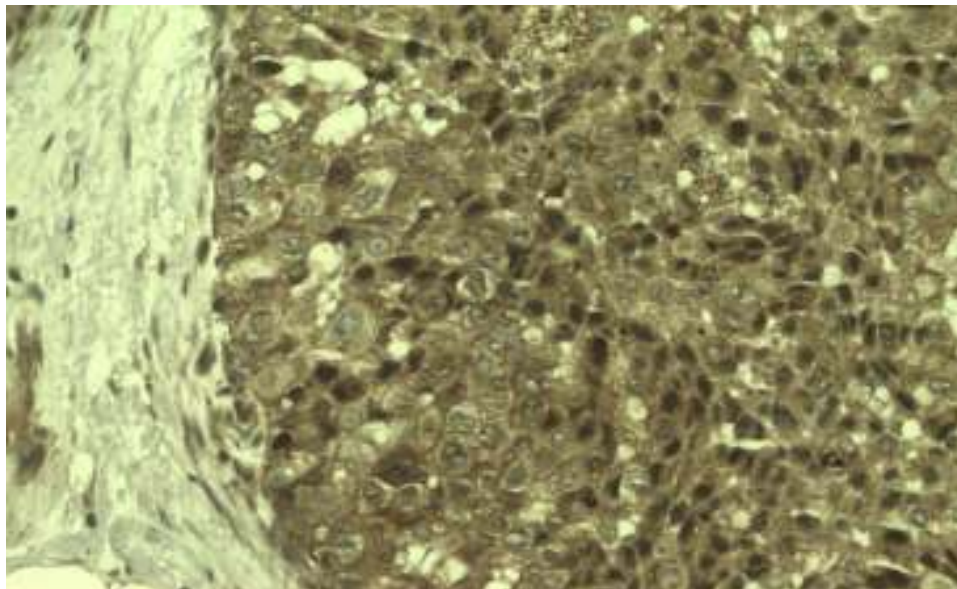
Tablica 6. Razlike u imunohistokemijskoj ekspresiji TGF β rIII u tumorskom i zdravom tkivu dojke.

Tkivo	Imunohistokemijska ekspresija TGF β rIII, N (%)			
	Nema (0)	Slaba (1)	Umjerena (2)	Jaka (3)
Tumor	10 (16)	12 (19)	27 (44)	13 (21)
Zdravo*	14 (30)	23 (50)	9 (20)	0

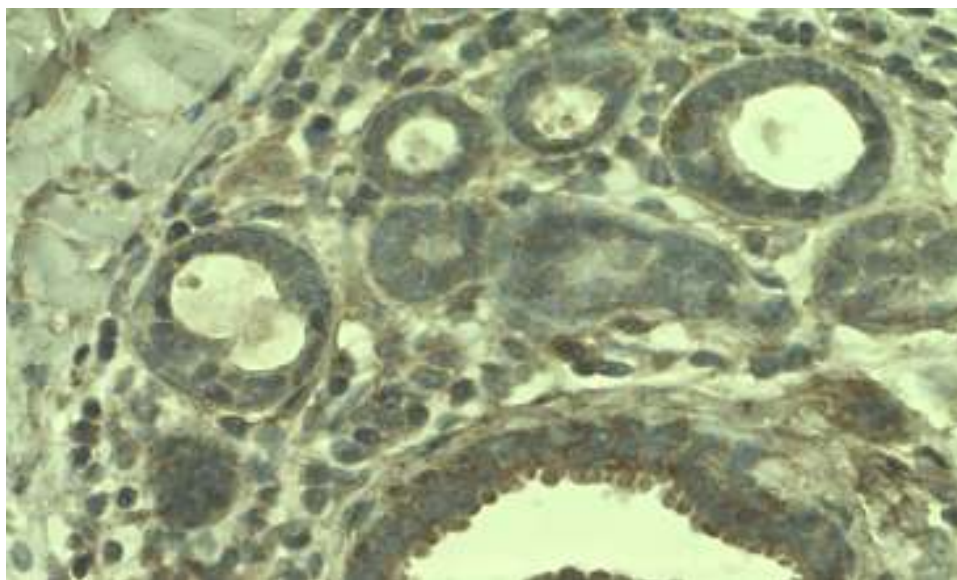
*chi kvadrat, $p < 0,05$

Vrijednosti intenziteta ekspresije TGF β rIII na skali od 1 do 3 pomnožene su s postotkom stanica koje ekspimiraju TGF β rIII te je dobiven umnožak intenziteta ekspresije i udjela ekspresije čiji je medijan u ispitivanoj skupini iznosio 100 (raspon od 0 do 300). Razlike između umnožaka intenziteta ekspresije i udjela ekspresije

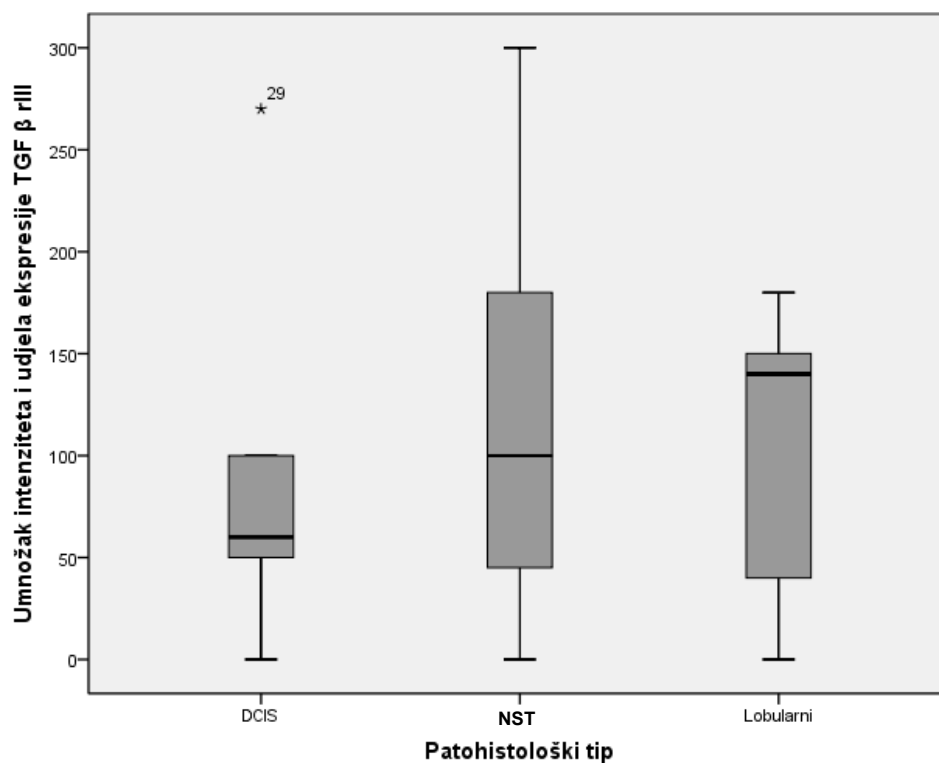
među bolesnicama s različitim kliničkim karakteristikama prikazane su na slikama 14. do 21.



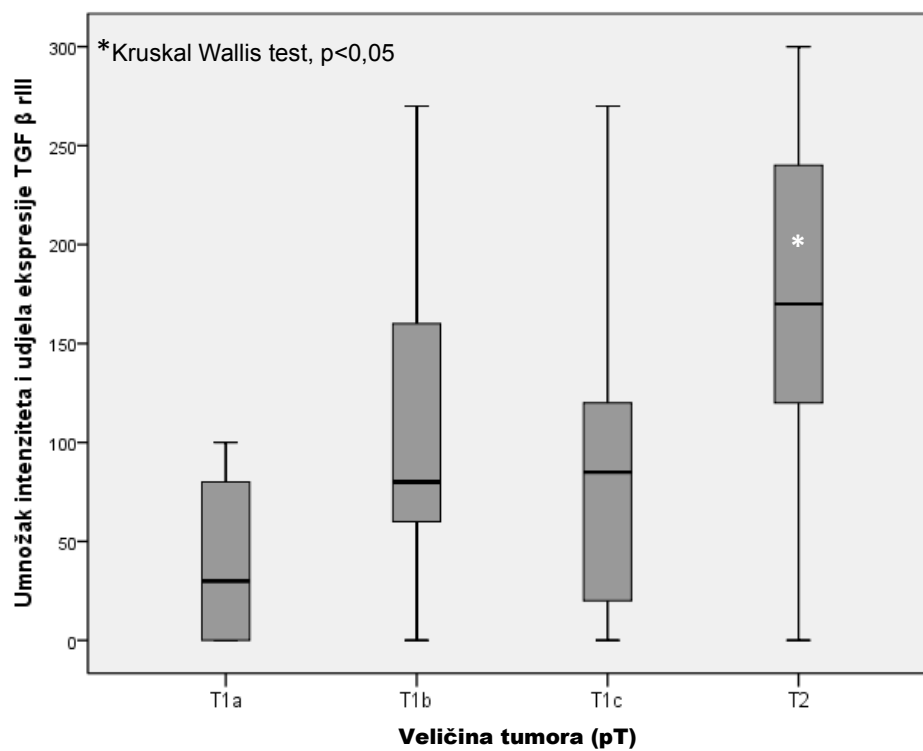
Slika 13. Imunohistokemijsko bojenje s anti- TGF β rIII protutijelom na uzorku karcinoma dojke (x200).



Slika 14. Imunohistokemijsko bojenje s anti- TGF β rIII protutijelom na zdravom tkivu dojke (x200).

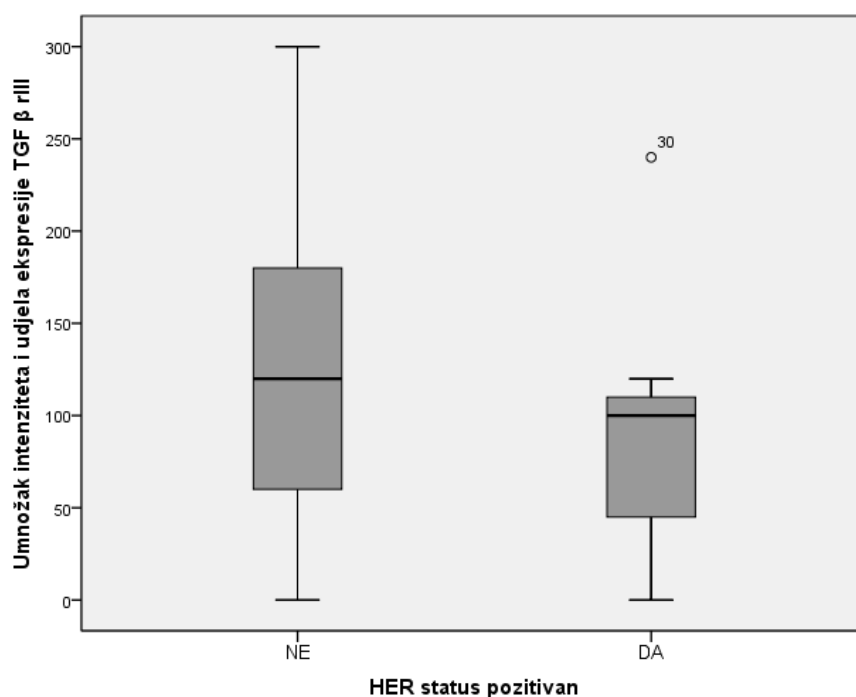


Slika 14. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o histološkom tipu karcinoma.

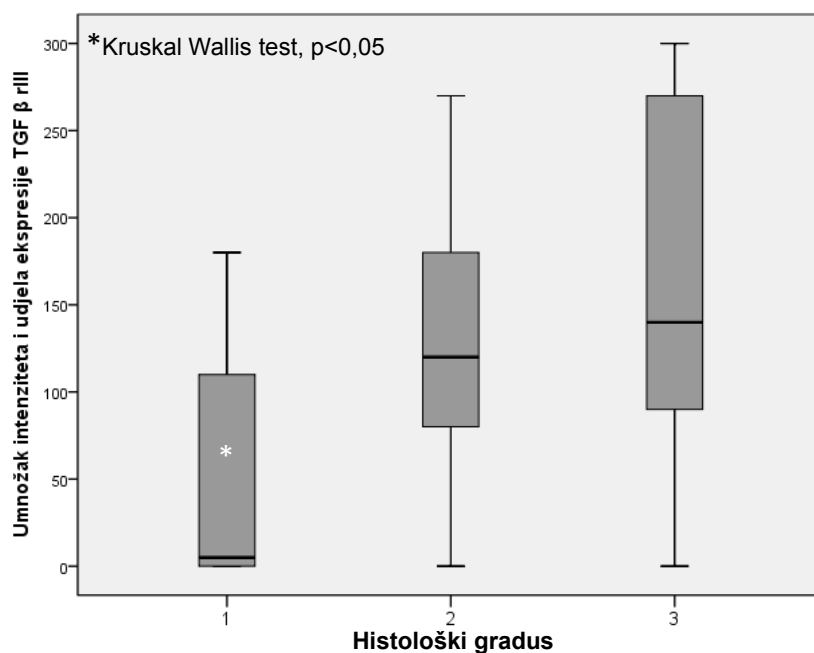


Slika 15. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o veličini tumora bolesnica s invazivnim karcinomom dojke.

Nije bilo statistički značajne razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između bolesnica s različitim histološkim tipom tumora (Slika 14., Kruskal Wallis test, $p=0,749$). Razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između bolesnica s različitom veličinom tumora bile su statistički značajne (Slika 15.). Post-hoc testovima nađeno je kako je ta značajna razlika rezultat statistički značajno višeg umnoška u bolesnica sa veličinom tumora T2 u odnosu na bolesnice sa veličinom tumora T1a (Slika 15.).



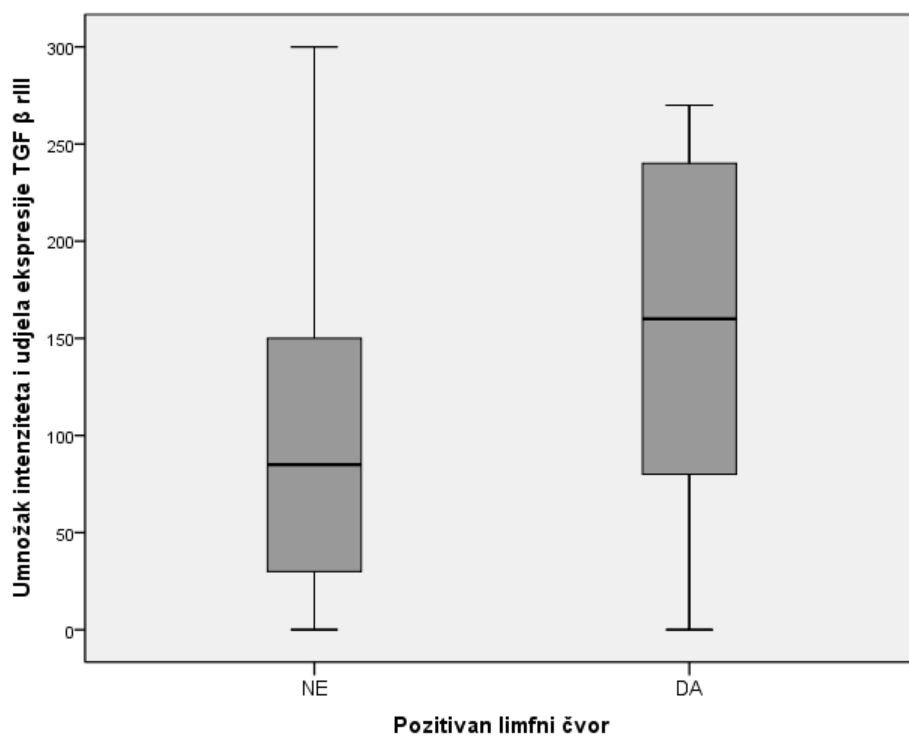
Slika 16. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o HER2 statusu bolesnica s invazivnim karcinomom dojke.



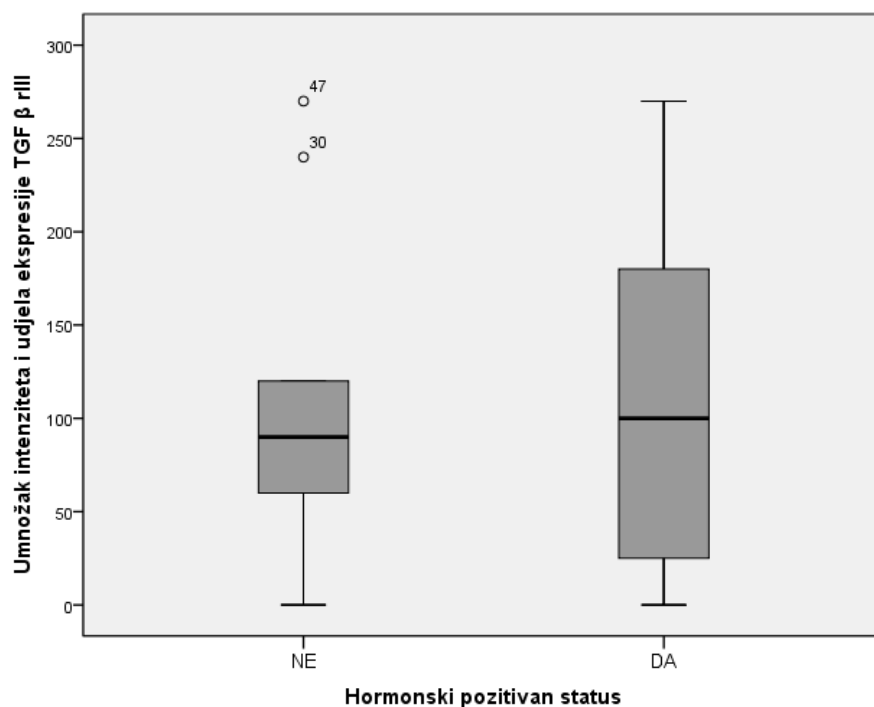
Slika 17. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o histološkom gradusu invazivnih karcinoma dojke.

Nije bilo statistički značajne razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između bolesnica s različitim HER2 statusom (Slika 16., Mann-Whitney test, $p=0,073$). Razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između bolesnica s različitim histološkim gradusom bile su statistički značajne (Slika 17.). Post-hoc testovima nađeno je kako je ta značajna razlika rezultat statistički značajno nižeg umnoška u bolesnica s histološkim gradusom 1 u odnosu na bolesnice s histološkim gradusom 2 ili 3 (Slika 17.).

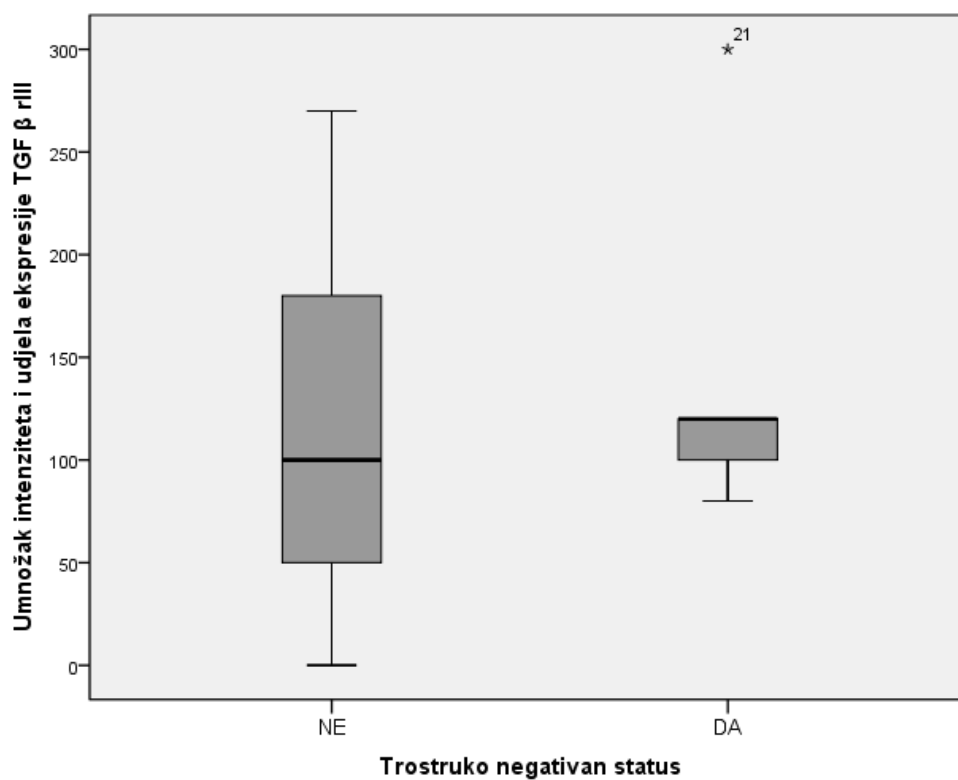
Bolesnice s pozitivnim limfnim čvorovima nisu imale različit umnožak intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII u odnosu na bolesnice s negativnim limfnim čvorovima (Slika 18.). Značajne razlike nisu nađene ni s obzirom na hormonski status (Slika 19.), odnosno ukupni receptorski status (Slika 20.). (Mann-Whitney test, $p>0,05$)



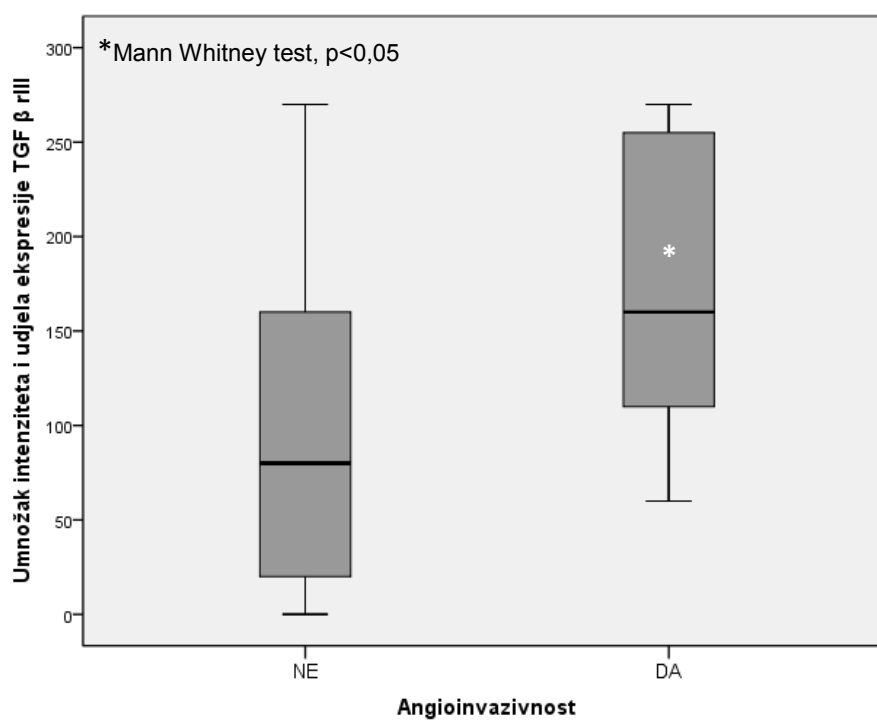
Slika 18. Umnošci intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o pozitivnosti limfnog čvora bolesnica s invazivnim karcinomom dojke.



Slika 19. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o hormonskom statusu bolesnica s invazivnim karcinomom dojke.



Slika 20. Umnošci intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o trostruko negativnom statusu NST karcinoma.



Slika 21. Razlike u umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o angioinvazivnosti NST karcinoma.

Nađena je značajna razlika u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između bolesnica s potvrđenom angioinvazivnosti tumora, u odnosu na one koje to nisu imale (Slika 21.).

5.6. KORELACIJA PREOPERATIVNE KONCENTRACIJE TGF β rIII U PLAZMI I UMNOŠKA INTENZITETA I UDJELA EKSPRESIJE TGF β rIII

Nije nađeno statistički značajne korelacije između preoperativne koncentracije TGF β rIII u plazmi i umnoška intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII, iako je zamijećena diskretna pozitivna korelacija između promatranih vrijednosti (Spearmanov rho 0,023, $p=0,878$).

5.7. PREŽIVLJENJE BOLESNICA BEZ NEPOVOLJNOG PRIMARNOG ISHODA TIJEKOM PET GODINA

U studiji je analizirano preživljenje bolesnica bez progresije bolesti koja je definirana pojavom nepovoljnog primarnog ishoda. Nepovoljni primarni ishod u ispitivanoj skupini definiran je kao: pojava metastaze, lokalnog recidiva ili pojava novog tumora dojke tijekom navedenog perioda praćenja bolesnica. S obzirom da je istraživanje provedeno u skupini bolesnica sa stadijem bolesti T1 i T2 NST ili lobularnog karcinoma, gdje je bila očekivana niska 5-godišnja smrtnost povezana s osnovnom bolesti, smrt nije bila uključena u kompozitni primarni ishod korišten u analizama. U ispitivanoj skupini ukupno osam bolesnica (12,9%) je umrlo tijekom 5 godina, od čega je u pet (8%) bolesnica smrtni ishod bio povezanim s osnovnom bolešću.

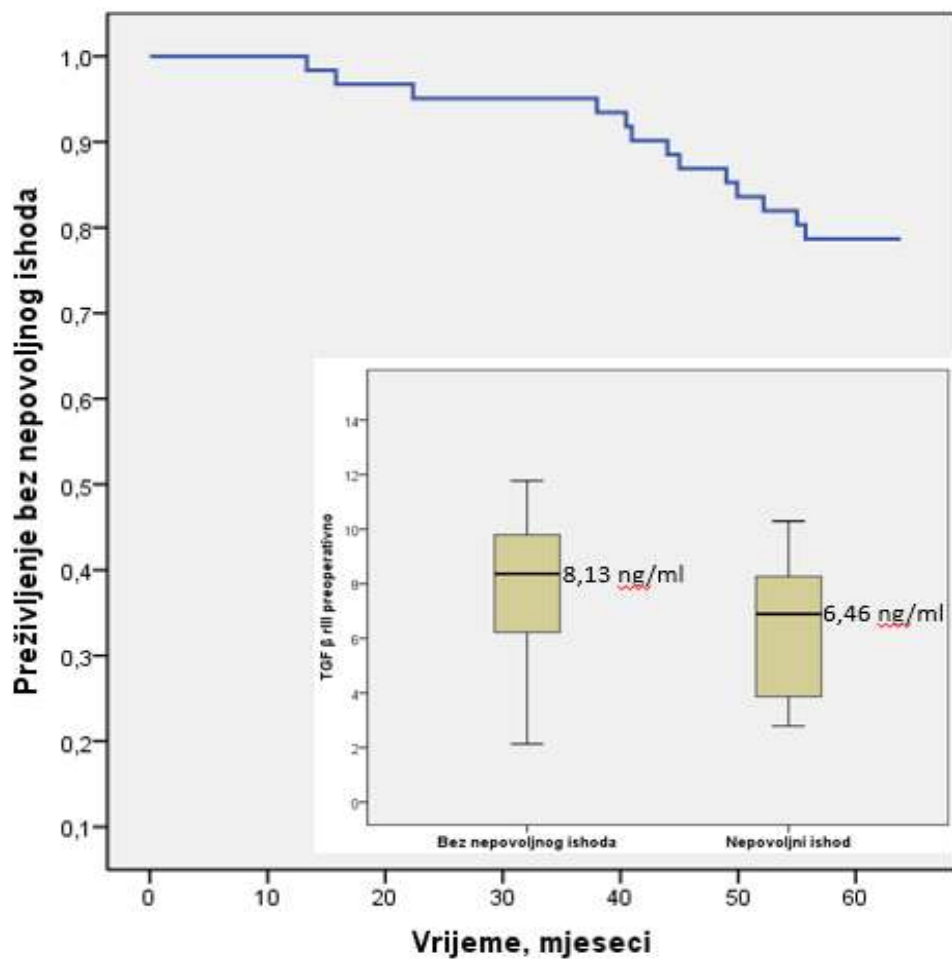
Prosječno praćenje bolesnica iznosilo je 61,2 mjeseca (raspon od 13,3 do 63,8 mjeseci). U tom razdoblju ukupno preživljenje bez progresije bolesti među svim promatranim bolesnicama bilo je 79% (49 od 62 bolesnice).

Dodatno je analizirano preživljenje bez progresije bolesti u odnosu na kliničke i patohistološke karakteristike te preoperativnu plazmatsku koncentraciju TGF β rIII samo među bolesnicama s NST karcinomom i dostupnim svim podacima (ukupno 47 bolesnica). Među tom skupinom bolesnica zabilježeno je 5-godišnje preživljenje bez progresije bolesti u 75% slučajeva (35 od 47 bolesnica). Nije nađeno statistički značajne razlike u dobi bolesnica ovisno o pojavnosti nepovoljnog primarnog ishoda

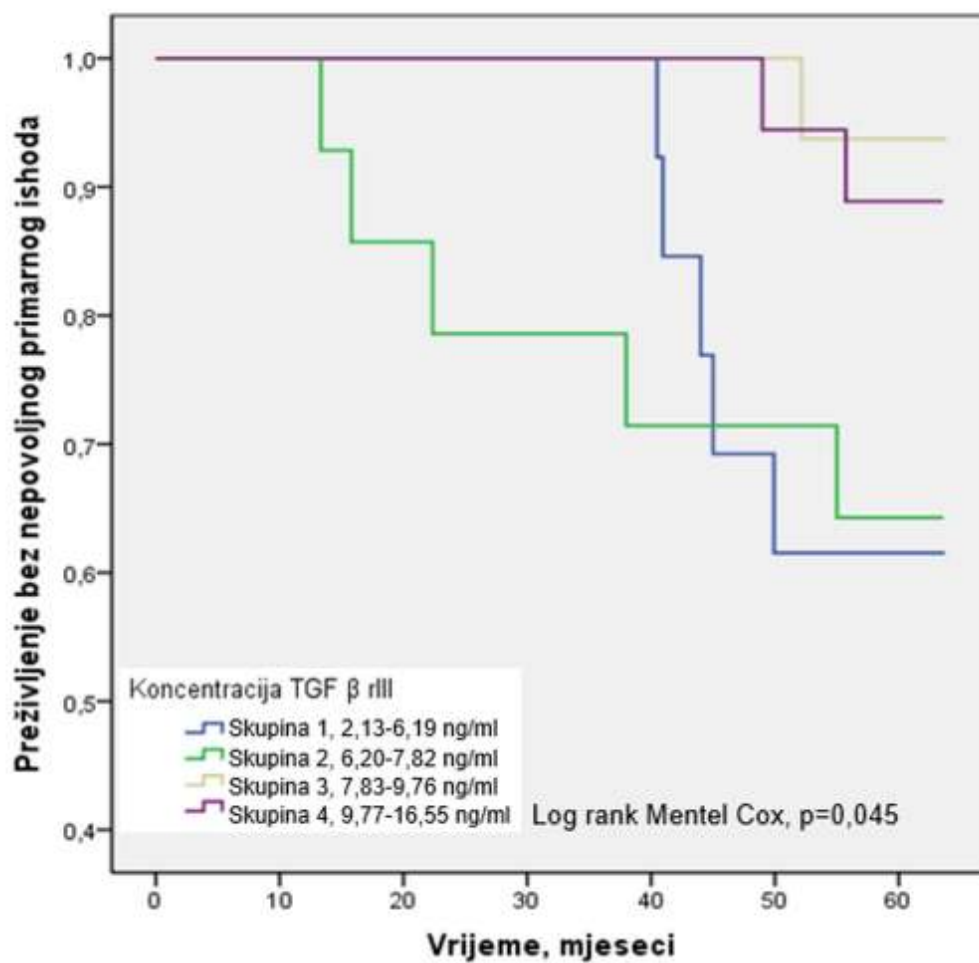
($57,8 \pm 10,6$ godina u bolesnica bez nepovoljnog primarnog ishoda nasuprot $54,7 \pm 18,9$ godina u bolesnica s nepovoljnim primarnim ishodom, $p=0,442$, Student T-test). Isto tako nije nađeno značajne razlike u 5-godišnjem preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda ovisno o radikalnosti operativnog zahvata kojim su bolesnice bile operirane (86,2% među bolesnicama s neradikalnim zahvatom nasuprot 71,9% među bolesnicama s radikalnim zahvatom, log rank Mentel Cox $p=0,205$, OR 2,446, CI 0,662-9,036). Bolesnice koje su preživjele bez zabilježenog nepovoljnog primarnog ishoda imale su preoperativno veću vrijednost plazmatske koncentracije TGF β rIII u usporedbi s bolesnicama s nepovoljnim primarnim ishodom (8,13 nasuprot 6,46, tim redom), ali ta razlika ispitana Mann-Whitney testom nije dosegla statističku značajnost ($p=0,076$) (Slika 22.).

Ispitivana skupina bolesnica s NST karcinomima dojke podijeljena je u četiri skupine prema kvartilama vrijednosti preoperativne koncentracije TGF β rIII u plazmi: skupina 1 (2,13 do 6,19 ng/mL), skupina 2 (6,20 do 7,82 ng/mL), skupina 3 (7,83 do 9,76 ng/mL) i skupina 4 (9,77 do 16,55 ng/mL). Skupine smo koristili za usporedbu preživljenja bolesnica bez zabilježenog nepovoljnog primarnog ishoda tijekom 5-godišnjeg praćenja ovisno o preoperativnoj koncentraciji TGF β rIII u plazmi. Za procjenu utjecaja promatranih varijabli na ishod bolesnica korištene su Kaplan-Meierove krivulje, s log rank Mentel Cox testom za procjenu statističke značajnosti razlika u ishodima među grupama bolesnica. Sve kliničke i patohistološke karakteristike uvrštene su u mješoviti linearni regresijski model za procjenu rizika nepovoljnog ishoda tijekom praćenja. Multivarijatnom analizom procijenjen je utjecaj koncentracije TGF β rIII kao neovisnog čimbenika na ishod bolesnica.

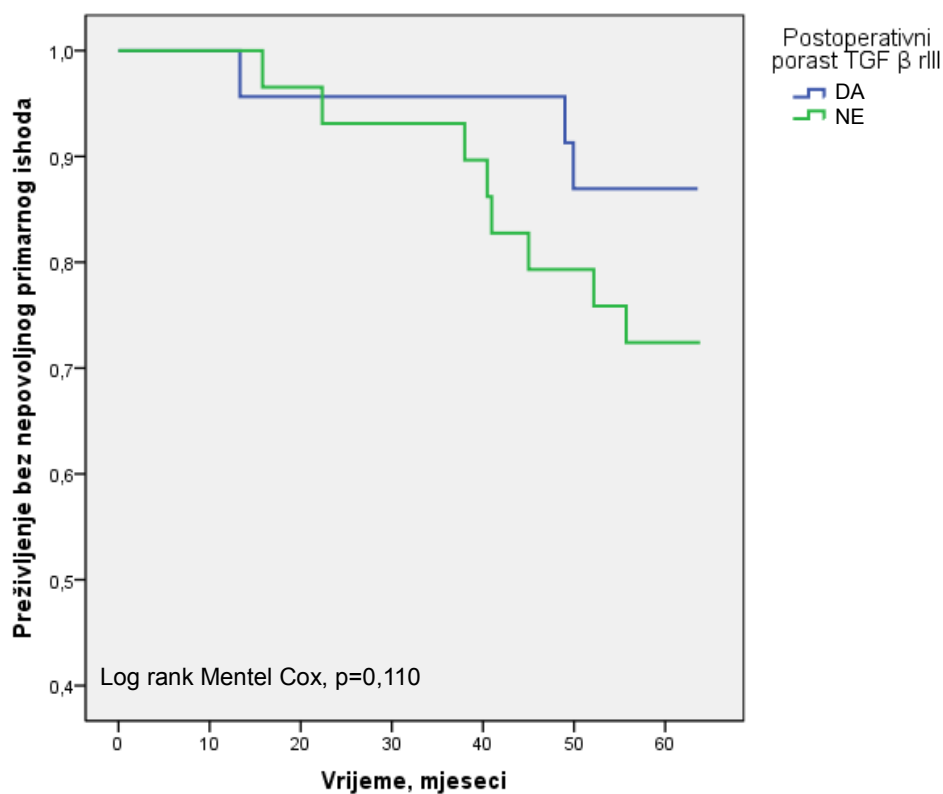
Bolesnice s plazmatskom koncentracijom TGF β rIII nižom od 7,83 ng/mL (skupina 1 i 2 prema kvartilama koncentracije TGF β rIII) imale su statistički značajno manji udio preživjelih bez nepovoljnog primarnog ishoda u usporedbi s bolesnicama iz skupine 3 i 4 (Slika 23.). Nije nađeno značajnih razlika u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda bolesnica ovisno o postoperativnom porastu koncentracije TGF β rIII nakon operativnog zahvata u bolesnica s dostupnim podacima, niti je nađeno razlika u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda ovisno o umnošku intenziteta ekspresije i udjela ekspresije TGF β rIII dobivenog patohistološkom analizom (Slike 24. i 25.).



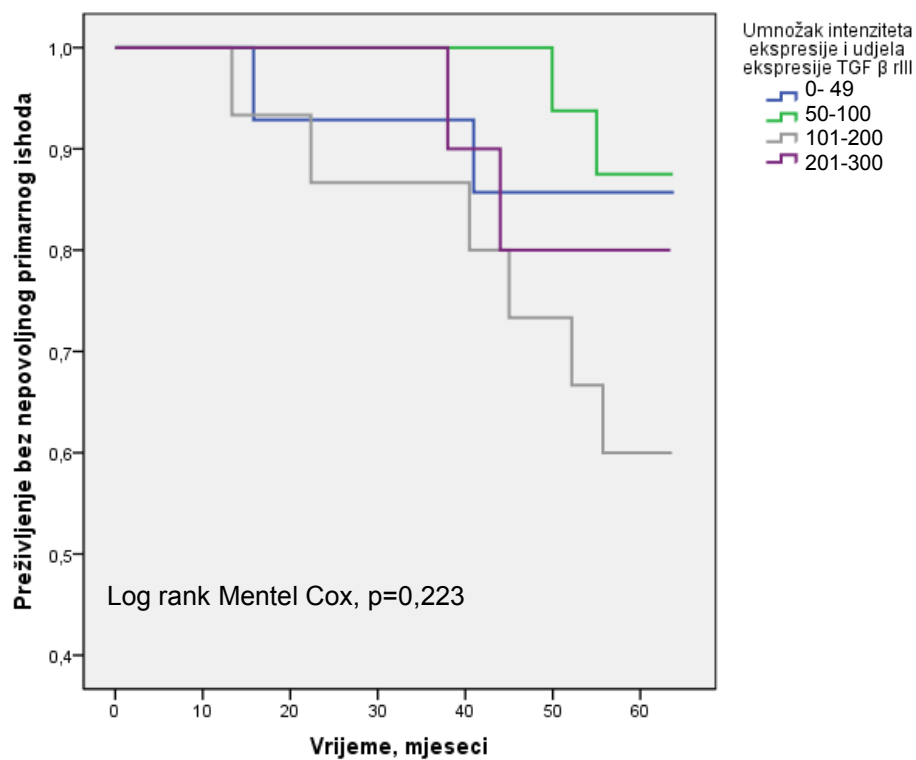
Slika 22. Preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda bolesnica s NST karcinomom dojke tijekom trajanja istraživanja i razlike u prosječnoj preoperativnoj koncentraciji TGF β rIII ovisno o zabilježenom nepovoljnom primarnom ishodu.



Slika 23. Značajne razlike u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda ispitanica s NST karcinomom s obzirom na vrijednosti preoperativne serumske koncentracije TGF β rIII.



Slika 24. Nesignifikante razlike u preživljenju bez progresije bolesti bolesnica s NST karcinomom ovisno o 50%-tnom porastu TGF β rIII u drugom postoperativnom mjerenju.



Slika 25. Nesignifikantne razlike u preživljenju bolesnica s NST karcinomom ovisno o umnošku intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII.

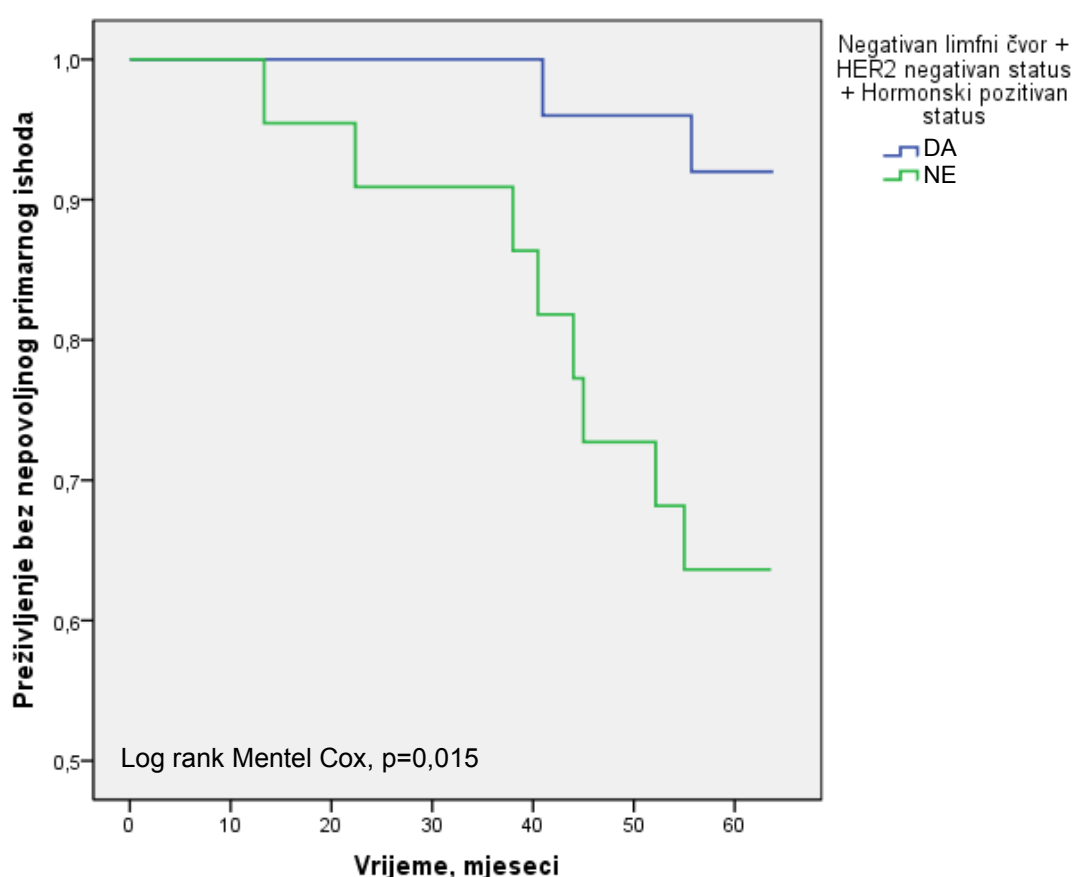
U tablici 7. prikazani su rezultati regresijske analize utjecaja kliničkih i patohistoloških karakteristika 47 bolesnica s NST karcinomom dojke na proporcionalni rizik pojave progresije bolesti tijekom perioda praćenja. Neovisno o drugim karakteristikama, odsutnost pozitivnih hormonskih receptora, angioinvazivnost i niska preoperativna koncentracija TGF β rIII bili su povezani sa značajno višim rizikom progresije bolesti tijekom praćenja.

Tablica 7. Povezanost kliničkih i patohistoloških karakteristika te preoperativne koncentracije TGF β rIII s progresijom bolesti u 47 bolesnica s NST karcinomom dojke.

Karakteristika	Nepovoljni ishod (N=12)	Bez nepovoljnog ishoda (N=35)	HR (95% CI)	P vrijednost
Dob, medijan (raspon)	63 (25-85)	60 (31-81)	0,98 (0,94-1,03)	0,401
Veličina tumora (T1a/T1b/T1c/T2)	0/2/5/5	4/8/15/8	0,96 (0,87-1,12)	0,390
Limfni čvor (pozitivan/negativan)	6/6	10/25	2,66 (0,62-10,46)	0,153
Hormonski receptori (pozitivan/negativan)	6/6	28/7	0,25 (0,69-1,04)	0,047
HER2 (pozitivan/negativan)	3/9	4/31	0,62 (0,17-2,23)	0,537
Histološki gradus (1/2/3)	0/7/5	8/17/10	0,69 (0,56-0,85)	0,117u
Trostruko negativan (DA/NE)	3/9	4/31	0,42 (0,14-1,20)	0,131
Angioinvazija (DA/NE)	6/6	3/32	0,27 (0,11-0,68)	0,008
TGF β rIII, medijan (raspon)	6,90 (2,82-10,26)	8,42 (3,37-16,64)	0,68 (0,49-0,89)	0,004

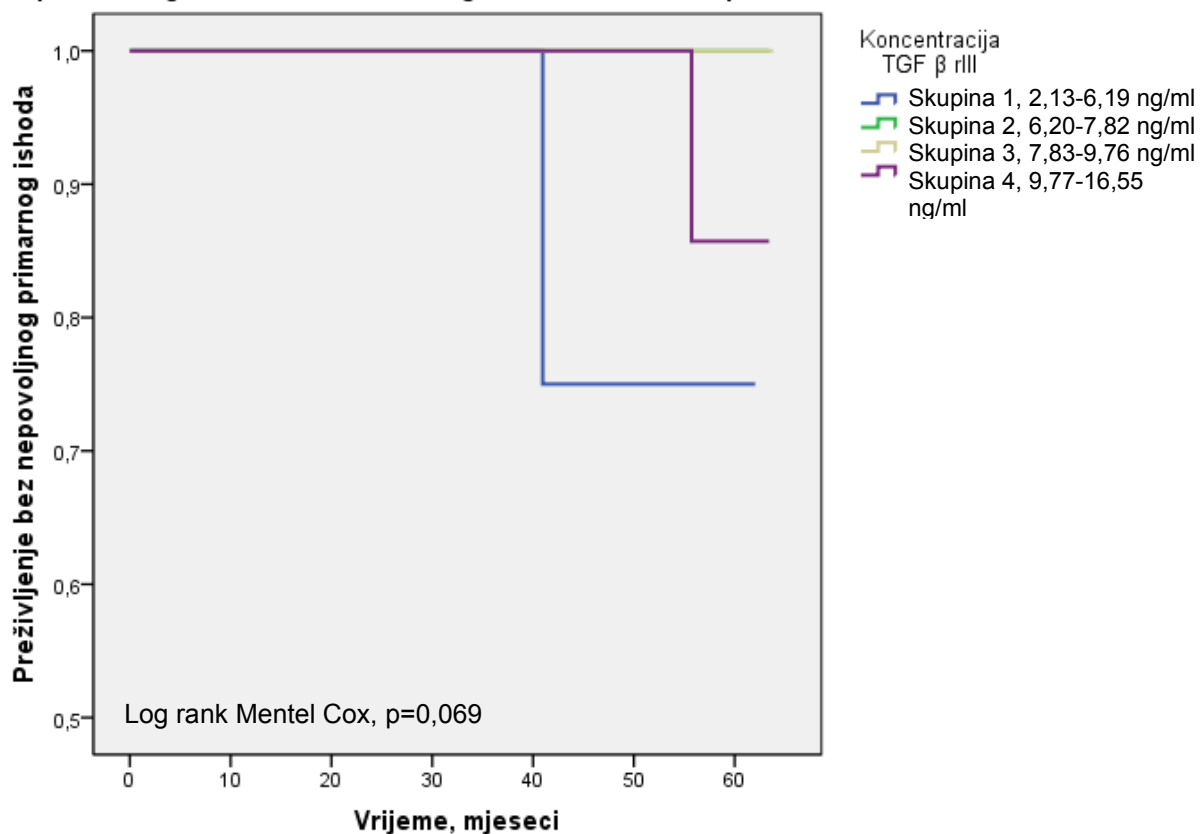
HR – omjer rizika, CI – interval pouzdanosti

Analiziran je utjecaj zajedničke prisutnosti skupa sljedećih prognostičkih parametara: negativan limfni čvor, negativan HER2 i pozitivni hormonski receptori na preživljenje bez progresije bolesti bolesnica s NST karcinomom dojke. Bolesnice s negativnim limfnim čvorom, negativnim HER2 i pozitivnim hormonskim receptorima imale su statistički značajno bolje preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u odnosu na ostale bolesnice (Slika 26.) i to neovisno o koncentraciji TGF β rIII (Slika 27.). U skupini bolesnica s pozitivnim limfnim čvorom, pozitivnim HER2 i negativnim hormonskim receptorima nađena je povezanost preoperativne koncentracije TGF β rIII na preživljenje bez progresije bolesti. Bolesnice s pozitivnim limfnim čvorom, pozitivnim HER2 i negativnim hormonskim receptorima čija je preoperativna koncentracija TGF β rIII bila veća od 7,83 ng/ml imale su značajno bolje preživljenje bez progresije u odnosu na bolesnice s nižom plazmatskom koncentracijom TGF β rIII (Slika 28.).



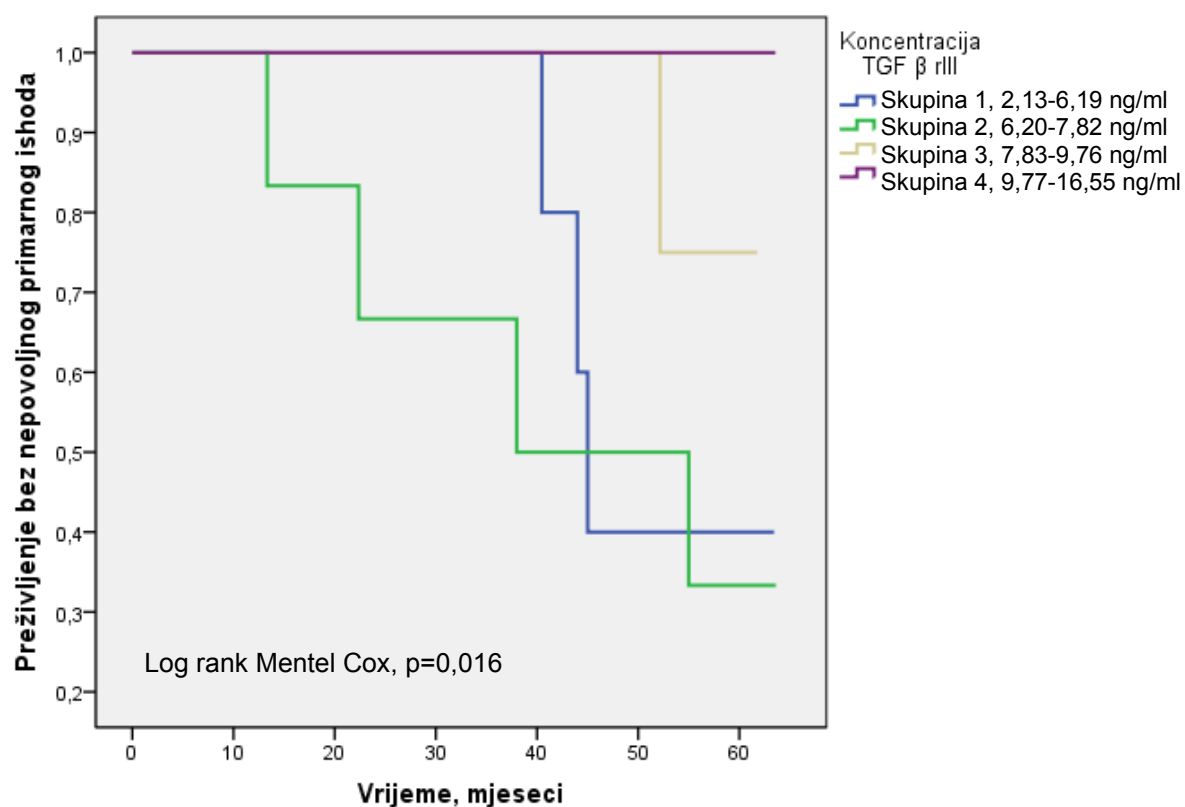
Slika 26. Značajno veće preživljenje bez nepovoljnog ishoda bolesnica s negativnim limfnim čvorom, negativnim HER2 i pozitivnim hormonskim receptorima.

Ispitanice s negativnim limfnim čvorom + negativnim HER2 statusom+ pozitivnim hormonskim statusom



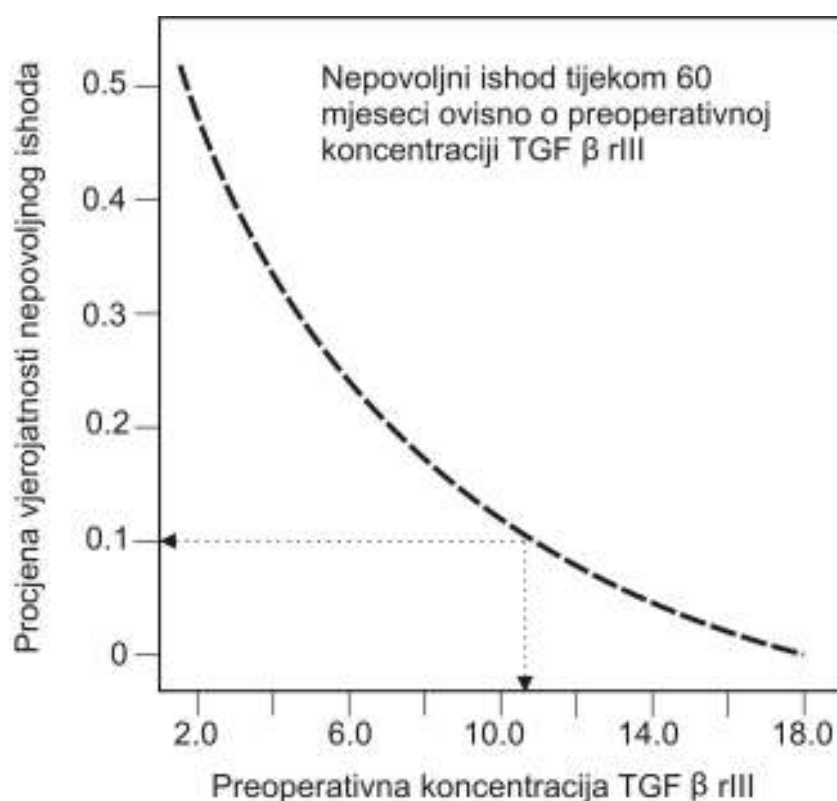
Slika 27. Neznačajne razlike u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda u skupini bolesnica s povoljnom kombinacijom kliničkih karakteristika ovisno o plazmatskoj koncentraciji TGF β rIII.

Ispitanice s pozitivnim limfnim čvorom + pozitivnim HER2 statusom i negativnim hormonskim statusom



Slika 28. Značajne razlike u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda u skupini bolesnica s nepovoljnim kliničkim karakteristikama ovisno o plazmatskoj koncentraciji TGF β rIII.

Plazmatska koncentracija TGF β rIII izmjerena prije operativnog zahvata kao jedini neovisni čimbenik upotrijebljena je za procjenu vjerojatnosti nepovoljnog ishoda u bolesnica s NST karcinomom dojke te je nađeno kako je vjerojatnost pojave progresije rasla s padom koncentracije preoperativnog TGF β rIII. Takvom analizom vjerojatnost progresije bolesti u ovom istraživanju procijenjena je na 10% pri plazmatskoj koncentraciji TGF β rIII od 10,8 ng/ml, a daljnjim padom koncentracije eksponencijalno je rasla i vjerojatnost progresije (Slika 29.).



Slika 29. Procjena nepovoljnog ishoda multivarijatnom analizom s preoperativnom koncentracijom TGF β rIII kao jedinim neovisnim čimbenikom.

6. RASPRAVA

Rana dijagnoza karcinoma dojke, pogotovo u neinvazivnom stadiju i prije razvoja metastaza, uvelike utječe na liječenje i prognozu. Mogućnosti rane detekcije karcinoma dojke i dalje su bazirane na tehnikama slikovnog prikaza (mamografija, ultrazvuk, magnetska rezonanca) u kombinaciji s kliničkim pregledom dojki i samopregledom, a koje se provode kroz masovni probir populacije. Upravo iz tih razloga postoji velika potreba za razvojem i potvrđivanjem serumskih biomarkera prvenstveno za ranu detekciju karcinoma dojke, ali i za predviđanje rizika progresije bolesti, odgovora na liječenje i prognozu kod bolesnica s karcinomom dojke. Trenutno dostupni biomarkeri nisu se pokazali dovoljno senzitivni i specifični da bi bili samostalno iskoristivi u ranoj detekciji karcinoma dojke. Unatoč raznovrsnim pristupima u otkrivanju mogućih markera iz seruma bolesnica, većina istraživanja su još u začetku.

Prema definicijama iz literature, biomarker je karakteristika koja je objektivno izmjerena i evaluirana kao pokazatelj normalnog biološkog ili patološkog procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju. (186)

Prvi biomarkeri karcinoma dojke otkriveni su 60-ih godina prošlog stoljeća otkrićem estrogenskih i progesteronskih receptora, imunohistokemijskom metodom. Dvadeset godina poslije, genskom amplifikacijom in situ hibridizacijom utvrđene su podskupine bolesnica s prekomjernom ekspresijom ljudskog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2). U novije vrijeme veliki iskorak u istraživanju karcinoma dojke napravljen je istraživanjem ekspresije gena. Danas se za otkrivanje ekspresije gena najčešće koriste dvije metode: DNA microarray (hrv. mikropostroj) i RNA sekvenciranje. DNA microarray se koristi u proučavanju ekspresije gena, otkrivanju polimorfizma na razini nukleotida (engl. SNP-Single Nucleotide Polymorphisms) i analizi genoma.

Dokazano je da je karcinom dojke bolest s molekularno različitim podgrupama karakteriziranim različitim prezentacijama bolesti, prognozom i osjetljivošću na liječenje. Zahvaljujući razvitku novih biotehnologija i napretku istraživanja karcinoma dojke, prepoznaju se novi biomarkeri koji pomažu u stvaranju personaliziranog pristupa liječenju karcinoma bolesti za svakog pacijenta. Biomarkeri kao dijagnostičko, prognostičko ili terapijsko sredstvo u liječenju karcinoma dojke postaju

predmet istraživanja s ciljem pronalaženja što efikasnijeg i pouzdanijeg biomarkera. (187)

Već duži niz godina postoji interes za hipotezu prema kojoj se tumor-specifični antigeni mogu naći u krvi bolesnika te da se isti mogu iskoristiti u ranoj dijagnostici karcinoma dojke. Proteini kao što su CA125 kod karcinoma jajnika ili PSA kod karcinoma prostate duže se vremena koriste u kliničkoj praksi kao dijagnostički markeri karcinoma. Budući da su glikoproteini najheterogenija skupina posttranslacijskih modifikacija poznatih kod proteina, brojni klinički biomarkeri i terapijski ciljevi su upravo glikoproteini, primjerice CA125, PSA i transmembranski glikoprotein HER2/neu, a sve je više dokaza o izmijenjenoj strukturi glikana glikoproteina karcinoma dojke. (188, 189)

Brojna istraživanja opisuju različite prekomjerno izražene promijenjene proteine u serumu bolesnica s karcinomom dojke. Serumski marker koji je u najširoj primjeni u dijagnostici karcinoma dojke je CA 15-3, koji detektira topljivu formu mucina MUC1, koji se normalno nalazi u apikalnoj membrani normalnog sekrecijskog epitela, a pri malignoj transformaciji dolazi do promjena u MUC1 glikozilaciji. Iako je MUC1 izražen u normalnim i neoplastičnim epitelnim stanicama dojke, kliničke vrijednosti pri mjerenju MUC1 odnose se na odcijepljene, odnosno topljive forme MUC1 koje se nazivaju CA 15-3, otpuštene sa stanične površine proteolitičkim cijepanjem. (190) Nažalost, CA 15-3 nije prikladan za rano otkrivanje karcinoma dojke budući da su serumske vrijednosti CA 15-3 rijetko povišene kod bolesnica s ranim ili lokaliziranim karcinomom dojke. CA 15-3 se pokazao najkorisnijim u praćenju terapijskog učinka kod bolesnica s metastatskim karcinomom dojke. Prema istraživanju Moline i suradnika, određivanje CA 15-3 i CEA kod primarnog lokoregionalnog karcinoma dojke indikativno je za veličinu tumora i zahvaćenost limfnih čvorova, te su ovi markeri korisni kao prognostički indikatori prema univarijantnoj i multivarijantnoj analizi. Visoke vrijednosti CEA prije liječenja mogu biti vrijedne u identificiranju podgrupe bolesnica sa subkliničkim metastazama. Također, povišene vrijednosti CEA ili CA 15-3 pokazale su se korisnima u identifikaciji T1 bolesnica bez metastaza u limfnim čvorovima koje imaju visoki rizik recidiva bolesti. (191)

Nadalje, studije su pokazale da su preoperativne serumske vrijednosti IL-6 i CRP značajno povišene u bolesnica s karcinomom dojke koje imaju metastaze u limfnim čvorovima. IL-6 je citokin koji, osim što inducira rast i diferencijaciju stanica

imunološkog sustava, sudjeluje u produkciji i ekspresiji drugih citokina u akutnoj fazi sinteze proteina. Na nekoliko načina djeluje na karcinomske stanice te je povezan s angiogenezom, sposobnošću da inducira VEGF mRNA. Dokazano je da IL-6 pozitivno korelira s TNM klasifikacijom karcinoma dojke i na taj način indirektno korelira s prognozom bolesnica s karcinomom dojke. (192) U studiji provedenoj na serumima 87 bolesnica s metastatskim karcinomom dojke, dokazano je da su visoke vrijednosti serumskog IL-6 povezane s lošim ishodom bolesti, dok vrijednosti serumske i plazmatske VEGF u ovoj studiji nisu bile značajno povezane s preživljenjem. (193)

U studiji iz 1999. godine, Bandyopadhyay A. i suradnici (179) dokazali su da ekspresija izvanstanične domene TGF β rIII u topljivoj formi (sTGF β rIII), u staničnoj liniji MDA-MB-231 ljudskog karcinoma dojke sekvstrira endogene TGF β izoforme (TGF β 1 i TGF β 2) i tako antagonizira njihovu aktivnost. Ekspresija sTGF β rIII također suprimira malignitet MDA-MB-231 stanice *in vivo* budući da su stanice koje su eksprimirale sTGF β rIII pokazale manju incidenciju i rast tumora i imale su manji metastatski potencijal u odnosu na kontrolne stanice inokulirane pod kožu atimičnih miševa, a što je sugeriralo potencijalnu iskoristivost sTGF β rIII u liječenju karcinoma. Njihovo istraživanje pokazalo je da prethodno opisana tumor-supresorska aktivnost TGF β rIII u radu Sun L. i Chen C. (194) nije ovisna o vezanju za membranu i o unutarstaničnoj domeni. Predloženi mehanizam sTGF β rIII posredovane supresije malignog fenotipa je antagoniziranje tumor-promotorske aktivnosti TGF β .

U novijoj studiji Bandyopadhyay A. i suradnici (195) pokazali su da sTGF β rIII ekspresija može inhibirati rast tumora u staničnoj liniji ljudskog karcinoma dojke MDA-MB-435 i staničnoj liniji ljudskog karcinoma kolona HCT116, kao i metastaza kod stanične linije MDA-MB-435 potvrđujuću tumor-supresorsku aktivnost sTGF β rIII u različitim modelima karcinoma. U njihovoj studiji je po prvi puta *in vitro* i *in vivo* dokazano da sTGF β rIII inducirana tumorska supresija barem djelomično nastaje inhibicijom angiogeneze, vjerojatno direktno preko smanjivanja sposobnosti endotelnih stanica da stvaraju kapilare.

Rezultati studije Dong M. i suradnika (154) upućuju na činjenicu da je gubitak TGF β rIII kroz gubitak alela česti genetski događaj tijekom razvoja ljudskog karcinoma koji povećava metastatski potencijal. Pokazali su da je gubitak ekspresije TGF β rIII rani događaj, koji se događa na početku, u preinvazivnom stadiju; DCIS,

sa stupnjem gubitka ekspresije u korelaciji s progresijom karcinoma dojke i smanjenjem preživljenja. Analizirajući 50 uzoraka karcinoma dojke u odnosu prema normalnim kontrolama, razina TGF β rIII mRNA bio je smanjen 60% kod invazivnog karcinoma NST s negativnom limfnim čvorovima, 64,7% kod invazivnog karcinoma NST s pozitivnim limfnim čvorovima i 100% kod invazivnog karcinoma NST s udaljenim metastazama. Također je bio značajno smanjen u 83,8% lobularnih karcinoma. IHC analizom 252 uzorka različitih stadija karcinoma dojke i 40 normalnih uzoraka tkiva dojke, ekspresija TGF β rIII je pala od 68,4% u uzorcima normalnog tkiva dojke na 23,5% u uzorcima DCIS te na 5,1% u uzorcima karcinoma dojke s negativnom limfnim čvorovima. U studiji su dokazali da je TGF β rIII supresor progresije karcinoma dojke te da su prilikom ponovnog uspostavljanja TGF β rIII ekspresije u stanicama ljudskog karcinoma dojke, tumorska invazija, angiogeneza i metastaze inhibirane *in vivo*. Njihovo istraživanje sugerira da bi TGF β rIII mogao poslužiti kao prediktivni faktor u preživljenju bolesnica s karcinomom dojke. U istraživanju su koristili 4T1 karcinomske stanice mišjih mliječnih žlijezda i stanične linije MDA-MB231.

Andres i suradnici (176) u studiji u kojoj se prvi puta opisuje betaglikan 1989. godine, pokazali su da postoji uzajamna veza između ekspresije TGF β rIII na staničnoj površini i ekspresije sTGF β rIII, sugerirajući da se sTGF β rIII sintetizira konstitutivno. Da bi dokazali ulogu sTGF β rIII u posredovanju efekata TGF β rIII u invazivnosti karcinoma, Dong M. i suradnici (154) ispitali su ekspresiju sTGF β rIII kod različitih ljudskih staničnih linija karcinoma i epitela dojke. Ekspresija sTGF β rIII dokazana je u svim analiziranim ljudskim staničnim linijama uključujući staničnu liniju epitela dojke MCF-10A i staničnu liniju ljudskog karcinoma dojke MCF-7, T47D i MDA-MB231. Potvrdili su tvrdnju Andres i suradnika, da razina sTGF β rIII korelira s ekspresijom TGF β rIII na staničnoj površini.

U novijoj studiji provedenoj od strane Jovanović i suradnika (196), koristeći se staničnim linijama SUM159, MDA-MB-231 i MDA-MB-157 za *in vivo* i *in vitro* studije, testirana je uloga TGF β rIII na specifičnom podtipu (MSL) trostruko negativnog karcinoma dojke. Rezultati su pokazali da je TGF β rIII neophodan u migraciji i invaziji *in vitro* te za rast tumora *in vivo* te je naglašen potencijalni mehanizam njegovog djelovanja preko integrina $\alpha 2$.

Točan mehanizam kojim TGF β rIII suprimira progresiju karcinoma dojke *in vivo* reducirajući migraciju karcinomskih stanica i invaziju još nije poznat. Rezultati studija

sugeriraju moguće postojanje nekoliko mehanizama, koji mogu djelovati istodobno ili izolirano pri posredovanju T β RIII u supresiji karcinomske progresije. Moguće je da različiti mehanizmi djeluju u različitom kontekstu, kao što je moguće da njihova interakcija bude i razlog gubitku TGF β rIII ekspresije tijekom progresije karcinoma dojke. Ovi mehanizmi djelovanja trenutno su u fazi istraživanja. (172, 197, 198)

Elementi TGF β signalne kaskade igraju značajnu ulogu u patogenezi karcinoma dojke. Prema dosada provedenim studijama, uloga elemenata TGF β signalne kaskade kao mogućih biomarkera karcinoma dojke još nije definirana. Budući da je TGF β rIII dokazan u ljudskoj plazmi, postavlja se pitanje vrijednosti TGF β rIII kao potencijalnog biomarkera u dijagnostici i praćenju karcinoma dojke.

U hipotezi ovog istraživanja pretpostavili smo da će veće koncentracije topljivog TGF beta III receptora u ljudskoj plazmi bolesnica sa zloćudnim tumorom dojke ukazivati na bolju prognozu bolesti te da se radi o mogućem prognostički pozitivnom biomarkeru.

U ovom istraživanju bilo je uključeno ukupno 98 žena, od čega 62 bolesnice s karcinomom dojke te 36 zdrave ispitanice u kontrolnoj skupini. Prosječna dob bolesnica s karcinomom dojke bila je $57,3 \pm 12,7$ godina, dok su žene u kontrolnoj skupini imale prosječnu dob od $38,9 \pm 15,3$ godine, i bile su statistički značajno mlađe u odnosu na ispitanu skupinu. Mlađa dob u kontrolnoj skupini posljedica je formiranja skupine zdravih ispitanica bez komorbiditeta, koji bi eventualno utjecali na vrijednosti TGF beta III receptora.

S obzirom na značajnu razliku u dobi između bolesnica s karcinomom dojke i kontrolne skupine, učinjena je korelacija preoperativnih vrijednosti koncentracije TGF β rIII ovisno o dobi u skupini bolesnica s karcinomom dojke. Dobiveni rezultati pokazuju kako značajna razlika izmjerenih koncentracija TGF β rIII između bolesnica s karcinomom dojke i kontrolne skupine nije rezultat značajne razlike u dobi između te dvije skupine, jer je vidljivo kako dob ne utječe jednako na vrijednosti TGF β rIII u bolesnica i zdravih osoba.

U ovu studiju su uključene bolesnice s invazivnim karcinomom koji nije posebnog tipa (NST), invazivnim lobularnim karcinomom dojke i DCIS.

Razlog uključivanju preinvazivne forme karcinoma dojke u ovo istraživanje potaknuto je rezultatom istraživanja provedenog od strane Dong M. i suradnika 2007. godine. (154) U svom istraživanju Dong M. i suradnici su dokazali da je gubitak ekspresije TGF β rIII rani događaj koji je prisutan i u preinvazivnom stadiju tumora dojke, a

stupanj gubitka ekspresije je u korelaciji s progresijom karcinoma dojke. U njihovoj su studiji na 252 uzorka karcinoma dojke (20 DCIS, 64 invazivna karcinoma s negativnim limfnim čvorovima, 64 invazivna karcinoma s pozitivnim limfnim čvorovima, 64 karcinoma s udaljenim metastazama) i 40 uzoraka normalnog tkiva dojke, imunohistokemijskim metodama autori dokazali smanjenje ekspresije TGF β rIII sa 68,4% u normalnom tkivu dojke na 23,5% u DCIS te 5,1% u tkivu invazivnog karcinoma dojke s negativnim limfnim čvorovima.

Izmjerene vrijednosti preoperativne koncentracije TGF beta III receptora u plazmi bolesnica s DCIS u našem istraživanju (značajno niže u odnosu na kontrolnu skupinu, a slične vrijednostima invazivnih karcinoma) podupiru tezu i rezultate gore navedene studije Donga M. i suradnika da je gubitak ekspresije TGF β rIII rani događaj u tumorigenezi raka dojke. Ovakvi rezultati mogu podupirati buduća istraživanja TGF β rIII kao potencijalnog biomarkera za dijagnozu raka dojke (i u in situ formi) te kao eventualnog markera za probir (screening) u općoj populaciji.

Bolesnice uključene u naše istraživanje imale su T1 ili T2 tumor dojke, bez obzira na N status prema TNM klasifikaciji. U literaturi postoji nekoliko radova u kojima je proučavana TGF β signalna kaskada u ranim stadijima karcinoma dojke.

CD105 (endoglin), visoko afinitetni receptor za TGF β 1 i TGF β 3, snažno izražen u vaskularnim endotelnim stanicama i velikom broju tumora, s bitnom ulogom u moduliranju endotelno-mezenhimalne signalizacije te angiogeneze, istražen je kao mogući biomarker u studiji Li C i suradnika. (199) Kod 92 bolesnice s ranim (T1 i T2) stadijem karcinoma dojke te 77 zdravih ispitanica dokazali su prisutnost CD105, kompleksa CD105/TGF β 1 i TGF β 1 u plazmi, te da je razina CD105 značajno viša kod bolesnica s karcinomom dojke, posebice u onih koje su razvile udaljene metastaze ili su umrle od posljedica bolesti, dok kompleks CD105/TGF β 1, koji je također bio značajno viši u istih bolesnica, nije korelirao s metastazama. Razina TGF β 1 u plazmi je bila značajno niža, ali isto tako bez korelacije s progresijom bolesti. Njihovi rezultati upućuju na mogućnost korištenja CD105 kao biomarkera za identifikaciju bolesnica s karcinomom dojke s visokim rizikom za razvoj metastaza.

Li C. i suradnici (200) u svojoj su studiji na 80 bolesnica s ranim stadijem karcinoma dojke (T1,T2) liječenim lumpektomijom i radioterapijom, dokazali da su TGF β 3 i kompleks receptor CD105-TGF β 3 prisutni u plazmi većine bolesnica s karcinomom dojke te da je koncentracija obaju znatno povišena u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima. Rezultati njihove studije upućuju na upletenost TGF β 3 i

kompleksa CD105-TGF β 3 u tumorigenezu te da kao takvi mogu imati prognostičku vrijednost u ranom otkrivanju metastaza karcinoma dojke. U toj studiji autori su se koristili ELISA metodom. TGF β 3 je bio detektiran u 71,3% bolesnica s medijanom 0,07 ng/ml, dok TGF β 1 nije bio povezan s metastazama u limfnim čvorovima te stadijem, veličinom i gradusom tumora.

U ispitivanju plazme zdravih ispitanika, Dong M. i suradnici (154) (n=5), potvrdili su ekspresiju sTGF β rIII u pet zdravih ispitanika (65-250 kDa), dok u plazmi bolesnica s karcinomom dojke (n=13) ekspresiju sTGF β rIII nisu uspjeli dokazati.

U našem istraživanju, detekciju TGF β rIII molekule u plazmi ispitanica izvodili smo pomoću komercijalnih monoklonskih protutijela te zečjeg poliklonskog protutijela na TGF β rIII koji je proizveden u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, a čiju smo specifičnost potvrdili Western blotting tehnikom. Koristeći specifična protutijela, razvili smo ELISA metodu kojom smo uspjeli potvrditi ekspresiju TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke i zdravih kontrola te izračunati njegovu koncentraciju.

Prosječna koncentracija TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke iznosila je 7,63 ng/ml (raspon 14,41 ng/ml), što je bilo statistički značajno niže od vrijednosti kontrolne skupine, čija je koncentracija TGF β rIII u plazmi prosječno iznosila 42,50 ng/ml (raspon 49,29 ng/ml); (Mann-Whitney test, $p < 0,001$).

Sheen-Chen i suradnici (201) proveli su prospektivnu studiju na 60 bolesnica s invazivnim karcinomom dojke i kontrolnoj grupi od 14 bolesnica s benignim tumorima dojke s ciljem mjerenja TGF β 1 u preoperativnom serumu kvantitativnim sandwich ELISA testom. Stratifikacijom kliničko-patoloških varijabli, bolesnice s jače zahvaćenim limfnim čvorovima ($p=0,04$), višim TNM stadijem bolesti ($p=0,005$) i višim histološkim gradusom imale su značajno više vrijednosti TGF β 1. U multivarijantnoj analizi, TNM stadij ($p=0,02$) neovisni je faktor povezan sa značajno višim vrijednostima serumskog TGF β 1. Iako u literaturi postoje oprečni izvještaji o ulozi izražajnosti TGF β 1 u bolesnica s karcinomom dojke, ovi rezultati su vrlo slični rezultatima Gorsch i suradnika (156) te Walker i Dearinga (202) koji su pokazali povezanost TGF β 1 s tumorskom transformacijom i progresijom bolesti.

Prema objavljenoj studiji Ivanovića i suradnika (203) dokazano je da postoje statistički značajno veće vrijednosti TGF β 1 u plazmi bolesnica s uznapredovalim karcinomom dojke (n=44; stadiji IIIB/IV) u odnosu na zdrave ispitanike (n=36).

Međutim, kod bolesnica s lokalno uznapredovalim karcinomom postojalo je preklapanje vrijednosti TGF β 1 u plazmi bolesnica s vrijednostima zdravih ispitanika, za razliku od bolesnica s metastatskim karcinomom u postmenopauzi koje su imale značajno više vrijednosti od zdravih ispitanica.

Ovo istraživanje je nadopunjeno studijom Nikolić-Vukosavljevića i suradnika (204) koji su ELISA testom mjerili vrijednosti TGF β 1 u plazmi 29 bolesnica s metastatskim karcinomom u postmenopauzi. Pratili su ukupno preživljenje tijekom 24 mjeseca, a rezultati su pokazali da su bolesnice s ER-/PR- imale značajno veće vrijednosti plazmatskog TGF β 1 u odnosu na plazmu bolesnica s ER+/PR+ karcinomima dojke ($p=0,047$). Njihovi preliminarni rezultati sugeriraju da vrijednosti TGF β 1 kod ER-/PR- metastatskih karcinoma dojke bolesnica u postmenopauzi predviđaju podgrupu s niskim rizikom progresije pri vrijednostima TGF β 1 $\leq$ 3,28ng/ml te podgrupu s visokim rizikom progresije pri vrijednostima TGF β 1 $\geq$ 3,28ng/ml, a koja bi označavala i agresivniji fenotip. Prema ovom radu, TGF β 1 je prikazan kao potencijalni neovisni prognostički faktor metastatskog karcinoma dojke.

U našem istraživanju nije nađeno značajnih razlika u preoperativnoj koncentraciji TGF β rIII ovisno o veličini tumora, zahvaćenosti limfnih čvorova, statusu HER2 receptora, statusu hormonskih receptora, histološkom gradusu i angioin vazivnosti tumora.

Pang i suradnici (205) su u novijoj studiji imunohistokemijskim metodama na tkivnoj razini dokazali da je snižena razina TGF β rIII u invazivnim karcinomima dojke značajno povezana s trostruko negativnim karcinomima dojke.

U našem istraživanju bolesnice s trostruko negativnim NST karcinomom dojke nisu imale različit umnožak intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII u odnosu na ostale bolesnice.

Razlog su vjerojatno različite uspoređivane skupine bolesnica s karcinomom dojke (trostruko negativni naspram luminalnih tumora dojke u studiji Pang i suradnika, dok smo u našem istraživanju uspoređivali trostruko negativne i ostale NST karcinome dojke) te različita i još uvijek eksperimentalna protutijela korištena u ove dvije eksplorativne studije.

U literaturi postoji nekoliko radova u kojima se pokušalo utvrditi vrijednost i dinamiku različitih biomarkera u krvi bolesnica s karcinomom dojke prije i nakon izvedenog operativnog zahvata.

Vrijednosti TGFβ1 u plazmi bolesnica s karcinomom dojke nakon operacije prvi je opisao Kong sa suradnicima. (157) U njihovoj studiji, ELISA testom mjerena je vrijednost TGFβ1 u plazmi 26 bolesnica s karcinomom dojke unutar sedam dana prije kirurškog zahvata i 45 dana nakon odstranjenja tumora. Preoperativno je 81% bolesnica imalo povišene vrijednosti TGFβ1 u plazmi (iznad 7,5 ng/ml), što je bilo značajno više u odnosu na negativne kontrole; 20 zdravih ispitanica (4,3 ng/ml). Postoperativno, nakon odstranjenja tumora, srednja vrijednost TGFβ1 u plazmi bolesnica bila je značajno manja ($20,0 \pm 2,5$ naprema $11,0 \pm 1,9$ ng/ml) ($p < 0,001$). U grupi bolesnica s negativnim resekcijskim rubom, nezahvaćenim limfnim čvorovima i bez metastaza, srednja vrijednost TGFβ1 u plazmi je značajno pala te se vratila u normalne vrijednosti nakon kirurškog zahvata ($19,3 \pm 3,2$ naprema $5,5 \pm 1,0$ ng/ml, $p < 0,001$). U grupi bolesnica s negativnim kirurškim rubom, ali pozitivnim limfnim čvorovima, postoperativne vrijednosti TGFβ1 u plazmi su također bile značajno manje, ali se nisu vratile na normalu. Kod bolesnica s pozitivnim kirurškim rubom, odnosno rezidualnim tumorom, vrijednosti TGFβ1 u plazmi se nisu značajno mijenjale postoperativno ($21,8 \pm 6,1$ naprema $19,6 \pm 6,3$ ng/ml, $p > 0,1$). U ovoj studiji nije bilo značajne razlike između srednje postoperativne vrijednosti TGFβ1 prve grupe u odnosu na kontrolnu grupu ($p > 0,1$). Rezultati iz ove studije sugeriraju da perzistentne povišene vrijednosti TGFβ1 u plazmi bolesnica nakon kirurškog zahvata mogu ukazivati na prisutnost metastaza u limfnim čvorovima ili rezidualnu okultnu bolest. Na četirima preparatima karcinoma dojke IHC i *in situ* hibridizacijom dokazana je ekspresija TGFβ1 mRNA i proteina u tumorskoj stromi.

Nasuprot gore navedenoj studiji postoje i istraživanja koja nisu pokazala promjene u vrijednostima TGFβ1 u plazmi bolesnica s karcinomom dojke prije i nakon liječenja. Ovakve rezultate pokušali su objasniti Grainger i suradnici upotrebom testova različitih specifičnosti i senzitivnosti, razlikama u protokolima pripremanja plazme i/ili različitim populacijama bolesnica. (206)

U istraživanju serumske i tkivne ekspresije aktivina A (glikoproteina iz TGFβ nadfamilije) Reis i suradnici (207) su dokazali da su mRNA aktivina βA i dimerički aktivin A izraženi u normalnom i neoplastičnom tkivu dojke, da je serumska razina aktivina A povišena kod bolesnica s karcinomom dojke u postmenopauzi te da razina aktivina A značajno pada nakon kirurškog odstranjenja tumora dojke u prvom i drugom danu nakon operacije, dok nakon odstranjenja tkiva dojke prilikom estetskih operacija ostaje nepromijenjena. Njihovi rezultati upućuju na mogućnost korištenja

aktivina A u bolesnica s karcinomom dojke u postmenopauzi kao mogućeg serumskog markera za dijagnozu bolesti.

Porast koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke u našem istraživanju bio je statistički značajan između preoperativnog uzorkovanja i drugog postoperativnog uzorkovanja. Medijan vremena od preoperativnog uzorkovanja do drugog postoperativnog uzorkovanja iznosio je 32 dana (minimalno 9, maksimalno 104 dana).

Porast koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke nakon operativnog zahvata pokazao je pozitivan trend promjene u koncentraciji što je u skladu s hipotezom ovog istraživanja.

U ovom istraživanju analizirali smo dinamiku u postoperativnom porastu koncentracije TGF β rIII u plazmi, ovisno o radikalnosti operativnog zahvata. Analizirane su razlike u porastu koncentracije TGF β rIII u drugom postoperativnom uzorkovanju ovisno o radikalnosti operativnog zahvata, gdje su bolesnice podijeljene u dvije skupine: bolesnice podvrgnute radikalnom operativnom zahvatu (SNSM i MRM) i bolesnice podvrgnute neradikalnom operativnom zahvatu (kvadrantektomija). Nije bilo značajnih razlika u koncentraciji TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke izmjerenoj preoperativno i izmjerenoj u drugom postoperativnom mjerenju između bolesnica podvrgnutih radikalnom zahvatu i onih podvrgnutih neradikalnom zahvatu. U objema skupinama došlo je do značajnog postoperativnog porasta koncentracije TGF β rIII i to s većom razinom značajnosti među skupinom podvrgnutom neradikalnom zahvatu.

Dobiveni rezultat ukazuje na činjenicu da porast koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke nije uvjetovan radikalnijim operativnim zahvatom odnosno većom količinom odstranjenog tkiva tijekom operativnog zahvata.

Dave H. i suradnici (208) proveli su istraživanje na 118 bolesnica s karcinomom dojke u kojem je po prvi puta analizirana vrijednost TGF β 2 kao prognostičkog i prediktivnog markera za karcinom dojke. Koncentraciju TGF β 2 u serumu su određivali ELISA metodom, a TGF β 2 mRNA reverznom transkripcijom i RT-PCR metodom u tumoru i normalnom okolnom tkivu dojke. Učinjena je korelacija sa svim kliničko-patološkim karakteristikama tumora dojke te je potvrđena razlika u ekspresiji TGF β 2 između ranog i uznapredovalog stadija karcinoma dojke. Viša koncentracija

TGF β 2 u cirkulaciji bila je povezana s povoljnim prediktivnim markerima, dok je viša tkivna koncentracija potvrđena kao marker s nepovoljnom prognozom.

U istraživanju Buck i suradnika (209) retrospektivno je analizirana ekspresija TGF β rI i TGF β rII u 246 karcinoma dojke IHC metodom. Rezultati su pokazali da je TGF β rII neovisan, vrlo značajan prognostički indikator preživljenja u ER– negativnih bolesnica. Kod ER negativnih tumora, povećana ekspresija TGF β rII je bila povezana s vrlo agresivnom podskupinom tumora sa značajno reduciranim preživljenjem. Simultani gubitak ekspresije ER i TGF β rII je povezan s dužim vremenom preživljenja, sličnim kao kod ER pozitivnih bolesnica s TGF β rII ekspresijom ili bez nje.

U našem istraživanju, imunohistokemijska ekspresija TGF β rIII analizirana je u tumorskom tkivu dojke te u slučaju nalaza zdravog tkiva u istom uzorku, i u zdravom tkivu dojki uz tumor. Ekspresija je bila izražena kao: bez ekspresije (0), slaba (1), umjerena (2) ili jaka (3). U ovom istraživanju 84% tumora dojke pokazalo je tkivnu (IHC) ekspresiju TGF β rIII i to češće umjerenog ili jakog intenziteta (65%) za razliku od okolnog normalnog tkiva dojke koji u 30% slučajeva nije pokazalo tkivnu ekspresiju TGF β rIII, a 50% je imalo reakciju slabog intenziteta.

Vrijednosti intenziteta ekspresije TGF β rIII testirane imunohistokemijskom metodom u tkivu karcinoma dojke na skali od 1 do 3 pomnožene su s postotkom stanica koje ekspimiraju TGF β rIII te je dobiven umnožak intenziteta ekspresije i udjela ekspresije čiji je medijan u ispitivanoj skupini karcinoma dojke iznosio 100 (raspon od 0 do 300).

Nije bilo statistički značajne razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između ispitanica s različitim histološkim tipom tumora. Razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII u skupini ispitanica s različitom veličinom tumora bile su statistički značajne. Post-hoc testovima nađeno je kako je ta značajna razlika rezultat statistički značajno višeg umnoška u bolesnica sa veličinom tumora T2 u odnosu na skupinu bolesnica s tumorom dojke veličine T1a.

U istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII ovisno o različitom HER2 statusu, statusu limfnih čvorova, hormonskom statusu te ukupnom receptorskom statusu.

Razlike u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između ispitanica s različitim histološkim gradusom bile su statistički značajne. Post-hoc testovima nađen

je statistički značajno niži umnožak u ispitanica s histološkim gradusom 1 u odnosu na bolesnice s histološkim gradusom 2 ili 3.

Nađena je značajna razlika u umnošcima intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII između ispitanica s potvrđenim angioinvazivnim karakteristikama tumora, u odnosu na one koje to nisu imale.

Nije nađeno statistički značajne korelacije između preoperativne serumske koncentracije TGF β rIII i umnoška intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII, iako je zamijećena diskretna pozitivna korelacija između promatranih vrijednosti.

Moguće je da statistički značajna korelacija između koncentracije TGF β rIII u tkivu i plazmi u ovom istraživanju nije potvrđena jer su protutjela za IHC još eksperimentalna, a vjerojatno bi trebao i veći uzorak da se takva povezanost definitivno potvrdi ili opovrgne.

Istraživanja TGF signalnog puta kod ranog karcinoma dojke na 61 uzorku karcinoma dojke IHC metodom prema Koumoundourou i suradnicima (210) pokazala su da je gubitak ekspresije pSmad2/3 povezan s kraćim preživljenjem bez nepovoljnog primarnog ishoda, uključujući bolesnice s ER pozitivnim tumorom, dok bolesnice koje ne pokazuju ekspresiju TGF β 1 imaju 4,6 puta veću šansu da razviju udaljene metastaze. Prema ovom istraživanju, kao i u drugim objavljenim *in vivo* studijama (211), može se zaključiti da je *in vivo* te u ranim stadijima tumorigeneze karcinoma dojke TGF ovisna inhibicija rasta dominantna nad stimulacijom stanične mobilnosti i invazije. U istom istraživanju pokazano je da pSmad2/3 i TGF β 1 mogu biti obećavajući prognostički markeri za T1-2, N0 karcinome dojke. (212)

Prosječno postoperativno praćenje bolesnica u našoj studiji iznosilo je 61,2 mjeseca (raspon od 13,3 do 63,8 mjeseci). Tijekom perioda praćenja, kod 8 (12,9%) bolesnica došlo je do smrtnog ishoda, od čega je u 5 (8%) bolesnica smrtni ishod bio povezan s osnovnom bolešću. Ukupno preživljenje bolesnica bez nepovoljnog primarnog ishoda (metastaza, lokalni recidiv ili pojava novog primarnog tumora) bilo je 79% (49 od 62 bolesnice). Rezultat je očekivan, obzirom da je ovo istraživanje provedeno na bolesnicama s malim tumorima, a koje se klasificiraju u stadij 0-II.

Nije nađeno statistički značajne razlike u dobi bolesnica s NST karcinomom dojke ovisno o pojavnosti nepovoljnog primarnog ishoda. Također, nije nađeno značajne razlike u 5-godišnjem preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda ovisno o radikalnosti operativnog zahvata (86,2% bez nepovoljnog primarnog ishoda

s neradikalnim zahvatom nasuprot 71,9% bolesnica liječenih radikalnim operativnim zahvatom).

U našem istraživanju bolesnice koje su preživjele bez zabilježenog nepovoljnog primarnog ishoda imale su preoperativno veću vrijednost plazmatske koncentracije TGF β rIII u usporedbi s bolesnicama s nepovoljnim primarnim ishodom, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost.

Bolesnice s invazivnim karcinomom dojke i preoperativno izmjerenom plazmatskom koncentracijom TGF β rIII nižom od 7,83 ng/ml (skupina 1 i 2 prema kvartilama koncentracije TGF β rIII) imale su statistički značajno manji udio preživjelih bez nepovoljnog primarnog ishoda u usporedbi s bolesnicama iz skupine 3 i 4 (koncentracija TGF β rIII u plazmi viša ili jednaka 7,83 ng/ml).

Bolesnice s niskom preoperativnom koncentracijom TGF β rIII u plazmi, negativnim hormonskim receptorima ili s angioinvazivnim tumorom imale su značajno viši rizik od nepovoljnog primarnog ishoda, što je očekivano te u skladu s hipotezom ovog istraživanja i literaturom.

Ovisno o ukupnom receptorskom statusu NST karcinoma dojke, bolesnice s trostruko negativnim tumorom i u našem istraživanju su imale viši rizik od nepovoljnog primarnog ishoda, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost. Razlog zašto razlika nije dosegla statističku značajnost moguće je što se u našem istraživanju radilo o relativno malom uzorku takvih bolesnica te činjenici da su u studiju uključeni samo pT1 i pT2 tumori koji imaju nisku smrtnost pa je potrebno duže praćenje kako bi se isto i statistički potvrdilo.

Bolesnice s NST tumorima dojke koje su imale limfni čvor pozitivan, hormonske receptore negativne i HER2 pozitivan (LN+, ER/PR-, Her2+) su bolesnice s visokim rizikom za nepovoljni primarni ishod za razliku od bolesnica s negativnim limfnim čvorom, pozitivnim hormonskim receptorima i negativnim HER2 (LN-, ER/PR+, Her2-). (213)

Još uvijek ne postoji adekvatni prognostički biomarker za procjenu rizika za nepovoljni primarni ishod unutar navedenih skupina bolesnica s karcinomom dojke.

U našem istraživanju analizirali smo razlike u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda bolesnica s povoljnim prognostičkim parametrima (negativan

limfni čvor, negativan HER2 i pozitivni hormonski receptori) u odnosu na sve ostale bolesnice.

I u ovom straživanju bolesnice s povoljnim prognostičkim parametrima (LN-, ER/PR+, Her2-) imale su značajno bolje preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u odnosu na ostale bolesnice. Analizom preoperativnih vrijednosti TGF β rIII u plazmi bolesnica s povoljnim prognostičkim parametrima utvrdili smo da preoperativna koncentracija TGF β rIII kod bolesnica s povoljnom kombinacijom kliničkih karakteristika nije povezana sa značajnim razlikama u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda.

S druge strane, u skupini bolesnica s nepovoljnim prognostičkim parametrima (LN+, ER/PR-, Her2+) nađena je statistički značajna razlika u preživljenju bez nepovoljnog primarnog ishoda ovisno o vrijednostima TGF β rIII u plazmi.

Bolesnice s koncentracijom TGF β rIII većom od 7,83 ng/ml imale su značajno bolje preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u odnosu na bolesnice s koncentracijom TGF β rIII u plazmi manjom od 7,83 ng/ml.

Preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u skupini bolesnica s nepovoljnim prognostičkim parametrima (LN+, ER/PR-, Her2+) koje su imale koncentraciju TGF β rIII u plazmi veću od 7,83 ng/ml, bilo je usporedivo s preživljenjem bez nepovoljnog primarnog ishoda bolesnica s povoljnim prognostičkim parametrima (LN-, ER/PR+, Her2-).

S obzirom na dobivene rezultate u skupini bolesnica s NST tumorima dojke u ranom stadiju bolesti (T1, T2 tumori), a koji imaju loše prognostičke parametre (LN+, ER/PR-, Her2+), ovisno o preoperativnim vrijednostima TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke moguće je predvidjeti koje će bolesnice imati lošiju, odnosno bolju prognozu.

Plazmatska koncentracija TGF β rIII izmjerena prije operativnog zahvata kao jedini neovisni čimbenik upotrijebljena je za procjenu vjerojatnosti nepovoljnog primarnog ishoda u bolesnica s karcinomom dojke. Nađeno je kako je vjerojatnost preživljenja bez nepovoljnog primarnog ishoda rasla s porastom preoperativne koncentracije TGF β rIII. Takvom analizom vjerojatnost pojave nepovoljnog ishoda u smislu progresije bolesti u ovom istraživanju procijenjena je na 10% pri serumskoj koncentraciji TGF β rIII od 10,8 ng/ml, a daljnjim padom koncentracije eksponencijalno je rasla i vjerojatnost progresije.

Zaključno, koristeći specifična protutijela razvili smo esej za detekciju molekule TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke te smo po prvi puta izmjerili razinu ekspresije navedene molekule u plazmi.

Koncentracija molekule TGF β rIII bila je značajno niža kod bolesnica s karcinomom dojke u odnosu na zdrave ispitanice, a nakon operativnog liječenja, koncentracija molekule TGF β rIII u plazmi bolesnica je porasla. S obzirom da je porast koncentracije TGF β rIII u plazmi bio statistički značajan tek komparacijom preoperativnog i drugog postoperativnog uzorkovanja s medijanom od 32 dana, opravdano bi bilo u budućim studijama postoperativno uzorkovanje plazme raditi 1 mjesec nakon operativnog zahvata.

U istraživanju smo dokazali tendenciju porasta vrijednosti TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke prema normalnim vrijednostima nakon uklanjanja tumorske mase kirurškim putem. Dugotrajnijim praćenjem vrijednosti TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke koji je niskog rizika za progresiju bolesti (T1 i T2 stadij bolesti) možda bi došlo do pada vrijednosti TGF β rIII, a koja bi upućivala na prvu naznaku da će uslijediti relaps bolesti.

Porast koncentracije TGF β rIII na tkivnoj razini imunohistokemijskom metodom u ovom istraživanju je sugestivan, međutim u odnosu na dobivene vrijednosti plazmatske koncentracije TGF β rIII zahtijeva dodatan napor u istraživanju različitim vrstama protutijela kako bi se jasnije ustanovila povezanost između tkivne i plazmatske koncentracije TGF β rIII kod bolesnica s karcinomom dojke.

Ovo istraživanje govori u prilog da je TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke moguće iskoristiti kao novi biomarker za prognozu bolesti u bolesnica s karcinomom dojke u ranim stadijima bolesti (T1,T2 tumori). Za potpuniju sliku o mogućnostima ovog markera potrebna su daljnja istraživanja na većim uzorcima i moguće uz duže vremensko praćenje. S obzirom da TGF β rIII ispunjava osnovne značajke biomarkera, a kao plazmatski biomarker ne zahtijeva kiruršku intervenciju i osigurava jeftin monitoring u bilo koje vrijeme bolesti, ostaje da se u budućnosti ispita njegova vrijednost u svim skupinama bolesnica s karcinomom dojke. Isto tako bilo bi dobro provesti nove studije koristeći ovaj biomarker za bolesnice s karcinomom dojke u uznapredovalom stadiju bolesti, kako za procjenu rizika od progresije tako i za praćenje učinkovitosti različitih metoda liječenja.

7. ZAKLJUČCI

1. Koristeći se specifičnim ELISA testom sa zečjim poliklonskim protutijelom na TGF β rIII proizvedenom u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta u Zagrebu, u ovom istraživanju po prvi puta smo izmjerili vrijednosti TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke te u plazmi zdravih ispitanica. Prosječna koncentracija TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke iznosila je 7,63 ng/ml (raspon 14,41 ng/ml), što je bilo statistički značajno manje od kontrolne skupine, čija je koncentracija TGF β rIII u plazmi prosječno iznosila 42,50 ng/ml (raspon 49,29 ng/ml); (Mann-Whitney test, $p < 0,001$). S obzirom na statističku značajnost, koncentracija TGF β rIII u plazmi mogla bi se koristiti s ciljem razlikovanja oboljelih od karcinoma dojke i zdravih.
2. Koncentracija TGF β rIII u plazmi značajno je porasla nakon operativnog zahvata u vremenu između preoperativnog i drugog postoperativnog uzorokovanja (Wilcoxon signed rank test, $Z = -3,574$, $p < 0,001$).
3. Koristeći se imunohistokemijskom metodom, u ovom istraživanju smo dokazali da zdravo tkivo dojke uz tumor u značajnije većem udjelu slabo ili nikako imunohistokemijski ne eksprimira TGF β rIII, za razliku od tumorskog tkiva koje ga umjereno ili jako eksprimira u 84% slučajeva.
4. U našem istraživanju nije nađena statistički značajna korelacija između preoperativne koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s invazivnim karcinomom dojke i umnoška intenziteta i udjela ekspresije TGF β rIII na imunohistokemijski bojenim uzorcima, iako je zamijećena diskretna pozitivna korelacija između promatranih vrijednosti (Spearmanov rho 0,023, $p = 0,878$).
5. Bolesnice s NST karcinomom dojke kojima je preoperativno izmjerena koncentracija TGF β rIII u plazmi bila niža od 7,83 ng/ml, imale su statistički značajno manji udio preživjelih bez nepovoljnog primarnog ishoda (metastaza, lokalni recidiv ili pojava novog primarnog tumora) u usporedbi s bolesnicama kojima je preoperativno izmjerena koncentracija TGF β rIII u plazmi bila viša ili jednaka 7,83 ng/ml (Log rank Mentel Cox, $p = 0,045$).

6. Bolesnice s NST tumorima dojke koje su imale loše prognostičke parametre (LN+, ER/PR-, Her2+), a čija je koncentracija TGF β rIII u plazmi prije operativnog zahvata bila veća od 7,83 ng/ml, imale su značajno bolje preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u odnosu na bolesnice s nižom koncentracijom TGF β rIII u plazmi, a koje je bilo usporedivo s preživljenjem bez nepovoljnog primarnog ishoda bolesnica s povoljnom kombinacijom prognostičkih parametara (LN-, ER/PR+, Her2-) (Log rank Mentel Cox, $p=0,016$).
7. Pojava nepovoljnog ishoda u smislu progresije bolesti u ovom istraživanju procijenjena je na 10 % pri preoperativnoj koncentraciji TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke od 10,8 ng/ml, a daljnjim padom koncentracije eksponencijalno je rasla i vjerojatnost progresije bolesti.

Provedena studija je eksplorativna inicijalna evaluacija koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke. Studija je monocentrična sa relativno malim uzorkom, ali koji je prosječno ispraćen do 61,2 mjeseca. Rezultati dobiveni u ovoj studiji pokazali su veliki potencijal određivanja koncentracije TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke kao biomarkera za dijagnozu i predviđanje prognoze bolesti.

8. SAŽETAK

Praćenje promjena koncentracije topljivoga receptora za TGF beta III specifičnoga biomarkera u plazmi bolesnica s karcinomom dojke

Uvod i cilj istraživanja

Karcinom dojke najčešće je maligno oboljenje žena od kojeg obolijeva četvrtina novooboljelih ženskih osoba u svijetu i Hrvatskoj. Cilj ove studije bio je istražiti povezanost molekule TGF β rIII u uzorcima plazme bolesnica s karcinomom dojke i tkiva tumora s prognozom bolesti.

Ispitanici i metode

U istraživanju su bile uključene 62 bolesnice sa zloćudnim tumorom dojke i 36 zdravih ispitanica u kontrolnoj skupini. ELISA metodom određivali smo koncentraciju TGF β rIII u plazmi bolesnica prije i nakon operativnog zahvata, a imunohistokemijski izražajnost TGF β rIII proteina u uzorcima tumora dojke.

Rezultati

U ovom istraživanju po prvi puta smo izmjerili vrijednosti TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke te u plazmi zdravih ispitanica. Prosječna koncentracija TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke iznosila je 7,63 ng/ml (raspon 14,41 ng/ml), što je bilo značajno niže u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0,001$). Bolesnice s preoperativno izmjerenom koncentracijom TGF β rIII u plazmi nižom od 7,83 ng/ml imale su statistički značajno manji udio preživjelih bez nepovoljnog primarnog ishoda (metastaza, lokalni recidiv ili pojava novog primarnog tumora) u usporedbi s ostalim bolesnicama ($p = 0,045$). Bolesnice koje su imale loše prognostičke parametre (LN+, ER/PR-, Her2+), a čija je koncentracija TGF β rIII u plazmi prije operativnog zahvata bila veća od 7,83 ng/ml, imale su značajno bolje preživljenje bez nepovoljnog primarnog ishoda u odnosu na bolesnice s tumorima istih karakteristika ali nižom koncentracijom TGF β rIII u plazmi ($p = 0,016$).

Zaključak

U ovom istraživanju pokazali smo da bi se TGF β rIII u plazmi bolesnica s karcinomom dojke mogao koristiti kao novi prediktor ishoda u skupini bolesnica s niskim rizikom bolesti te je zanimljiv predmet budućih istraživanja.

Ključne riječi: rak dojke, TGF β rIII, biomarker, plazma, prognostički faktor

9. SUMMARY

Monitoring of plasma concentration changes of specific biomarker TGF beta III soluble receptor in breast cancer patients

Darko Jurišić, Zagreb, 2016.

Background and aim

Breast cancer is the most common female cancer disease of which are affected one quarter of women treated for cancer in the world and Croatia. The aim of this study was to explore the relationship of the molecule TGF β rIII in samples of plasma of the patients with breast cancer and tumour tissue with prognosis of the disease.

Subjects and Methods

The study included 62 female patients with breast cancer and 36 respondents in the control group. ELISA method was used to determine the concentration of the TGF β rIII in the patients' plasma before and after the surgery, while immunohistochemical analysis was used for expression of TGF β rIII protein in breast tumor samples.

Results

In this research for the first time we measured the values of the TGF β rIII in plasma of the patients with breast cancer and in plasma of healthy respondents. The average concentration of the TGF β rIII in plasma of the patients with breast cancer was 7,63 ng/ml (range 14,41 ng/ml), which was significantly lower concentration compared to the control group ($p < 0,001$). Patients with breast cancer with preoperative concentration of the TGF β rIII in plasma lower than 7,83 ng/ml had statistically significantly lower survival rate without adversely primary outcome (metastasis, local recurrence or appearance of new primary tumors) compared to other patients ($p = 0,045$). Patients with poor prognostic parameters (LN+, ER/PR-, Her2+) and with preoperative concentration of the TGF β rIII in plasma higher than 7,83 ng/ml had statistically significantly better survival rate without adversely primary outcome compared to patients with lower concentration of the TGF β rIII in plasma ($p = 0,016$).

Conclusion

This study demonstrated that TGF β rIII in the plasma of patients with breast cancer disease could be a new predictor of outcome in a group of patients with low-risk disease and is an interesting subject for future research.

Keywords: breast cancer, TGF β rIII, biomarker, plasma, prognostic factor

10. LITERATURA

1. Znaor A. Registar za rak. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 2011;7:28.
2. Vlajčić Z, Stanec Z, ur. Kliničke smjernice za onkoplastično liječenje raka dojke. HLZ, HDPREK. Zagreb: Nex-press; 2013, str. 6-35.
3. Stamenić V, Strnad M. Urban-rural differences in a population-based breast cancer screening program in Croatia. Croat Med J 2011;52:76-86.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj. Zagreb 2010: Registar za rak; Bilten br. 33.
5. Vrdoljak E, Wojtukiewicz MZ, Pienkowski T, i sur. Cancer epidemiology in Central and South Eastern European countries. Croat Med J 2011;52:478-87.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, i sur. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Dostupno na: <http://globocan.iarc.fr>.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.
8. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010;60:277-300.
9. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast Cancer Statistics, 2011. Ca Cancer J Clin 2011;61:409–18.
10. Brewster A, Helzlsouer K. Breast cancer epidemiology, prevention and early detection. Curr Opin Oncol 2001;13:420–25.
11. Legorreta AP, Cherneroff HO, Trinh JB, Parker RG. Diagnosis, Clinical Staging, and Treatment of Breast Cancer. Am J Clin Oncol 2004;27:185–90.
12. Strnad M. Epidemiologija raka. U: Šamija M i sur, ur. Onkologija, Zagreb: Medicinska naklada; 2000, str. 51-7.
13. Stanec S. Dojka. U: Šoša T, Sutlić Ž, Stanec Z i sur, ur. Kirurgija, Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 884-92.
14. Ljubičić N, Ivanda T, Strnad M, Brkljacic B. The Croatian national breast cancer screening program--"mamma". Breast J 2011;17:106-8.
15. Parun A.Š. Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke. Hrvatski časopis za javno zdravstvo 2011;28:7.

16. Ivančević Ž. i sur: MSD priručnik dijagnostike i terapije. The Merck Manual. 2. izd. Split: Placebo d.o.o; 2010, str. 2108-118.
17. Fajdić J. i sur: Suvremena dijagnostika bolesti dojke. Zagreb: Medicinska naklada; 2001, str. 143-350.
18. Brody JG, Moysich KB, Humblet O, Attfield KR, Beehler GP, Rudel RA. Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer* 2007;109:2667–711.
19. Šamija M, Krajina Z, Purišić A. Radioterapija. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1996, str. 129-57.
20. Mettlin C. The Relationship of Breast Cancer Epidemiology to Screening Recommendations. *Cancer* 1994;74:228-30.
21. Kraljević Lj, Perković Z, Štambuk I. Probir i minimalni rak dojke. *Borba protiv raka* 1995;1:40-2.
22. Nover AB, Jagtap S, Anjum W, i sur. Modern Breast Cancer Detection: A Technological Review. *Int J Biomed Imaging* 2009;2009:902326.
23. Enriquez L, Listinsky J. Role of MRI in breast cancer management. *Cleve Clin J Med* 2009;76:525-32.
24. Yu YH, Liang C, Yuan XZ. Diagnostic value of vacuum-assisted breast biopsy for breast carcinoma: A meta-analysis and systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:469–79.
25. Veronesi U, Pagganelli G, Viale G, i sur. Sentinel Lymph Node Biopsy and Axillary Dissection in Breast Cancer: Results in a Large Series. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:368-73.
26. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs. 2nd edition. Lyon, France: IARC Press; 2003, str. 1-112.
27. Michell M, Reznick RH: Contemporary Issues in Cancer Imaging; Breast Cancer. New York: Cambridge University Press; 2010, str. 46-168.
28. Elsheikh TM, Silverman JF. Follow-up surgical excision is indicated when breast core needle biopsies show atypical lobular hyperplasia or lobular carcinoma in situ: a correlative study of 33 patients with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 2005;29:534–43.

29. Schnitt SJ. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: flat epithelial atypia – classification, pathologic features and clinical significance. *Breast Cancer Res* 2003; 5:263–8.
30. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: : how special are they? *Mol Oncol* 2010;4:192-208.
31. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van der Vijver MJ. WHO Classification Of Tumours of the Breast. 4. izd. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012, str. 34-163.
32. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004;6:149–56.
33. Yerushalmi R, Hayes MM, Gelmon KA. Breast carcinoma - rare types: review of the literature. *Ann Oncol* 2009;20:1763–70.
34. Chen L, Fan Y, Lang RG, i sur. Breast carcinoma with micropapillary features: clinicopathologic study and long-term follow-up of 100 cases. *Int J Surg Pathol* 2008;16:155–63.
35. Middleton LP, Tressera F, Sobel ME, i sur. Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 1999;12:499-504.
36. Luini A, Aguilar M, Gatti G, i sur. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute Of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101:349–53.
37. Sapino A, Papotti M, Righi L ,Cassoni P, Chiusa L, Bussolati G . Clinical significance of neuroendocrine carcinoma of the breast. *Ann Oncol* 2001;12:115–7.
38. Shi P, Wang M, Zhang Q, Sun J. Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathological study of 49 cases. *Tumori* 2008;94:342–6.
39. Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S. Clinical and pathological features of glycogen-rich clear cell carcinoma of the breast. *Breast Cancer* 2005; 12:189–95.
40. Arpino G, Clark GM, Mohsin S, Bardou VJ, Elledge RM. Adenoid cystic carcinoma of the breast: molecular markers, treatment, and clinical outcome. *Cancer* 2002;94:2119–7.

41. Edge B, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC Cancer Staging Manual. 7. izd. New York Dordrecht Heidelberg London: Springer; 2010, str. 347-76.
42. Winchester DJ, Winchester DP, ur. American Cancer Society. Atlas of Clinical Oncology. Breast Cancer. Hamilton. London: B.C. Decker Inc; 2000, str. 139-200.
43. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, i sur. Twenty year follow-up of a randomized study comparing breast conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1227–32.
44. Arriagada R, Le MG, Rochard F, Contesso G. Conservative treatment versus mastectomy in early breast cancer: patterns of failure with 15 years of follow-up data. Institut Gustave-Roussy Breast Cancer Group. *J Clin Oncol* 1996;14:1558–64.
45. Fisher B, Anderson S, Bryant J, i sur. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1233–41.
46. Poggi MM, Danforth DN, Sciuto LC, i sur. Eighteen-year results in the treatment of early breast carcinoma with mastectomy versus breast-conservation therapy. *Cancer* 2003;98:696–702.
47. van Dongen JA, Voogd AC, Fentiman IS, i sur. Longterm results of a randomized trial comparing breastconserving therapy with mastectomy: European organization for research and treatment of cancer 10801 trial. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1143–50.
48. Bilchert-Toft M, Rose C, Anderson JA, i sur. Danish randomized trial comparing breast-conservation therapy with mastectomy. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992;11:19–25.
49. Veronesi U, Banfi A, Salvadori B, i sur. Breast conservation is the treatment of choice in small breast cancer: Long term results of a randomized trial. *Eur J Cancer* 1990;26:668-70.
50. Veronesi U, Volterrani F, Luini A, i sur. Quadrantectomy versus lumpectomy for small size breast cancer. *Eur J Cancer* 1990;6:671-3.
51. Veronesi U, Luini A, Del Vecchio M, i sur. Radiotherapy after breast-preseving surgery in women with localized cancer of the breast. *N Engl J Med* 1992;82:1587-91.

52. Atalay C. New concepts in axillary management of breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014;10:895-900.
53. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977;39:456–466.
54. Morton DL, Wen DR, Wong JR, i sur. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392–9.
55. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, i sur. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:927-3.
56. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfi MR, i sur. American society of clinical oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703–20.
57. Lucci A, McCall LM, Beitsch PD, i sur. Surgical complications associated with sentinel lymph node dissection (SLND) plus axillary lymph node dissection compared with SLND alone in the American college of surgeons oncology group trial Z0011. *J Clin Oncol* 2007;25:3657–63.
58. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, i sur. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7703-20.
59. Collins ED, Moore CP, Clay KF, i sur. Can women with early stage breast cancer make an informed decision for mastectomy? *J Clin Oncol* 2009;27:519–25.
60. Vinton AL, Traverso W, Zehring RD. Immediate breast reconstruction following mastectomy is as safe as mastectomy alone. *Arch Surg* 1990;125:1303–8.
61. Džepina I. Rekonstruktivna i estetska kirurgija dojke. U: Fajdić J, Džepina I, ur. *Kirurgija dojke*. Zagreb: Školska knjiga, d.d; 2006, str. 137-77.
62. Hammond DC. Latissimus dorsi musculocutaneous flap breast reconstruction. U: Spear S. L. *Surgery of the Breast. Principles and Art*. 3. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, str. 535-54.
63. Goyal A. Current Trends in Breast Surgery. *Indian J Surg Oncol* 2012;3:287–91.
64. Alderman AK, McMahon L, Wilkins EG. The national utilization of immediate and early delayed breast reconstruction and the impact of sociodemographic factors. *Plast Reconstr Surg* 2003;111:695–703.

65. Burstein HJ, Harris JR, Morrow M. Malignant tumors of the breast. U: DeVita, V.T, Lawrence TS, Rosenberg SA, ur. Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008, str.1606-53.
66. Clarke M, Collins R, Darby S, i sur. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005;366:2087.
67. Morrow M, Harris JR. Local management of invasive cancer: breast. U: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, ur. Diseases of the breast, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004, str.719.
68. Holland R, Veling SH, Mravunac M, Hendriks JH. Histologic multifocality of Tis, T1-2 breast carcinomas. Implications for clinical trials of breast-conserving surgery. Cancer 1985;56:979.
69. Vicini FA, Kestin LL, Goldstein NS. Defining the clinical target volume for patients with early-stage breast cancer treated with lumpectomy and accelerated partial breast irradiation:a pathologic analysis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;60:722–30.
70. Cuttino L.W, Vicini F.A. Radiation Therapy Following Breast-conserving Surgery. U: Spear S. L, sur. Surgery of the Breast. Principles and Art. Third Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, str. 242-53.
71. Overgaard M, Hansen PS, Overgaard J, i sur. Postoperative radiotherapy in high-risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. Danish Breast Cancer Cooperative Group 82b Trial. N Engl J Med 1997;337:949-55.
72. Fowble B, Gray R, Gilchrist K, i sur. Identification of a subgroup of patients with breast cancer and histologically positive axillary nodes receiving adjuvant chemotherapy who may benefit from postoperative radiotherapy. J Clin Oncol 1988;6:1107-17.
73. López-Tarruella S, Martín M. Recent advances in systemic therapy: advances in adjuvant systemic chemotherapy of early breast cancer. Breast Cancer Res 2009;11:204.
74. Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, i sur. Combination chemotherapy as an adjuvant treat-ment in operable breast cancer. N Engl J Med 1976;294:405-10.

75. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C: Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995;332:901-6.
76. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Poly-chemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;352:930-42.
77. Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, i sur; GEICAM Group (Spanish Breast Cancer Research Group), Spain. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Ann Oncol* 2003;14:833-42.
78. Fumoleau P, Kerbrat P, Romestaing P, i sur. Randomized trial comparing six versus three cycles of epirubicin-based adjuvant chemotherapy in premenopausal, node-positive breast cancer patients: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 01 trial. *J Clin Oncol* 2003;21:298-5.
79. Henry NL, Hayes DF. Can biology trump anatomy? Do all node-positive patients with breast cancer need chemotherapy? *J Clin Oncol* 2007;25:2501-3.
80. Sabel MS, ur. *Essentials of Breast Surgery*. Philadelphia: Mosby, Inc; 2009, str. 247-78.
81. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol* 2007;18:1133-44.
82. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008;26:721-28.
83. Lebowitz PF, Swain SM. *Hormonal Therapy for Breast Cancer*. U: Chabner BA, Longo DL, ur. *Cancer Chemotherapy & Biotherapy: Principles & Practices*, 4. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006, str. 810-46.
84. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002;346:340-52.
85. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med* 1998;339:1609-18.
86. Rose C, Mouridsen HT. Treatment of advanced breast cancer with tamoxifen. *Recent Results Cancer Res* 1984;91:230-42.

87. Muss HB, Case LD, Atkins JN, i sur. Tamoxifen versus high-dose oral medroxyprogesterone acetate as initial endocrine therapy for patients with metastatic breast cancer: a Piedmont Oncology Association study. *J Clin Oncol* 1994;12:1630-8.
88. Early Breast Cancer Trialist Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451–67.
89. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, i sur. Tamoxifen for the prevention of breast cancer; report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1371–88.
90. Jordan VC, Assikis VJ. Endometrial carcinoma and tamoxifen: clearing up a controversy. *Clin Cancer Res* 1995;1:467-72.
91. Swain SM: Tamoxifen: the long and short of it. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1510-2.
92. Van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C, i sur. Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;377:321-31.
93. Coombes RC, Hall E, Gibson LJ, i sur. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1081-92.
94. Goss PE, Ingle JN, Martino S, i sur. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* 2003;349:1793-802.
95. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, i sur. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005;23:619-29.
96. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group; Thürlimann B, Keshaviah A, Coates AS, i sur. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:2747-57.
97. Juretić A, Šarić N, Bišof V, Bašić-Koretić M. Fulvestrant: Novi lijek u hormonskoj terapiji raka dojke. *Liječ Vjesn* 2006;128:31–6.
98. Robertson JF. Selective estrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat Rev* 2004;30:695–706.

99. Dinh P, Tomasello G, Piccart M J. HER2-Targeted Therapy. U: Jatoi I, Kaufmann M, ur. Management of breast diseases. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2010, str. 373-90.
100. Romond EH, Perez EA, Bryant J, i sur. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005;353:1673.
101. Smith I, Procter M, Gelber RD, i sur. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. Lancet 2007;369:29.
102. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, i sur. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. N Engl J Med 2006;354:809–20.
103. Conzen S D, Grushko TA, Olopade OI. The molecular biology of breast cancer. U: DeVita V T, Lawrence TS, Rosenberg SA, ur. Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 8. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008, str.1596-606.
104. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. J Clin Oncol 2003;21:2787–99.
105. Arpino G, Green SJ, Allred DC, i sur. HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. Clin Cancer Res 2004;10:5670–6.
106. Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, i sur. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. J Clin Oncol 2003;21:3965–71.
107. Albanell J, Baselga J. Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect. J Natl Cancer Inst 2001;93:1830–2.
108. Murphy C.G, Modi S. HER2 breast cancer therapies: a review. Biologics 2009;3:289–301.
109. Anders CK, Winer EP, Ford JM, i sur. Poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition: "targeted" therapy for triple-negative breast cancer. Clin Cancer Res 2010;16:4702-10.

110. Ladjemi MZ, Jacot W, Chardès T, Pèlegri A, Navarro-Teulon I. Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1295–312.
111. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181–7.
112. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, i sur. Prognostic Factors in Breast Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966–78.
113. Biganzoli L. Prognostic and Predictive Factors. U: Castiglione M, Piccart MJ, ur. *Adjuvant Therapy for Breast Cancer*. Springer Science+Business Media, 2009, str. 13-30.
114. Rogers CE, Loveday RL, Drew PJ, Greenman J. Molecular prognostic indicators in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;285:467-78.
115. Elston CW, Ellis IO. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
116. Carey LA, Metzger R, Dees EC, i sur. American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1137–42.
117. Abrial SC, Penault-Llorca F, Delva R, i sur. High prognostic significance of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: a retrospective study in 710 patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;94:255–63.
118. Ogston KN, Miller ID, Payne S, i sur. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003;12:320–7.
119. Thor AD, Moore DH. Prognostic and predictive markers in breast cancer. U: Winchester D.J. Winchester D.P, ur. *Atlas of Clinical Oncology. Breast Cancer*. American Cancer Society. London: B.C. Decker Inc; 2000, str. 113-30.
120. Ibrahim M. Bartlett J.M.S, Miller K, Jasani B. Breast Cancer Biomarkers: Prognostic and Predictive Value and External Quality Assurance. U: O'Malley F. P, Pinder S.E, Mulligan A.M, ur. *Breast Pathology*, O'Malley, 2. izd. Philadelphia: Saunders of Elsevier Inc; 2011., str. 321-67.

121. Rodriguez de Paterna L, Arnaiz F, Estenoz J, Ortuño B, Lanzós E. Study of serum tumor markers CEA, CA15.3 and CA 27.29 as diagnostic parameters in patients with breast carcinoma. *Int J Biol Markers* 1995;10:24-9.
122. Hammarström S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues 1. *Semin Cancer Biol* 1999;2:67–81.
123. Fisher B, Jeong JH, Bryant J, i sur. Treatment of lymph-node-negative, oestrogen-receptor-positive breast cancer: long-term findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project randomised clinical trials. *Lancet* 2004;364:858–68.
124. Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, i sur. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report, 2004. *J Clin Oncol* 2005;23:619–29.
125. Tan M, Yu D. Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. *Adv Exp Med Biol* 2007;608:119–29.
126. Harris L, Fritsche H, Mennel R, i sur. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287-312.
127. Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 2006;52:345-51.
128. Guillot C, Falette N, Courtois S, i sur. Alteration of p53 damage response by tamoxifen treatment. *Clin Cancer Res* 1996;2:1439-44.
129. Duffy J. The clinical value of tumor markers in breast cancer. *European Oncological Disease* 2006;1:23-7.
130. Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 2002;1:3289-97.
131. Nola P, Orešić V, Kolarić K. Rak dojke. U: Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur: Klinička onkologija. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1996, str. 577-628.
132. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311–22.

133. Sainsbury JR, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet* 1987;1:1398-402.
134. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.
135. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010;23:60-4.
136. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, i sur: Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
137. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, i sur. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;1193:551-8.
138. Paik S, Shak S, Tang G, i sur. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;30:2817-26.
139. Albain KS, Barlow WE, Shak S, i sur. Breast Cancer Intergroup of North America. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11:55-65.
140. Srivastava R. Apoptosis, cell signaling and human diseases. New Jersey: Humana Press Inc. Totowa; 2007, str. 77-9.
141. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350-8.
142. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett* 2002;82:85-91.
143. Derynck R, Fengr XH. TGF-b receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:105–50.
144. Jakowlew SB. Transforming growth factor- β in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:435–57.
145. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF- β as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:21–62.

146. Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:166–76.
147. Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:22–9.
148. Pinkas J, Teicher B.A. TGF- β in cancer and as a therapeutic target. *Bioch Pharm* 2006;72:523–529.
149. Bierie B, Moses HL. TGF- β and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;72:29–40.
150. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer—a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001;11:44–51.
151. Reiss M. TGF- β and cancer. *Microbes Infect* 1999;1:1327–47.
152. Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:197–28.
153. Iyer S, Wang ZG, Akhtari M, Zhao W, Seth P. Targeting TGF β signaling for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2005;4:261–6.
154. Dong M, How T, Kirkbride KC, et al. The type III TGF- β receptor suppresses breast cancer progression. *J Clin Invest* 2007;117:206–17.
155. Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2078–93.
156. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992;52:6949–52.
157. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor beta1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995;222:155–62.
158. Ghellal A, Li C, Hayes M, Byrne G, Bundred N, Kumar S. Prognostic significance of TGF beta 1 and TGF beta 3 in human breast carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20:4413–18.
159. Gatz CE, Oh SY, Blobel GC. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell Signal* 2010;22:1163–74.

160. Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 1991;15:797-05.
161. López-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massagué J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994;124:557-68.
162. Mendoza V, Vilchis-Landeros MM, Mendoza-Hernández G, i sur. Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF-beta binding: proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry* 2009;15:48-9.
163. Bernabeu C, Lopez-Novoa JM, Quintanilla M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:954-73.
164. Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 2008;21:7628-37.
165. Wiaters E, Vale W. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem* 2003;278:7934-41.
166. Esparza-Lopez J, Montiel JL, Vilchis-Landeros MM, Okadome T, Miyazono K, López-Casillas F. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 2001;276:14588-96.
167. Blobe GC, Liu X, Fang SJ, How T, Lodish HF. A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J Biol Chem* 2001;276:39608-17.
168. Blobe GC, Schiemann WP, Pepin MC, i sur. Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor beta receptor in regulating transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem* 2001;276:24627-37.
169. López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 1991;67:785-95.

170. Chen W, Kirkbride KC, How T, i sur. Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 2003;301:1394-7.
171. Lee NY, Kirkbride KC, Sheu RD, Blobe GC. The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Mol Biol Cell* 2009;20:4362-70.
172. Lee JD, Hempel N, Lee NY, Blobe GC. The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression through GIPC-mediated inhibition of TGF-beta signaling. *Carcinogenesis* 2010;31:175-83.
173. Yan Z, Deng X, Friedman E. Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor-beta receptor III. *J Biol Chem* 2001;276:1555-63.
174. Criswell TL, Dumont N, Barnett JV, Arteaga CL. Knockdown of the transforming growth factor-beta type III receptor impairs motility and invasion of metastatic cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:7304-12.
175. Grgurevic L, Macek B, Durdevic D, Vukicevic S. Detection of bone and cartilage-related proteins in plasma of patients with a bone fracture using liquid chromatography-mass spectrometry. *Int Orthop* 2007;31:743-51.
176. Andres JL, Stanley K, Cheifetz S, Massague J. Membrane-anchored and Soluble Forms of Betaglycan, a Polymorphic Proteoglycan that Binds Transforming Growth Factor- β . *J Cell Biol* 1989;109:3137-45.
177. Hempel N, How T, Cooper SJ. Expression of the type III TGF- β receptor is negatively regulated by TGF- β . *Carcinogenesis* 2008;29:905–12.
178. Velasco-Loyden G, Arribas J, López-Casillas F. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem* 2004;279:7721-33.
179. Bandyopadhyay A, Zhu Y, Cibull M.L. A Soluble Transforming Growth Factor b Type III Receptor Suppresses Tumorigenicity and Metastasis of Human Breast Cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res* 1999;59:5041-46.
180. Bandyopadhyay A. Antitumor Activity of a Recombinant Soluble Betaglycan in Human Breast Cancer Xenograft. *Cancer Res* 2002;62:4690-95.
181. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-

- selectivetransforming growth factor- β neutralizing agent. *Biochem J* 2001;355:215-22.
182. Juarez P, Vilchis-Landeros MM, Ponce-Coria J. Soluble betaglycan reduces renal damage progression in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:321–29.
 183. Zhang M, Zola H, Read L, Penttila I. Identification of soluble transforming growth factor-beta receptor III (sTbetalll) in rat milk. *Immunol Cell Biol* 2001;79:291-7.
 184. Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, Mendoza V, Mendoza-Hernández G, López-Casillas F. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-beta neutralizing agent. *Biochem J* 2001;355:215-22.
 185. Fukushima D, Bützow R, Hildebrand A, Ruoslahti E. Localization of transforming growth factor beta binding site in betaglycan. Comparison with small extracellular matrix proteoglycans. *J Biol Chem* 1993;268:22710-5.
 186. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95.
 187. Tessari A, Palmieri D, Di Cosimo S. Overview of diagnostic/targeted treatment combinations in personalized medicine for breast cancer patients. *Pharmgenomics Pers Med* 2013;7:1-19.
 188. Abbott KL, Aoki K, Lim JM, Porterfield M, i sur. Targeted glycoproteomic identification of biomarkers for human breast carcinoma. *J Proteome Res* 2008;7:1470-80.
 189. Abd Hamid UM, Royle L, Salдова R, i sur. A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology* 2008;18:1105-18.
 190. Misek DE, Kim EH. Protein biomarkers for the early detection of breast cancer. *Int J Proteomics* 2011;2011:343582.
 191. Molina R, Auge JM, Farrus B, i sur. Prospective evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15.3 (CA 15.3) in patients with primary locoregional breast cancer. *Clin Chem* 2010;56:1148-57.
 192. Ravishankaran P, Karunanithi R. Clinical significance of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in breast cancer patients. *World J Surg Oncol* 2011;6:18.

193. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003;88:1721-6.
194. Sun L, Chen C. Expression of transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Biol Chem* 1997;272:25367-72.
195. Bandyopadhyay A, Zhu Y, Malik SN, i sur. Extracellular domain of TGFbeta type III receptor inhibits angiogenesis and tumor growth in human cancer cells. *Oncogene* 2002;21: 3541-51.
196. Jovanovic B, Beeler JS, Pickup MW, i sur. Transforming growth factor beta receptor type III is a tumor promoter in mesenchymal-stem like triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2014;1:69.
197. Mythreye K, Blobe GC. The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:8221-6.
198. You HJ, How T, Blobe GC. The type III transforming growth factor-beta receptor negatively regulates nuclear factor kappa B signaling through its interaction with beta-arrestin2. *Carcinogenesis* 2009;1281-7.
199. Li C, Guo B, Wilson PB, i sur. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:122-6.
200. Li C, Wang J, Wilson PB, i sur. Role of transforming growth factor beta3 in lymphatic metastasis in breast cancer. *Int J Cancer* 1998;79:455-9.
201. Sheen-Chen SM, Chen HS, Sheen CW, Eng HL, Chen WJ. Serum levels of transforming growth factor beta1 in patients with breast cancer. *Arch Surg* 2001;8:937-40.
202. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 1992;28:641-4.
203. Ivanović V, Todorović-Raković N, Demajo M, i sur. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression. *Eur J Cancer* 2003;39:454-61.
204. Nikolić-Vukosavljević D, Todorović-Raković N, Demajo M, i sur. Plasma TGF-beta1-related survival of postmenopausal metastatic breast cancer patients. *Clin Exp Metastasis* 2004;21:581-5.

205. Pang JC, Virani NK, Kidwell KM, Kleer CG. Characterization of type III TGF- β receptor expression in invasive breast carcinomas: a potential new marker and target for triple negative breast cancer. *J Cell Commun Signal* 2014;8:211-8.
206. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:133-45.
207. Reis FM, Cobellis L, Tameirão LC, i sur. Serum and tissue expression of activin a in postmenopausal women with breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2277-82.
208. Dave H, Trivedi S, Shah M, Shukla S. Transforming growth factor beta 2: a predictive marker for breast cancer. *Indian J Exp Biol* 2011;49:879-87.
209. Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G, Knabbe C. Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:491-8.
210. Koumoundourou D, Kassimatis T, Zolota V, i sur. Prognostic significance of TGFbeta-1 and pSmad2/3 in breast cancer patients with T1-2, N0 tumours. *Anticancer Res* 2007;27:2613-20.
211. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Clin Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Med Res* 2009;7:4-13.
212. Walker RA, Dearing SJ. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 1992;28:641-4.
213. He W, Tong Y, Wang Y, i sur. Serum soluble CD14 is a potential prognostic indicator of recurrence of human breast invasive ductal carcinoma with Her2-enriched subtype. *PLoS One* 2013;9:75366.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 21. 1. 1974. g. u Slavonskom Brodu. Osnovnu i srednju školu, Gimnaziju „Matija Mesić“, završio sam u Slavonskom Brodu.

Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam 1992., a diplomirao 1998. godine.

Obvezni liječnički staž odradio sam u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Po završetku staža, radio sam kao liječnik na Hitnoj medicinskoj pomoći u Domu zdravlja Slavonski Brod, a potom u vojnim ambulantama tijekom služenja vojnog roka. Godinu dana sam kao vanjski suradnik predavao predmet Anatomija i fiziologija u Srednjoj medicinskoj školi u Slavonskom Brodu.

Godine 2001. odobrena mi je specijalizacija iz opće kirurgije, a specijalistički ispit položio sam 2005. godine u Kliničkoj bolnici „Sestre milosrdnice“ u Zagrebu. Godine 2007. započeo sam subspecijalizaciju iz plastične kirurgije, a subspecijalistički ispit položio sam 2007. godine na Klinici za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku kirurgiju, Klinička bolnica „Dubrava“ u Zagrebu.

Zaposlen sam na Odjelu za kirurške bolesti kao specijalist opće kirurgije i subspecijalist plastične kirurgije u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

Godine 2004. upisao sam Znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“ Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a 2012. obranio sam temu doktorske disertacije pod nazivom „Praćenje promjena koncentracije topljivoga receptora za TGF beta III specifičnoga biomarkera u plazmi bolesnica s karcinomom dojke“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Lovorke Grgurević.

Završio sam više tečajeva iz područja opće i plastične kirurgije, a 2009. godine sam nakon dobivanja stipendije OTC bio na edukaciji iz plastične kirurgije i traumatologije u Trauma Centru Murnau u Njemačkoj i Trauma Centru „Rashid Hospital“ u Dubaiju, UAE. U studijskom posjetu UKC Ljubljana 2015. godine, usavršavao sam se u području rekonstrukcijske kirurgije dojke.

Član sam Upravnog odbora Hrvatskog društva za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku kirurgiju (HDPREK) te sam bio voditelj međunarodnog tečaja I. kategorije: Kirurgija šake, održanog u Slavonskom Brodu 23. - 24. travnja 2014. godine.

Aktivno sam sudjelovao kao autor i koautor na oko 30 radova objavljenih na domaćim i međunarodnim kongresima.

Govorim engleski jezik. Oženjen sam i otac dvaju sinova.

PUBLIKACIJE U ČASOPISIMA INDEKSIRANIM U CURRENT CONTENTS-u:

- Jurisic D, Erjavec I, Trkulja V, Dumic-Cule I, Hadzibegovic I, Kovacevic L, Svagusa T, Stanec Z, Vukicevic S, Grgurevic L. Soluble type III TGF β receptor in diagnosis and follow-up of patients with breast cancer. *Growth Factors*. 2015;20:1-10.
- Jurisic D, Doko M, Glavan E, Rosko D, Vidovic D, Tomic K. Local recurrence of primary non-ampullary adenocarcinoma of duodenum after surgical treatment--a case report and a literature review. *Coll Antropol* 2006;30:225-9.
- Jurisic D, Doko M, Glavan E, Vidovic D, Matkovic K, Pitlovic V. Spontaneous retroperitoneal haematoma associated with clopidogrel therapy mimicking acute appendicitis. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:248-9.
- Jurisic D, Glavan E, Cugura JF, Vidovic D, Splenic rupture following idiopathic rupture of the urinary bladder presenting as acute abdomen. *J Postgrad Med* 2007;53:39-40.
- Jurisic D, Samardzic J, Hreckovski B, Bano V, Jakovina T, Held R. Massive Necrosis of the Upper Gastrointestinal Tract with Acute Gastric Perforation and Metabolic Acidosis after Hydrochloric Acid (HCl) Ingestion. *Zentralbl Chir* 2011;136:289-90.
- Glavan E, Mijic A, Bekavac-Beslin M, Franjic DB, Jurisic D. Endoscopic extraperitoneal inguinal hernia repair with double mesh: indications, technique, complications, and results. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2005;15:586-90.
- Vidovic D, Jurisic D, Franjic BD, Glavan E, Ledinsky M, Bekavac-Beslin M. Factors affecting recurrence after incisional hernia repair. *Hernia* 2006;10:322-5.
- Pitlović V, Sarić G, Pitlović H, Jovanović S, Jurišić D. A correlation of peak height velocity and olecranon apophysis ossification assessed by ultrasound. *Coll Antropol* 2013;37:1285-9.
- Matejčić A, Ivica M, Jurišić D, Ćuti T, Bakota B, Vidović D. Internal fixation of patellar apex fractures with the basket plate: 25 years of experience. *Injury* 2015;46:S87-90.
- Vidović D, Matejčić A, Ivica M, Jurišić D, Elabjer E, Bakota B. Minimally-invasive plate osteosynthesis in distal tibial fractures: Results and complications. *Injury* 2015;46:S96-9.