

EKSPRESIJA FOLATNOG RECEPTORA ALFA U TROSTRUKO NEGATIVNIH KARCINOMA DOJKE

Zagorec, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:685630>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Irena Zagorac

**EKSPRESIJA FOLATNOG RECEPTORA ALFA U
TROSTRUKO NEGATIVNIH KARCINOMA DOJKE**

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Mentorica: doc. prim. dr. sc. Branka Lončar, dr. med.

Rad ima 84 lista.

Zahvaljujem mentorici doc. prim. dr. sc. Branki Lončar, dr. med. te komentoru, prof. dr. sc. Branku Dmitroviću, dr.med. na predloženoj temi, pruženim savjetima i pomoći tijekom izrade doktorske disertacije.

Ovu disertaciju posvećujem supruhu Igoru koji mi je pružao nesebičnu potporu, razumijevanje i strpljenje.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Histopatološka podjela i gradiranje.....	2
1.2. Molekularna klasifikacija.....	5
1.3. Trostruko negativni karcinom dojke	6
1.4. TNM klasifikacija	8
1.5. Prognostički i prediktivni čimbenici	10
1.5.1. Dob pacijentice	10
1.5.2. Histološki tip i gradus tumora	10
1.5.3. Veličina tumora.....	11
1.5.4. Status aksilarnih limfnih čvorova	11
1.5.5. Limfovaskularna invazija.....	12
1.5.6. Status hormonskih receptora i HER2 ekspresije	12
1.5.7. Proliferacijski indeks (Ki-67)	13
1.6. Folatni receptor alfa (FR α).....	13
2. HIPOTEZA.....	16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
4. ISPITANICI I METODE	18
4.1. Ustroj studije i ispitanici	18
4.2. Metode.....	19
4.3. Statističke metode	23
5. REZULTATI	24
5.1. Osnovna obilježja ispitanica	24
5.2. Povezanost H-scorea s obilježjima ispitanica	27
5.3. Vjerojatnost predviđanja da će doći do relapsa i negativnog ishoda	34
5.4. Analize preživljenja	38
6. RASPRAVA.....	44
6.1. Kliničko-patološki parametri ispitanica oboljelih od TNBC	45
6.2. Folatni receptor alfa u TNBC.....	48

7.	ZAKLJUČCI	55
8.	SAŽETAK	57
9.	SUMMARY	58
10.	LITERATURA	59
11.	ŽIVOTOPIS.....	71

POPIS KRATICA

AUC	Area under the curve (Područje ispod krivulje)
BMI	Body mass indeks (Indeks tjelesne mase)
BCFI	Breast cancer-free interval (Interval bez karcinoma dojke)
CI	Confidence interval (Interval pouzdanosti)
CC1	Cell Conditioner 1
DFS	Disease free survival (Preživljenje bez povrata bolesti)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonukleinska kiselina)
ER	Estrogenski receptor
FR	Folatni receptor
FRα	Folatni receptor alfa
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Receptor za humani epidermalni čimbenik rasta)
KBCO	Klinički bolnički centar Osijek
OS	Overall survival (Sveukupno preživljenje)
OR	Odds ratio (Omjer rizika)
PCFT	Proton-coupled folate transporter (Proton-vezani folatni transporter)
pCR	Pathologic complete response (Patološki potpuni odgovor)
PR	Progesteronski receptor
RFC	Reduced folate carrier (Reducirani folatni nosač)
ROC	Receiver Operating Characteristic
TNBC	Triple negative breast cancer (Trostruko negativni karcinom dojke)
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organisation (Svjetska zdravstvena organizacija)

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Notthingamski sustav gradiranja.....	4
Tablica 1.2. Klasifikacija karcinoma prema St. Gallenu.....	6
Tablica 5.1. Raspodjela ispitanica prema osnovnim obilježjima.....	24
Tablica 5.2. Broj izvađenih i pozitivnih čvorova i veličina tumora.....	25
Tablica 5.3. Vrijednosti proliferacijskog indeksa i H-scorea.....	25
Tablica 5.4. Raspodjela ispitanica prema statusu limfnih čvorova, veličini tumora, proliferacijskom indeksu i folatnom receptoru alfa.....	26
Tablica 5.5. Učestalost prvih i ostalih udaljenih metastaza.....	27
Tablica 5.6. Razlike u H-scoreu prema obilježjima ispitanica.....	28
Tablica 5.7. Međusobna povezanost dobi, broja pozitivnih čvorova, veličine tumora, proliferacijskog indeksa i H-scorea (Pearsonov koeficijent korelacije).....	29
Tablica 5.8. Vrijednosti H-scorea prema statusu limfnih čvorova, veličini tumora i proliferacijskom indeksu.....	30
Tablica 5.9. Raspodjela ispitanica prema folatnom receptoru alfa (FR α) i obilježjima.....	31
Tablica 5.10. Raspodjela ispitanica prema pozitivnom folatnom receptoru alfa (FR α) i obilježjima.....	33
Tablica 5.11. Utjecaj proliferacijskog indeksa, veličine tumora, limfovaskularne invazije i H-scorea na vjerojatnost relapsa (Cox regresija).....	34
Tablica 5.12. Utjecaj veličine tumora i H-scorea na vjerojatnost relapsa (Cox regresija, Stepwise metoda).....	35
Tablica 5.13. Parametri ROC krivulje s obzirom na pojavnost relapsa.....	35
Tablica 5.14. Utjecaj veličine tumora na vjerojatnost negativnog ishoda (Cox regresija, Stepwise metoda).....	36

Tablica 5.15. Veličina tumora kao vrijednost ROC krivulje s obzirom na jednogodišnji ili trogodišnji negativan ishod.....	37
Tablica 5.16. Ukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti u odnosu na folatni receptor alfa (FR α).....	38
Tablica 5.17. Jednogodišnje i trogodišnje preživljenje u odnosu na folatni receptor alfa (FR α).....	39
Tablica 5.18. Ukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti u odnosu na pozitivan folatni receptor alfa (FR α).....	41
Tablica 5.19. Jednogodišnje i trogodišnje preživljenje u odnosu na vrijednosti pozitivnog folatnog receptora alfa (FR α).....	42

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (4. izdanje, 2012.).....	3
Slika 1.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke (8. izdanje, 2016.).....	9
Slika 4.1. Ekspresija folatnog receptora alfa.....	22
Slika 5.1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i granične vrijednosti H-scorea i veličine tumora u određivanju pojavnosti relapsa.....	36
Slika 5.2. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i granične vrijednosti veličine tumora kod jednogodišnjeg i trogodišnjeg negativnog ishoda.....	37
Slika 5.3. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez povrata bolesti (BCFI).....	39
Slika 5.4. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje i trogodišnje ukupno preživljenje.....	40
Slika 5.5. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje i trogodišnje preživljenje bez povrata bolesti.....	40
Slika 5.6. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja pozitivnoga folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje i trogodišnje ukupno preživljenje.....	42
Slika 5.7. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja pozitivnog folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje i trogodišnje preživljenje bez povrata bolesti.....	43

1. UVOD

Karcinom dojke najčešća je zloćudna bolest žena i uzrok smrti od raka, diljem svijeta, s više od 2 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva u 2018. godini (1, 2). Visoka učestalost te, još uvijek, visok mortalitet čini ga svjetskim, zdravstvenim i sociološkim problemom. Prema posljednjim podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo iz 2017. godine, u Republici Hrvatskoj zabilježeno je 2767 novooboljelih žena te su od te zloćudne bolesti, u istoj godini, umrle 853 žene (3). Svjetska zdravstvena organizacija bilježi porast incidencije i mortaliteta u Republici Hrvatskoj, sa zabilježenih 2856 novooboljelih i 1108 umrlih žena u 2018. godini, što čini 11,3 % oboljelih i 7,7 % umrlih, od ukupnog broja oboljelih od raka bilo kojeg sijela, u oba spola (4).

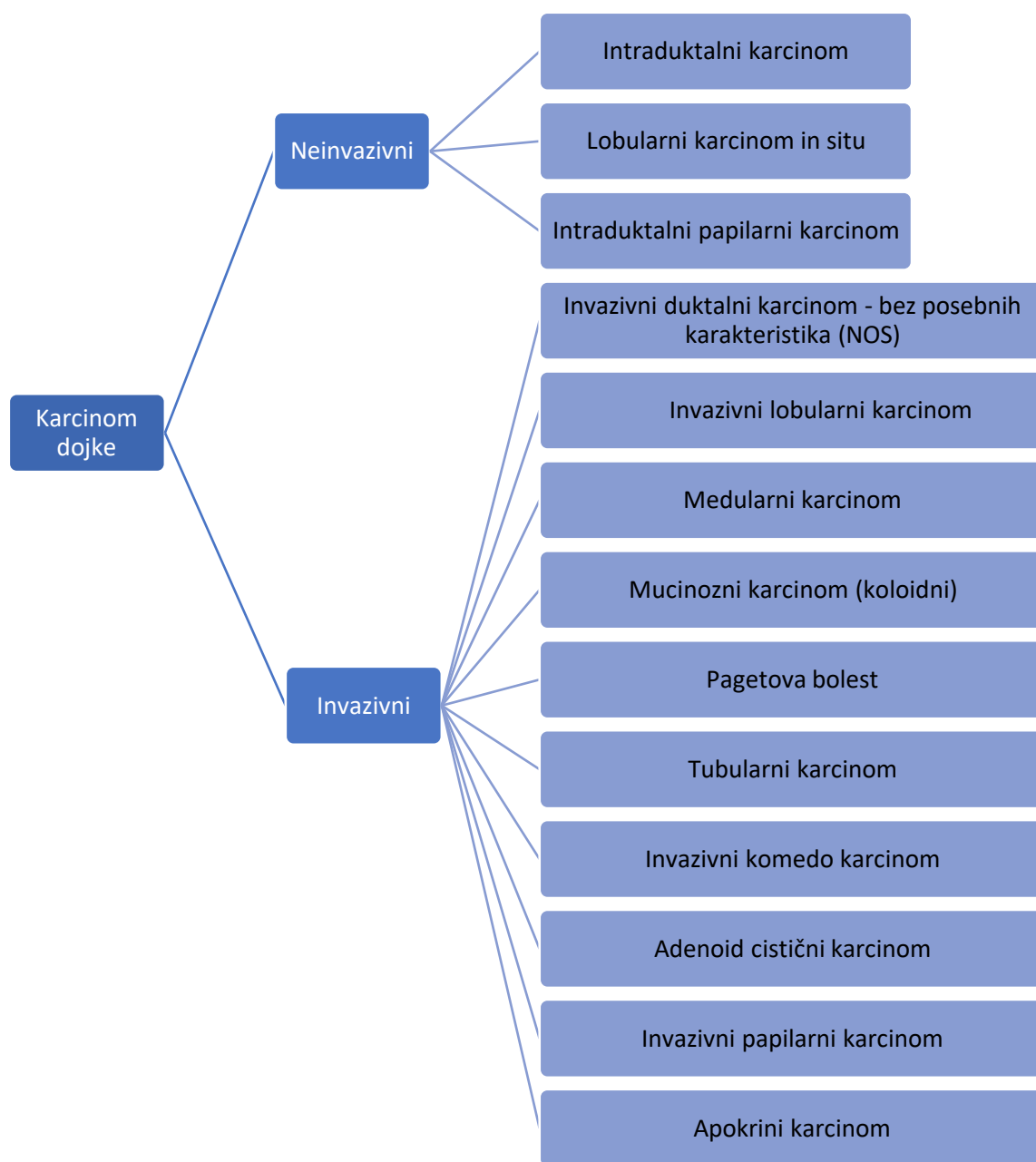
Epidemiološka istraživanja su utvrdila razne egzogene i endogene čimbenike koji utječu na pojavnost karcinoma dojke, od kojih su najvažniji spol, dob i naslijeđe, odnosno pozitivna obiteljska anamneza. Uz njih se kao rizični čimbenici navode i reproduktivna aktivnost, utjecaj hormona (nadmjesna hormonska terapija i uzimanje oralnih kontraceptiva), ranije dijagnosticirana bolest dojke (npr. atipična duktalna ili lobularna hiperplazija) te način života i prehrana, odnosno pretilost. Postoje brojne preporuke koje za smanjenje rizika od razvoja karcinoma dojke sugeriraju promjenu načina života, pravilnu prehranu bogatu vlaknima i antioksidansima, nezasićenim masnim kiselinama i onima s nižim udjelom masnoća, nepušenje i povećanje tjelesne aktivnosti (5).

Pokazalo se da žene imaju sto puta veću vjerojatnost obolijevanja od karcinoma dojke (6). Bolest se može pojaviti i u mlađih žena, no iznad 40. godine incidencija se rapidno povećava, s vrhom obolijevanja u dobi između 60 i 70 godina. Dulja izloženost endogenim estrogenima, uvjetovana vremenom pojave menarhe i menopauze, te trudnoće u kasnijoj dobi ili nulpariteta, kao i egzogeni unos estrogena, putem hormonske kontracepcije ili nadmjesnom hormonskom terapijom u menopauzi, povećavaju rizik za razvoj karcinoma dojke (7, 8). Dob u kojoj se javljaju menarhe i menopauza ima utjecaj na pojavljivanje bolesti te će žene u kojih je menarhe kasnije nastupila imati manji rizik od obolijevanja, a one u kojih je menopauza kasnije nastupila imati će veći rizik. Prvorotkinje u dobi iznad 35 godina, kao i nerotkinje, isto tako su pod povećanim rizikom (9–12).

Žene u kojih je obiteljska anamneza raka dojke pozitivna imaju veću vjerojatnost obolijevanja, koja korelira sa stupnjem srodnosti (bliži rod), dobi obolijevanja od karcinoma te brojem oboljelih članova obitelji. Žene čije su majke ili sestre imale karcinom dojke nose veći rizik od obolijevanja, a taj se rizik povećava ukoliko je dva ili više rođaka iz prvoga koljena oboljelo (13). Nasljedne mutacije čine manje od 10 % ukupnog uzroka za razvoj karcinoma dojke te je dvostruko veći rizik obolijevanja u osoba koje posjeduju mutaciju na samo jednom alelu, nego u osoba bez mutacije. Rizik se objašnjava mutacijama određenih gena, kao što su, najčešće, *BRCA1* i *BRCA2* gen, koju nosi oko 5 % žena. Mutacije tih gena uzrok su trećine ukupnih nasljednih karcinoma dojke te je u nositelja navedenih gena vjerojatnost za razvoj karcinoma dojke 45-85 % (14, 15). Osim njih, dokazane su i genske mutacije u genima *TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C* (16, 17).

1.1. Histopatološka podjela i gradiranje

Tumori dojke se dijele na dobroćudne i zloćudne. Zloćudne tumore dojke karakterizira sposobnost invadiranja i razaranja okolnog tkiva i struktura, kao i širenje u druge organe i tkiva, odnosno metastaziranje. S obzirom na odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani, zloćudne tumore možemo podijeliti u dvije velike skupine: neinvazivne (maligne stanica nisu probile bazalnu membranu) i invazivne (bazalna membrana je probijena). Za klasificiranje temeljem histološkog izgleda najčešće se koristi klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (Slika 1.1.).



Slika 1.1. Klasifikacija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO (World Health Organisation) 4. izdanje, 2012.)

Svi se karcinomi dojke klasificiraju na temelju histološkoga i/ili citološkog izgleda, kako neinvazivni tako i invazivni. Adenokarcinomi su najčešći tumori dojke i čine oko 95 % neoplazmi toga organa. Od svih karcinoma, najčešće se javlja duktalni invazivni karcinom – bez posebnih karakteristika te čini oko 80 % ukupnog broja. Po učestalosti ga slijede lobularni i medularni karcinom, dok su ostali oblici rijetki (18–21).

Histološki gradus tumora odnosi se na semi-kvantitativnu procjenu morfoloških karakteristika i označava stupanj diferenciranosti tumora. Za gradiranje se koristi Scarff-Bloom-Richardson sustav modificiran po Elston-Ellisu (Nottinghamski sustav). Evaluiraju se tri morfološke karakteristike: postotak stvaranja žlijezda, nuklearni pleomorfizam i broj mitoze na deset vidnih polja velikog uvećanja (Tablica 1.1.) (22–24).

Tablica 1.1. Nottinghamski sustav gradiranja

	1 bod	2 boda	3 boda
Stvaranje žlijezda	>75 %	10–75 %	<10 %
Nuklearni pleomorfizam	Blagi (uniformne stanice s malom, uniformnom jezgrom)	Srednji (umjerene varijacije u veličini i obliku, vidljivi nukleoli)	Jaki (izrazite varijacije u veličini i obliku, prominentni, često multipli, nukleoli)
Mitoze / 10 hpf	<9	10–19	>20

Svaki se kriterij ocijeni s 1–3 boda te se dobiveni bodovi zbroje. Konačan rezultat odgovara gradusu tumora, kako slijedi:

- 3–5 bodova = G1 (dobro diferencirani tumor)
- 6–7 bodova = G2 (umjereno diferencirani tumor)
- 8–9 bodova = G3 (slabo diferencirani tumor)

1.2. Molekularna klasifikacija

Karcinom dojke je, s kliničkoga, genetskoga i fenotipskoga gledišta, izrazito heterogena bolest, što utječe na dijagnosticiranje same bolesti, određivanje terapije, kao i na prognozu. Određivanje pojedinih bioloških podtipova temelji se na imunohistokemijskim metodama i profiliranju ekspresije pojedinih gena te su pojedina istraživanja pokazala kako različiti podtipovi imaju drukčije ishode bolesti i značajno se razlikuju u prognozi (25–27).

Molekularnom analizom karcinoma dojke, na temelju ekspresije određenih gena, pokazalo se kako se karcinom dojke može podijeliti na nekoliko podtipova. Oni se razlikuju s obzirom na intrizičku listu gena, a dijele se na: luminalne podtipove (A i B) karakterizirane pozitivnošću estrogenskih receptora (ER) i ekspresijom gena povezanih s luminalnim epitelnim stanicama normalnog tkiva dojke, HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) podtip koji obilježava visoka ekspresija HER2 i proliferacijske skupine gena te trostruko negativan podtip obilježen ekspresijom gena bazalnih epitelних stanica normalnog tkiva dojke (basal-like) te negativnom ekspresijom estrogenskih i progesteronskih (PR) receptora i HER2 (20, 28, 29).

Profiliranje ekspresije gena skupa je metoda koja zahtijeva vrijeme te ju je teško implementirati u svakodnevni rad, čime je nedostupno većini oboljelih od karcinoma dojke. Stoga je na St. Gallenskoj konferenciji 2011. godine (s izmjenama 2013. i 2015. godine) predložena nadomjesna klasifikacija, koja temeljem imunohistokemijske metode određuje receptorski status (estrogenski i progesteronski receptori), ekspresiju HER2 i proliferacijski indeks (Ki-67) (Tablica 1.2.) (30–33).

Luminalni A podtip čini oko 40 % karcinoma dojke, pozitivni su na estrogenske i/ili progesteronske receptore, HER2 im je negativan, a Ki-67 proliferacijski indeks nizak (<20 %). Odgovaraju na hormonsku terapiju te ih odlikuje bolja prognoza od luminal B karcinoma.

Luminalni B podtip ima varijabilnu ekspresiju HER2 gena, višu ekspresiju proliferacijskih gena od luminal A skupine te nešto nižu ekspresiju ER grupe gena. Taj podtip čini oko 20 % karcinoma dojke.

HER2 podtip karakterizira prekomjerna ekspresija HER2 skupine gena, uz proliferacijsku skupinu, te niska ekspresija ER i PR, a čini oko 10 do 15 % karcinoma dojke (28, 34).

Tablica 1.2. Klasifikacija karcinoma prema St. Gallenu

	ER/PR	HER2	Ki-67
Luminal A	ER i/ili PR receptor pozitivan	Negativan	<20 %
Luminal B, HER2 negativni	ER i/ili PR receptor pozitivan	Negativan	≥20 %
Luminal B, HER2 pozitivni	ER i/ili PR receptor pozitivan	Pozitivan	≥20 %
HER2 pozitivni	Negativan	Pozitivan	Sve vrijednosti
Trostruko negativni (TNBC)	Negativan	Negativan	Sve vrijednosti

1.3. Trostruko negativni karcinom dojke

Trostruko negativni karcinomi dojke i dalje su velik izazov za liječnike i područje interesa za razna istraživanja. Karcinomi dojke ovog fenotipa ne pokazuju ekspresiju hormonskih receptora (ER i PR), kao ni HER2, te čine oko 15 % svih invazivnih karcinoma dojke. Iako su odgovorni za manji broj slučajeva karcinoma dojke, uzrokuju veliku smrtnost u pacijenata oboljelih od tog fenotipa te imaju, u usporedbi sa drugim podtipovima, manji pomak u razvitku ciljanih terapija. Trostruko negativni karcinomi dojke su, uglavnom, većih dimenzija od drugih podtipova i većinom su visokog gradusa, s histološkom slikom invazivnoga dukalnoga karcinoma – bez posebnih karakteristika (35, 36). Javljaju se češće u mlađih, premenopauzalnih žena, kao i u žena afričkog, afroameričkog te latinoameričkog podrijetla, a oko 75 % karcinoma dojke dijagnosticiranih u pacijenata s nasljednom BRCA1 mutacijom trostruko je negativnog fenotipa (35, 37). Za razliku od žena koje nisu oboljele od raka dojke, žene kod kojih se razvio trostruko negativni karcinom imale su raniji nastup menarhe i veći *body-mass index* (BMI) u premenopauzalnim godinama, kao i veći paritet (broj porođaja pozitivno korelira s rizikom razvoja TNBC) i kraće vremensko razdoblje dojenja (38, 39). Rizični faktori za trostruko negativni karcinom time se nešto razlikuju od onih uobičajeno vezanih za druge tipove karcinoma dojke te je, primjerice u usporedbi s luminal

A podtipom karcinoma, rizik veći u žena koje su više puta rađale, kao i u onih s povećanim omjerom opsega struka i kukova. Studije su pokazale kako je veća vjerojatnost da će se ovaj podtip otkriti tijekom kliničkog pregleda, nego putem slikovnih metoda dijagnostike (mamografije i ultrazvuka), te je veća vjerojatnost da se prezentiraju kao „intervalni karcinomi“ između dva mamograma; što može biti odraz njihove agresivnosti i rapidnog rasta i/ili intrinzične razlike u gustoći tkiva dojke pacijenata (40–42).

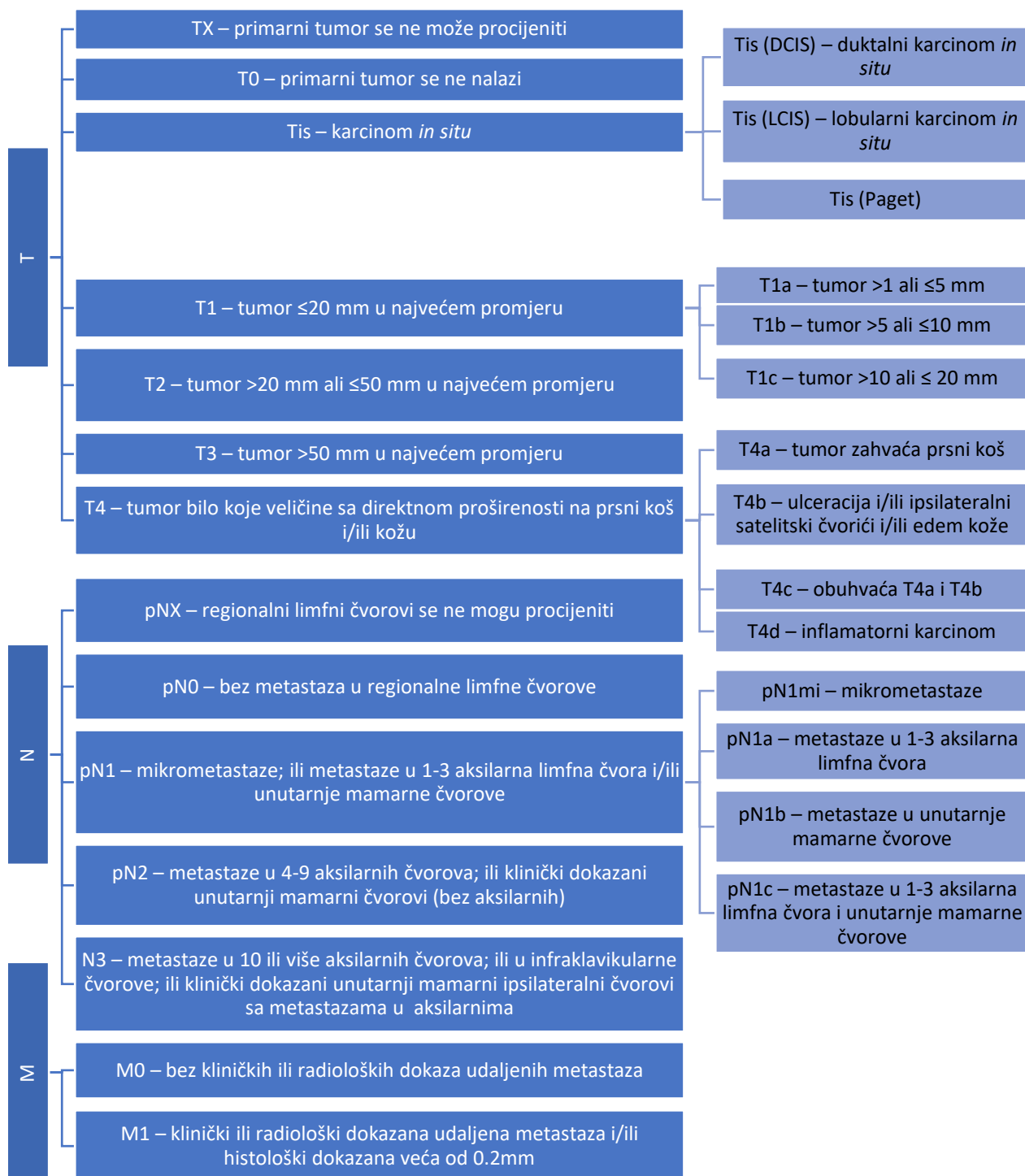
U usporedbi sa drugim podtipovima, trostruko negativni karcinomi dojke pokazuju slabiju diferenciranost, veći mitotski indeks i izraženiji nuklearni pleomorfizam, kao i prisutnost geografske nekroze unutar tumora i stromalni limfocitni odgovor (40). Također, obilježava ih i veća agresivnost i lošiji ishod bolesti (43). Jedna od karakteristika tog podtipa karcinoma je i slaba povezanost veličine tumora sa zahvaćenošću limfnih čvorova; čak i tumori malog promjera pokazuju veliku učestalost zahvaćanja limfnih čvorova (44, 45). Pacijenti oboljeli od trostruko negativnoga karcinoma imaju veći rizik za raniji relaps bolesti, s vrhom povrata bolesti u prve tri godine (35, 42, 46, 47). Faktori koji mogu pridonijeti povratu bolesti su veći promjer tumora, javljanje bolesti u dobi od 35 godina i prije, segmentektomija bez iradijacije te zahvaćenost limfnih čvorova (48). Pojedine studije pokazuju da manji broj žena s trostruko negativnim karcinomom dobije lokalni recidiv prije udaljenog recidiva (42), pa žene s tim fenotipom imaju dvostruko veću vjerojatnost za razvoj udaljenih metastaza. TNBC imaju jedinstveni metastatski uzorak s većom predilekcijom za visceralne metastaze i meka tkiva, uključujući pluća, jetru i moždane metastaze, s manjim brojem koštanih metastaza u odnosu na druge podtipove (49–52). Studije pokazuju kako TNBC imaju najveći rizik za razvoj moždanih metastaza s nižim sveukupnim preživljenjem, u usporedbi s ostalim podtipovima karcinoma (53–55).

Loš ishod bolesti jedno je od glavnih obilježja ove skupine. Pojedina istraživanja su zabilježila značajno povećanje rizika od smrti u prve dvije godine od dijagnoze (56), dok su drugi uspoređivali sveukupno preživljenje (*overall survival – OS*) sa ostalim podtipovima kroz tri godine i pokazali kako trostruko negativni karcinomi imaju gori OS u usporedbi sa svim drugim podtipovima (57). Također, istraživanja su pokazala kako je trogodišnje preživljenje bez povrata bolesti (*disease free survival – DFS*) i sveukupno preživljenje bolesnika oko 60–65 %, odnosno 53–65 % (58, 59), što govori o ranoj i agresivnoj prirodi recidiva bolesti. Loš ishod prikazuju i pojedina istraživanja koja su pokazala kako medijan preživljenja u metastatskog trostruko negativnoga karcinoma iznosi otprilike jednu godinu (60, 61).

Pacijenti oboljeli od trostruko negativnoga karcinoma dojke imaju veliku vjerojatnost dobrog odgovora na kemoterapiju. U dvije neoadjuvantne studije, od kojih je jedna temeljena na antraciklinima, a druga na antraciklinima i taksanima, patološki potpuni odgovor (*pCR – pathologic complete response*) bio je značajno viši u TNBC (25–45 %) nego u luminalnim podtipovima karcinoma (6–7 %) (62, 63). Usprkos višem pCR-u u odnosu na druge podtipove, pacijenti oboljeli od TNBC imali su lošiji DFS i OS, koji su bili uvjetovani visokim stupnjem relapsa u pacijenata s rezidualnom tumorom, dok su oni s pCR bili dobroga stanja. Ukoliko se pokaže da bolest nije kemosenzitivna, pacijenti imaju lošiju prognozu, uzimajući u obzir nedostatak ciljane terapije i oslanjanje samo na kemoterapiju (64). Pacijenti s trostruko negativnim fenotipom, za razliku od pacijenata s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima, i onih s karcinomima dojke koji pokazuju prekomjernu izraženost HER2, nemaju koristi od HER2 ciljane terapije ili endokrine terapije te je potreban razvoj novih terapija kojima bi se te pacijentice liječile (46, 65, 66).

1.4. TNM klasifikacija

TNM sustav je međunarodno priznati sustav kojim se utvrđuje proširenost bolesti, odnosno stadij bolesti (Slika 1.2.). Omogućava procjenu prognoze i ishoda bolesti, procjenjivanje rezultata terapije te uspoređivanje rezultata. U toj klasifikaciji procjenjuje se primarni tumor (T), zahvaćenost limfnih čvorova (N) te eventualna prisutnost udaljenih metastaza (M). Danas se koristi internacionalno prihvaćena klasifikacija koju je izdao *Union for International Cancer Control (UICC)* (67, 68). Klasifikacija uključuje kliničku klasifikaciju, koja služi za odabir lokoregionalne terapije, i patološku klasifikaciju, koja omogućava donošenje odluke o adjuvantnom liječenju.



Slika 1.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke (UICC 8. izdanje, 2016.)

1.5. Prognostički i prediktivni čimbenici

Prognostički čimbenici su klinički ili biološki utjecaj na vrijeme do ukupnog preživljenja ili progresije bolesti. To su mjere povezane s prirodnim tijekom same bolesti, odnosno one dostupne u vrijeme operativnog zahvata pacijentice povezane s preživljenjem u odsutnosti adjuvantne terapije. Koriste se u izboru terapije da bi se identificirale pacijentice s lošom prognozom, što bi opravdalo agresivniji terapijski pristup, odnosno one s dobrom prognozom kod kojih rizik adjuvantne terapije premašuje potencijalnu korist. Prediktivni čimbenici služe u procjeni vjerojatnosti odgovora na određenu vrstu terapije. Pojedini prognostički čimbenici imaju i prediktivnu ulogu, odnosno povezani su s odgovorom na primijenjenu terapiju te omogućuju odabir odgovarajuće terapije za pacijenta.

Prognostički i prediktivni čimbenici mogu se podijeliti u tri skupine: tradicionalni prognostički čimbenici (koji obuhvaćaju dob pacijentice, histološki tip i gradus tumora, veličinu tumora, status aksilarnih limfnih čvorova, limfovaskularnu invaziju), prediktivni čimbenici odgovora na terapiju (koji obuhvaćaju receptore za steroidne hormone i receptore za čimbenike rasta), te molekularni prognostički i prediktivni čimbenici (izraženost ER, PR, HER2 i Ki-67 proliferacijski indeks).

1.5.1. Dob pacijentice

Karcinomi dojke u pacijentice mlađih od 35 godina često su višega histološkoga gradusa, većih dimenzija te pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova. Isto tako, u tim dobnim skupinama, kao i u premenopauzalnih žena, češće se nalazi TNBC koji ima lošiju prognozu bolesti (69).

1.5.2. Histološki tip i gradus tumora

Histološki tipovi karcinoma dojke razlikuju se u tijeku i ishodu bolesti. Duktalni invazivni karcinom ima najlošiju prognozu (desetogodišnje preživljenje 47 %), dok kribriformni, mucinozni i tubularni karcinomi imaju bolju prognozu (70).

Histološki gradus tumora određuje se prema Nottinghamskom sustavu (Tablica 1.1.) te je kao prognostički čimbenik neovisan o statusu limfnih čvorova i veličini tumora, radi čega se primarno koristi za donošenje terapijskih odluka u liječenju pacijenata s graničnom veličinom tumora i negativnim aksilarnim limfnim čvorovima. Tumori višega gradusa imaju lošije desetogodišnje preživljenje (30-78 %) u usporedbi s tumorima niskoga gradusa (90-94 %) (71, 72).

Istraživanja su pokazala da je trostruko negativni karcinom histološki većinom invazivni duktalni karcinom te je u trenutku dijagnoze visokoga gradusa (73–75).

1.5.3. Veličina tumora

Veličina tumora određuje se tijekom patohistološke obrade pristiglog materijala, makroskopskim pregledom i mjerenjem u nativnom stanju; mjeri se u tri dimenzije, a uzima se vrijednost najvećeg promjera. U pozitivnoj je korelaciji s brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova, što ukazuje na lošiju prognozu, povećavajući vjerojatnost povrata bolesti (76). Iako je povezana s brojem zahvaćenih limfnih čvorova, predstavlja i važan samostalni prognostički čimbenik. Što su tumori manji, to imaju bolje petogodišnje preživljenje, te tako tumori manji od 1 cm imaju stopu preživljenja od 99 %, dok kod tumora većih od 5 cm ta stopa iznosi 63 % (77).

Većina pacijenata s trostruko negativnim karcinomom u vrijeme dijagnoze imaju tumor veći od 2 cm (73, 78).

1.5.4. Status aksilarnih limfnih čvorova

Regionalni limfni čvorovi aksile prvo su mjesto metastaziranja karcinoma dojke, a njihova zahvaćenost utvrđuje se mikroskopskim nalazom tumorskih stanica unutar limfnoga čvora. Aksila se može podijeliti u tri etaže, ovisno o odnosu prema malom pektoralnom mišiću. Ukoliko se radi aksilarna disekcija, preporučeno je odstranjivanje 10 i više limfnih čvorova iz prve dvije etaže, kako bi analiza bila kvalitetna (79). Lošijoj prognozi pridonose proboj kapsule limfnog čvora te zahvaćenost druge i treće etaže čvorova (80–82).

Ukupno preživljenje i rizik pojave recidiva ovise i o broju zahvaćenih limfnih čvorova. Pacijentice s negativnim limfnim čvorovima imaju petogodišnje preživljenje bez bolesti preko 80 %, a ukoliko su čvorovi pozitivni, preživljenje je ispod 65 %, dok je desetogodišnje preživljenje

u pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima 25–30 %, a u onih s negativnim limfnim čvorovima 75 % (79, 83).

Istraživanja pokazuju kako u trenutku dijagnoze gotovo polovica pacijenata s trostruko negativnim karcinomom dojke imaju zahvaćene aksilarne limfne čvorove (58, 73).

1.5.5. *Limfovaskularna invazija*

Limfovaskularna invazija označava prisutnost tumora unutar limfnih i krvnih žila i ide u prilog lošijoj prognozi. Prisutnost se određuje u tkivu dojke izvan glavne tumorske mase, a nalazi se u oko 15 % intraduktalnih karcinoma i 5–10 % pacijentica s negativnim limfnim čvorovima (84–86).

Pojedina istraživanja pokazuju kako je limfovaskularna invazija rjeđa u trostruko negativnih karcinoma, u usporedbi s drugim podtipovima karcinoma dojke (56, 58).

1.5.6. *Status hormonskih receptora i HER2 ekspresije*

Estrogenski i progesteronski receptori su termolabilni proteini koji se nalaze u jezgrama tumorskih stanica i u normalnim epitelnim stanicama. Oko 50-85 % karcinoma dojke izražava hormonske receptore, a s porastom dobi pacijentica povećava se i udio tumora pozitivnih na ER (82, 87, 88). Prisutnost ER i PR je i prognostički i prediktivni čimbenik karcinoma dojke, s naglaskom da veće značenje ima kao prediktivni čimbenik (procjena vjerojatnosti odgovora na određenu terapiju) (89). Tumori s višom razinom hormonskih receptora jače će odgovoriti na hormonsku terapiju od onih s nižim razinama, dok estrogen receptor negativni tumori bolje reagiraju na kemoterapiju u odnosu na estrogen receptor pozitivne tumore. Tumori s pozitivnim ER i PR odgovaraju na hormonsku terapiju u 78 % slučajeva, ER pozitivni i PR negativni tumori u 34 % slučajeva, a ER negativni i PR pozitivni tumori u 45 % slučajeva.

Pacijentice s pozitivnim estrogenskim receptorima imaju produženi DFS nakon primarne terapije kao i veće ukupno preživljenje, u usporedbi s ER negativnim tumorima, a neovisno o statusu limfnih čvorova (82).

HER2 receptor je transmembranski protein koji sudjeluje u nadzoru staničnoga rasta. Prekomjerna ekspresija nalazi se u 15–25 % invazivnih karcinoma dojke, kao i u slabije diferenciranim, većim tumorima. Povezana je s lošijom prognozom u pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima, agresivnijim kliničkim tijekom i većim rizikom za razvoj metastaza. HER2 pozitivne pacijentice imaju koristi od terapije trastuzumabom (90–95).

1.5.7. Proliferacijski indeks (Ki-67)

Ki-67 je nuklearni protein koji ima važnu ulogu u staničnoj diobi te se nalazi u svim fazama staničnog ciklusa (osim u G₀ fazi). U normalnom tkivu dojke ekspresija Ki-67 nalazi se u manje od 3 % stanica, dok se u tumorskom tkivu može naći i više od 90 % (96, 97). Prema St. Gallen konsenzusu iz 2013. godine granična vrijednost (*cut off*) za visoki Ki-67 iznosi 20 %, što je i indikacija za kemoterapiju (98).

Viša ekspresija Ki-67 nalazi se u slabije diferenciranim tumorima te tumorima s negativnim hormonskim receptorima, i povezana je s lošijom prognozom u pacijentica oboljelih od karcinoma dojke (99, 100).

1.6. Folatni receptor alfa (FR α)

Folati, vitamin B9, nužni su za biosintezu baza nukleotida, aminokiselina i drugih metiliranih staničnih spojeva te su potrebni u većim količinama u stanicama koje se umnažaju. Ključna uloga folata u rastu, proliferaciji i preživljenju stanica odražava njihovu važnost u rastu tumorskih stanica.

Folati iz hrane apsorbiraju se u tankom crijevu, metaboliziraju u jetri u 5-metiltetrahidrofolat (glavni cirkulirajući oblik folata) te cirkuliraju krvotokom, odakle dolaze do raznih tkiva i organa (101). Prenose se kroz staničnu membranu na tri načina – putem proton-vezanoga folatnog transportera (*proton-coupled folate transporter – PCFT*) koji iskorištava transmembranski gradijent protona za transport folata u stanice i odgovoran je za intestinalnu apsorpciju pri kiselom pH u proksimalnom dijelu tankog crijeva, zatim putem reduciranoga

folatnog nosača (*reduced folate carrier – RFC*) koji je široko rasprostranjen i primarni je put unosa reduciranog folata pod fiziološkim pH, te, obzirom da folati ne mogu izravno penetrirati staničnu membranu zbog svoje hidrofobne anionske prirode, procesom endocitoze putem folatnih receptora (102–105). Folatni receptori (FR) su glikozilfosfatidilinozitol usidreni membranski proteini s afinitetom za vezanje folne kiseline. Od četiri poznate izoforme (α , β , γ i δ), FR α i FR β imaju najveći afinitet za vezanje folata. Stanice koje imaju izraženi FR α , P15328 (FOLR1_HUMAN) (106), na svojim membranama su efikasnije u unosu folata, od onih s drugim izoformama receptora (107, 108). FR α ima visok afinitet za reducirane folate (kao što su 5-metiltetrahidrofilat i tetrahidrofolat) i folnu kiselinu. Vezanje tih folata na receptor potiče stvaranje receptor-ligand kompleksa u staničnoj membrani, koji se potom invaginira, procesom koji se naziva potocitoza, što rezultira inkorporacijom kompleksa u vezikule. Vezikule se potom spajaju s lizosomima i acidificiraju, time otpuštajući folat (109, 110). Ekspresija tog receptora je, u normalnim tkivima i organima, ograničena na samo nekoliko organa, koji uključuju bubrege, crijeva, pluća, koroidni plexus i placentu, gdje je ograničena na apikalnu površinu epitelnih stanica (111, 112).

Brojna istraživanja su pokazala kako je FR α prekomjerno ekspimiran u različitim tumorima, uključujući tumore ovarija, bubrega, pluća, endometrija, mokraćnog mjehura, kolorektalne tumore, kao i u tumorima dojke (112–118).

FR α je prekomjerno ekspimiran u 80 % epitelnih karcinoma ovarija. Pojedine studije su pokazale kako ta ekspresija značajno korelira s histološkim gradusom i stadijem te tako u nemucinoznih karcinoma ovarija značajno korelira s visokim gradusom i pridonosi lošijoj prognozi (119, 120).

Kod karcinoma pluća, adenokarcinom i pločasti karcinom pokazuju visoku razinu ekspresije FR α . Za razliku od ovarijalnih karcinoma, pokazalo se da je kod tih karcinoma ona povezana s poboljšanim sveukupnim preživljenjem kod pacijenata s resekiranim adenokarcinomom (121). Druge studije su pokazale da dobro diferencirani karcinomi pluća, u ranom stadiju bolesti, imaju višu razinu ekspresije FR α , u usporedbi sa slabije diferenciranim karcinomima uznapređovalog stadija te da visoke razine ekspresije koreliraju sa značajno višim trogodišnjim preživljenjem bez povrata bolesti (122).

Pojedina istraživanja pokazuju kako prekomjerna ekspresija FR α može pridonijeti rastu tumora, povećavajući unos folata u stanice (i time potičući ubrzan stanični rast i dijeljenje) i može utjecati na staničnu proliferaciju putem staničnih signalnih puteva (107, 123).

Istraživanja su inkonzistentna kad je u pitanju povezanost unosa folata i rizika za razvoj karcinoma dojke. Dok je jedno istraživanje pokazalo da je unos folata povezan sa smanjenim rizikom za razvoj karcinoma dojke u premenopauzalnih žena (124), druga su pokazala obratnu povezanost, ograničenu na postmenopauzalne žene (125–127). Zaštitni učinci nadomjesnih pripravaka folne kiseline mogu se objasniti činjenicom da više folne kiseline povećava popravak DNA (*eng. deoxyribonucleic acid*) u zdravim tkivima i time sprječava razvoj raka, dok se poticanje tumorskog rasta objašnjava time što visoke razine replikacije DNA u tkivu tumora zahtijevaju velike količine folata za kontinuirani rast tumora (128).

Studije pokazuju da ekspresija FR α negativno korelira s ekspresijom ER i HER2 u karcinomu dojke i, s obzirom na molekularni podtip karcinoma dojke, trostruko negativni karcinomi pokazuju veću ekspresiju FR α u odnosu na druge podtipove (129, 130). S druge strane, istraživanja su inkonzistentna kad je riječ o povezanosti ekspresije s kliničko-patološkim karakteristikama, poput dobi, spola, stadija tumora i statusa limfnih čvorova. Dok jedna pokazuju da povezanosti nema, druga su prikazala da je ekspresija jako povezana s većom zahvaćenošću limfnih čvorova (129–131).

Ograničena raspodjela FR α i specifična ekspresija u pojedinim malignim tumorima čini taj receptor zanimljivom metom za usmjerene terapije, kako za druge tumore tako i za trostruko negativni karcinom dojke koji, za razliku od ostalih podtipova, nema koristi od endokrine i HER2 ciljane terapije. Nekoliko je razloga zašto se upravo taj receptor razmatra kao moguća antikancerogena terapija. Ta izoforma receptora ima minimalnu fiziološku ulogu u nemalignim tkivima nakon embriogeneze, a eksprimirana je u brojnim tumorskim tkivima. Također, ima visok afinitet za nefiziološke supstrate, poput folne kiseline, u usporedbi s drugim transporterima folata, omogućavajući time razvoj konjugata folne kiseline. Naposljetku, FR α može utjecati na dijeljenje i migraciju tumorskih stanica pa inhibicija tih receptora pruža određeni stupanj izravnog djelovanja na tumore (132).

2. HIPOTEZA

Ekspresija folatnog receptora alfa u trostruko negativnih karcinoma dojke povezana je s pojedinim kliničko-patološkim karakteristikama tumora i može se koristiti kao prognostički čimbenik kod pacijenata oboljelih od navedenog podtipa karcinoma.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja kojima će se potvrditi ili odbaciti predložena hipoteza:

Primarni cilj:

- Pomoću *H-score* metode utvrditi ekspresiju folatnog receptora alfa u trostruko negativnim karcinomima dojke.

Sekundarni ciljevi:

- Dodatno ispitati skupinu trostruko negativnih karcinoma dojke.
- Utvrditi povezanost ekspresije folatnog receptora alfa u trostruko negativnih karcinoma dojke s kliničko-patološkim parametrima koji obuhvaćaju:
 - Dob pacijentice u trenutku dijagnoze
 - Lokalizacije primarnog tumora (lijeva/desna dojka)
 - Histološki izgled tumora
 - Histološki gradus tumora
 - Ki-67 proliferacijski indeks
 - Veličinu tumora
 - Stupanj proširenosti/zahvaćenost limfnih čvorova
 - Limfovaskularnu invaziju.
- Ispitati prognostičku vrijednost folatnog receptora alfa, odnosno:
 - povezanost ekspresije s povratom bolesti – interval bez karcinoma dojke
 - povezanost ekspresije sa sveukupnim preživljenjem.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije i ispitanici

Provedena je retrospektivna studija na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu i Zavodu za onkologiju Kliničkoga bolničkog centra Osijek (KBCO). Studijom su obuhvaćena 92 pacijenta koji su operirani na Klinici za kirurgiju KBCO te im je patohistološki utvrđena dijagnoza invazivnoga karcinoma dojke. Razdoblje studije obuhvaća razdoblje od siječnja 2008. do prosinca 2016. godine.

Kriteriji za uključivanje u studiju su novodijagnosticirani invazivni karcinom dojke, gradusa I do III, koji je imunohistokemijskom dijagnostikom svrstan u trostruko negativne karcinome, u pacijenata oba spola i svih dobni skupina, neovisno o reproduktivnoj dobi u žena. Uključeni su oni pacijenti koji su podvrgnuti kirurškoj terapiji zbog navedenoga karcinoma, kao i oni kojima je navedeni tumor dojke primarni karcinom, neovisno o postojanju sinkrone ili metakrone neoplazme drugoga primarnog sijela.

Kriteriji za isključivanje obuhvaćaju pacijente s prije poznatom malignom bolesti dojke, druge fenotipove karcinoma dojke, pacijente u kojih je nepoznat status ER, PR i HER2 te pacijente koji su u trenutku operacije imali dokaz postojanja udaljenih metastaza.

Materijali korišteni za studiju su arhivski uzorci Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBCO, koji obuhvaćaju parafinske kocke i imunohistokemijska te hemalauneozinska stakla. Relevantni podatci o pacijentima, pojavi prve metastaze i preživljenju prikupljeni su iz povijesti bolesti Zavoda za onkologiju KBCO te iz arhivskih nalaza Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBCO. Prikupljeni su podatci o spolu pacijenata, dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze trostruko negativnoga karcinoma dojke, lokalizaciji primarnog tumora (desna, odnosno lijeva dojka), postojanju *core* biopsije koja je prethodila operaciji, vrsti operacije koja je provedena (mastektomija, odnosno kvadrantektomija), histološkom tipu i gradusu tumora, veličini tumora, limfovaskularnoj invaziji, statusu aksilarnih limfnih čvorova, vrijednosti Ki-67 proliferacijskog indeksa, prisutnosti i lokalizaciji prvog povratka bolesti te svih sljedećih povratka bolesti, kao i podatak o vremenu koje je proteklo od dijagnoze bolesti do povratka bolesti, odnosno o vremenu koje je proteklo do smrtnog ishoda, ukoliko je isti nastupio.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (URBROJ: 2158-61-07-20-07).

4.2. Metode

Analizirani materijal dobiven je u navedenom razdoblju mastektomijom ili kvadrantektomijom te je rutinski obrađen: uklopljen u parafinske blokove i bojan standardnim bojenjem, hemalaun-eozinom. Također je obrađen i standardnim imunohistokemijskim bojenjem na estrogenske i progesteronske receptore, HER2 i Ki-67. Histološki tip i gradus tumora određeni su prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (Slika 1.1.), odnosno prema Nottinghamskom sustavu gradiranja (Tablica 1.1.).

S obzirom na veličinu tumora, a prema TNM klasifikaciji, tumori su svrstani u sljedeće skupine: $\leq 0,5$ cm (T1a), $>0,5$ ali ≤ 1 cm (T1b), >1 ali ≤ 2 cm (T1c), > 2 ali ≤ 5 cm (T2) i > 5 cm (T3). Prema status limfnih čvorova tumori su svrstani u one s negativnim limfnim čvorovima (pN0) i one s pozitivnima, koji su dalje podijeljeni, s obzirom na broj pozitivnih čvorova, kako slijedi: 1–3 (pN1), 4–9 (pN2) i ≥ 10 (pN3).

Limfovaskularna invazija je označena kao prisutna, odnosno odsutna ukoliko se nije našla.

Za ispitivanje povezanosti ekspresije $FR\alpha$ s povratom bolesti koristio se interval bez karcinoma dojke (*breast cancer-free interval – BCFI*) koji obuhvaća razdoblje od operacije do pojave ipsilateralnoga, kontralateralnoga, regionalnog (zahvaćanje torakalne stijenke, kože i regionalnih limfnih čvorova) i udaljenog recidiva, odnosno metastaze (koja je potvrđena biopsijom ili klinički dijagnosticirana kao povrat invazivnoga karcinoma dojke) invazivne bolesti. Sveukupno preživljenje obuhvaća razdoblje od operacije do smrtnog ishoda (smrt uzrokovana karcinomom dojke, smrt zbog drugog uzroka, i smrt zbog nepoznatog uzroka) (133).

Evaluacija hormonskih receptora, HER2 i Ki-67 proliferacijske aktivnosti učinjena je prema standardnom protokolu: tkivo je bilo fiksirano u 10 % puferiranom formalinu potom uklopljeno u parafinske blokove i rezano na debljinu do 4 μ m. Zatim je slijedila deparafinizacija i bojenje hemalaun-eozininom (H-E). Dalje je provedeno imunohistokemijsko bojenje estrogenskih receptora (Confirm anti-estrogene receptor – clone SP1), progesteronskih receptora (Confirm anti-

progesterone Receptor – clone 1E2), Ki-67 proliferacijskog indeksa (Confirm anti-Ki-67 – clone 30-9) i HER2 receptora (Pathwayanti HER-2/neu (clone 4B5)) (VENTANA, Rosche). Izdvojeni su tumori koji, sukladno St. Gallenskom konsenzusu (Tablica 1.2.) imaju trostruko negativni fenotip. Proliferacijski indeks Ki-67 označen je kao nizak za vrijednosti $<20\%$ te visok, $\geq 20\%$. Za potrebe ove studije vrijednosti označene kao visoke podijelile su se u slijedeće skupine: $\geq 20-50\%$, $\geq 50-80\%$ i $\geq 80-100\%$.

Imunohistokemijska analiza folatnog receptora alfa učinjena je uporabom poliklonalnoga zečjeg protutijela *Folate Receptor alpha Polyclonal AntibodyC*, proizvođača ThermoFisher scientific, kataloški broj PA5-42004, na uređaju Ventana BenchMark Ultra. Iz arhiviranih parafinskih kocaka učinili su se rezovi debljine 4- μm , koji su se potom deparafinizirali u ksilolu na temperaturi od 72 °C. Nakon toga slijedilo je ispiranje u trajanju od 20 minuta sa CC1 – Cell Conditioner 1 (po sastavu Tris/borat/pufer, pH – 8,4). Slijedila je primjena Universal DAB inhibitora (3 % H₂O₂), 5 minuta na 37°C, čime su se inhibirale endogene peroksidaze iz tkiva, a zatim ispiranje reakcijskim puferom, koji je po sastavu Tris pufer (pH – 7,6), u trajanju od 10 minuta. Nakon toga slijedila je enzimatska digestija primjenom HRP multimer, s inkubacijom od 4 minute na 37 °C, čime su se otkrili epitopi u tkivu, te ispiranje na sobnoj temperaturi, u trajanju od 10 minuta, u reakcijskom puferu. Nakon ispiranja u reakcijskom puferu primijenilo se primarno protutijelo Folate Receptor alpha, u razrjeđenju 1:80, 60 minuta na 37 °C. Nakon primarnog protutijela slijedila je inkubacija s ULTRA Conditionerom, u trajanju od 1 do 8 minuta na temperaturi od 95 °C, a potom 36 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon toga primjenio se Ultra View DAB Copper (CuSO₄), kako bi se markirala mjesta u tumoru gdje je došlo do vezivanja antigen-antitijelo, od 5 minuta na 37 °C. Potom se 10 minuta ispiralo u reakcijskom puferu, na temperaturi 37 °C, nakon čega je slijedio Ultra Counterstain (pH 7,8), 5 minuta na 37 °C. Nakon što se uzorak isperao u reakcijskom puferu (10 minuta na 37 °C) slijedilo je bojanje hematoxylinom, u trajanju od 12 minuta, na sobnoj temperaturi. Potom se još jednom ispirao reakcijskim puferom, na sobnoj temperaturi, 5 minuta, a zatim impregnirao u uljnoj otopini koja sprječava isušivanje tkiva i isparavanje reagensa, osigurava potpunu zaštitu i prekrivenost stakla – ULTRA LCS (Ultra liquid Coverslip). Slijedilo je 5 minuta manualnog ispiranja stakalaca u mlakoj vodovodnoj vodi te manualno dehidriranje stakalaca u koncentracijama alkohola od 70 % –100 %, u svakoj koncentraciji po 2–4 minute. Potom se radilo bistrenje preparata u Supstitutu Xylena, (proizvođač Sakura), u trajanju od 5 minuta te naposljetku pokrivanje na automatskom pokrivaču

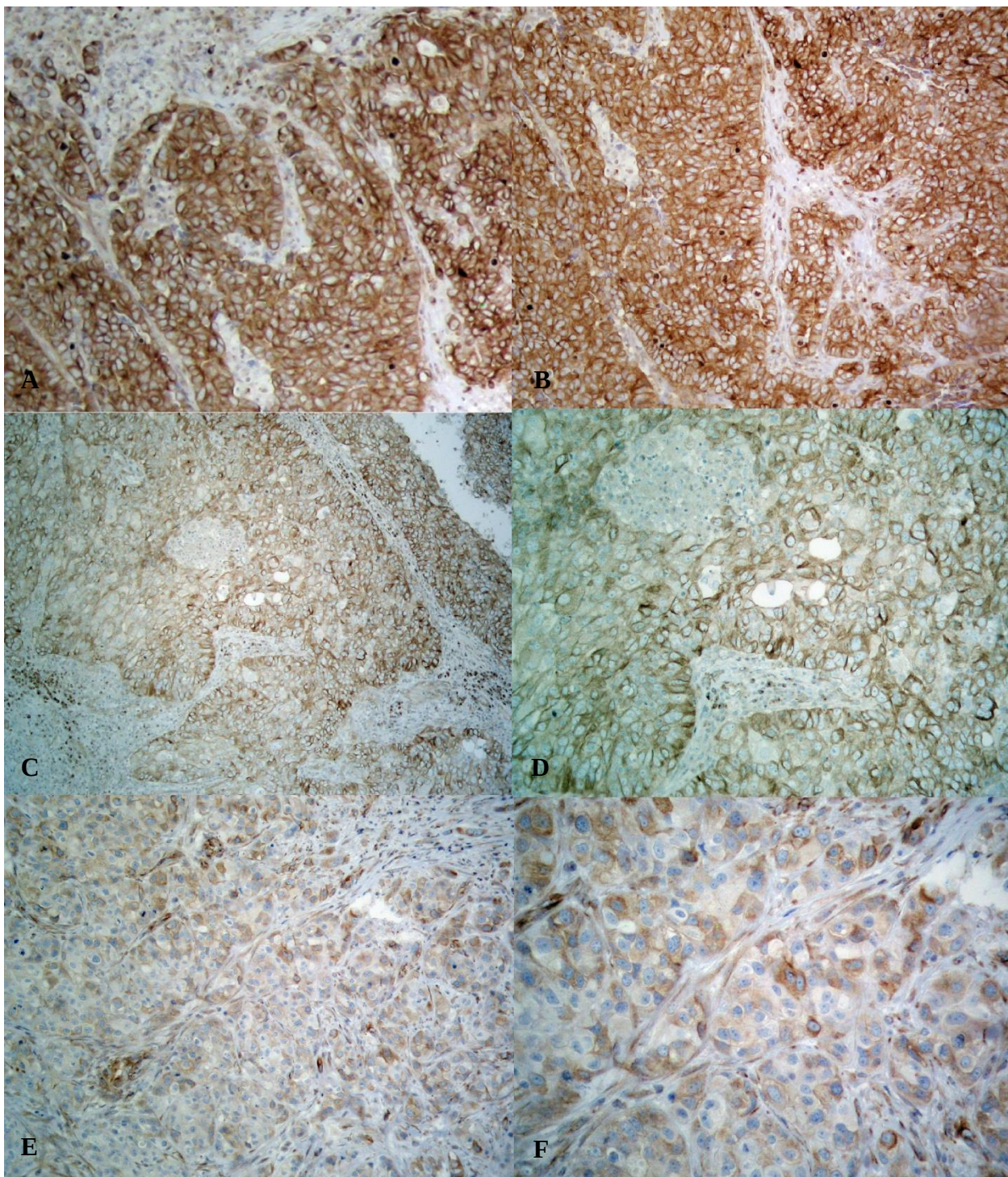
Sakura. Za kontrolu uzoraka koristile su se pozitivna (serozni papilarni karcinom jajnika) i negativna kontrola (tkivo jetre).

Uzorci su mikroskopski pregledani te su ih evaluirala dva neovisna patologa, bez saznanja o kliničko-patološkim podacima pacijenata.

Za određivanje ekspresije folatnog receptora koristila se *H-score* metoda koja povezuje intenzitet bojenja i postotak pozitivno obojanih stanica. Intenzitet bojenja označava se s 0, 1+, 2+ i 3+, što odgovara negativnoj, slaboj, srednjoj, odnosno jakoj obojanosti. Prebroji se ukupan broj stanica u vidnom polju i broj obojanih stanica svakog intenziteta te se izračuna postotak obojanih stanica. Nakon toga primjeni se formula: $H\text{-score} = (\% \text{ obojanih stanica intenziteta bojenja } 1+ \times 1) + (\% \text{ obojanih stanica intenziteta bojenja } 2+ \times 2) + (\% \text{ obojanih stanica intenziteta bojenja } 3+ \times 3)$. Dobije se H-score u vrijednosti 0–300 pri čemu 300 odgovara nalazu 100 % tumorskih stanica intenzivno obojanih (3+) (129, 134).

Kao pozitivan rezultat ocijenilo se membransko bojenje, neovisno o intenzitetu bojenja. Uzorci su analizirani pod objektivima povećanja 4x, 10x, 20x i 40x. Bojenje 3+ uočilo se kao intenzivno membransko bojenje, odmah vidljivo na povećanju 4x i potvrđeno na povećanju 10x. Umjereno membransko bojenje 2+ bilo je slabijeg intenziteta i tanje od 3+ bojenja, vidljivo na povećanju 10x i potvrđeno na povećanju 20x, a slabo membransko bojenje 1+ zahtijevalo je povećanje od 20x i/ili 40x te se očitovalo kao izrazito slabo, tanko membransko bojenje (Slika 4.1.).

Za potrebe ove studije dobivene vrijednosti su se, nakon statističke analize samoga H-scorea, podijelile na folatni receptor alfa negativne (za vrijednosti H-scorea <10) i pozitivne, a pozitivne vrijednosti ekspresije folatnog receptora alfa dodatno su se podijelile u grupe kako slijedi: niska (10–100), srednja (101–200) i visoka (201–300).



Slika 4.1. Ekspresija folatnog receptora alfa (A) 3+, povećanje 10x; (B) 3+, povećanje 20x; (C) 2+, povećanje 10x; (D) 2+, povećanje 20x; (E) 1+, povećanje 20x; (F) 1+, povećanje 40x

4.3. Statističke metode

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U testom, a između tri i više skupina Kruskal-Wallisovim testom (Post hoc Conover).

Ocjena povezanosti dana je Pearsonovim koeficijentom korelacije (r). Vrijeme preživljenja računalo se u mjesecima, počevši od dana operativnog zahvata. Kaplan-Meierove krivulje doživljenja uspoređivane su log-rank testom. Coxova multivarijatna regresijska analiza (*Stepwise metoda*) korištena je u svrhu predviđanje vjerojatnost negativnog ishoda i relapsa, a izražena je omjerom rizika (OR) i 95 % intervalom pouzdanosti (95 % CI). ROC analiza (engl. *Receiver Operating Characteristic*) primijenila se za određivanje optimalne granične vrijednosti folatnog receptora alfa, površine ispod ROC krivulje (engl. *area under the curve*, *AUC*), specifičnosti, osjetljivosti ispitivane varijable u slučaju negativnog ishoda, pojave metastaza i/ili recidiva. Sve P vrijednosti su dvostrane.

Razina značajnosti postavljena je na $\text{Alpha} = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software version 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018) i IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.)

5. REZULTATI

5.1. Osnovna obilježja ispitanica

Istraživanje je provedeno na 92 ispitanice oboljele od karcinoma dojke. Medijan dobi je 58 godina (interkvartilnog raspona od 49 do 68 godina) u rasponu od 31 do 89 godina. Samo dvije ispitanice su s dijagnozom *Carcinoma lobulare invasivum*, a sve ostale, njih 90 (98 %) s dijagnozom *Carcinoma ductale invasivum*. Kod 6 (7 %) ispitanica obavljena je core biopsija, a prema vrsti operacije mastektomija je učinjena kod 62 ispitanice (67 %), dok kod jedne ispitanice postupak nije zabilježen. U odnosu na histološki gradus 65 ispitanica je gradusa III (71 %), prisutnu limfovaskularnu invaziju imalo je 20 ispitanica (22 %), a kod 36 (39 %) uočena je zahvaćenost limfnih čvorova aksile (Tablica 5.1).

Tablica 5.1. Raspodjela ispitanica prema osnovnim obilježjima

	Broj (%)
Zahvaćena dojka	
Desna	43 (47)
Lijeva	49 (53)
Dijagnoza	
Carcinoma ductale invasivum	90 (98)
Carcinoma lobulare invasivum	2 (2)
Core biopsija	
Da	6 (7)
Ne	86 (93)
Operacija	
Mastektomija	62 (67)
Kvadrantektomija	29 (32)
Histološki gradus tumora	
I	1 (1)
II	26 (28)
III	65 (71)
Limfovaskularna invazija	
Prisutna	20 (22)
Nije prisutna	72 (78)
Zahvaćenost limfnih čvorova	
Da	36 (39)
Ne	52 (57)
Nepoznato	4 (4)

Tijekom operacije izvađeno je od 1 do 29 čvorova, od kojih je pozitivnih bilo u rasponu od 0 do 22. Medijan promjera tumora je 2,1 cm (interkvartilnog raspona od 1,7 cm do 3,5 cm) u rasponu od 0,5 cm do 7,3 cm (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Broj izvađenih i pozitivnih čvorova i veličina tumora

	Medijan (interkvartilni raspon)	Minimum – maksimum
Ukupno izvađeno čvorova	14 (10–19)	1–29
Broj pozitivnih čvorova	0 (0–2)	0–22
Veličina tumora (promjer u cm)	2,1 (1,7–3,5)	0,5–7,3

Vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67 kreću se od 2 do 95, a H-scorea od 0 do 300 (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Vrijednosti proliferacijskog indeksa i H-scorea

	Medijan (interkvartilni raspon)	Minimum – maksimum
Proliferacijski indeks Ki-67 (%)	70 (45–80)	2–95
H-score	100 (35–188,75)	0–300

Prema statusu limfnih čvorova najviše ispitanica, njih 52 (57 %) ima negativne limfne čvorove, dok ih 7 (8 %) ima pozitivno 4–9 limfnih čvorova, a njih 5 (5 %) ima 10 i više pozitivnih čvorova. S obzirom na veličinu tumora 38 (41 %) ispitanica ima tumor veći od 2 cm, ali manji ili jednak 5 cm, a njih 36 (39 %) tumor veći od 1 cm, ali manji ili jednak 2 cm. Devet (10 %) ispitanica ima tumor veći od 5 cm. Visok proliferacijski indeks Ki-67 uočen je kod 85 (92 %) ispitanica, od kojih njih 39 (46 %) ima vrijednost Ki-67 jednaku 50 i više, a manje od 80.

S obzirom na vrijednost folatnog receptora alfa (FR α), pozitivan FR α je uočen kod 78 (85 %) ispitanica, od kojih niže vrijednosti (10–100) imaju 33 (42 %) ispitanice, a visoko pozitivne vrijednosti (201–300) ima 15 (19 %) ispitanica (Tablica 5.4.).

Tablica 5.4. Raspodjela ispitanica prema statusu limfnih čvorova, veličini tumora, proliferacijskom indeksu i folatnom receptoru alfa

	Broj (%)
Status limfnih čvorova	
0	52 (57)
1a	24 (26)
2a	7 (8)
3a	5 (5)
Nepoznato	4 (4)
Veličina tumora (cm)	
1a ($\leq 0,5$ cm)	1 (1)
1b ($>0,5$ ali ≤ 1 cm)	7 (8)
1c (>1 ali ≤ 2 cm)	36 (39)
2 (> 2 ali ≤ 5 cm)	38 (41)
3 (> 5 cm)	9 (10)
Nepoznato	1 (1)
Proliferacijski indeks Ki-67	
Nizak (< 20 %)	7 (8)
Visok (≥ 20 %)	85 (92)
Visok proliferacijski indeks Ki-67	
≥ 20 do < 50	18 (21)
≥ 50 do < 80	39 (46)
≥ 80 do 100	28 (33)
Folatni receptor alfa (FRα)	
Negativan	14 (15)
Pozitivan	78 (85)
Pozitivan folatni receptor alfa (FRα)	
nisko (10–100)	33 (42)
srednje (101–200)	30 (39)
visoko (201–300)	15 (19)

Recidiv je zabilježen kod 3 (3 %) ispitanice (16, 91 i 93 mjeseca nakon operacije), a prve udaljene metastaze kod 16 (17,4 %) ispitanica, medijana 12,5 mjeseci (interkvartilnog raspona od

8 do 18 mjeseci) u rasponu od jednog do 55 mjeseci. Druge udaljene metastaze javile su se kod tri ispitanice u vremenu od 14, 20 i 29 mjeseci.

Prve udaljene metastaze javile su se kod 5 (5,4 %) ispitanica na plućima, 4 (4,3 %) ispitanice imale su prve udaljene metastaze na ostalim limfnim čvorovima (izuzev aksilarnih) ili na jetri, 3 (3,3 %) ispitanice na skeletu ili mozgu, a dvije (2,2 %) na koži. Ostale udaljene metastaze imale su dvije (2,2 %) ispitanice na mozgu i jedna na skeletu (Tablica 5.5.).

Tablica 5.5. Učestalost prvih i ostalih udaljenih metastaza

	Broj (%)
Prve udaljene metastaze	
Pluća	5 (5,4)
Ostali limfni čvorovi	4 (4,3)
Skelet	3 (3,3)
Mozak	3 (3,3)
Jetra	4 (4,3)
Koža	2 (2,2)
Ostale udaljene metastaze	
Mozak	2 (2,2)
Skelet	1 (1,1)

5.2. Povezanost H-scorea s obilježjima ispitanica

Iako su vrijednosti H-scorea značajno više kod ispitanica s dijagnozom *Carcinoma lobulare invasivum* moramo uzeti u obzir da je riječ o samo dvije ispitanice.

Ispitanice s većim histološkim gradusom (III) imaju značajno niže vrijednosti H-scorea (Mann Whitney U test, $P = 0,03$), u odnosu na ispitanice s gradusom II .

S obzirom na lokalizaciju primarnoga karcinoma (desna/lijeva dojka), limfovaskularnu invaziju, zahvaćenost čvorova i proliferacijski indeks, nema značajnih razlika u vrijednosti H-scorea.

Ako gledamo pojavnost relapsa, bilo u vidu lokalnog recidiva ili udaljenih metastaza, značajno više vrijednosti H-scorea, medijana 127,5 (interkvartilnog raspona od 90 do 215) imaju ispitanice

koje su imale metastaze i/ili recidiv (relaps) u odnosu na one kod kojih relaps nije zabilježen (Tablica 5.6.).

Tablica 5.6. Razlike u H-scoreu prema obilježjima ispitanica

	Medijan (interkvartilni raspon) H-skora	Hodges- Lehmann razlika	95 % CI	P*
Dijagnoza				
<i>Carcinoma ductale invasivum</i>	100 (35–180)	197,5	-	0,02
<i>Carcinoma lobulare invasivum</i>	295 (290–300)			
Dojka				
Desna	105 (36,3–167,5)	5,0	-29 do 50	0,68
Lijeva	100 (30,3–196,3)			
Histološki gradus				
I (n=1)	290	-50	-100 do 0	0,03
II	145 (80–215)			
III	90 (31,25–148,75)			
Limfovaskularna invazija				
Prisutna	62,5 (0–130)	35	0 do 85	0,09
Nije prisutna	112,5 (40–190)			
Zahvaćenost čvorova				
Da	92,5 (15,5–192,5)	0	-35 do 45	0,86
Ne	97,5 (37,5–165)			
Ki-67				
Nizak (< 20 %)	200 (85–280)	-80	-165 do 0	0,06
Visok (≥ 20 %)	100 (31,25–176,25)			
Relaps				
Ne	85 (15,5–177,5)	55	0 do 95	0,04
Da	127,5 (90–215)			

*Mann Whitney U test

Pearsonovim koeficijentom korelacije (r) ocijenili smo povezanost H-scorea s dobi, brojem pozitivnih čvorova, veličinom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67 i uočili da je H-score značajno povezan s Ki-67, odnosno da je uz više vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67, H-score poprima niže vrijednosti ($r = -0,284$ $P = 0,006$).

Više vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67 prisutne su kod većeg promjera tumora ($r = 0,210$ $P = 0,04$) i obratno (Tablica 5.7.).

Tablica 5.7. Međusobna povezanost dobi, broja pozitivnih čvorova, veličine tumora, proliferacijskog indeksa i H-scorea (Pearsonov koeficijent korelacije)

	Dob ispitanica	Broj pozitivnih čvorova	Veličina tumora	Ki-67 (%)
Dob ispitanica	-			
Broj pozitivnih čvorova	-0,106 (0,33)	-		
Veličina tumora (cm)	0,019 (0,86)	0,082 (0,45)	-	
Ki-67 (%)	-0,117 (0,27)	-0,042 (0,70)	0,210 (0,04)	-
H-score	0,128 (0,22)	0,203 (0,06)	-0,030 (0,77)	-0,284 (0,006)

Ispitanice s više pozitivnih čvorova, s manjim promjerom tumora i manjim proliferacijskim indeksom imaju više vrijednosti H-scorea, u odnosu na ispitanice s manje pozitivnih čvorova, većim tumorom i većim proliferacijskim indeksom, ali bez statističke značajnosti (Tablica 5.8.).

Tablica 5.8. Vrijednosti H-scorea prema statusu limfnih čvorova, veličini tumora i proliferacijskom indeksu

	Medijan (interkvartilni raspon) H-scorea	P*
Status limfnih čvorova		
0	97,5 (37,5–165)	0,42
1a	77,5 (14–122,5)	
2a	145 (33,75–216,25)	
3a	170 (83,75–208,75)	
Veličina tumora (cm)		
1a ($\leq 0,5$ cm) (n = 1)	160	0,67
1b ($>0,5$ ali ≤ 1 cm)	160 (39–285)	
1c (>1 ali ≤ 2 cm)	97,5 (11–187,5)	
2 (> 2 ali ≤ 5 cm)	97,5 (40–175)	
3 (> 5 cm)	90 (58,75–173,75)	
Proliferacijski indeks Ki-67		
nizak < 20 %	200 (80–290)	0,06 [†]
visok ≥ 20 %	100 (28–178)	
Visok proliferacijski indeks Ki-67		
≥ 20 do < 50	145 (13–225)	0,47
≥ 50 do < 80	100 (23,75–188,75)	
≥ 80 do 100	90 (35–142,5)	

*Kruskal Wallisov test (PostHoc Conover); [†]Mann Whitney U test

Napravimo li podjelu H-scorea na pozitivan ili negativan folatni receptor alfa, nismo uočili značajne razlike u raspodjeli ispitanica s obzirom na dijagnozu, histološki gradus tumora, limfovaskularnu invaziju, zahvaćenost čvorova, proliferacijski indeks, statusu limfnih čvorova i veličini tumora (Tablica 5.9.).

Tablica 5.9. Raspodjela ispitanica prema folatnom receptoru alfa (FR α) i obilježjima

	Broj (%) ispitanika u odnosu na FR α			P*
	Negativno	Pozitivno	Ukupno	
Dijagnoza				
<i>Carcinoma ductale invasivum</i>	14 (100)	76 (97)	90 (98)	>0,99
<i>Carcinoma lobulare invasivum</i>	0	2 (3)	2 (2)	
Histološki gradus tumora				
I	0	1 (1)	1 (1)	0,79
II	3 (21)	23 (29)	26 (28)	
III	11 (79)	54 (69)	65 (71)	
Limfovaskularna invazija				
Prisutna	6 (43)	14 (18)	20 (22)	0,07
Nije prisutna	8 (57)	64 (82)	72 (78)	
Zahvaćenost čvorova				
Da	6 (43)	30 (41)	36 (41)	>0,99
Ne	8 (57)	44 (59)	52 (59)	
Proliferacijski indeks Ki-67				
Nizak (< 20 %)	0 (0)	7 (9)	7 (8)	0,59
Visok ($\geq$ 20 %)	14 (100)	71 (91)	85 (92)	
Status limfnih čvorova				
0	8 (57)	44 (59)	52 (59)	0,72
1a	4 (29)	20 (27)	24 (27)	
2a	2 (14)	5 (7)	7 (8)	
3a	0	5 (7)	5 (6)	
Veličina tumora (cm)				
1a ($\leq$ 0,5 cm)	0	1 (1)	1 (1)	0,53
1b (>0,5 ali $\leq$ 1 cm)	1 (7)	6 (8)	7 (8)	
1c (>1 ali $\leq$ 2 cm)	8 (57)	28 (36)	36 (40)	
2 (> 2 ali $\leq$ 5 cm)	5 (36)	33 (43)	38 (42)	
3 (> 5 cm)	0	9 (12)	9 (10)	
Visok proliferacijski indeks Ki-67				
$\geq$ 20 do < 50	4 (29)	14 (20)	18 (21)	0,80
$\geq$ 50 do < 80	6 (43)	33 (46)	39 (46)	
$\geq$ 80 do 100	4 (29)	24 (34)	28 (33)	

*Fisherov egzaktni test

Podijelimo li pozitivni folatni receptor alfa na nizak, umjeren i visok, nismo uočili značajne razlike u raspodjeli ispitanica s obzirom na histološki gradus tumora, limfovaskularnu invaziju, zahvaćenost čvorova, proliferacijski indeks, statusu limfnih čvorova i veličinu tumora. Razlika je značajna samo u slučaju dijagnoza, ali lobularni invazivni karcinom imaju samo dvije ispitanice (Tablica 5.10.).

Tablica 5.10. Raspodjela ispitanica prema pozitivnom folatnom receptoru alfa (FR α) i obilježjima

		Broj (%) ispitanika u odnosu na pozitivni FRα			P*
		Nizak (10–100)	Umjeren (101–200)	Visok (201–300)	
Dijagnoza					
Carcinoma ductale invasivum	33 (100)	30 (100)	13 (87)	76 (97)	0,04
Carcinoma lobulare invasivum	0	0	2 (13)	2 (3)	
Gradus					
I	0	0	1 (7)	1 (1)	0,07
II	6 (18)	11 (37)	6 (40)	23 (29)	
III	27 (82)	19 (63)	8 (53)	54 (69)	
Limfovaskularna invazija					
Prisutna	6 (18)	5 (17)	3 (20)	14 (18)	>0,99
Nije prisutna	27 (82)	25 (83)	12 (80)	64 (82)	
Zahvaćenost čvorova					
Da	13 (39)	11 (39)	6 (46)	30 (41)	0,90
Ne	20 (61)	17 (61)	7 (54)	44 (59)	
Proliferacijski indeks Ki-67					
Nizak (< 20 %)	3 (9)	1 (3)	3 (20)	7 (9)	0,16
Visok (≥ 20 %)	30 (91)	29 (97)	12 (80)	71 (91)	
Status limfnih čvorova					
0	20 (61)	17 (61)	7 (54)	44 (59)	0,38
1a	11 (33)	6 (21)	3 (23)	20 (27)	
2a	0 (0)	3 (11)	2 (15)	5 (7)	
3a	2 (6)	2 (7)	1 (8)	5 (7)	
Veličina tumora (cm)					
1a (≤ 0,5 cm)	0	1 (3)	0	1 (1)	0,22
1b (>0,5 ali ≤1 cm)	1 (3)	2 (7)	3 (20)	6 (8)	
1c (>1 ali ≤2 cm)	10 (31)	14 (47)	4 (27)	28 (36)	
2 (> 2 ali ≤5 cm)	15 (47)	12 (40)	6 (40)	33 (43)	
3 (> 5 cm)	6 (19)	1 (3)	2 (13)	9 (12)	
Visok proliferacijski indeks Ki-67					
≥ 20 do < 50	4 (13)	6 (21)	4 (33)	14 (20)	0,25
≥ 50 do < 80	14 (47)	12 (41)	7 (58)	33 (46)	
≥ 80 do 100	4 (13)	6 (21)	4 (33)	14 (20)	

*Fisherov egzakti test

5.3. Vjerojatnost predviđanja da će doći do relapsa i negativnog ishoda

Regresijskom analizom (Cox) ispitao se utjecaj proliferacijskog indeksa, veličine tumora, limfovaskularne invazije i H-scorea na vjerojatnost da će kod ispitanica doći do relapsa i negativnog ishoda. Udio pojedinih prediktora na vjerojatnost pojave metastaza vidljiva je u Tablici 5.11.

Tablica 5.11. Utjecaj proliferacijskog indeksa, veličine tumora, limfovaskularne invazije i H-scorea na vjerojatnost relapsa (Cox regresija)

	β	Wald	P	Omjer izgleda (OR)	95 % Interval pouzdanosti
Ki-67	0,009	0,59	0,44	1,009	0,986–1,032
Veličina tumora	0,16	0,64	0,42	1,17	0,795–1,726
Limfovaskularna invazija (prisutna)	0,62	0,65	0,42	1,87	0,409–8,538
H-score	0,005	1,09	0,30	1,005	0,996–1,014

β – regresijski koeficijent

Multivarijatnom regresijskom analizom (*Stepwise* metoda) pokazalo se da su H-score i veličina tumora značajni prediktori koji utječu na vjerojatnosti pojave relapsa. Model je u cijelosti značajan ($P = 0,02$). Jači prediktor je veličina tumora ($OR = 1,29$, $P = 0,04$) (Tablica 5.12.).

Tablica 5.12. Utjecaj veličine tumora i H-scorea na vjerojatnost relapsa (Cox regresija, Stepwise metoda)

	β	Wald	P	Omjer Izgleda (OR)	95 % Interval pouzdanosti
Veličina tumora	0,25	4,41	0,04	1,29	1,02 do 1,63
H-score	0,005	4,14	0,04	1,005	1,001 do 1,01

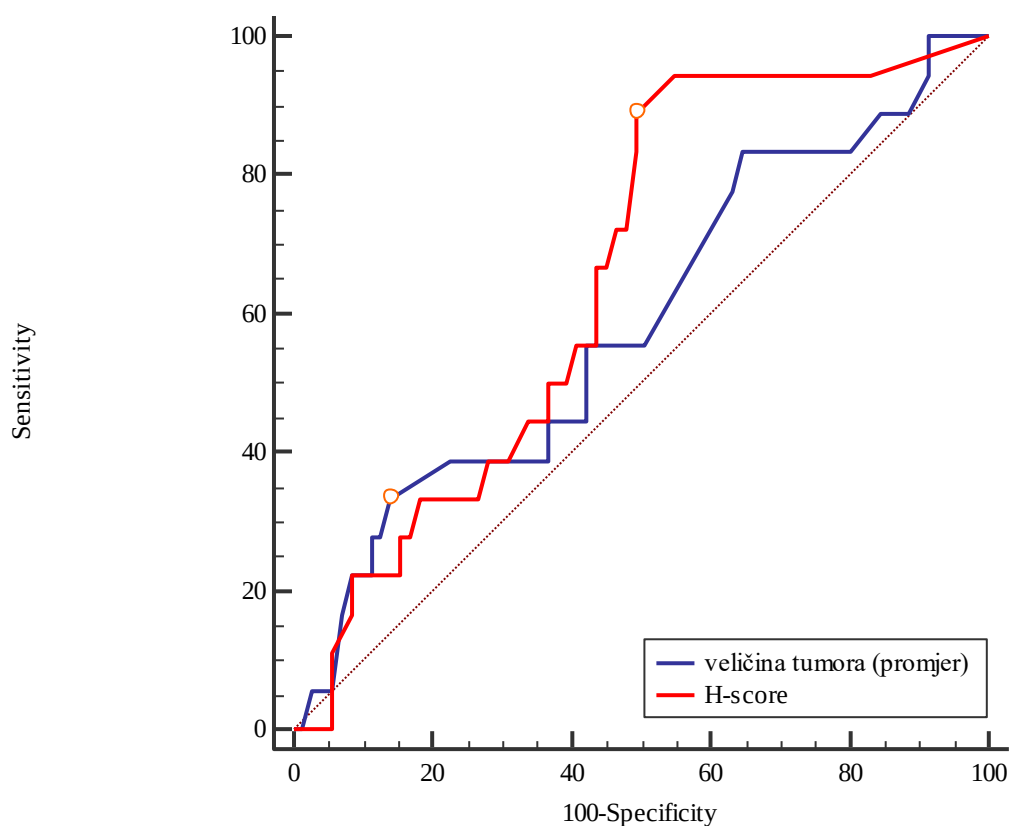
β – regresijski koeficijent

Da bi se procijenila vrijednost H-scorea i veličine tumora kojeg smo regresijskom analizom dobili da značajno doprinosi pojavi relapsa, korištena je metoda izračuna ROC krivulje kojom se stupnjevito mijenjaju vrijednosti koje razlučuju slučajeve s obzirom na pojavnost relapsa. Mijenjana je točka razlučivanja za pojedinu skupinu (engl. *cut-off point*), kako bi se stvaranjem ROC krivulje moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

U našim podatcima H-score možemo prikazati kao dijagnostički pokazatelj pojavnosti relapsa (Tablica 5.13. i Slika 5.1.).

Tablica 5.13. Parametri ROC krivulje s obzirom na pojavnost relapsa

Parametri	Površina ispod krivulje (AUC)	95 % CI	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja (cut off)	Youden indeks	P
H-score	0,656	0,549 do 0,753	94,4	44,4	>75	0,39	0,02
Veličina tumora	0,587	0,478 do 0,691	33,3	85,9	>3,5	0,19	0,26



Slika 5.1. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i granične vrijednosti H-scorea i veličine tumora u određivanju pojavnosti relapsa

Samo je veličina tumora značajan prediktor na vjerojatnosti negativnog ishoda (OR = 1,22, P = 0,009) (Tablica 5.14).

Tablica 5.14. Utjecaj veličine tumora na vjerojatnost negativnog ishoda (Cox regresija, Stepwise metoda)

	β	Wald	P	Omjer Izgleda (OR)	95 % Interval pouzdanosti (95 % CI)
Veličina tumora	0,197	6,79	0,009	1,22	1,05–1,41

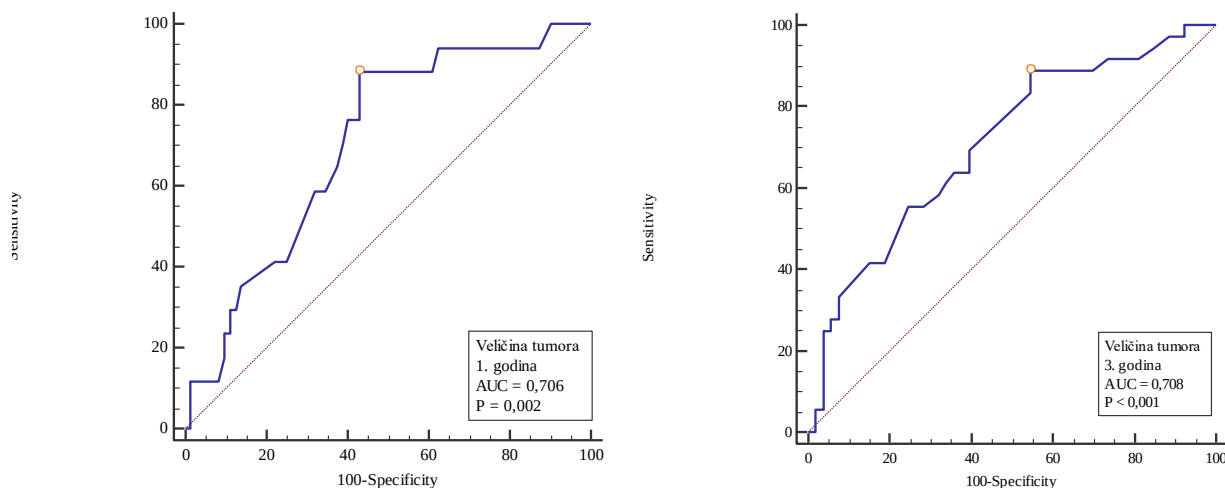
β – regresijski koeficijent

Da bi se procijenila vrijednost veličine tumora za koji smo regresijskom analizom utvrdili da značajno doprinosi negativnom ishodu, korištena je metoda izračuna ROC krivulje kako bi se moglo objektivno utvrditi koja vrijednost najbolje razlučuje uspoređene skupine.

U našim podacima veličinu tumora možemo prikazati kao dijagnostički pokazatelj negativnog ishoda i u jednogodišnjem i trogodišnjem preživljenju (Tablica 5.15. i Slika 5.2.).

Tablica 5.15. Veličina tumora kao vrijednost ROC krivulje s obzirom na jednogodišnji ili trogodišnji negativan ishod

Parametri	Površina ispod krivulje (AUC)	95 % CI	Senzitivnost	Specifičnost	Točka razlučivanja (cut off)	Youden indeks	P
Jednogodišnje preživljenje	0,706	0,600 do 0,798	88,2	56,9	>2	0,45	0,002
Trogodišnje preživljenje	0,708	0,602 do 0,800	88,9	45,3	<1,8	0,34	<0,001



Slika 5.2. ROC analiza senzitivnosti, specifičnosti i granične vrijednosti veličine tumora kod jednogodišnjeg (lijevo) i trogodišnjeg (desno) negativnog ishoda

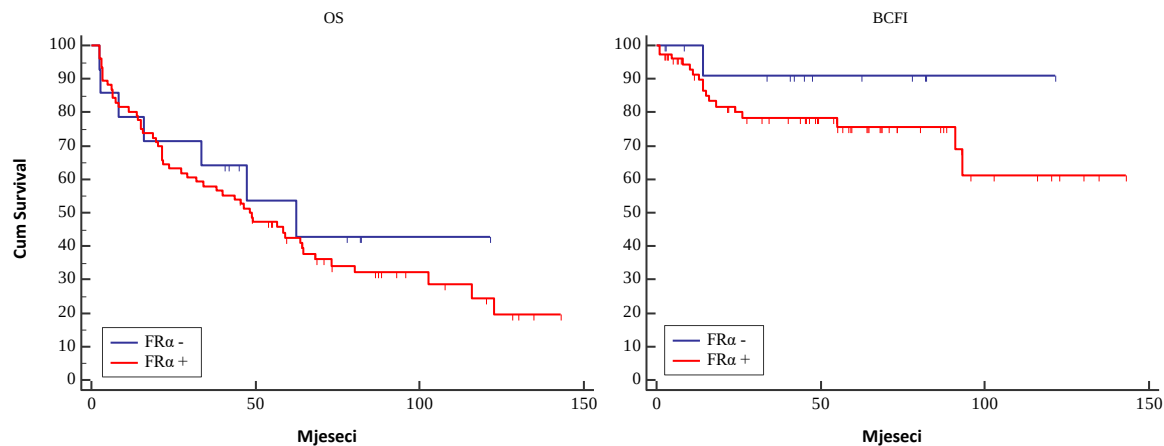
5.4. Analize preživljenja

Aritmetička sredina ukupnog preživljenja je 64,7 mjeseci (95 % CI 53,1 do 76,2 mjeseca), bez značajne razlike u ukupnom preživljenju (OS) u odnosu na folatni receptor alfa pozitivan ili negativan. Nema značajne razlike prema FR α pozitivnom ili negativnom u odnosu na preživljenje bez povrata bolesti (BCFI) (Tablica 5.16. i Slika 5.3.).

Tablica 5.16. Ukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti u odnosu na folatni receptor alfa (FR α)

	Aritmetička sredina (mjeseci)	95 % CI sredine	χ^2 test	Logrank test (P)
Ukupno preživljenje				
FR α negativan	68,3	40,9 do 95,7	0,43	0,51
FR α pozitivan	62,9	50,7 do 75,2	(df=1)	
Ukupno	64,7	53,1 do 76,2		
Preživljenje bez povrata bolesti				
FR α negativan	111,6	93,4 do 129,9	1,31	0,25
FR α pozitivan	105,0	89,5 do 120,6	(df=1)	
Ukupno	108,3	94,03 do 122,5		

FR α – folatni receptor alfa



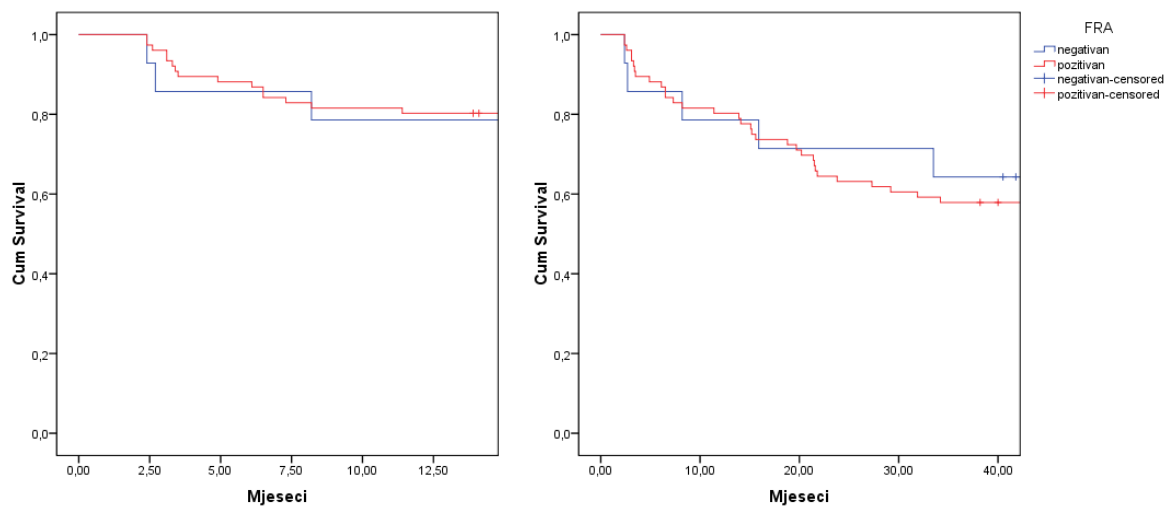
Slika 5.3. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa (FR α) na ukupno preživljenje (OS) (lijevo) i preživljenje bez povrata bolesti (BCFI) (desno)

Ukupno jednogodišnje preživljenje je 80 %, a trogodišnje 58,9 %, bez značajne razlike u odnosu na to je li folatni receptor alfa (FR α) pozitivan ili negativan (Tablica 5.17., Slika 5.4. i Slika 5.5.).

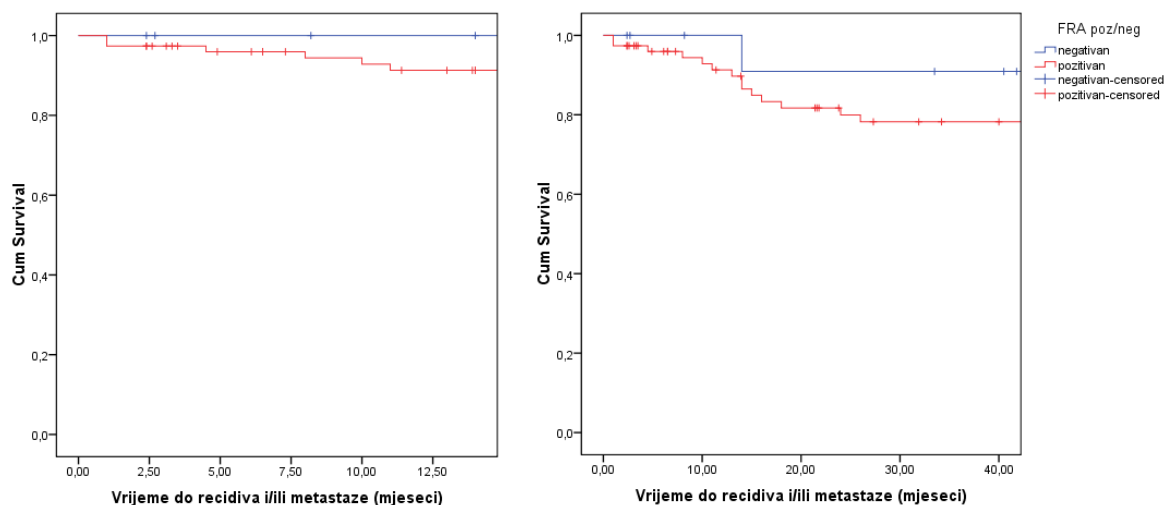
Tablica 5.17. Jednogodišnje i trogodišnje preživljenje u odnosu na folatni receptor alfa (FR α)

	Broj umrlih	Broj preživjelih	Ukupno	Preživljenje	Logrank test (P)
Jednogodišnje preživljenje					
FRα negativan	3 (21)	11 (78,6)	14	78,6 %	0,86
FRα pozitivan	15 (20)	61 (80,3)	76	80,3 %	
Ukupno	18 (20)	72 (80)	90	80 %	
Trogodišnje preživljenje					
FRα negativan	5 (35,7)	9 (64,3)	14	64,3 %	0,71
FRα pozitivan	32 (42,1)	44 (57,9)	76	57,9 %	
Ukupno	37 (41,1)	53 (58,9)	90	58,9 %	

FR α – folatni receptor alfa



Slika 5.4. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje (lijevo) i trogodišnje (desno) ukupno preživljenje



Slika 5.5. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja folatnog receptora alfa ($FR\alpha$) na jednogodišnje (lijevo) i trogodišnje (desno) preživljenje bez povrata bolesti

Aritmetička sredina ukupnog preživljenja je 63 mjeseca (95 % CI 50,7 do 75,2 mjeseca), bez značajne razlike u preživljenju u odnosu na vrijednosti pozitivnoga folatnog receptora alfa. Nema značajne razlike prema vrijednostima pozitivnoga folatnog receptora alfa u odnosu na preživljenje bez bolesti (Tablica 5.18.)

Tablica 5.18. Ukupno preživljenje i preživljenje bez povrata bolesti u odnosu na pozitivan folatni receptor alfa (FR α)

Pozitivan FRα	Aritmetička sredina (mjeseci)	95 % CI sredine	χ^2 test	Logrank test (P)
Ukupno preživljenje				
FR α nizak (10–100)	67	50,7 do 83,1	0,88 (df=2)	0,64
FR α umjeren (101–200)	56	36,7 do 75,4		
FR α visok (201–300)	60	31,9 do 88,6		
Ukupno	63	50,7 do 75,2		
Preživljenje bez povrata bolesti				
FR α nizak (10–100)	102	86,1 do 118,0	2,45 (df=2)	0,29
FR α umjeren (101–200)	89	61,4 do 116,2		
FR α visok (201–300)	101	71,4 do 130,2		
Ukupno	105	89,5 do 120,6		

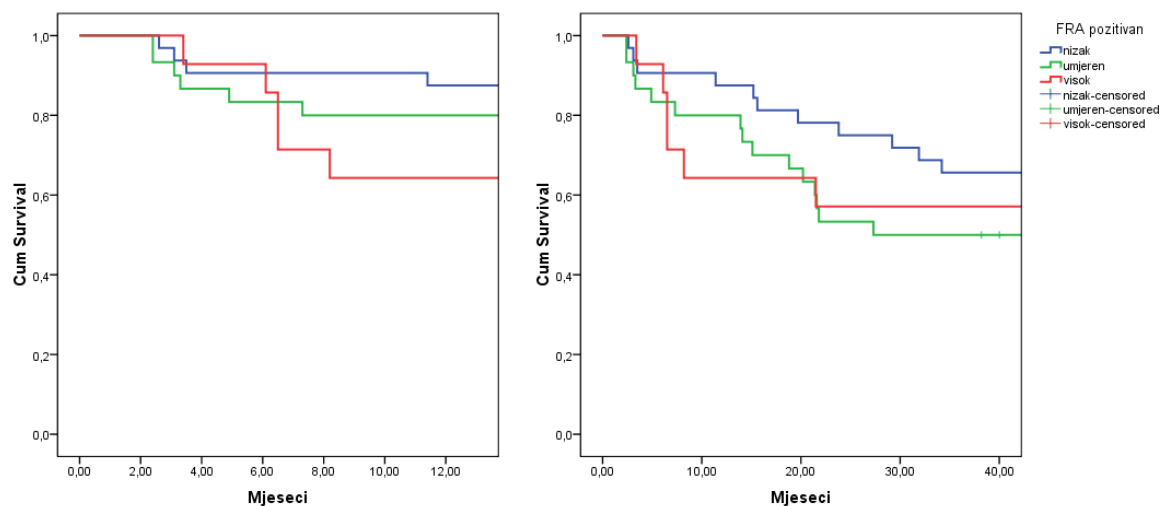
FR α – folatni receptor alfa

Ukupno jednogodišnje preživljenje je 80 %, a trogodišnje 57,9 %, bez značajne razlike u odnosu na pozitivne vrijednosti FR α (Tablica 5.19., Slika 5.6. i Slika 5.7).

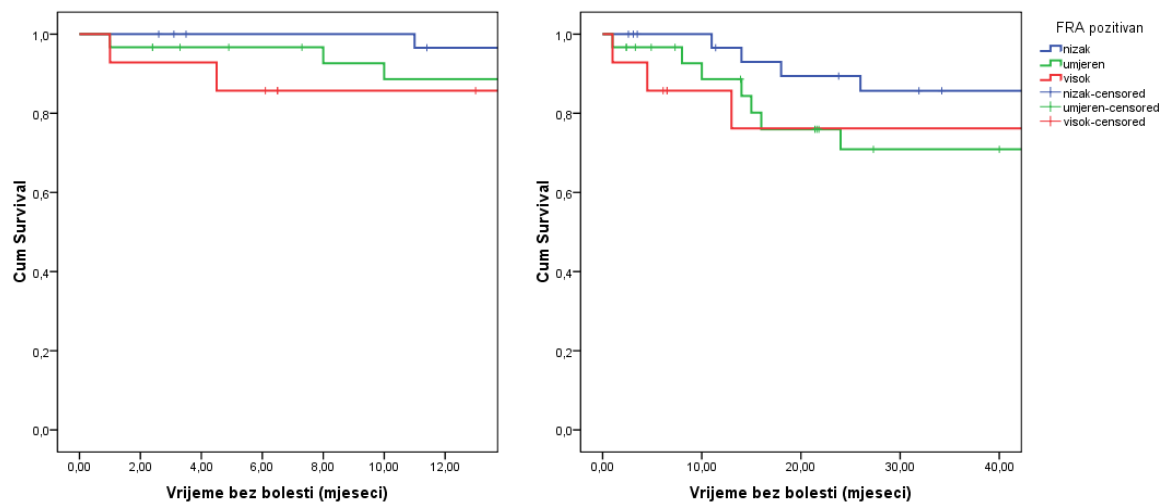
Tablica 5.19. Jednogodišnje i trogodišnje preživljenje u odnosu na vrijednosti pozitivnog folatnog receptora alfa (FR α)

	Broj umrlih	Broj preživjelih	Ukupno	Preživljenje	Logrank test (P)
Jednogodišnje preživljenje					
FR α nizak (10–100)	4 (12,5)	28 (87,5)	32	87,5 %	0,24
FR α umjeren (101–200)	6 (20)	24 (80)	30	80 %	
FR α visok (201–300)	5 (35,7)	9 (64,3)	14	64,3 %	
Ukupno	15 (19,7)	61 (80,3)	76		
Trogodišnje preživljenje					
FR α nizak (10–100)	11 (34,4)	21 (65,6)	32	65,6 %	0,39
FR α umjeren (101–200)	15 (50)	15 (50)	30	50 %	
FR α visok (201–300)	6 (42,9)	8 (57,1)	14	57,1 %	
Ukupno	32 (42,1)	44 (57,9)	76		

FR α – folatni receptor alfa



Slika 5.6. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja pozitivnoga folatnog receptora alfa (FR α) na jednogodišnje (lijevo) i trogodišnje (desno) ukupno preživljenje



Slika 5.7. Kaplan-Meierov grafikon utjecaja pozitivnog folatnog receptora alfa (FRA) na jednogodišnje (lijevo) i trogodišnje (desno) preživljenje bez povrata bolesti

6. RASPRAVA

Karcinom dojke je globalni zdravstveni problem, s više od 2 milijuna novodijagnosticiranih slučajeva godišnje diljem svijeta. Smrtnost je u blagom opadanju zahvaljujući programima prevencije i ranijeg dijagnosticiranja te poboljšanju razvoja terapija, osobito onih usmjerenih prema specifičnim biomarkerima. No usprkos napretku, na karcinom dojke i dalje opada gotovo 8 % smrtnosti od karcinoma svih sijela (2). Karcinomi dojke obuhvaćaju heterogenu skupinu tumora, koji se sukladno St. Gallenskoj konferenciji na temelju imunohistokemijskih metoda mogu podijeliti na luminalne A i B, HER2 pozitivne te trostruko negativne karcinome dojke (31, 32). Trostruko negativni karcinom dojke karakteriziran je negativnom ekspresijom ER, PR i HER2 te je neosjetljiv na trenutačno dostupnu hormonalnu ili HER 2 baziranu terapiju. Javlja se u mlađih žena te ga obilježava visoki histološki gradus, veće dimenzije od ostalih karcinoma, visoki proliferacijski indeks (iako on u skupini TNBC može poprimiti vrijednosti od 0 do 100, istraživanja su pokazala kako većina TNBC ima visok indeks proliferacije) i loš ishod bolesti. Iako čini samo 15 % svih karcinoma dojke, zbog opisanih karakteristika odgovoran je za učestalu smrtnosti od te bolesti. Terapija toga karcinoma trenutačno obuhvaća visoko toksične i nespecifične kemoterapeutske protokole te to, uz sve navedeno, ukazuje na potrebu pronalaska novih biomarkera kako bi se došlo do napretka u razvitku terapijskih sredstava usmjerenih na liječenje toga, klinički agresivnog fenotipa (35, 44, 57).

Biomarker koji se u novije vrijeme istražuje jest folatni receptor alfa. Povećana ekspresija tog biomarkera nađena je u tumorima ovarija, pluća, bubrega, mokraćnog mjehura i dojke, kod kojih se pokazalo da je više eksprimiran u trostruko negativnog fenotipa, u usporedbi s drugim fenotipovima karcinoma dojke (112, 130, 135). Zbog njegove dokazane uloge u rastu i proliferaciji tumorskih stanica te dokazanog utjecaja na prognozu bolesti u pojedinim karcinoma, poput ovarijalnih i karcinoma pluća, provedeno je ovo istraživanje s ciljem preciznijeg definiranja skupine TNBC i izolacije one skupine pacijenata s većom vjerojatnošću razvoja metastaza i lošijim ishodom bolesti te mogućeg potencijalnog učinka usmjerene terapije.

6.1. Kliničko-patološki parametri ispitanica oboljelih od TNBC

Istraživanje je obuhvatilo 92 ispitanice kojima je, u razdoblju od siječnja 2008. do prosinca 2016. godine, učinjena kirurška ekstripacija promjene u dojci i patohistološki postavljena dijagnoza trostruko negativnog karcinoma. Kod većeg broja ispitanica ekstripacija tumora učinjena je mastektomijom (67 %). Medijan dobi ispitanica je 58 godina (interkvartilnog raspona od 49 do 68 godina); najmlađa je imala 31, a najstarija 89 godina.

Histološkim gradusom tumora procjenjuje se njegova sličnost sa zdravim tkivom iz kojega je nastao i agresivnost samoga tumora, tumori višega histološkoga gradusa agresivniji su od onih nižega gradusa. Cheang i suradnici ustanovili su da su trostruko negativni karcinomi većinom visokoga histološkoga gradusa, sa 76,4 % ispitanika koji su bili gradusa III, za razliku od luminal A pacijenata kod kojih je taj gradus imalo 41,2 % ispitivanih pacijenata; dok je Carey ustanovila još veći postotak, od 82 % ispitanika s gradusom III tumora (136, 137). U ovom istraživanju većina karcinoma bila je određena kao gradus III, njih 71 %, dok je gradusa II bilo njih 28 %, iz čega vidimo da zastupljenost visokoga histološkoga gradusa odgovara onima iz literature. Za trostruko negativni karcinom dojke karakteristično je da su većinom histološkog tipa duktalnog invazivnog karcinoma – bez posebnih karakteristika, što su u svojim istraživanjima pokazali Livasy i suradnici: od kohorte od 23 ispitanika, njih 21 bilo je toga histološkog tipa. I u naših ispitanica prevladavao je tip duktalnoga invazivnoga karcinoma – bez posebnih karakteristika. Od 92 ispitanice, 90 je imalo tu vrstu karcinoma, a samo su 2 ispitanice imale lobularni invazivni karcinom.

Trostruko negativni karcinom dojke karakteriziraju i veći promjer inicijalnog tumora, kao i visok Ki-67 proliferacijski indeks te relativno visoka zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova. Veličina tumora se definira kao najveći promjer tumora te se procjenjuje tijekom patohistološke obrade materijala. Ona je važan prognostički čimbenik: istraživanja su pokazala da pacijentice s tumorom veličine do 5 mm imaju rizik za pojavu metastaza od 5 %, a pri veličini do 20 mm taj rizik iznosi 30 %. Petogodišnje preživljenje u pacijentica s tumorom veličine do 20 mm bez zahvaćenih limfnih čvorova iznosi 96 %, dok u pacijentica s tumorom promjera većim od 50 mm i zahvaćenim limfnim čvorovima preživljenje pada na svega 43 % (70, 76). Ovcariček i suradnici pokazali su kako većina TNBC u trenutku dijagnoze ima tumor veći od 20 mm (njih 59 %), a Dent i suradnici pokazali su kako je prosječna veličina TNBC veća od one u ostalih podtipova, s trećinom TNBC koji su bili manji od 20 mm u trenutku dijagnoze, dok su dvije trećine ostalih

podtipova bili te veličine. Proliferacijski indeks Ki-67 koristi se za određivanje i praćenje rasta i dijeljenja zdravih i tumorskih stanica. U pozitivnoj je korelaciji s histološkim gradusom tumora i brojem zahvaćenih limfnih čvorova, a u negativnoj sa statusom hormonskih receptora, te se pokazalo kako trostruko negativni karcinomi imaju visoke vrijednosti Ki-67. Status aksilarnih limfnih čvorova najznačajniji je prognostički faktor za karcinome dojke – pacijentice sa zahvaćenim čvorovima, za razliku od onih u kojih su čvorovi negativni, imaju 4–8 puta veću smrtnost. Postoji i povezanost među rizikom za razvoj metastatske bolesti i broja zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova (138, 139). Matos i suradnici su pokazali da je većina trostruko negativnih karcinoma gradusa III i visokoga proliferacijskog indeksa (140), a Ovcariček i suradnici su pokazali kako gotovo pola ispitanika (46 %) u trenutku dijagnoze ima pozitivan barem jedan aksilarni limfni čvor. U istraživanju koje su proveli Chintalapani i suradnici broj takvih ispitanika penje se do 58 %. Nadalje, pokazali su i da je pozitivnost limfnih čvorova u TNBC povezana s veličinom tumora i visokim histološkim gradusom (58, 73). U trenutku dijagnoze ispitanice u našem istraživanju imale su većinom tumor veličine > 2 cm, ali ≤ 5 cm, njih 41 %, dok ih je 10 % imalo tumor veličine > 5 cm, što se podudara sa podacima iz literature. Prema St. Gallen konsenzusu iz 2013. godine granična vrijednost (*cut off*) za visoki Ki-67 iznosi 20 %. U ovom istraživanju visoki Ki-67 imalo je 92 % ispitanica. Kako bi se pokušala preciznije definirati skupina „visokog Ki-67“, za potrebe istraživanja isti je podijeljen u skupine: ≥ 20 – < 50 %, ≥ 50 – < 80 % i ≥ 80 – 100 %. Pokazalo se kako gotovo polovica ispitanica s TNBC ima vrijednosti proliferacijskog indeksa ≥ 50 – < 80 % (46 % ispitanica), a tek nešto manje (33 %) ima vrijednosti ≥ 80 – 100 %. Dobiveni rezultati nam govore kako većina oboljelih od TNBC ima iznimno visoke vrijednosti proliferacijskog indeksa, čime se može objasniti njihov potencijal ranog povrata bolesti (unutar 3 godine) i lošija prognoza. Isto tako, obzirom da visoka proliferacijska aktivnost ukazuje na bolji odgovor na kemoterapiju (141), dobivenim rezultatom može se objasniti zašto TNBC imaju, u odnosu na druge podtipove karcinoma dojke, bolji rezultat liječenja kemoterapeutima. Oko 43 % naših ispitanica u trenutku dijagnoze prezentiralo se sa pozitivnim aksilarnim limfnim čvorovima, što odgovara podacima iz literature, te govori u prilog agresivnosti trostruko negativnog fenotipa.

Trostruko negativne karcinome dojke karakterizira i manja vjerojatnost limfovaskularne invazije te rano pojavljivanje prvih metastaza s predilekcijom za visceralne organe. Limfovaskularna invazija se definira kao prisutnost tumorskih stanica unutar krvnih i limfnih žila. Preduvjet je diseminaciji tumorskih stanica kroz limfni sustav i povećava petogodišnji rizik za

nastanak recidiva za 15 %. Kod pacijentica s negativnim limfnim čvorovima povezana je s kraćim razdobljem do povrata bolesti, povećanim rizikom za razvoj udaljenih metastaza i kraćim preživljenjem (142). U istraživanju o kliničko-patološkim obilježjima, povratu bolesti i preživljenju pacijenata s TNBC, Lin i suradnici pokazuju da je limfovaskularna invazija u tih ispitanika rjeđa u odnosu na HER2+ pacijente (26 %, odnosno 36 %), što je slično rezultatima koje su dobili Ovcariček i suradnici, u kojih je postotak ispitanika s limfovaskularnom invazijom iznosio približno 25 %. Ispitujući preživljenje u toj skupini karcinoma dojke, istraživanje koje su proveli Liedtke i suradnici pokazuje da je rizik od relapsa i smrtnog ishoda značajno viši u prve 3 godine u ispitanika s trostruko negativnim fenotipom, za razliku od drugih podtipova. Isto su utvrdili i Dent i suradnici, koji su pokazali da je vrijeme potrebno za razvoj udaljenih metastaza kraće u tih karcinoma, nego u onih drugih skupina (2,6 nasuprot 5 godina), te da medijan preživljenja u ispitanika s metastatskom bolesti iznosi 9 mjeseci, što je značajno niže kada se usporedi sa drugim podtipovima (u kojih je medijan 20 mjeseci) (42, 50). Također su pokazali i da manji broj žena dobije lokalni recidiv prije udaljenih metastaza. U svom drugom istraživanju (obrazac metastaziranja TNBC), Dent i suradnici su pokazali da je vjerojatnost visceralnih metastaza, kao i onih u meka tkiva, veća u ispitanica s tim fenotipom dok se koštane metastaze češće javljaju u luminalnim podtipovima (49). Slično njihovim rezultatima, i naše ispitanice su pokazale rani relaps, s medijanom pojave prvih metastaza od 12,5 mjeseci. Također se i u našem istraživanju pokazalo kako značajno manji broj žena razvije lokalni recidiv u odnosu na udaljene metastaze (3 % nasuprot 17,4 %). Od ukupnog broja ispitanica, njih 5,4 % prve je metastaze imalo na plućima, po 4,3 % na jetri i ostalim limfnim čvorovima, 3,3 % na mozgu i skeletu, a 2,2 % je imalo kožne metastaze, što govori u prilog tome da se metastaze u TNBC češće javljaju na visceralnim organima i mekim tkivima. U našem istraživanju limfovaskularna invazija je pronađena u 22 % ispitanica, što odgovara podacima iz literature. S obzirom na nizak broj pacijenata u kojih je pronađena limfovaskularna invazija te relativno visok broj pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova i rani relaps bolesti, možemo zaključiti da drugi čimbenici rizika kod tog podtipa karcinoma dojke igraju veću ulogu u njegovu izrazito agresivnom ponašanju i visokom smrtnom ishodu od limfovaskularne invazije.

6.2. Folatni receptor alfa u TNBC

Folatni receptor alfa pokazao se kao potencijalna prognostička i terapijska meta za pojedine vrste karcinoma. Kod karcinoma dojke pokazalo se da njegova ekspresija varira ovisno o fenotipskom podtipu. U istraživanju ekspresije FR α u karcinomima dojke O'Shannessy i suradnici ustanovili su kako je većina (89 %) njihovih ispitanih FR α pozitivnih invazivnih duktalnih karcinoma HER2 negativno, te da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji između hormon receptor pozitivnih i negativnih tumora, sa značajno manjim postotkom FR α pozitivnih tumora koji ekspresiraju hormonske receptore. Isto tako, 67 % trostruko negativnih karcinoma iz njihove ispitivane skupine ekspresiralo je FR α (130). Slične rezultate su dobili Zhang i suradnici. U njihovu istraživanju se pokazalo da je ekspresija FR α značajno povezana s negativnim ER (75 % ispitanika), negativnim PR (63 % ispitanika) kao i visokim Ki-67 proliferacijskim indeksom (56 % ispitanika). Nadalje, u njihovoj ispitivanoj skupini pokazala se i značajna ekspresija FR α u TNBC u usporedbi s ostalim podtipovima (131). Iz tih podataka se može zaključiti da je ekspresija tog proteina u trostruko negativnom karcinomu dojke pojačana.

Uzimajući u obzir činjenicu da je TNBC fenotip karcinoma dojke s agresivnim tijekom bolesti i lošom prognozom, a vodeći se podacima iz literature koji pokazuju da je kod njih povećana ekspresija FR α , provedeno je ovo istraživanje kako bi se ispitala ekspresija tog proteina unutar same skupine TNBC. Željela se ispitati njegova prevalencija i prognostička vrijednost te, na temelju ekspresije FR α , dodatno definirati ta fenotipska skupina karcinoma dojke.

Kao pozitivan rezultat ekspresije FR α ocijenilo se membransko bojenje, neovisno o intenzitetu bojenja. S obzirom na imunohistokemijsku analizu dobivenih uzoraka, u većini istraživanja opisuje se i interpretira membranski pozitivitet, uz koje pojedini autori navode i miješano membransko-citoplazmatsko bojenje te točkasto citoplazmatsko bojenje (143), što se može objasniti primjenom različitog tipa protutijela na folatni receptor alfa. U ovom istraživanju koristio se membranski pozitivitet, svakog intenziteta (neovisno o citoplazmatskom bojenju), budući da su se tim kriterijem koristili u većini istraživanja (129, 131, 144).

Ekspresija FR α utvrdila se pomoću prije opisane H-score metode (129, 134). Za potrebe ove studije, nakon statističke analize samog H-scorea, dobivene vrijednosti su se podijelile na folatni receptor alfa negativne (za vrijednosti H-scorea <10) i pozitivne te se iz Tablice 5.4. može vidjeti kako je u našem istraživanju pozitivan FR α imala većina ispitanica, njih 85 %, što se slaže

s podacima iz literature koji govore o visokom pozitivitetu tog receptora u TNBC. Kako bi se preciznije definirala ekspresiju toga receptora, a u svrhu egzaktnijeg prikazivanja njegove povezanosti s drugim parametrima i prognozom, dobivene pozitivne vrijednosti H-scorea su nadalje proizvoljno podijeljene u tri kategorije. U kategoriju niskoga FR α svrstane su ispitanice s vrijednostima H-scorea od 10 do 100, srednji FR α obuhvaća pacijentice sa vrijednostima 101 do 200, a visoki 201 do 300. Prema dobivenim rezultatima prikazanim u Tablici 5.4 može se vidjeti da većina ispitanica ima niske i srednje vrijednosti FR α (42 %, odnosno 39 %), dok ih 19 % ima visoke vrijednosti. Iz dobivenog se može zaključiti kako ekspresija toga receptora varira ne samo unutar fenotipskih podskupina karcinoma dojke, nego i unutar same skupine TNBC, na temelju čega možemo zaključiti da je taj podtip karcinoma heterogena bolest.

U istraživanju povezanosti FR α s kliničko-patološkim obilježjima u karcinomu dojke Aboulhagag i suradnici su pokazali da je ekspresija FR α izrazito povezana s visokim histološkim gradusom (93,3 % tumora gradusa III je izražavalo FR α), većim promjerom tumora (87,5 % T3 tumora), većom zahvaćenošću limfnih čvorova (većina ih je bila N2 i N3) i prisutnošću limfovaskularne invazije (145). Slične rezultate dobili su Zhang i suradnici. Njihovi rezultati su također pokazali da ekspresija FR α značajno korelira s višim gradusom tumora i većom zahvaćenošću čvorova (oko 50 % tumora gradusa III su eksprimirali FR α , a N 2–3 je imalo 46 %–54 % pacijenata). No, za razliku od istraživanja koje su proveli Aboulhagag i suradnici, Zhang i suradnici nisu našli značajnu povezanost između ekspresije FR α i veličine tumora. Iako njihovi rezultati odražavaju ekspresiju unutar svih skupina karcinoma dojke, a ne samo TNBC, indiciraju kritičnu ulogu FR α u karcinogenezi tumora dojke i povezanost s lošim prognostičkim kriterijima. Necela i suradnici su ispitivali ekspresiju FR α u TNBC i uspoređivali ju s ostalim podtipovima te su došli do rezultata koji pokazuju kako ekspresija tog receptora nije povezana sa spolom i statusom limfnih čvorova unutar svih skupina karcinoma dojke, kao ni kad se analiza ograničila samo na TNBC. Što se tiče starosti ispitanika, primijetili su značajnu razliku u ekspresiji ovisno o dobi kad su uspoređivali sve podtipove, no istu statističku značajnost nisu dobili kad su analizu sveli samo na TNBC (129). U ovom istraživanju također se nije našla statistički značajna razlika ekspresije FR α , ni u odnosu na dob ispitanica ni u odnosu na lokaciju gdje se primarni karcinom javio (desna, odnosno lijeva dojka) (Tablice 5.6. i 5.7.)

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem, prikazani u Tablici 5.6., pokazuju kako u trostruko negativnih karcinoma dojke postoji statistički značajna povezanost ekspresije FR α i histološkoga

gradusa: ispitanice višega histološkoga gradusa (III) imaju značajno niže vrijednosti H-scorea (Mann Whitney U test, $P = 0,03$) u odnosu na ispitanice s gradusom II. Nadalje, pokazalo se da nema statistički značajne povezanosti u ekspresiji tog receptora sa zahvaćenošću aksilarnih limfnih čvorova. Rezultati se dijelom slažu s onima iz istraživanja koje su proveli Necela i suradnici, koji također nisu našli povezanost između zahvaćanja limfnih čvorova i ekspresije $FR\alpha$, čime se može zaključiti da ekspresija ovoga receptora u tumorskom tkivu ne utječe na rano lokoregionalno širenje bolesti, odnosno širenje bolesti u limfne čvorove aksile.

Što se tiče povezanosti s histološkim gradusom, postoje razlike u rezultatima iz literature i ovoga istraživanja. Dok Necela i suradnici nisu našli povezanost, Zhang i suradnici te Aboulhagag i suradnici su pokazali kako je ekspresija veća u karcinomima visokoga histološkoga gradusa. Uspoređujući naše s njihovim rezultatima, moramo uzeti u obzir da su oni ispitivali ekspresiju toga receptora unutar svih podskupina dojke, dok se ovo istraživanje temeljilo isključivo na TNBC te da moguća diskrepancija proizlazi i iz različitih načina interpretacije pozitiviteta, što naglašava važnost potrebnog definiranja apsolutne *cut-off* vrijednosti za pozitivan, odnosno negativan $FR\alpha$, kao i način samog ocjenjivanja pozitiviteta.

Iako istraživanja nisu pokazala povezanost ekspresije $FR\alpha$ s histološkim izgledom karcinoma (146), u ovoj studiji se pokazalo kako postoji statistička značajnost te da ispitanice s invazivnim lobularnim karcinomom imaju značajno više vrijednosti H-scorea u odnosu na one s duktalnim invazivnim karcinomom.

Iz navedenih rezultata ovog istraživanja može se zaključiti, kao i potvrditi dio hipoteze, da je ekspresija $FR\alpha$ povezana s pojedinim karakteristikama tumora te da se unutar skupine TNBC mogu izdvojiti pojedine skupine pacijentica na temelju histološkog izgleda i gradusa karcinoma, koje ekspimiraju više razine $FR\alpha$, te bi mogle imati eventualnu korist od ciljane terapije. Isto tako, istraživanje je pokazalo da uz razvoj novih, modernih metoda dijagnostike tumorskog tkiva i dalje postoji potreba za osnovnim patohistološkim pregledom i dijagnostikom. No moramo uzeti u obzir nekoliko činjenica. Prvo, velika većina TNBC je histološkog tipa duktalnoga invazivnog karcinoma – bez posebnih karakteristika, dok na ostale tipove otpada mali broj, što je pokazala i ova studija (dijagnozu lobularnog invazivnog karcinoma imaju samo dvije ispitanice). I drugo, veličina uzorka bi mogla utjecati na rezultate, s obzirom na maleni broj ispitanica s dijagnozom lobularnog invazivnog karcinoma unutar naše ispitivane skupine od 92 pacijentice.

Da bi se procijenila povezanost H-scorea s dobi, brojem pozitivnih čvorova, veličinom tumora i proliferacijskim indeksom Ki-67 u ovoj studiji, koristio se Pearsonov koeficijent korelacije (r) (Tablica 5.7.). Uočilo se da je H-score značajno povezan s Ki-67, odnosno da uz više vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67, H-score poprima niže vrijednosti ($r = -0,284$ $P = 0,006$). Rezultat nam sugerirati da u skupini FR α pozitivnih, trostruko negativnih karcinoma drugi čimbenici određuju maligni potencijal tumora te da on nije vezan za proliferacijsku aktivnost. Također se pokazalo kako su više vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67 prisutne kod većeg promjera tumora ($r = 0,210$ $P = 0,04$) i obratno, što se slaže sa podacima iz literature.

U studiji koju su proveli Aboulhagag i suradnici pokazalo se kako većina tumora dojke, kod kojih je nađena limfovaskularna invazija, pokazuju pozitivnu ekspresiju FR α (145). U našoj studiji nismo našli statističku značajnost u povezanosti ekspresije toga receptora s limfovaskularnom invazijom, ni kad se određivao H-score, ni kada su se ispitanice na temelju toga rezultata podijelile u FR α pozitivne i negativne ($P=0,09$, odnosno $P=0,07$). No iako nije statistički značajno, iz Tablice 5.9. se vidi kako znatno veći broj ispitanica kod kojih nije utvrđena limfovaskularna invazija imaju pozitivan FR α . Nalaz je kontradiktoran onome iz gore navedene studije, što se može objasniti činjenicom da su Aboulhagag i suradnici navedeno ispitivali na svim karcinomima dojke, a ne izolirano na TNBC, te različitom veličinom ispitivane skupine i metodama evaluacije pozitiviteta. Isto tako, budući da je većina TNBC pozitivna na FR α , te da tu podskupinu karakterizira manja prisutnost limfovaskularne invazije u odnosu na druge skupine, rezultat koji se dobio ovim istraživanjem, pri izoliranoj analizi TNBC, očekivan je te nam govori da su u FR α pozitivnih trostruko negativnih karcinoma dojke za udaljeno širenje, osim limfovaskularne invazije, bitni neki drugi parametri.

Iz Tablice 5.8. vidi se da ispitanice s više pozitivnih čvorova, s manjim promjerom tumora i manjim proliferacijskim indeksom imaju više vrijednosti H-scorea, u odnosu na ispitanice s manje pozitivnih čvorova, većim tumorom i većim proliferacijskim indeksom, ali bez statističke značajnosti. Iako se nisu pokazali kao statistički značajni, ti rezultati sugeriraju da u TNBC koji imaju više vrijednosti ekspresije FR α , odnosno H-scorea, pojedini prognostički čimbenici nemaju istu vrijednost kao i u drugim podtipovima karcinoma dojke.

Nakon što se ispitala povezanost H-scorea FR α s patohistološkim karakteristikama tumora, isti se podijelio u skupine negativan, odnosno pozitivan FR α , te se skupina pozitivnog FR α dalje

podijelila kako slijedi: nizak (10– 100), umjeren (101– 200) i visok (201– 300), kako bi se pobliže ispitala ekspresija tog receptora. Iz Tablica 5.9. i 5.10. može se vidjeti da nema značajnih razlika u raspodjeli ispitanica s obzirom na histološki gradus tumora, limfovaskularnu invaziju, zahvaćenost čvorova, proliferacijski indeks, statusu limfnih čvorova i veličini tumora u odnosu na pozitivan ili negativan folatni receptor alfa, odnosno nizak, umjeren ili visok FR α . Jedina značajna razlika našla se samo u slučaju dijagnoze (Tablica 5.10.), no treba uzeti u obzir da dijagnozu invazivnoga lobularnoga karcinoma imaju samo dvije ispitanice, zbog čega je veličina uzorka mogla utjecati na dobiveni rezultat.

Na temelju rezultata možemo zaključiti da se u analizi folatnog receptora alfa, unutar skupine trostruko negativnih karcinoma, značajnim pokazalo vrednovanje samog H-scorea toga receptora, bez potrebne segregacije u potkategorije, koje bi se, eventualno, trebale drukčije oblikovati. Isto tako, veličina uzorka mogla bi imati ulogu pri podjeli u određene kategorije te bi se isto trebalo ispitati na većem uzorku ispitanika.

Ova studija je ispitala i vjerojatnost pojavnosti relapsa bolesti, bilo u vidu lokalnog recidiva ili udaljenih metastaza, te su se značajno više vrijednosti H-scorea našle u ispitanica koje su imale relaps u odnosu na one kod kojih isti nisu zabilježeni (Tablica 5.6.). Nadalje, regresijskom Cox analizom ispitao se utjecaj H-scorea na vjerojatnost da će kod ispitanica doći do relapsa i negativnog ishoda (Tablica 5.11.), te se multivarijatnom regresijskom analizom (*Stepwise* metoda) (Tablica 5.12.) H-score pokazao kao značajni prediktor koji utječe na vjerojatnost pojave relapsa bolesti, no ne kao i prediktor negativnog ishoda. Na temelju tih rezultata može se zaključiti kako TNBC koji imaju više vrijednosti H-scorea, odnosno FR α , imaju veću vjerojatnost za razvoj proširene bolesti i/ili lokalnih recidiva, u odnosu na pacijentice s nižim vrijednostima tog receptora, te se H-score folatnog receptora alfa, u pacijentica sa tim fenotipom, može koristiti kao prediktor za pojavu udaljene bolesti. Isto tako, može se zaključiti da je ekspresija folatnog receptora alfa u TNBC više vezana za metastatski potencijal tumora, nego za inicijalno lokalno širenje u aksilarne limfne čvorove, te se time potvrdio dio hipoteze da se FR α može koristiti kao prognostički faktor u trostruko negativnim karcinomima dojke. Kao bitan prediktor za pojavu relapsa pokazala se i veličina tumora, koja se, isto tako, pokazala i kao značajan prediktor za vjerojatnost negativnog ishoda, kao i negativnog ishoda u jednogodišnjem i trogodišnjem preživljenju (Tablica 5.14., 5.15.

i Slika 4.), što odgovara podacima iz literature da je veličina tumora bitan prognostički čimbenik (70, 76).

Trostruko negativni karcinomi dojke, u odnosu na druge karcinome, imaju agresivniji tijek bolesti i lošije preživljenje. To su potvrdili Lin i suradnici, koji su pokazali da u toj skupini karcinoma postoji značajno povećanje rizika od smrtnosti unutar prve dvije godine od dijagnoze, a Li i suradnici su pokazali da imaju gori OS, u razdoblju od tri godine, od ostalih podtipova karcinoma (56, 57). U studiji o preživljenju pacijenata s TNBC, Chintalapani i suradnici su pokazali da je TNBC podtip karcinoma s rapidnim kliničkim tijekom i ranim povratom bolesti te je DFS u njihovoj ispitivanoj skupini iznosio 63,2 %, a OS 65,6 % (58). Dawood i suradnici su došli do sličnih rezultata s DFS od 63 % i OS od 71 %, unutar ispitivane skupine, dok su Ovcaricek i suradnici ispitivali DFS i OS u razdoblju od pet godina, te su oni iznosili 68,2 % i 74,5 % (59, 73). U studiji o ekspresiji folatnog receptora alfa u trostruko negativnim karcinomima dojke i povezanosti s preživljenjem, u razdoblju od pet godina, Ginter i suradnici nisu pronašli statistički značajnu povezanost između ekspresije tog receptora i OS. Međutim, pokazali su da ona značajno korelira sa smanjenim DFS (146). Sličan rezultat dobili su Cui i suradnici, koji nisu primijetili značajnu povezanost FR α s OS, ni s DFS, dok su Norton i suradnici uočili bolje preživljenje u većine pacijenata koji su eksprimirali taj receptor (147, 148).

U ovoj studiji ispitali su se preživljenje bez povrata bolesti, definirano kao *breast cancer-free interval*, i sveukupno preživljenje (133) u odnosu na pozitivan, odnosno negativan FR α , te u odnosu na ranije definirane skupine pozitivnoga FR α .

S obzirom na folatni receptor alfa pozitivan, odnosno negativan, aritmetička sredina ukupnog preživljenja je 64,7 mjeseci, bez značajne razlike u odnosu na ekspresiju tog receptora. Isto tako, nije se našla značajna razlika u preživljenju bez povrata bolesti (Tablica 5.16.). Kada se analiziralo preživljenje u odnosu na skupine pozitivnoga folatnog receptora alfa, također se nije našla značajna razlika u ukupnom preživljenju i preživljenju bez povrata bolesti u odnosu na taj receptor (Tablica 5.18.). Kaplan-Meierovim krivuljama ispitala su se jednogodišnja i trogodišnja preživljenja u odnosu na folatni receptor alfa. Rezultati su pokazali kako nema značajne razlike ni u jednogodišnjem ni u trogodišnjem preživljenju, u odnosu na pozitivni, odnosno negativni folatni receptor alfa, kao ni u odnosu na taj receptor kada su se pozitivne vrijednosti podijelile u skupine. Stoga se dio hipoteze, da je folatni receptor alfa bitan prognostički čimbenik u trostruko negativnim

karcinomima dojke, samo djelomično potvrdio. Ekspresija toga receptora pokazala se bitnom u predikciji pojave relapsa, no nije se pokazala kao bitna u preživljenju pacijentica.

7. ZAKLJUČCI

S obzirom na postavljenu hipotezu i ciljeve, a temeljem prikazanih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Trostruko negativni karcinomi dojke u velikom broju pokazuju ekspresiju folatnog receptora alfa, te se ista našla u 85 % ispitanica (njih 78) ove studije, što odgovara podacima iz literature.
2. H-score folatnog receptora alfa je imao statistički značajnu povezanost s histološkim tipom karcinoma te ispitanice sa gradusom II karcinoma imaju značajno više vrijednosti od onih sa gradusom III. Nadalje, pokazalo se da je u skupini trostruko negativnih karcinoma dojke H-score folatnog receptora alfa značajno povezan sa Ki-67 proliferacijskim indeksom te rezultati sugeriraju da u TNBC, koji su FR α pozitivni, neki drugi čimbenici određuju maligni potencijal tumora te da on nije vezan za proliferacijsku aktivnost.
3. Zahvaćanje aksilarnih limfnih čvorova u TNBC, unutar ove studije, nije statistički značajno povezano s ekspresijom FR α , što sugerira da ista ne utječe na rano lokoregionalno širenje bolesti.
4. U ovoj studiji nije se našla statistički značajna povezanost ekspresije FR α s limfovaskularnom invazijom. No iako nije statistički značajno, znatno veći broj naših ispitanica, kod kojih nije utvrđena limfovaskularna invazija, imaju pozitivan FR α , što nam sugerira da su, kod FR α pozitivnih, trostruko negativnih karcinoma dojke, za udaljeno širenje bitniji neki drugi parametri, a ne limfovaskularna invazija.
5. Statistički značajne više vrijednosti H-scorea imaju ispitanice koje su imale relaps bolesti te se H-score folatnog receptora pokazao kao značajni prediktor koji utječe na vjerojatnosti pojave relapsa, čime se dijelom potvrđuje hipoteza da se ekspresija folatnog receptora alfa može koristiti kao prognostički čimbenik u trostruko negativnim karcinomima dojke.
6. Nije se našla statistički značajna povezanost ekspresije folatnog receptora alfa sa sveukupnim preživljenjem i preživljenjem bez povrata bolesti, kao ni s jednogodišnjim ni trogodišnjim preživljenjem. S obzirom na to, FR α se ne može koristiti kao pokazatelj

preživljenja u pacijentica s trostruko negativnim karcinomom, barem ne u razdoblju od 3 godine, te bi se ista trebala ispitati za duže razdoblje.

7. Ova studija je pokazala da u trostruko negativnim karcinomima dojke ima varijabilnosti u ekspresiji FR α , te se pokazalo kako se temeljem njega mogu izdvojiti određene skupine pacijenata koje bi se mogle koristiti kao potencijalne ciljne skupine pri razvoju usmjerene terapije za taj fenotip karcinoma.
8. Prognostička se vrijednost ekspresije folatnog receptora alfa u trostruko negativnim karcinomima dojke, u ovoj studiji, uspjela samo djelomično razjasniti. Dok se ekspresija pokazala kao bitna prediktivna vrijednost za vjerojatnost pojave metastaza i/ili recidiva, nije se utvrdila povezanost s preživljenjem. Zbog navedenog, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se prognostički utjecaj FR α podrobnije ispitao.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Folatni receptor alfa (FR α) je protein koji je prekomjerno eksprimiran u različitim tumorima. Pokazao se kao potencijalna prognostička i terapijska meta, ponajprije u karcinomima ovarija i pluća, no isto tako i u karcinomima dojke. Studije su pokazale da je njegova ekspresija viša u trostruko negativnim karcinomima (TNBC) u odnosu na druge fenotipove karcinoma dojke. Stoga je cilj ove studije bio ispitati ekspresiju FR α unutar kohorte pacijenata oboljelih od TNBC, a u korelaciji sa kliničko-patološkim obilježjima i prognostičkim čimbenicima.

Materijali i metode: Učinjeno je imunohistokemijsko bojenje poliklonalnim protutijelom FR α na arhivskim parafinskim blokovima pacijenata s TNBC Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek. Kao pozitivan rezultat ocijenilo se membransko bojenje te se ekspresija izrazila pomoću H-score metode. Statističkim metodama korelirala se ekspresija FR α s kliničko-patološkim parametrima i ishodom, odnosno sveukupnim preživljenjem (OS) i preživljenjem bez povrata bolesti (BCFI).

Rezultati: Većina ispitanica imala je pozitivnu ekspresiju FR α (85 %, 78/92). Dokazana je statistički značajna povezanost ekspresije s histološkim gradusom (Mann Whitney U test, $P=0,03$) i tipom tumora ($P=0,02$). Pearsonovim koeficijentom korelacije uočilo se da uz više vrijednosti proliferacijskog indeksa Ki-67, H-score poprima niže vrijednosti ($r = -0,284$, $P = 0,006$). Multivarijatnom regresijskom analizom (Cox regresija, *Stepwise* metoda) H-score se pokazao kao značajni prediktor koji utječe na vjerojatnosti pojave relapsa bolesti ($OR=1,005$, $P = 0,04$). Nije se dokazala statistički značajna povezanost s OS i BCFI.

Zaključak: FR α je u velikoj mjeri eksprimiran u TNBC te se, s obzirom na povezanost sa pojedinim kliničko-patološkim parametrima, mogu izdvojiti skupine pacijenata koje bi bile potencijalna meta za nove terapijske mogućnosti u liječenju TNBC.

Ključne riječi: folatni receptor alfa; H-score; karcinom dojke; trostruko negativan karcinom dojke

9. SUMMARY

Folate Receptor Alpha Expression in Triple Negative Breast Cancer

Objectives: Folate receptor alpha (FR α) is a protein that is excessively expressed in various tumours. It is shown to be a potential prognostic and therapeutic target, primarily in ovarian and lung cancer, as well as in breast cancer. Studies have shown that its expression is higher in triple negative breast cancer (TNBC), compared to other breast cancer phenotypes, hence the aim of this study was to examine FR α expression in TNBC patient cohort, in correlation with clinicopathological parameters and prognostic factors.

Material and methods: Immunohistochemistry was performed using polyclonal FR α antibody on archival paraffin blocks, from the Department of Pathology and Forensic Medicine, University Hospital Centre Osijek, of patients with TNBC. Membranous staining was deemed positive, and H-score was used to evaluate FR α expression. Statistical analysis correlating FR α expression with clinicopathologic parameters and clinical outcome, overall survival (OS) and disease-free survival (BCFI), were performed.

Results: Most cases showed positive FR α expression (85%, 78/92). Statistically significant correlation of expression and histologic grade (Mann Whitney U test, $P=0,03$), as well as the type of tumour ($P=0,02$), was found. Using the Pearson coefficient of correlation, it was noticed that with higher Ki-67 proliferation index values, H-score has lower values ($r = -0,284$, $P = 0,006$). Multivariant regression analysis (Cox regression, *Stepwise* method) proved H-score to be a significant predictor that affects the probability of disease relapse. ($OR=1,005$, $P = 0,04$). No correlation between FR α expression and OS and BCFI was found.

Conclusion: FR α is greatly expressed in TNBC, and given the correlation with clinicopathological parameters, groups of patients could be identified that would be potential targets for new therapeutic perspectives in the treatment of TNBC.

Keywords: breast cancer; folate receptor alpha; H-score; triple negative breast cancer

10. LITERATURA

1. Breast cancer statistics [Internet]. World Cancer Research Fund. 2018 [cited 2019 Aug 23]. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
3. Šekerija M, Bubanović L, Novak P, Veltruski J, Glibo M, Stavinoha M, et al. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2017., Bilten 42, Zagreb, 2020. (42):37.
4. 191-croatia-fact-sheets.pdf [Internet]. [cited 2019 Aug 23]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/191-croatia-fact-sheets.pdf>
5. Khodarahmi M, Azadbakht L. The association between different kinds of fat intake and breast cancer risk in women. *Int J Prev Med*. 2014 Jan;5(1):6–15.
6. Cancer Statistics, 2017. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Nov 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055103>
7. Hulka BS, Liu ET, Lininger RA. Steroid hormones and risk of breast cancer. *Cancer*. 1994 Aug 1;74(S3):1111–24.
8. Kumle M, Weiderpass E, Braaten T, Persson I, Adami H-O, Lund E. Use of Oral Contraceptives and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomark Amp Prev*. 2002 Nov 1;11(11):1375.
9. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Przegląd Menopauzalny Menopause Rev*. 2015 Sep;14(3):196–202.
10. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2001 Mar 1;2(3):133–40.
11. Chen WY, Colditz GA. Risk factors and hormone-receptor status: epidemiology, risk-prediction models and treatment implications for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Jul;4(7):415–23.
12. Abdulrahman GO Jr, Rahman GA. Epidemiology of breast cancer in europe and Africa. *J Cancer Epidemiol*. 2012/05/27 ed. 2012;2012:915610–915610.
13. Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Aug 1;165(1):193–200.

14. Palacios J, Robles Frías MJ, Castilla MA, López-García MA, Benítez J. The Molecular Pathology of Hereditary Breast Cancer. *Pathobiology*. 2008;75(2):85–94.
15. Levanat S, Levačić Cvok M. MOLEKULARNA OSNOVA RAKA DOJKE VEZANA UZ GENE BRCA1 I BRCA2: KARAKTERISTIKE I CILJANA TERAPIJA. *Liječnički Vjesn*. 2010 Feb 28;132(1–2):34–7.
16. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017 Nov 1;13(11):1387–97.
17. Radford DM, Zehnbauer BA. INHERITED BREAST CANCER. *Surg Clin North Am*. 1996 Apr 1;76(2):205–20.
18. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition - WHO - OMS - [Internet]. [cited 2019 Nov 18]. Available from: <http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4004>
19. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol*. 2015 Dec 21;8:23–31.
20. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 15;10(10):955–60.
21. Fabbri A, Carcangiu ML, Carbone A. Histological Classification of Breast Cancer. In: Bombardieri E, Gianni L, Bonadonna G, editors. *Breast Cancer: Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008. p. 3–14. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-540-36781-9_2
22. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403–10.
23. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010 Jul 30;12(4):207.
24. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010/04/18 ed. 2010 Jun;4(3):192–208.
25. Millar EKA, Graham PH, O'Toole SA, McNeil CM, Browne L, Morey AL, et al. Prediction of Local Recurrence, Distant Metastases, and Death After Breast-Conserving Therapy in Early-Stage Invasive Breast Cancer Using a Five-Biomarker Panel. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 31;27(28):4701–8.
26. Gabos Z, Thoms J, Ghosh S, Hanson J, Deschênes J, Sabri S, et al. The association between biological subtype and locoregional recurrence in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Nov 1;124(1):187–94.

27. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(10):1684–91.
28. Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G. “New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2008 Dec 20;10(12):777.
29. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 May;109(1):123–39.
30. Eliyatkin N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J Breast Health*. 2015 Apr 1;11(2):59–66.
31. Gnant M, Harbeck N, Thomssen C. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care*. 2011 Apr;6(2):136–41.
32. Balic M, Thomssen C, Würtle R, Gnant M, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment. *Breast Care*. 2019;14(2):103–10.
33. Vasconcelos I, Hussainzada A, Berger S, Fietze E, Linke J, Siedentopf F, et al. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *The Breast*. 2016 Oct;29:181–5.
34. Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan;27(1):95–120.
35. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 10;363(20):1938–48.
36. Malorni L, Shetty PB, De Angelis C, Hilsenbeck S, Rimawi MF, Elledge R, et al. Clinical and biologic features of triple-negative breast cancers in a large cohort of patients with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Dec;136(3):795–804.
37. Suresh P, Batra U, Doval DC. Epidemiological and clinical profile of triple negative breast cancer at a cancer hospital in North India. *Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol*. 2013 Apr;34(2):89–95.
38. Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2007/06/20 ed. 2008 May;109(1):123–39.
39. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, et al. Differences in Risk Factors for Breast Cancer Molecular Subtypes in a Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomark Amp Prev*. 2007 Mar 1;16(3):439.

40. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009 Jun;9 Suppl 2(Suppl 2):S73–81.
41. Collett K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE, et al. A Basal Epithelial Phenotype Is More Frequent in Interval Breast Cancers Compared with Screen Detected Tumors. *Cancer Epidemiol Biomark Amp Prev*. 2005 May 1;14(5):1108.
42. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429–34.
43. Curigliano G, Goldhirsch A. The triple-negative subtype: new ideas for the poorest prognosis breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2011;2011(43):108–10.
44. Chacón RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2010/10/22 ed. 2010;12 Suppl 2(Suppl 2):S3–S3.
45. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):790–800.
46. Chen J-Q, Russo J. ER α -Negative and Triple Negative Breast Cancer: Molecular Features and Potential Therapeutic Approaches. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):162–75.
47. Ismail-Khan R, Bui MM. A Review of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Control*. 2010 Jul 1;17(3):173–6.
48. Reddy SM, Barcenas CH, Sinha AK, Hsu L, Moulder SL, Tripathy D, et al. Long-term survival outcomes of triple-receptor negative breast cancer survivors who are disease free at 5 years and relationship with low hormone receptor positivity. *Br J Cancer*. 2017/12/12 ed. 2018 Jan;118(1):17–23.
49. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 May 1;115(2):423–8.
50. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275–81.
51. Heitz F, Harter P, Beutel B, Lück H-J, Traut A, Bois A. Cerebral metastases (CM) in breast cancer (BC) with focus on “triple-negative“ (TN) tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2008 Sep 1;68.
52. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 May 24;28(20):3271–7.
53. Niwińska A, Murawska M, Pogoda K. Breast cancer brain metastases: differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Ann Oncol*. 2010 May 1;21(5):942–8.

54. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2008 Nov 15;113(10):2638–45.
55. Heitz F, Harter P, Beutel B, Lück H-J, Traut A, Bois A. Cerebral metastases (CM) in breast cancer (BC) with focus on “triple- negative“ (TN) tumors. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2008 Sep 1;68.
56. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong Y-N, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012 Nov 15;118(22):5463–72.
57. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2017 Jan 1;161(2):279–87.
58. Chintalapani S, Bala S, Konatam M, Gundeti S, Kuruva S, Hui M. Triple-negative breast cancer: Pattern of recurrence and survival outcomes. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2019;40(1):67–72.
59. Dawood S, Broglio K, Kau S-W, Green MC, Giordano SH, Meric-Bernstam F, et al. Triple receptor-negative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Jan 10;27(2):220–6.
60. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008 Nov 15;113(10):2638–45.
61. Harris LN, Broadwater G, Lin NU, Miron A, Schnitt SJ, Cowan D, et al. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. *Breast Cancer Res BCR*. 2006;8(6):R66–R66.
62. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5678.
63. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329.
64. Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, Garber J, Perou CM, Richardson A, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Risk Factors to Potential Targets. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 15;14(24):8010.
65. Schott AF, Hayes DF. Defining the Benefits of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1747–9.

66. Chen WY, Colditz GA. Risk factors and hormone-receptor status: epidemiology, risk-prediction models and treatment implications for breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2007 Jul;4(7):415–23.
67. AJCC Breast Cancer Staging System.pdf [Internet]. [cited 2019 Oct 6]. Available from: [https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC %20Breast %20Cancer %20Staging %20System.pdf](https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%20Breast%20Cancer%20Staging%20System.pdf)
68. Edge SB, American Joint Committee on Cancer, editors. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010. 648 p.
69. Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*. 1994 May 1;12(5):888–94.
70. ELLIS IO, GALEA M, BROUGHTON N, LOCKER A, BLAMEY RW, ELSTON CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992 Jun 1;20(6):479–89.
71. Frkovic-Grazio S, Bracko M. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol*. 2002 Feb;55(2):88–92.
72. Kollias J, Murphy CA, Elston CW, Ellis IO, Robertson JFR, Blamey RW. The prognosis of small primary breast cancers. *Eur J Cancer*. 1999 Jun 1;35(6):908–12.
73. Ovcaricek T, Frkovic SG, Matos E, Mozina B, Borstnar S. Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. *Radiol Oncol*. 2011 Mar;45(1):46–52.
74. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009 Nov 9;20(12):1913–27.
75. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009 Jun;9 Suppl 2(Suppl 2):S73–81.
76. Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer*. 2004 Jan 1;100(1):20–7.
77. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer*. 1989 Jan 1;63(1):181–7.
78. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*. 2009 Sep 1;45:27–40.
79. Patohistološka analiza aksilarnih limfnih čvorova s posebnim osvrtom na postupak kod biopsije “sentinel” limfnog čvora [Internet]. [cited 2019 Nov 21]. Available from: <https://dizbi.hazu.hr/a/?pr=i&id=194448>

80. Tominaga T, Takashima S, Danno M. Randomized clinical trial comparing level II and level III axillary node dissection in addition to mastectomy for breast cancer. *BJS Br J Surg*. 2004 Jan 1;91(1):38–43.
81. Goldstein NS, Mani A, Vicini F, Ingold J. Prognostic Features in Patients with Stage T1 Breast Carcinoma and a 0.5-cm or Less Lymph Node Metastasis: Significance of Lymph Node Hilar Tissue Invasion. *Am J Clin Pathol*. 1999 Jan 1;111(1):21–8.
82. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 1997;47(1):28–51.
83. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn H-J. Meeting Highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2001 Sep 15;19(18):3817–27.
84. Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A, Hartmann WH, Hollaway L, Russell I, et al. Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol*. 1985 Dec 1;16(12):1212–8.
85. Rakha EA, Martin S, Lee AHS, Morgan D, Pharoah PDP, Hodi Z, et al. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2012 Aug 1;118(15):3670–80.
86. Rosen's Breast Pathology | Syed A. Hoda MD, Edi Brogi MD PHD, Frederick C. Koerner MD, Paul Peter Rosen MD | download [Internet]. [cited 2019 Nov 21]. Available from: <https://id.b-ok2.org/book/2529093/7a12ca>
87. Scawn R, Shousha S. Morphologic Spectrum of Estrogen Receptor–Negative Breast Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Mar 1;126(3):325–30.
88. Kreiger N, King WD, Rosenberg L, Clarke EA, Palmer JR, Shapiro S. Steroid receptor status and the epidemiology of breast cancer. *Ann Epidemiol*. 1991 Nov 1;1(6):513–23.
89. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of Tissue Estrogen and Progesterone Receptor Levels: A Survey of Current Practice, Techniques, and Quantitation Methods. *Breast J*. 2000 May 1;6(3):189–96.
90. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*. 2004 Jan 11;9(6):606–16.
91. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E, et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol*. 2002 Jan 1;196(1):17–25.
92. Schnitt SJ. Breast Cancer in the 21st Century: New Opportunities and New Challenges. *Mod Pathol*. 2001 Mar 1;14(3):213–8.

93. Borg Å, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Fernö M, Fuqua SAW, et al. HER-2/*neu* Amplification Predicts Poor Survival in Node-positive Breast Cancer. *Cancer Res.* 1990 Jul 15;50(14):4332.
94. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, Paterson AHG, Lees AW, Jamil N, et al. Correlation between c-*erbB*-2 Amplification and Risk of Recurrent Disease in Node-negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 1991 Jan 15;51(2):556.
95. Clark GM, McGuire WL. Follow-up Study of HER-2/*neu* Amplification in Primary Breast Cancer. *Cancer Res.* 1991 Feb 1;51(3):944.
96. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010 Feb 1;11(2):174–83.
97. Aleskandarany MA, Rakha EA, Macmillan RD, Powe DG, Ellis IO, Green AR. MIB1/Ki-67 labelling index can classify grade 2 breast cancer into two clinically distinct subgroups. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jun 1;127(3):591–9.
98. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2013 Sep;24(9):2206–23.
99. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol.* 2010 Apr 20;4:15–34.
100. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007 May 21;96(10):1504–13.
101. Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012 Aug 1;15(4):183–210.
102. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr.* 2011 Aug 21;31:177–201.
103. Ledermann JA, Canevari S, Thigpen T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Ann Oncol.* 2015 Jun 10;26(10):2034–43.
104. Assaraf YG, Leamon CP, Reddy JA. The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment. *Drug Resist Updat.* 2014 Oct 1;17(4):89–95.
105. Matherly LH, Goldman ID. Membrane Transport of Folates. In: *Vitamins & Hormones* [Internet]. Academic Press; 2003. p. 403–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672903010124>

106. FOLR1 - Folate receptor alpha precursor - Homo sapiens (Human) - FOLR1 gene & protein [Internet]. [cited 2020 May 21]. Available from:
https://www.uniprot.org/uniprot/P15328#pathology_and_biotech
107. Kelemen LE. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer*. 2006 Jul 15;119(2):243–50.
108. Salazar MD, Ratnam M. The folate receptor: What does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Mar 1;26(1):141–52.
109. Rothberg KG, Ying YS, Kolhouse JF, Kamen BA, Anderson RG. The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol*. 1990 Mar;110(3):637–49.
110. Sabharanjak S, Mayor S. Folate receptor endocytosis and trafficking. *Folate Recept-Target Drugs Cancer Inflamm Dis*. 2004 Apr 29;56(8):1099–109.
111. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Folate Recept-Target Drugs Cancer Inflamm Dis*. 2004 Apr 29;56(8):1067–84.
112. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem*. 2005 Mar 15;338(2):284–93.
113. Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, Tran C, Maltzman JD, O'Shannessy DJ, et al. Significance of folate receptor alpha and thymidylate synthase protein expression in patients with non-small-cell lung cancer treated with pemetrexed. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2013 Jan;8(1):19–30.
114. Crane LMA, Arts HJG, van Oosten M, Low PS, van der Zee AGJ, van Dam GM, et al. The effect of chemotherapy on expression of folate receptor-alpha in ovarian cancer. *Cell Oncol Dordr*. 2012 Feb;35(1):9–18.
115. Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Nov 21]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146749>
116. Nunez MI, Behrens C, Woods DM, Lin H, Suraokar M, Kadara H, et al. High expression of folate receptor alpha in lung cancer correlates with adenocarcinoma histology and EGFR [corrected] mutation. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2012 May;7(5):833–40.
117. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer*. 1997 Apr 22;74(2):193–8.

118. Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR, et al. Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues. *Cancer Res.* 1992 Jun 15;52(12):3396.
119. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer.* 1997 Apr 22;74(2):193–8.
120. Siu MKY, Kong DSH, Chan HY, Wong ESY, Ip PPC, Jiang L, et al. Paradoxical impact of two folate receptors, FR α and RFC, in ovarian cancer: effect on cell proliferation, invasion and clinical outcome. *PloS One.* 2012/11/07 ed. 2012;7(11):e47201–e47201.
121. O’Shannessy DJ, Yu G, Smale R, Fu Y-S, Singhal S, Thiel RP, et al. Folate Receptor Alpha Expression in Lung Cancer: Diagnostic and Prognostic Significance. *Oncotarget.* 2012 Apr 29;3(4):414–25.
122. Iwakiri S, Sonobe M, Nagai S, Hirata T, Wada H, Miyahara R. Expression Status of Folate Receptor α Is Significantly Correlated with Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancers. *Ann Surg Oncol.* 2008 Mar 1;15(3):889–99.
123. Bagnoli M, Tomassetti A, Figini M, Flati S, Dolo V, Canevari S, et al. Downmodulation of caveolin-1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to α -folate receptor overexpression. *Oncogene.* 2000 Sep 1;19(41):4754–63.
124. Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson MK, et al. Premenopausal Breast Cancer Risk and Intake of Vegetables, Fruits, and Related Nutrients. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 1996 Mar 20;88(6):340–8.
125. Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, et al. A Prospective Study of Folate Intake and the Risk of Breast Cancer. *JAMA.* 1999 May 5;281(17):1632–7.
126. Shrubsole MJ, Jin F, Dai Q, Shu X-O, Potter JD, Hebert JR, et al. Dietary Folate Intake and Breast Cancer Risk. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7136.
127. Ericson U, Sonestedt E, Gullberg B, Olsson H, Wirfält E. High folate intake is associated with lower breast cancer incidence in postmenopausal women in the Malmö Diet and Cancer cohort. *Am J Clin Nutr.* 2007 Aug 1;86(2):434–43.
128. Miller JW, Borowsky AD, Marple TC, McGoldrick ET, Dillard-Telm L, Young LJT, et al. Folate, DNA methylation, and mouse models of breast tumorigenesis. *Nutr Rev.* 2008 Aug;66 Suppl 1(0 1):S59–64.
129. Necela BM, Crozier JA, Andorfer CA, Lewis-Tuffin L, Kachergus JM, Geiger XJ, et al. Folate Receptor- α (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2016 Aug 20];10(3). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4376802/>

130. O'Shannessy DJ, Somers EB, Maltzman J, Smale R, Fu Y-S. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. SpringerPlus. 2012 Sep 28;1:22–22.
131. Zhang Z, Wang J, Tacha DE, Li P, Bremer RE, Chen H, et al. Folate receptor α associated with triple-negative breast cancer and poor prognosis. Arch Pathol Lab Med. 2014 Jul;138(7):890–5.
132. Scaranti M, Cojocaru E, Banerjee S, Banerji U. Exploiting the folate receptor α in oncology. Nat Rev Clin Oncol [Internet]. 2020 Mar 9; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0339-5>
133. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, Gray RJ, Pritchard KI, Chapman J-AW, et al. Proposal for Standardized Definitions for Efficacy End Points in Adjuvant Breast Cancer Trials: The STEEP System. J Clin Oncol [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2020 May 17]; Available from: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/JCO.2006.10.3523>
134. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. J Clin Pathol. 1995 Sep;48(9):876–8.
135. Nunez MI, Behrens C, Woods DM, Lin H, Suraokar M, Kadara H, et al. High Expression of Folate Receptor Alpha in Lung Cancer Correlates with Adenocarcinoma Histology and Mutation. J Thorac Oncol. 2012 May 1;7(5):833–40.
136. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. Clin Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1368.
137. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. JAMA. 2006 Jun 7;295(21):2492–502.
138. Fisher E, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. Cancer. 2001 Apr;91(8 Suppl):1679–87.
139. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma. Cancer. 2006 Feb 15;106(4):743–50.
140. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. Virchows Arch. 2005 Oct 1;447(4):688–94.
141. Penault-Llorca F, Radosevich-Robin N. Ki67 assessment in breast cancer: an update. Pathology (Phila). 2017 Feb 1;49(2):166–71.

142. Mohammed RA, Martin SG, Mahmmod AM, Macmillan RD, Green AR, Paish EC, et al. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: findings from a large case series with long-term follow-up. *J Pathol.* 2011 Feb 1;223(3):358–65.
143. Hartmann LC, Keeney GL, Lingle WL, Christianson TJH, Varghese B, Hillman D, et al. Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *Int J Cancer.* 2007 Sep 1;121(5):938–42.
144. Tacha D, Bremer R. Folate Receptor alpha is Frequently Expressed in Triple Negative Breast Cancers. :4.
145. Aboulhagag NAE, Torky RF, Fadel SA. Folate receptor α is associated with poor clinicopathological perspectives in breast carcinoma. *Pathophysiology.* 2018 Mar 1;25(1):71–6.
146. Ginter PS, McIntire PJ, Cui X, Irshaid L, Liu Y, Chen Z, et al. Folate Receptor Alpha Expression Is Associated With Increased Risk of Recurrence in Triple-negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2017 Nov 1;17(7):544–9.
147. Cui X, McIntire PJ, Ginter PS, Irshaid L, Chen Z, Shin SJ. Abstract P4-12-14: Folate receptor alpha (FOLR1) expression in triple-negative breast cancer (TNBC). *Cancer Res.* 2017 Feb 15;77(4 Supplement):P4-12-14-P4-12-4.
148. Norton N, Youssef B, Hillman DW, Nassar A, Geiger XJ, Necela BM, et al. Folate receptor alpha expression associates with improved disease-free survival in triple negative breast cancer patients. *Npj Breast Cancer.* 2020 Feb 4;6(1):4.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Irena Zagorac (rođ. Fröhlich)

Datum i mjesto rođenja: 02. 09. 1988., Osijek, Hrvatska

Adresa stanovanja: Vijenac Ivana Meštrovića 44, 31000 Osijek

Školovanje:

2016.–danas – Poslijediplomski doktorski studij: Biomedicina i zdravstvo; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska

2006–2013. Sveučilišni integrirani preddiplomski i diplomski studij medicine; Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska

2002–2006. srednjoškolsko obrazovanje; II. gimnazija Osijek, Osijek, Hrvatska

Radno iskustvo:

2016.–danas – Specijalizant patologije i citologije; KBC Osijek, Osijek, Hrvatska

2014–2016. – Liječnik opće medicine; Dom zdravlja Osijek, Osijek, Hrvatska

2013–2014. – Pripravnički staž doktora medicine; Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska

Radno mjesto: Klinički bolnički centar Osijek

Klinički zavod za patologiju i sudsku medicinu

J. Huttlera 4, 31000 Osijek, Hrvatska

E-mail: irena.zagorac88@gmail.com

Nastavna aktivnost:

2017.–danas – Asistent na Katedri za patološku anatomiju i sudsku medicinu

2017. – izbor u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstveno polje kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana patologija na Katedri za patologiju i sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Nagrade:

2019 – Dekanova nagrada za godišnji seminarski rad *Correlation of folate receptor alpha expression with clinicopathological parameters in triple negative breast cancer*

Članstva:

- od 2013. Hrvatska liječnička komora
- od 2018. Hrvatski liječnički zbor
- od 2018. Hrvatsko društvo patologa i sudskih medicinarara
- 2018. Hrvatsko onkološko društvo
- 2019. Pulmonary Pathology Society

Znanstvena i stručna aktivnost:

Objavljeni radovi:

1. Rajc J, Gugić D, **Fröhlich I**, Marjanović K, Dumenčić B. Prognostic role of Nectin-4 expression in luminal B (HER2 negative) breast cancer. *Pathol - Res Pract*. 2017 Sep;213(9):1102–8
2. Rajc J, **Fröhlich I**, Mrčela M, Tomaš I, Flam J. Prognostic Impact of Low Estrogen and Progesterone Positivity in Luminal B (HER2 Negative) Breast Cancer. *Acta clinica Croatica* <https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.03.04>

Kongresna priopćenja:

1. **Zagorac, Irena**; Dmitrović, Branko; Kovačević, Andrej - PD-L1 Testing in University Hospital Centre Osijek // 27th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology with One Health Session. Final Program & Book of Abstracts, Zagreb: conTres projekti d.o.o., 2019. str. 50-50
2. **Zagorac, Irena**; Dmitrović, Branko - Inflammatory Fibroid Polip - Two Case Reposts // 27th Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology with One Health Session. Final program & Book of Abstracts, Zagreb: conTres projekti d.o.o., 2019. str. 49-49
3. **Fröhlich I**; Kovačević A, Pauzar B, Staklenac B, Perić M, Vrselja N, Miličić V, Lončar B. - Dijagnostička vrijednost citologije žarišnih promjena u jetri i gušterači – usporedba sa patohistološkim nalazom // 5. hrvatski kongres kliničke citologije, 2. hrvatski simpozij analitičke citologije, 3. Hrvatski simpozij citotehnologije s međunarodnim sudjelovanjem. Knjiga sažetaka/Abstract book str. 162-162
4. Ladenhauser, Tatjana; **Fröhlich, Irena**; Dmitrović, Branko; Tomaš, Ilijan; Erić, Suzana Metastatic Soft Tissue Sarcoma Outcomes – Single Institutional Experience // *Archive of Oncology*. Volume 25. Supplement 1. May 2019 / Četojević-Simin, Dragana (ur.). Sremska Kamenica: Oncology Institute of Vojvodina, 2019. str. 53-5

5. **Zagorac, Irena;** Lončar, Ana; Dmitrović, Branko - Cytodiagnostics of pancreatic neuroendocrine tumor: a case report // 2nd International Translational Medicine COngress of Students and Young Physicians. Book of Abstracts, Osijek, 2020. str. 39-39
6. **Zagorac, Irena;** Lončar, Ana - Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions // 2nd International Translational Medicine COngress of Students and Young Physicians. Book of Abstracts, Osijek, 2020. str. 85-85