

# Prognostička vrijednost 8-oksodG u invazivnom karcinomu dojke (NOS)

---

**Jakovčević, Danica**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:274395>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Danica Jakovčević

PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST 8-OXSODG U INVAZIVNOM  
KARCINOMU DOJKE (NOS)

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za patologiju i citologiju  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditeljica rada je prof. dr. sc. Jasminka Jakić-Razumović.

Zahvala

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasminki Jakić-Razumović na  
izvrsnoj suradnji, strpljenju i nesebičnoj podršci pri izradi ovog rada.*

## SADRŽAJ

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                           | 1  |
| 1.1. Epidemiološki podaci o karcinomu dojke.....                       | 1  |
| 1.2. Čimbenici rizika.....                                             | 2  |
| 1.3. Dijagnostika karcinoma dojke.....                                 | 4  |
| 1.4. Klasifikacija karcinoma dojke.....                                | 5  |
| 1.4.1. TNM klasifikacija karcinoma dojke.....                          | 5  |
| 1.4.2. Patohistološka klasifikacija karcinoma dojke.....               | 6  |
| 1.4.3. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke.....                  | 7  |
| 1.4.4. Imunohistokemijska klasifikacija karcinoma dojke.....           | 8  |
| 1.5. Prognostički i prediktivni čimbenici raka dojke.....              | 9  |
| 1.5.1. Veličina tumora.....                                            | 9  |
| 1.5.2. Histološki tip tumora.....                                      | 10 |
| 1.5.3. Stupanj diferenciranosti tumora.....                            | 10 |
| 1.5.4. Status limfnih čvorova.....                                     | 10 |
| 1.5.5. Hormonski receptori.....                                        | 11 |
| 1.5.6. HER2 status.....                                                | 11 |
| 1.5.7. Proliferacijski indeks Ki-67.....                               | 12 |
| 1.5.8. Limfovaskularna invazija.....                                   | 12 |
| 1.5.9. Molekularni profil tumora.....                                  | 13 |
| 1.6. Liječenje karcinoma dojke.....                                    | 14 |
| 1.6.1. Liječenje karcinoma dojke adjuvantnom kemoterapijom.....        | 15 |
| 1.6.2. Liječenje karcinoma dojke adjuvantnom endokrinom terapijom..... | 15 |
| 1.6.3. Liječenje tamoksifenom.....                                     | 16 |
| 1.6.4. Inhibitori aromataza.....                                       | 16 |
| 1.7. Oksidacijski stres.....                                           | 17 |
| 1.7.1. Slobodni radikali.....                                          | 17 |
| 1.7.2. Oksidacijski stres.....                                         | 18 |
| 1.7.3. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS).....                           | 18 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.4. Slobodni radikali dušika.....                                                             | 19 |
| 1.7.5. 8-okso-2-deoksigvanozin (8-oksodG).....                                                   | 20 |
| 1.7.6. Oksidacijski stres i karcinogeneza.....                                                   | 22 |
| 1.7.7. Oksidacijski stres i karcinom dojke.....                                                  | 24 |
| 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....                                                          | 27 |
| 2.1. Ciljevi istraživanja.....                                                                   | 27 |
| 2.2 Hipoteza.....                                                                                | 27 |
| 3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA.....                                                         | 29 |
| 3.1. Ispitanice.....                                                                             | 29 |
| 3.2. Metode.....                                                                                 | 30 |
| 3.2.1. Histološka analiza.....                                                                   | 30 |
| 3.2.2. Tkivni mikročipovi i imunohistokemijsko određivanje 8-oksodG.....                         | 35 |
| 3.3. Statistički postupci.....                                                                   | 37 |
| 4. REZULTATI.....                                                                                | 38 |
| 4.1. Obilježja ispitanica.....                                                                   | 38 |
| 4.2. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i ostalih ispitivanih obilježja.....               | 45 |
| 4.2.1. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i molekularnih podtipova karcinoma<br>dojke..... | 45 |
| 4.2.2. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i patohistoloških karakteristika<br>tumora.....  | 48 |
| 4.3. Ocjenjivanje specifičnog mortaliteta za karcinom dojke.....                                 | 50 |
| 4.4. Analiza preživljenja.....                                                                   | 55 |
| 4.4.1. Ukupno preživljenje.....                                                                  | 55 |
| 4.4.2. Preživljenje bez znakova bolesti.....                                                     | 62 |
| 5. RASPRAVA.....                                                                                 | 70 |
| 6. ZAKLJUČCI.....                                                                                | 76 |
| 7. SAŽETAK.....                                                                                  | 78 |
| 8. SUMMARY.....                                                                                  | 79 |
| 9. LITERATURA.....                                                                               | 80 |
| 10. ŽIVOTOPIS.....                                                                               | 90 |

## POPIS SKRAĆENICA

AP-1- aktivator proteina 1

BRCA1- gen karcinoma dojke 1 (eng. breast cancer gene 1)

BRCA2- gen karcinoma dojke 2 (eng. breast cancer gene 2)

DNA- deoksiribonukleinska kiselina

ER- estrogenski receptor (eng. estrogen receptor)

HER2- receptor za humani epidermalni faktor rasta 2 (eng. human epidermal growth factor receptor 2)

HIF-1- hipoksijom inducirani faktor 1 (eng. hypoxia inducible factor-1)

HZJZ- Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IARC- Internacionalna agencija za istraživanje raka

MAPK- protein kinaza aktivirana mitogenom

MR- magnetska rezonanca

MMP1- matriksna metaloproteinaza 1

MMP2- matriksna metaloproteinaza 2

NADPH- reducirani oblik nikotinamid adenin dinukleotid fosfata

NADPH oksidaza- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza

NF- $\kappa$ B- nuklearni faktor-kappa B

Nrf2- nuklearni faktor eritroidni faktor 2-povezan faktor 2

OGG1- DNA glikozilaza 1

8-oksodG- 8-okso2'-deoksigvanozin (eng. 8-oxo2'-deoxyguanosine)

8-OHdG- 8-hidroksi2'-deoksigvanozin (eng. 8-hydroxy2'-deoxyguanosine)

PR- progesteronski receptor (eng. progesteron receptor)

ROS- reaktivni kisikovi spojevi (eng. reactive oxygen species)

SOD- superoksid dismutaza

TMA- tkivni mikročipovi (eng. tissue microarrays)

TNBC- trostruko negativni karcinom dojke (eng. triple negative breast cancer)

TNF- $\alpha$ - faktor nekroze tumora  $\alpha$

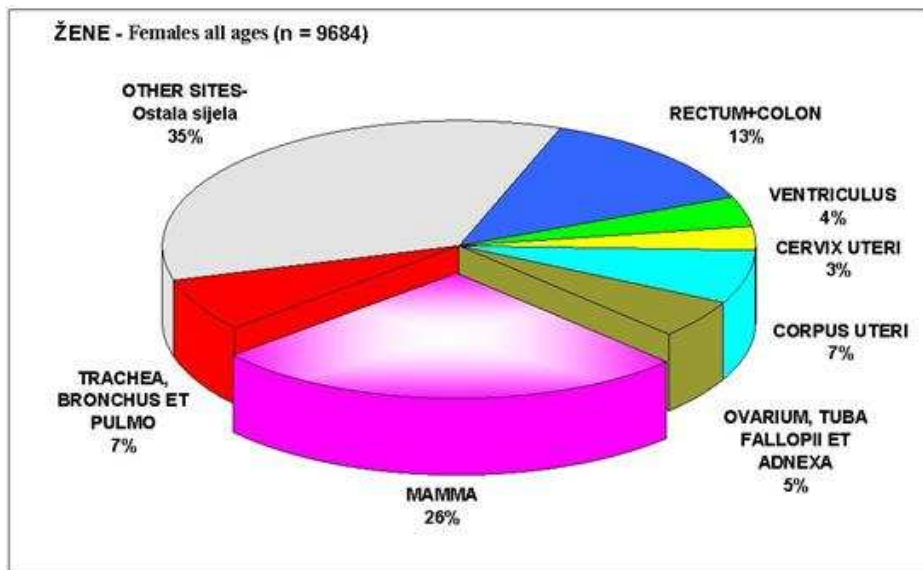
VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta (eng. vascular endothelial growth factor)

## **1. UVOD**

### **1.1. EPIDEMIOLOŠKI PODACI O KARCINOMU DOJKE**

Karcinom dojke je najučestalija zloćudna bolest u žena. Prema podacima IARC-a (International Agency for Research on Cancer), 2012. u svijetu je novootkriveno 1,677.000 novih slučajeva, što čini 25% svih novooboljelih od maligne bolesti. U razvijenim zemljama incidencija raka dojke kod žena je 28%, a mortalitet 15.4%, dok je u slabo razvijenim zemljama incidencija 23%, a mortalitet 14,3%. U Japanu i Kini se bilježi incidencija 19% i 15,1 %, što je među najnižima u svijetu. Ove zemljopisne različitosti dijelom se povezuju sa socioekonomskim, reproduktivnim i dijetalnim čimbenicima. Karcinom dojke je najčešći uzrok smrti od malignih tumora u žena, podjednako u razvijenim zemljama kao i u zemljama u razvoju s mortalitetom od 12.9/100000 žena (1).

Dojka je najčešće sjelo maligne bolesti kod žena u Hrvatskoj. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2010. rak dojke čini 26% novooboljelih zloćudnih tumora u žena (2) (Slika 1). U Hrvatskoj od raka dojke obolijeva svaka 11. žena, rijetko prije 20. godine, a najčešće između 55. i 70. godine života. Premda prevladava kod žena, ova bolest se može javiti i kod muškaraca, iako vrlo rijetko, točnije u 1:100 svih karcinoma (2).



Slika 1. Najčešća sjela raka u žena u 2010. godini (Preuzeto iz: HZJZ, Registar za rak, Incidencija raka u Hrvatskoj 2009, Bilten br. 35).

U 2010. u Hrvatskoj je zabilježeno 2513 novooboljelih od raka dojke, od toga 2492 žene (109/100000) i 21 muškarac, s najvećom učestalošću između 55. i 69. godine. Incidencija i mortalitet raka dojke u Hrvatskoj su u stalnom porastu te je vodeći uzrok smrti od malignih tumora u žena, iako se zadnjih godina bilježi stabilizacija trenda mortaliteta. Moguće objašnjenje za porast incidencije u Hrvatskoj su veća prevalencija rizičnih faktora povezanih sa stilom života. Tako je, npr. broj pretilih žena s 42.9% 1997. porastao na 58.2% u 2003. Porasla je i srednja dob žene kod prvog poroda s 23.5 u 1960. na 27.4 godina u 2009. Također na incidenciju vjerojatno utječe veća konzumacija alkohola, hormonska nadomjesna terapija i oralni kontraceptivi (3).

## 1.2. ČIMBENICI RIZIKA

Rak dojke je heterogena bolest uvjetovana kombinacijom urođenih i okolišnih čimbenika. Potomci migrantica koje dolaze iz zemalja s niskom stopom raka dojke stječu već nakon treće generacije višestruko povišeni rizik za nastanak karcinoma dojke koji odgovara novoj zemlji. Ovo nesumnjivo upućuje na utjecaj ekoloških čimbenika i stila življenja na etiologiju raka dojke. Udio genetskog opterećenja, kao i točan udio ekoloških čimbenika, u većini je



slučajeva teško ustanoviti. Poznati čimbenici rizika karcinoma dojke su spol, dob, genetika, hormonski i reproduktivni čimbenici, biološki biljezi u tkivu dojke, način života i prehrana (4-5). Dob je glavni rizični čimbenik za obolijevanje od karcinoma dojke. Pozitivna obiteljska anamneza, odnosno podatak o pojavnosti karcinoma dojke kod bližih srodnika u obitelji povećava rizik od oboljenja, naročito u žena ispod 40 godina. Rizik je povećan i u slučaju obiteljske anamneze karcinoma jajnika.

Urođeni karcinom dojke čini 5-10% karcinoma dojke i nasljeđuje se autosomno dominantno s varijabilnom penetrantnosti. Za 25% nasljednih tumora dojke odgovorne su mutacije dvaju gena supresora tumora BRCA1 i BRCA2 na kromosomu 17 i 13, čiji produkti su uključeni u održavanje integriteta DNA i regulaciju transkripcije. Gubitak njihove transkripcije vodi genskoj nestabilnosti (6). Ove mutacije su prisutne u <1% opće populacije, ali se češće javljaju u određenim etničkim skupinama kao, npr. kod ženske populacije Aškenazi Židova. Žene nositelji mutacije BRCA1 i BRCA2 imaju 90% šanse za razvoj karcinoma dojke za vrijeme života (do 85. godine). Reproductivni faktori povezani s povećanim rizikom za rak dojke su: rana menarha ( $\leq 11$  godina), kasna menopauza ( $> 55$  godina), starija dob kod prvog poroda (iza 30. godine) i nuliparitet. Ti faktori doprinose produljenoj ekspoziciji endogenog estrogena kod žena u premenopauzi, dok pretilost i hormonska nadomjesna terapija povisuju razinu estrogena u postmenopauzi. Povećani rizik kod adipoznih žena je vjerojatno zbog konverzije androgena u estrogene u masnom tkivu. Korištenje hormonske nadomjesne terapije s kombinacijom estrogena i progestina povećava rizik razvoja i umiranja od karcinoma dojke kod višegodišnje upotrebe, ali ne manje od 5 godina (7-8). Povećani rizik se smanjuje unutar 5 godina od prestanka uzimanja hormona. Drugi faktori koji značajno podižu rizik su fizička neaktivnost i konzumacija alkohola. Medicinski nalazi koji predviđaju rizik su gušće tkivo dojke na mamogramu, povećana mineralna gustoća kostiju i biopsijom potvrđena hiperplazija, posebno atipična hiperplazija epitela dojke. Prethodna dijagnoza neinvazivnog karcinoma dojke (duktalnog ili lobularnog) 8-10 puta povećava rizik za nastanak raka dojke. Žene već liječene od invazivnog karcinoma dojke imaju 4 puta veći rizik javljanja karcinoma u kontralateralnoj dojci (9). Izlaganje prsa velikim dozama zračenja kod radioterapije također povećava rizik razvoja raka dojke. Sve veća pozornost se usmjerava na utjecaj prehrane na razvoj karcinoma. Razlike u incidenciji između pojedinih zemalja ukazuju da bi visoki unos zasićenih masnih kiselina u hrani mogao biti povezan s povećanim rizikom za obolijevanje.

Sadašnje spoznaje govore u prilog tomu da je unos nezasićenih masnih kiselina iz maslinovog ulja u kombinaciji s prehranom bogatom povrćem i voćem (mediteranska dijeta), povezan s niskim rizikom nastanka karcinoma dojke. Alkohol je dobro potvrđen rizik u nastanku karcinoma dojke. Eksperimentalno pojačava staničnu proliferaciju, kao i broj estrogenskih receptora ( $ER\alpha$ ) u tumorskim stanicama te je pretpostavljen mehanizam djelovanja porast razine endogenih estrogena (10).

### **1.3. DIJAGNOSTIKA**

Otkrivanje tumora u ranoj fazi povećava mogućnost izlječenja, smanjuje mortalitet i utječe na odabir liječenja (11). Osnovnu dijagnostiku karcinoma dojke čine: klinički pregled, ultrazvuk, mamografija te tkivna analiza (citološka punkcija i perkutana biopsija širokom iglom). Klinički pregled je osnovna dijagnostička metoda i savjetuje se jednom godišnje ženama starijim od 35 godina. Mamografija je još uvijek zlatni standard. Može otkriti karcinom dojke u ranom stadiju kad su i veći izgledi za izlječenje. Mamografiju se savjetuje učiniti od 40. godine ili ranije kod rizičnih skupina. Mamografiju treba ponavljati svake dvije godine, tj. svake godine od 50. godine života, a rizične skupine od 35. godine (12).

Mamografijom se otkriva 80-90% karcinoma dojke kod žena bez simptoma. Sve suspektne lezije treba biopsirati za definitivnu dijagnozu. Redovite mamografije smanjuju mortalitet od raka dojke u žena od 50 do 69 godina za 30% (13). Ultrazvuk se koristi kao komplementarna dijagnostička metoda uz mamografiju za razlučivanje promjena u mamografski gustim dojkama, procjenu cističnih promjena i intervencijske zahvate (npr. markacija tumora žicom). Magnetska rezonanca (MR) se koristi kao komplementarna metoda u odabrane skupine žena. Najveća vrijednost MR-e je u razlučivanju ožiljnog tkiva od povrata bolesti u prethodno liječenih žena. MR-u je indicirano učiniti kod pošteđenog zahvata te kod žena s povećanim rizikom za karcinom dojke. Preporuča se da žene s povećanim rizikom (20-25%) za dobivanje karcinoma dojke od tridesete godine provode skrining s MR-om uz godišnju mamografiju (14).

## 1.4. KLASIFIKACIJA KARCINOMA DOJKE

### 1.4.1. TNM Klasifikacija

Za prognozu i liječenje karcinoma dojke, osim histopatološke slike, važno je i znati klinički stadij proširenosti tumora. Za određivanje kliničkog stadija najčešće se koristi TNM klasifikacija. Klasifikacija opisuje veličinu tumora (T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova (N) i postojanje udaljenih metastaza (M) (15).

- **T-primarni tumor**

- Tx: primarni tumor se ne može odrediti
- T0: ne može se dokazati primarni tumor
- Tis: neinvazivni (in situ karcinom)
- T1: tumor dojke promjera do 2 cm
  - T1mic: mikroinvazija  $\leq 0.1$  cm
  - T1a: tumor  $>0.1$  cm, ali  $\leq 0.5$  cm
  - T1b: tumor  $>0.5$  cm, ali  $\leq 1$  cm
  - T1c: tumor  $>1$  cm, ali  $\leq 2$  cm
- T2: tumor dojke promjera  $>2$  cm, ali  $\leq 5$  cm
- T3: tumor dojke promjera  $>5$  cm
- T4: tumor dojke bilo koje veličine s izravnim širenjem na torakalnu stijenku ili kožu
  - T4a: tumor se širi na torakalnu stijenku, ne zahvaća pektoralni mišić
  - T4b: edem kože (uključuje tzv. izgled poput narančine kore) ili ulceracija kože dojke ili stvara satelitske kožne čvoriće ograničene na istu dojku
  - T4c: oboje (T4a i T4b)
  - T4d: inflamirani karcinom dojke

- **N-regionalni limfni čvorovi (ipsilateralni)**

- Nx: regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti (prethodno odstranjeni ili nisu vađeni)

- N0: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
- N1: metastaze u pomičnim aksilarnim limfnim čvorovima
- N2: metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima koji su međusobno ili u odnosu na okolinu fiksirani
- N3: metastaze u istostranim infraklavikularnim, unutrašnjim mamarnim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima
- **M-udaljene metastaze**
  - M0: bez udaljenih metastaza
  - M1: prisutne udaljene metastaze

### **Klinički stadiji karcinoma dojke**

Na temelju klasifikacije, tj. na osnovu proširenosti bolesti, karcinom dojke se stupnjuje u četiri stadija:

- Stadij 0: Tis
- Stadij IA: T1, N0, M0
- Stadij IB: T0-1, N1mi, M0
- Stadij IIA: T0-1, N1, M0 ili T2, N0, M0
- Stadij IIB: T2, N1, M0 ili T3, N0, M0
- Stadij IIIA: T0-3, N2, M0 ili T3, N1-2, M0
- Stadij IIIB: T4 bilo koji N, M0
- Stadij IIIC: bilo koji T, N3, M0
- Stadij IV: bilo koji T, bilo koji N, M1

### **1.4.2. Patohistološka klasifikacija**

Tumori dojke mogu biti benigni i maligni. Histogenetski, tumori nastaju iz epitela ili strome. Zloćudni tumori dojke najčešće su epitelnog podrijetla (karcinomi). Karcinomi nastaju monoklonskom proliferacijom epitela terminalnih kanalića ili duktulo-lobularnih jedinica. S obzirom na odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani, karcinomi mogu biti neinvazivni (ne prelaze bazalnu membranu) ili invazivni (prelaze bazalnu membranu). Na

osnovu histoloških karakteristika invazivni karcinomi dojke se prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije dijele u različite podtipove (16):

- Invazivni karcinom bez posebne oznake
- Invazivni lobularni karcinom
- Tubularni karcinom
- Kribriformni karcinom
- Mucinozni karcinom
- Karcinom s medularnim značajkama
- Karcinom s apokrinom diferencijacijom
- Karcinom s diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka
- Invazivni mikropapilarni karcinom
- Metaplastični karcinom bez posebne oznake
- Ostali rijetki podtipovi

Najčešći tip raka dojke je invazivni karcinom bez posebne oznake (NOS) koji čini preko 80 % svih karcinoma dojke. Zatim slijede invazivni lobularni karcinom (10%) te karcinom s medularnim značajkama (5%).

#### **1.4.3. Molekularna klasifikacija**

Tehnologija DNA mikročipova koja omogućava simultano mjerenje aktivnosti tisuća gena je pokazala da rak dojke nije jedinstvena bolest nego se može podijeliti u nekoliko podtipova koji se razlikuju po genskom izražaju, odgovoru na terapiju i prognozi (17-18). Geni koji diferenciraju ove podtipove se zovu intrinzični geni i sastoje se od nekoliko skupina gena koji se odnose na ekspresiju ER, HER2 ekspresiju, proliferaciju te posebna skupina gena koji se zovu bazalna grupa. Luminalni podtip čine hormonski ovisni tumori i može ih se podijeliti u 2 podskupine: luminalni tip A i B. Luminalni A tip čini 40% svih karcinoma dojke, pokazuje visoku ekspresiju ER gena te nisku ekspresiju HER2 gena i gena proliferacije. Najčešći je podtip i ima najbolju prognozu (18-20).

Luminalni B podtip čini oko 20% tumora dojke, ima nešto nižu ekspresiju ER gena, varijabilnu ekspresiju HER2 gena i visoku ekspresiju gena za proliferaciju. Ima lošiju prognozu od luminalnih A tumora (20).

Podtipovi HER2 i bazalni pripadaju skupini hormonski neovisnih tumora, visokog su proliferacijskog indeksa i histološkog gradusa te lošijeg ishoda. HER2 podtip čini 10-15% svih karcinoma dojke i karakterizira ga visoka ekspresija HER2 gena i gena proliferacije te niska ekspresija luminalnih gena. Zato su ovi tumor najčešće ER/PR negativni, a HER2 pozitivni. Karcinomi bazalnog podtipa (eng. basal like) pokazuju izraženost biljega karakterističnih za bazalne epitelne stanice normalnog tkiva dojke i čine 15-20% svih karcinoma dojke. Imaju negativne ER i HER2, visokog su gradusa i proliferacijskog indeksa. 80% karcinoma u žena s mutacijom BRCA1 su bazalnog tipa. Budući da je većina karcinoma dojke bazalnog tipa sporadična, a BRCA1 gen i protein kod njih izgledaju intaktno, pretpostavlja se da je obično riječ o metilaciji promotora (21-22).

#### **1.4.4. Imunohistokemijska klasifikacija**

Novija istraživanja su pokazala da određene imunohistokemijske karakteristike tumora (status hormonskih receptora, HER2 status i proliferacijski indeks) odgovaraju određenim molekularnim karakteristikama karcinoma dojke (23-24). Na 12. Internacionalnoj konferenciji održanoj u ožujku 2011. godine u St. Gallenu (25) usvojena je imunohistokemijska klasifikacija karcinoma dojke koja obuhvaća sljedeće podtipove:

- luminalni A: ER+/PR+/HER2-/Ki-67 <14%
- luminalni B (HER2-): ER+/PR+/HER2-/Ki-67 ≥14%
- luminalni B (HER2+): ER+/PR+/HER2+/Ki-67 bilo koji
- HER2 pozitivni: ER-/PR-/HER2+
- trostruko negativni: ER-/PR-/HER2-

Klasifikacija se odražava na prognozu i terapijski pristup. Tako luminalni A podtip uglavnom zahtijeva samo hormonsku terapiju, dok je kod većine luminalnih B i svih trostruko negativnih karcinoma potrebna kemoterapija, uz dodatak Herceptina za HER2 pozitivne (25-26). Istraživanja su pokazala da luminalni A podtip ima najduže ukupno preživljenje kao i

preživljenje bez znakove bolesti, dok HER2 pozitivni i trostruko negativni podtipovi imaju najlošiju prognozu (18, 27).

## **1.5. PROGNOŠTIČKI I PREDIKTIVNI ČIMBENICI**

Određivanje prognostičkih i prediktivnih faktora pomaže u procjeni prognoze i individualiziranju liječenja. Prognostički čimbenici predstavljaju osobitost tumora ili bolesnice u vrijeme postavljanja dijagnoze koja pokazuje vjerojatnost kliničkog ishoda neovisno o primijenjenom liječenju. Tradicionalni prognostički čimbenici su: veličina tumora, histološki tip, stupanj diferenciranosti (gradus), limfovaskularna invazija, status limfnih čvorova te stadij proširenosti bolesti (16). Dominantni prognostički indikator diseminacije bolesti je zahvaćenost pazušnih limfnih čvorova. Oko 20 % žena s negativnim limfnim čvorovima doživi relaps bolesti unutar 10 godina u odnosu na 70% žena s pozitivnim limfnim čvorovima (27). Ne postoji pouzdani biomarker koji bi izdvojio bolesnice s negativnim limfnim čvorovima i većim rizikom za relaps bolesti koje bi imale koristi od adjuvantne kemoterapije, dok bi se ostale mogle poštediti teških nuspojava kemoterapije.

Prediktivni čimbenici su osobitost tumora koja upućuje na vjerojatnost odgovora na specifičnu terapiju i povezani su s osjetljivošću ili rezistencijom tumora na tu terapiju (28). Najznačajniji prediktivni faktori su: estrogenski (ER) i progesteronski (PR) receptori, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) i proliferacijski indeks Ki-67. Oni se rutinski određuju u svakom karcinomu dojke. Općenito, prognostički markeri pomažu odrediti zahtijeva li pacijent terapiju, dok su prediktivni faktori korisni u izboru terapije.

### **1.5.1. Veličina tumora**

Veličina tumora ima neovisno prognostičko značenje i linearno korelira s razvojem udaljenih metastaza. Općenito, tumori manji od 15 mm imaju dobru prognozu i učestalost metastaza u pazušne limfne čvorove kod takvih tumora je oko 15-20%, dok tumori veći od 15 mm imaju učestalost metastaza u pazušne limfne čvorove veću od 40% (29-30).

### **1.5.2. Histološki tip tumora**

Histološki tip tumora ima prognostički značaj. Odličnu prognozu ima tubularni, kribriformni, mucinozni i tubulo-lobularni karcinom dojke, dok lošu prognozu ima invazivni karcinom dojke (NOS), miješani duktalni i lobularni te solidni lobularni karcinom dojke (31). Osobito lošu prognozu ima karcinom tipa prstena pečatnjaka i pleomorfni invazivni lobularni karcinom (32).

### **1.5.3. Stupanj diferenciranosti tumora**

Stupanj diferenciranosti tumora je važan neovisni prognostički čimbenik. Kod nuklearnog gradusa se analiziraju osobine jezgre tumorskih stanica (veličina i oblik jezgre, kromatin, sadržaj nukleola). Za određivanje histološkog gradusa danas je najviše u upotrebi Scarf-Bloom-Richardsonova metoda, odnosno njezina modifikacija po Elsonu i Ellisu (tzv. Nottinghamaska metoda) (33). Gradiranje se bazira na tri elementa: stvaranju tubula, pleomorfizmu jezgre i broju mitoz. Svaki element se ocjenjuje s 1-3 boda te njihov krajnji zbroj određuje gradus.

- 3-5 bodova: gradus I (dobro diferencirani tumor)
- 6-7 bodova: gradus II (srednje diferencirani tumor)
- 8-9 bodova: gradus III (slabo diferencirani tumor)

### **1.5.4. Status limfnih čvorova**

Status limfnih čvorova je najvažniji nezavisni prognostički čimbenik. Desetogodišnje preživljenje u bolesnica sa zahvaćenim pazušnim limfnim čvorovima je 23-35%, dok je u onih s negativnim limfnim čvorovima 60-75% (30). Prema današnjim protokolima liječenja sve bolesnice sa zahvaćenim pazušnim limfnim čvorovima trebaju biti liječene adjuvantnom sustavnom terapijom.



### **1.5.5. Hormonski receptori**

Steroidni receptori se rutinski, imunohistokemijskom metodom određuju u svakom karcinomu dojke. ER i PR su prediktivni faktori i predviđaju dobar odgovor na hormonsku terapiju i time bolju prognozu. Interakcija estrogena s receptorima u zloćudnim stanicama vodi kočenju apoptoze i oštećenju staničnog ciklusa što rezultira u proliferaciji stanice. Aktivacijom ER dolazi do indukcije PR. Status hormonskih receptora se smatra pozitivnim ako je bilo koji od ova dva receptora pozitivan, jer se pozitivnost PR smatra odrazom aktivnosti ER. Oko 70 % karcinoma dojke su ER pozitivni i te bolesnice reagiraju na hormonsku terapiju (tamoksifen, inhibitori aromataze) (34). Tamoksifen se veže za ER i blokira estrogenom stimuliran rast te dokazano smanjuje pojavu recidiva i produljuje život u pacijenata s ER pozitivnim invazivnim karcinomom dojke (35). Liječenje tamoksifenom smanjuje godišnju smrtnost od raka dojke za 31% kod ER pozitivnih tumora (28). Inhibitori aromataze suprimiraju proizvodnju estrogena (36). Oko 1% bolesnica s karcinomom dojke ima ER-/PR+ tumore i takve bolesnice također pokazuju određenu dobrobit od hormonske terapije (37).

### **1.5.6. HER2 status**

Obitelj receptora za epidermalni čimbenik rasta ima četiri člana (HER1-4) koji pripadaju obitelji tirozin-kinaznih receptora, i receptori su za mnoge čimbenike rasta, hormone i citokine. Epidermalni čimbenik rasta je ligand za HER2. Nakon njegovog vezanja s HER2 dobiva sposobnost dimerizacije s drugim HER2 receptorom. Stvaranjem dimera aktivira se tirozin-kinazni dio receptora koji pokreće signalne puteve koji sudjeluju u regulaciji staničnog rasta, diferencijaciji, proliferaciji i pokretljivosti stanice (38-39). Normalne epitelne stanice dojke imaju na svojoj površini oko 20000-50000 HER2 receptora. Kod amplifikacije HER2 gena broj HER2 receptora na površini stanice naraste do 2 milijuna što vodi promjeni tirozin-kinazne aktivnosti i signalnih puteva, čime se pojačavaju stanični signali i ometaju normalni unutarstanični kontrolni mehanizmi. Rezultat je veća sposobnost invazije i metastaziranja kod tumora s prekomjernom ekspresijom HER2. HER2 je prognostički i prediktivni čimbenik. Visoka ekspresija HER2 kod karcinoma dojke je povezana s visokim histološkim gradusom i

agresivnijim profilom tumora te pacijentice s prekomjernom ekspresijom HER2 imaju veću vjerojatnost recidiva i kraće sveukupno preživljenje. Amplifikacija HER2 gena se nalazi u 15-20% karcinoma dojke (40-41) i ova grupa pacijentica ima značajnu korist od anti-HER2 terapije. Primjena monoklonskog protutijela transtuzumaba (Herceptin) dokazano inhibira rast tumorskih stanica koje imaju amplifikaciju HER2 gena (42). HER2 status se rutinski određuje imunohistokemijom kod svih karcinoma dojke (membransko bojenje-HerceptTest). Imunobojenje 0-1+ se smatra negativnim, a 3+ pozitivnim. Kod nejasnih slučajeva (2+) se radi ISH (eng. *in situ* hybridisation) koja mjeri amplifikaciju gena (43). Terapija transtuzumabom je indicirana kod bolesnica s imunohistokemijski dokazanom ekspresijom intenziteta 3+ te kod onih s intenzitetom 2+ kod koji je *in situ* hibridizacijom dokazana amplifikacija HER2 gena (43).

#### **1.5.7. Proliferacijski indeks Ki-67**

Proliferacijski indeks se u raku dojke najčešće određuje imunohistokemijskim bojenjem s anti-Ki-67 protutijelom. Ki-67 je nehistonski protein jezgre otkriven 1991. godine. Funkcija mu nije poznata. Dokazan je izražaj Ki-67 u stanicama koje proliferiraju, dok ga nema kod stanica u mirovanju (44). Značajan je prognostički biljeg u bolesnica s negativnim limfnim čvorovima dok je u bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima značajnost manja. Ki-67 ima prediktivnu vrijednost za liječenje kemoterapijom. Jači izražaj Ki-67 povezan je s boljim odgovorom na kemoterapiju (45).

#### **1.5.8. Limfovaskularna invazija**

Limfovaskularna invazija predstavlja nezavisni prognostički čimbenik rizika za lokalno obnavljanje i diseminaciju bolesti. Prvenstveno se gleda u tkivu dojke oko primarnog karcinoma, a ne unutar samog tumora. Češće se nađe u većim tumorima visokog gradusa, kod invazivnih karcinoma dojke (NOS) te u bolesnica sa zahvaćenim limfnim čvorovima (31).

### **1.5.9. Molekularni profil tumora**

Određivanje genskog profila otvara nove mogućnosti u definiranju prognostičkih i prediktivnih čimbenika karcinoma dojke. Najčešća metoda njegovog određivanja je tehnologija DNA mikročipova. 2002. godine Laura van't Veer iz Nizozemske je koristila tehnologiju DNA mikronizova za analizu 261 uzorka karcinoma dojke (46). U studiji su uspoređivali uzorke pacijenata koji su imali metastaze i one bez metastaza. Pronašli su da su neki geni, koje su nazvali tzv. profil loše prognoze, povezani s vjerojatnošću da će bolesnice dobiti metastaze unutar 5 godina nakon završenog liječenja. Druga skupina gena tzv. profil dobre prognoze je povezan s pacijenticama koje nisu razvile metastaze unutar 5 godina od završenog liječenja. Na temelju genskog profiliranja razvili su se testovi s ciljem pokušaja određivanja vrste terapije koja nosi najbolju korist za određenu osobu s ranim karcinomom dojke. Svrha genskog profiliranja je omogućiti pacijenticama kojima ne treba adjuvantna terapija da izbjegnu štetne nuspojave nepotrebne terapije te da identificira bolesnice koje bi imale koristi od takve terapije. MammaPrint je prognostički test koji koristi tehniku mikronizova za analizu izraženosti 70 gena iz uzorka tumorskog tkiva, a njime se bolesnice dijele u dvije skupine (47). Jedna je skupina s boljim genetskim profilom i boljom prognozom, a druga skupina s lošijim genetskim profilom i nepovoljnom prognozom. Pretpostavka je da bi bolesnice iz povoljnije grupe mogle izbjeći adjuvantno kemoterapijsko liječenje. Oncotype-DX je dijagnostički test koji kvantificira vjerojatnost povrata bolesti kod žena s ranim stadijem ER+ karcinoma dojke (prognostička vrijednost) i predviđa korist od određenog tipa kemoterapije (prediktivna vrijednost). Oncotype-DX analizira grupu od 21 gena unutar tumora da odredi rizik povrata bolesti (eng. recurrence score, RS) unutar 10

godina od trenutka dijagnoze kod pacijenata liječenih tamoksifenom (48). Temeljem ovih rezultata bolesnice se svrstavaju u 3 skupine:

- niskog rizika -  $RS < 10\%$
- srednjeg rizika -  $RS 10-30\%$
- visokog rizika -  $RS > 30\%$

Pokazalo se da visoki RS predviđa korist od kemoterapije kod ER+ karcinoma dojke u ranom stadiju, dok bolesnice s niskim rizikom imaju značajnu korist od liječenja hormonskom terapijom i nije im potrebna kemoterapija (49). Učinkovitost tih testova još se uvijek proučava u brojnim kliničkim studijama (50-51).

## **1.6. LIJEČENJE KARCINOMA DOJKE**

Liječenje raka dojke provodi se operativnim zahvatom, zračenjem i lijekovima. Operativni zahvat može biti pošteđni i radikalni (52). Kod pošteđne operacije radi se ekscizija primarnog tumora s različito širokim rubom okolnog zdravog tkiva, i s obzirom na opseg i širinu slobodnih rubova oko tumora govorimo o: kvadrantektomiji, segmentektomiji i tumorektomiji. Lokalni konzervativni tretman (pošteđni kirurški zahvat nakon kojeg slijedi radioterapija) se smatra odgovarajućom terapijom kod većine žena u I i II stadiju bolesti. Konzervativno liječenje je indicirano kod bolesnica s tumorom promjera do 4 cm, kod unifokalne lokalizacije tumora i negativne ili pozitivne aksile (53). Radikalni kirurški zahvat uključuje:

- jednostavnu mastektomiju (odstranjuje se cijela dojka bez aksile uz očuvanje prsnih mišića),
- potkožnu mastektomiju (odstranjuje se cjelokupno tkivo dojke ispod kože čime se omogućava rekonstrukcija dojke),
- modificiranu radikalnu mastektomiju (odstranjenje cijele dojke uz disekciju pazušnih limfnih čvorova, pri tome je veliki prsni mišić očuvan).

Lijekovima možemo ostvariti smanjenje tumora prije operacije primarnog tumora što se zove neoadjuvantna terapija. Adjuvantna terapija je liječenje nakon uklanjanja primarnog tumora.

#### **1.6.1. Liječenje raka dojke adjuvantnom kemoterapijom**

Adjuvantna terapija primarnog raka dojke se provodi nakon operativnog uklanjanja tumora. Adjuvantno ili dodatno liječenje može biti zračenje, kemoterapija i endokrina terapija. Ovakvo liječenje se provodi u svrhu onemogućavanja zaostalih malignih stanica u organizmu da proliferiraju i stvore sekundarnu bolest. Sekundarna bolest može nastati na mjestu primarne operacije ili na udaljenom mjestu (metastaza). Odluku o adjuvantnoj terapiji kliničar donosi na temelju nalaza prediktivnih i prognostičkih pokazatelja. Adjuvantna kemoterapija se preporuča u liječenju bolesnica s tumorima visokog histološkog gradusa, visokog proliferacijskog indeksa, kod HER2 pozitivnih i trostruko negativnih tumora te kod bolesnica s pozitivnim limfnim čvorovima (25, 54).

#### **1.6.2. Liječenje raka dojke adjuvantnom endokrinom terapijom**

Internacionalne smjernice za liječenje raka dojke se usvajaju svake dvije godine na Internacionalnoj konferenciji u St. Gallenu, u Švicarskoj (25). Prema tim smjernicama ako se pri određivanju ER dokaže prisutnost receptora, bez obzira na njihovu količinu, to je dovoljan dokaz za davanje adjuvantne endokrine terapije. Određivanje se vrši imunohistokemijskom metodom, a rezultat se iznosi kao postotak obojenih tumorskih stanica. Dokazano je da čak i ako je obojenost stanica samo 1%, takvi tumori u nekoj mjeri ipak odgovaraju na adjuvantnu endokrinu terapiju. Za kliničku odluku važna je visoka receptorska pozitivnost tumora koja je definirana kao  $\geq 50\%$  obojenih tumorskih stanica. Takve bolesnice imaju dobru prognozu ako su i drugi prognostički pokazatelji povoljni. Prema smjernicama iz St. Gallena istaknuta je skupina bolesnica s niskim rizikom pojave sekundarne bolesti. Ta skupina bolesnica ima primarni rak dojke histološkog gradusa 1, negativne pazušne limfne čvorove, veličinu tumora  $\leq 2$  cm, visoko pozitivne ER/PR ( $\geq 50\%$ ), tumor niskog proliferacijskog indeksa i bez vaskularne invazije. Ova skupina bolesnica može adjuvantno primati samo hormonsku terapiju bez kemoterapije. S obzirom na vrstu adjuvantne endokrine terapije, podjela se vrši

prema menopauzalnom statusu. Premenopauzalne bolesnice bi trebale primati tamoksifen ili njegove analoge, dok postmenopauzalne bolesnice mogu primati inhibitore aromataza (55).

### **1.6.3. Liječenje tamoksifenom**

Tamoksifen je selektivni modulator estrogenskih receptora (eng. selective estrogen receptor modulator-SERM) koji djelomično koči aktivnost ER $\alpha$  u tkivu dojke. Djelovanje tamoksifena je tkivno specifično. Uz djelomično antagonističko djelovanje na ER u tkivu dojke pojavljuje se i agonističko djelovanje na ER u kostima, jetri i maternici. Ovakvo djelovanje tamoksifena je odgovorno za neke negativne učinke liječenja. Tamoksifen se daje više godine nakon pojave raka dojke, najčešće pet godina. Tijekom tog vremena se mogu javiti nuspojave koje nepovoljno djeluju na kvalitetu života (mučnina, proljev, depresija, promjene na koži), pa i ugroziti život (infarkt miokarda, moždani udar, embolija pluća, karcinom endometrija) (56). Davanje tamoksifena bolesnicama s ER+ karcinomom dojke smanjuje povrat bolesti s 45% (kontrola) na 33,2%, dok je smrtnost pala od 34,8% na 25,6% (57).

### **1.6.4. Inhibitori aromataza**

Aromataza u zdravom organizmu pretvara C19 androgene (androstendion i testosteron) u estron i estradiol koji su C18 spojevi. U liječenju se najčešće upotrebljavaju inhibitori aromataza treće generacije (letrozol i anastrozol). Ovi lijekovi su nesteroidni aromataza inhibitori čije djelovanje se temelji na kompetitivnoj inhibiciji sa supstratom, tj. androgenom (58). Liječenje se najčešće provodi u trajanju 2-5 godina.

## 1.7. OKSIDACIJSKI STRES

### 1.7.1. Slobodni radikali

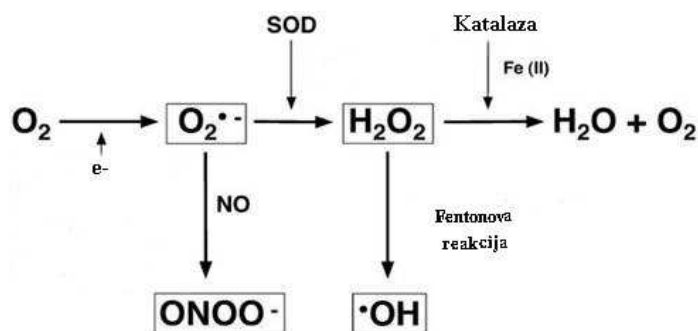
Rak je multifaktorijalna bolest i njegova etiologija je još uvijek većim dijelom nepoznata. U zadnjem desetljeću istraživanja su pokazala da slobodni radikali imaju važnu ulogu u karcinogenezi (59-60). Slobodni radikali su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi. Reaktivni kisikovi spojevi (eng. reactive oxygene species-ROS) je zajednički naziv za radikale kisika (npr. superoksid, hidroksil radikal) i spojeve koje nisu radikali (npr. vodikov peroksid, singletni kisik). ROS su produkti normalnog staničnog metabolizma. To su visoko reaktivne molekule koje sadrže nespareni elektron u vanjskoj orbiti što ih čini izrazito nestabilnim i visoko reaktivnim, pri čemu reagiraju s organskim ili neorganskim spojevima (61). Procijenjeno je da dnevno 10000-20000 slobodnih radikala napada svaku stanicu tijela. Kod atletičara ta je brojka uvećana za 50%. Slobodni radikali nastaju uslijed apsorpcije energije zračenja, u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama tijekom patoloških i normalnih fizioloških procesa poput oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima, prijenosom elektrona u sistemu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu, oksidacijom masnih kiselina u peroksisomima, metabolizmom arahidonske kiseline u staničnim membranama i tijekom fagocitoze (62). Glavni izvor slobodnih radikala u normalnim okolnostima je „curenje“ elektrona iz elektronskog transportnog lanca u mitohondrijima na molekularni kisik što stvara superoksid ( $\cdot\text{O}_2$ ) (63). Mitohondrij je mala stanična organela koja je odgovorna za proizvodnju energije i staničnu respiraciju. Preko sustava koji se zove „elektronski transportni lanac“ elektroni prelaze na različite molekule i sa svakim prelaskom se stvara kemijska energija. Čak i u idealnim uvjetima neki elektroni cure s elektronskog transportnog lanca i reagiraju s kisikom pri čemu nastaje superoksid. U fiziološkim uvjetima se 1-3% molekula kisika pretvara u superoksid. Tako stvoren  $\cdot\text{O}_2$  primarno reagira s mitohondrijskom DNA. Većina štete koja nastaje u jezgri DNA se popravi, dok je kapacitet popravka mitohondrijske DNA deficijentan te dolazi do nakupljanja oksidacijski oštećene mitohondrijske DNA. Mitohondriji s vremenom gube svoju funkciju te dolazi do smrti stanice.

### 1.7.2. Oksidacijski stres

U normalnoj aerobnoj stanici postoji ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i antioksidacijske zaštite. Neadekvatna antioksidacijska zaštita ili pretjerano stvaranje slobodnih radikala dovodi do oksidacijskog stresa. U stanjima oksidacijskog stresa pretjerano stvaranje slobodnih radikala može dovesti do oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, proteini oksidacijom gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji. Oksidacijski stres ima značajnu ulogu u etiopatogenezi kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, karcinoma, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, fibroze i procesa starenja (62).

### 1.7.3. Reaktivni kisikovi spojevi

Superoksid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) nastaje redukcijom molekule kisika jednim elektronom (61). Njegova topivost u mastima je ograničena te ne može prodrijeti duboko u stanicu. Djelovanje mu je ograničeno na mjestu njegovog stvaranja. Superoksid se spontano, ali i uz pomoć superoksid dismutaze (SOD) te vodikovih iona, raspada u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Slika 2).

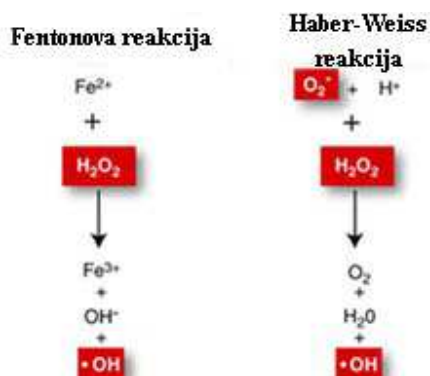


Slika 2. Prikaz lančane reakcije (kaskade) slobodnih radikala

Vodikov peroksid se zatim pretvara u vodu i molekularni kisik djelovanjem enzima katalaze, glutation peroksidaze i peroksiredoksina. Iako vodikov peroksid nije radikal jer nema nesparenih elektrona, on je oksidans koji uz prisustvo prijelaznih metala, divalentnog iona željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i jednovalentnog iona bakra ( $\text{Cu}^+$ ), može prihvatiti jedan elektron stvarajući vrlo toksičan hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ). Vodikov peroksid je topiv u mastima pa može djelovati na



udaljenim mjestima od njegova stvaranja. Hidroksil radikal nastaje Fentonovom i Haber-Weissovom reakcijom (Slika 3).



Slika 3. Prikaz Fentonove i Haber-Weissove reakcije

U Fentonovoj reakciji  $\text{Fe}^{2+}$  reagira s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje hidroksilni radikal i hidroksilni ion uz nastanak  $\text{Fe}^{3+}$ . U Haber-Weissovoj reakciji superoksid reagira s vodikovim peroksidom pri čemu također nastaje hidroksilni radikal i hidroksilni ion. Hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) je najreaktivnija poznata ROS vrsta. Poluvrijeme života mu je vrlo kratko (manje od 1 ns) i zato mu je djelovanje ograničeno na najbliže stanične komponente (61, 64). Interakcijom hidroksil radikala s DNA nastaje više tipova oksidiranih nukleozida od kojih je najrašireniji 8-hidroksideoksigvanosin (65).

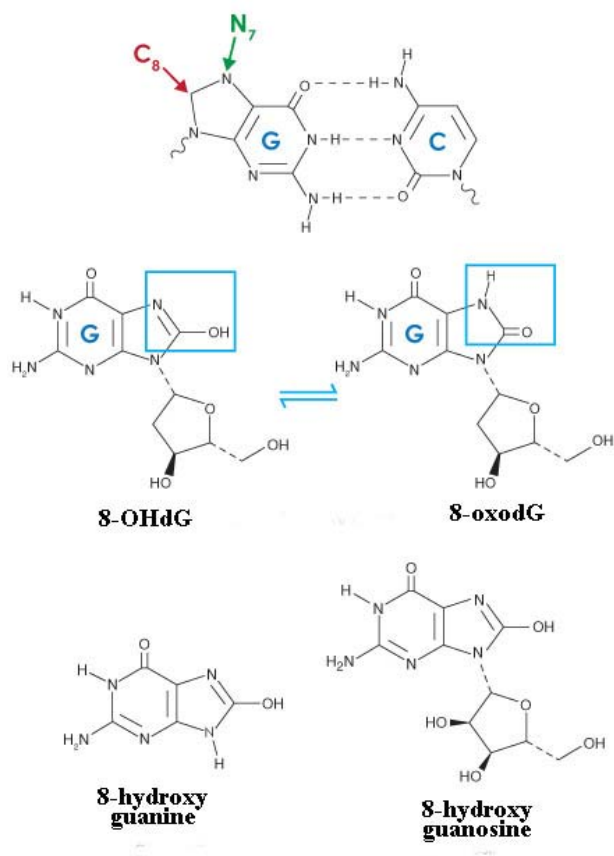
#### 1.7.4. Slobodni radikali dušika

Naziv “reaktivni dušikovi spojevi” (eng. reactive nitrogen species-RNS) označava skupinu visoko reaktivnih dušikovih spojeva koji osim slobodnih dušikovih radikala poput dušikovog oksida ( $\text{NO}\cdot$ ) i dušikovog dioksida ( $\text{NO}_2\cdot$ ) uključuje i duge reaktivne spojeve dušika kao što su dušična kiselina ( $\text{HNO}_2$ ), peroksinitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ ), peroksinitritna kiselina ( $\text{ONOOH}$ ) i alkil peroksinitrat ( $\text{ROONO}$ ) (66). Dušikov oksid nastaje u endotelnim, živčanim i upalnim stanicama iz L-arginina djelovanjem dušik oksid sintetaze (67). On sudjeluje u regulaciji krvnog tlaka, u upalnim reakcijama, inhibiciji agregacije trombocita i proliferaciji glatkih mišićnih stanica, ali je i toksičan, ima važnu ulogu u oštećenju tkiva tijekom kronične upale,

infarkta mozga i septičkog šoka (68-69). Reakcijom  $\text{NO}^\cdot$  sa superoksidom nastaje vrlo toksičan peroksinitrit koji može potaknuti lipidnu peroksidaciju (66).

### 1.7.5. 8-okso-2'-deoksigvanozin (8-oksodG)

U istraživanjima se najčešće koriste protutijela na specifične biljege oksidacijskog oštećenja DNA. Najčešća lezija baze koja je ujedno i najviše mjerena kao indeks oksidacijskog oštećenja DNA je 8-hidroksigvanin, koji se često mjeri i kao nukleozid (64). Naime, najosjetljivije mjesto za oksidacijsko oštećenje DNA je na gvaninu i to na poziciji C8. Kada je gvanin spojen na poziciji N-9 s C-1 ugljikom deoksiriboze (šećer) nastaje deoksigvanozin. Interakcijom  $\cdot\text{OH}$  radikala s DNA dolazi do hidroksilacije 2-deoksigvanosina na poziciji C-8 pri čemu nastaje 8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) (Slika 4).

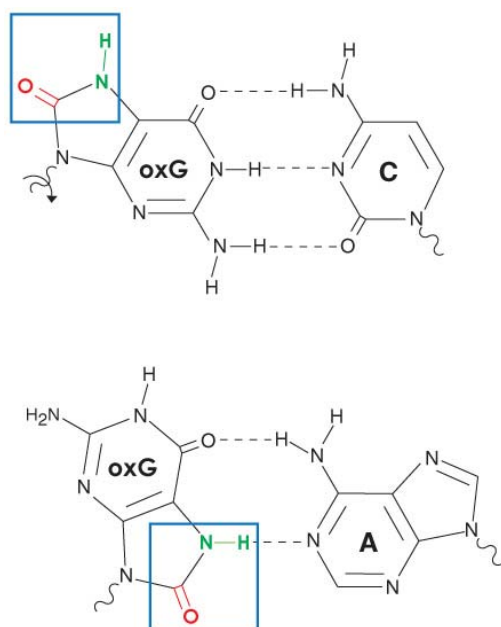


Slika 4. Oksidacijsko oštećenje nukleotida: fokus na gvanozinu

Tautomerizacijom s N-7 nastaje 8-okso-2-deoksigvanozin (8-oksodG), u odnosu na karbonilnu skupinu na C-8. Tautomerizacija je ravnotežna kemijska reakcija kod koje dolazi do premještanja vodikova atoma s jednog položaja na drugi uz istodobnu zamjenu dvostruke veze jednostrukom. Pojam 8-oksodG se koristi naizmjenično s 8-OHdG. 8-oksodG je otkriven 1984. godine (70) i od tada je najrašireniji marker oksidacijskog stresa. Njegovo stvaranje je regulirano lokalnim antioksidacijskim kapacitetom i enzimima za popravak DNA.

8-oksodG može inducirati GC→TA transverzijsku mutaciju (Slika 3) za vrijeme DNA replikacije i ako se ove lezije ne poprave postaju mutagene (71).

Uobičajena somatska mutacija je zamjena gvanozina s timidinom (G→T). Timidin ili točnije deoksitimidin je nukleozid koji se sastoji od deoksiriboze vezane za pirimidinsku bazu timin. Naime, oksidacija na poziciji C-8 omogućuje stvaranje tautomera s protonom na N7 (Slika 5).



Slika 5. Oksidirani gvanozin veže citozin ili adenozin

Za vrijeme DNA replikacije, oksidirani gvanozin se povremeno vrti oko šećerno-fosfatnog kostura, predstavljajući tako N-7 za vezivanje. Takvo predstavljanje imitira timidin, što rezultira umetanjem adenzina u komplementarni lanac DNA. U sljedećem ciklusu replikacije DNA, timidin je umetnut u lanac koji je nastao prema lancu koji sadrži adenozin.

Ove transverzijske mutacije su primijećene i kod p53 tumor supresor gena i ras onkogeni, što dalje upućuje na važnost ROS-a u kancerogenezi, ali nisu specifične samo za 8-oksodG (72-

73). 8-oksodG se uglavnom odstranjuje iz DNA djelovanjem DNA glikozilaze 1 (OGG1) (74). Ako se lezije DNA ne poprave, rezultiraju s mutacijama kao što su supstitucija baze i delecija što vodi karcinogenezi (71). Mehanizam popravka slabi sa starenjem, tako se s vremenom lezije DNA akumuliraju. Eksperimenti na OGG1<sup>-/-</sup> „knock-out“ miševima su ukazali na akumulaciju 8-oksodG i sklonost nekim tumorima, naročito karcinomu pluća (75).

#### **1.7.6. Oksidacijski stres i karcinogeneza**

Karcinogeneza je proces pretvorbe normalne stanice u malignu. To je složen proces, potaknut karcinogenima (76). Odvija se u tri stadija: inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija je ireverzibilan proces koji započinje mutacijom u genomu stanice. U toj fazi dolazi do promjena molekulske strukture stanične DNA, a tvari ili fizikalne pojave koje mogu dovesti do takvih promjena (mutacija) se zovu mutagenima. Ukoliko mutacije dovode do nastanka tumora, te tvari nazivamo karcinogenima. U karcinogene ubrajamo: kemijske karcinogene, ionizacijsko i neionizacijsko zračenje te viruse (77). U toku inicijacije dolazi do aktivacije brojnih protoonkogenih i inaktivacije tumor supresorskih gena. U stadiju promocije dolazi do mijenjanja ekspresije genoma i prijenosa signala iz okoline do genoma te do selektivne klonalne ekspanzije stanica koje izbjegavaju kontrolne mehanizme rasta i diferencijacije.

Danas se smatra da slobodni radikali imaju važnu ulogu u karcinogenezi i to u inicijaciji, promociji i progresiji raka (60). Poznato je da tumorske stanice podliježu perzistentnom i visokom oksidacijskom stresu što je dokazano većom razinom 8-oksodG u stanicama karcinoma (78). To se objašnjava samim metabolizmom tumorskih stanica (potaknuta glikoliza), povećanom infiltracijom fagocita koja prati tumor te povećanom produkcijom ROS-a u defektnom vaskularnom sustavu tumora za vrijeme reperfuzijske faze koja prati hipoksiju. Naime, zna se da fagociti i B limfociti sadrže enzim NADPH oksidazu. Kada, npr. fagociti prepoznaju stranu molekulu dolazi do niza reakcija tzv. “oksidacijskog praska” kojim se elektroni prenose s NADPH na O<sub>2</sub>, pri čemu nastaje superoksid koji služi za ubijanje stanica i patogena (79). Osim toga, makrofazi luče faktor nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) koji potiče daljnji oksidacijski stres u stanicama karcinoma (80). Nadalje, karcinomi potpomažu svoj rast stimulacijom razvoja novih krvnih žila. Tok krvi unutar novostvorenih krvnih žila je

često kaotičan, uzrokujući razdoblja hipoksije praćene reperfuzijom. Za reperfuziju koja se javlja nakon infarkta miokarda i ishemije mozga je poznato da uzrokuje stvaranje ROS-a.

Slobodni radikali se smatraju posebno važnim u inicijacijskom stadiju karcinogeneze (81). Za vrijeme inicijacije oksidacijsko oštećenje DNA može dovesti do mutacije gena te strukturnih promjena DNA. Hidroksil radikal može aktivirati određene onkogene kao što je K-ras i C-raf-1 (82). Za vrijeme promocije oksidacijski stres može doprinijeti abnormalnoj ekspresiji gena, inhibiciji međustanične komunikacije i modifikaciji sistema drugih glasnika, što rezultira u povećanju stanične proliferacije ili smanjenju apoptoze u iniciranoj populaciji stanica. Ovo rezultira klonalnom ekspanzijom iniciranih stanica u preneoplastične fokalne lezije. Stoga, perzistentan oksidacijski stres rezultira patofiziološkim promjenama koje omogućavaju selektivan rast preneoplastičnih iniciranih stanica. U fazi promocije moguće je da sami antioksidansi omogućavaju klonalno širenje i promociju tumora štiteći inicirane stanice od pretjerane toksičnosti oksidansa i posljedične apoptoze. Progresija tumora rezultira u razvoju malignog rasta iz benignih lezija. Oksidacijski stres može sudjelovati u fazi progresije stvaranjem daljnjih promjena u strukturi DNA u populaciji iniciranih stanica. Ove promjene mogu rezultirati u promjenama enzimske aktivnosti te učiniti lezije rezistentnim na normalnu kontrolu rasta. U ovom stadiju oksidacijski stres može igrati direktnu ulogu u razvoju karakteristika tumora kao što su nekontrolirani rast, genomska nestabilnost, rezistencija na kemoterapiju te invazija i metastaze. ROS može oštetiti određene inhibitore proteaza što vodi pojačanoj aktivaciji nekih proteaza (plazmin, elastaza i aktivator plazminogena) čime se potpomaže invazija tumora i metastaze (83). Perzistentni oksidacijski stres u karcinomu aktivira neke transkripcijske faktore kao što su nuklearni faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B), AP-1, povećava ekspresiju protoonkogeni (c-fos, c-jun, c-myc), inaktivira gene supresore tumora (p53), te inducira oštećenje DNA koje vodi daljnjoj genetskoj nestabilnosti (84). Transkripcijski faktori su proteini niske molekulske težine koji se vežu za promotorsku regiju gena te reguliraju transkripciju gena uključenih u rast, razvoj i starenje stanice (85). AP-1 kontrolira gene važne za stanični rast. ROS može aktivirati AP-1 kao i potaknuti njegovu sintezu (86). Također ROS aktivira antioksidacijski sistem (tiorredoksini, peroksiredoksini) koji može štititi karcinom od apoptoze i činiti ga rezistentnim na kemoterapiju. Perzistentni oksidacijski stres u tumoru je dovoljan da uzrokuje dodatnu gensku nestabilnost, ali ne i

nekrozu tumorskih stanica. Stoga u tumoru perzistentni i visoki oksidacijski stres djeluje selektivno da potiče akcelerirani rast, invaziju i metastaze (59, 78).

#### **1.7.7. Oksidacijski stres i karcinom dojke**

Karcinom dojke je heterogena bolest i smatra se da kancerogeneza ide u više faza; počinje od hiperplazije te progredira do atipične hiperplazije, *in situ* karcinoma i invazivnog karcinoma. Razina 8-oksodG je znatno veća u stanicama i tkivu karcinoma dojke u usporedbi s ne-malignim lezijama dojke (87-88). Nadalje, izlučivanje 8-oksodG u urinu je povezano sa značajno većim rizikom za karcinom dojke (89). U suprotnosti s tim, dvije studije nisu našle povezanosti između razine 8-oksodG u urinu i rizika za karcinom dojke (90-91). Osim toga, jedna studija je zabilježila da se visoka razina 8-oksodG nađena u urinu bolesnica s karcinomom dojke značajno smanjila nakon operacije tumora i to na razinu nađenu u kontrolnoj skupini, što upućuje da 8-oksodG nađen u urinu potječe od tumora (92). Povišene razine 8-oksodG su također nađene u urinu ili u DNA tumorskog tkiva u usporedbi sa zdravim tkivom kod akutne limfoblastične leukemije, kolorektalnog karcinoma, cervikalne displazije visokog stupnja, karcinoma bubrega i drugih (93-95). Neka istraživanja nisu našla značajnu statističku razliku između razine 8-oksodG kod karcinoma dojke i zdravog tkiva dojke (96). Novija istraživanja su pokazala slab imunohistokemijski pozitivitet 8-oksodG kod invazivnog karcinoma dojke u usporedbi s neinvazivnim lezijama. Osim toga, pokazano je da je negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG nezavisni prognostički faktor loše prognoze (97-98). Slab pozitivitet 8-oksodG je bio izrazito povezano s pokazateljima za agresivniji fenotip raka dojke kao što su limfna invazija i pozitivan status limfnih čvorova. Nasuprot tome, povećana 8-oksodG razina u tumorskom tkivu je prognostički faktor za loše preživljenje kod hepatocelularnog karcinoma i karcinoma pluća, što ukazuje na različitu funkciju 8-oksodG u različitim tumorima (99-100). Zasad nije poznat točan uzrok slabog pozitiviteta 8-oksodG kod agresivnijih oblika karcinoma dojke. 8-oksodG se uglavnom odstranjuje iz DNA djelovanjem DNA glikozilaze 1 (OGG1) (74). Pokazalo se da je pozitivan imunohistokemijski nalaz OGG1 znatno veći kod invazivnog karcinoma dojke nego kod preinvazivnih lezija dojke, te da je negativan imunohistokemijski nalaz OGG1 povezan s karakteristikama agresivnijeg oblika karcinoma dojke (101). Osim toga, antioksidansi kao što

su tioredoksini, peroksiredoksini, SOD, glutation peroksidaza su značajno povišeni u karcinomu dojke, dok je aktivnost katalaze većinom snižena (102). Prema tome, slobodni radikali aktiviraju antioksidacijski sistem u tumoru koji može štititi karcinom od apoptoze i činiti ga rezistentnim na kemoterapiju. Naime, određena terapija djeluje tako da povećava oksidacijski stres unutar karcinoma dojke. Kemoterapijski agensi (doksorubicin, mitomycin C, etoposid i cisplatin) kao i radioterapija te fotodinamična terapija stvaraju slobodne radikale unutar tumorskih stanica (103). Njihova antitumorska aktivnost je do određenog stupnja ovisna o indukciji apoptoze tumorskih stanica kao odgovor na oksidacijski stres i oksidacijsko oštećenje DNA. Kod kemorezistentnih linija je induciran i transkripcijski faktor Nrf2 koji je glavni stimulator brojnih antioksidacijskih enzima (104). Stoga se smatra da bi slab pozitivitet 8-oksodG kod agresivnijih oblika karcinoma dojke mogao biti posljedica povećane indukcije enzima za popravak DNA u stanjima većeg oksidacijskog stresa kao i aktivacije nekih transkripcijskih faktora (Nrf2) i antioksidacijskog sistema.

Danas se zna da estrogeni imaju ulogu u patogenezi karcinoma dojke te da jedan od mehanizama uključuje oksidacijskim stresom posredovan signalni put. Naime, mnoge studije su pokazale da fiziološke koncentracije estrogena i njegovih metabolita potiču stvaranje slobodnih radikala u ER pozitivnom tkivu kao i kulturama stanica karcinoma dojke (88). Estrogenom inducirano oksidacijsko oštećenje DNA uključuje stvaranje 8-oksodG, sugerirajući time na ulogu oksidacijskog stresa u inicijaciji i progresiji karcinoma dojke (105). Pokazalo se da superoksid i vodikov peroksid potiču proliferaciju stanica karcinoma dojke, vjerojatno kroz aktivaciju mitogen-aktiviranih protein kinaza (MAPKs) (106). Nadalje, ROS zajedno s hipoksijom potiče angiogenezu unutar tumora. Naime, karcinomi dojke redovito prerastu svoju krvnu opskrbu te dolazi do hipoksije i nekroze unutar tumora. Hipoksija stimulira lučenje transkripcijskog faktora HIF-1 (hipoksijom inducirani faktor-1) koji promovira transkripciju faktora angiogeneze VEGF (eng. vascular endothelial growth factor) (83). Dodatno, ROS stimulira stvaranje faktora angiogeneze VEGF i interleukina 8 (IL-8) te matriksne metaloproteinaze-1 (MMP-1) u tumorskim stanicama. MMP-1 je kolagenaza koja pomaže rast krvno-žilne opskrbe u tumoru. Osim toga, angiogeneza podiže intersticijski tlak u tumoru te bi tako sama po sebi mogla promovirati limfatičku diseminaciju tumora. Slobodni radikali mogu povećati migraciju tumorskih stanica aktivacijom p38 MAPK i time rizik za invaziju i metastaze (107). Oksidacijski stres unutar karcinoma dojke također može potaknuti

invaziju i metastaze aktivirajući metaloproteinaze i inhibirajući antiproteaze. Matriksna metaloproteinaza-2 (MMP-2) je gelatinaza koja ima važnu ulogu u invaziji karcinoma dojke i nastanku metastaza te visoka razina MMP-2 korelira s lošom prognozom (108). Inhibitori proteaze kao što su  $\alpha$ 1-inhibitor proteaze i inhibitor aktivatora plazminogena inaktiviraju se oksidacijom, što aktivira proteaze koje oni inhibiraju te promovira invaziju i razvoj metastaza (109).



## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

### **2.1 CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Osnovni ciljevi ovog istraživanja su:

- reklasificirati invazivne karcinome dojke u pet podtipova prema imunohistokemijskom profilu tumora (luminalni A, luminalni B (HER2 negativan), luminalni B (HER2 pozitivan), HER2 pozitivne i trostruko negativne) na temelju imunohistokemijske ekspresije ER, PR, HER-2 i Ki67,
- odrediti imunohistokemijski pozitivitet 8-oksodG kod određenih podtipova invazivnog karcinoma dojke i usporediti ga s određenim patohistološkim karakteristikama tumora (vaskularna invazija, histološki i nuklearni gradus, veličina tumora, status limfnih čvorova, status ER i PR, HER2 status, proliferacijski indeks-Ki67)
- odrediti tijek bolesti tijekom desetogodišnjeg praćenja, utvrđujući preživljenje bez znakova bolesti (eng. disease free survival-DFS), pojavu relapsa i sveukupno preživljenje bolesnica (eng. overall survival-OS),
- utvrditi povezanost tijeka bolesti s podtipovima karcinoma prema imunohistokemijskom profilu i imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG te na osnovu statističke analize zaključiti o mogućoj ulozi određivanja 8-oxodG kao prognostičkog čimbenika u karcinomu dojke.

### **2.2. HIPOTEZA**

Molekularni podtipovi karcinoma dojke definiraju tumore različitih genskih, odnosno bioloških karakteristika koji se međusobno razlikuju po prognozi i terapiji. Nije poznato postoji li povezanost između oksidacijskog oštećenja DNA i određenih molekularnih podtipova karcinoma dojke. Očekujemo da bi se unutar podtipova prema imunohistokemijskom profilu tumora dodatno mogli izdvojiti karcinomi na temelju

imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG. Ako je imunohistokemijski nalaz 8-oksodG slabo pozitivan ili negativan u uzorcima invazivnih karcinoma dojke, moguće je da se radi o tumorima izrazito lošije prognoze te se na temelju razine imunohistokemijskog nalaza u odnosu na podtipove karcinoma dojke može poboljšati određivanje njihovog biološkog tijeka.

### 3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

#### 3.1. ISPITANICE

U studiju su uključene 152 ispitanice oboljele od primarnog karcinoma dojke, operirane u Klinici za kirurgiju KBC-a Zagreb u razdoblju od 01.10.2002 do 01.10.2003. Srednja dob pacijentica s invazivnim karcinomom dojke je bila 56 godina s rasponom od 49 do 66 godina. Za sve bolesnice su prikupljeni podaci o dobi, menopauzalnom statusu, datumu operacije, patohistološkim karakteristikama tumora, kliničkom stadiju bolesti, vrsti provedene kirurške i onkološke terapije, tijeku bolesti (pojavi recidiva, metastaza i dužini perioda bez znakova pojave bolesti), datumu posljednje kontrole za bolesnice koje su žive te datumu smrti kod bolesnica umrlih od karcinoma dojke ili nekog drugog uzroka. Podaci su dobiveni uvidom u povijest bolesti bolesnica liječenih na Klinici za onkologiju, arhive Kliničkog zavoda za patologiju KBC Zagreb i dodatne imunohistokemijske analize parafinskih blokova Kliničkog zavoda za patologiju. Bolesnice su podijeljene u pet skupina prema surogatnim molekularnim podtipovima karcinoma dojke koji se određuju imunohistokemijski prema preporuci 12 Konferencije o karcinomu dojke u St. Gallenu (25) prema danim karakteristikama:

- Luminalni A: ER i/ili PR pozitivan, HER2 negativan, Ki-67<14%
- Luminalni B (HER2-): ER i/ili PR pozitivan, HER2 negativan, Ki-67≥14%
- Luminalni B (HER2+): ER i/ili PR pozitivan, HER2+ pozitivan, Ki-67 bilo koji
- HER2 pozitivan: ER i PR negativni, HER2 pozitivni
- Trostruko negativan: ER i PR negativan, HER2 negativan

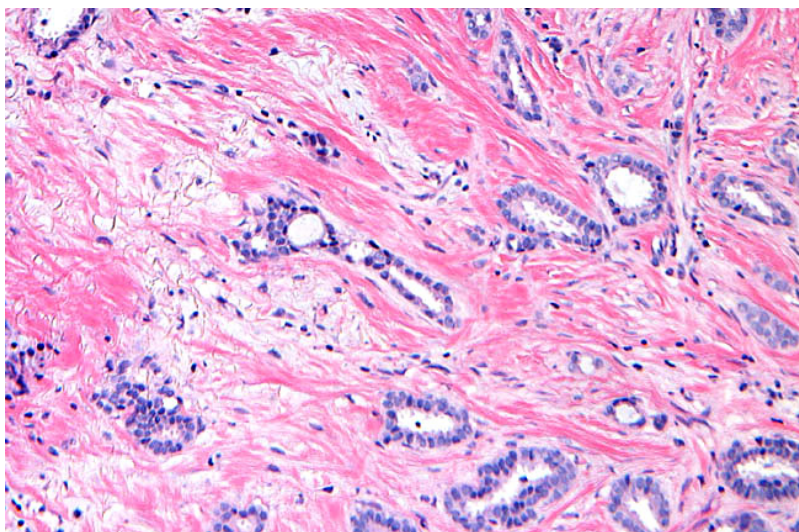
Medijan praćenja ispitanica iznosio je 112 mjeseci s rasponom od 87 do 116 mjeseci. Na temelju dostupnih podataka praćenja bolesnica napravljena je analiza preživljenja. Za ukupno preživljenje (eng. overall survival-OS) se smatrao vremenski interval između datuma operacije i datuma posljednje kontrole ili smrti bolesnice. Za preživljenje bez znakova bolesti (eng. disease free survival-DFS) se smatrao vremenski interval između datuma operacije i datuma povrata bolesti.

### 3.2. METODE

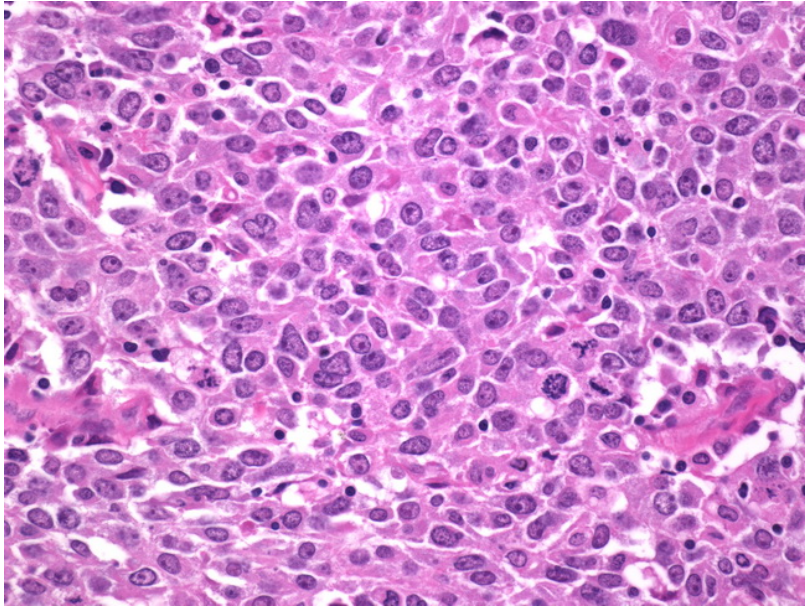
### 3.2.1 Histološka analiza

Revizijom arhiviranih patohistoloških preparata određen je histološki tip tumora, stupani diferenciranosti tumora, status steroidnih receptora i HER2 status, proliferacijski indeks mjeren s Ki-67, postojanje vaskularne invazije, broj izvađenih i broj tumorom zahvaćenih pazušnih limfnih čvorova.

Histološki tip tumora je određen prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije (16). Stupanj diferenciranosti tumora (histološki i nuklearni gradus) je određen prema Elstonovoj i Ellisovoj shemi za sve histološke tipove karcinoma dojke koja definira precizne kriterije za ocjenu morfoloških osobitosti kao što su stvaranje tubula, nuklearni pleomorfizam i broj mitozna na određenoj površini tumora (Slika 6 i 7) (33).

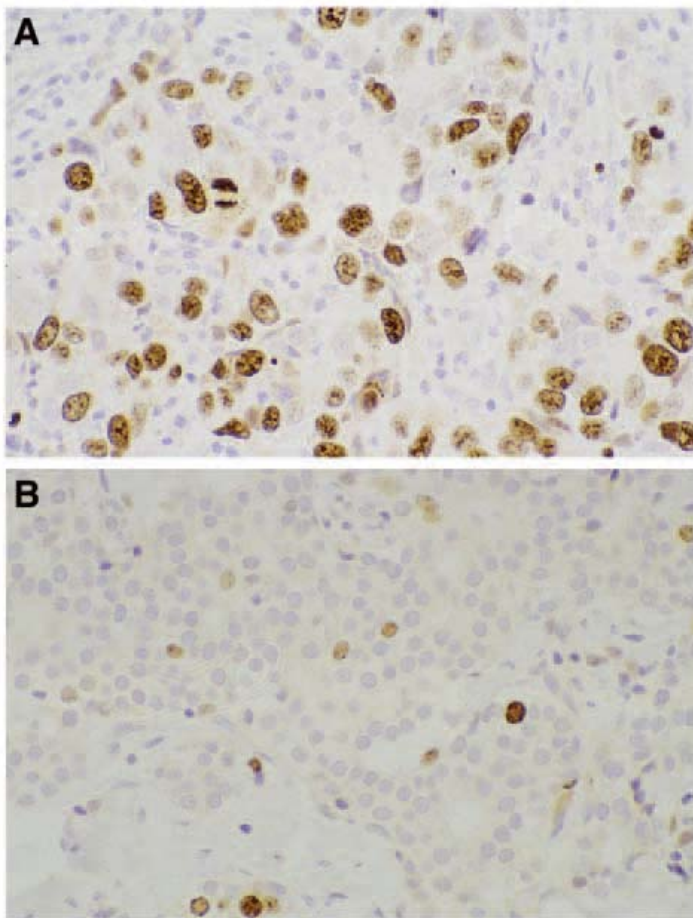


Slika 6. Dobro diferencirani invazivni karcinom dojke (GI). Hemalaun-eozin, 300x (izvor: [www.hsc.stonybrook.edu](http://www.hsc.stonybrook.edu)).



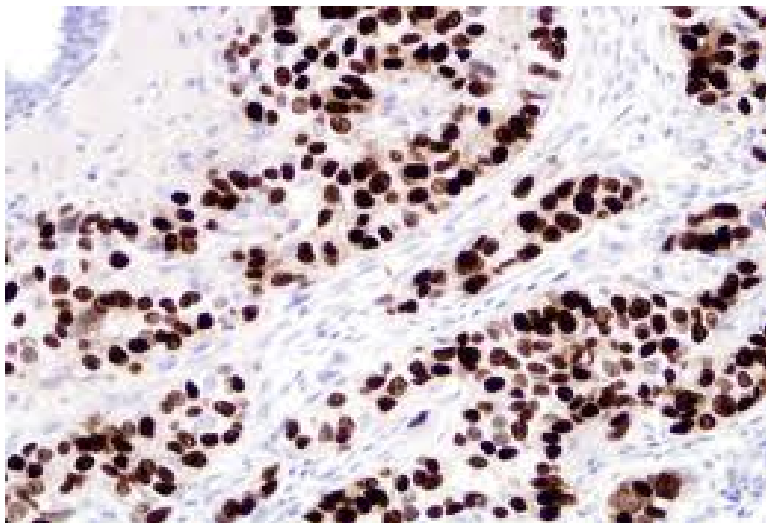
Slika 7. Slabo diferencirani invazivni karcinom dojke (GIII). Hemalaun-eozin, 400x (izvor: [www.webpathology.com](http://www.webpathology.com)).

Proliferacijski indeks mjeren imunohistokemijskom ekspresijom Ki-67 protutijela (DAKO, klon MIB-1, M7240) izračunat je brojanjem pozitivne nuklearne reakcije na 500 tumorskih stanica i prikazan kao niska proliferacija (<14% pozitivnih jezgara tumorskih stanica) i visoka proliferacija ( $\geq$ 14% pozitivnih jezgara tumorskih stanica) (Slika 8) (23).



Slika 8. Imunohistokemijsko bojenje s anti-Ki-67 protutijelom, visoka proliferacijska aktivnost (A) i niska proliferacijska aktivnost (B). Kontrastno bojenje hematoksilinom, x400 (preuzeto iz J Clin Oncol 2005;23:7212-7220).

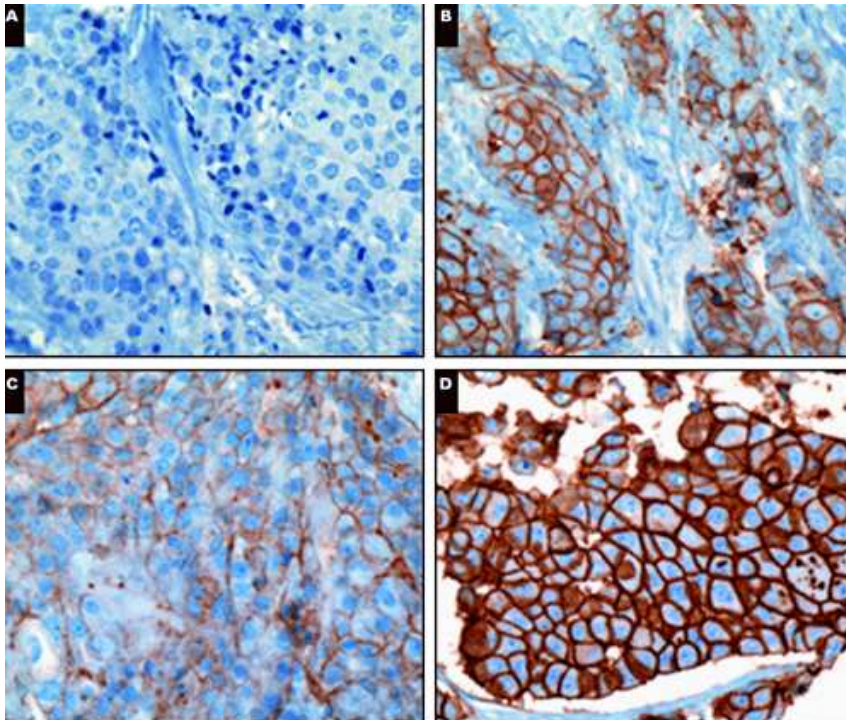
Steroidni receptori su određeni imunohistokemijskim bojenjem s anti-ER (DAKO, klon ID5, H7098, razrjeđenje 1:50) i anti-PR protutijelom (DAKO, klon PgT36, M3569, razrjeđenje 1:50). Pozitivno bojenje se definira kao jezgrino bojenje i to u  $>1\%$  jezgara tumorskih stanica (Slika 9) (110).



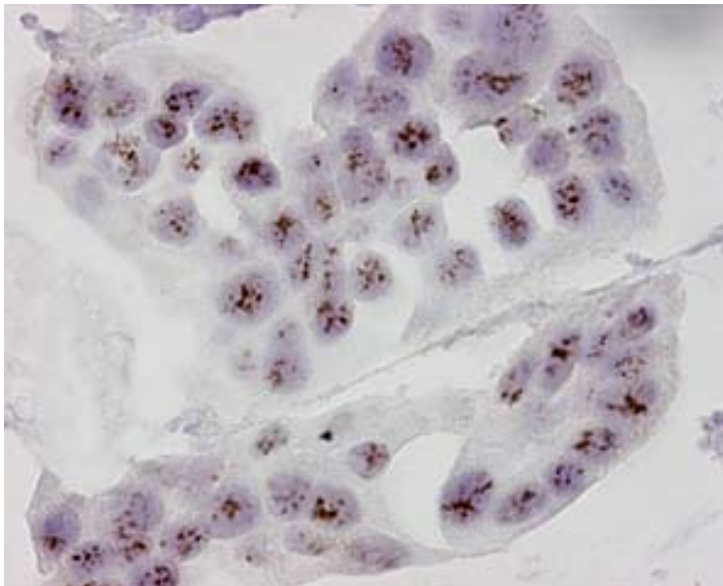
Slika 9. Imunohistokemijsko bojenje s anti-ER protutijelom, jaka ekspresija ER ,400x (izvor: [www.bcm.edu](http://www.bcm.edu)).

Izraženost HER2 receptora je određena imunohistokemijski i to korištenjem HercepTesta (Dako), tako da se ocijenio intenzitet bojenja stanične membrane na skali od 0 do 3+. HER2 se smatra pozitivan kod inteziteta 3+ (jako, potpuno bojenje stanične membrane u više od 30% tumorskih stanica), dok se slučajevi s intezitetom 0 i 1+ smatraju negativnim (Slika 10). Za bolesnice s ekspresijom HER2 2+ učinjena je dodatna kromogena *in situ* hibridizacija (CISH) radi ocjene amplifikacije gena, koristeći kriterij da više od 6 signala po jezgri predstavlja HER2 amplifikaciju (Slika 11) (111).





Slika 10. Imunohistokemijsko bojenje s anti-HER2 protutijelom. **A**, negativno bojenje HER2. **B**, bojenje HER2 u intenzitetu 2+. **C**, bojenje HER2 u intenzitetu 1+. **D**, bojenje HER2 u intenzitetu 3+ (AD, 400x). Preuzeto iz Am J Clin Pathol 2008;129:263-273.



Slika 11. Amplifikacija HER2 gena CISH metodom bojenja u karcinomu dojke (izvor: [www.atlasgeneticsoncology.com](http://www.atlasgeneticsoncology.com)).

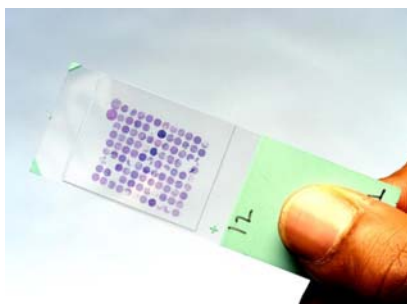


### 3.2.2. Tkivni mikročipovi i imunohistokemijsko određivanje 8-oksodG

Imunohistokemijska analiza 8-oksodG je izvedena na tkivnim mikročipovima (eng. tissue microarrays-TMAs). TMA je tehnički postupak prijenosa i objedinjavanja više uzoraka tkiva uklopljenog u parafinu na jedan parafinski blok. Vrlo je isplativa tehnika jer omogućava pregled velikog broja uzoraka na jednom preparatu pod istim eksperimentalnim uvjetima, uz istovremenu uštedu protutijela. Od prethodno odabranih parafinskih blokova s tumorskim tkivom, prvo se napravi novi rez i oboji na hematoksilin-eozin radi određivanja reprezentativnog područja tumora, koje se označi na staklu i na parafinskom bloku davatelja. Pomoću specijalne igle (Sakura, Japan) s označenog mjesta na bloku davatelja uzmu se po tri cilindra tumorskog tkiva promjera do 2 mm i premjeste u novi parafinski blok primatelj po zadanim koordinatama. Parafinski blok primatelj se zatim ostavi preko noći u termostatu na 45°C da bi se cilindri s bloka davatelja povezali i uklopili u blok primatelj te potom narezali za daljnje imunohistokemijske analize (Slika 12 i 13).



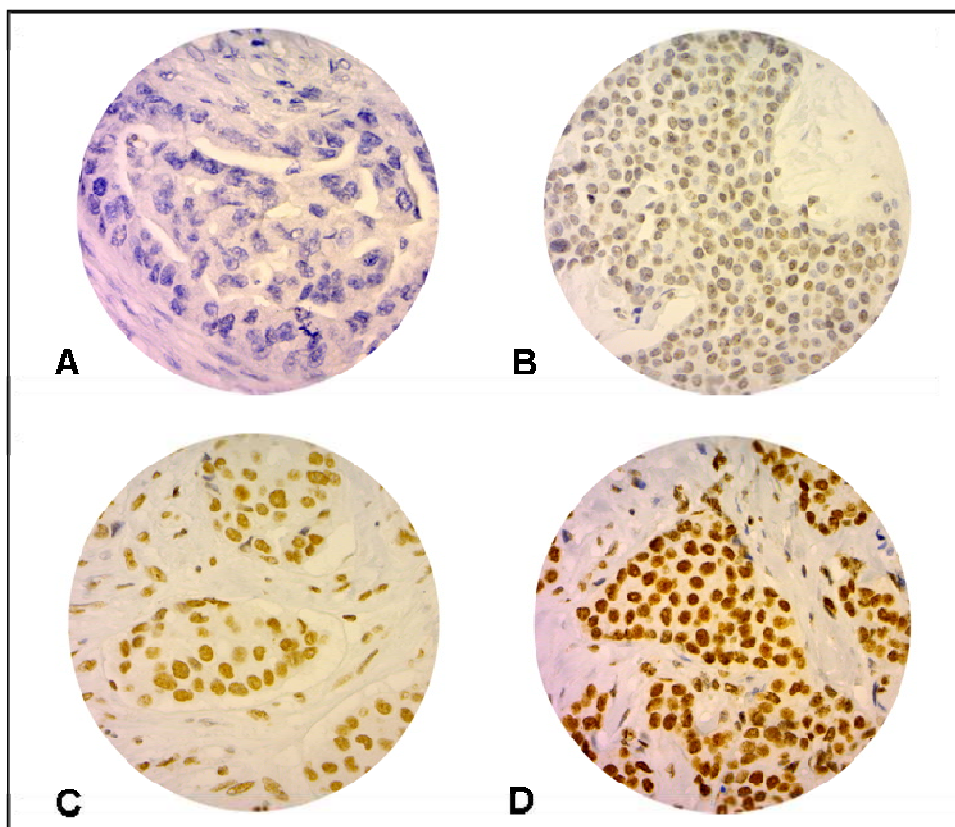
Slika 12. Shematski prikaz uklapanja tkivnih uzoraka u prazan „mikročip blok“ (izvor: [www.microarraystation.com](http://www.microarraystation.com)).



Slika 13. Prikaz histološkog preparata s priređenim tkivnim „mikročipom“.

Upotrebom ove metode je čak 60 tkivnih uzoraka tumora (20 tumora, s obzirom da se od svakog parafinskog bloka uzimaju tri uzorka) analizirano na jednom staklu. Tkivni mikročipovi su pomoću mikrotoma izrezani u rezove debljine 4-5 mikrometara, deparafinizirani u ksilolu i dehidrirani u gradiranim alkoholima te obojani standardnom imunohistokemijskom metodom imunoperoksidaza avidin-biotin koristeći protutijelo anti-8-oksodG (Abcam, USA) strojem za automatsko bojenje (Autostainer, Dako, Danska). Primarno protutijelo je pripremljeno u razrjeđenju 1:50, a bojenje je provedeno na sobnoj temperaturi pri inkubaciji od 60 minuta. Pozitivna kontrola je epidermis. Sekundarno protutijelo je od EnVision (K8000 Dako, Danska), a sredstvo vizualizacije na mjestu reakcije antigen-protutijelo u tkivu bio je diaminobenzidin (DAB). Pozitivnom reakcijom se smatralo obojenje jezgara tumorskih stanica smeđom bojom (Slika 14). Preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom, a rezultati 8-oksodG imunobojenja su prikazani Allredovim indeksom (112). Ovom metodom se gledao postotak pozitivnih stanica (bodovan na skali 0-3) i intenzitet bojenja (bodovan na skali 0-3). Množenjem intenziteta bojenja s brojem bodova dobivenih prema postotku obojenih stanica (0=negativno, 1=1-10%, 2=10-50%, 3=više od 50%) dobio se krajnji indeks (0=negativan, 1-3=slabo pozitivan, 4-6=umjereno pozitivan, 7-9=jako pozitivan). Za statističku analizu Allredov indeks 0 je smatran negativnim, dok su indeksi 1-3 smatrani pozitivnim.





Slika 14. Primjer negativnog (A), slabo pozitivnog (B), umjereno pozitivnog (C) te jako pozitivnog (D) 8-oksodG imunobojenja. AD, 400x.

### 3.3. Statistički postupci

Pri statističkoj obradi podataka korišten je program SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA). Statističke značajnosti razlika analizirane su  $H_i^2$  testom, Man-Whitney testom i Kruskal-Wallisovim testom. Univarijatna i multivarijatna predviđanja specifičnog mortaliteta za karcinom dojke provedena su pomoću logističke regresijske analize i korišten je omjer izgleda (eng. odds ratio) uz 95%-tni interval pouzdanosti (eng. confidence interval) za svaku varijablu. U analizi preživljenja prema svim varijablama korištena je Kaplan-Meierova metoda, log-rank test i Breslow test. Utjecaj ispitivanih varijabli na preživljenje i relativni rizik smrtnog ishoda i povrata bolesti analiziran je Coxovom regresijskom analizom. Statistički značajnom se smatrala vrijednost  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Obilježja ispitanica

U ispitivanje su bile uključene 152 žene oboljele od primarnog invazivnog karcinoma dojke. Za svaku bolesnicu su prikupljeni i analizirani podaci o dobi, veličini tumora, histološkom i nuklearnom gradusu, statusu steroidnih receptora i HER2 statusu, proliferacijskom indeksu mjerenom s Ki-67, statusu limfnih čvorova, izraženosti 8-oksodG i podaci o terapiji. Distribucija kvalitativnih obilježja prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Patohistološke karakteristike tumora dojke u istraživanoj skupini

|                                | N (%)        |
|--------------------------------|--------------|
| Dob (medijan, IQR)             | 56 (49-66,8) |
| Veličina tumora (medijan, IQR) | 20 (13-30)   |
| Veličina tumora (n, %)         |              |
| T1                             | 83 (54.6)    |
| T2                             | 60 (39.5)    |
| T3                             | 9 (5.9)      |
| ukupno                         | 152 (100.0)  |
| Status limfnih čvorova         |              |
| negativan                      | 79 (52.0)    |
| pozitivan                      | 46 (30.3)    |
| nema podataka                  | 27 (17.8)    |
| ukupno                         | 152 (100.0)  |
| Histološki tip                 |              |
| duktalni (NOS)                 | 119 (78.3)   |
| lobularni                      | 30 (19.7)    |
| ostali                         | 3 (2.0)      |
| ukupno                         | 152 (100.0)  |
| Gradus                         |              |
| 1                              | 27 (17.8)    |
| 2                              | 71 (46.7)    |
| 3                              | 54 (35.5)    |
| ukupno                         | 152 (100.0)  |
| Nuklearni gradus               |              |
| 1                              | 16 (10.5)    |
| 2                              | 83 (54.6)    |

|                              | N (%)       |
|------------------------------|-------------|
| 3                            | 53 (34.9)   |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| Vaskularna invazija          |             |
| negativna                    | 145 (95.4)  |
| pozitivna                    | 7 (4.6)     |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| ER                           |             |
| negativni                    | 52 (34.2)   |
| pozitivni                    | 100 (65.8)  |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| PR                           |             |
| negativni                    | 70 (46.1)   |
| pozitivni                    | 82 (53.9)   |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| HER2                         |             |
| negativni                    | 123 (80.9)  |
| pozitivni                    | 29 (19.1)   |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| Ki-67 proliferacijski indeks |             |
| nizak (<14%)                 | 119 (78.3)  |
| visok (14%+)                 | 33 (21.7)   |
| ukupno                       | 152 (100.0) |
| Kemoterapija                 |             |
| ne                           | 35 (24.0)   |
| da                           | 111 (76.0)  |
| ukupno                       | 146 (100.0) |
| Radioterapija                |             |
| ne                           | 45 (30.8)   |
| da                           | 101 (69.2)  |
| ukupno                       | 146 (100.0) |
| Hormonska terapija           |             |
| ne                           | 43 (29.5)   |
| da                           | 103 (70.5)  |
| ukupno                       | 146 (100.0) |

Većina bolesnica je bila starija od 50 godina, imala invazivni duktalni karcinom (NOS), histološki i nuklearni gradus 2 te tumor manji od 2 cm u najvećem promjeru. Limfni čvorovi su bili negativni u 79 (52%) ispitanica, dok u 27 ispitanica nije bilo podataka o limfnim čvorovima. Vaskularna invazija je bila nađena u samo 4.6% bolesnica. Više od polovine

bolesnica (65.8%) imalo je tumor s pozitivnim steroidnim receptorima, dok je HER2 bio pozitivan u njih 29 (19.1%). Proliferacijski indeks Ki-67 je bio nizak u 78.3% bolesnica. Hormonsku terapiju primilo je 70.5% bolesnica. Liječenje adjuvantnom kemoterapijom provedeno je u 76% bolesnica. Zračenju nakon operacije primarnog raka dojke podvrgnuto je 69.2% bolesnica.

Rezultati 8-oksodG imunobojenja su prikazani Allredovim indeksom (tablica 2). Allredov indeks 0 je smatran negativnim, dok su indeksi 1-3 smatrani pozitivnim. U ovoj skupini bolesnica 7 (4.6%) je imalo negativan Allredov indeks, dok su 145 (95.4%) bolesnice imale pozitivan Allredov indeks; od toga ih je 68 (44.7%) imalo indeks 1, 54 (35.5%) indeks 2 i 23 (15.1%) ispitanice su imale indeks 3.

Tablica 2. Izraženost 8-oksodG imunobojenja

|                             | N (%)       |
|-----------------------------|-------------|
| Allredov indeks (neg/poz)   |             |
| negativan                   | 7 (4.6)     |
| pozitivan                   | 145 (95.4)  |
| ukupno                      | 152 (100.0) |
| Allredov indeks             |             |
| negativan (0)               | 7 (4.6)     |
| slabo pozitivan (skor 1)    | 68 (44.7)   |
| umjereno pozitivan (skor 2) | 54 (35.5)   |
| jako pozitivan (skor 3)     | 23 (15.1)   |
| ukupno                      | 152 (100.0) |

Distribucija povrata bolesti i smrtnog ishoda od karcinoma dojke u sviju 152 bolesnica je prikazana u tablici 3.

Tablica 3. Distribucija ponovne pojave bolesti i smrtnog ishoda u bolesnica s karcinomom dojke

|                | N (%)       |
|----------------|-------------|
| Relaps         |             |
| ne             | 104 (68.4)  |
| da             | 48 (31.6)   |
| ukupno         | 152 (100.0) |
| Smrt           |             |
| ne             | 115 (75.7)  |
| da             | 37 (24.3)   |
| ukupno         | 152 (100.0) |
| Uzrok smrti    |             |
| karcinom dojke | 30 (81.1)   |
| drugo          | 7 (18.9)    |
| ukupno         | 37 (100.0)  |

Recidiv bolesti se javio u 48 (31.6%) bolesnica, a umrlo je njih 37 (24.3%). Od toga je 30 (81.1%) bolesnica umrlo od karcinoma dojke, a 7 (18.9%) od neke druge bolesti nevezane za karcinom.

Distibucija tumora prema imunohistokemijskom profilu je prikazana u tablici 4.

Tablica 4. Distribucija tumora prema imunohistokemijskom profilu

|                                                | N (%)       |
|------------------------------------------------|-------------|
| Luminalni A                                    | 75 (49.3)   |
| Luminalni B (HER2 negativan)                   | 16 (10.5)   |
| Luminalni B (HER2 pozitivan)                   | 17 (11.2)   |
| HER2 pozitivan                                 | 12 (7.9)    |
| Trostruko negativni karcinomi<br>dojke (TNBCs) | 32 (21.1)   |
| ukupno                                         | 152 (100.0) |

Većina bolesnica je imala luminalni A tumor (49.3%), zatim trostruko negativni (21.1%), luminalni B“HER2+“ (11.2%), luminalni B“HER2-“ (10.5%) i HER2 pozitivne tumore (7.9%). Ukupan broj HER2 pozitivnih slučajeva je bio veći, budući da je dio luminalnih B tumora HER2 pozitivan.

Razlike u karakteristikama tumora prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke su prikazane u tablici 5.



Tablica 5. Razlike u karakteristikama tumora prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke

|                        | Podtipovi prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke |                              |                              |                |                            | <i>P</i> *; cc**         |
|------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|
|                        | Luminalni A                                                 | Luminalni B (HER2 negativan) | Luminalni B (HER2 pozitivan) | HER2 pozitivan | Trostruko negativan (TNBC) |                          |
|                        | N (%)                                                       | N (%)                        | N (%)                        | N (%)          | N (%)                      |                          |
| Veličina tumora        |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| T1                     | 52 (69.3)                                                   | 11 (68.8)                    | 5 (29.4)                     | 4 (33.3)       | 11 (34.4)                  | <b>&lt;0.001</b> ; 0.352 |
| T2                     | 20 (26.7)                                                   | 5 (31.3)                     | 11 (64.7)                    | 7 (58.3)       | 17 (53.1)                  |                          |
| T3                     | 3 (4.0)                                                     | 0 (0.0)                      | 1 (5.9)                      | 1 (8.3)        | 4 (12.5)                   |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| Status limfnih čvorova |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| negativni              | 41 (65.1)                                                   | 9 (81.8)                     | 7 (50.0)                     | 5 (45.5)       | 17 (65.4)                  | 0,372                    |
| pozitivni              | 22 (34.9)                                                   | 2 (18.2)                     | 7 (50.0)                     | 6 (54.5)       | 9 (34.6)                   |                          |
| ukupno                 | 63 (100.0)                                                  | 11 (100.0)                   | 14 (100.0)                   | 11 (100.0)     | 26 (100.0)                 |                          |
| Gradus                 |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| 1                      | 18 (24.0)                                                   | 2 (12.5)                     | 3 (17.6)                     | 1 (8.3)        | 3 (9.4)                    | <b>&lt;0.001</b> ; 0,420 |
| 2                      | 46 (61.3)                                                   | 7 (43.8)                     | 2 (11.8)                     | 4 (33.3)       | 12 (37.5)                  |                          |
| 3                      | 11 (14.7)                                                   | 7 (43.8)                     | 12 (70.6)                    | 7 (58.3)       | 17 (53.1)                  |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| Histološki tip         |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| duktalni (NOS)         | 56 (74.7)                                                   | 13 (81.3)                    | 15 (88.2)                    | 10 (83.3)      | 25 (78.1)                  | 0.633                    |
| lobularni              | 17 (22.7)                                                   | 3 (18.8)                     | 2 (11.8)                     | 1 (8.3)        | 7 (21.9)                   |                          |
| drugi                  | 2 (2.7)                                                     | 0 (0.0)                      | 0 (0.0)                      | 1 (8.3)        | 0 (0.0)                    |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| Nuklearni gradus       |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| 1                      | 13 (17.3)                                                   | 0 (0.0)                      | 0 (0.0)                      | 1 (8.3)        | 2 (6.3)                    | <b>0.001</b> ; 0.399     |
| 2                      | 49 (65.3)                                                   | 11 (68.8)                    | 6 (35.3)                     | 4 (33.3)       | 13 (40.6)                  |                          |
| 3                      | 13 (17.3)                                                   | 5 (31.3)                     | 11 (64.7)                    | 7 (58.3)       | 17 (53.1)                  |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| Vaskularna invazija    |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| negativna              | 72 (96.0)                                                   | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 10 (83.3)      | 30 (93.8)                  | 0.186                    |
| pozitivna              | 3 (4.0)                                                     | 0 (0.0)                      | 0 (0.0)                      | 2 (16.7)       | 2 (6.3)                    |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| ER                     |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| negativni              | 3 (4.0)                                                     | 1 (6.3)                      | 4 (23.5)                     | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 | <b>&lt;0.001</b> ; 0.666 |
| pozitivni              | 72 (96.0)                                                   | 15 (93.8)                    | 13 (76.5)                    | 0 (0.0)        | 0 (0.0)                    |                          |
| ukupno                 | 75 (100.0)                                                  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| PR                     |                                                             |                              |                              |                |                            |                          |
| negativni              | 17 (22.7)                                                   | 5 (31.3)                     | 4 (23.5)                     | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 | <b>&lt;0.001</b> ; 0.569 |

| Podtipovi prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke |             |                              |                              |                |                            |                          |
|-------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------|
|                                                             | Luminalni A | Luminalni B (HER2 negativan) | Luminalni B (HER2 pozitivan) | HER2 pozitivan | Trostruko negativan (TNBC) | <i>P</i> *; cc**         |
|                                                             | N (%)       | N (%)                        | N (%)                        | N (%)          | N (%)                      |                          |
| pozitivni                                                   | 58 (77.3)   | 11 (68.8)                    | 13 (76.5)                    | 0 (0.0)        | 0 (0.0)                    |                          |
| ukupno                                                      | 75 (100.0)  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| HER2                                                        |             |                              |                              |                |                            |                          |
| negativni                                                   | 75 (100.0)  | 16 (100.0)                   | 0 (0.0)                      | 0 (0.0)        | 32 (100.0)                 | <b>&lt;0.001</b> ; 0.707 |
| pozitivni                                                   | 0 (0.0)     | 0 (0.0)                      | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 0 (0.0)                    |                          |
| ukupno                                                      | 75 (100.0)  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |
| Ki-67 proliferacijski indeks                                |             |                              |                              |                |                            |                          |
| nizak (<14%)                                                | 75 (100.0)  | 0 (0.0)                      | 9 (52.9)                     | 9 (75.0)       | 26 (81.3)                  | <b>&lt;0.001</b> ; 0.599 |
| visok (14%+)                                                | 0 (0.0)     | 16 (100.0)                   | 8 (47.1)                     | 3 (25.0)       | 6 (18.8)                   |                          |
| ukupno                                                      | 75 (100.0)  | 16 (100.0)                   | 17 (100.0)                   | 12 (100.0)     | 32 (100.0)                 |                          |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

\*\*cc=koeficijent kontigencije

Između pet podtipova karcinoma dojke je postojala statistički značajna razlika u veličini tumora ( $\chi^2=21.531; P<0.001$ ), histološkom gradusu ( $\chi^2=32.629; P<0.001$ ) i nuklearnom gradusu ( $\chi^2=28.822; P=0.001$ ). Luminalni B (HER2+), HER2 pozitivni i trostruko negativni podtipovi su češće imali veći tumor (T2), visok histološki i visok nuklearni gradus u odnosu na druge luminalne podtipove.

Medijan dobi bolesnica iznosio je 56 godina, pri čemu je najmlađa bolesnica imala 30, a najstarija 83 godine. U tablici 6 je prikazana distribucija dobi prema imunohistokemijskom profilu tumora i izraženosti 8-oksodG.

Tablica 6. Parametri distribucije dobi prema imunohistokemijskom profilu tumora i izraženosti 8-oksodG

|                              | N  | Medijan dobi (IQR)* | P**   |
|------------------------------|----|---------------------|-------|
| Podtipovi karcinoma dojke    |    |                     |       |
| luminalni A                  | 75 | 57 (49-69)          | 0.858 |
| luminalni B (HER2 negativan) | 16 | 59.5 (45.5-68.5)    |       |
| luminal B (HER2 pozitivan)   | 17 | 54 (50-62.5)        |       |
| HER2 pozitivan               | 12 | 55 (51-64.3)        |       |
| trostruko negativni (TNBC)   | 32 | 55 (48-65.8)        |       |
| Allredov indeks              |    |                     |       |
| negativan                    | 7  | 56 (49-64)          | 0.434 |
| slabo pozitivan              | 68 | 52.5 (48-66)        |       |
| umjereno pozitivan           | 54 | 56.5 (50-68.3)      |       |
| jako pozitivan               | 23 | 62 (50-67)          |       |

\*IQR=interkvartilni raspon

\*\*Kruskal-Wallis test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Pri analizi distribucije dobi bolesnica prema imunohistokemijskom profilu tumora (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2=1.371$ ;  $P=0.858$ ) i izraženosti 8-oksodG (Kruskal-Wallis test;  $\chi^2=2.764$ ;  $P=0.434$ ) nije nađena statistički značajna razlika.

## 4.2. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i ostalih ispitivanih obilježja

### 4.2.1. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i podtipova prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke

U tablicama 7-11 je prikazana analiza povezanosti imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG izraženog Allredovim indeksom (pozitivan/negativan) s pet podtipova karcinoma dojke prema imunohistokemijskom profilu tumora.

Tablica 7. Izraženost 8-oksodG u luminalnom A karcinomu dojke

|                 | Luminalni A |                          | <i>P</i> * |
|-----------------|-------------|--------------------------|------------|
|                 | da          | ne (ostali<br>podtipovi) |            |
|                 | N (%)       | N (%)                    |            |
| Allredov indeks |             |                          |            |
| negativan       | 3 (4.0)     | 4 (5.2)                  | >0.999     |
| pozitivan       | 72 (96.0)   | 73 (94.8)                |            |
| ukupno          | 75 (100.0)  | 77 (100.0)               |            |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 8. Izraženost 8-oksodG u luminalnom B (HER2-) karcinomu dojke

|                 | Luminalni B (HER2 negativan) |                          | <i>P</i> * |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|------------|
|                 | da                           | ne (ostali<br>podtipovi) |            |
|                 | N(%)                         | N(%)                     |            |
| Allredov indeks |                              |                          |            |
| negativan       | 0 (0.0)                      | 7 (5.1)                  | 0.611      |
| pozitivan       | 16 (100.0)                   | 129 (94.9)               |            |
| ukupno          | 16 (100.0)                   | 136 (100.0)              |            |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 9. Izraženost 8-oksodG u luminalnom B (HER2+) karcinomu dojke

|                 | Luminalni B (HER2 pozitivan) |                          | <i>P</i> * |
|-----------------|------------------------------|--------------------------|------------|
|                 | da                           | ne (ostali<br>podtipovi) |            |
|                 | N(%)                         | N(%)                     |            |
| Allredov indeks |                              |                          |            |
| negativan       | 0 (0.0)                      | 7 (5.2)                  | 0.605      |
| pozitivan       | 17 (100.0)                   | 128 (94.8)               |            |
| ukupno          | 17 (100.0)                   | 135 (100.0)              |            |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 10. Izraženost 8-oksodG u HER2 pozitivnom karcinomu dojke

|                 | HER2 pozitivan |                                  | <i>P</i> * |
|-----------------|----------------|----------------------------------|------------|
|                 | da<br>N(%)     | ne (ostali<br>podtipovi)<br>N(%) |            |
| Allredov indeks |                |                                  |            |
| negativan       | 0 (0.0)        | 7 (5.0)                          | 0.652      |
| pozitivan       | 12 (100.0)     | 133 (95.0)                       |            |
| ukupno          | 12 (100.0)     | 140 (100.0)                      |            |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Tablica 11. Izraženost 8-oksodG u trostruko negativnom karcinomu dojke

|                 | Trostruko negativan tumor |                                  | <i>P</i> *; cc**     |
|-----------------|---------------------------|----------------------------------|----------------------|
|                 | da<br>N(%)                | ne (ostali<br>podtipovi)<br>N(%) |                      |
| Allredov indeks |                           |                                  |                      |
| negativan       | 4 (12.5)                  | 3 (2.5)                          | <b>0.036</b> ; 0.191 |
| pozitivan       | 28 (87.5)                 | 117 (97.5)                       |                      |
| ukupno          | 32 (100.0)                | 120 (100.0)                      |                      |

\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

\*\* cc= koeficijent kontigencije

Analizom povezanosti izraženosti 8-oksodG i različitih podtipova prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke statistički značajna razlika je nađena u trostruko negativnim karcinomima dojke (TNBCs). TNBCs su češće imali negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG ( $\chi^2=5.751$ ;  $P=0.036$ ) u odnosu na druge podtipove. Nije nađena statistički značajna povezanost imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG i ostalih podtipova.

#### 4.2.2. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i patohistoloških karakteristika tumora

Tablica 12 pokazuje izraženosti 8-oksodG u četiri kategorije s obzirom na prognostičke faktore karcinoma dojke. Iako se može uočiti veza slabog pozitiviteta 8-oksodG s gradusom ( $P=0.055$ ) i veličinom tumora ( $P=0.051$ ), ovim istraživanjem to nije bilo moguće statistički značajno utvrditi. Nije bilo statistički značajne povezanosti između imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG i drugih prognostičkih faktora kao što su nuklearni gradus, vaskularna invazija, status limfnih čvorova, ER/PR status, HER2 status i Ki-67.

Tablica 12. Prikaz kvalitativnih varijabli s obzirom na imunohistokemijski nalaz 8-oksodG

|                        | Allredov indeks |                  |                     |                 |             | <i>P</i> * |
|------------------------|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|-------------|------------|
|                        | negativan       | slab pozitivitet | umjeren pozitivitet | jak pozitivitet | ukupno      |            |
|                        | N (%)           | N (%)            | N (%)               | N (%)           | N (%)       |            |
| Veličina tumora        |                 |                  |                     |                 |             |            |
| T1                     | 5 (6.0)         | 32 (38.6)        | 37 (44.6)           | 9 (10.8)        | 83 (100.0)  | 0.051      |
| T2                     | 2 (3.3)         | 30 (50.0)        | 14 (23.3)           | 14 (23.3)       | 60 (100.0)  |            |
| T3                     | 0 (0.0)         | 6 (66.7)         | 3 (33.3)            | 0 (0.0)         | 9 (100.0)   |            |
| Status limfnih čvorova |                 |                  |                     |                 |             |            |
| negativan              | 6 (7.6)         | 35 (44.3)        | 26 (32.9)           | 12 (15.2)       | 79 (100.0)  | 0.649      |
| pozitivan              | 1 (2.2)         | 21 (45.7)        | 17 (37.0)           | 7 (15.2)        | 46 (100.0)  |            |
| Gradus                 |                 |                  |                     |                 |             |            |
| 1                      | 4 (14.8)        | 12 (44.4)        | 10 (37.0)           | 1 (3.7)         | 27 (100.0)  | 0.055      |
| 2                      | 2 (2.8)         | 28 (39.4)        | 28 (39.4)           | 13 (18.3)       | 71 (100.0)  |            |
| 3                      | 1 (1.9)         | 28 (51.9)        | 16 (29.6)           | 9 (16.7)        | 54 (100.0)  |            |
| Histološki tip         |                 |                  |                     |                 |             |            |
| duktalni (NOS)         | 7 (5.9)         | 53 (44.5)        | 42 (35.3)           | 17 (14.3)       | 119 (100.0) | 0.754      |
| lobularni              | 0 (0.0)         | 13 (43.3)        | 11 (36.7)           | 6 (20.0)        | 30 (100.0)  |            |
| ostali                 | 0 (0.0)         | 2 (66.7)         | 1 (33.3)            | 0 (0.0)         | 3 (100.0)   |            |
| Nuklearni gradus       |                 |                  |                     |                 |             |            |
| 1                      | 2 (12.5)        | 8 (50.0)         | 5 (31.3)            | 1 (6.3)         | 16 (100.0)  | 0.368      |
| 2                      | 4 (4.8)         | 32 (38.6)        | 32 (38.6)           | 15 (18.1)       | 83 (100.0)  |            |
| 3                      | 1 (1.9)         | 28 (52.8)        | 17 (32.1)           | 7 (13.2)        | 53 (100.0)  |            |
| Vaskularna invazija    |                 |                  |                     |                 |             |            |
| negativna              | 7 (4.8)         | 63 (43.4)        | 52 (35.9)           | 23 (15.9)       | 145 (100.0) | 0.402      |
| pozitivna              | 0 (0.0)         | 5 (71.4)         | 2 (28.6)            | 0 (0.0)         | 7 (100.0)   |            |
| ER                     |                 |                  |                     |                 |             |            |
| negativni              | 4 (7.7)         | 17 (32.7)        | 21 (40.4)           | 10 (19.2)       | 52 (100.0)  | 0.134      |

|              | Allredov indeks |                  |                     |                 |             | <i>P</i> * |
|--------------|-----------------|------------------|---------------------|-----------------|-------------|------------|
|              | negativan       | slab pozitivitet | umjeren pozitivitet | jak pozitivitet | ukupno      |            |
|              | N (%)           | N (%)            | N (%)               | N (%)           | N (%)       |            |
| pozitivni    | 3 (3.0)         | 51 (51.0)        | 33 (33.0)           | 13 (13.0)       | 100 (100.0) |            |
| PR           |                 |                  |                     |                 |             |            |
| negativni    | 5 (7.1)         | 26 (37.1)        | 25 (35.7)           | 14 (20.0)       | 70 (100.0)  | 0.132      |
| pozitivni    | 2 (2.4)         | 42 (51.2)        | 29 (35.4)           | 9 (11.0)        | 82 (100.0)  |            |
| HER2         |                 |                  |                     |                 |             |            |
| negativni    | 7 (5.7)         | 55 (44.7)        | 42 (34.1)           | 19 (15.4)       | 123 (100.0) | 0.608      |
| pozitivni    | 0 (0.0)         | 13 (44.8)        | 12 (41.4)           | 4 (13.8)        | 29 (100.0)  |            |
| Ki-67        |                 |                  |                     |                 |             |            |
| nizak (<14%) | 7 (5.9)         | 55 (46.2)        | 42 (35.3)           | 15 (12.6)       | 119 (100.0) | 0.208      |
| visok (14%+) | 0 (0.0)         | 13 (39.4)        | 12 (36.4)           | 8 (24.2)        | 33 (100.0)  |            |

\*\* $P=\chi^2$  test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

### 4.3. Ocjenjivanje specifičnog mortaliteta za karcinom dojke

U ovoj analizi iz obrade su isključene bolesnice koje su umrle od neke druge bolesti (n=7). U tablici 13 je analizirana smrt od karcinoma dojke unutar pet podtipova prema imunohistokemijskom profilu tumora.

Tablica 13. Prikaz specifičnog mortaliteta karcinoma dojke prema podtipovima karcinoma

|                            | Smrt od karcinoma dojke |             |                 | <i>P</i> ; cc       | OR*                    | 95% CI |
|----------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|---------------------|------------------------|--------|
|                            | da<br>N (%)             | ne<br>N (%) | ukupno<br>N (%) |                     |                        |        |
| Luminalni A                |                         |             |                 |                     |                        |        |
| ne                         | 22 (29.7)               | 52 (70.3)   | 74 (100.0)      | <b>0.007</b> ;0.222 | 1                      |        |
| da                         | 8 (11.3)                | 63 (88.7)   | 71 (100.0)      |                     | <b>0.3 (0.12-0.73)</b> |        |
| Luminalni B (HER2-)        |                         |             |                 |                     |                        |        |
| ne                         | 25 (19.2)               | 105 (80.8)  | 130 (100.0)     | 0.309               | 1                      |        |
| da                         | 5 (33.3)                | 10 (66.7)   | 15 (100.0)      |                     | 2.1 (0.66-6.69)        |        |
| Luminalni B (HER2+)        |                         |             |                 |                     |                        |        |
| ne                         | 28 (21.9)               | 100 (78.1)  | 128 (100.0)     | 0.376               | 1                      |        |
| da                         | 2 (11.8)                | 15 (88.2)   | 17 (100.0)      |                     | 0.5 (0.10-2.21)        |        |
| HER2 pozitivan             |                         |             |                 |                     |                        |        |
| ne                         | 25 (18.8)               | 108 (81.2)  | 133 (100.0)     | 0.073               | 1                      |        |
| da                         | 5 (41.7)                | 7 (58.3)    | 12 (100.0)      |                     | 3.1 (0.90-10.53)       |        |
| Trostruko negativni (TNBC) |                         |             |                 |                     |                        |        |
| ne                         | 20 (17.4)               | 95 (82.6)   | 115 (100.0)     | 0.075               | 1                      |        |
| da                         | 10 (33.3)               | 20 (66.7)   | 30 (100.0)      |                     | 2.4 (0.97-5.84)        |        |

\*univarijatna logistička regresija

Statistički značajna razlika u specifičnoj smrtnosti od karcinoma dojke je nađena u luminalnom A podtipu ( $\chi^2=7.527$ ;  $P=0.007$ ). Prema rezultatima logističke regresije, bolesnice s luminalnim A podtipom su imale 0.7 (70%) puta manji omjer izgleda za pojavnost smrti od karcinoma dojke u odnosu na bolesnice s drugim podtipovima karcinoma dojke (OR=0.3; 95% CI=0.12-0.73). Veća smrtnost od karcinoma dojke je nađena kod HER2 pozitivnih ( $P=0.073$ ) i trostruko negativnih tumora ( $P=0.075$ ), ali nije dostigla statistički značajnu razliku. U tablici 14 prikazana je analiza povezanosti specifičnog mortaliteta od



karcinoma dojke s imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG, a u tablici 15 prikazana je smrt od karcinoma dojke prema patohistološkim karakteristikama tumora.

Tablica 14. Analiza povezanosti izraženosti 8-oksodG i smrti od karcinoma dojke

|                               | Smrt od karcinoma dojke |             |                 | <i>P</i> ; cc | OR <sub>uv</sub> * | 95% CI |
|-------------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|---------------|--------------------|--------|
|                               | da<br>N (%)             | ne<br>N (%) | ukupno<br>N (%) |               |                    |        |
| Allredov indeks               |                         |             |                 |               |                    |        |
| negativan                     | 3 (42.9)                | 4 (57.1)    | 7 (100.0)       | 0.314         | 1                  |        |
| slabo pozitivan (indeks 1)    | 11 (17.7)               | 51 (82.3)   | 62 (100.0)      |               | 0.3 (0.06-1.47)    |        |
| umjereno pozitivan (indeks 2) | 13 (24.1)               | 41 (75.9)   | 54 (100.0)      |               | 0.4 (0.08-2.14)    |        |
| jako pozitivan (indeks 3)     | 3 (13.6)                | 19 (86.4)   | 22 (100.0)      |               | 0.2 (0.03-1.45)    |        |
| Allredov indeks               |                         |             |                 |               |                    |        |
| negativan                     | 3 (42.9)                | 4 (57.1)    | 7 (100.0)       | 0.155         | 1                  |        |
| pozitivan                     | 27 (19.6)               | 111 (80.4)  | 138 (100.0)     |               | 0.3 (0.07-1.54)    |        |

\*univarijatna logistička regresija

Tablica 15. Prikaz smrti od karcinoma dojke prema patohistološkim karakteristikama tumora

|                  | Smrt od karcinoma dojke |             |                 | <i>P</i> ; cc        | OR <sub>uv</sub> *      | 95% CI |
|------------------|-------------------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------------------|--------|
|                  | da<br>N (%)             | ne<br>N (%) | ukupno<br>N (%) |                      |                         |        |
| Veličina tumora  |                         |             |                 |                      |                         |        |
| T1               | 8 (10.0)                | 72 (90.0)   | 80 (100.0)      | <b>0.001</b> ; 0.310 | 1                       |        |
| T2               | 17 (30.4)               | 39 (69.6)   | 56 (100.0)      |                      | <b>3.9 (1.55-9.91)</b>  |        |
| T3               | 5 (55.6)                | 4 (44.4)    | 9 (100.0)       |                      | <b>11.3 (2.5-50.62)</b> |        |
| Histološki tip   |                         |             |                 |                      |                         |        |
| duktalni         | 24 (21.1)               | 90 (78.9)   | 114 (100.0)     | 0.783                | 1                       |        |
| lobularni        | 6 (21.4)                | 22 (78.6)   | 28 (100.0)      |                      | 1.0 (0.37-2.81)         |        |
| ostali           | 0 (0.0)                 | 3 (100.0)   | 3 (100.0)       |                      | x x                     |        |
| Gradus           |                         |             |                 |                      |                         |        |
| 1                | 3 (11.5)                | 23 (88.5)   | 26 (100.0)      | 0.065                | 1                       |        |
| 2                | 11 (16.2)               | 57 (83.8)   | 68 (100.0)      |                      | 1.5 (0.38-5.80)         |        |
| 3                | 16 (31.4)               | 35 (68.6)   | 51 (100.0)      |                      | 3.5 (0.92-13.39)        |        |
| Nuklearni gradus |                         |             |                 |                      |                         |        |
| 1                | 2 (12.5)                | 14 (87.5)   | 16 (100.0)      | <b>0.037</b> ; 0.207 | 1                       |        |

|                        | Smrt od karcinoma dojke |             |                 | <i>P</i> ; cc        | OR <sub>uv</sub> *      | 95% CI |
|------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------------------|--------|
|                        | da<br>N (%)             | ne<br>N (%) | ukupno<br>N (%) |                      |                         |        |
| 2                      | 12 (15.0)               | 68 (85.0)   | 80 (100.0)      |                      | 1.2 (0.25-6.14)         |        |
| 3                      | 16 (32.7)               | 33 (67.3)   | 49 (100.0)      |                      | 3.4 (0.69-16.77)        |        |
| Vaskularna invazija    |                         |             |                 |                      |                         |        |
| negativna              | 26 (18.8)               | 112 (81.2)  | 138 (100.0)     | <b>0.034</b> , 0.199 | 1                       |        |
| pozitivna              | 4 (57.1)                | 3 (42.9)    | 7 (100.0)       |                      | <b>5.7 (1.21-27.24)</b> |        |
| Status limfnih čvorova |                         |             |                 |                      |                         |        |
| negativan              | 9 (11.8)                | 67 (88.2)   | 76 (100.0)      | <b>0.005</b> ; 0.259 | 1                       |        |
| pozitivan              | 15 (34.1)               | 29 (65.9)   | 44 (100.0)      |                      | <b>3.9 (1.51-9.80)</b>  |        |
| ER                     |                         |             |                 |                      |                         |        |
| negativni              | 16 (32.0)               | 34 (68.0)   | 50 (100.0)      | <b>0.018</b> ; 0.199 | 1                       |        |
| pozitivni              | 14 (14.7)               | 81 (85.3)   | 95 (100.0)      |                      | <b>0.4 (0.16-0.84)</b>  |        |
| PR                     |                         |             |                 |                      |                         |        |
| negativni              | 18 (27.3)               | 48 (72.7)   | 66 (100.0)      | 0.099                | 1                       |        |
| pozitivni              | 12 (15.2)               | 67 (84.8)   | 79 (100.0)      |                      | 0.5 (0.21-1.08)         |        |
| HER2                   |                         |             |                 |                      |                         |        |
| negativni              | 23 (19.8)               | 93 (80.2)   | 116 (100.0)     | 0.799                | 1                       |        |
| pozitivni              | 7 (24.1)                | 22 (75.9)   | 29 (100.0)      |                      | 1.3 (0.49-3.38)         |        |
| Ki-67                  |                         |             |                 |                      |                         |        |
| nizak (<14%)           | 21 (18.4)               | 93 (81.6)   | 114 (100.0)     | 0.215                | 1                       |        |
| visok (14%+)           | 9 (29.0)                | 22 (71.0)   | 31 (100.0)      |                      | 1.8 (0.73-4.50)         |        |

\*univarijatna logistička regresija

U analizi povezanosti imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG u tumorskim stanicama sa specifičnom smrtnosti od karcinoma dojke nije nađena statistički značajna razlika. Univarijatna analiza je pokazala da smrt od karcinoma dojke korelira s određenim prognostičkim faktorima kao što su veličina tumora ( $\chi^2=15.428$ ;  $P=0.001$ ), nuklearni gradus ( $\chi^2=6.506$ ;  $P=0.037$ ), vaskularna invazija ( $\chi^2=5.956$ ;  $P=0.034$ ), status limfnih čvorova ( $\chi^2=8.621$ ;  $P=0.005$ ) i negativna ekspresija ER ( $\chi^2=5.950$ ;  $P=0.018$ ). Prema logističkoj regresiji, bolesnice s T2 veličinom tumora su imale 3.9 puta veći omjer izgleda za smrt od karcinoma dojke te bolesnice s T3 veličinom tumora su imale 11.3 puta veći omjer izgleda za smrt od karcinoma dojke u odnosu na T1 veličinu tumora. Nalaz vaskularne invazije je povećala omjer izgleda za smrtni ishod 5.7 puta (OR=5.7; 95% CI=1.21-27.24). Također, pozitivni pazušni limfni čvorovi su povećavali omjer izgleda za smrtni ishod 3.9 puta

(OR=3.9;95% CI=1.51-9.80). Nađena je statistički značajna povezanost između stupnjeva nuklearnog gradusa i mortaliteta od karcinoma dojke, ali univarijatnom logističkom regresijom nije utvrđeno da su bolesnice s umjerenim i izraženim nuklearnim gradusom imale statistički značajno veće izgleda za umiranje od karcinoma dojke u odnosu na one s niskim nuklearnim gradusom. Prema logističkoj regresiji, bolesnice s pozitivnim ER su imale 0.6 puta manji omjer izgleda za umiranje od karcinoma dojke u odnosu na one s negativnim ER. Bolesnice s većim histološki gradusom tumora su također imale veći mortalitet od karcinoma dojke, ali razlika nije bila statistički značajna ( $P=0.065$ ).

Prema multivarijatnoj logističkoj regresiji, mortalitet od karcinoma dojke je bio statistički značajno povezan s negativnim imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG (negativni vs. pozitivni; OR=0.04;95% CI=0.002-0.62) kada su u model bili uključeni veličina tumora, vaskularna invazija, zahvaćanje regionalnih limfnih čvorova i status ER (tablica 17).

Tablica 17. Multivarijatna analiza specifičnog mortaliteta od karcinoma dojke prema imunohistokemijskom nalazu 8-oksodG i karakteristikama tumora

|                        | Smrt od karcinoma dojke |             |                 | OR <sub>mv</sub>        | 95% CI |
|------------------------|-------------------------|-------------|-----------------|-------------------------|--------|
|                        | da<br>N (%)             | ne<br>N (%) | ukupno<br>N (%) |                         |        |
| Allredov indeks        |                         |             |                 |                         |        |
| negativan              | 3 (42.9)                | 4 (57.1)    | 7 (100.0)       | 1                       |        |
| pozitivan              | 27 (19.6)               | 111 (80.4)  | 138 (100.0)     | <b>0.14 (0.02-0.86)</b> |        |
| Veličina tumora        |                         |             |                 |                         |        |
| T1                     | 8 (10.0)                | 72 (90.0)   | 80 (100.0)      | 1                       |        |
| T2                     | 17 (30.4)               | 39 (69.6)   | 56 (100.0)      | <b>3.1 (1.02-9.42)</b>  |        |
| T3                     | 5 (55.6)                | 4 (44.4)    | 9 (100.0)       | 4.2 (0.47-37.21)        |        |
| Vaskularna invazija    |                         |             |                 |                         |        |
| negativna              | 26 (18.8)               | 112 (81.2)  | 138 (100.0)     | 1                       |        |
| pozitivna              | 4 (57.1)                | 3 (42.9)    | 7 (100.0)       | 2.0 (0.24-16.86)        |        |
| Status limfnih čvorova |                         |             |                 |                         |        |
| negativan              | 9 (11.8)                | 67 (88.2)   | 76 (100.0)      | 1                       |        |
| pozitivan              | 15 (34.1)               | 29 (65.9)   | 44 (100.0)      | <b>3.9 (1.34-11.13)</b> |        |
| ER                     |                         |             |                 |                         |        |
| negativni              | 16 (32.0)               | 34 (68.0)   | 50 (100.0)      | 1                       |        |
| pozitivni              | 14 (14.7)               | 81 (85.3)   | 95 (100.0)      | 0.5 (0.17-1.35)         |        |

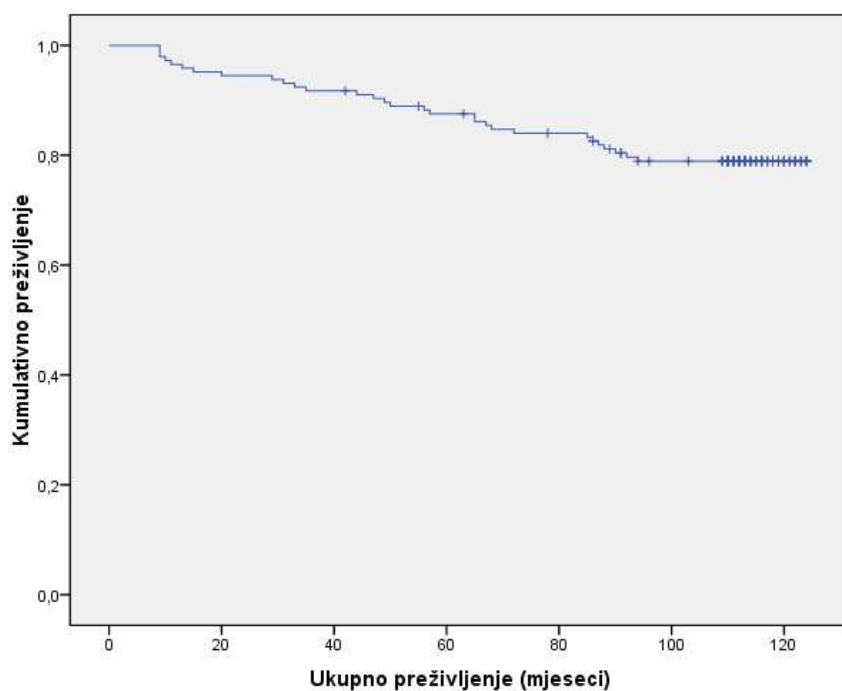
\*multivarijatna logistička regresija

Bolesnice s pozitivnim imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG su imale 0.86 puta manji omjer izgleda za umiranje od karcinoma dojke u odnosu na one s negativnim 8-oksodG nalazom. Osim toga, bolesnice s T2 veličinom tumora su imale 3.1 puta veći omjer izgleda za umiranje od karcinoma dojke nego one s T1 veličinom tumora (OR=3.1;95% CI=1.02-9.42). Prema multivarijantnoj logističkoj regresiji, bolesnice s pozitivnim limfnim čvorovima su imale 3.9 puta veći omjer izgleda za smrt od karcinoma dojke u odnosu na one s negativnim limfnim čvorovima (OR=3.9;95% CI=1.34-11.13).

#### 4.4. Analize preživljenja

##### 4.4.1. Ukupno preživljenje

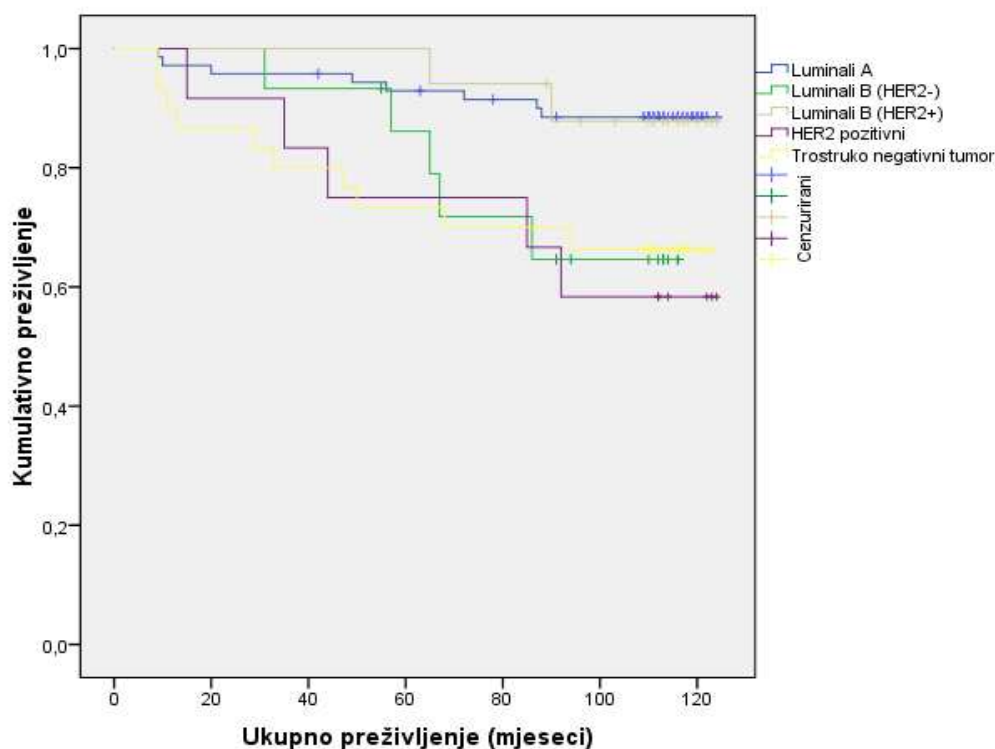
Analiza ukupnog preživljenja (OS) nastala je na temelju praćenja bolesnica od početka liječenja do smrti od karcinoma dojke ili zadnjeg kontrolnog pregleda bolesnica. Medijan vremena ukupnog preživljenja je bio 112 mjeseci. Tijekom istraživanja (oktobar 2002.- oktobar 2003. godine) 37 (24.3%) bolesnica je umrlo, dok ih je 115 (75.7%) preživjelo do kraja praćenja (desetogodišnje praćenje), odnosno ušlo u cenzus. Medijan vremena do smrti bio je 47 mjeseci (IQR 17.5-70). Na Slici 15 je prikazano ukupno preživljenje u 152 bolesnice s invazivnim karcinomom dojke.



Slika 15. Ukupno preživljenje svih bolesnica

Nakon Mann-Whitney testa kojim nije nađena statistički značajna povezanost između ukupnog preživljenja i podtipova prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke, napravljena je post hoc analiza Log-rank testom ( $\chi^2=12.931$ ;df=4; $P=0.001$ ) i Breslowim testom ( $\chi^2=13.009$ ;df=4; $P=0.001$ ) kojima je nađena statistički značajna povezanost.

Kaplan-Meierova krivulja ukupnog preživljenja u odnosu na podtipove prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke je prikazana na Slici 16. Najveći postotak smrti je nađen kod HER2 pozitivne grupe bolesnica, dok su bolesnice s luminalnim A tumorom imale najbolju prognozu.



Slika 16. Ukupno preživljenje u odnosu na podtipove prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke.

U tablici 19 prikazana je analiza ukupnog preživljenja prema patohistološkim karakteristikama tumora i imunohistokemijskom nalazu 8-oksodG.

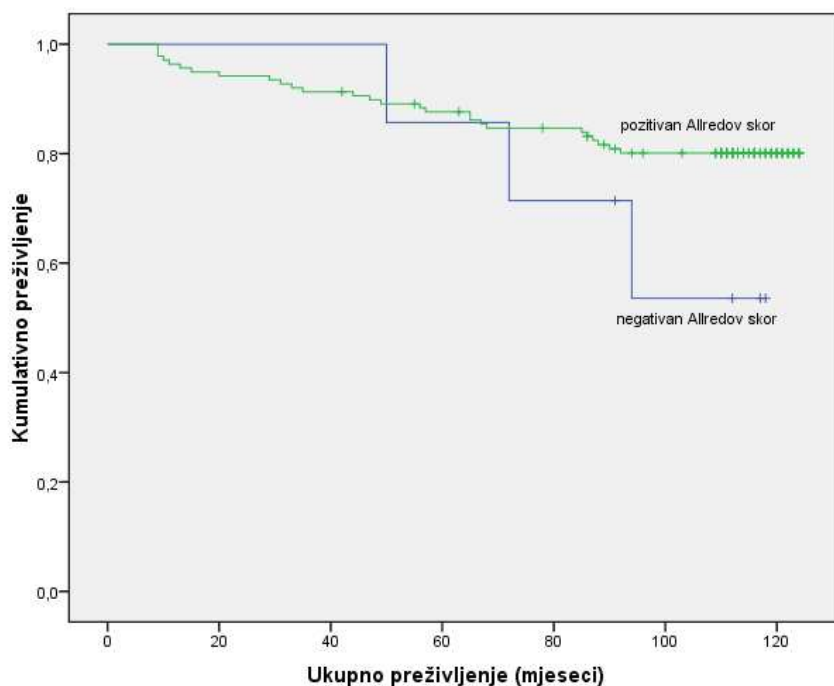
Tablica 19. Analiza ukupnog preživljenja prema patohistološkim karakteristikama tumora i imunohistokemijskom nalazu 8-oksodG

|                              | N   | medijan (IQR)     | <i>P</i> *, cc       |
|------------------------------|-----|-------------------|----------------------|
| Veličina tumora              |     |                   |                      |
| T1                           | 83  | 112 (110-116)     | <b>0.021</b> ; -0,95 |
| T2                           | 60  | 110 (58.3-116.8)  |                      |
| T3                           | 9   | 68 (10.5-114)     |                      |
| Status limfnih čvorova       |     |                   |                      |
| negativan                    | 79  | 112 (96-116)      | 0.426                |
| pozitivan                    | 465 | 112 (53-117.3)    |                      |
| Gradus                       |     |                   |                      |
| 1                            | 27  | 114 (110-119)     | <b>0.003</b> ; -0.93 |
| 2                            | 71  | 113 (109-116)     |                      |
| 3                            | 54  | 109 (63-112)      |                      |
| Histološki tip               |     |                   |                      |
| duktalni (NOS)               | 119 | 112 (87-116)      | 0.560                |
| lobularni                    | 30  | 112 (66.5-118)    |                      |
| ostali                       | 3   | 114 (110-115.5)   |                      |
| Nuklearni gradus             |     |                   |                      |
| 1                            | 16  | 112.5 (110-117.8) | <b>0.005</b> ; -0.94 |
| 2                            | 83  | 112 (109-117)     |                      |
| 3                            | 53  | 109 (52.5-113.5)  |                      |
| Vaskularna invazija          |     |                   |                      |
| negativna                    | 145 | 112 (89.5-116)    | 0.167                |
| pozitivna                    | 7   | 68 (11-116)       |                      |
| ER                           |     |                   |                      |
| negativni                    | 52  | 110.5 (58.3-116)  | 0.169                |
| pozitivni                    | 100 | 112 (94.5-116)    |                      |
| PR                           |     |                   |                      |
| negativni                    | 70  | 112 (71-116.3)    | 0.635                |
| pozitivni                    | 82  | 112 (94.8-116)    |                      |
| HER2                         |     |                   |                      |
| negativni                    | 123 | 112 (86-116)      | 0.319                |
| pozitivni                    | 29  | 112 (91-119)      |                      |
| Ki-67 proliferacijski indeks |     |                   |                      |
| nizak (<14%)                 | 119 | 112 (90-117)      | 0.051                |
| visok (14%+)                 | 33  | 110 (65-113)      |                      |
| Allredov indeks              |     |                   |                      |
| negativan                    | 7   | 94 (72-117)       | 0.554                |
| pozitivan                    | 145 | 112 (87.5-116)    |                      |

\*Mann-Whitney test u slučaju dvije grupe, Kruskal-Wallis test u slučaju više od dvije grupe, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Veličina tumora (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=7.471$ ;  $P=0.021$ ), visok histološki gradus (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=11.323$ ;  $P=0.003$ ) i visok nuklearni gradus (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=9.864$ ;  $P=0.005$ ) su bili statistički značajni faktori nepovoljne prognoze kod ukupnog preživljenja. Visoka ekspresija Ki-67 je bila blizu, ali nije dosegla statističku značajnost (0.051). Statistički značajna razlika je nađena između veličine tumora T1 i T2 (Mann-Whitney  $U=1947$ ;  $P=0.026$ ) i veličine tumora T1 i T3 (Mann-Whitney  $U=225$ ;  $P=0.048$ ), ali nakon Bonferronijeve korekcije nijedna razlika nije ostala statistički značajna. Osim toga, statistički značajna razlika je nađena između histološkog gradusa 1 i 3 (Mann-Whitney  $U=457.5$ ;  $P=0.008$ ) te između gradusa 2 i 3 (Mann-Whitney  $U=1337.5$ ;  $P=0.003$ ). Obje varijable su ostale statistički značajne nakon Bonferronijeve korekcije. Statistički značajna razlika je nađena između niskog i visokog nuklearnog gradusa (Mann-Whitney  $U=272$ ;  $P=0.031$ ), kao i između umjerenog i izraženog nuklearnog gradusa (Mann-Whitney  $U=1548.5$ ;  $P=0.002$ ). Nakon Bonferronijeve korekcije samo je razlika između umjerenog i izraženog nuklearnog gradusa ostala statistički značajna. Nije nađena statistički značajna povezanost između ukupnog preživljenja i imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG Log rank testom ( $\chi^2=1.748$ ;  $P=0.186$ ) i Breslowim testom ( $\chi^2=1.480$ ;  $P=0.224$ ), premda postoji tendencija da bolesnice s negativnim imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG imaju veću smrtnost od karcinoma dojke u odnosu na 8-oksodG pozitivne bolesnice (Slika 17).





Slika 17. Kaplan-Meierova krivulja za ukupno preživljenje prema izraženosti 8-oksodG

Rezultati Coxove regresijske analize za ukupno preživljenje su prikazani u tablici 20. Prema Coxovom regresijskom modelu, negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG (negativni vs. pozitivni;  $HR=0.1$ ;  $95\% \text{ CI}=0.02-0.68$ ) je bio nepovoljni prognostički čimbenik za ukupno preživljenje kada su u obzir uzeti imunohistokemijski profil tumora, veličina tumora, histološki i nuklearni gradus, vaskularna invazija, status limfnih čvorova, Ki-67, status steroidnih receptora i HER2 status. Bolesnice sa slabim ( $HR=0.1$ ;  $95\% \text{ CI}=0.02-0.84$ ) i jakim pozitivitetom 8-oksodG ( $HR=0.02$ ;  $95\% \text{ CI}=0.001-0.461$ ) su imale 0.9 i 0.98 puta manji omjer ugroženosti od smrtnog ishoda u odnosu na bolesnice s negativnom 8-oksodG ekspresijom. Bolesnice s luminalnim B (HER2 negativnim) podtipom karcinoma dojke su imale 29.6 puta veći omjer ugroženosti od smrtnog ishoda u odnosu na bolesnice s luminalnim A podtipom ( $HR=29.6$ ;  $95\% \text{ CI}=1.91-457.84$ ). Veličina tumora T2 je povećavala

omjer ugroženosti od smrtnog ishoda 3.6 puta u odnosu na tumor veličine T1 (HR=3.6;95% CI=1.21-10.59). Pozitivni status limfnih čvorova je povećavao omjer ugroženosti od smrtnog ishoda 3.7 puta (HR=3.7;95% CI=1.22-11.14). Nismo dokazali da su ostali analizirani pokazatelji: histološki i nuklearni gradus, vaskularna invazija, ER, PR te Ki-67 bili statistički značajno povezani s ukupnim preživljenjem.

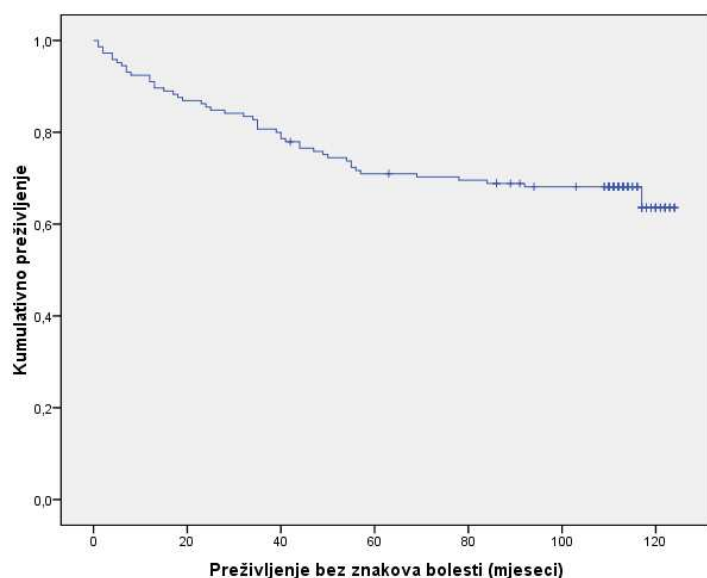
Tablica 20. Coxova regresijska analiza za OS

|                                  | frekvencija<br>N (%) | HR (95% CI)               |
|----------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Imunohistokemijski profil tumora |                      |                           |
| luminalni A                      | 71 (49.0)            | 1                         |
| luminalni B (HER 2-)             | 15 (10.3)            | <b>29.6 (1.91-457.84)</b> |
| luminalni B (HER 2+)             | 17 (11.7)            | 0.3 (0.03-2.96)           |
| HER 2 pozitivan                  | 12 (8.3)             | 5.0 (0.27-93.88)          |
| TNBCs                            | 30 (20.7)            | 3.5 (0.20-61.19)          |
| Vaskularna invazija              |                      |                           |
| negativna                        | 138 (95.2)           | 1                         |
| pozitivna                        | 7 (4.8)              | 0.8 (0.14-4.58)           |
| Gradus                           |                      |                           |
| 1                                | 26 (17.9)            | 1                         |
| 2                                | 68 (46.9)            | 1.0 (0.15-6.16)           |
| 3                                | 51 (35.2)            | 3.5 (0.26-45.42)          |
| Nuklearni gradus                 |                      |                           |
| 1                                | 16 (11.0)            | 1                         |
| 2                                | 80 (55.2)            | 0.7 (0.10-4.55)           |
| 3                                | 49 (33.8)            | 0.5 (0.31-6.93)           |
| Veličina tumora                  |                      |                           |
| T1                               | 80 (55.2)            | 1                         |
| T2                               | 56 (38.6)            | <b>3.6 (1.21-10.59)</b>   |
| T3                               | 9 (6.2)              | 4.3 (0.60-31.58)          |
| Status limfnih čvorova           |                      |                           |
| negativan                        | 76 (63.3)            | 1                         |
| pozitivan                        | 44 (19.2)            | <b>3.7 (1.22-11.14)</b>   |
| ER                               |                      |                           |
| negativni                        | 50 (34.5)            | 1                         |
| pozitivni                        | 95 (65.5)            | 0.6 (0.06-6.10)           |
| PR                               |                      |                           |
| negativni                        | 66 (45.5)            | 1                         |
| pozitivni                        | 79 (54.5)            | 4.0 (0.54-30.35)          |
| Ki-67 proliferacijski indeks     |                      |                           |
| negativan                        | 114 (78.6)           | 1                         |
| pozitivan                        | 31 (21.4)            | 0.2 (0.02-1.86)           |
| Allred indeks                    |                      |                           |
| negativan                        | 7 (4.8)              | 1                         |
| slabo pozitivan                  | 62 (42.8)            | <b>0.1 (0.02-0.84)</b>    |
| umjereno pozitivan               | 54 (37.2)            | 0.3 (0.05-2.03)           |
| jako pozitivan                   | 22 (15.2)            | <b>0.02 (0.001-0.461)</b> |

\*hazard ratio

#### 4.4.2. Preživljenje bez znakova bolesti

Analiza preživljenja bez znakova bolesti (DFS) nastala je na temelju praćenja bolesnica od početka liječenja do datuma povrata zloćudne bolesti. Medijan preživljenja bez znakova bolesti je bio 111 mjeseci. Tijekom istraživanja bolest se ponovo javila kod 48 bolesnica (31.6%), dok ih je 104 (68.4%) bilo bez ponovne pojave bolesti, odnosno ušle su u cenzus. Medijan vremena do ponovne pojave bolesti bio je 33 mjeseca (IQR 12-49.8). Na Slici 18 prikazano je vrijeme do ponovne pojave bolesti u 152 bolesnice.



Slika 18. Vrijeme do ponovne pojave bolesti

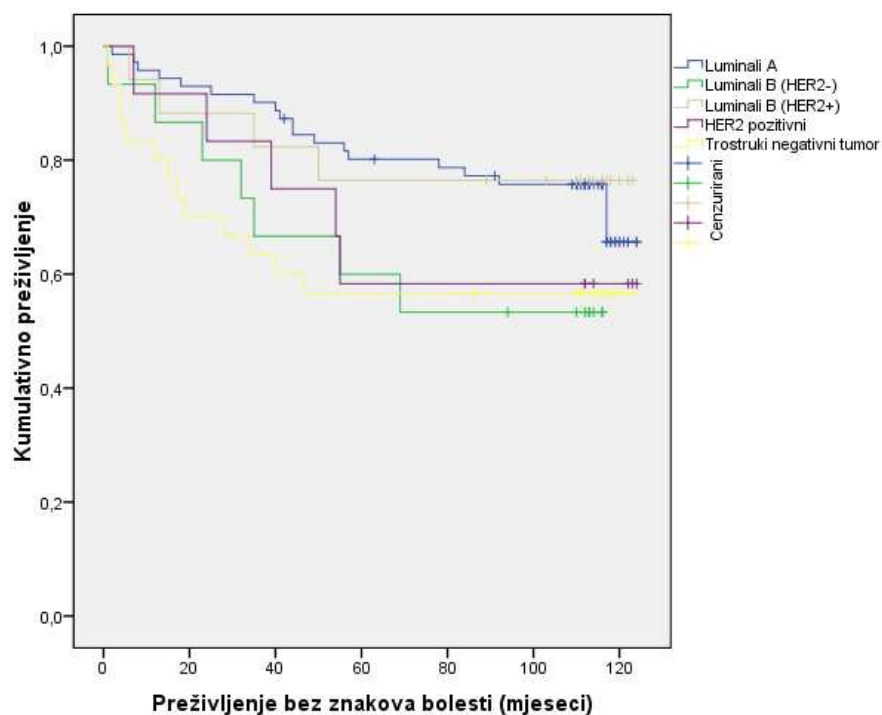
Nije nađena statistički značajna povezanost između preživljenja bez znakova bolesti i podtipova prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke što se vidi u tablici 21.

Tablica 21. Analiza DFS u mjesecima prema podtipovima karcinoma dojke

|                              | N   | medijan (IQR)    | <i>P</i> * |
|------------------------------|-----|------------------|------------|
| Luminalni A                  |     |                  |            |
| ne                           | 77  | 110 (33-115.5)   | 0.231      |
| da                           | 75  | 112 (57-116)     |            |
| Luminalni B (HER2 negativan) |     |                  |            |
| ne                           | 136 | 111 (44-116)     | 0.224      |
| da                           | 16  | 97.5 (32.8-113)  |            |
| Luminalni B (HER2 pozitivan) |     |                  |            |
| ne                           | 135 | 111 (42-115)     | 0.371      |
| da                           | 17  | 111 (69.5-117.5) |            |
| HER2 pozitivan               |     |                  |            |
| ne                           | 140 | 111 (42.5-116)   | 0.686      |
| da                           | 12  | 112 (42.8-120)   |            |
| Trostruko negativni (TNBC)   |     |                  |            |
| ne                           | 120 | 111 (54.3-116)   | 0.121      |
| da                           | 32  | 86 (17.5-115.8)  |            |

\**P*=Mann-Whitney test, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju bez znakova bolesti prema podtipovima karcinoma dojke Log rank testom ( $\chi^2=5.842; P=0.211$ ) i Breslowim testom ( $\chi^2=8.009; P=0.091$ ). Kaplan-Meierova krivulja preživljenja bez znakova bolesti prema podtipovima karcinoma dojke je prikazana na Slici 19.



Slika 19. DFS u odnosu na podtipove prema imunohistokemijskom profilu karcinoma dojke

Preživljenje bez znakova bolesti prema patohistološkim karakteristikama tumora i imunohistokemijskom nalazu 8-oksodG je prikazano na tablici 22.

Tablica 22. Analiza DFS prema patohistološkim karakteristikama tumora i imunohistokemijskom nalazu 8-oksodG

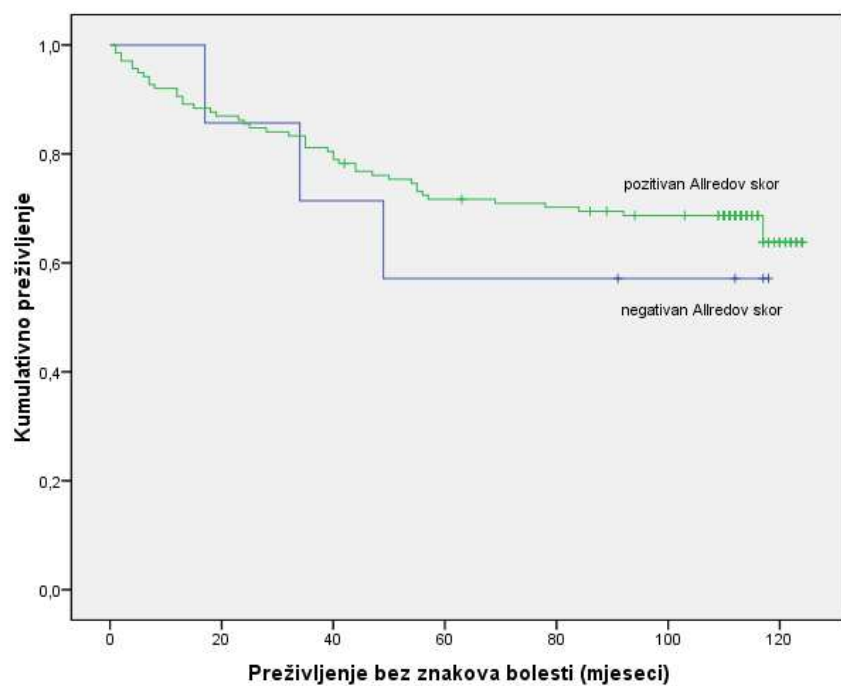
|                              | N   | medijan (IQR)      | <i>P*</i> ;cc        |
|------------------------------|-----|--------------------|----------------------|
| Veličina tumora              |     |                    |                      |
| T1                           | 83  | 112 (92-116.5)     | <b>0.026</b> ; -0.95 |
| T2                           | 60  | 87.5 (29.8-115.5)  |                      |
| T3                           | 9   | 35 (3.5-113.5)     |                      |
| Status limfnih čvorova       |     |                    |                      |
| negativan                    | 79  | 111 (63-115)       | 0.293                |
| pozitivan                    | 46  | 110.5 (19.8-116.3) |                      |
| Gradus                       |     |                    |                      |
| 1                            | 27  | 114 (110-118)      | <b>0.002</b> ; -0.92 |
| 2                            | 71  | 112 (55-116)       |                      |
| 3                            | 54  | 91.5 (21.5-112)    |                      |
| Histološki tip               |     |                    |                      |
| duktalni (NOS)               | 119 | 111 (42-114)       | 0.603                |
| lobularni                    | 30  | 110.5 (43-116.3)   |                      |
| ostali                       | 3   | 114 (110-115.5)    |                      |
| Nuklearni gradus             |     |                    |                      |
| 1                            | 16  | 112 (95.8-116.8)   | <b>0.025</b> ; -0.95 |
| 2                            | 83  | 112 (55-116)       |                      |
| 3                            | 53  | 101 (19.5-112.5)   |                      |
| Vaskularna invazija          |     |                    |                      |
| negativna                    | 145 | 111 (45.5-116)     | 0.162                |
| pozitivna                    | 7   | 8 (5-116)          |                      |
| ER                           |     |                    |                      |
| negativni                    | 52  | 110 (25-115.8)     | 0.407                |
| pozitivni                    | 100 | 111 (51.3-116)     |                      |
| PR                           |     |                    |                      |
| negativni                    | 70  | 110 (39.8-116)     | 0.532                |
| pozitivni                    | 82  | 111 (52.3-116)     |                      |
| HER2                         |     |                    |                      |
| negativan                    | 123 | 110 (42-115)       | 0.307                |
| pozitivan                    | 29  | 112 (52-117.5)     |                      |
| Ki-67 proliferacijski indeks |     |                    |                      |
| nizak (<14%)                 | 119 | 111 (44-116)       | 0.205                |

|                 | N   | medijan (IQR)  | <i>P*</i> ;cc |
|-----------------|-----|----------------|---------------|
| visok (14%+)    | 33  | 110 (33.5-113) |               |
| Allredov indeks |     |                |               |
| negativan       | 7   | 91 (34-117)    | 0.722         |
| pozitivan       | 145 | 111 (43-116)   |               |

\**P*=Mann-Whitney test u slučaju dvije grupe, Kruskal-Wallis test u slučaju više od dvije grupe, razina statističke značajnosti; vjerojatnost pogreške tipa I

Nije nađena statistički značajna povezanost između preživljenja bez znakova bolesti i imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG. Veličina tumora (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=7.167$ ; *P*=0.026), visok histološki gradus (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=11.743$ ; *P*=0.002) i visok nuklearni gradus (Kruskal-Wallis;  $\chi^2=7.370$ ; *P*=0.025) su bili statistički značajni faktori nepovoljne prognoze za DFS. DFS je bio najduži kod tumora veličine T1, a najkraći kod tumora veličine T3. Statistički značajna razlika je nađena između veličine tumora T1 i T2 (Mann-Whitney *U*=2005.5; *P*=0.048), kao i veličine tumora T1 i T3 (Mann-Whitney *U*=217.5; *P*=0.035), ali nakon Bonferronijeve korekcije nijedna varijabla nije ostala statistički značajna. Osim toga, DFS je bilo nadulje kod tumora niskog gradusa, a najkraće kod tumora visokog gradusa. Statistički značajna razlika je nađena između histološkog gradusa 1 i 3 (Mann-Whitney *U*=423; *P*=0.002) te između gradusa 2 i 3 (Mann-Whitney *U*=1430; *P*=0.015). Obje varijable su ostale statistički značajne nakon Bonferronijeve korekcije. Statistički značajna razlika je nađena između niskog i visokog nuklearnog gradusa (Mann-Whitney *U*=278; *P*=0.038), kao i između umjerenog i izraženog nuklearnog gradusa (Mann-Whitney *U*=1664; *P*=0.016). Nakon Bonferronijeve korekcije samo je razlika između umjerenog i izraženog nuklearnog gradusa ostala statistički značajna. DFS je bilo najdulje kod tumora niskog i umjerenog nuklearnog gradusa, a najkraće kod izraženog nuklearnog gradusa. Nije nađena statistički značajna povezanost između preživljenja bez znakova bolesti i imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG Log rank testom ( $\chi^2=0.269$ ; *P*=0.604) i Breslowim testom ( $\chi^2=0.284$ ; *P*=0.594). Kaplan-Meierova krivulja za preživljenje do ponovne pojave bolesti prema izraženosti 8-oksodG je prikazana na Slici 20.





Slika 20. Kaplan-Meierova krivulja za DFS prema izraženosti 8-oksodG

Rezultati Coxove regresijske analize za slobodni interval bez bolesti su prikazani u tablici 23.

Tablica 23. Coxova regresijska analiza za DFS

|                                  | frekvencija<br>N (%) | HR (95% CI)            |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| Imunohistokemijski profil tumora |                      |                        |
| luminalni A                      | 63 (50.4)            | 1                      |
| luminalni B (HER 2-)             | 11 (8.8)             | 3.0 (0.40-22.88)       |
| luminalni B (HER 2+)             | 14 (11.2)            | 0.8 (0.20-3.48)        |
| HER 2 pozitivan                  | 11 (8.8)             | 1.6 (0.13-20.49)       |
| TNBCs                            | 26 (20.8)            | 0.5 (0.15-1.95)        |
| Vaskularna invazija              |                      |                        |
| negativna                        | 119 (95.2)           | 1                      |
| pozitivna                        | 6 (4.8)              | 1.3 (0.27-6.51)        |
| Gradus                           |                      |                        |
| 1                                | 24 (12.8)            | 1                      |
| 2                                | 57 (52.0)            | 1.2 (0.33-4.90)        |
| 3                                | 44 (35.2)            | 4.83 (0.74-31.25)      |
| Nuklearni gradus                 |                      |                        |
| 1                                | 16 (12.8)            | 1                      |
| 2                                | 65 (52.0)            | 1.2 (0.29-5.16)        |
| 3                                | 44 (35.2)            | 0.5 (0.08-3.68)        |
| Veličina tumora                  |                      |                        |
| T1                               | 70 (56.0)            | 1                      |
| T2                               | 49 (39.2)            | 1.1 (0.53-2.59)        |
| T3                               | 6 (4.8)              | 1.9 (0.38-9.56)        |
| Status limfnih čvorova           |                      |                        |
| negativni                        | 79 (63.2)            | 1                      |
| pozitivni                        | 46 (36.8)            | <b>2.2 (1.09-4.43)</b> |
| ER                               |                      |                        |
| negativni                        | 44 (35.2)            | 1                      |
| pozitivni                        | 81 (64.8)            | 1.2 (0.15-10.69)       |
| PR                               |                      |                        |
| negativni                        | 60 (48.0)            | 1                      |
| pozitivni                        | 65 (25.0)            | 0.8 (0.31-2.16)        |
| Ki-67 proliferacijski indeks     |                      |                        |
| negativan                        | 101 (80.8)           | 1                      |
| pozitivan                        | 24 (19.2)            | 0.2 (0.05-1.34)        |
| Allredov indeks                  |                      |                        |
| negativan                        | 7 (5.6)              | 1                      |
| pozitivan                        | 118 (94.4)           | 0.5 (0.15-1.95)        |

Prema Coxovom regresijskom modelu, bolesnice s pozitivnim limfnim čvorovima su imale 2.2 puta veći omjer ugroženosti od smrtnog ishoda u odnosu na bolesnice s negativnim limfnim čvorovima (HR=2.2;95% CI = 1.09-4.43). Nismo dokazali da su ostali analizirani pokazatelji, kao što su imunohistokemijski profil tumora, veličina tumora, histološki i nuklearni gradus, vaskularna invazija, steroidni receptori, Ki-67 te imunohistokemijski nalaz 8-oksodG, bili statistički značajno povezani s DFS.

## 5. RASPRAVA

Rak dojke je još uvijek jedan od vodećih uzroka smrti od raka u žena, ali je tijekom posljednjih desetljeća zabilježen stalan pad stope smrtnosti unatoč sve većoj učestalosti karcinoma dojke. Razlog tomu je veća primjena sve učinkovitijih adjuvantnih načina liječenja. Kao rezultat redovitih mamografskih skrining programa došlo je do pomaka prema otkrivanju ranog karcinoma dojke (<2cm) s negativnim limfnim čvorovima i boljom prognozom. Učestalost recidiva nakon provedene samo kirurške terapije je vrlo niska kod pacijentica s ranim karcinomom dojke te je potrebna individualna procjena dobrobiti systemske kemoterapije kod donošenja odluka o terapiji. Važno je izbjeći prekomjerno liječenje pacijenata koji od njega imaju samo malu dobrobit, dok ujedno mogu imati nuspojave liječenja. S druge strane, trebalo bi izbjeći netočno ili nedovoljno liječenje. Stoga treba definirati specifične karakteristike koje bi omogućile optimalizaciju individualiziranog liječenja. Klasične kliničko-patološke karakteristike koje određuju prognozu i preporuke za adjuvantnu terapiju su veličina tumora, histološki gradus, status steroidnih receptora, HER2 status, limfovaskularna invazija i status limfnih čvorova. TNM sustav integrira ove karakteristike tumora u stadije koji imaju glavnu prognostičku vrijednost. Unatoč poznatim prognostičkim čimbenicima, karcinom dojke je često nepredvidivog tijeka, stoga se istražuju brojni biomarkeri s ciljem pomoći kod određivanja optimalne terapije, predviđanja odgovora na terapiju kao i ocjene prognoze. Odnedavno se sve češće koristi molekularno profiliranje koje se zasniva na ekspresiji gena kako bi se precizirala klasifikacija raka dojke te procijenila prognoza i odgovor na terapiju. Kompleksni profil svakog podtipa je određen pomoću molekularne i genetske informacije iz stanica tumora. Međutim, neke karakteristike tumora (status steroidnih receptora, HER2 status i proliferacijski indeks) koje se rutinski, imunohistokemijskom metodom, određuju u svakom karcinomu dojke se mogu koristiti za definiranje molekularnih podtipova. Luminalni tumori čine 70% invazivnih karcinoma dojke, pozitivni su na ER i PR te odgovaraju na hormonsku terapiju, dok imaju varijabilni odgovor na kemoterapiju. Luminalni B tumori imaju bolji odgovor na kemoterapiju vjerojatno zbog većeg proliferacijskog indeksa. Od pet podvrsta, luminalni A tumori imaju najbolju prognozu s relativno visokim stopama preživljenja i niskom stopom recidiva, dok luminalni B tumori obično imaju veći histološki gradus i lošiju prognozu od luminalnih A tumora. HER2

pozitivni tumori čine 15-20% karcinoma dojke, češće su visokog gradusa i pozitivnih limfnih čvorova. Liječe se kemoterapijom (najčešće antraciklinima) i ciljanim protutijelom trastuzumabom (Herceptin) (25-26). Trostruko negativni karcinomi dojke čine 15% svih karcinoma dojke, slabo su diferencirani tumori te često metastaziraju u pluća i mozak, dok su metastaze u regionalne limfne čvorove rjeđe (113). Ne mogu se liječiti hormonskom terapijom ili Herceptinom jer su ER i HER2 negativni te je kemoterapija jedini sistemski oblik liječenja. HER2 pozitivni i trostruko negativni tumori su karakterizirani agresivnijim fenotipom i lošim preživljenjem (18, 27). S tim su u skladu i rezultati naše studije. 71% tumora bilo je ER/PR pozitivno, 19.1% HER2 pozitivno, dok je trostruko negativnih bilo 21%. Većina bolesnica je imala luminalne A tumore (49.3%) male veličine, niskog gradusa i one su imale najbolje ukupno preživljenje kao i preživljenje bez znakova bolesti unutar deset godina praćenja. HER2 pozitivni i trostruko negativni su češće imali veći tumor, visokog histološkog i nukleranog gradusa te najlošije ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti.

Poznato je da oksidacijski stres ima važnu ulogu u karcinogenezi mnogih tumora, ali se još ne zna točno uloga oksidacijskog oštećenja DNA u etiologiji karcinoma dojke, kao i njegov udio u pojedinim molekularnim podtipovima karcinoma dojke. Prema dostupnoj literaturi, ovo je prva studija koja istražuje povezanost oksidacijskog DNA oštećenja i svih surogatnih molekularnih podtipova karcinoma dojke. U studiji smo pokazali da trostruko negativni karcinomi dojke češće imaju negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG u odnosu na ostale surogatne molekularne podtipove. Prema tome, logično je pretpostaviti da slobodnim radikalima inducirano DNA oštećenje bi moglo imati manju važnost u patogenezi trostruko negativnih tumora. Trostruko negativni karcinomi dojke se definiraju kao tumori kojima nedostaje ekspresija ER, PR i HER2. Naime, poznato je da je povećano izlaganje estrogenima tijekom života glavni rizični faktor za karcinom dojke. Estrogeni interakcijom sa svojim receptorima ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) potiču transkripciju gena vežući se na tzv. ERE (estrogen-responsive elements) gene koji su uključeni u stanični rast. Tako porast estrogena može dovesti do porasta stanične proliferacije (114). Jedan od najvažnijih kancerogenih mehanizama povezanih s estrogenom je oksidacijski metabolizam estrogena pri čemu se stvaraju slobodni radikali. Estrogeni se metaboliziraju hidroksilacijom u citokrom P450 sustavu u katekolestrogene (115). Katekolestrogeni se oksidiraju u semikvinone i kvinone, pri

čemu se stvara superoksid koji se dalje može reducirati u hidroksil radikal. Prema tome, fiziološke koncentracije estrogena i njihovih metabolita potiču stvaranje ROS-a koji povećava genomsku nestabilnost te aktivacijom nekih transkripcijskih faktora (npr. AP-1, NF- $\kappa$ B) igra važnu ulogu u transformaciji stanice, staničnom ciklusu, migraciji i invaziji karcinoma dojke (116). *In vitro* fiziološke koncentracije estrogena potiču stvaranje slobodnih radikala u ER pozitivnim MCF-7 stanicama karcinoma dojke i to naročito u mitohondrijima (117). Druge studije su pokazale da je razina 8-oksodG 9.3 puta veća u ER+ MCF-7 stanicama karcinoma dojke nego u trostruko negativnim MDA-MB-231 stanicama karcinoma dojke (88) te da inhibicija ER $\alpha$  značajno smanjuje estrogenima inducirano stvaranje 8-oksodG u MCF-7 stanicama (118). Ovi podaci su u skladu s novom kliničkom studijom koja je zabilježila pozitivnu korelaciju između izlučivanja 8-oksodG u urinu i rizika za uglavnom ER pozitivni karcinom dojke (119), što upućuje na specifičnu ulogu oksidacijskog stresa kod ER pozitivnog karcinoma dojke. Dvije velike studije nisu našle povezanost između izlučivanja 8-oksodG u urinu i rizika za karcinom dojke (90-91), ali one su koristile manje preciznu metodu za mjerenje 8-oksodG (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) od kromatografije. Osim toga, 17 $\beta$ -estradiol može povećati osjetljivost na oksidacijsko oštećenje modulacijom antioksidacijskih enzima (105). Naime, tretiranjem ER pozitivnih MCF-7 stanica s 17 $\beta$ -estradiolom dolazi do smanjene aktivnosti katalaze te porasta SOD i glutation peroksidaze u MCF-7 stanicama, što dovodi do smanjene sposobnosti metaboliziranja vodikova peroksida. Ako se vodikov peroksid ne reducira i reagira s tranzicijskim metalima (ionima željeza ili bakra) dolazi do stvaranja hidroksil radikala te posljedično do nastanka 8-oksodG. Prema tome, prekomjerno stvaranje ROS-a zajedno s promijenjenim antioksidacijskim statusom može pogodovati stvaranju oksidacijskog oštećenja tkiva u karcinomu dojke i potaknuti rast tumora. U korelaciji s ovim podacima Karihtala i suradnici su našli značajno veći pozitivitet 8-oksodG u grupi ER+/PR+/HER2- tumora u odnosu na trostruko negativne tumore te također sugeriraju da ROS ima važnu ulogu u patogenezi ER/PR+ tumora, ali ne nužno i kod trostruko negativnih tumora (97). Ovaj nalaz sukladan je s podacima u našoj studiji, 96% luminalnih A tumora te svi luminalni B tumori su bili 8-oksodG pozitivni, dok je 12.5% trostruko negativnih tumora pokazivalo negativno 8-oksodG imunobojenje. Osim toga, našli smo da su svi HER2 pozitivni tumori bili 8-oksodG pozitivni, pa je logično za pretpostaviti da bi oksidacijski stres također mogao igrati važnu ulogu u patogenezi u tim skupinama raka

dojke (luminalni B<sup>+</sup>HER2<sup>+</sup> i HER2<sup>+</sup>). U skladu s našim podacima, druga studija je našla pozitivnu korelaciju između 8-oksodG pozitiviteta, pozitivnog HER2 statusa i p53 ekspresije te predlaže da su slobodni radikali važni u stvaranju HER2 i p53 mutacija (98). Slobodnim radikalima izazvane GC→TA transverzijske mutacije su zabilježene u p53 genu *in vivo* kod karcinoma pluća i jetre (120-121).

Poznato je da se 8-oksodG uglavnom odstranjuje iz DNA djelovanjem OGG1 (74). U slučaju nedostatka OGG1, 8-oksodG perzistira i dolazi do akumulacije GC→TA mutacija. U nedavno objavljenoj studiji Karihtala i suradnici su našli značajno veći imunohistokemijski pozitivitet OGG1 kod invazivnog karcinoma dojke u odnosu na preinvazivne lezije dojke što tumače povećanom potrebom za reparacijskim DNA enzimima u stanjima većeg oksidacijskog stresa kao što je karcinom (101). Odnos između imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG i OGG1 je bio obrnuto proporcionalan. Također su zabilježili da je negativan OGG1 nalaz bio povezan s karakteristikama agresivnijeg oblika raka dojke kao što su visoki gradus, visoki proliferacijski indeks, limfovaskularna invazija te negativni steroidni receptori. Slično tome, svi trostruko negativni tumori u njihovoj studiji su bili OGG1 negativni. Osobito je zanimljiv podatak da su našli podgrupu bolesnica s negativnim imunohistokemijskim nalazom OGG1 i 8-oksodG koja je imala izrazito loše preživljenje. Za sada nema podataka o imunohistokemijskom nalazu OGG1 u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke. Samo jedna studija je zabilježila polimorfizam OGG1 gena kod trostruko negativnih tumora, što može utjecati na sposobnost OGG1 za odstranjenje 8-oksodG (122). Možda postoji podgrupa bolesnica s trostruko negativnim tumorima u čijoj patogenezi oksidacijski stres bi mogao imati znatno manju važnost. To bi objasnilo zašto trostruko negativni tumori češće imaju negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG i OGG1, jer osim OGG1 polimorfizma postoji manja potreba za intenzivnom indukcijom enzima za popravak DNA koji odstranjuju 8-oksodG iz DNA.

Rezultati studija u kojima je analizirana povezanost 8-oksodG pozitiviteta s patohistološkim karakteristikama tumora su proturječni. Neke studije nisu našle statistički značajnu povezanost između 8-oksodG razine i patohistoloških karakteristika tumora (87, 123). Karihtala i suradnici navode značajnu korelaciju pozitivnog 8-oksodG imunobojenja s niskim gradusom i malom veličinom tumora, dok su u drugoj studiji našli povezanost slabog 8-oksodG imunobojenja s pokazateljima za agresivniji fenotip raka dojke kao što su limfna

invazija i pozitivan status limfnih čvorova (97-98). Druge studije su zabilježile povezanost niske 8-oksodG razine u tumorskom tkivu ili urinu bolesnica s karcinomom dojke s većim stadijem ili gradusom tumora (87, 89). U našoj studiji, iako se mogla uočiti veza slabog 8-oksodG imunobojenja s visokim gradusom i veličinom tumora, razlika nije bila statistički značajna.

Nadalje, analizirana je povezanost imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG u tumorima sa specifičnom smrtnošću od karcinoma dojke. Iako nije dobivena statistički značajna razlika, prema našim rezultatima bolesnice s pozitivnim imunohistokemijskim nalazom 8-oksodG su imale 0.86 puta manje izgleda za smrtni ishod od karcinoma dojke u usporedbi s 8-oksodG negativnim bolesnicama, što ukazuje na pozitivan trend i mogućnost da bi se statistički značajna korelacija mogla dobiti uključivanjem većeg broja bolesnica. Ovaj trend je u skladu s dvije nedavno objavljene studije u kojima se navodi povezanost između negativnog 8-oksodG imunobojenja i većeg rizika smrtnosti od karcinoma dojke te zaključuje da je pozitivno 8-oksodG imunobojenje nezavisni faktor dobre prognoze kod karcinoma dojke (97-98). Razlog zbog kojeg nismo dobili statistički značajnu razliku mogao je biti u malom broju tumora s negativnim 8-oksodG imunobojenjem.

Dok je kod karcinoma dojke pozitivan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG bio povezan s dobrom prognozom, kod nekih drugih tumora kao što su karcinom pluća (100), kolorektalni karcinom (124) i karcinom ovarija (125) pozitivan 8-oksodG nalaz je bio prognostički faktor loše prognoze. Tako su, na primjer, u našoj studiji bolesnice s pozitivnim 8-oksodG tumorima imale 0.9 puta manju ugroženost od smrtnosti od karcinoma dojke, dok su u drugoj studiji bolesnici s visokim razinama 8-oksodG u karcinomima pluća imali više od tri puta povećanu ugroženost od smrtnog ishoda u odnosu na 8-oksodG negativne bolesnike. Razlog manje smrtnosti kod 8-oksodG pozitivnih bolesnica s karcinomom dojke bi mogla biti hormonska terapija koja se daje za ER/PR pozitivne tumore. Naime, poznato je da estrogeni imaju ulogu u inicijaciji i progresiji karcinoma dojke te da jedan od mehanizama uključuje oksidacijskim stresom posredovan put. Inhibicijom estrogenih receptora značajno se smanjuje nastanak oksidacijskog oštećenja DNA. Sama terapija tamoksifenom smanjuje smrtnost od karcinoma dojke godišnje za 31% (28). Stoga, ako oksidacijski stres u drugim tumorima ukazuje na lošiju prognozu, onda bi pronalaženje mehanizama koji izazivaju oksidacijsko oštećenje DNA u tim tumorima moglo biti od znatne terapijske važnosti.



Rezultati studija u kojima je analizirana povezanost 8-oksodG imunobojenja i preživljenja su se također razlikovali. Dvije studije su povezivale negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG s lošijim preživljenjem (97-98). Druge pak nisu zabilježile statistički značajnu korelaciju između 8-oksodG razine i preživljenja (87, 89). U ovoj studiji nije nađena povezanost između 8-oksodG imunobojenja i preživljenja (OS i DFS). Razlog tome mogao je biti mali broj bolesnica u pojedinim skupinama kao i činjenica da se HER2 pozitivni i trostruko negativni podtipovi koji imaju najgoru prognozu ujedno razlikuju u 8-oksodG i HER2 imunobojenju. Naime, svi HER2 pozitivni tumori u našoj studiji su bili 8-oksodG pozitivni, dok su trostruko negativni tumori bili češće 8-oksodG negativni.

Molekularno profiliranje koje mjeri ekspresiju gena se sve češće koristi u kliničkoj praksi s ciljem da bi se procijenila prognoza bolesnica s karcinomom dojke kao i odgovor na terapiju. Integracija molekularnih eseja s kliničkim i patohistološkim karakteristikama karcinoma dojke dodatno će osnažiti postojeće prognostičke i prediktivne modele izvan anatomske stadija bolesti i patohistološke fenotipizacije tumora. Prediktivni i prognostički faktori su važni za individualizaciju terapije karcinoma dojke kako bi se omogućilo efikasno liječenje i poštedilo pacijente s profilom niskog tumora od neželjenih nuspojava prekomjerne terapije. U tom cilju se istražuje i 8-oksodG kao najrasprostranjeniji marker oksidacijskog oštećenja DNA. Poznato je da oksidacijski stres ima važnu ulogu u patogenezi raka dojke, ali se još uvijek ne zna točna uloga oksidacijskog stresa u različitim molekularnim podtipovima karcinoma dojke. Osim toga, razina 8-oksodG ima nezavisnu prognostičku vrijednost u mnogim tumorima te bi rasvjetljavanje mehanizama nastanka oksidacijskog oštećenja DNA u tim tumorima moglo biti od znatne terapijske vrijednosti.

## 6. ZAKLJUČCI

1. U istraživanoj skupini bolesnica s primarnim rakom dojke većina bolesnica je imala luminalne A tumore (49.3%) koji su češće bili male veličine (69.3%) i nižeg gradusa (61.3%) u odnosu na druge podtipove prema imunohistokemijskom profilu tumora te imali najbolje ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti unutar deset godina praćenja. HER2 pozitivni i trostruko negativni su češće imali veći tumor (58.3%, 53.1%), visoki histološki (58.3%, 53.1%) i nuklearni gradus (58.3%, 53.1%) te najlošije OS i DFS.
2. Negativan imunohistokemijski nalaz 8-oksodG je zabilježen u 4.6% karcinoma dojke, a značajno je povezan s trostruko negativnim podtipom (12.5%). Pozitivno 8-oksodG imunobojenje je zabilježeno u 95.4% karcinoma dojke. 96% luminalnih A tumora te svi luminalni B i HER2 pozitivni tumori su bili 8-oksodG pozitivni. Stoga je logično pretpostaviti da bi oksidacijski stres mogao imati manju ulogu u patogenezi trostruko negativnih tumora u odnosu na ostale podtipove prema imunohistokemijskom profilu tumora.
3. Analizom povezanosti izraženosti 8-oksodG s prognostičkim faktorima tumora uočeno je postojanje veze između slabog 8-oksodG imunobojenja, visoke veličine tumora i visokog histološkog gradusa koja međutim nije dostigla statistički značajnu razliku.
4. Iako nije dobivena statistički značajna razlika u analizi povezanosti imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG i specifične smrti od karcinoma dojke, prema našim rezultatima bolesnice s pozitivnom 8-oksodG imunobojenjem su imale 0.86 puta manje izgleda za smrt od karcinoma dojke u usporedbi s 8-oksodG negativnim bolesnicama, što ukazuje na pozitivan trend i mogućnost da bi se statistički značajna razlika mogla dobiti uključivanjem većeg broja bolesnica.
5. Kao značajni prognostički čimbenici za desetogodišnje preživljenje su se pokazali: veličina tumora, histološki i nuklearni gradus. Ki-67 proliferacijski indeks je bio blizu, ali nije dostigao statističku značajnost.

6. Nije nađena statistički značajna razlika u desetogodišnjem preživljenju kao i preživljenju bez znakova bolesti između 8-oksodG pozitivnih i 8-oksodG negativnih bolesnika.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja.** Oksidacijski stres ima važnu ulogu u etiologiji mnogih tumora, pa tako i karcinoma dojke. 8-okso-2'-deoksigvanozin (8-oksodG) je najrasprostranjeniji marker oksidacijskog oštećenja DNA i on je povećan kod karcinoma dojke u odnosu na ne-maligne lezije dojke. Cilj ove studije je odrediti koliki je udio oksidacijskog oštećenja DNA u pojedinim surogatnim molekularnim podtipovima karcinoma dojke da bi se procijenio prognostički značaj kao i uloga oksidacijske lezije baze (8-oksodG) u etiologiji karcinoma dojke.

**Materijali i metode.** Za određivanje 8-oksodG imunobojenja korišteni su tkivni mikročipovi od 152 bolesnice s invazivnim karcinomom dojke. Imunohistokemijski nalaz 8-oksodG je koreliran s prognostičkim faktorima tumora kao i različitim surogatnim molekularnim podtipovima karcinoma dojke koji uključuju luminalne A, luminalne B (HER2-), luminalne B (HER2+), HER2 pozitivne i trostruko negativne tumore.

**Rezultati.** Trostruko negativni karcinomi dojke su češće pokazivali negativno 8-oksodG imunobojenje u odnosu na druge surogatne molekularne podtipove. Nije bilo statistički značajne razlike između imunohistokemijskog nalaza 8-oksodG i drugih podtipova karcinoma dojke.

U univarijatnoj analizi nije nađena statistički značajna razlika između 8-oksodG imunobojenja i specifične smrti od karcinoma dojke, dok je u multivarijatnoj analizi 8-oksodG pozitivitet bio značajno povezan s boljim specifičnim preživljenjem od karcinoma dojke (OR=0.14; 95% CI=0.02-0.86). Coxovom regresijskom analizom bolesnice sa slabim i jakim 8-oksodG pozitivitetom su imale 0.9 puta manji omjer ugroženosti od smrtnog ishoda u odnosu na 8-oksodG negativne bolesnice.

**Zaključak.** Oksidacijski stres ima važnu ulogu u patogenezi ER/PR+ karcinoma dojke, ali ne nužno i kod trostruko negativnih tumora. 8-oksodG bi mogao biti obećavajući biomarker u procjeni prognoze za bolesnice s karcinomom dojke.

## 8. SUMMARY

### Prognostic value of 8-oxodG in invasive breast carcinoma

**Objectives:** Oxidative stress is thought to play a major role in etiology of many cancers, including breast cancer. 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) is the most abundant marker of oxidative DNA damage. The aim of this study was to assess the extent of oxidative DNA damage in different breast cancer molecular surrogate subtypes in order to investigate the prognostic relevance and role of 8-oxodG in etiology of breast cancer.

**Materials and methods:** 8-oxodG expression was immunohistochemically studied on tissue microarrays constructed from 152 patients with invasive breast cancer. Expression was correlated with other prognostic factors, as well as different breast cancer molecular surrogate subtypes such as luminal A, luminal B (HER2 negative), luminal B (HER2 positive), HER2 enriched and triple negative tumors.

**Results:** Triple negative breast carcinomas (TNBCs) were more frequently 8-oxodG negative compared with non TNBCs ( $p=0.036$ ). There was no statistically significant difference between 8-oxodG expression and other breast cancer molecular subtypes.

In univariate analysis there was no significant difference between 8-oxodG expression and breast cancer-specific death, although in multivariate analysis 8-oxodG overexpression was associated with better breast cancer specific survival (OR=0.14, 95% CI=0.02-0.86). In Cox regression analysis patients with low and strong 8-oxodG expression had 0.9 times smaller breast cancer death hazard ratio than patients with negative 8-oxodG expression.

**Conclusion:** Oxidative stress plays important role in pathogenesis of steroid receptors positive breast cancers, but not necessarily in TNBCs. 8-oxodG may be promising biomarker in prediction of prognosis for breast cancer patients.

## 9. LITERATURA

1. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Available at <http://globocan.iarc.fr>. Accessed on: 15.05.2014.
2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2009. Bilten br. 35
3. Kelava I, Tomicic K, Kokic M i sur. Breast and gynecological cancers in Croatia, 1988-2008. *Croat Med J* 2012;53:100-8.
4. Anderson WF, Jatoi I, Devesa SS. Distinct breast cancer incidence and prognostic patterns in the NCI's SEER program: suggesting a possible link between etiology and outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2005;90:127-37.
5. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:133-40.
6. Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008;124:31-42.
7. Beral V, Reeves G, Bull D, Green J. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:296-305.
8. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M i sur. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA*. 2010;304:1684-92.
9. Strnad M, Hrabak-Žerjavić V, Šamija M. Epidemiologija, prevencija i rano otkrivanje raka dojke. U: Šamija M, Juzbašić S, Šeparović V, Vrdoljak VD, ur. *Tumori dojke*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007, str. 27-41.
10. Singletary KW, Gapstur SM. Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms. *JAMA* 2001;286:2143-51.
11. Cady B. Breast Cancer in the Third Millennium. *Breast J* 2000;6:280-7.
12. Mettlin C. The relationship of breast cancer epidemiology to screening recommendations. *Cancer* 1994;74:228-30.
13. Gotzsche PC, Nielsen M. Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD001877.
14. Saslow D, Boetes C, Burke W i sur. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mammography. *CA Cancer J Clin* 2007;57:75-89.

15. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM Classification of Malignant tumours. 7. izd. New York: Wiley-Blaskwell; 2009, str. 181-94.
16. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, Van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC; 2012.
17. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB i sur. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
18. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R i sur. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
19. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM i sur. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10393-8.
20. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010;28:1684-91.
21. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO i sur. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1482-5.
22. Olopade OI, Grushko T. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:2028-9.
23. Cheang MC, Chia SK, Voduc D i sur. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:736-50.
24. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K i sur. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-74.
25. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-47.
26. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011;5:5-23.
27. Harbeck N, Thomssen C. A new look at node-negative breast cancer. *Oncologist* 2011;16 Suppl 1:51-60.
28. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:R245-62.

29. O'Malley FP, Pinder SE. Breast Pathology. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006, str. 235.
30. Thomssen C, Janicke F, Harbeck N. Clinical relevance of prognostic factors in axillary node-negative breast cancer. *Onkologie* 2003;26:438-45.
31. Sigdestad CP, Spratt JS, Connor AM. Ionizing Radiation of the Breast. U: Donegan WL, Spratt JS, ur. Cancer of the breast. Philadelphia: Saunders; 2002, str. 133-143.
32. 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;20:479-89.
33. 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* 2002;41:151-2.
34. Allred DC, Brown P, Medina D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:240-5.
35. Davies C, Godwin J, Gray R i sur. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378:771-84.
36. Buzdar AU, Vergote I, Sainsbury R. The impact of hormone receptor status on the clinical efficacy of the new-generation aromatase inhibitors: a review of data from first-line metastatic disease trials in postmenopausal women. *Breast J* 2004;10:211-7.
37. Viale G, Regan MM, Maiorano E i sur. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007;25:3846-52.
38. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548-57.
39. Stern DF. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res* 2000;2:176-83.
40. Romond EH, Perez EA, Bryant J i sur. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-84.
41. Smith I, Procter M, Gelber RD i sur. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:29-36.



42. Zwick E, Wallasch C, Ullrich A. HER2/neu: a target for breast cancer therapy. *Breast Dis* 2000;11:7-18.
43. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG i sur. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: american society of clinical oncology/college of american pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 2013;31:3997-4013.
44. Lopez F, Belloc F, Lacombe F i sur. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 1991;12:42-9.
45. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
46. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ i sur. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
47. Grant KA, Apffelstaedt JP, Wright CA i sur. MammaPrint Pre-screen Algorithm (MPA) reduces chemotherapy in patients with early-stage breast cancer. *S Afr Med J* 2013;103:522-6.
48. Sparano JA, Paik S. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol* 2008;26:721-8.
49. Paik S, Tang G, Shak S i sur. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3726-34.
50. Goncalves R, Bose R. Using multigene tests to select treatment for early-stage breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:174-82.
51. Harbeck N, Sotlar K, Wuerstlein R, Doisneau-Sixou S. Molecular and protein markers for clinical decision making in breast cancer: today and tomorrow. *Cancer Treat Rev* 2014;40:434-44.
52. Margolese RG. Surgical considerations for invasive breast cancer. *Surg Clin North Am* 1999;79:1031-46.
53. NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991;265:391-5.
54. Kataja V, Castiglione M. Primary breast cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 4:10-4.

55. Eisen A, Trudeau M, Shelley W, Messersmith H, Pritchard KI. Aromatase inhibitors in adjuvant therapy for hormone receptor positive breast cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2008;34:157-74.
56. Lorizio W, Wu AH, Beattie MS i sur. Clinical and biomarker predictors of side effects from tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:1107-18.
57. Clarke M, Collins R, Darby S i sur. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;366:2087-106.
58. Chen S, Masri S, Hong Y i sur. New experimental models for aromatase inhibitor resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;106:8-15.
59. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195-214.
60. Klaunig JE, Xu Y, Isenberg JS i sur. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 1:289-95.
61. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266:37-56.
62. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. 4. izd. New York: Oxford Univesity Press; 2007, str. 5-19.
63. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1986;247:1-11.
64. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21:361-70.
65. Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 1998;7:9-16.
66. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
67. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:217-30.
68. Cannon RO, 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44:1809-19.
69. Giles TD. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens* 2006;8:2-16.

70. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63.
71. Peoples MC, Karnes HT. Recent developments in analytical methodology for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and related compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827:5-15.
72. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;195:255-71.
73. Takahashi T, Nau MM, Chiba I i sur. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-4.
74. Hirano T. Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J Radiat Res* 2008;49:329-40.
75. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M i sur. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res* 2003;63:902-5.
76. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008;358:502-11.
77. Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. 2. izd. New York: McGraw-Hill Professional; 2002.
78. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 1995;358:1-3.
79. Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1428-59.
80. Fulton AM, Chong YC. The role of macrophage-derived TNF $\alpha$  in the induction of sublethal tumor cell DNA damage. *Carcinogenesis* 1992;13:77-81.
81. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567:1-61.
82. Jackson JH. Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 10:155-7.
83. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2001;3:323-7.
84. Storz G, Polla BS. Transcriptional regulators of oxidative stress-inducible genes in prokaryotes and eukaryotes. *EXS* 1996;77:239-54.

85. Vellanoeth RL, Suprakar PC, Roy AK. Transcription factors in development, growth, and aging. *Lab Invest* 1994;70:784-99.
86. Kerr LD, Inoue J, Verma IM. Signal transduction: the nuclear target. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:496-501.
87. Matsui A, Ikeda T, Enomoto K i sur. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* 2000;151:87-95.
88. Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:1209-14.
89. Kuo HW, Chou SY, Hu TW, Wu FY, Chen DJ. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and genetic polymorphisms in breast cancer patients. *Mutat Res* 2007;631:62-8.
90. Rossner P jr, Gammon MD, Terry MB i sur. Relationship between urinary 15-F2t-isoprostane and 8-oxodeoxyguanosine levels and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:639-44.
91. Shen J, Gammon MD, Terry MB i sur. Telomere length, oxidative damage, antioxidants and breast cancer risk. *Int J Cancer* 2009;124:1637-43.
92. Cho SH, Choi MH, Lee WY, Chung BC. Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal. *Clin Biochem* 2009;42:540-3.
93. Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K i sur. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;58:825-9.
94. Oliva MR, Ripoll F, Muniz P i sur. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997;18:232-43.
95. Senturker S, Karahalil B, Inal M i sur. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett* 1997;416:286-90.
96. Nagashima M, Tsuda H, Takenoshita S i sur. 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett* 1995;90:157-62.
97. Karihtala P, Kauppila S, Soini Y, Arja Jukkola V. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. *BMC Cancer* 2011;11:262.

98. Sova H, Jukkola-Vuorinen A, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P. 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer* 2010;102:1018-23.
99. Matsumoto K, Satoh Y, Sugo H i sur. Immunohistochemical study of the relationship between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in noncancerous region and postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma in remnant liver. *Hepatol Res* 2003;25:435-41.
100. Shen J, Deiningner P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2007;109:574-80.
101. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Absence of the DNA repair enzyme human 8-oxoguanine glycosylase is associated with an aggressive breast cancer phenotype. *Br J Cancer* 2012;106:344-7.
102. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 2007;115:81-103.
103. Yokomizo A, Ono M, Nanri H i sur. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Res* 1995;55:4293-6.
104. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 2008;58:262-70.
105. Mobley JA, Brueggemeier RW. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:3-9.
106. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995;18:775-94.
107. Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998;333:291-300.
108. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000;2:252-7.
109. Swaim MW, Pizzo SV. Methionine sulfoxide and the oxidative regulation of plasma proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 1988;43:365-79.
110. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 2010;6:195-7.

111. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN i sur. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:18-43.
112. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-68.
113. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K i sur. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res* 2007;9:R4.
114. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 1993;15:17-35.
115. Roy D, Liehr JG. Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res* 1999;424:107-15.
116. Okoh V, Deoraj A, Roy D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1815:115-33.
117. Felty Q, Xiong WC, Sun D i sur. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* 2005;44:6900-9.
118. Yao Y, Brodie AM, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:585-91.
119. Loft S, Olsen A, Moller P, Poulsen HE, Tjonneland A. Association between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and risk of postmenopausal breast cancer: nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22:1289-96.
120. Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006;365:30-49.
121. Hussain SP, Raja K, Amstad PA i sur. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12770-5.
122. Xie H, Xia K, Rong H, Chen X. Genetic polymorphism in hOGG1 is associated with triple-negative breast cancer risk in Chinese Han women. *Breast* 2013;22:707-12.
123. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology* 2011;58:854-62.

124. Sheridan J, Wang LM, Tosetto M i sur. Nuclear oxidative damage correlates with poor survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;100:381-8.
125. Karihtala P, Soini Y, Vaskivuo L, Bloigu R, Puistola U. DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine, a novel putative marker of prognostic significance in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:1047-51.

## **10. ŽIVOTOPIS**

### **OPĆI PODACI**

**Ime i prezime:** Danica Jakovčević, dr. med.

**Datum i mjesto rođenja:** 15. svibnja 1975., Split

**Adresa:** IV Maksimirsko naselje br. 31, 10 000 Zagreb

**Mobitel:** +385 95 879 3841

**E-mail:** [danica.jakovcevic@gmail.com](mailto:danica.jakovcevic@gmail.com)

### **ŠKOLOVANJE**

|           |                                                                                                                                                             |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1989-1993 | I. gimnazija, Split                                                                                                                                         |
| 1993-2001 | Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu                                                                                                                   |
| 2002-2005 | Poslijediplomski doktorski znanstveni studij “Temeljne i kliničke medicinske znanosti”, smjer Klinička medicina<br>Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu |

### **RADNO ISKUSTVO**

|           |                                                                                                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2001-2001 | KBC Split, liječnički pripravnički staž                                                                                                                                                       |
| 2003-2005 | Postdoctoral Fellow<br>“Central Mechanisms and Neurotransmitters in the Control of Breathing”,<br>Department of Anesthesiology, Medical College of Wisconsin,<br>Milwaukee, WI                |
| 2005-2008 | Postdoctoral Fellow<br>“Regulation of Cerebral Blood Flow and Tumor Angiogenesis ”<br>Cardiovascular Research Center, Department of Physiology<br>Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI |



|           |                                                                                                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2009-2010 | Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije, Split                                                |
| 2010      | Ordinacija opće medicine, Runjaninova 4, Zagreb                                                  |
| 05/2011-  | Specijalizant iz patološke anatomije<br>Zavod za patologiju i citologiju, KB "Sveti Duh", Zagreb |

### **OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI**

- 1.) Brandes IF, Zuperku EJ, Stucke AG, Jakovcevic D, Hopp F.A, Stuth EA. Serotonergic modulation of inspiratory hypoglossal motoneurons in decerebrate dogs. J Neurophysiol 2006;95:3449-59.
- 2.) Brandes IF, Zuperku EJ, Dean C, Hopp F.A, Jakovcevic D, Stuth EA. Retrograde labeling reveals extensive distribution of genioglossal motoneurons possessing 5-HT2A receptors throughout the hypoglossal nucleus of adult dogs. Brain Res 2007;1132:110-9.
- 3.) Brandes IF, Zuperku EJ, Stucke AG, Hopp FA, Jakovcevic D, Stuth EA. Isoflurane depresses the response of inspiratory hypoglossal motoneurons to serotonin in vivo. Anesthesiology 2007;106:736-45.
- 4.) Jakovcevic D, Harder DR. Role of astrocytes in matching blood flow to neuronal activity. Curr Top Dev Biol 2007;79:75-97.
- 5.) Zagorac D, Jakovcevic D, Gebremedhin D, Harder DR. Antioangiogenic effect of inhibitors of cytochrome P450 on rats with glioblastoma multiforme. J Cereb Blood Flow Metab 2008;28:1431-9.

### **KONGRESNA PRIOPĆENJA**

- 1.) 11<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb, 2000: Immunohistochemical Expression of Hormone Receptors and Other Markers in 31 Cases of Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. Hiroshi RSU, Jakovčević D, da Silva MJ, Giannotti OF.
- 2.) 11<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology, Zagreb, 2000: Possible influence of the War Aggression on Croatia (1991-1995) on the Distribution of Skin Cancer. Radotić V, Jakovčević D, Ugarković N, Jakovčević A, Belicza M.
- 3.) ASA, USA, 2004: Subanesthetic Concentrations of Isoflurane (ISO) Depress Inspiratory Hypoglossal Motoneurons (IHMNs) and their Response to Serotonin. Brandes IF, Stuth EA, Jakovcevic D, Stucke AG, Hopp FA, Kampine JP, Zuperku EJ.

- 4.) Experimental Biology, Washington DC, USA, 2004: Anatomical Location of Genioglossus Motoneurons (GGMNs): Within the Adult Canine Hypoglossal Motor Nucleus. Brandes IF, Dean C, Jakovcevic D, Stucke AG, Hopp FA, Zuperku EJ, Stuth EA.
- 5.) Experimental Biology, Washington DC, USA, 2004: Characteristics of the Effects of Locally Applied Serotonin on the Discharge Patterns of Canine Hypoglossal Motoneurons (HMNs) in Vivo Brandes IF, Stucke AG, Jakovcevic D, Dean D, Hopp FA, Zuperku EJ, Stuth EA.
- 6.) Experimental Biology, Washington DC, USA, 2004: Responses of Canine PreBötzinger Complex (PreBC) Respiratory Neurons to GABA and Glycine Receptor Antagonists. Jakovcevic D, Krolo M, Stuth EA, Stucke AG, Brandes IF, Hopp FA, Zuperku EJ.
- 7.) Midwest Anesthesia Resident Conference, USA, 2004: Effects of locally applied Serotonin on the Discharge Patterns of Canine Hypoglossal Motoneurons (HMN) in vivo. Brandes IF, Stucke AG, Jakovcevic D, Dean C, Hopp FA, Zuperku EJ, Stuth EA.
- 8.) Experimental Biology, San Diego, California USA, 2005: Defining regions within the Canine Medullary Ventral Respiratory Column (VRC) involved with phase-timing. Jakovcevic D, Brandes IF, Stucke AG, Hopp FA, Stuth EA, McCrimmon D, Zuperku EJ.
- 9.) Experimental Biology, 2005: Characteristics of the Serotonin contribution to the Discharge Patterns of Canine Hypoglossal Motoneurons (HMNs) in Vivo. Brandes IF, Stucke AG., Jakovcevic D, Hopp FA, Stuth EA, Zuperku EJ.

## **KONGRESI**

- **11<sup>th</sup> Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology**, Zagreb, Croatia, 2000.
- **Experimental Biology**, Washington DC, USA, 2004.
- **Experimental Biology**, San Diego, USA, 2005.

## **TEČAJEVI**

- **Advance life support course-ALS**, Hrvatsko Društvo za Reanimatologiju Hrvatskog Liječničkog Zbora, Split 2009.
- **European School of Pathology**: Update in Breast Pathology, Zagreb, 27.-29. studenog 2013.

## **AKTIVNOSTI**

- Od 1995. do 1996. demonstrator na Katedri za biologiju
- Od 1997. do 1999. demonstrator na Katedri za patologiju
- Kolovoz 1999. odlazim na razmjenu studenata (IFMSA) na Katedru za patologiju Universidade Federal de São Paulo
- Od 2008. član Hrvatske liječničke komore

## **VJEŠTINE**

- Aktivno se služim engleskim jezikom
- Posjedujem ECDL diplomu za rad na računalu