



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

**Бојан З Милошевић**  
**ЕКСПРЕСИЈА МАМАГЛОБИНА У ТКИВУ КАО ПРЕДИКТОРА АГРЕСИВНОСТИ**  
**ТУМОРА ДОЈКЕ**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2018. године**

**САЖЕТАК**

**УВОД:** Упркос напретку који је постигнут у лечењу карцинома дојке очигледан је висок морталитет и морбидитет када је у питању ова болест, тако да је неопходно даље изучавање на овом пољу у циљу проналажења нових маркера као предиктора агресивности болести. Хумани мамаглобин се сматра једним од најзначајнијих маркера хематогене дисеманације карцинома дојке.

**МЕТОД:** У испитивање су укључени пацијенти са дијагностикованим примарним карциномом дојке лечени у КЦ Крагујевац, у периоду праћења од 5 година (2011-2016). Током хируршке интервенције се узоркује туморско и перитуморско ткиво дојке и подвргава патохистолошкој обради. Потом се врше лабораторијске анализе ради утврђивања нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву, а затим се добијени резултати упоређују са анализом маркера који су у корелацији са појавом удаљених метастаза и рецидива болести.

**ОЧЕКИВАНИ РЕЗУЛТАТИ:** Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијета са карциномом дојке корелира са степеном агресивности болести. Однос нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву у корелацији са осталим маркерима канцерогенезе има улогу у исходу лечења и прогнози болести код пацијета са карциномом дојке. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијета са карциномом дојке корелира са одређеним патохистолошким типовима. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву чак и код пацијената код којих је постигнута Р0 хируршка ресекција може указати на постојање системске болести.

**ОЧЕКИВАНИ ЗАКЉУЧАК:** Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву у корелацији са осталим анализираним маркерима може да издвоји пацијенте под повећаним ризиком од појаве системске болести, што би за последицу имало спровођење раног радикалног адјувантног третмана.

Кључне речи: карцином дојке, мамаглобин, рецидив, метастазе

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Despite the achieved advance in the treatment of breast carcinoma, high rates of mortality and morbidity are obvious related to this disease, so further study in this field is necessary with the aim of finding new markers as predictors of disease aggressiveness. Human mammaglobin is considered to be one of the most significant markers of hematogenous dissemination of breast carcinoma.

**METHOD:** This research included patients with diagnosed primary breast carcinoma treated at the Clinical Center in Kragujevac during the period of five years (from 2011 to 2016). During the surgical intervention, a sample of tumoral and peritumoral breast tissue is taken and sent for a pathohistological examination. After that, laboratory analyses are done to determine the level of mammaglobin in the tumoral and peritumoral tissue and then, obtained results are compared with the marker analysis that are in correlation with the appearance of distant metastases and disease relapse.

**EXPECTED RESULTS:** The level of mammaglobin in the tumoral and peritumoral tissue in breast carcinoma patients correlates with the degree of disease aggressiveness. The ratio of mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue in correlation with other markers of carcinogenesis has a role in the treatment outcome and disease prognosis in breast carcinoma patients. The mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue in breast carcinoma patients correlates with certain pathohistological types. The mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue even in patients who underwent P0 surgical resection might indicate the existence of systemic disease.

**EXPECTED CONCLUSION:** The mammaglobin level in the tumoral and peritumoral tissue in correlation with other analyzed markers may identify patients who are at increased risk of the appearance of systemic disease, which would have as a consequence conducting of early radical adjuvant treatment.

Key words: breast carcinoma, mammaglobin, relapse, metastases

## Садржај

1. УВОД .....	5
1.1. Историјски ток рака дојке.....	7
1.2. Фактори ризика за настанак рака дојке .....	8
1.3. Васкуларизација дојке и лимфна дренажа.....	10
1.4. Класификација тумора дојке.....	11
1.5. Прогностички и предиктивни фактори рака дојке .....	17
1.6. Потенцијални прогностички / предиктивни маркери рака дојке.....	26
1.7. Хирургија инвазивног рака дојке .....	31
1.8. Метастатски рак дојке.....	39
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	42
2.1. Радне хипотезе.....	42
2.2. Циљеви истраживања .....	42
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ СТУДИЈЕ.....	43
3.1. Врста судије .....	43
3.2. Методологија .....	43
4. РЕЗУЛТАТИ.....	52
4.1. Клиничко-патолошке карактеристике код пацијената са карциномом дојке.....	52
4.2. Карактеристике лечења примарног карцинома дојке.....	54
4.3. Концентрација мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке .....	55
4.4. Анализа генске експресије мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке .....	57
4.5. Предиктивни значај концентрације мамаглобина А у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке.....	58
4.5. Предиктивни значај генске експресије мамаглобина А у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке.....	61
5. ДИСКУСИЈА.....	83
6. ЗАКЉУЧАК .....	91
7. ЛИТЕРАТУРА.....	92

## 1. УВОД

Карцином дојке је водећи узрок смрти узроковане карциномском болешћу у САД са преко 230,000 новодијагностикованих пацијената у 2014-ој години и са готово 40,000 смртних исхода (Siegel и сар., 2015). Упркос напретку који је постигнут коришћењем бројних хормонских, генских и молекуларних маркера (естроген рецептор, прогестреон рецептор, HER2, Ki67, итд) очигледан је висок морталитет и морбидитет када је у питању ова болест, тако да је неопходно даље изучавање на овом пољу у циљу проналажења нових маркера као предиктора агресивности карциномске болести дојке (Zambrano и Yeh, 2016.) (Inoue и Fry., 2016). Кроз историјат хирургије дојке сачињени су бројни системи класификације карцинома у циљу оптималног избора лечења (Džodić и сар., 2014). Карцином дојке је на основу патохистолошких карактеристика као најзначајнијег параметра класификације био подељен на инвазивни дуктани карцином (преко 80% укупног броја), инвазивни лобуларни са око 10% учешћа док осталих 10% чине сви остали хистолошки типови који су ређе заступљени (Toss и Cristofanilli, 2015). Са напретком медицине дошло се до појма индивидуализације терапије, тј избора третмана који би одговарао сваком појединачном пацијенту (Koren и Ventires-Alj, 2015). Данас је актуелно молекуларно профилисање на основу кога се карцином дојке као једна врло хетерогена група дели на најмање 6 подтипова (normal like, luminal A, luminal B, HER2 enriched, claudin low, and basal like). Ова класификација има импликације на избор терапијског модалитета и последично на исход лечења (Reyes и сар., 2012). Хумани мамаглобин је члан утероглобинске групе протеина који се у литератури често наводи као маркер специфичан за карцином дојке. Док се ниски нивои мамаглобина могу наћи у здравом ткиву дојке, његова експресија је драматично повишена код пацијената са карциномом дојке. Његова детекција у крви је у вези са појавом метастаза, а његов ниво утиче на прогнозу болести (Watson и Fleming, 1996). Watson и Fleming су 1994-те године методом PCR (polymerase chain reaction) изоловали ланац цДНК која је кодирала протеин, данас познат као хумани мамаглобин (hMAG) (Bellone и сар., 2013). Осим у ткиву дојке, hMAG-B подтипа (hMAG B-1 и B-2) је такође детектован и у ткиву карцинома ендометријума и оваријума (Al Joudi, 2014). У литератури се често користи различита номенклатура када је у питању мамаглобин, тако да поред hMAG можемо срести бројне скраћенице као што су: MAM, MGB, UGB3, MMG, SCGB2A1

(Zafrakas и сар., 2006). Хумани мамаглобини А и В су хомологни чланови велике фамилије протеина са великим значајем у дијагностици и прогнози исхода лечења пацијената са карциномом дојке (Liu и сар., 2012). Клиничке студије сугеришу да велики број пацијената са карциномом дојке има системску болест и да код приближно 25–30% пацијента код којих су верификовани негативни лимфни нодуси припадајуће аксиле у време хируршке интервенције ипак долази до појаве удаљених метастаза у петогодишњем периоду праћења и често до смртог исхода. Системска адјувантна терапија може да допринесе ерадикацији резидуалних карциномских ћелија које су се већ прошириле до удаљених ткива и органа. Ови потенцијални фокуси тумора могу дуго остати аваскуларни и клинички неми али задржавају потенцијал за раст и размножавање тако да се могу активирати и после више година. Хумани мамаглобин (hMAM) је експримиран у мањој концентрацији у нормалном ткиву дојке, али је у карциномском ткиву дојке његова концентрација повишена, док у крви и коштаном сржи здравих пацијената није присутан. Показао се као значајан предиктор јављања метастаза у костима код пацијената са карциномом дојке (Li и сар., 2011). Хумани мамаглобин се сматра једним од најзначајнијих маркера хематогене дисеманације карцинома дојке (O'Brien и сар., 2012). У литератури се може наћи више радова који се тичу анализе нивоа мамаглобина у периферној крви пацијената са карциномом дојке, мање је радова који описују ниво мамаглобина у самом туморском ткиву, док је најмање радова који се тичу испитивања нивоа мамаглобина у перитуморском ткиву. Наш циљ је анализа нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву дојке, њихова корелација са другим маркерима за које је познато да утичу на појаву рецидива тумора и метастазирање као што су Ki 67, E-Cadherin, интерлеукин 8 (IL 8), фамилија матрикс металопротеиназа (MMP), итд., што би директно утицало на избор одговарајућег модалитета лечења.

### ***1.1. Историјски ток рака дојке***

У древном Египту, пре више од 3.500 година на папирусима су нађени записи о тумору дојке који се не може излечити.

**Хипократ** је сматрао да је рак дојке системска болест и да настаје због вишка “црне жучи”. Говорио је:” Боље је не ексцидирати рак, они којима је уклоњен брзо нестају, док они којима није уклоњен живе дуже”.

**Гален** је подржао Хипократову системску теорију, он је сматрао да су једни тумори опаснији од других. Гален је препоручивао промптну ексцизију рака дојке. До 17. века се веровало у Галенову теорију о настанку рака дојке.

**Henri Le Dran**, водећи француски лекар, предложио је операцију рака дојке са уклањањем лимфних чворов.

**Claude-Nicolas Le Cat** је сматрао да се једино хируршки може излечити рак дојке.

**Virchow** је у 19. веку пажљивим истраживањем рака дојке закључио да он настаје из епителних ћелија, а да се потом шири дуж фасција и лимфним каналима. Он је рак дојке сматрао локалном болешћу која се може излечити локалном терапијом, односно опрацијом.

**William Halstead**, хирур из Њујорка, направио је” златни стандард” у третману рака дојке и поставио постулате локалног третмана дојке. То је подразумевало мутилантну операцију уклањања дојке, пекторалних мишића и свих лимфних чворова пазушне јаме. Ова операција се сматра и почетком оперативног локо-регионалног третмана рака дојке.

Временом је схваћено да је ово веома мутилантан захват са много компликација и великим деформитетом. Касније је доживела многе модификације.

У првој половини 20. века мастектомија је била стандард у лечењу рака дојке.

**Benson**, шкотски хирург, 1895. године, открио је да је уклањањем јајника код једне од његових пацијенткиња смањио тумор дојке. Тада су посумњали да естроген из јајника подстиче раст тумора.

**Bernard Fisher**, 1976. године, објављује резултате поштедних операција дојке са постоперативним зрачењем и хемиотерапијом (Džodić и сар., 2014).

## ***1.2. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК РАКА ДОЈКЕ***

Фактори ризика од значаја за настанак рака дојке који се наводе у литератури су бројни: генетски, хормонски, фактори околине и географски. Није једноставно одредити улогу сваког понаособ, јер су често међусобно испреплетани. Основни фактори ризика су: позитивна породична анамнеза, рана прва менструација, бенигна патологија дојке, нерађање или малобројно рађање, касна прва трудноћа, касна менопауза (Dupont и Page, 1995).

Генетски фактори за настанак рака дојке су комплексни из више разлога, јер постоје бројне генске мутације које могу да доведу до настанка рака дојке. Жене које су лечене од операбилног рака дојке у 5-15% случајева имају висок ризик од метакроног рака контралатералне дојке. Ризик је посебно висок код жена код којих постоји позитивна породична анамнеза, код млађих жена у време откривања карцинома и код жена са лобуларним типом рака дојке. У више од 50% случајева билатералног рака дојке постоје мутације на BRCA 1 и BRCA 2 (BRCA1 and 2) супресорским генима (Kollias и сар., 2000). Гени одговорни за настанак рака дојке су из групе супресорских гена, BRCA 1 и BRCA 2. Мутације ових гена носе са собом ризик од настанка не само рака дојке, већ и оваријума. Жене којима је дијагностикована мутација BRCA 1 гена имају ризик од скоро 80% да добију рак дојке. У таквим случајевима се може размишљати о превентивним супкутанним мастектомијама са реконструкцијом (Grann и сар., 1998). Генетска испитивања треба да имају за циљ да се оптимизује скрининг рака дојке код младих жена код којих постоји повишени ризик. Рано откривање рака дојке и адекватно лечење омогућавају висок проценат излечења. Женама са веома високим ризиком од рака дојке може се саветовати хемопревенција или превентивна субкутана мастектомија са реконструкцијом, али је одлука ипак на пацијенткињи, након што јој се адекватно и детаљно објасне ризици, али и добит коју превентивна субкутана мастектомија са реконструкцијом носи (Agiuan, 1995). Рана прва менструација, касна менопауза, нерађање или касна прва трудноћа, после 30 године, са собом носе веома велики ризик од настанка рака дојке. Што је период између прве менструације и менопаузе дужи, то је ризик за настанак рака дојке већи (Hulka и Stark, 1995).



Утицај оралних контрацептива на настанак рака дојке је дискутабилан. Бројне студије које су рађене нису показале повишен ризик од рака дојке због употребе оралних контрацептива. Код жена млађих од 45 година присутан је умерено повишен ризик од рака дојке током примене оралних контрацептива и неколико година по престанку (Le, 1999).

У литератури постоје подаци о повишеном ризику од рака дојке, чак 30 - 40 % код жена у менопаузи које су узимале хормонску (естрогену) супституцију. Међутим, бројни радови показују да је ризик повишен само током узимања супституције и престаје по њеном прекидању. Супституциона хормонска терапија естрогенима и прогестеронима у менопаузи удружена је са повећаном учесталošћу рака дојке. Ризик расте са дужином узимања хормонске супституције (Colditz и сар., 1999).

Бројне студије показују да начин исхране има значајну улогу у настанку рака дојке. Гојазност као последица конзумирања висококалоричне хране, масти и протеина животињског порекла наводи се као озбиљан фактор ризика код жена у постменопаузи. Повећан унос витамина, поврћа и воћа умањује ризик од настанка рака дојке (Newman и сар., 1996).

### ***1.2.1. Патохистолошке карактеристике BRCA 1 и BRCA 2 (BRCA1 and 2) зависних карцинома дојке***

За карциноме који су повезани са мутацијама у високо пенетрабилном гену BRCA1 (енг. BRCA1 (BRCA1 gene 1)) је примећено да су лошије диферентовани (хистолошки градус 3), имају већи степен једарних плеоморфизама као и већи број митоза у односу на спорадичне туморе (Garcia-Casado и сар., 2011). Око 75% BRCA1 зависних карцинома су по типу инвазивни дуктални, али и атипични медуларни карциноми су чешћи код BRCA1 зависних тумора (15%) у односу на спорадичне форме (3%) (Laloo и Evans, 2012). Најупечатљивија карактеристика BRCA1 везаних карцинома дојке (90% случајева) је недостатак експресије стероидног рецептора за естроген (ER) који представља један од најзначајних прогностичких и предиктивних маркера (Mavaddat и сар., 2010). Доказан је и недостатак експресије рецептора за прогестерон (PR) као и нижа учесталост HER2 експресије у поређењу са спорадичним облицима. Што се тиче пролиферативних маркера, висока експресија Ki-67, као и висок митотски индекс, такође карактеришу BRCA1 зависне карциноме (Mangia и сар., 2011).

Патологија карцинома дојке код носилаца мутација у другом високо пенетрабилном гену у карциному дојке, BRCA2 (енг. BReast CAncer gene 2), није толико карактеристична као код BRCA1. BRCA2 зависни тумори су средње или ниско диферентовани карциноми (хистолошки градуси 2 и 3) без повећања једарних плеоморфизама, и немају обавезно повећан митотски индекс (Lalloo и Evans, 2012). Лобуларни карцином као и дуктални карцином *in situ* (DCIS) су пријављени као чешћи код BRCA2 зависних тумора у односу на BRCA1 зависне туморе. Што се тиче статуса стероидних рецептора, BRCA2 зависни тумори имају сличан ниво експресије ER и PR као и спорадични облици. Повећана HER2 експресија је ретка код BRCA2 везаних карцинома са учесталашћу која варира од 0% до 3,9% (Mangia и сар., 2011).

### 1.3. ВАСКУЛАРИЗАЦИЈА ДОЈКЕ И ЛИМФНА ДРЕНАЖА

Крв у дојку већином доводе две велике артерије: унутрашња грудна артерија (a. thoracica /mammaria/ interna) која са својим гранама васкуларизује око 60% ткива дојке, углавном средишње делове и латерална грудна артерија (a. thoracica lateralis) која васкуларизује око 30% дојке, углавном горње и латералне делове. Мањи део крви у дојку долази путем огранака других артерија: a. thoracoacromialis, aa. intercostales, a. subscapularis и a. thoracodorsalis (Osborne, 2004).

Венска дренажа показује значајне индивидуалне разлике, али углавном прати артеријску васкуларизацију. Површински венски сплет налази се у поткожном ткиву у тече од латералне према медијалној страни, а крв скупља v. thoracica interna. Крв из дубоких делова дојке дренира се путем огранака три вене: то су v. thoracica interna, v. axilaris и vv. intercostales (Rosen, 2001).

Лимфна дренажа дојке захтева посебну пажњу због улоге коју има у метастазирању рака дојке. Преко 75% лимфе, углавном из латералних квадраната дренира се у лимфне чворове пазушне јаме или аксиле (nodi lymphoidei axillares). Остатак лимфе, углавном из медијалних делова дојке, дренира се или у парастерналне лимфне чворове (nodi lymphoidei parasternales) или у чворове супротне дојке, а лимфа из доњих делова у чворове (nodi phrenici inferiores). Изузев коже брадавице и ареоле, лимфа из коже дојке, дренира се у аксиларне лимфне чворове, доње дубоке лимфне чворове врата (nodi lymphoidei cervicales inferiores), лимфне

чворове испод клавикуле (nodi lymphoidei infraclaviculares) и парастерналне лимфне чворове (Rosen, 2001).

#### 1.4. КЛАСИФИКАЦИЈА ТУМОРА ДОЈКЕ

Због сложене хистолошке грађе дојке, хистогенетско порекло тумора у њој може бити: епително, мезенхимно и мешовито. У оквиру сваке хистогенетске групе постоје: **бенигни** (палпиломи, аденоми, фиброаденоми, филодни тумори), **гранични** (borderline- филодни тумори) и **малигни тумори** (карциноми, саркоми, карциносаркоми и малигни филодни тумори).

Класификација малигнух тумора дојке заснива се примарно на основу њиховог хистогенетског порекла, а онда у оквиру сваке хистогенетске групе постоји и класификација према *инвазивности, хистоморфолошким, хистохемијским и биолошким карактеристикама* (Scarff и Torloni, 1998).

Најчешћи малигни тумори дојке су порекла епителних ћелија (карциноми) у односу н остале малигне туморе.

Први корак у хистопатолошкој дијагностици рака дојке је сагледавање степена његове инвазивности, односно да ли је у питању карцином *in situ* или инвазивни. Степен инвазивности рака дојке је од изузетног значаја за врсту терапије и за прогнозу даљег тока болести. Неинвазивни, микроинвазивни и инвазивни карциноми пречника до 10 милиметара, чине групу која је означена као *early (рани)* карцином код кога је могуће применити поштедну операцију и постоперативну радиотерапију остатка дојке (Silverstein, 1997).

##### 1.4.1. Одређивање клиничког стадијума рака дојке (TNM класификација)

TNM класификација укључује величину примарног тумора (T), проширеност тумора у регионалне лимфне чворове (N) и удаљене метастазе (M).

TNM класификација тумора дојке према Светској здравственој организацији (Marković, 2013).

##### 1.4.1.1. Клиничка и патохистолошка класификација примарног тумора (T)

T - примарни тумор:

**Tx** - примарни тумор се не може одредити

**T0** - примарни тумор није доказан

**Tis** - карцином in situ

**T1** - тумор  $\leq 2$  цм

**T1a**: тумор  $> 0,1$  цм, али не већи од 0,5 цм

**T1b**: тумор  $> 0,5$  цм, али не већи од 1 цм

**T1c**: тумор  $> 1$  цм, али не већи од 2 цм

**T2** - тумор  $>$  од 2 цм, али не већи од 5 цм

**T3** - тумор  $> 5$  цм

**T4** - тумор било које величине са директним ширењем на зид грудног коша или кожу

**T4a**: ширење у зид грудног коша

**T4b**: улцерација коже дојке, истострани сателитски чворови у кожи или едем коже (укључујући peau d'orange)

**T4c**: 4a и 4b

**T4d**: инфламаторни карцином

### **Регионални лимфни чворови су:**

**Аксиларни (истострани)**: интерпекторални (Rotter) чворови и лимфни чворови дуж аксиларне вене и њених притока, које се могу поделити на следеће нивое:

- **Ниво I (доњи спрат)**: лимфни чворови бочно у односу на спољашњу ивицу малог грудног мишића.
- **Ниво II (средњи спрат)**: лимфни чворови између унутрашње и спољашње ивице малог грудног мишића и интерпекторалних (Rotter) лимфних чворова.
- **Ниво III (горња спрат)**: горњи лимфни чворови у врху аксиле и они унутра од унутрашње ивице малог грудног мишића, искључујући инфра и супраклавикуларне чворове.

### **Инфраклавикуларни (субклавикуларни) (истострани)**

**Дуж мамарије интерне (истострани)** лимфни чворови у међуребарним просторима дуж ивице стернума у ендоторакалној фасцији.

### **Супраклавикуларни (истострани)**

**1.4.1.2. Клиничка класификација регионалних лимфних чворова (N):**

**NX** - регионални лимфни чворови се не могу проценити (нпр. претходно су уклоњени)

**N0** - регионални лимфни чвор без метастазе

**N1** - метастаза у покретном истостраном аксиларном лимфном чвору/чворовима нивоа I и II

**N2** - метастазе у истостраном аксиларном лимфном чвору/чворовима нивоа I и II, клинички фиксирани или сливени или клинички евидентном истостраном лимфном чвору/чворовима око артерије мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) у одсуству клинички евидентних метастаза у аксиларним лимфним чворовима

**N2a** - метастазе у аксиларном лимфном чвору/чворовима фиксирани међусобно (сливене) или за друге структуре

**N2b** - метастазе само у клинички евидентном лимфном чвору/чворовима око артерије 14 мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) у одсуству клинички евидентних метастаза у аксиларним лимфним чворовима.

**N3** - метастазе у истостраном инфраклавикуларном (ниво III аксиле) лимфном чвору/чворовима са или без захватања лимфних чворова нивоа I и II аксиле или у клинички евидентном лимфном чвору/чворовима око артерије мамарије интерне (или унутрашње мамарне артерије) са клинички евидентним метастазама у аксиларним лимфним чворовима или метастаза у истостраном супраклавикуларном лимфном чвору/чворовима са или без захватања аксиларних или лимфних чворова око артерије мамарије интерне.

**N3a** - метастазе у инфраклавикуларном лимфном чвору/чворовима

**N3b** - метастазе у лимфном чвору/чворовима аксиле или око артерије мамарије интерне

**N3c** - метастазе у супраклавикуларном лимфном чвору/чворовима

**1.4.1.3. Патохистолошка класификација регионалних лимфних чворова (pN):**

**pNX** - регионални лимфни чворови се не могу проценити (нису уклоњени ради испитивања или су претходно уклоњени)

**pN0** - регионални лимфни чвор без метастазе

**pN1** - микрометастазе или метастаза у 1 до 3 истострана аксиларна лимфна чвора, односно истостраним унутрашњим чворовима дојке са метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али клинички није очигледна.

**pN1mi** - микрометастаза (већа од 0,2 мм и/или више од 200 ћелија, али не веће од 2 мм)

**pN1a** - метастаза у 1 до 3 аксиларна лимфна чвора, укључујући бар један чија највећа димензија прелази 2 мм

**pN1b** - унутрашњи лимфни чворови дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, али која клинички није очигледна 15

**pN1c** - метастаза у 1 до 3 лимфна чвора, а унутрашњи лимфни чворови дојке садрже микроскопску метастазу откривену дисекцијом стражарског лимфног чвора, која није клинички очигледна

**pN2** - метастазе у 4-9 истостраних аксиларних лимфних чворова, или клинички очигледан лимфни чвор дуж мамарије интерне у одсуству аксиларних лимфонодалних метастаза

**pN2a** - метастаза у 4-9 аксиларних лимфних чворова, укључујући бар један који је већи од 2 мм

**pN2b** - метастаза у клинички очигледном унутрашњем лимфном чвору/чворовима дојке, у одсуству метастазе аксиларног лимфног чвора.

**pN3** - метастазе описане као:

**pN3a** - метастаза у 10 или више аксиларних лимфних чворова (од којих је бар један већи од 2 мм) или метастаза у инфраклавикуларним лимфним чворовима

**pN3b** - метастаза у клинички очигледном унутрашњем лимфном чвору/чворовима) дојке у присуству позитивног аксиларног лимфног чвора/чворова или метастаза у више од 3 аксиларна лимфна чвора и у унутрашњим лимфним чворовима дојке са микроскопском метастазом откривеном дисекцијом стражарског лимфног чвора, а која није клинички очигледна.

**pN3c** - метастаза у супраклавикуларном лимфном чвору (чворовима).

#### ***1.4.1.4. Клиничка и патохистолошка класификација удаљених метастаза (M)***

**M** - удаљене метастазе:

**MX** - постојање удаљених метастаза не може се одредити

**M0** - нема удаљених метастаза

**M1** - удаљене метастазе

**M1** и **pM1** се даље могу делити на следећи начин:

Плућа-PUL, Кичмена мождина-MAR, Кости-OSS, Плеура-PLE, Јетра-HEP, Перитонеум-PER, Мозак-BRA, Надбубрег-ADR, Лимфни чворови-LYM, Кожа-SKI, Остало-OTH.

#### ***1.4.1.5. Одсуство или присуство резидуалног тумора (R)***

Одсуство или присуство резидуалног тумора после лечења означено је знаком **R**.

**R** - класификација се односи на:

**RX** - Присуство резидуалног тумора се не може проценити

**R0** - Нема резидуалног тумора

**R1** - Микроскопски резидуални тумор

**R2** - Макроскопски резидуални тумор

#### ***1.4.1.6. Стадијуми рака дојке према TNM класификацији***

Стадијум 0	Tis N0 M0
Стадијум IA	T1 N0 M0
Стадијум IB	T0, T1 N1mi M0
Стадијум IIA	T0, T1 N1 M0, T2 N0 M0
Стадијум IIB	T2 N1 M0, T3 N0 M0
Стадијум IIIA	T0, T1, T2 N2 M0, T3 N0, N1, N2 M0
Стадијум IIIB	T4 N0, N1, N2 M0
Стадијум IIIC	било који T N3 M0
Стадијум IV	било који T било који N M1

(TNM classification of breast cancer, 2010).

#### ***1.4.2. Хистолошки типови рака дојке према Светској здравственој организацији***

На основу однос малигних ћелија према базалној мембрани, карциноми могу бити **неинвазивни** (in situ), који не прелазе базалну мембрану, или **инвазивни**, уколико прелазе базалну мембрану. Светска здравствена организација је, обзиром на хистолошки тип тумора, предложила следећу поделу инвазивних карцинома дојке (Tavassoli и Devilee, 2003):

- Инвазивни дуктални карцином
- Инвазивни лобуларни карцином
- Тубуларни карцином
- Инвазивни крибриформни карцином
- Медуларни карцином
- Муцинозни карцином
- Инвазивни папиларни карцином
- Инвазивни микропапиларни карцином
- Апокрини карцином
- Метапластични карцином
- Карцином богат липидима
- Секреторни карцином
- Онкоцитни карцином
- Аденоидно-цистични карцином
- Карцином ацинарних ћелија
- Карцином светлих ћелија-богат гликогеном
- Себацеални карцином
- Малигни миоепителиом
- Мукоепидермоидни карцином
- Сквамозни карцином
- Аденосквамозни карцином

Лошију прогнозу имају дуктални карцином, лобуларни и медуларни, док нешто бољу прогнозу имају тубуларни, муцинозни и крибриформни карцином (Elston и сар., 1998).



Дуктални карцином је најчешћи тип рака дојке, који чини укупно 80% свих карцинома дојке.

Лобуларни карцином је на другом месту по учесталости међу инвазивним карциномима дојке и на њега отпада око 10% свих карцинома дојке.

Медуларни карцином се чешће среће код млађих жена које су носиоци BRCA1 и BRCA2 мутација, док је муцинозни карцином чешћи код старијих жена.

## 1.5. ПРОГНОСТИЧКИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ РАКА ДОЈКЕ

*Прогностички фактор* је термин који показује да су неке особености тумора и домаћина у вези са природним током болести и њеним исходом, али у одсуству терапије. У том контексту представља маркер значајан за релапс болести. *Предиктивни фактор* је термин који се користи у контексту одговора тумора на одговарајући терапијски модалитет лечења. Ови фактори зависе од карактеристика самог тумора, као и карактеристика самог пацијента, а њихова идентификација може помоћи у одређивању најбољег индивидуалног терапијског модалитета лечења за сваког пацијента. Посебно је важна идентификација високоризичне групе пацијената. Прогноза рака дојке је врло различита, те се избор најприкладнијег терапијског приступа процењује индивидуално према читавом низу прогностичких фактора. Прогностички фактори код рака дојке могу се поделити на оне традиционалне и новије који обухватају низ фактора од којих су многи још предмет испитивања и клиничких студија. У рутинској клиничкој пракси, у употреби је неколико добро познатих прогностичких и предиктивних фактора који су важни у избору одговарајућег терапијског модалитета лечења а то су: величина тумора, захваћеност лимфних чворова пазушне јаме, присуство удаљених метастаза, експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (ER/PR), HER-2 статус, хистолошки градус тумора, индекс пролиферативности ћелије Ki-67 и присуство лимфоваскуларне инвазије (Cardoso и сар., 2013).

### ***1.5.1. Величина тумора***

Величина тумора је један од значајнијих прогностичких фактора, поготово код пацијенткиња с негативним пазушним лимфним чворовима. Између величине тумора и преживљења постоји позитивна корелација, односно пацијенткиње са мањим туморима имају бољу прогнозу. Петогодишња стопа рецидива је приближно 10% за пацијенткиње са тумором мањим од 10 милиметара, а приближно 30-50% за оне са тумором од 50 милиметара и више (Tot и сар., 2002). За туморе мање од 10 мм, уобичајени прогностички фактори, као што је хистолошки градус, нису довољни да сврстају пацијенткиње у различите прогностичке категорије. У овим случајевима, постојање удруженог DCIS, његова распрострањеност и његов градус (G) су значајни прогностички фактори. Мали инвазивни тумор удружен са екстензивном DCIS G.III компонентом има лошију прогнозу од малих тумора без DCIS или са DCIS G.I (Fisher и сар., 1993).

Величина тумора је, предиктивни фактор за статус лимфних чворова пазушне јаме, али и независан прогностички фактор код пацијенткиња са негативним статусом лимфних чворова. Рутински се користи при одлучивању о примени адјувантне системске терапије. Пацијенти са негативним лимфним чворовима пазушне јаме и туморима величине до/или 1цм представљају групу са најповољнијом прогнозом који не би имали користи од примене адјувантне системске терапије. За пацијенткиње са туморима 1-2 цм треба размотрити примену адјувантне терапије, јер код њих постоји ризик за појаву удаљених метастаза од преко 20%.

### ***1.5.2. Захваћеност лимфних чворова пазушне јаме***

Ово је један од најважнијих прогностичких фактора код пацијенткиња са раком дојке који указује на вероватноћу рецидива болести, такође представља значајан параметар при селекцији пацијенткиња код којих треба применити адјувантну хемиотерапију (Schnitt, 2001). Потребно је прегледати најмање 8-10 лимфних чворова (нодуса) аксиле да би правилно проценили прогнозу. Ризик појаве рецидива и укупно преживљење зависе од броја захваћених лимфних чворова пазушне јаме. Пацијенткиње са негативним лимфним чворовима пазушне јаме имају петогодишње преживљење без релапса болести преко 80%, а ако су чворови позитивни, преживљење је испод 65%, односно прогноза је лошија што је број захваћених лимфних чворова већи. Ниво захваћености лимфних чворова такође је

прогностички значајан. Метастазе у виши ниво аксиле и апекс указују на лошију прогнозу. Након пазуха, друго по важности дренажно подручје је у лимфне чворове дуж унутрашње мамарне артерије. Они су захваћени укупно у 22% случајева, чешће код тумора у медијалној половини дојке и код позитивне аксиле. Супраклавикуларни лимфни чворови захваћени су у око 20% случајева са позитивном аксилом, а готово никад нису захваћени код негативне аксиле (Andea и сар., 2004).

Статус лимфних чворова пазушне јаме се обично процењује интраоперативно методом биопсије сентинел лимфних чворова или након дисекције пазушне јаме, обзиром да је клиничка евалуација непрецизна. Дефинише се као број позитивних у односу на укупан број лимфних чворова достављених на преглед.

Величина метастатских депозита у лимфном чвору дефинише се као:

- **изоловане туморске ћелије (ИТС)**, ако су метастазе  $\leq 0.2\text{mm}$ ,
- **микрометастазе**, ако су метастазе  $>0.2\text{mm}$ , а  $\leq 2\text{mm}$ ,
- **макрометастазе**, ако су метастазе  $>2\text{mm}$ .

Значајнија прогностичка информација добија се на основу броја метастатских лимфних чворова, него на основу самог присуства/одсуства метастаза у регионалним лимфним чворовима.

Пацијенти се према броју захваћених лимфних чворова деле у *четири групе*:

**I група**, са 0 захваћених лимфних чворова,

**II група**, са 1 до 3 позитивних лимфних чворова,

**III група**, са 4 до 9 позитивних лимфних чворова,

**IV група**, са 10 и више позитивних лимфних чворова.

Статус лимфних чворова пазушне јаме је параметар који се узима у обзир при одлучивању о примени адјувантне системске терапије. Адјувантна системска терапија, према онколошким препорукама, индикована је код свих пацијената са позитивним лимфним чворовима аксиле, јер код њих стопе рецидива у 10-годишњем периоду достижу 70%.

### ***1.5.3. Присуство удаљених метастаза***

Метастазирање се дефинише као ширење ћелија рака од примарног тумора и стварање секундарног депозита на удаљеној локацији (Chambers и сар, 2002).

Метастазирање се састоји од низа веома комплексних корака, а ћелије канцера морају да савладају сваки корак у тој каскади како би дошло до настанка метастатског тумора. Ови кораци укључују тзв. бег од примарног тумора (екстравазација), лимфну или хематогену дисеминацију, преживљавање у циркулацији, екстравазацију на секундарну локализацију, раст и стварање микрометастаза на секундарној локацији, наставак раста уз обезбеђивање адекватне васкуларизације и стварање клинички детектабилне макрометастазе (MacDonald и сар., 2001) (Swartz и сар., 2001). Присуство удаљених метастаза је доказано најзначајнији прогностички фактор. Хематогене метастазе воде генерализованој дисеминацији рака дојке у кости, плућа, јетру, јајнике, надбубрежне жлезде, плеуру и друга места. Најчешће захваћене кости су ребра, лобањске кости, кичмени пршљенови, хумерус и клавикула. Метастазе рака дојке у кости су, слично другим типовима карцинома, најчешће остеолитичке (Edge и сар., 2010). Уколико је метастатска болест присутна само у костима, такве пацијенткиње имају бољу прогнозу него оне са висцералним метастазама.

Рак дојке има посебан афинитет за метастазирање у регионалне лимфне чворове, плућа, јетру, кости и мозак.

### ***1.5.4. Експресија естрогенских и прогестеронских рецептора (ER/PR)***

Рецептор за естроген (ER) и рецептор за прогестерон (PR) су највише изучавани биохемијски параметри прогнозе/предикције тока болести код пацијената оболелих од рака дојке (Saez и сар., 1983). Познато је да 50 - 80% пацијената оболелих од рака дојке садрже мерљиве концентрације ER. PR се углавном експримира заједно са и при вишим концентрацијама ER. Око 75% рака дојке је хормонски позитивно. Хормонски рецептори код рака дојке немају само прогностички већ и предиктивни значај. Тумори који су високо хормонски позитивни боље ће реаговати на хормонску терапију од оних који су слабо хормонски позитивни. ER негативни (ER-) тумори боље реагирају на хемиотерапију у односу на ER позитивне туморе (ER+) (Henderson и Feigelson, 2000). Пацијенти са ER+

туморима имају дуже преживљење без релапса болести у односу на оне са ER- туморима. ER+ тумори чешћи су код старијих жена, чешће су добро диферентовани, ниже митотске активности. Око 5% карцинома дојке су ER- PR+ што се може објаснити или лажно негативним резултатом у одређивању ER или синтеза PR може бити индукована независно од естрогенских рецептора. Значај PR као независног прогностичког фактора је врло мала (Layfield и сар., 2006).

Статус ER/PR код рака дојке је моћан фактор предикције тока болести који указује на ефикасност примене адјувантне хормонске терапије. Клинички значај ER се односи на чињеницу да његово присуство идентификује туморе који су осетљиви на деловање естрогена. Доказано је да око 55% пацијенткиња оболелих од рака дојке, које имају позитиван статус ER, повољно одговарају на адјувантну хормонску терапију (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Пацијенткиње са позитивним статусом ER у туморима имају дужи интервал до појаве релапса болести након примене терапије, дуже преживљавање након појаве релапса болести и значајно боље укупно преживљавање, у поређењу са пацијенткињама које имају туморе са негативним статусом ER. Ако тумори, поред ER, садрже и PR, одговор на неку врсту адјуванте хормонске терапије је присутан у око 75 - 80% случајева (McGuire и сар., 1997).

Из овога се може закључити да се статус стероидних рецептора може користити као фактор предикције за ефикасност адјувантне хормонске терапије (Тамоксифен). (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). Све пацијенткиње са позитивним статусом стероидних рецептора, које је оправдано лечити адјувантном системском терапијом, препорука је да буду лечене и хормонском терапијом, осим ако постоје контраиндикације.

### ***1.5.5. HER-2 статус***

HER2 ili HER2/neu (engl. human epidermal growth factor receptor 2) је протеин који постоји на површини појединих ћелија рака дојке. Кодира га протоонкоген ERBB2, лоциран на другом краку хромозома 17 (17q12). HER2/neu онкоген је амплификован и/или прекомерно експримиран код око 20% случајева рака дојке и значајан је прогностички фактор за рецидив и лоше преживљавање, нарочито код пацијената са позитивним аксиларним статусом (Prati и сар., 2005)

HER2 протеин има важну улогу у расту и преживљавању ћелија. С обзиром да је један од фактора који одређује терапијски приступ у лечењу рака дојке, HER2 статус се рутински одређује код сваког инвазивног рака дојке. За одређивање HER2 статуса користи се имунохистохемија: додавање антитела на HER2 протеин доводи до промене у боји узорка, што се посматра микроскопом и означава као 0, 1+, 2+, или 3+. Овом методом се одређује заправо број HER2 протеинских рецептора у ћелијама рака.

Карциноми дојке код којих је појачана експресија HER2 (HER2 3+) називају се HER2 позитивни, а остали (HER2 0 или 1+) HER2 негативни. HER2 негативни карциноми немају циљану терапију. HER2 позитивни карциноми могу бити лечени циљаним молекулским агенсима као што је Herceptin® (Salomon и сар., 1987).

Позитиван HER2 статус удружен је и са другим факторима лоше прогнозе рака дојке, као што су позитивни лимфни чворови, већи промер тумора, лош степен хистолошке диференцијације, висока пролиферациона стопа и негативан естроген и прогестерон рецепторни статус (Cianfrocca и Goldstein, 2004).

### ***1.5.6. Хистолошки градус тумора (G)***

Хистолошки градус тумора (G) има за циљ да укаже на мању или већу агресивност тумора и самим тим представља један од стандардних прогностичких фактора, нарочито за инвазивне карциноме веће од 10 мм. Приликом одређивања хистолошког градуса (G) анализирају се три особине тумора, које се класификују од 1 до 3: 1. формирање тубула, 2. нуклеарни полиморфизам и 3. број митоза. Хистолошки градус израчунава се из збира бодова из чега произлазе градуси (Fisher и сар., 1993):

**G1** (добро диферентовани) - 3 до 5 бодова

**G2** (умерено диферентовани) - 6 до 7 бодова

**G3** (слабо диферентовани) - 8 до 9 бодова

Добро диферентовани тумори (G1) имају петогодишње преживљавање у око 75% случајева, а десет година преживи око 47% пацијенткиња. Са умерено диферентованим туморима (G2) пет година преживи око 53% пацијенткиња, а десет година преживи око 27%. У групи

пацијенткиња са слабо диферентованима туморима (G3) пет година преживи 31%, а десет година преживи 18% (Fisher и сар., 1993). Прогностичка вредност хистолошког градуса расте у комбинацији с другим прогностичким факторима од којих су најважнији величина тумора и хистолошки статус лимфних чворова. Већина студија је потврдила да пацијенти чији су тумори високог градуса, односно слабо диферентовани, имају већи ризик за релапс болести од оних чији су тумори ниског градуса, односно добро диферентовани (Contesso и сар., 1987).

Хистолошки градус је значајан прогностички фактор и за укупно преживљавање, како за пацијене са позитивним, тако и за пацијенте са негативним статусом лимфних чворова (Fisher и сар, 1993). Установљено је да адјувантна хемиотерапија доводи до значајног побољшања тока болести и у групи пацијената са негативним и у групи пацијената са позитивним статусом лимфних чворова који имају слабо диферентоване туморе, у поређењу са пацијентима који имају добро диферентоване туморе (Davis и сар., 1996). Значи, висок хистолошки градус може да укаже на бољи одговор пацијента на адјувантну хемиотерапију.

Највећи прогностички значај, има комбинација три описана фактора: статус лимфних чворова пазушне јаме, величина тумора и хистолошки градус (Shek и Godolphin, 1998).

#### ***1.5.7. Индекс пролиферативности ћелије Ki-67***

Ki-67 је једарни протеин који се доводи у везу са ћелијском пролиферацијом. Индекс пролиферативности ћелије се убраја у прогностичке факторе за рак дојке. Тумори који имају већу пролиферативну активност имају лошију прогнозу и краћи интервал до појаве релапса болести (Yerushalmi и сар., 2010). У узорцима нормалног ткива дојке Ki-67 се експримира у ниском проценту (<3 % ћелија) код ER негативних ћелија. Студије које су испитивале предиктивни значај маркера пролиферације код пацијенткиња које су примале хемио или ендокрину терапију, нису показале да се протеин Ki-67 може сматрати самосталним предиктором одговора на терапију. Једна од метода за одређивање степена пролиферације у тумору је имунохистохемијска, коришћењем анти-Ki-67 антитела које маркира једра у свим фазама ћелијског циклуса осим G0 и ране G1 фазе (Keshgegian и Спаан, 1995).

Према препорукама Ст. Гален консензус конференције из 2009. године пролиферативни Ki-67 индекс у карциномима дојке може да буде: 1) низак (до 15%), 2) средњи (16-30%) и 3) висок (преко 31%), тако да су препоручене граничне вредности 15% или 30%.

Ki-67 позитивност указује на висок ризик од појаве релапса болести и лошије преживљавање пацијената са раком дојке. На конференцији у Ст. Галену 2013. године Ki-67 је препоручен за одређивање степена пролиферативности и разликовање луминал А од луминал Б рака дојке (Untch и сар., 2013). Већина учесника Ст. Гален консензус конференције 2013. године сложили су се да Ki-67 треба узети у обзир при доношењу одлуке о примени адјувантне хемиотерапије код појединачних пацијената.

#### ***1.5.8. Присуство лимфоваскуларне инвазија***

Доказано је да је лимфоваскуларна инвазија јак предиктор за захваћеност лимфних чворова пазушне јаме. Више студија је показало да налаз туморских ћелија унутар лумена крвних или лимфних простора значи лошију прогнозу. Васкуларна инвазија нађена је у готово четвртини случајева рака дојке, а чешће се види код слабо диферентованих, већих тумора, уз дуктални инвазивни карцином, те у случајевима са позитивном аксилом. Перинеурална инвазија је обично присутна у туморима високог хистолошког градуса, често уз лимфатичку инвазију. До сада није доказано да представља независан прогностички фактор (Elston и сар., 1998).

Лимфоваскуларна инвазија је и прогностички значајна за удаљену прогресију рака дојке код пацијената са негативним статусом лимфних чворова пазушне јаме, који нису имали адјувантну системску терапију. Код пацијента без лимфоваскуларне инвазије, стопа 10-годишњег преживљавања без појаве удаљених метастаза је око 90%, а за пацијенте са лимфоваскуларном инвазијом стопа преживљавања износи око 70%.

#### ***1.5.9. Молекуларна класификација рака дојке***

Примена молекуларне класификације рака дојке у процесу одабира одговарајуће терапије је јако присутна у последњих неколико година. На основу генских експресионих профила



настала је молекуларна класификација рака дојке, која карциноме позитивне на хормонске рецепторе дели у две групе: луминал А и луминал Б, а карциноме негативне на хормонске рецепторе на HER2 + позитивни и базалоидни тип. Осим споменутих типова, у литератури се спомињу и тип луминал Ц и тип карцинома сличан нормалној дојци, али ови типови су још увек слабо дефинисани (Geyer и сар., 2012). Ова класификација је изведена на основу експресије естроген и прогестерон рецептора, HER2 рецептора и пролиферативног индекса (Ki-67):

**ЛУМИНАЛНИ А ТИП:** (ER+, PR+, HER2-, Ki-67 низак ниво експресије)

**ЛУМИНАЛНИ Б ТИП:** (ER+, HER2 -, Ki-67 висок ниво експресије или PR низак ниво експресије) (ER+, HER2 +, било које вредности Ki-67 и PR)

**HER2 + ПОЗИТИВНИ ТИП:** (ER-, PR-, HER2 +)

**БАЗАЛОИДНИ ТИП** (троструко негативни дуктални): (ER-, PR-, HER2 -)

Луминални А тип рака дојке, чини више од 40% свих типова рака дојке, обично има високу експресију ER, ниску експресију HER2 рецептора, као и низак ниво експресије маркера пролиферације Ki -67, мање од 14%. Карцином дојке луминалног типа А, обично има ниски хистолошки градус, па овај тип тумора карактерише најбоља прогноза болести у односу на друге типове рака дојке (Sotiriou и Puztai, 2009). Карциноми луминалног типа Б углавном имају позитивне ER и амплификацију HER-2, високи хистолошки градус, високи индекс пролиферације и лошију прогнозу него они луминалног типа А (Puztai, 2009). Карциноми HER-2 типа имају високу израженост HER-2 и гена повезаних са HER-2 сигналним путевима. Ове туморе карактерише високи хистолошки градус и индекс пролиферације. Базални карциноми дојке чине до 15% свих карцинома дојке. У више студија доказано је да су базални карциноми дојке претежно лоше диферентовани тумори, често са медуларним и метапластичним елементима. Имунохистохемијски, они су претежно хормонски и HER-2 негативни (ER-, PR-, HER2-). Позитивна експресија базалних маркера повезана је са лошом прогнозом и са BRCA-1 мутацијама због непостојања адекватне, индивидуализоване циљане терапије (Sotiriou и сар., 2009).

## 1.6. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ПРОГНОСТИЧКИ / ПРЕДИКТИВНИ МАРКЕРИ РАКА ДОЈКЕ

Бројне студије анализирају потенцијалне молекуларне биомаркере као прогностичке /предиктивне факторе агресивности, који утичу на појави рецидива тумора и метастазирање, као што су E-Cadherin, **Humani Mammaglobin (hMAG)**, Interleukin 8 (IL8), Matriksne metaloproteinaze 2 и 9 (MMP2, MMP9) и многи други, јер би њихова корелација са другим маркерима канцерогенезе, директно утицало на избор одговарајућег модалитета лечења у различитим типовима хуманих канцера, укључујући и рак дојке.

### 1.6.1. E-cadherin

E-cadherin је епително-специфични молекул укључен у ћелијско-ћелијску адхезију, који има улогу тумор супресорног гена туморске инвазије. Када се прави поређење са инвазивним дукталним карциномима, E-cadherin имунохистохемијска експресија се значајно смањује или губи код већине инвазивно лобуларних карцинома дојке, а такође се губи и имунохистохемијска реактивност за алфа-, бета- и гама- катенине (De Leeuw и сар., 1997).

Бројне студије показују E-cadherin реактивност у око 90,5% инвазивних дукталних карцинома (Qureshi и сар, 2006). Међу класичним инвазивним лобуларним карциномима, 90% било је E-cadherin негативно, а 10% E-cadherin позитивно. Учесталост E-cadherin негативности била је незнатно мања, око 80% међу плеоморфним лобуларним карциномима. Губитак E-cadherin реактивности код карцинома који изгледају по хистолошким критеријумима као дуктални се много чешће виђа код лоше диферентованих тумора, али се дешава и код добро диферентованих карцинома (Harigopal и сар., 2005).

Катенини су протеини укључени у повезивање E-cadherin мембранског комплекса са интрацелуларним актинским цитоскелетом. Саопштено је да лобуларни карциноми класичног и плеоморфног типа приказују одсуство мембранске имунореактивности за катенин, паралелно са губитком E-cadherin-ске реактивности код тих карцинома (Dabbs и сар., 2007). Као што се понекад дешава са E-cadherin имунохистохемијски, p120 катенин ретко има тачкасто мембранско бојење "у виду бројанице" код ћелија лобуларног

карцинома. Јако дифузно цитоплазматско или тачкасто парануклеарно p120 катенин бојење обично се виђа код ћелија лобуларног карцинома дојке (Dabbs и сар., 2007). Насупрот томе, дуктални карциноми и нормални епител дојке показује континуалну мембранску p120 катенинску реактивност. Међутим, у неким студијама запазили су слабо мембранско p120 катенинско бојење у 10% дукталних карцинома и закључили да тај део промена може да буде погрешно класификован као лобуларни карцином, ако се дијагноза заснива на p120 катенин бојењу (Brandt и сар., 2008). Мада је E-cadherin бојење само по себи довољно да би се направиле разлике између лобуларних и дукталних карцинома, у већини случајева p120 катенин може да буде од помоћи заједно са E-cadherinom код двосмислених случајева.

### 1.6.2 Интерлеукин 8 (IL 8)

Познато је да је IL8 медијатор урођене имуности. IL8 секретују имунолошке ћелије које као компоненте урођене имуности обављају фагоцитозу – неутрофили и моноцити/макрофази. Стимулисани фагоцити секретују цитокине, хемокине, ензиме и друге антимикробне молекуле, факторе раста, факторе ангиогенезе и протеазе са циљем да се ремоделује оштећено ткиво и замени новим. Повећана експресија IL8 је карактеристична за хронична инфламаторна стања и различите типове хуманих канцера, укључујући и рак дојке. Различити фактори микросредине тумора као и сами хемотерапеутски агенси, индукују у ћелијама тумора повећану синтезу и секрецију IL8 (Bendrik и сар., 2009). Секретовани IL8 битно утиче на микросредину тумора посредством CHCR1/CHCR2 рецептора експримираних од стране ћелија тумора, ендотелних ћелија, неутрофила и моноцита/макрофага. Делујући аутокринно и паракринно, IL8 стимулише пролиферацију, преживљавање/хеморезистенцију, покретљивост и инвазивност ћелија тумора. Додатно, IL8 стимулише пролиферацију, преживљавање и миграцију ендотелних ћелија које и саме синтетишу и секретују IL8. На тај начин IL8 делује као врло значајан фактор ангиогенезе. IL8 индукује хемотаксичну инфилтрацију неутрофила и моноцита/макрофага на место тумора, који са своје стране продукују факторе раста, факторе ангиогенезе и протеазе, што такође доприноси ангиогенези, расту и прогресији тумора. Новија истраживања су указала на важност феномена епително-мезенхималне транзиције (EMT) у процесу прогресије тумора. Више аутора је указало на важност IL8 у иницијацији и/или одржању

мезенхималних и инвазивних карактеристика ћелија тумора, које би могле бити терапеутски елиминисане управо блокирањем IL8 и/или CHCR1/CHCR2. Новија истраживања су такође указала на важност IL8/CHCR1 сигнализације у самообнављању и одржању фенотипских и функционалних карактеристика канцерских стем ћелија дојке. Анализе генске експресије су показале да је CHCR1 маркер канцерских стем ћелија дојке. На основу ин витро истраживања, Гинестиер и сарадници су закључили да би хемиотерапија у комбинацији са инхибицијом CHCR1 рецептора била ефикаснија у лечењу рака дојке (Ginestier и сар., 2010).

### ***1.6.3. Матрикс металопротеиназе***

Матрикс металопротеиназе (ММП) су фамилија протеина зависних од цинка, а ММП-2 и ММП-9 су главни чланови ММП породице. ММП-2 и ММП-9 се углавном излучују у туморским ћелијама и стромалним ћелијама у облику неактивног облика-зимогена. Након активације путем хидролизе, ММП-2 и ММП-9 деградирају колаген базалне мембране (ВМ) типа IV, утичући на способност ВМ да делиује као баријера даљем продору туморских ћелија у циркулацију. Пробојем базалне мембране тумор прелази из ткз. „in situ“ стадијума, који нема способност метастазирања у инвазивни облик, који је склон појави метастаза. Истраживања су показала да ММП-2 и ММП-9 играју кључне улоге у деградацији екстрацелуларног матрикса и промовишу инвазију тумора и метастазе. ММП-2 и ММП-9 су високо експримиране код пацијената са раком дојке и блиско су повезани са метастазама у лимфним чворовима и стажирањем тумора. ММП-2 и ММП-9 се могу користити као предиктори исхода лечења и процену прогнозе болести (Li H, и сар., 2017).

### ***1.6.4 Human Mamaglobin (hMAG)***

Хумани мамаглобин (hMAG) је члан утероглобинске групе протеина који се у литератури наводи као маркер специфичан за рак дојке. Иако се ниске вредности могу детектовати у нормалном ткиву дојке, његова експресија је драматично повишена код рака дојке и у корелацији је са високим хистолошким градусом. Детекција мамаглобина у крви и телесним течностима је такође повезана са појавом метастаза, а ниво његове експресије са прогнозом болести. То обећава да ће мамаглобин бити користан скрининг маркер за рано откривање

рака дојке, нарочито код особа са високим ризиком за настанак рака дојке. У литератури, мамоглобин је такође коришћен за циљану имунотерапију ћелија рака дојке. Међутим, постоје неке контроверзе у вези његове дијагностичке ефикасности и прогностичке вредности, које захтевају даље проучавање.

Watson и Fleming су 1994-те године методом PCR (polymerase chain reaction) изоловали ланац сДНК која је кодирала протеин, данас познат као хумани мамоглобин (hMAG) (Watson и Fleming, 1994). Осим у ткиву дојке, hMAG-B подтипа (hMAG B-1 и B-2) је такође детектован и у ткиву карцинома ендометријума и оваријума (Bernstein и сар., 2005). У литератури се често користи различита номенклатура када је у питању мамоглобин, тако да поред hMAG можемо срести бројне скраћенице као што су: MAM, MGB, UGB3, MMG, SCGB2A1. hMAG је описан као један од 23 чланова утероглобинске групе протеина, фамилије малих епителних секреторних протеина, секретоглобина (Klug и сар., 2000). То је протеин 93-амино киселине са два N-повезана места гликолизе. Мамоглобин формира растворљиве, ковалентно везане хетеродимере са Липофилином Б у антипаралелном режиму што дозвољава формирање три дисулфидна моста између ова два молекула (Ni и сар., 2000). Мамоглобински молекул формира 4 алфа-хеликса у глава-реп оријентацији стварајући хидрофобно језгро, омогућавајући формирање 3 блиско повезана споја. У овом моделу N-терминални цистеин мамоглобина је ковалентно повезан са C-терминалним цистеином Л. Протеински серолошки маркер код карцинома дојке се налази у оквиру секвенци мамоглобин-липофилин комплекса (Carter и сар., 2002). Мултигенска фамилија мамоглобина А и В је локализована на хромозому 11q12.2 у густом кластеру заузимајући не више од 400 kbp (Ni и сар., 2000.).

Путем Western blot анализе, утврђено је да hMAG-A постоји у ткива дојке у два главна облика са приближним молекулским масама 18 и 25 kDa. Оба облика су детектована чешће у карциномима дојке него у нормалном ткиву дојке. Обрнути однос је утврђен између високе молекулске тежине hMAG-A, градуса тумора и пролиферативног индекса. Није утврђена значајна корелација између hMAG-A протеина, величине тумора или статуса лимфних нодуса, у прогнози рака дојке (O'Brien и сар., 2005). Иако се зна да су секретоглобини регулисани од стране стероидних хормона, експресија hMAG-A није изазвана естрогеном у ER позитивним ћелијским линијама рака дојке, као што су MCF7 и T47D, наговештавајући да је експресија hMAG-A у ткиву дојке, независна од стероидних

хормона (Watson и сар., 1998). У туморима дојке, hMAG-A и липофилин се ко-експримирају симултано, што указује на постојање заједничког регулаторног механизма (Span и сар., 2004). Функција hMAG-A протеина није позната. Northern blot и RT-PCR анализе су показале да је експресија hMAG-A ограничена на ткиво дојке и то да је веома изражена у ћелијским линијама рака дојке и примарним туморима дојке у поређењу са нормалним ткивом дојке (Watson и сар., 1998). Међутим, његова експресија није повећала стопу раста ћелијских линија, што значи да није укључен у процес ћелијске деобе (Sjodin и сар., 2008). Такође се очекује да се лако излучује од стране тумора дојке и да изазова производњу аутоантитела детектабилних у серуму пацијената са карциномом дојке и жена са високим ризиком од рака дојке, те се поставља питање да ли мамаглобин може да се користи као тумор маркер (Watson и сар., 1999).

У прелиминарним покушајима да утврде клинички значај мамаглобин као маркера тумора дојке, Watson и Fleming су открили да је експресија мамаглобин mRNA вишеструка у поређењу са нормалним ткивом дојке. Коришћењем RT-PCR and Northern blot анализе, они су открили hMAG у 91% случајева рака дојке, независно од стадијума болест и хистолошког типа (Watson и сар., 1999).

Слично томе, бројне накнадне студија описују повећану експресију мамаглобина у примарном тумору дојке, његово присуство у здравом ткиву дојке, у мањим концентрацијама, али не и у другим ткивима, што га чини погодним маркером у дијагностици рака дојке (Silva и сар., 2002). hMAG је такође коришћен у разликовању различитих под-типова карцинома дојке, попут Luminal A и B, HER-2, Basel-like carcinom (BLC) и трипле-негативног карцинома (Lewis и сар., 2011). Позитивна експресија hMAG-A, имунохистохемијским бојењем нађена је у приближно 90% инвазивног дукталног карцинома и у 80% интрадукталног карцинома (Leung и сар., 2013). Поред тога, претерана експресија hMAG гена је у корелацији са високим градусом тумора дојке (Mikhitarian и сар., 2008). Величина тумора, степен захваћености аксиларних лимфних нодуса, висок хистолошки градус, сматрају се снажним показатељима за рецидив рака дојке и лоше прогнозе пацијената са метастатским туморима (Diel и сар., 1996). Детекција hMAG у периферној крви је био слаб прогностички знак. Постоје, међутим, контроверзе на основу експерименталних налаза у којима нема корелације између детекције hMAG у крви пацијената са раком дојке и исхода лечења, или је мамаглобин описан као добар

прогностички индикатор метастазирања (Raica и сар., 2009). Поред тога, експресија hMAG је у корелацији са мање агресивним туморима дојке (Nunez-Villar и сар., 2003). In vitro студије показале су да прекомерна експресија hMAG није имала велики утицај на стопу раста ћелијске линије карцинома дојке Hs578T34. Стога, ставови о односу између hMAG и прогнозе су веома контроверзни. Мамаглобин се сматра перспективни дијагностичким маркером рака дојке већ дужи низ година. Много напора је до сада уложено у детекцију мамаглобин mRNA у лимфним чворовима, крви и коштаном сржи пацијената са карциномом дојке. Специфичност hMAG лежи у његовом готово искључивом постојању у ткиву дојке и карциному дојке. Поред тога, његова повећана експресија у карциномима дојке и његова повезаност са туморским градусом, чини га одличним маркером за дијагнозу и прогнозу болести. Методе за скрининг и детекцију раног рака дојке се и даље проучавају. До данас, само мамографија је начин раног откривања, а hMAG може повећати и допунити предиктивну вредност мамографије (O'Brien и сар., 2008).

## **1.7. ХИРУРГИЈА ИНВАЗИВНОГ РАКА ДОЈКЕ**

У зависности од статуса лимфних чворова пазушне јаме, величине тумора и хистолошког градуса, изводе се поштедне и мутилантне операције рака дојке.

### ***1.7.1. Поштедна хирургија рака дојке***

Рана дијагностика рака дојке, примена неoadјувантне хемиотерапије и постоперативна радиотерапија, омогућили су последњих деценија поштедну хирургију рака дојке. Поштедна хирургија рака дојке подразумева уклањање примарног тумора са околним здравим ткивом уз очување волумена и симетричног изгледа дојке, sentinel проверу стражарских лимфних нодуса или функционалну дисекцију пазушне јаме, постоперативну радиотерапију остатка дојке и регионалних лимфних подручја, адјувантну хемиотерапију, хормонску терапију, биолошку терапију на основу патохистолошког, имунохистохемијског налаза (Fitzal и сар., 2008). Чисте линије ресекције потврђује микроскопска анализа.

У поштедне операције рака дојке спадају:

1. **Туморектомија** - екцизија тумора до најмање 1цм у здраво уз обавезну проверу ивица екцизије на ех тегове узорку.
2. **Сегментектомија** - Екцизија тумора са ресекцијом 2 цм здравог ткива.
3. **Квадрантектомија** - Екцизија тумора са здравим ткивом тако да се одстрани цео квадрант и део пекторалне фасције, а слободне ивице екцизије су преко 2цм у здраво.
4. **Кунеиформна ресекција** - Купаста екцизија коже, брадавице и ареоле заједно са ретроареоларним ткивом до терцијерних завршетака жлезданих каналића дојке.
5. **Дисекција пазушне јаме** - Подразумева одстрањивање масног и лимфног ткива I и II а некада и III спрата пазушне јаме. Увек треба радити функционалну дисекцију која подразумева очување свих важних неуро-васкуларних елемената пазушне јаме. Дисекција пазушне јаме има два аспекта. Први је дијагностички говори нам да ли су регионални лимфни нодуси захваћени метастазама, што је и најзначајнији прогностички фактор. Други је терапијски који се постиже уклањањем метастаски измењених лимфних нодуса (Veriwal и сар., 2009).

Код поштедне операције рака дојке мора се задовољити онколошки принцип да се одстрани примарни тумор са слободним ивицама ресекције уз дисекцију I и II спрата пазушне јаме.

#### ***1.7.1.1. Индикације за поштедну хирургију рака дојке:***

- непалпабилни тумори,
- T1 и T2 тумори величине до 3цм и
- N0 и N1 лимфонодални статус у пазушној јами,
- гранична величина примарног тумора када се може урадити поштедна операција је 3цм,
- дефинитивна одлука се доноси на основу величине примарног тумора и волумена дојке,
- поштедна операција се може урадити и након доброг одговора на неoadјувантну хемиотерапију када је примарни тумор био већи од 3 цм уз неопходну одлуку конзилијума.



### ***1.7.1.2. Контраиндикације за поштедну хирургију рака дојке:***

- стадијум IIb (T3N0M0) и III (T3N1M0), када је тумор превелик за постизање одговарајућег естетског ефекта,
- неповољан однос величине тумора и дојке (мале дојке),
- понављано позитивне ивице ресекције код инвазивног и неинвазивног карцинома,
- дифузне микрокалцификације малигног изгледа,
- мултицентрични карциноми,
- претходно високодозна радиотерапија дојке или карцинома плућа,
- немогућност спровођења радиотерапије,
- предвиђен лош козметски ефекат,
- жеља пацијенткиње да се уради мастектомија,
- први и други триместар трудноће,
- рецидив након поштедне операције,
- психолошки, социјални и други разлози.

### ***1.7.1.3. Концепт биопсије стражарски лимфни чвор (Sentinel lymph node)***

Према дефиницији, стражарски лимфни чвор (Sentinel lymph node, SLN) је први лимфни чвор који прима аферентну лимфну дренажу из малигног тумора (Vergara-Fernández и сар., 2004). Биопсија SLN је постала стандард код операција рака дојке. Доказано је да код више од 2/3 жена са раним раком дојке нема метастаза у регионалним лимфним нодусима, тако да се смањује потреба за дисекцијом аксиле, јер од ове процедуре код ових жена нема значајне онколошке користи (Collins, 2005). Обележавање SLN се врши на два начина, преоперативно перитуморско убризгавање радиоактивног колоида (Tc99m), најчешће латерално и медијално од тумора и перитуморским убризгавањем виталне боје (*Patent blue V, Isosulfan blue, Mwtilen blue*). Најбоље је користити обе методе истовремено. Ова техника

обезбеђује прецизну процену статуса лимфних нодуса аксиле, ниску стопу лажно негативних резултата уз значајну редуцкију хируршког морбидитета, посебно лимфедема (Schneebaum и сар., 1998) (Van Rijk и сар., 2005). Резултати неколико студија показали су да нема разлике у преживљавању када је код раног карцинома урађена поштедна операција у односу на пацијенте код којих је у истом стадијуму урађена радикална мастектомија (Harisis и сар., 2010).

Циљ поштедне хирургије рака дојке је да резултат лечења буде једнак оном који се постиже мутилантном хирургијом. Постиже се бољи естетски резултат и бољи квалитет живота (Fodor и сар., 2005).

### ***1.7.2. Мутилантна хирургија рака дојке – Мастектомије***

Синоним за радикалну операцију рака дојке све до 60- тих година прошлог века, била је радикална мастектомија по Halstedu. Данас се, обзиром на напредак у области хемиотерапије, више и не користе радикалне мастектомије, већ модификоване радикалне мастектомије чија је заједничка одлика комплетно уклањање ткива дојке уз дисекцију пазушне јаме.

#### ***1.7.2.1. Врсте мастектомија***

##### **Радикална мастектомија по *Halsted - y***

Радикална мастектомија која се раније радила је подразумевла уклањање ткива дојке, великог и малог грудног мишића и дисекцију сва три спрата пазушне јаме. Ова врсте операције се јако ретко ради (Halsted, 1907).

##### **Модификована радикална мастектомија по *Madden - y***

Она подразумева уклањање ткива дојке уз широку ексизију коже, мамиле и ареоле као и дисекцију доњег и средњег спрата аксиле (Madden, 1972).

Индикације за мастектомију код рака дојке су: сви случајеви у којима је контраиндикована поштедна операција, код мултицентричног рака дојке, код тумора већих од 3 цм, код пацијенткиња које су иницијално примале неoadјуватну терапију због канцер-маститиса и инфилтрације коже,...

#### Модификована радикална мастектомија по *Patey - y*

Подразумева уклањање комплетног glandуларног ткива дојке, уклањање малог грудног мишића са пресецањем ребарних припоја уз дисекцију сва три спрата пазушне јаме. Како се пресече и медијални пекторални нерв, долази до атрофије доње трећине великог грудног мишића (Madden и сар., 1972).

#### *Субкутана* мастектомија

Подразумева одстрањење целокупног glandуларног ткива уз очување коже и ареоле и истовремено са дисекцијом пазушне јаме. Истовремено се ради и примарна реконструкција, најчешће уграђивањем ендопротезе испод великог грудног мишића или експандера који се постепено допуњује до жељеног волумена, а након тога замени са ендопротезом (Driul и сар., 2013).

Индикација за субкутану мастектомију су мултицентрични карцином, централно локализован карцином, мали волумен дојки.

#### Проста мастектомија (*simplex*)

Мастектомија за очувањем коже дојке (*Skin sparing mastectomy*) са примарном реконструкцијом дојке имплантацијом ендопротезе субпекторално (Carlson и сар., 1997).

### ***1.7.3. ПРОГНОСТИЧКЕ ГРУПЕ ИНВАЗИВНОГ РАКА ДОЈКЕ***

Сваки пацијент се након операције, на основу познавања свих прогностичких и предиктивних фактора, сврстава у једну од **3 прогностичке групе** у којима је ризик за релапс болести у току првих 10 година различит:

- 1. групу са ниским ризиком за релапс болести (<10%),**
- 2. групу са интермедијарним или умереним ризиком (10-50%) и**
- 3. групу са високим ризиком (>50%).**

Груписање према прогнози неопходно је за избор оптималне адјувантне терапије.

#### ***1.7.3.1. Адјувантна хемиотерапија рака дојке***

Примена **адјувантне хемиотерапије** има за циљ да цитостатским дејством на евентуалне микрометастазе смањи ризик од претпостављеног ризика за релапс болести.

Примена постоперативне, адјувантне хемиотерапије одређује се према важећем консенсусу о лечењу рака дојке. Рецептори за ER и PR и HER2 статус су најзначајнији молекуларни параметри са предиктивним значајем на основу којих се примењује циљана терапија (Nagaraj и Ма, 2013).

**Адјувантна хемиотерапија** се препоручује код пацијената са умереним, и нарочито код оних са високим ризиком од релапса болести.

Од десетак хемиотерапијских режима који се најчешће примењују у адјувантној терапији, они који садрже **антрациклине** се препоручују код пацијената са високим ризиком, нарочито уколико постоји HER2 оверекспресија или амплификација.

Код старијих пацијената или код пацијената са кардиолошким и другим контраиндикацијама за примену антрациклина, **CMF (Циклофосфамид, метотрексат, 5-флуоурацил) хемиотерапија** може бити најбоља терапијска опција (Joensuu и сар., 2012). Оптимална дужина адјувантне хемиотерапије није у потпуности испитана, али се најчешће примењује током 6 до 8 циклуса, односно траје 18 - 24 недеље. Краћа примена (12-16 недеља) може бити погодна за старије пацијенте.

Примена **таксана** препоручује се код пацијената са нодус позитивним туморима, а нарочито оних које припадају категорији високог ризика (Lagha и сар., 2013). Уколико постоји и индикација за хормонску терапију, исту треба примењивати након завршене адјувантне хемиотерапије, изузев оваријалне аблације која се може спровести на почетку или у току хемиотерапије.

Уколико постоји индикација за примену **анти-HER2 терапије, трастузумабом**, исти треба примењивати након завршеног антрациклинског дела хемиотерапије, са или без таксана (Albert и сар., 2011).

Примена **таксана** је стандард у лечењу метастаског рака дојке после примене антрациклинске хемиотерапије.

### *1.7.3.2. Адјувантна биолошка терапија рака дојке*

HER2 позитивним карциномима дојке, сматрају се они, код којих је HER2 статус одређен имунохистохемијском методом, означен као 3+ (више од 30% туморских ћелија показује хомогено и интензивно бојење ћелијске мембране). Резултат одређен имунохистохемијском методом, означен као 2+ представља туморе чији HER2 статус је непоуздан, што захтева додатне методе (Lifrange и сар., 2011).

Све болеснице са ХЕР2 позитивним карциномом дојке треба да добију адјувантни **Херцептин**, под условом да имају очувану функцију леве коморе (што се одређује ехокардиографским прегледом, или радиоизотопским прегледом пре започињања примене Херцептина). Изузетак су болеснице са најповољнијом прогнозом (T<10 мм, N0). Херцептин се примењује у комбинацији са хемиотерапијом, конкомитантно или секвенцијално до укупно 1 године. Херцептин се може применити у недељном или тронедељном режиму по утврђеним онколошким принципима (Tan и сар., 2003).

### *1.7.3.3. Неoadјувантна хемиотерапија рака дојке*

**Неoadјувантна** (примарна системска, преоперативна, индукциона) **терапија** је системска апликација медијалне терапије пре локорегионалне терапије у неметастатској болести рака

дојке, код локално одмаклих карцинома дојке (стадијум IIIA T3 N1 M0, T0-3 N2 M0, стадијум IIIB T4 N0-2 M0, стадијум IIIC сваки T N3 M0, стадијум IIIV T3 N0 M0). Пацијенти са локално одмаклим раком дојке имају лошију прогнозу него пацијенти са раним операбилним раком дојке (већи ризик за локални релапс и удаљене метастазе, као и лошије укупно преживљавање), али имају бољу прогнозу него пацијенти са удаљеним метастазама. Инфламаторни карцином дојке представља клинички и патолошки подтип локално одмаклог карцинома дојке који има посебно агресиван ток и лошу прогнозу (Sun и сар., 2013).

**Антрациклински и таксански режими** су савремени стандард неoadјувантне хемиотерапије (Alken и Kelly, 2013). Дуже трајање неoadјувантне хемиотерапије (6-8 циклуса) је ефикасније него краће трајање (3-4 циклуса), те се не препоручује примена мање од 6 циклуса неoadјувантне хемиотерапије.

Након примене **неoadјувантне хемиотерапије** и **оперативног захвата** може се применити адјувантна хемиотерапија код пацијената са резидуалном болешћу у дојци или аксилу (Valenzuela и Julian, 2008).

#### ***1.7.3.4. HER2 позитивни локално одмакли рак дојке – Неoadјувантни Трастузумаб***

Амплификација или прекомерна експресија HER2 је нађена у око 35% локално одмаклих и метастатских тумора и око 40% инфламаторних карцинома дојке и удружена је са агресивним током болести и лошом прогнозом. Због тога је изузетно важно пацијентима са HER2 + локално одмаклим, а посебно онима са инфламаторним раком дојке понудити ефикасну **неoadјувантну терапију**. Додавање **трастузумаба** неoadјувантној хемиотерапији (а затим адјувантно до укупног трајања примене **Херцептина** око једне године) у пацијената са HER2 + локално одмаклим и инфламаторним раком дојке значајно побољшава преживљавање у односу на пацијенте лечене само хемиотерапијом (Adams и сар., 2008).

#### ***1.7.3.5. Радиотерапија у лечењу карцинома дојке***

Радиотерапија као и хирургија спада у локорегионални третман. Радиотерапија се примењује у свим стадијумима болести код рака дојке, почев од раног карцинома након поштедне операције, након мастектомије, преко локално узрапредовалог тумора па до метастатске болести (Cutuli, 2012).

## 1.8. МЕТАСТАТСКИ РАК ДОЈКЕ

Рак дојке одликује локално инфилтративни раст и способност давања лимфонодалних и удаљених метастаза. Теорија каскаде говори да је неинвазивни или минимално инвазивни рак дојке без лимфонодалних метастаза, **локална болест**, а када се појаве лимфонодалне метастазе рак дојке постаје **системска болест**.

Према студијама рађеним до сада може се тврдити да је потребно у просеку десет година (1-20 г.) од настанка малигнух ћелија до клинички испољеног тумора величине 0.5 до 1цм. Од хиперплазије и атипичне ћелије настају појединачне малигне ћелије које остају унутар каналића или режњића без пробоја базалне мембране, а када пробију базалну мембрану настаје инвазивна форма рака. Лимфонодалне метастазе настају када малигне ћелије уђу у лимфоток. Метастазе обично настају у лимфним нодусима првог реда (аксиларни, мамарни и инфраклавикуларни). Ретко метастазе прескоче подручја првог реда и дају метастазе у наредним регионима (Tichy и сар., 2013). Метастазе у лимфним нодусима око унутрашње мамарне артерије могу бити једино место метастазирања. Број захваћених лимфних нодуса и степен захваћености имају важан прогностички значај. Истраживања су показала да 30% болесника без лимфонодалних метастаза умире од рака дојке најчешће због метастаза у костима.

Удаљене метастазе настају миграцијом и заустављањем малигнух ћелија у различитим органима и ткивима. Метастазирање може бити **хематогено и лимфогено**. Метастаски потенцијал малигнух ћелија је генетски одређен. Метастазе се могу испољити пре него што се клинички испољи примарни тумор дојке. Метастазе обично имају бржи раст од раста примарног тумора. Пацијент лечен од рака дојке може добити рецидив и после 20 година од започињања лечења (Merkel и Osborne, 1989).

У зависности од иницијалног стадијума болести 25-85% пацијената развиће метастазе рака

дојке. Стопа преживљавања је, упркос лечењу 2-3 године. Метастатска болест може бити дијагностикована истовремено са појавом локо-регионалног релапса болести, или у тренутку дијагнозе карцинома дојке (око 10% свих новодијагностикованих карцинома дојке), али најчешће ипак у периоду праћења. Метастазе се најчешће јављају у костима, затим плућима, јетри, јајницима, кожи и CNS-у. Када се дијагностикује метастаза у једном органу, увек је неопходно урадити и прегледе других органа, а све са циљем да се:

- процени проширеност болести,
- прогноза болести,
- да се постави циљ системске терапије и
- изабере оптимални модел лечења за сваког пацијента индивидуално.

При процени прогнозе и избору оптималне терапије и многи други фактори имају улогу, као што је старост пацијента, нарушеност функције органа и система услед болести, лабораторијски поремећаји, разни коморбидитети, као и став самог пацијента.

Избор терапијског приступа све је више индивидуализован, прилагођен појединачном пацијенту.

Упркос великом напретку у лечењу рака дојке, метастатски карцином дојке је и даље инкурабилна болест (Tseng и сар., 2013). То значи да упркос лечењу, пацијенти са метастатском болешћу најчешће прогредирају даље у току 1-2 године. Пет година у САД преживи нешто мање од 30%, осам година око 12% болесника и само мали број (1-3%) може да преживи и до 20 година.

#### **Циљ лечења:**

- Излечење (изузетно ретко)
- Продужење укупног преживљавања
- Продужење времена до даље прогресије болести
- Што већи број узастопних терапијских одговора на различите третмане



- Ублажавање симптома болести
- Побољшање квалитета живота
- Превенција компликација везаних за болест

Лечење метастаске болести је велики терапијски изазов. Избор најприкладнијег терапијског приступа за сваког појединачног пацијента са метастатским раком дојке зависи од процене **параметара агресивности болести:**

- рецепторски стаус (ER/PR)
- HER-2 статус
- протекло време између примарног лечења и појаве релапса болести
- локализација метастаза
- проширеност метастаских лезија

#### **Алгоритми у лечењу:**

Хормонотерапија → релативне индолентне форме

Хемиотерапија → агресивне форме

(Lim и Winer, 2011).

Највећу активност у лечењу метастаског карцинома дојке показали су алкилирајући агенси, антиметаболити, винка алкалоиди, антрациклини и таксани. Применом монотерапије објективни терапијски одговор постиже се у 20-80% пацијената. Комплетна ремисија је ретка, у око 15% пацијената, а траје дуже од 5 година у само 10% пацијената (Burdette-Radoux и Muss, 2003).

## **2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

### ***2.1. Радне хипотезе***

1. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке корелира са степеном агресивности болести
2. Однос нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву у корелацији са осталим маркерима канцерогенезе има улогу у исходу лечења и прогнози болести код пацијената са карциномом дојке
3. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке корелира са одређеним патохистолошким типовима
4. Ниво мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву чак и код пацијената код којих је постигнута R0 хируршка ресекција може указати на постојање системске болести

### ***2.2. Циљеви истраживања***

1. Сакупити узорке како карциномског тако и перитуморског ткива дојке пацијената са карциномом дојке и патохистолошки анализирати исте
2. Извршити лабораторијске анализе на материјалима хуманог порекла ради утврђивања нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву
3. Утврдити корелацију добијених нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву са маркерима који су у корелацији са појавом удаљених метастаза (Ki 67, E-Cadherin, матрикс металопроотеиназе 9, итд).
4. На основу наведеног извести закључке који могу значајно утицати на избор одгорајућег терапијског модалитета

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ СТУДИЈЕ**

#### ***3.1. Врста студије***

Рад представља клиничку опсервациону студију (кохортна) уз експерименталну студију на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

#### ***3.2. Методологија***

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Узорци (туморско и перитуморско ткиво) су узимани у сарадњи са Клиником за општу и грудну хирургију и Службом за патолошку анатомску дијагностику Клиничког Центра у Крагујевцу. Истраживања у овој дисертацији су обављена у складу са Хелсиншком декларацијом.

Студија је део пројекта Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије бр. III 41010: "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци (ПИБАС)", са одобрењем Етичког одбора КЦ Крагујевац бр. 01-4990.

##### ***3.2.1. Хемикалије и реагенси***

Коришћене хемикалије и реагенси купљени су од различитих произвођача. Физиолошки раствор са фосфатним пуфером (Phosphate-buffered saline - PBS), добијени су од Gipro, USA. Хлороформ, етанол и изопропанол PCR чистоће добијени су од компаније Serva, Немачка. Кит за одређивање концентрације hMAG (Human Mammaglobin-A ELISA kit) као и моноклонско антитело Anti-Human Antibody (My BioSource, inc. San Diego, CA, USA). Китови за превођење РНК у комплементарну ДНК (QuantiTect Reverse Transcription Kit) и

PCR Кит (Sensiscript Reverse Transcriptase Kit - RT) од Qiagen, Немачка. Вода PCR чистоће и TRIzol од Ambion, USA. Кит за експресију гена КараSYBR® Green PCR Master Mix од произвођача KAPA Biosystems, Boston, USA. Прајмери од произвођача Eurofins Genomics, Ebersberg.

### ***3.2.2. Критеријуми за укључивање пацијената у студију***

За потребе истраживања у оквиру докторске дисертације анализирано је туморско и околно перитуморско ткиво. У студију су укључене пацијенткиње са дијагносикованим карциномом дојке. Све пацијенткиње су прегледане од стране Онколошког конзилијума КЦ Крагујевац, након чега су подвргнуте одговарајућој хируршкој интервенцији. Након прегледа онколошког конзилијума, уз добровољни пристанак пацијената са раком дојке и одобрењем Етичког Комитета Клиничког Центра у Крагујевцу (КЦ Крагујевац бр. 01-4990) узимани су узорци ткива. Сви пацијенти су били и писмено информисани о свим детаљима студије. Током операција које се рутински изводи на Клиници за општу и грудну хирургију у КЦ Крагујевац узимани су узорци карцинома дојке (n=64) и перитуморског ткива (n=64). Узорци карциномског ткива су различите величине у зависности од величине самог тумора, а узорци перитуморског, макроскопски неизмењеног ткива су узимани на око 3 cm од макроскопске маргине тумора. Сви узорци су прошли патохистолошку верификацију Службе за патолошку и анатомску дијагностику, КЦ Крагујевац. Узорци су чувани на температури од -196 °C до извођења анализа. Сваки узорак је прошао хистопатолошку евалуацију: хистолошки тип, туморски градус (Nottingham Histological Scores), старост пацијената, статус лимфних нодуса, естрогенски, прогестеронски и HER2/neu статус евалуирани су према протоколу American Joint Committee on Cancer - AJCC, 7th ed., 2010 (Elston и сар., 2002; Edge и сар., 2010).

У студију нису укључене пацијенткиње код којих је преоперативно спроведена неoadјувантна терапија. Неoadјувантна терапија је употреба цитостатика пре хируршке или зрачне терапије да би се смањио тумор или покушало заустављање напредовања већ проширеног тумора у телу. Овај вид терапије може служити за стварање предуслова за операцију. Такође, из студије су искључене пацијенткиње са претходном историјом карцинома дојке. Искључене су пацијенткиње са присутним метастатским депозитима

пореклом из других органа. Испитивање ни у ком случају није ометало лечење какво се иначе рутински спроводи у КЦ Крагујевац према важећим принципима добре клиничке праксе.

### ***3.2.3. Припрема узорака ткива***

Узорак је измерен и хомогенизован на леду. Хомогенизација је вршена додатком 500  $\mu$ l хладног пуфера за лизирање на 0,01 g узорка. За хомогенизацију узорака смо користили хомогенизатор (IKA Homogeniser IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Germany) и ултрасонични хомогенизатор (Ultrasonic homogenizers Sonopuls, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Germany). Пуфер за лизирање се састојао од 31.25 mM Triss-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерола и допуњен је до 100 ml dH<sub>2</sub>O. Пуфер за лизирање је чуван на собној температури пошто је филтриран. Након центрифугирања на 10,000 rpm на 4 °C, 10 минута, издвојен је супернатант, који представља укупан ћелијски лизат. Тако су издвојени укупни протеини из туморског и перитуморског ткива. Lowry метода је коришћена за одређивање укупне концентрације протеина у супернатанту. Супернатанти су еликвирирани и чувани на -80 °C.

### ***3.2.4. Одређивање концентрације протеина Lowry методом (Lowry и сар., 1951):***

Измери се 0,1 ml супернатанта (узорака туморског и перитуморског ткива) и дода се 0,1 ml 0,2 M NaOH и 0,3 ml Реагенса II (бакар карбонатни реагенс). Реагенс II се добија мешањем 1 ml раствора 1% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O и 2% K, Na-тартарата. Затим се смеша допуни до 0,1 ml са 0,2 M NaOH (Реагенс I). Затим се врши инкубација 15 минута на собној температури и дода се 0,6 ml Folin-Ciocalteu-реагенса. Потом следи инкубација од 30 минута на собној температури, а апсорбанца је мерена на 490 nm. Мерена је апсорбанца из стандардне криве конструисане на основу познате концентрације протеина говеђег серумског албумина, што је коришћено за израчунавање концентрације протеина.

### 3.2.5. Одређивање концентрације хуманог *Mamaglobin-A* у ткиву карцинома дојке

Пуфер за испирање - 30 ml концентрованог пуфера за испирање је разблажено у 750 ml дејонизоване или дестиловане воде. Неискоришћен раствор је остављен на 4°C. Када су се кристали формирали у концентрату, загреван је на 40°C у воденом купатилу (температура загревања није прелазила 50°C) и полако се вршило мешање док се кристали у потпуности нису растворили. Раствор је остављен да се охлади на собној температури пре употребе.

Стандард:

- 1) 10 ng/ml стандардног раствора: додато је 1ml узорка/стандардног пуфера за растварање у епрувету, епрувета је остављена на собној температури 10 мин. и измешано.
- 2) 5 ng/ml - 0.156 ng/ml стандардних раствора: обележено је 6 епрувета са 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.3125 ng/ml, 0.156 ng/ml, појединачно. Аликвот 0.3 ml узорка/стандардног пуфера за растварање у сваку епрувету. Додато је 0.3 ml изнад поменутог 10 ng/ml стандардног раствора у прву епрувету и измешано. Узето је 0.3 ml из прве епрувете и стављено у другу епрувету и измешано. Узето је 0.3 ml из друге епрувете и стављено у трећу епрувету и измешано, и тако редом. Стандардни раствори су коришћени у току два сата. Стандардни раствор је био на температури од 4°C до 12 сати.

Припрема биотинисаног радног раствора за детекцију антитела је припремана један сат пре експеримента

- 1) Израчуната је укупна запремина радног раствора: 0.1ml/ бунарчић x величина бунарчића (0.1 - 0.2 ml више од укупне запремине)
- 2) Разблажен је биотин за детекцију антитела са пуфером за растварање антитела у сразмери 1:100 и измешано. (додато је 1µl биотина за детекцију антитела у 99µl пуфера за растварање антитела)

Припрема HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) радног раствора:

Припремано 30 мин. пре експеримента.

- 1) Израчуната је укупна запремина радног раствора: 0.1ml/бунарчић x величина бунарчића. (0.1-0.2ml више од укупне запремине)
- 2) Разблажено је SABC са SABC пуфером за растварање при сразмери 1:100 и измешано. (додато је 1µl SABC у 99µl SABC пуфера за растварање)

Поступак испитивања

Пре додавања у бунарчиће, уједначени су SABC радни раствор и ТМВ супстрат око 30 мин. на собној температури (37°C). Узорци и реагенси су потпуно и уједначено измешани. Унета је стандардна крива за сваки тест.

1. Подешен је стандард, тест узорак и контролни (нула) бунарчићи на претходно припремљеној (обложеној) плочи за сваки појединачно, и онда су забележени њихови положаји. Измерен је сваки стандард и узорак душло. Опрана је посуда два пута пре него што су додати стандард, узорак и контролни (нула) бунарчићи.
2. Аликвот 0.1ml од 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml, 1.25ng/ml, 0.625ng/ml, 0.3125ng/ml, 0.156ng/ml, стандардни раствори у стандард бунарчиће.
3. Додато је 0.1ml узорка/стандардног пуфера за растварање у контролни (нула) бунарчић.
4. Додато је 0.1 ml одговарајуће разблаженог узорка (хомогенат ткива) у бунарчиће са тест узорком.
5. Затворена је плоча са поклопцем и започета је инкубација на 37°C 90 мин.
6. Уклоњен је поклопац и одложен садржај плоче, брзо је стављена плоча на филтер папир или други материјал за упијање. Бунарчићи се нису у потпуности осушили. Плоча није опрана.
7. Додато је 0.1ml биотинисаног радног раствора за детекцију антитела у поменуте бунарчиће (стандард, тест узорак и нула бунарчиће). Додат је раствор на дно сваког бунарчића без додиривања зидова.
8. Плоча је затворена поклопцем и започета је инкубација на 37°C у току 60 мин.
9. Уклоњен је поклопац и плоча је опрана три пута са пуфером за испирање.
10. Додато је 0.1ml SABC радног раствора у сваки бунарчић, покривено је поклопцем и започета је инкубација на 37°C у току 30 мин.
11. Уклоњен је поклопац и испрана је плоча пет пута са пуфером за испирање и сваки пут је пуфер за испирање остављен да одстоји у бунарчићима 1-2 мин.
12. Додато је 90µl ТМВ супстрата у сваки бунарчић, покривена је плоча и започета је инкубација на 37°C у мраку 15-30 мин. Нијансе плаве су се могле видети у прва три до четири бунарчића (са најконцентрованијим SCGB2A2 стандардним растворима), други бунарчићи нису показивали очигледну боју.
13. Додато је 50µL стоп раствора у сваки бунарчић и измешано. Боја се одмах мења у жуту.

14. Очитана је О.Д. апсорпција на 450 nm у читачу микроплоче одмах након додавања стоп раствора.

За прорачун, (релативни О.Д.450) = (О.Д. 450 сваког бунарчића) – (О.Д. 450 нула бунарчића).

Стандардна крива је могла да се нацрта као релативни О.Д.450 сваког стандардног раствора (Y) вс. појединачна концентрација стандардног раствора (X). SCGB2A2 концентрација узорака може интерполирати од стандардне криве.

Резиме

1. Опрана је плоча два пута пре него што је додат стандард, узорак и контролни (нула) бунарчићи.
2. Додато је 100µl стандарда или узорка сваком бунарчићу 90 мин. на 37°C.
3. Додато је 100µl биотинисаног радног раствора за детекцију антитела у сваки бунарчић 60 мин. на 37°C.
4. Аспирирано је и опрано три пута
5. Додато је 100µl SABC радног раствора у сваки бунарчић. Инкубација 30 мин. на 37°C.
6. Аспирирано је и опрано пет пута.
7. Додато је 90µl TMB супстрата. Инкубација 15-30 мин. на 37°C.
8. Додато је 50µl стоп раствора. Очитано одмах на 450nm.
9. Прорачунати су резултати.

### **3.2.6. Испитивање експресије информационе РНК за *mamaglobin-A gen***

Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction - qRT-PCR) омогућава да се циљна ДНК секвенца симултано амплификује и квантификује. Нивои генске експресије су високо регулисани процеси у свим ћелијама. Број транскрипата неког гена, који се касније транслатира у специфичан протеин, директно зависи од стопе експресије или деградације информационе или „messenger“ РНК (iRНК или mRNA) у ћелији или ткиву. Да бисмо могли квантификовати генску експресију потребно је умножити генски транскрипт тј. специфичне информационе РНК. PCR је техника којом се умножавају ДНК молекули, док је за умножавање информационе РНК, потребно да се она прво преведе у комплементарну ДНК помоћу



ензима реверзне транскриптазе. Процедура за qPCR даље прати општи принцип PCR, главна разлика је то што се копије ДНК квантификују у реалном времену тј. након сваког појединачног циклуса. За квантификацију се често користи Sybr Green, флуоресцентна боја која интеркалира тј. везује се за дволанчану ДНК и како се број копија ДНК повећава, јачи је и сигнал, односно флуоресценца која се емитује. Апарат за qPCR мери количину флуоресценце ове флуорофоре у реалном времену и на основу тих резултата, посебно дизајниран софтвер омогућава анализу, односно на овај начин прерачунавамо релативну генску експресију у различитим узорцима преко броја копија информационе РНК. QRT-PCR метода због начина сакупљања узорка и анализирања је једна од најефикаснијих и најпрецизнијих метода.

### ***3.2.7. Изолација рибонуклеинске киселине из ткива и ћелија***

Принцип за изолацију РНК се заснива на фенол/хлороформ реакцији коју су први описали Chomczynski и Sacchi (1987). Сав рад се врши на леду, сем корака где је наглашено другачије. Узорак (ткиво карцинома и перитуморско ткиво) је пребачен на лед и ресуспендован у 1 ml TRIzol-a (1 ml TRIzol-a на 0.01 g ткива) у коме је хомогенизован пипетом и остављен у TRIzol -у на собној температури 5 минута.

У све узорке додато је 200 µl хлороформа, након енергичног мешања 15 секунди остављен је на собној температури 2-3 минута и центрифугиран 15 минута на 12000 rpm, на 4 °C. Центрифугирањем су се издвојиле три видљиве фазе унутар микротубе. Водена фаза која се налази на врху (фаза РНК) је пренета у нову микротубу, пазећи да се не помеша са осталим фазама. У издвојену водену фазу додато је 500 µl изопропанола и инкубирано на собној температури 10 минута. Након тога, узорци су центрифугирани 10 минута на 12000 rpm на 4 °C. Супернатант је уклоњен, талог РНК је испран са 1 ml 80% етанола и микротуба је центрифугирана 5 минута на 7500 rpm на 4 °C. Супернатант је уклоњен, преостали етанол осушен за 2-3 минута и РНК талог ресуспендован у 20 µl PCR воде и инкубиран на 55 °C у термоблоку 2-3 минута. Концентрација сваког узорка је измерена на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer Plus). Однос апсорбанци 260 и 280 nm који је био између 1,8-2,0 узиман је као показатељ чисте РНК без присуства других компоненти (pure RNK). На

основу добијене концентрације, РНК узорци су еликутирани и чувани на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до извођења анализа.

### **3.2.8. Реверзна транскрипција (RT-PCR)**

Једноланчана РНК се преписује у комплементарну ДНК (сДНК) по принципу комплементарности помоћу ензима реверзне транскриптазе (енгл. Reverse Transcriptase, RT) (Bustin, 2000). Коришћен је Qiagen Seniscript RT Mix (Master Mix) који садржи 2  $\mu\text{l}$  10x Buffer RT, 2  $\mu\text{l}$  dNTP Mix-а (дезоксирибонуклеотид трифосфати, појединачне концентрације 5 mM), 2  $\mu\text{l}$  олиго-dT прајмера, 10  $\mu\text{l}$  воде (PCR чистоће), 1  $\mu\text{l}$  ензима реверзне транскриптазе (Sensiscript Reverse Transcriptase) и 2  $\mu\text{l}$  изоловане РНК, концентрације 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Узорци су постављени у апарат MultiGene OptiMax Thermal (Labnet Intentional Inc. North America) који је програмиран у складу са упутствима произвођача. Добијени узорци комплементарне ДНК су чувани на  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  до извођења анализа.

### **3.2.9. Квантитативна ланчана реакција полимеразе (qRT-PCR)**

За анализу експересије гена коришћена је сДНК као полазни молекул (Zhai и сар. 2005). *Master mix (Universal Kapa Sybr fast qPCR Master Mix 2x)* је комерцијално припремљен кит који је у себи садржавао све потребне компоненте за реакцију, изузев пара прајмера, узорка сДНК и боје-Rox Low, које се додају одвојено. Након одмрзавања qPCR *Master mix*-а, компоненте су вортексоване и направљена је реакциона смеша која садржи све компоненте потребне за qPCR, осим сДНК. Реакциона смеша је садржала следеће компоненте 10  $\mu\text{l}$  qPCR Master Mix-а; 0,4  $\mu\text{l}$  прајмера (Forward прајмер концентрације 10  $\mu\text{M}$ ) и 0,4  $\mu\text{l}$  прајмера (Reverse прајмер-концентрације 10  $\mu\text{M}$ ) и 0,4  $\mu\text{l}$  ROX Low.

Коришћени су прајмери за гене  $\beta$ -actin,

Primer	Forward sequence	Reverse sequence
<i>β-actin</i>	5'-AAGCAGGAGTATGACGAGTCCG-3'	5'-GCCTTCATACATCTCAAGTTGG-3'
<i>Mammaglobin-A gen</i>	5'-CAG CGG CTT CCT TGA TCCTTG-3'	5'-ATA AGA AAG AGA AGG TGT GG-3'

У PCR плочу са *PCR Master Mix*-ом додато је 2  $\mu$ л узорака комплементарне ДНК и на крају је додато онолико микролитара воде PCR чистоће (*Ambion® Nuclease-Free Water*), да укупна запремина у бунарићу PCR плоче буде 20  $\mu$ л. Плоче су постављене у апарат *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems*. Коришћен је софтвер *Applied Biosystems (7500/7500 Fast Real-Time PCR softver v 2.0)*. У складу са упутствима произвођача програм је био покренут. Сваки qPCR циклус почиње топлотним активационим кораком на 95 °C у трајању од 3 минута, након тога следи циклус који се понављао 40 пута и састоји се од три корака. Први корак представља денатурацију ДНК која се одвија 15 секунди на температури од 95 °C. Затим је следи хибридизација, односно везивање прајмера на ДНК калуп, и на крају полимеризација у трајању од 60 секунди на 60 °C. Након завршеног циклуса амплификације, добијени резултати су анализирани софтвером *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR*. Релативна квантификација експресије испитиваног гена је добијена у односу на експресију конститутивног гена *β-actin*-а („housekeeping gene“) у истом узорку (Schmittgen и Livak, 2008).

За израчунавање релативне генске експресије из ткива коришћена је следећа формула:

$$2^{-\Delta C_T} = \Delta C_{T1} - \Delta C_{T2}$$

$\Delta C_{T1}$  =  $C_T$  вредност испитиваног гена у узорку;  $\Delta C_{T2}$  =  $C_T$  вредност *β-actin*-а („housekeeping gene“) у узорку.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Клиничко-патолошке карактеристике код пацијената са карциномом дојке

Циљ коме тежи модерна онкологија је индивидуализација терапије, што је основна премиса ове дисертације. У том циљу праћени су нивои мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке и анализирана њихова прогностичка вредност. Такође, изучавана је корелација између нивоа мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву и одређених клиничко-патолошких карактеристика. У студију су укључене пацијенткиње чије су клиничко-патолошке карактеристике описане у **Табели 1**.

**Табела 1. Клиничко-патолошке карактеристике пацијенткиња са карциномом дојке**

Карактеристике	Број пацијената-N, (%)
<b>Укупан број узорака</b>	128
<ul style="list-style-type: none"> <li>Перитуморско ткиво (ПТ)</li> <li>Карциномско ткиво (КТ)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>64 (50%)</li> <li>64 (50%)</li> </ul>
<b>Хистолошки тип тумора</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Invasive Ductal Carcinoma</i></li> <li><i>Invasive Lobular Carcinoma</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>55 (86%)</li> <li>9 (14%)</li> </ul>
<b>Хистолошки градус</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>G1 Добра диференцијација (<i>low grade</i>)</li> <li>G2 Умерена диференцијација (<i>intermediate grade</i>)</li> <li>G3 Слаба диференцијација (<i>high grade</i>)</li> <li>G4 Неиздиференциране (<i>high grade</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>8 (12%)</li> <li>36 (56%)</li> <li>20 (32%)</li> <li>0</li> </ul>
<b>Величина тумора</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>T1 (тумор <math>\leq 2</math> cm)</li> <li>T2 (тумор величине између 2 и 5 cm)</li> <li>T3 (тумор <math>&gt; 5</math> cm)</li> <li>T4 (тумор било које величине са инфилтрацијом зида грудног коша)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>27 (42%)</li> <li>3 (4%)</li> <li>34 (54%)</li> <li>0</li> </ul>

**Захваћеност лимфних нодуса (N)**

- N0 нема регионалних лимфоидалних метастаза • 4 (6%)
- N1 метастазе присутне у ипсилатералним аксиларним лимфним нодусима • 31 (48%)
- N2 метастазе присутне у ипсилатералним аксиларним нодусима фиксирани један за други или друге стурктуре • 29 (46%)

**Присуство метастаза (M)**

- M0 Нема удаљених метастаза • 23 (36%)
- M1 Присутне удаљене метастазе • 33 (52%)
- Mx Присуство метастаза непознатно • 8 (12%)

**Статус рецептора**

- ER+ (Присутни) • 38 (60%)
- ER- (Нису присутни) • 26 (40%)
- PR+ (Присутни) • 29 (46%)
- PR- (Нису присутни) • 35 (54%)
- HER+ (Присутни) • 31 (48%)
- HER- (Нису присутни) • 33 (52%)

**Године**

- < 50 • 3 (4%)
  - > 50 • 61 (96%)
- 

Већи број пацијенткиња, 55 (86%) према 9 (14%) је имао дуктални хистолошки тип рака дојке. Тумор величине T3 (тумор > 5 cm) је био најчешћи 54%. Позитиван хормонски рецепторски статус је имало 53% пацијенткиња, док је 48% пацијенткиња било HER2 позитивно. Лимфни нодуси су код 94% пацијенткиња били захваћени метастазама.

#### 4.2. Карактеристике лечења примарног карцинома дојке

Карактеристике лечења примарног карцинома дојке које се односе на учињену хируршку интервенцију (поштедна или мутилантна операција) и постоперативну онколошку терапију, описане су у Табели 2.

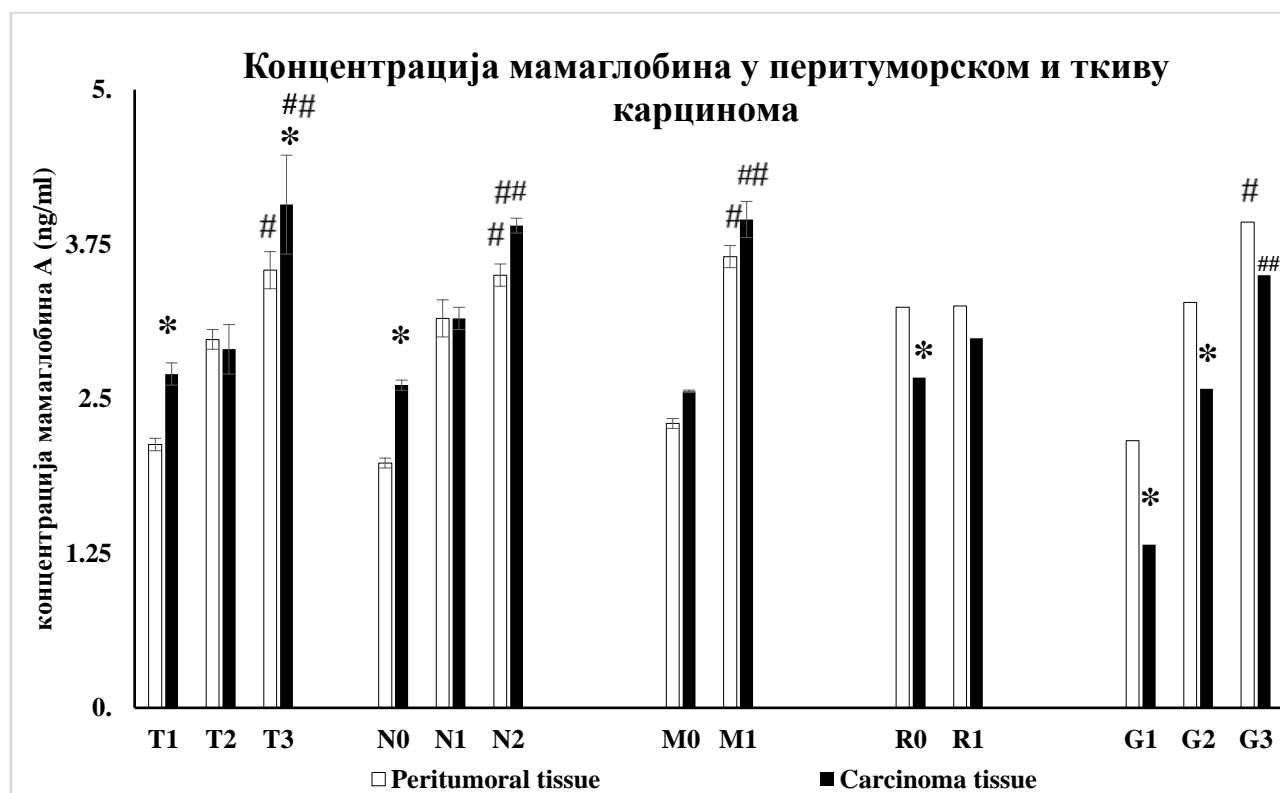
**Табела 2. Карактеристике лечења примарног карцинома дојке**

Карактеристике N (%)	Број пацијената-N, (%)
<b>Хируршка интервенција</b>	
• Поштедна (Тумор < 3 cm)	29 (45,3%)
• Мутилантна (Тумор ≥ 3 cm)	35 (54,7%)
<b>Постоперативна адјувантна хемиотерапија</b>	
• Да	46 (72%)
• Не	18 (28%)
<b>Постоперативна радиотерапија</b>	
• Да	43 (67%)
• Не	21 (33%)
Укупно	64 (100%)

Поштедна операција је урађена код 29 (45,3%) пацијенткиња које су имале примарни рак дојке мањи од 3cm, према 35 (54,7%) пацијенткиња код којих је учињена мутилантна операција. Постоперативну адјувантну хемиотерапију је имало 46 (72%) пацијенткиња. Постоперативна радиотерапија је примењена код 43 (67%) пацијенткиња.

### 4.3. Концентрација мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке

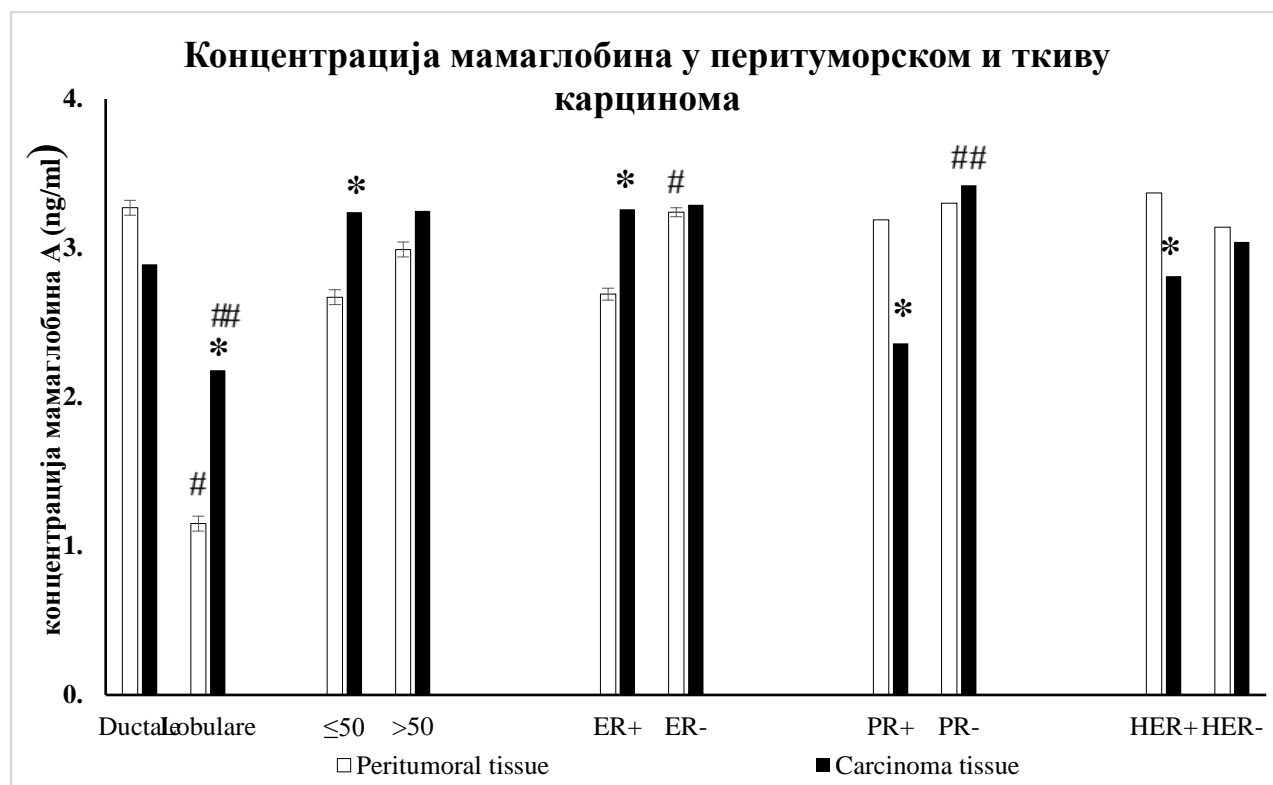
**Графикон 1.** Концентрација мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке у односу на ТНМ класификацију и хистолошки градус тумора.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорка испитиваног параметра (N); \* $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномског и перитуморског ткива; # $p < 0,05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива међусобно; ## $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномских ткива међусобно.

Коришћени су *Student's T* тест и ANOVA, при чему је  $p < 0.05$  сматрана статистички значајном разликом.

**Графикон 2.** Концентрација мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке у односу на патохистолошки тип тумора, старосну доб пацијента, хормонски и HER 2 статус.



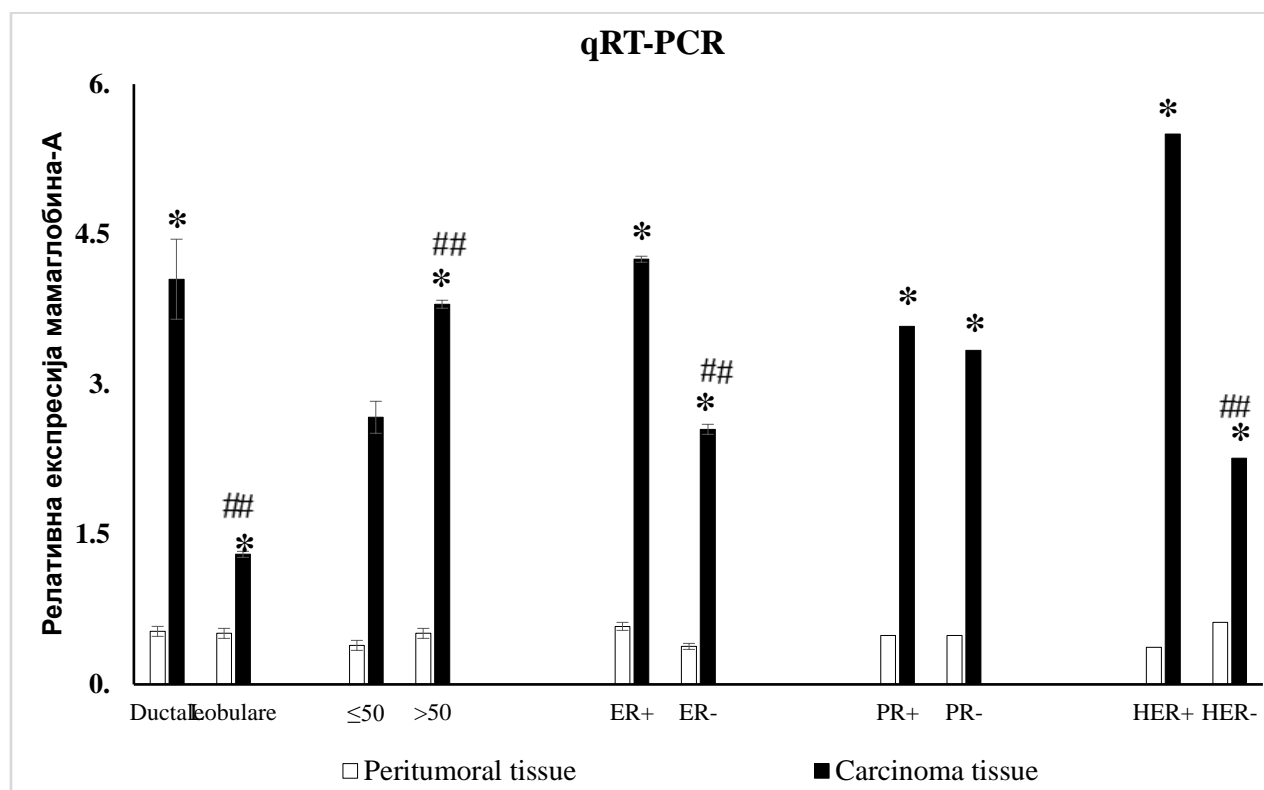
Резултати су представљени као средња вредност ± SE за број узорака испитиваног параметра (N); \* $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномског и перитуморског ткива; # $p < 0,05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива међусобно; ## $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномских ткива међусобно

Коришћен је *Student's T* тест, при чему је  $p < 0,05$  сматрана статистички значајном разликом.



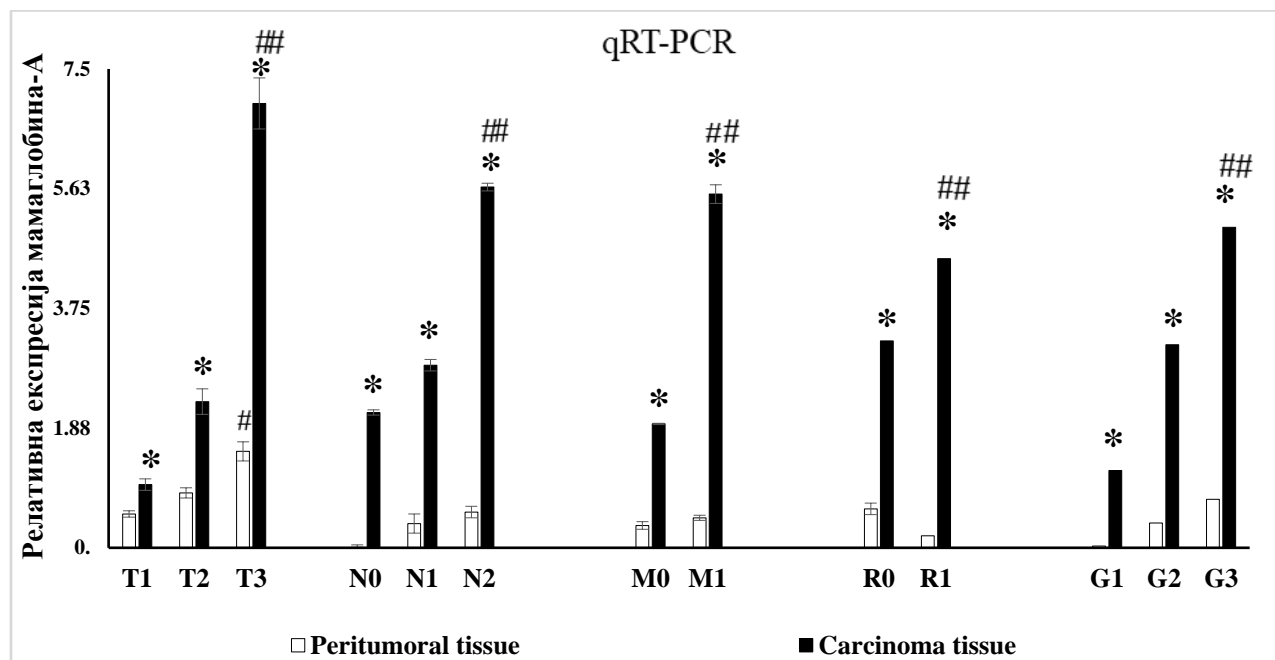
#### 4.4. Анализа генске експресије мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке

**Графикон 3.** Релативна генска експресија мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке у односу на патохистолошки тип тумора, старосну доб пацијента, хормонски и HER 2 статус.



Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорка испитиваног параметра (N); \* $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномског и перитуморског ткива; # $p < 0,05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива међусобно; ## $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномских ткива међусобно (

**Графикон 4.** Генска експресија мамаглобина А у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке у односу на ТНМ класификацију, захваћеност маргина препарата карциномом и хистолошки градус тумора

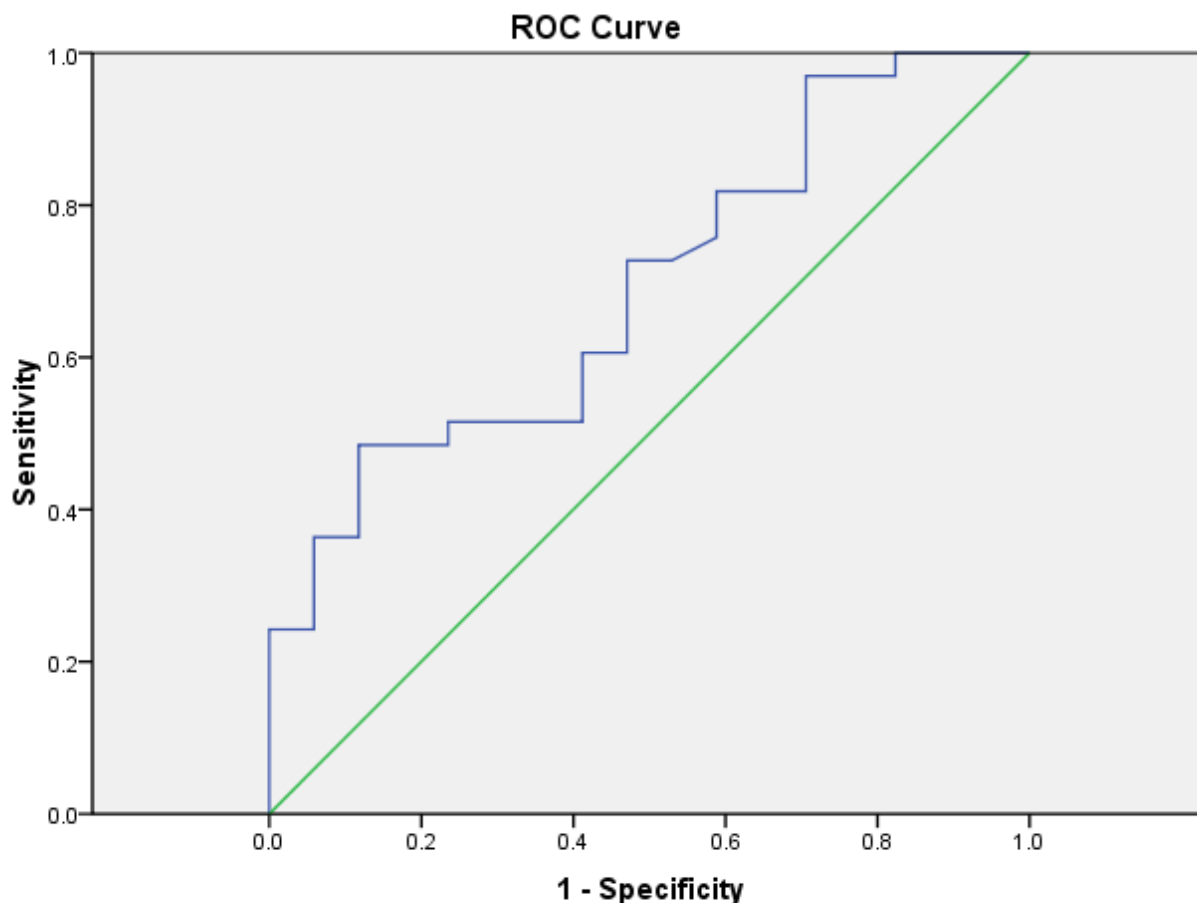


Резултати су представљени као средња вредност  $\pm$  SE за број узорака испитиваног параметра (N); \* $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномског и перитуморског ткива; # $p < 0,05$  статистички значајна разлика између перитуморских ткива међусобно; ## $p < 0,05$  статистички значајна разлика између карциномских ткива међусобно.

Генска експресија мамаглобина у туморском ткиву је значајно израженија у односу на перитуморско ткиво (Mann-Whitney тест,  $U = 754$ ,  $p = 0.001$ ).

#### 4.5. Предиктивни значај концентрације мамаглобина А у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке

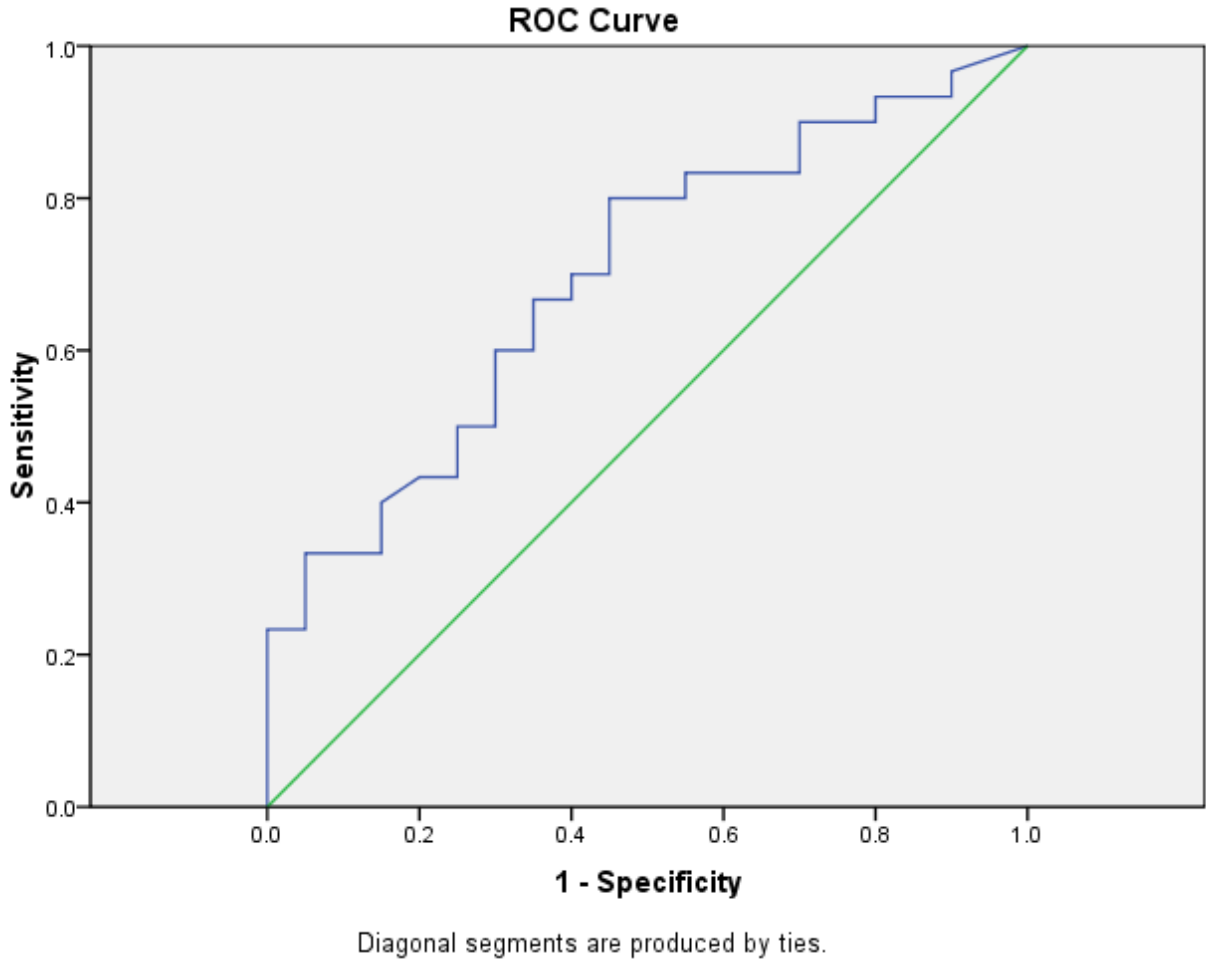
**Графикон 5.** ROC крива-концентрација мамаглобина А у перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Diagonal segments are produced by ties.

Концентрација мамаглобина у перитуморском ткиву код карцинома дојке значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија,  $p=0.024$ ). На основу ROC криве можемо закључити да вредност концентрације мамаглобина у перитуморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ( $AUC= 0.693$ ,  $p=0.027$ ). Гранична вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи  $0.67\text{ng/ml}$  за сензитивност 0.58 и специфичност 0.59.

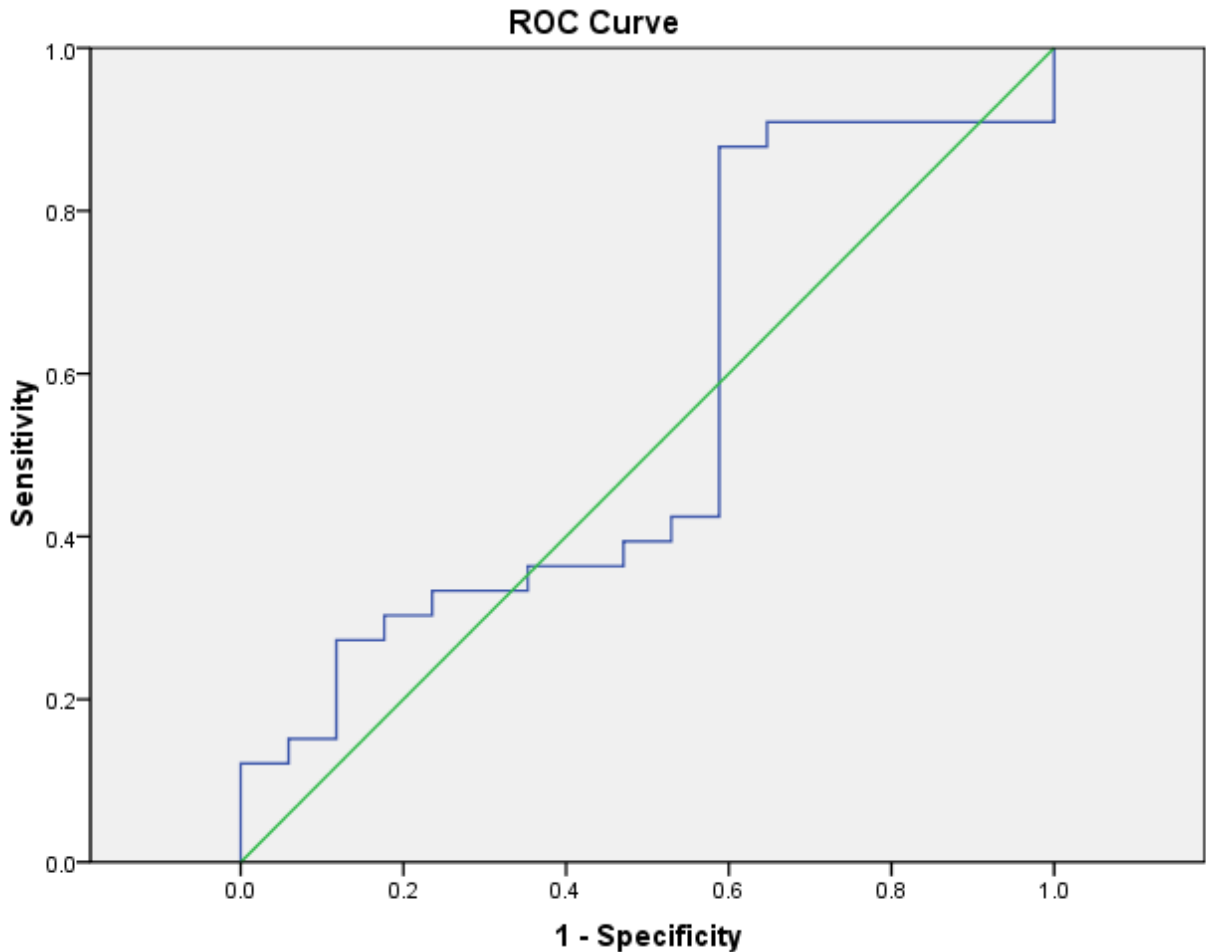
**Графикон 6.** ROC крива-концентрација мамаглобина А у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Концентрација мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија,  $p = 0.025$ ). На основу ROC криве можемо закључити да вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ( $AUC = 0.698$ ,  $p = 0.019$ ). Гранична вредност концентрације мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи  $0.578 \text{ ng/ml}$  за сензитивност  $0.67$  и специфичност  $0.65$ .

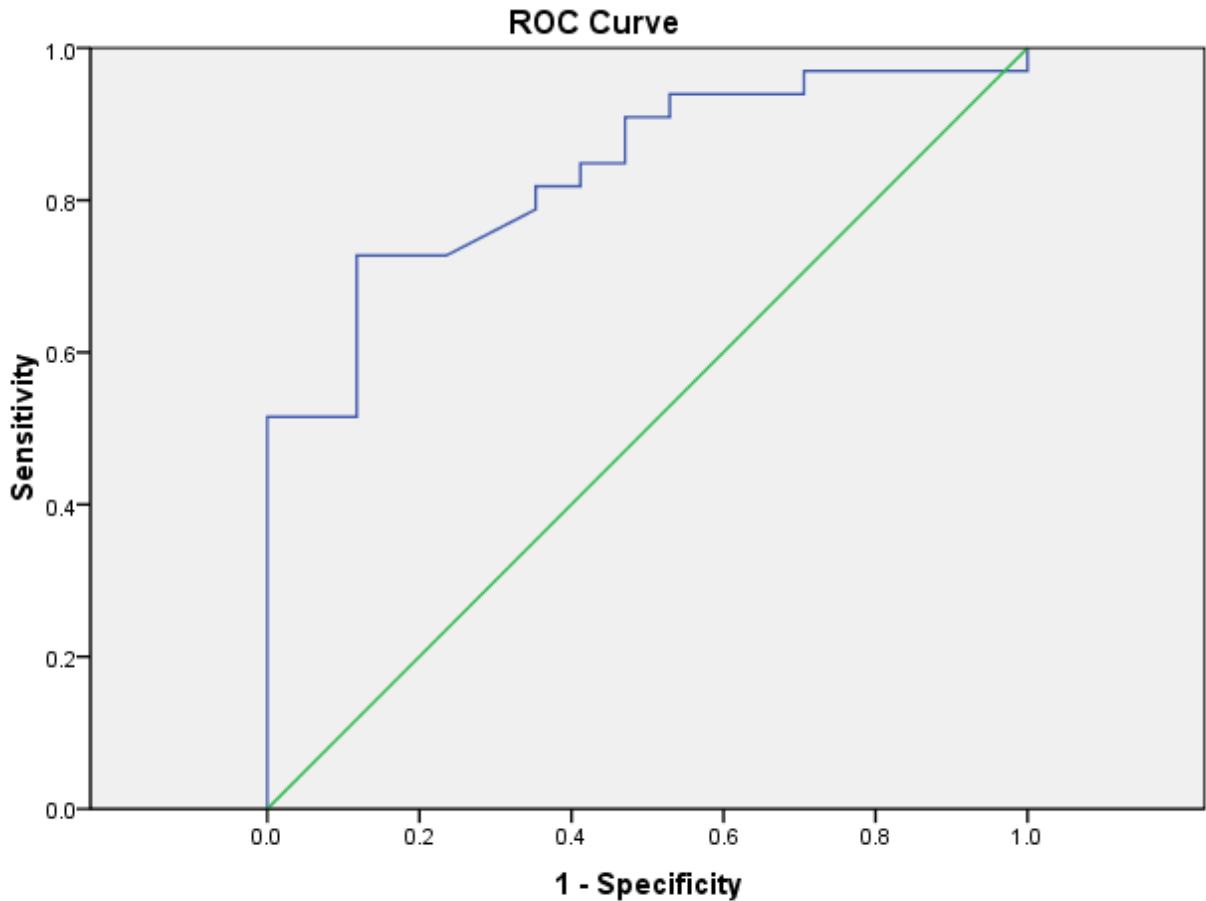
#### 4.6 Предиктивни значај генске експресије мамаглобина А у перитуморском и туморском ткиву код пацијената са карциномом дојке

**Графикон 7.** ROC крива-генска експресија мамаглобина А у перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



Генска експресија мамаглобина у перитуморском ткиву не утиче значајно на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија,  $p=0.307$ ). На основу ROC криве можемо закључити да вредност генске експресије мамаглобина у перитуморском ткиву не може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ( $AUC= 0.553$ ,  $p=0.546$ ).

**Графикон 8.** ROC крива-генска експресија мамаглобина А у туморском ткиву пацијената са карциномом дојке.



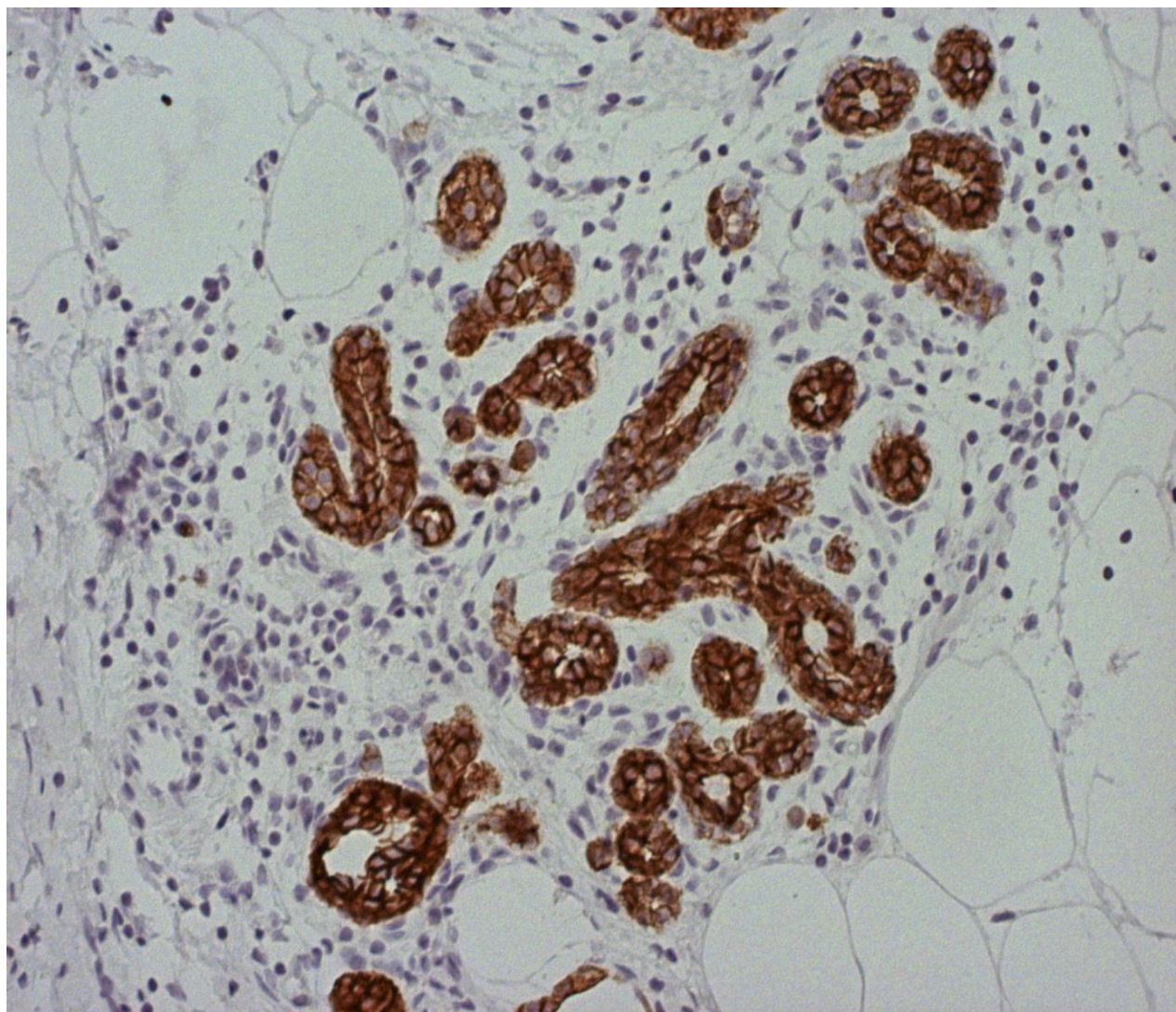
Diagonal segments are produced by ties.

Генска експресија мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке одређена PCR методом значајно утиче на појаву удаљених метастаза (бинарна логистичка регресија,  $p=0.043$ ). На основу ROC криве можемо закључити да вредност генске експресије мамаглобина у туморском ткиву може да се користи као фактор предикције за настанак удаљених метастаза ( $AUC=0.838$ ,  $p<0.01$ ). Гранична вредност генске експресије мамаглобина у туморском ткиву изнад које можемо закључити да постоји већа вероватноћа настанка удаљених метастаза износи  $1.003\text{ng/ml}$  за сензитивност 0.73 и специфичност 0.76.

#### 4.6. Значај имунохистохемијског одређивања E-Cadherin-а код пацијаната са карциномом дојке

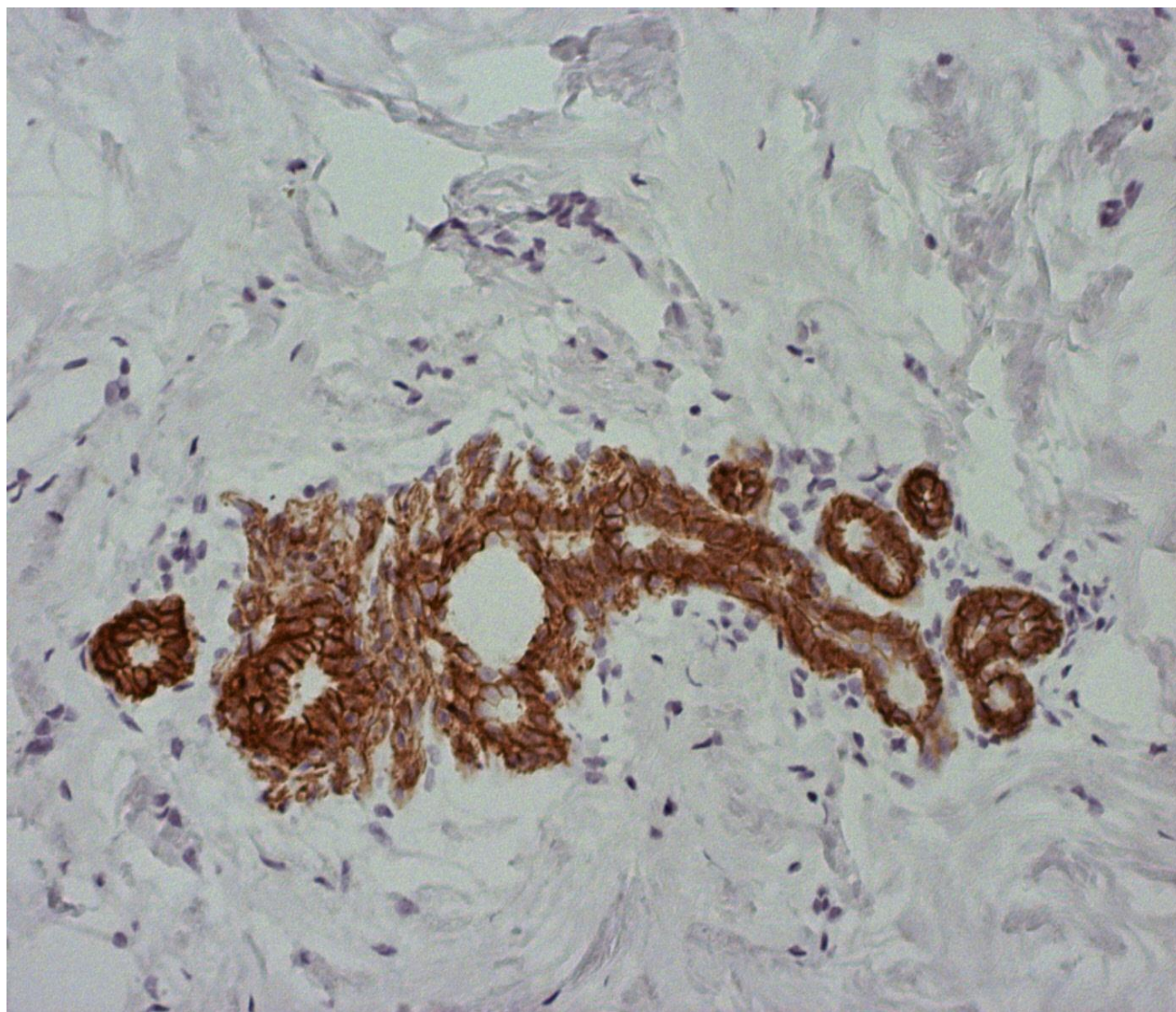
	Cadherin			ukupno
		neg.	poz.	
Tip karcinoma dojke	64	0	0	64
duktalni	0	3	52	55
lobularni	0	5	4	9
Ukupno	64	8	56	128

E-Cadherin се статистички значајно чешће јавља код пацијената са дукталним типом карцинома дојке у односу на лобуларни тип (Ни квадрат тест,  $X^2=125.166$ ,  $p<0.01$ )

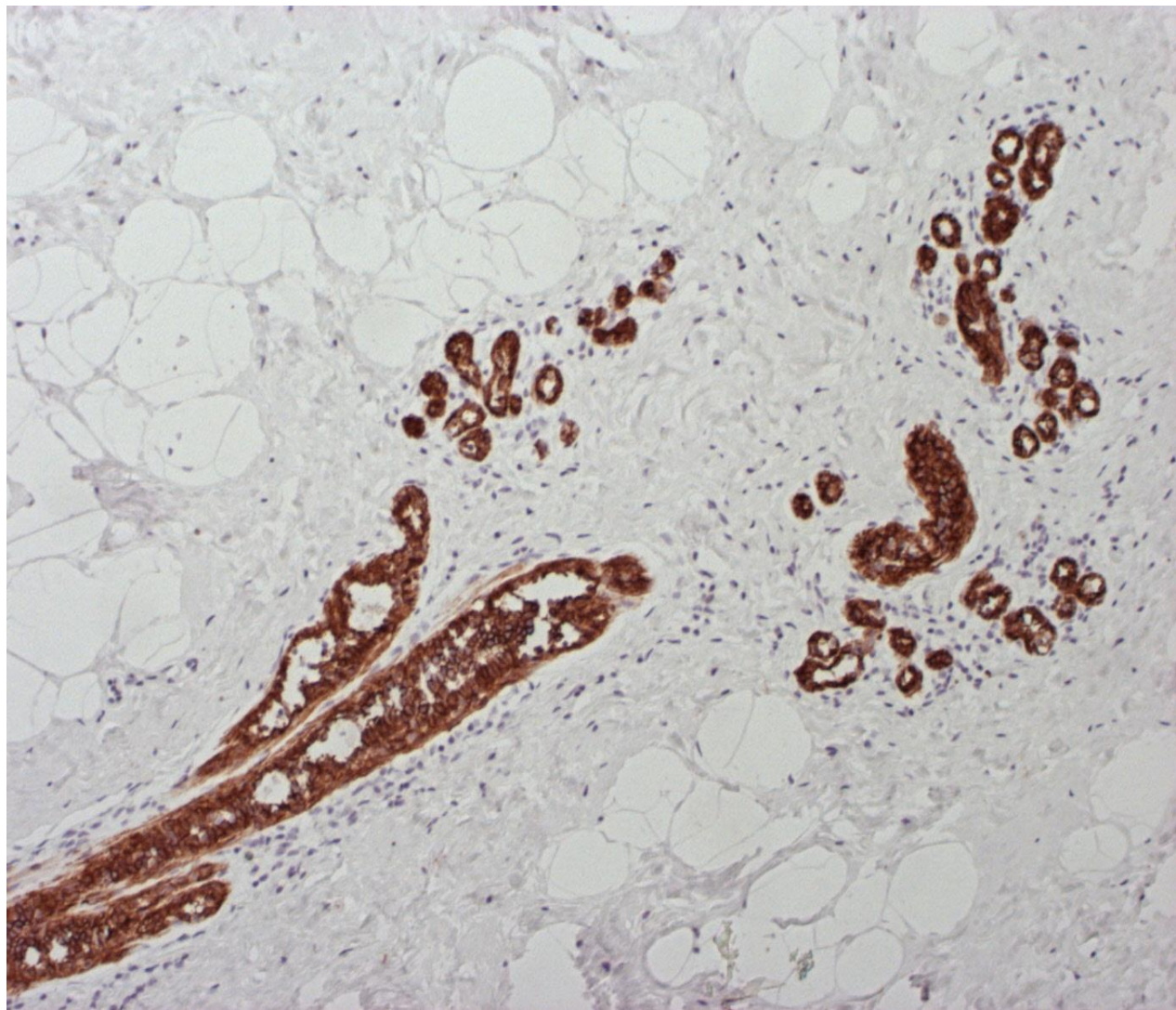


**Слика 1.** ECADx200-Мембранска позитивност епителних ћелија дукталних структура.

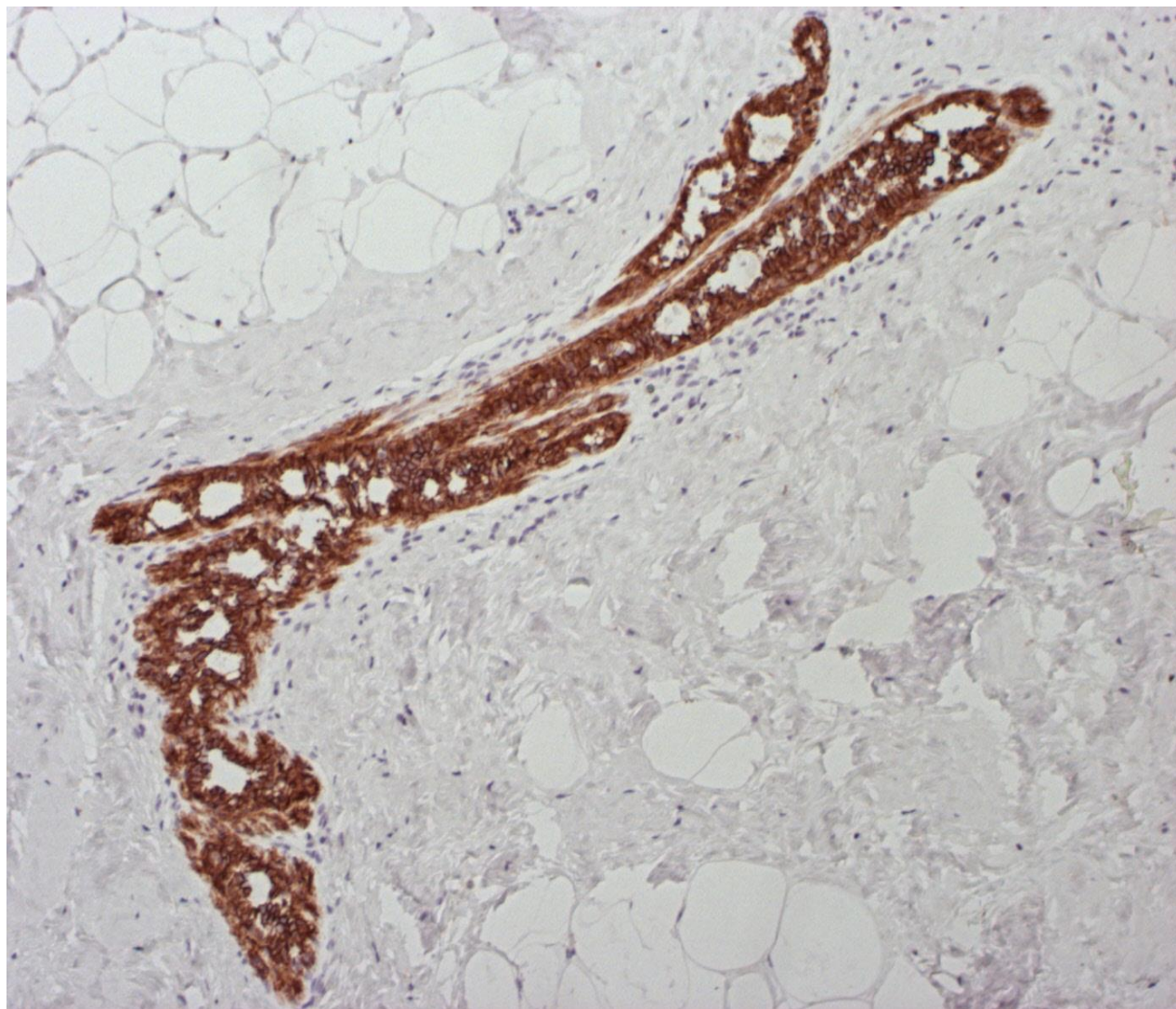




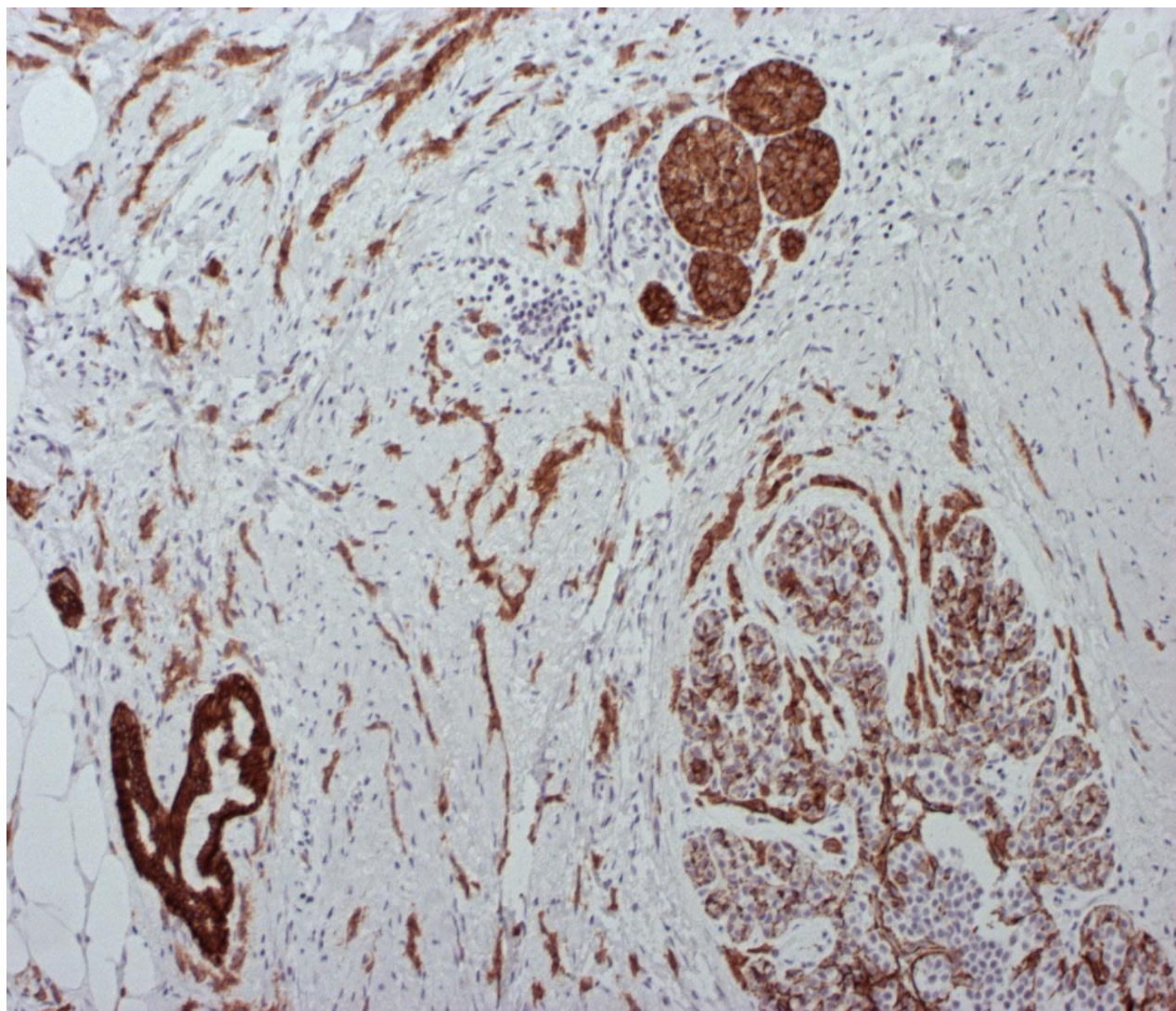
**Слика 2.** ECADx200-Мембранска позитивност епителних ћелија дукталних структура.



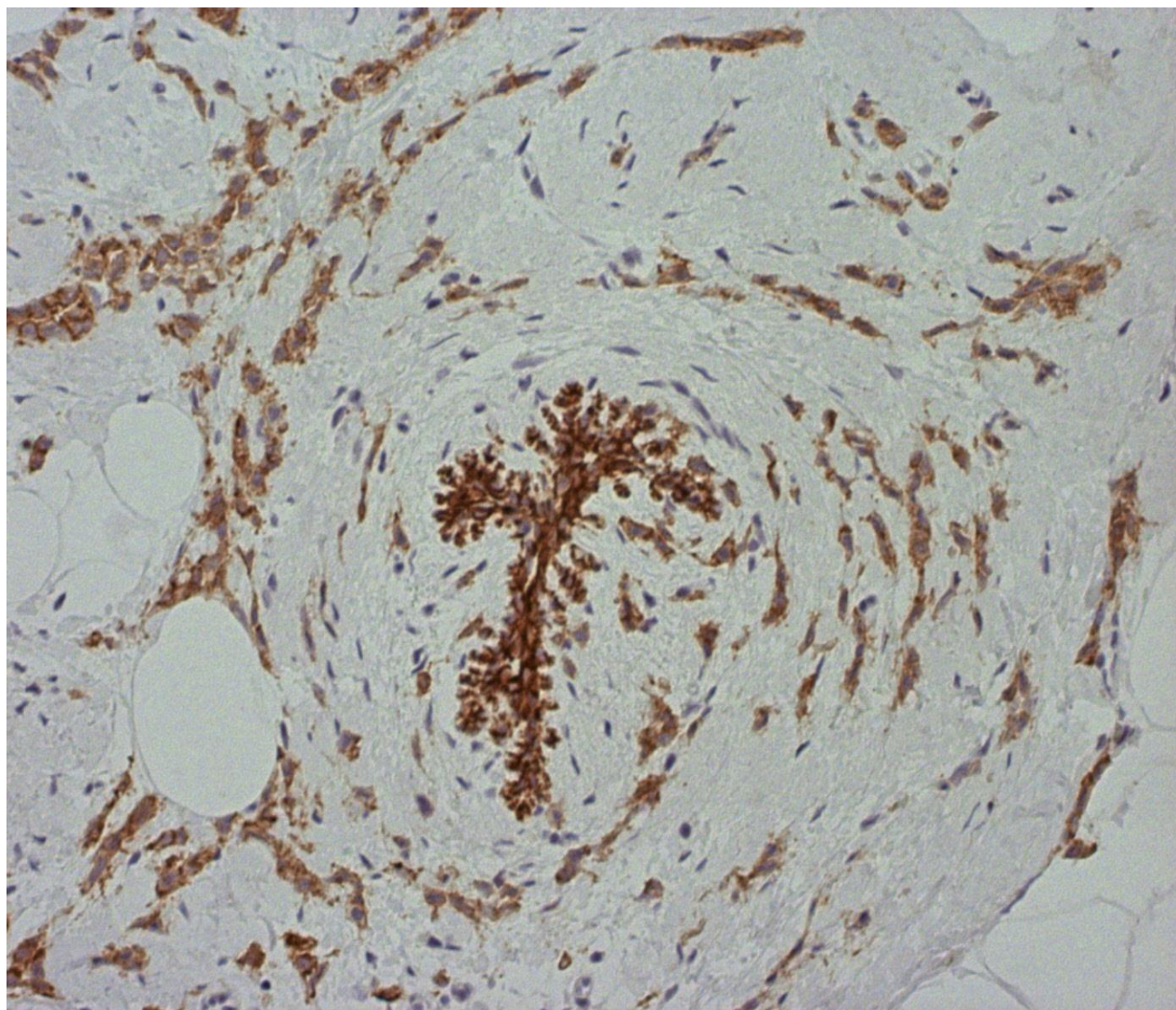
**Слика 3.** ECADx200-Мембранска позитивност епителних ћелија завршних дукталних структура атипичне дукталне хиперплазије.



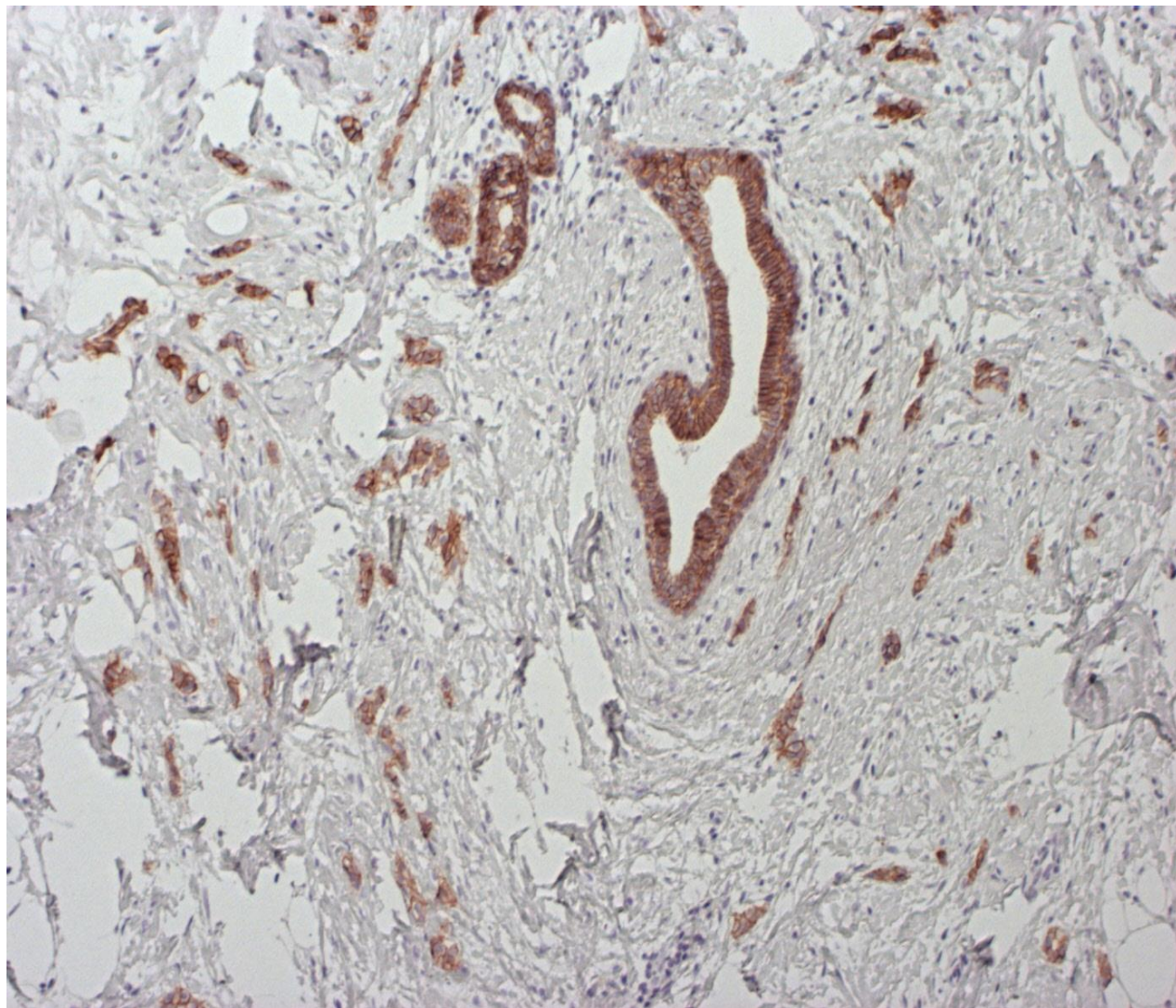
**Слика 4.** ESADx200-Наглашена имунореактивност ћелија код атипичне дукталне хиперплазије.



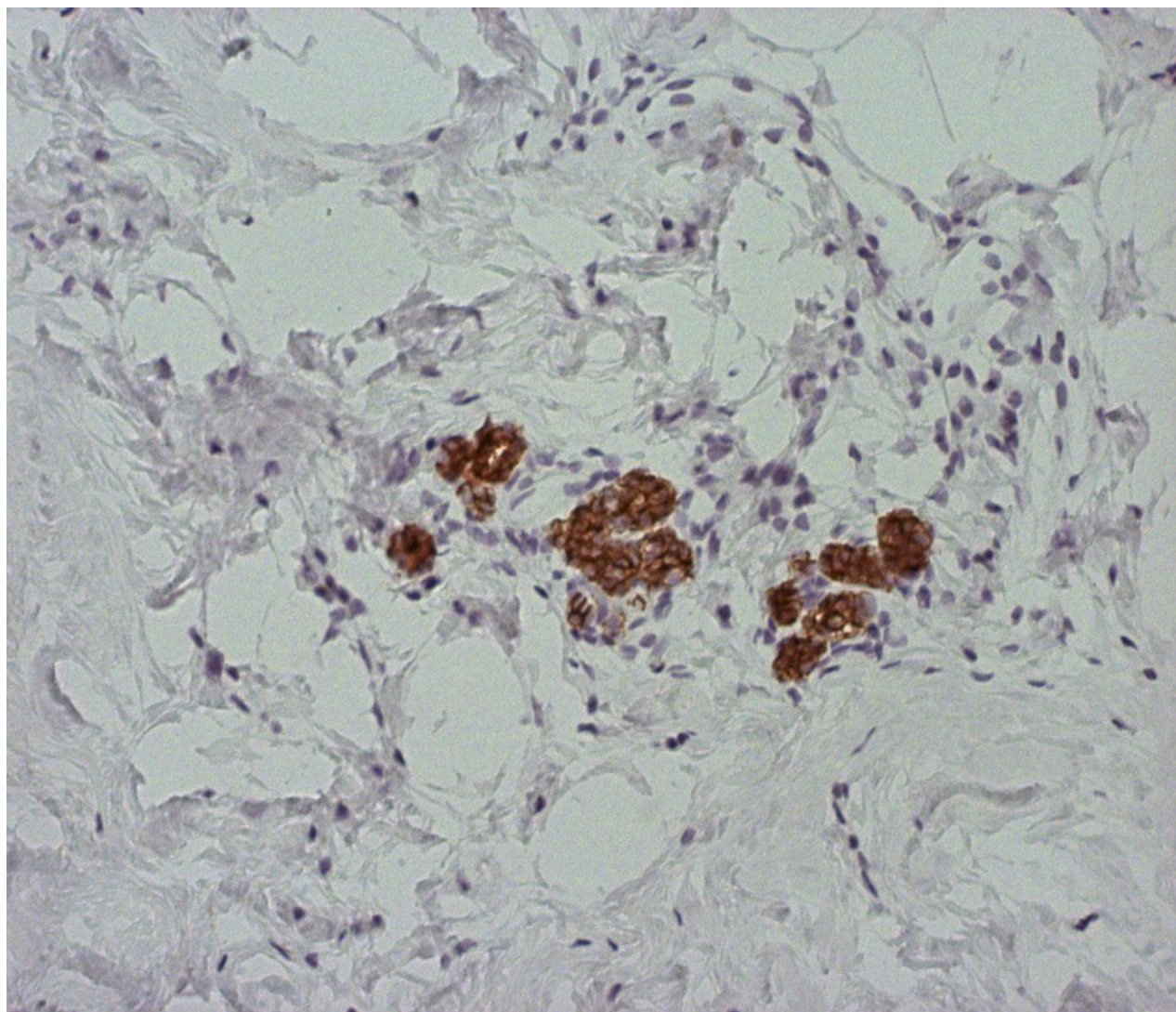
**Слика 5.** ESADx200-Имунопозитивност епителних ћелија дуктуса (унутрашња контрола), туморских ћелија *in situ* карцинома, трака и солидних поља туморских ћелија.



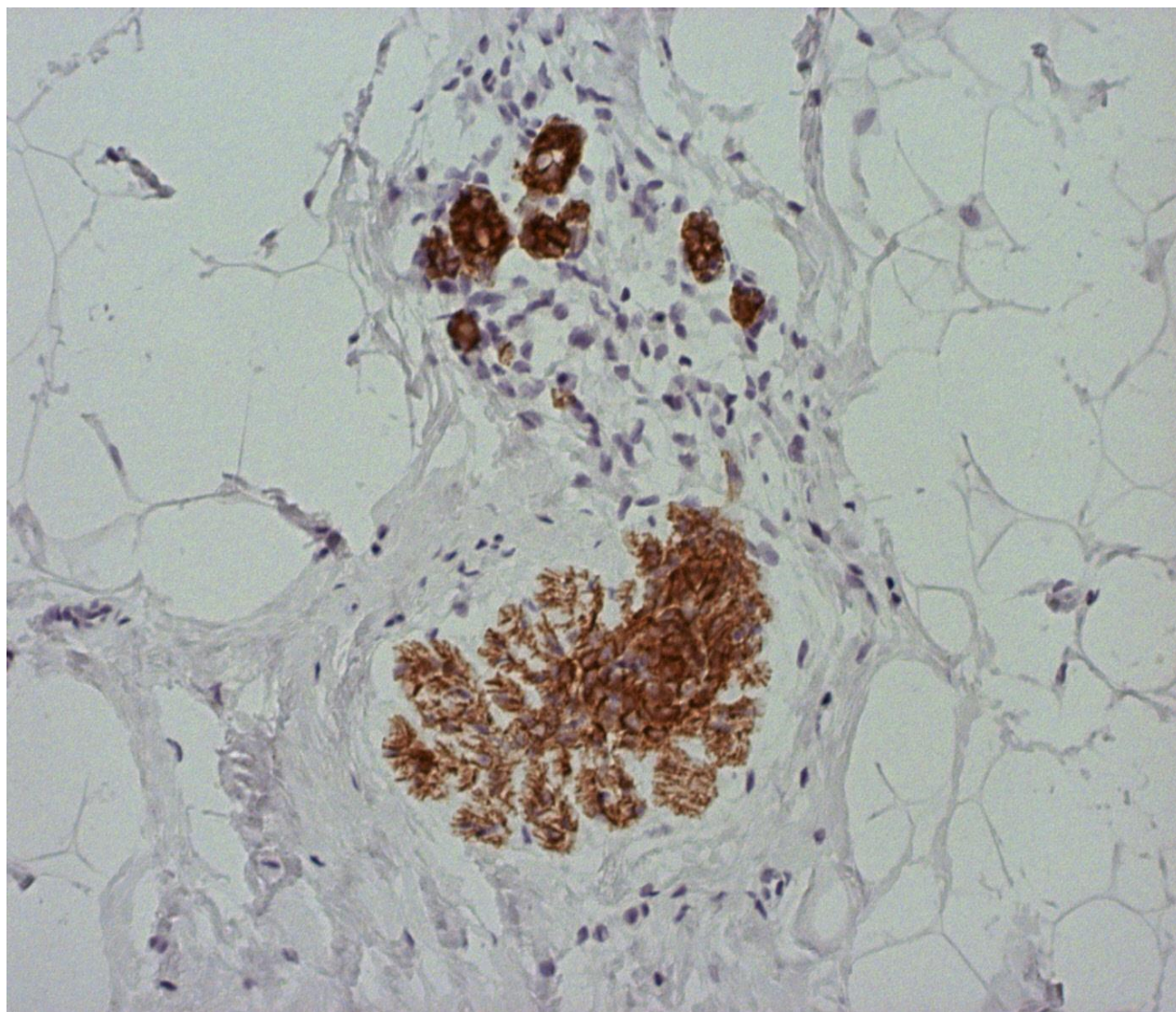
**Слика 6.** ECADx200- Континуирана и дисконтинуирана имунореактивност мембране туморских ћелија које формирају траке и колоне око дуктуса.



**Слика 7.** ECADx200- Континуирана и дисконтуирана имунореактивност мембране туморских ћелија које формирају траке и колоне око дуктуса.

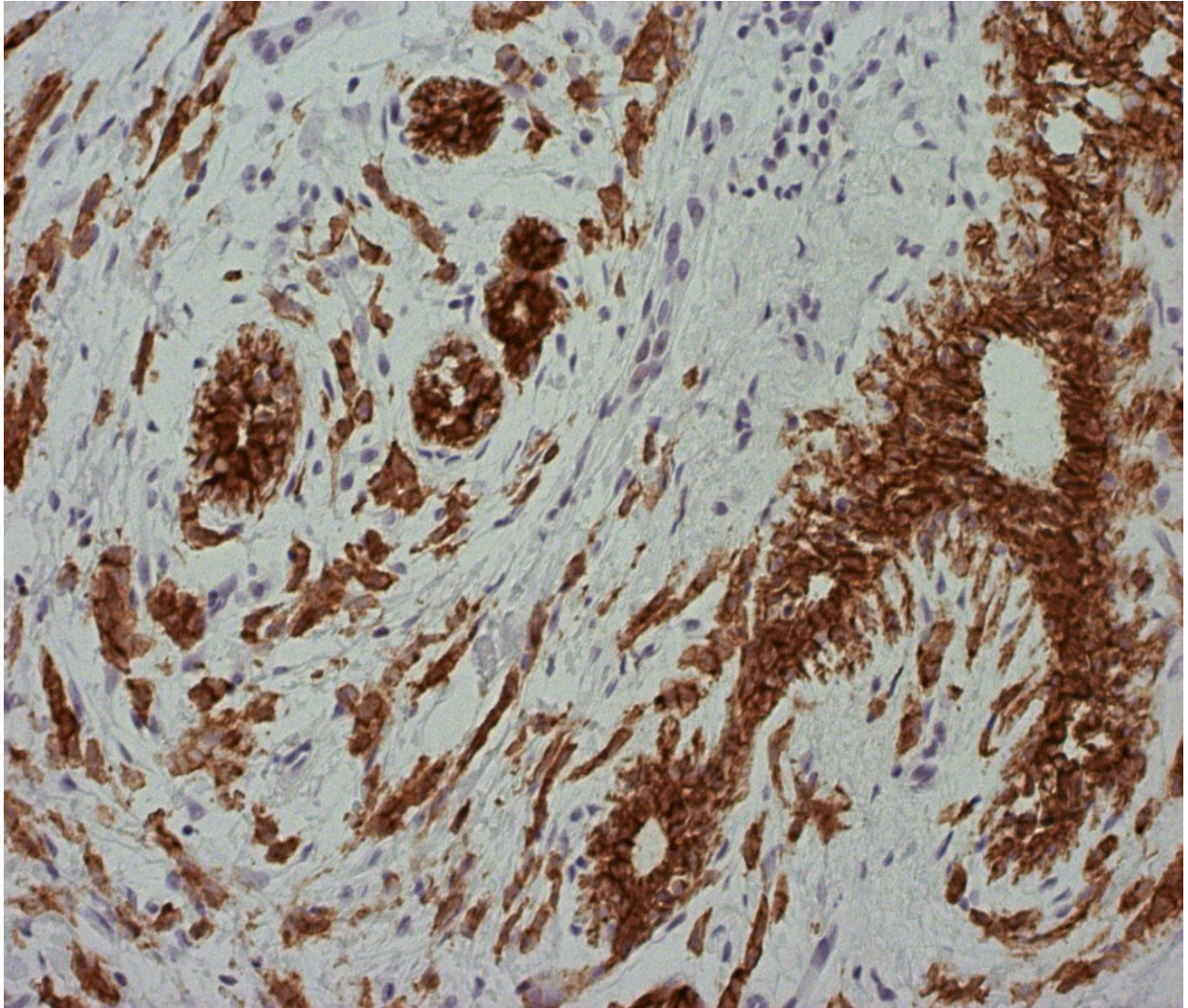


**Слика 8.** ECADx200-Тубуларне туморске формације чије туморске ћелије показују умерену мембранску позитивност.

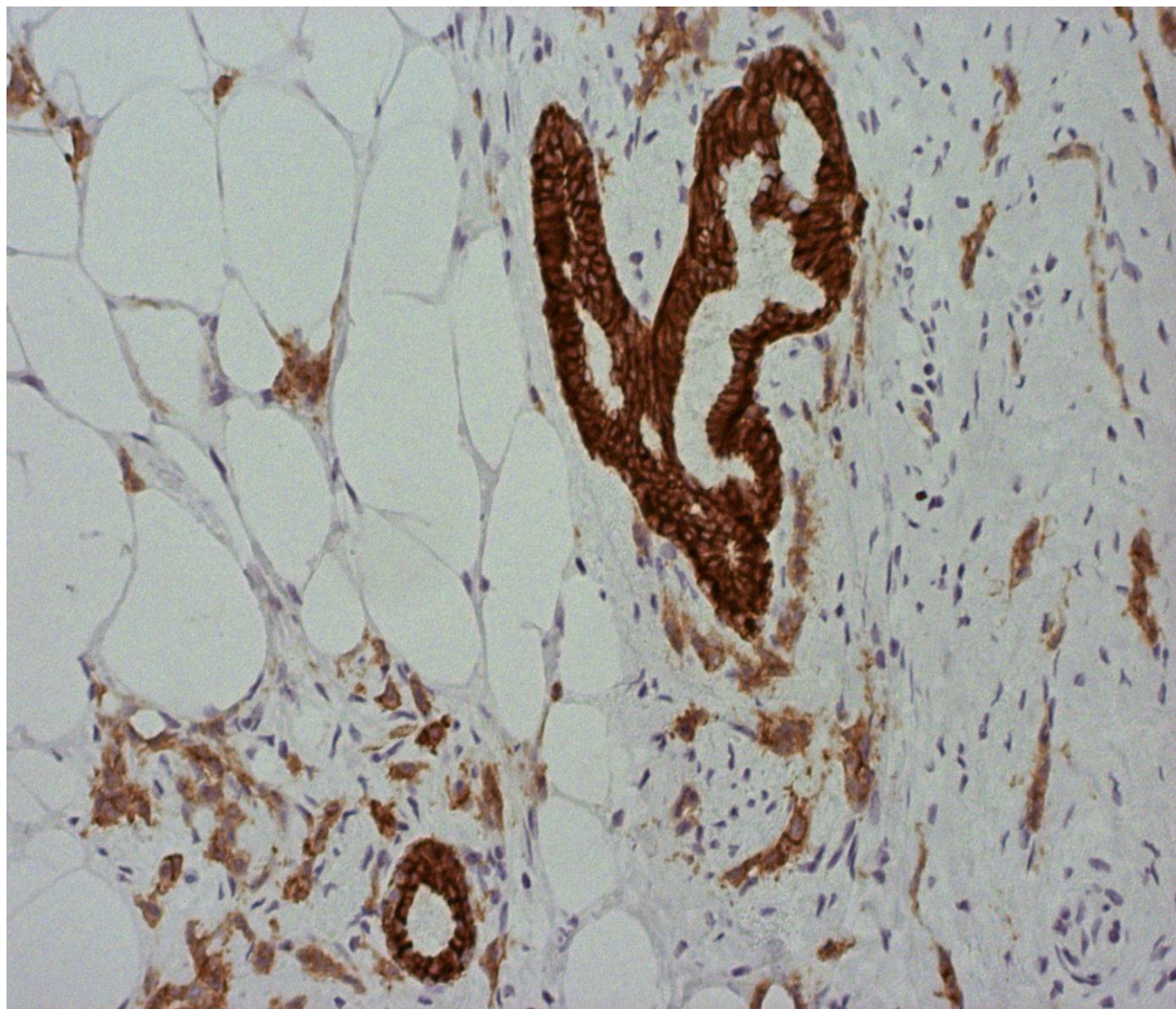


**Слика 9.** ECADx200-Тубуларне туморске формације чије туморске ћелије показују умерену мембранску позитивност.

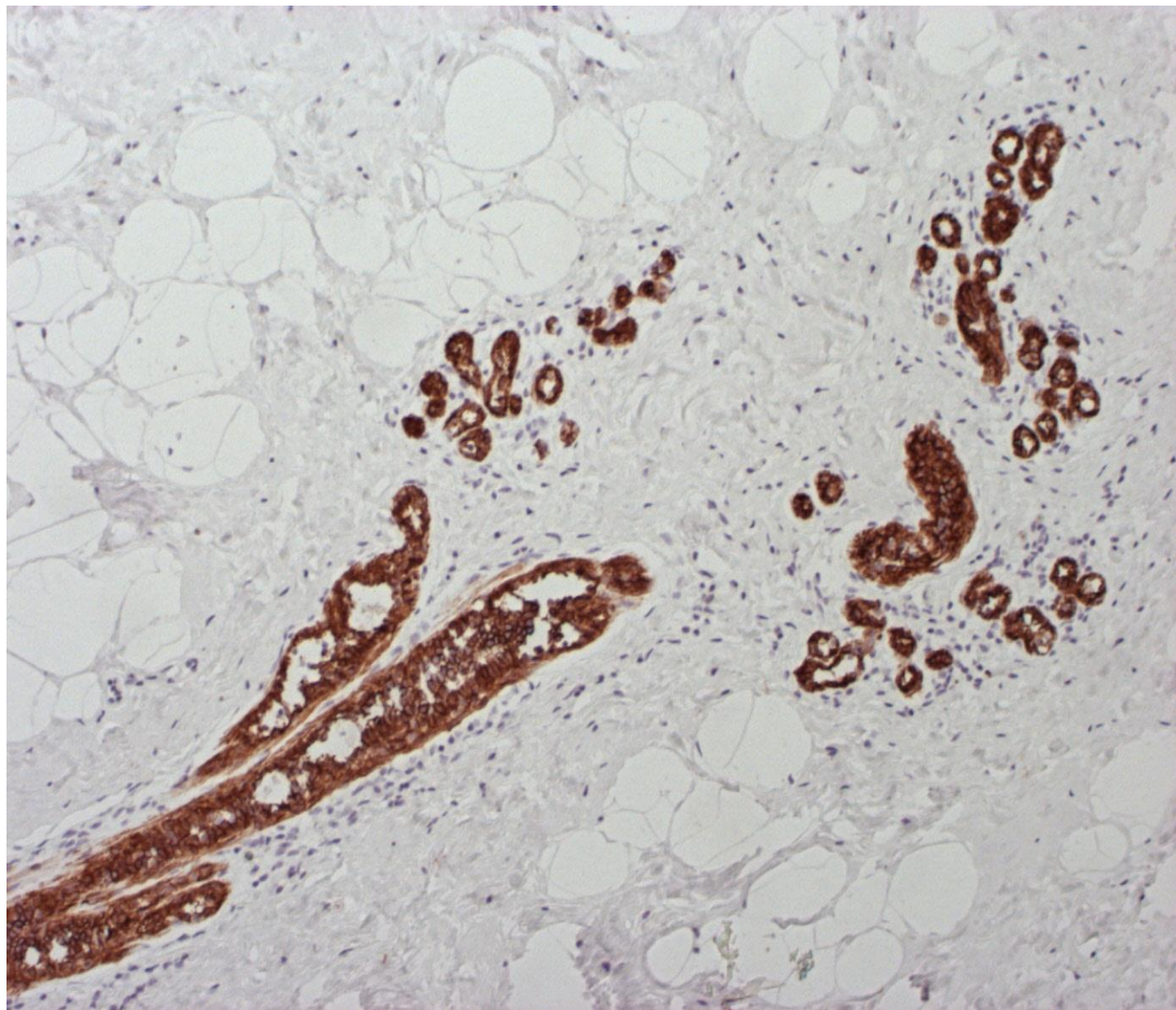




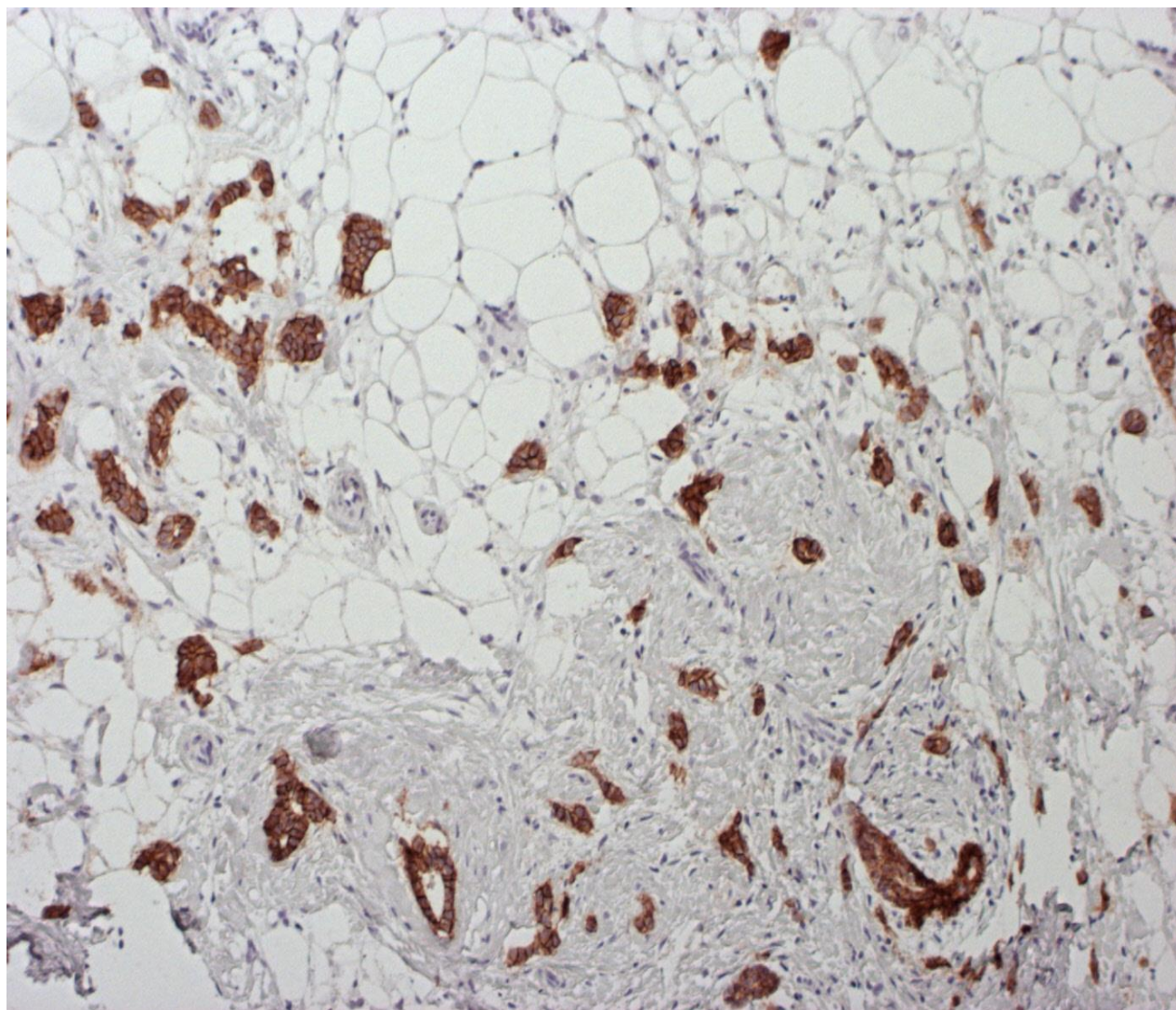
**Слика 10.** ESADx200- Дисконтуирана лака до умерена имунопозитивност мембране туморских ћелија које формирају траке, колоне и солидна поља око дуктуса и завршних каналића.



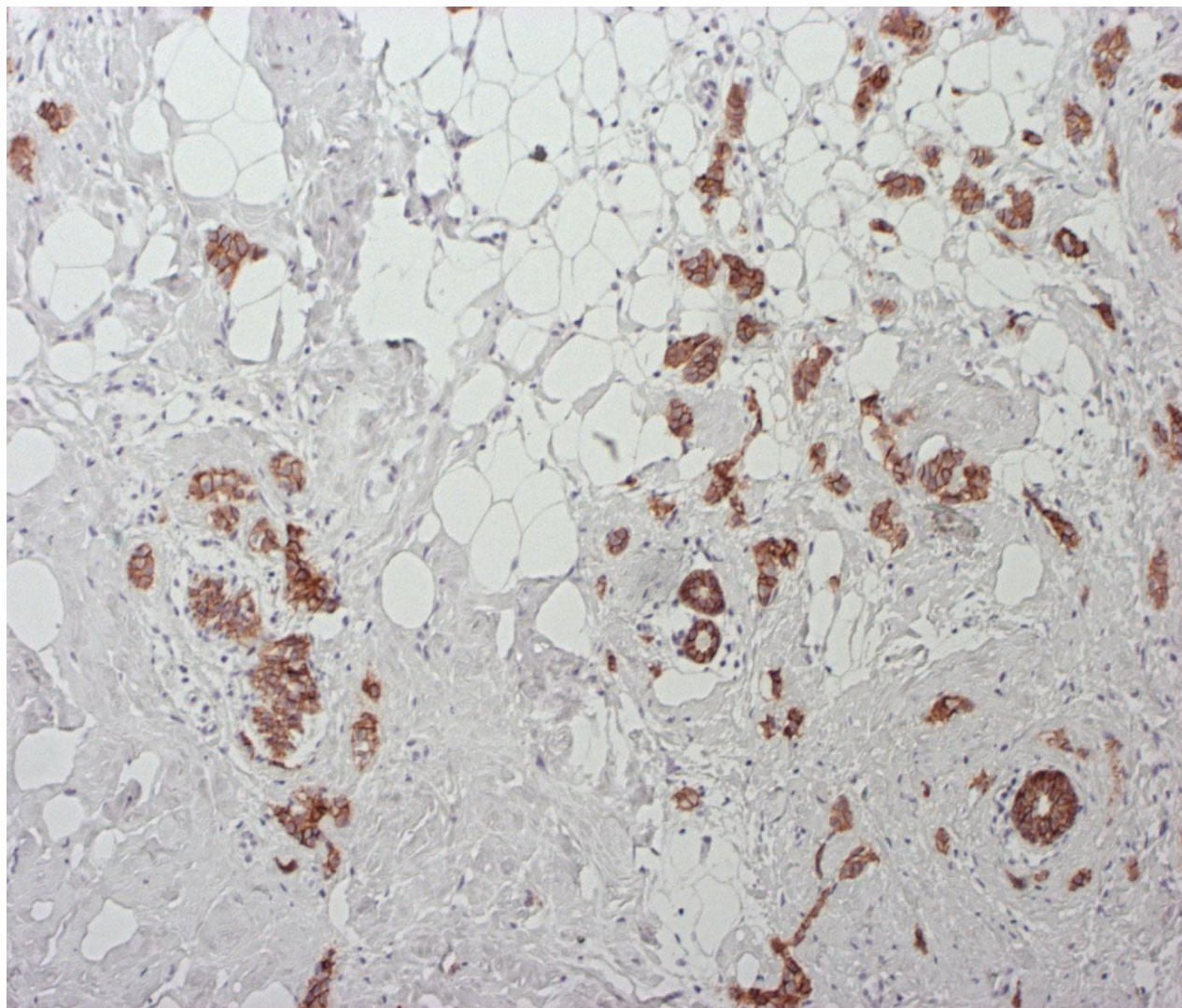
**Слика 11.** ESADx200- Дисконтурирана лака до умерена имунопозитивност мембране туморских ћелија које формирају траке, колоне и солидна поља око дуктуса и завршних каналића.



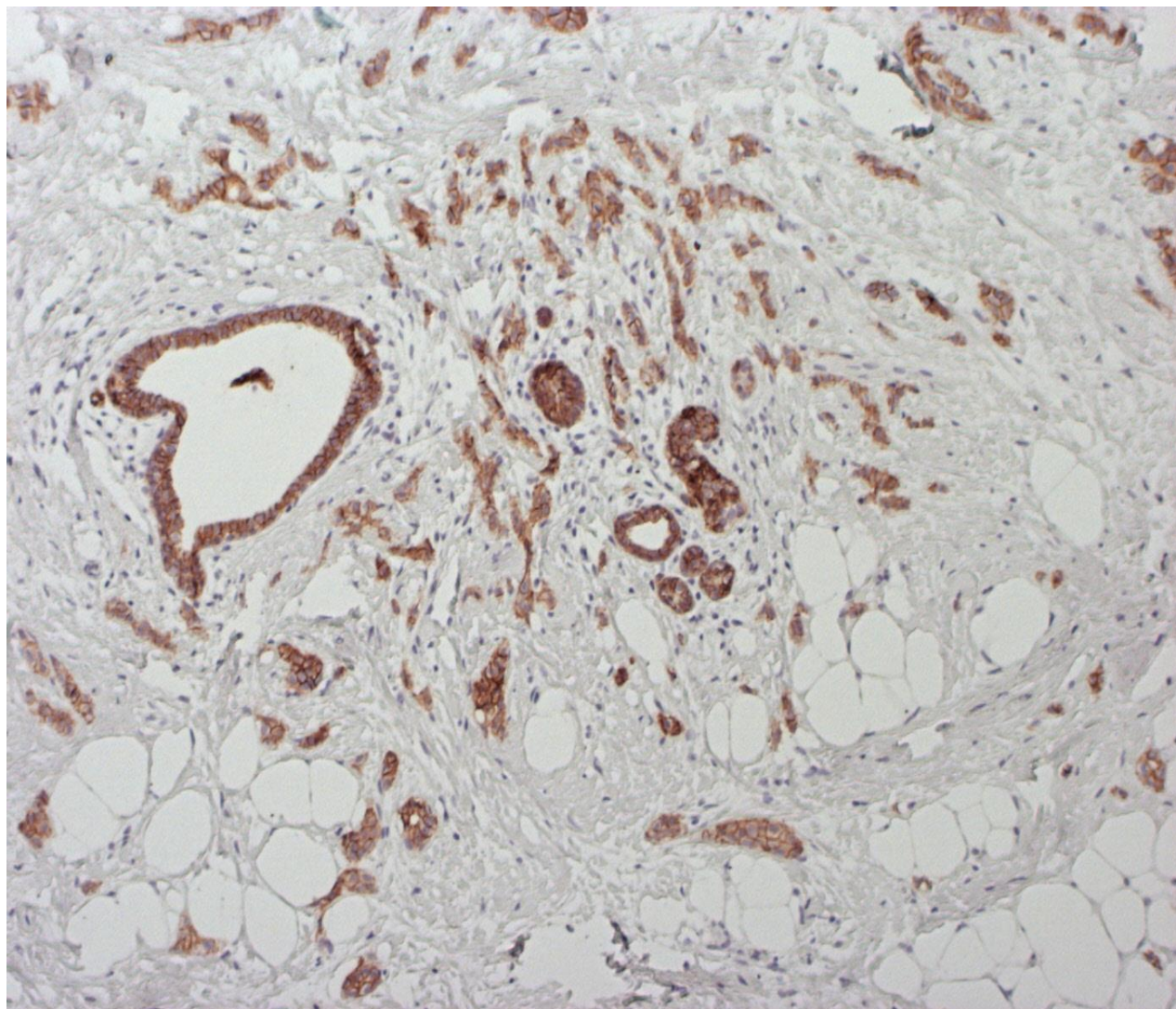
**Слика 12.** ESADx200- Дисконтинуирана лака до умерена имунопозитивност мембране туморских ћелија које формирају траке, колоне и солидна поља око дуктуса и завршних каналића.



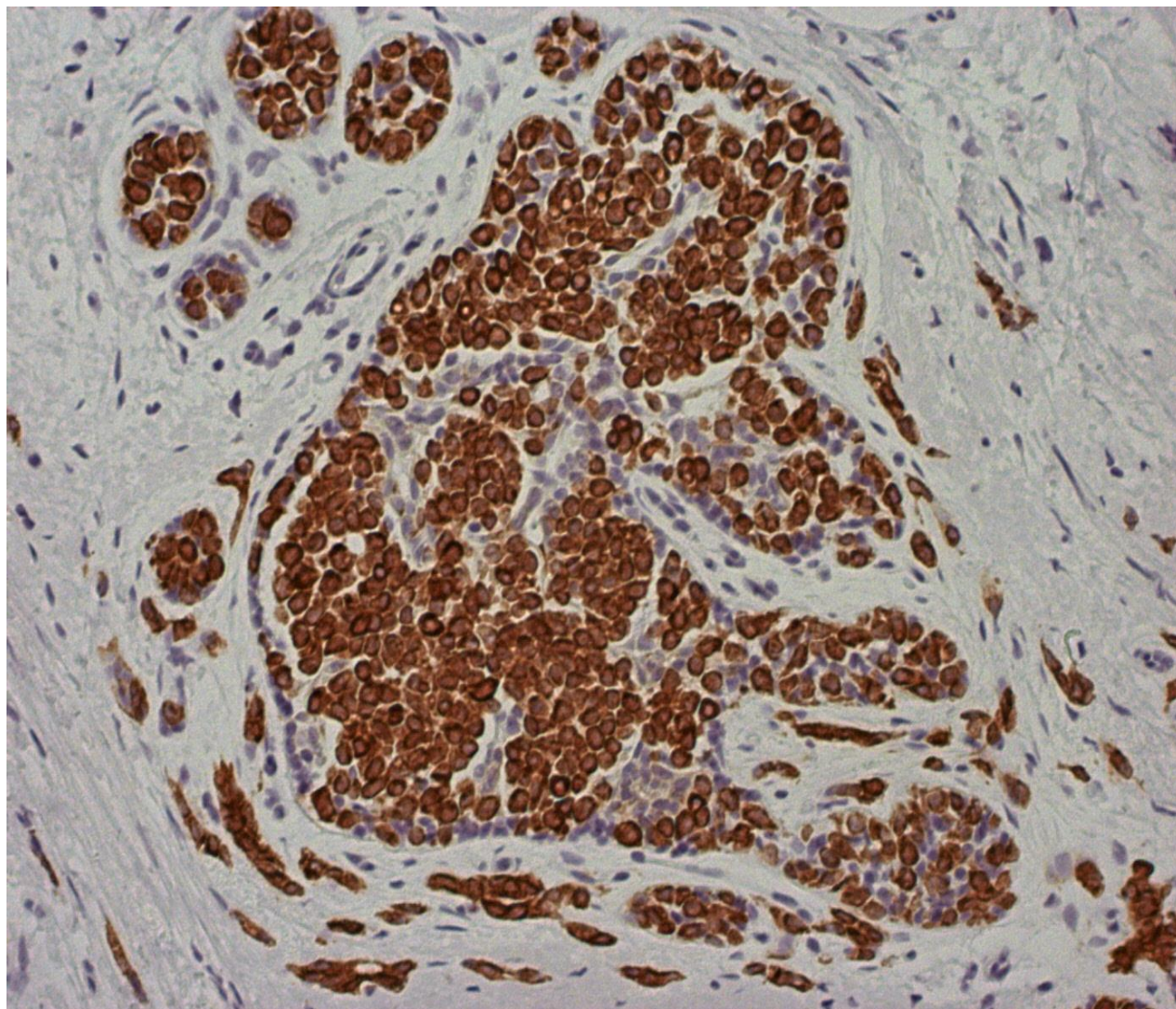
**Слика 13.** ECADx200- Тубуларне и солидне туморске формације чије туморске ћелије показују континуирану мембранску позитивност.



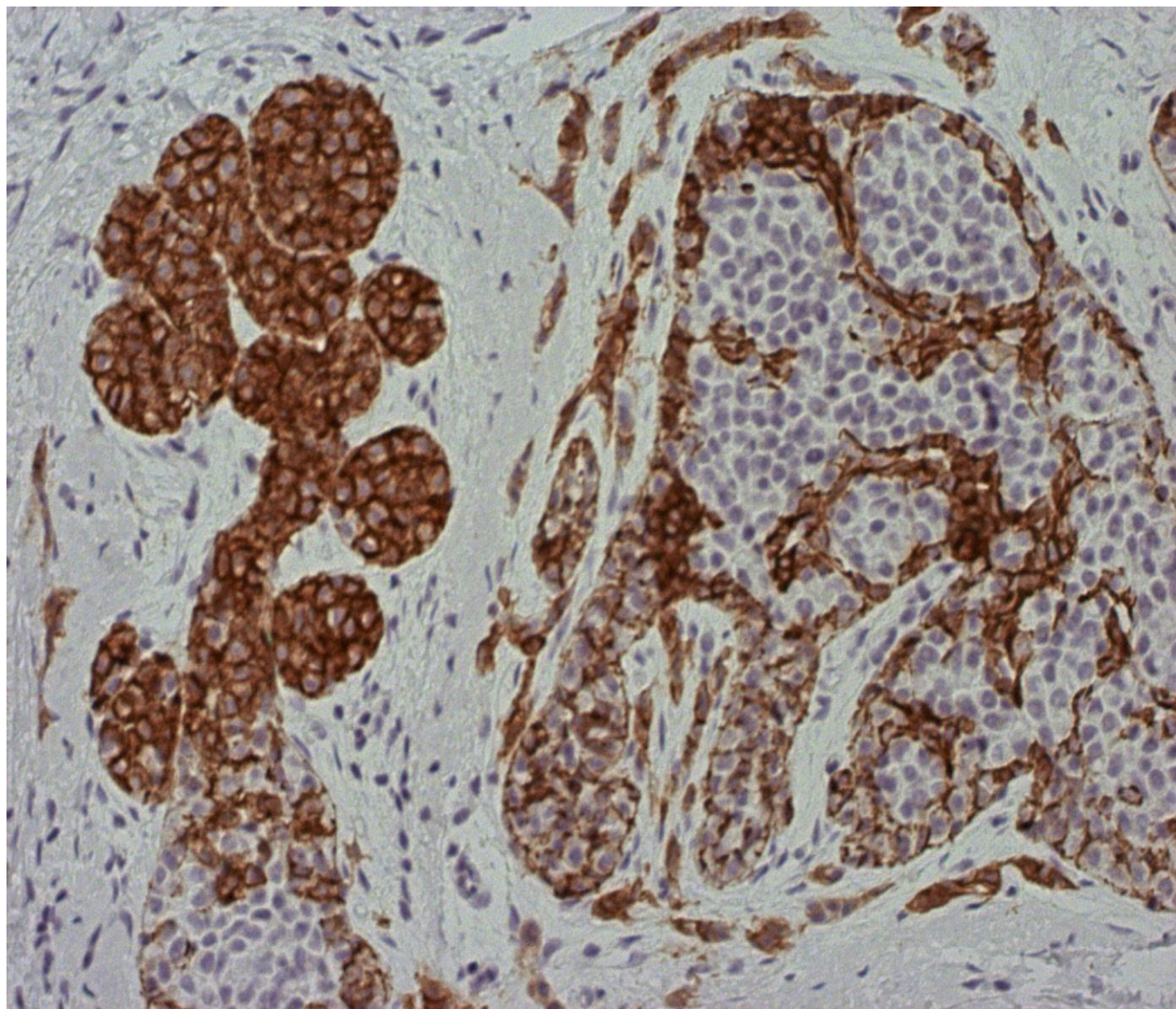
**Слика 14.** ECADx200- Тубуларне и солидне туморске формације чије туморске ћелије показују континуирану мембранску позитивност.



**Слика 15.** ECADx200- Тубуларне и солидне туморске формације чије туморске ћелије показују континуирану мембранску позитивност.

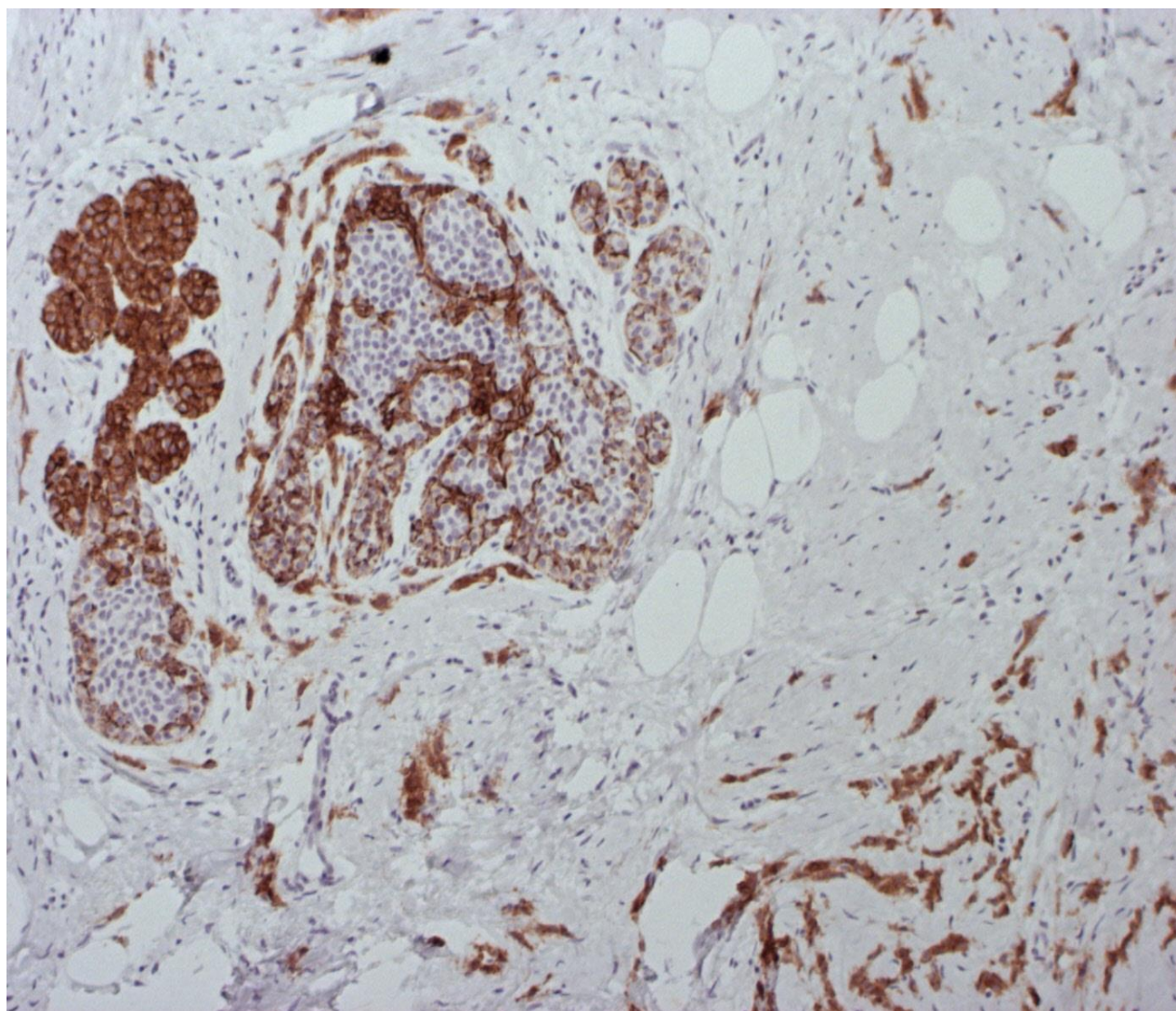


**Слика 16.** ESADx200- Тубуларне, тракасте и солидне туморске формације чије туморске ћелије показују интензивну мембранску имунореактивност.

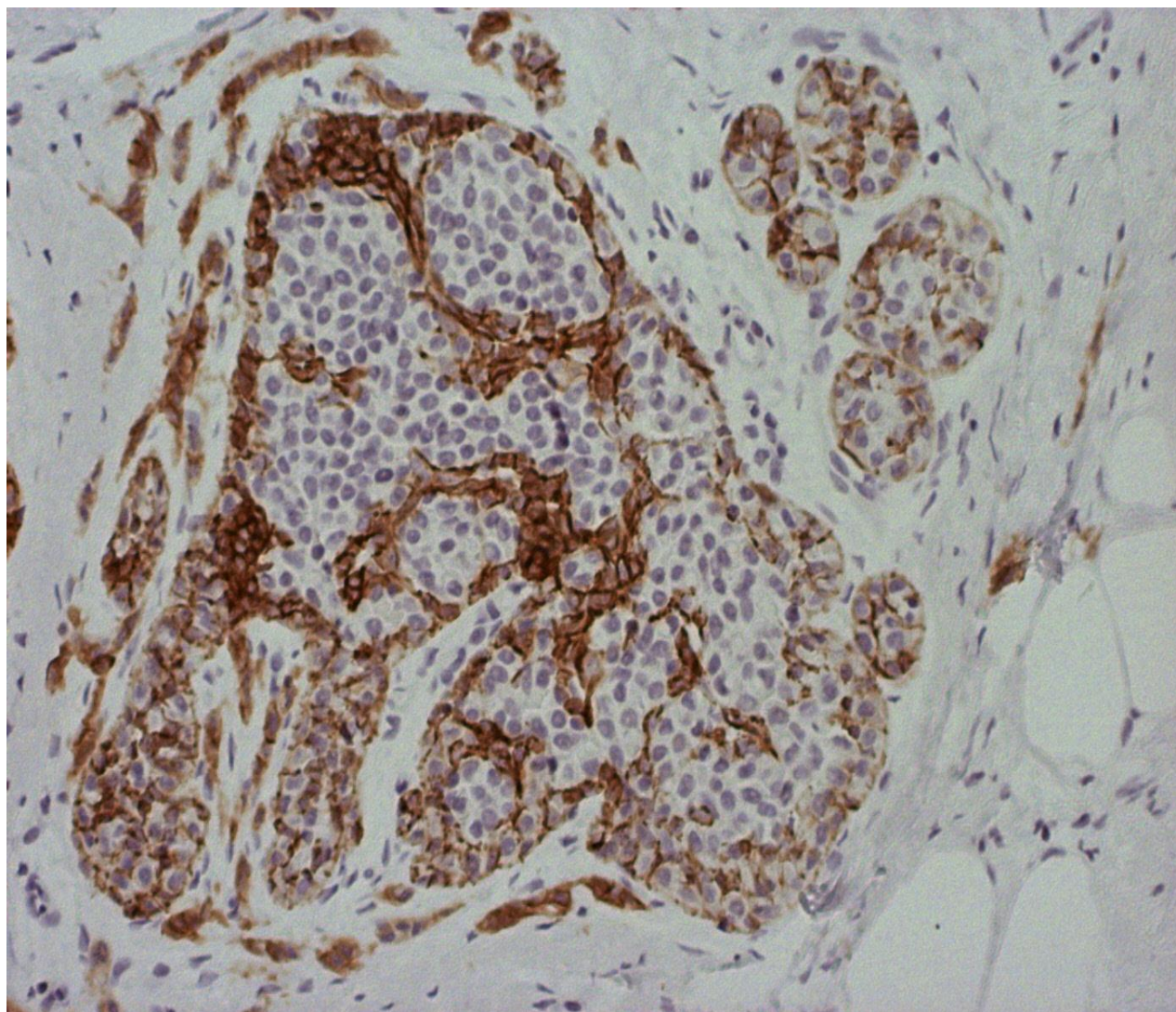


**Слика 17.** EHCADx200- Мембранска имунореактивност у фокусима *in situ* карцинома и солидним, тракастим туморским аранжманима.





**Слика 18.** EHCADx200- Мембранска имунореактивност у фокусима *in situ* карцинома и солидним, тракастим туморским аранжманима.



**Слика 19.** EHCADx100- Мембранска имунореактивност у фокусима *in situ* карцинома и солидним, тракастим туморским аранжманима.

Обзиром да су повишени нивои концентрације матрикс металопротеиназе (ММП-9) познати предиктори метастазирања рака дојке испитивали смо да ли постоји корелација између концентрације матрикс металопротеиназе и концентрације мамаглобина (hMAG) у ткиву. Користили смо Spearman-ову корелацију којом смо утврдили да не постоји међусобна зависност између концентрације матрикс металопротеиназе и концентрације мамаглобина у ткиву, тј. закључили смо да су они независни предиктори исхода болести код пацијената са раком дојке (кофицијент корелације 0,307,  $p=0,068$ ).

## 5. ДИСКУСИЈА

Мотив за нашу студију је била веома висока инциденца карцинома дојке, њен велики пораст током последњих година, као и веома велика смртност услед ове болести. Процењује се да се у свету сваке године дијагностикује преко 1 600 000 нових случајева са преко 500 000 смртних исхода. Стога је испитивање нових прогностичких маркера од круцијалног значаја (Weng и сар., 2014). Испитивањем нивоа hMGA mRNA у периферној крви пацијената са карциномом дојке долази се до податка о сензитивности од 38,2%, специфичности од 100,0%, позитивној предиктивној вредности (PPV) од 100,0%, и негативној предиктивној вредности (NPV) од 61,8% (Aristizábal-Pachón и сар., 2015). Светска литература последњих година обилује литературом која описује истраживања нивоа мамаглобина у серуму пацијената са карциномом дојке, али је врло мало радова који се баве испитивањем нивоа мамаглобина у туморском ткиву, док је најмање радова који се тичу испитивања нивоа мамаглобина у перитуморском ткиву. Уопште у светској литератури испитивање перитуморског ткива је релативно новијег датума, јер су недавна истраживања потврдила значајну улогу перитуморског ткива у процесима настанка и развоја тумора у којима перитуморско ткиво има веома значајну модулишућу улогу (Lareire и сар., 2014). Наш циљ је био да анализирамо генску и протеинску експресију мамаглобина у узорцима туморског и перитуморског ткива пацијената са раком дојке, даље, да докажемо да испитивани нивои имају предиктивну вредност која може бити од користи клиничарима у избору одговарајућег модалитета онколошког лечења. Такође, успели смо да дефинишемо конкретне вредности ових параметара у туморском и перитуморском ткиву пацијената са раком дојке који имају прогностичку вредност у процени исхода болести. Циљ модерне онколошке терапије је индивидуализација (персонификација) терапијског режима, који би, како му и само име каже, био оптималан, тј. најбољи могући за конкретног пацијента (Trifiletti и сар, 2017). Ова студија даје допринос истраживању персонализоване терапије у том смислу што анализира потенцијалну корелацију између експресије мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву и одређених клиничко патолошких особина које су карактеристичне за сваког пацијента понаособ. Даље, успели смо да дефинишемо конкретне вредности нивоа мамаглобина (тзв. cut-off вредности) у туморском и

перитуморском ткиву пацијената са карциномом дојке које имају статистички доказану предиктивну вредност када су у питању параметри као што је појава релапса болести, удаљених и лимфонодалних метастаза, што су круцијални прогностички параметри који дефинишу даљи ток и исход болести код ових пацијената (Tseng и сар., 2013).

Према литературним подацима серумске концентрације мамаглобина код пацијената са карциномом дојке су се кретале од 0,07 до 9,6 ng/ml у поређењу са 0 до 0,07 ng/ml код контролне групе здравих особа (Fanger и сар, 2002). Наше истраживање указује да нема статистички значајне разлике у концентрацији мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву одређеној ELISA тестом, тј. перитуморско ткиво секретује мамаглобин у готово истој концентрацији као и сам тумор, а што је значајно више од вредности које литературни подаци наводе за здраве особе. Ми смо добили вредности од 2,4 ng/ml до 3,8 ng/ml, што је свакако значајно више од дијапазона 0 до 0,07 ng/ml, који срећемо у серуму здравих особа, што јасно говори у прилог предиктивној вредности одређивања ткивних концентрација мамаглобина ELISA тестом у туморском и перитуморском ткиву. Још један веома значајан заључак који се из овога може извести је и тврдња да перитуморско ткиво има особине сасвим различите од здравог ткива дојке, јер иако на патохистолошком препарату имају исте особине перитуморско ткиво има другачије молекуларне карактеристике, тј. лучи мамаглобин у знатно вишим концентрацијама од ткива дојке особа које немају карцином, што може имати предиктивну вредност.

Литературни подаци по питању серумске концентрације мамаглобина су често контрадикторни. Тако *Zehentner ca cap.* наводи да подаци добијени ELISA тестом на пацијентима у различитим стадијумима карцинома дојке као и здравих особа показују да ниво мамаглобина није завистан од стадијума болести. ROC крива је конструисана за случајеве када је cutoff вредност била 1,71 ng/ml; тест је сматран позитивним када је вредност мамаглобина била изнад наведене вредности (Zehentner и сар, 2004).

За разлику од горе наведених података *Bernstein JL ca cap.* наводи да су пацијенти у стадијумима од I до III имали вредности мамаглобина од 0,9 до 1,4 ng/ml док су у стадијуму IV имали чак 2,3 ng/ml. Пронађена је јака позитивна корелација између нивоа мамаглобина и величине тумора; пацијенти са туморима већег дијаметра су имали веће серумске концентрације мамаглобина (Bernstein и сар., 2005). Наши резултати су у складу

са последњим наведеним литературним подацима. Ми смо такође констатовали градацијски пораст нивоа мамаглобина како у туморском тако и у перитуморском ткиву пацијаната са карциномом дојке са порастом величине тумора. Наши резултати се разликују од поменутих који се тичу серумских концентрација, док смо ми проучавали концентрације мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву тако да смо добили концентрације преко 2,6 ng/ml у стадијуму Т1 до 3,8 ng/ml у стадијуму Т3. Вредности у перитуморском ткиву су биле незнатно ниже од оних у туморском и кретале су се од 2,4 ng/ml у Т1 до 3,6 ng/ml у Т3 стадијуму болести. Претрагом доступних база података нисмо нашли слична испитивања која се тичу концентрације мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву са којима би смо могли да направимо поређење. Према нашим сазнањима ово је прва студија ове врсте која се бавила одређивањем ткивних концентрација мамаглобина.

Наши резултати су показали да постоји градацијски пораст протеинске експресије мамаглобина, како у туморском, тако и у перитуморском ткиву, са порастом вероватноће јављања лимфонодалних метастаза у пазушној јами. Добили смо вредности у опсегу 2,3 ng/ml до 3,7 ng/ml у перитуморском ткиву и 2,6 ng/ml до 3,8 ng/ml у туморском ткиву, када су у питању N0 и N2 стадијуми болести, респективно. Ове разлике су статистички значајне што говори у прилог предиктивном значају одређивања ткивних концентрација мамаглобина када је у питању захваћеност регионалних лимфних нодуса. Ови резултати се слажу са подацима које смо нашли у литератури. Тако *Liu Y. са сар.* наводе статистички значајно више концентрације мамаглобина код пацијената са позитивним лимфним нодусима у пазушној јами, шта више, што је више нодуса захваћено, виша је и експресија мамаглобина (Liu и сар., 2006).

Средња вредност серумске концентрације мамаглобина код пацијената са метастатским карциномом дојке је била 9,38 ng/ml (7,9 ng/ml у контролној групи здравих особа); вредност од 8,8 ng/ml cutoff је установљена као граница изнад које су узорци сматрани позитивним. Сензитивност је достигала 68% а специфичност 88,8%. Резултати се могу минимално разликовати јер су у различитим студијама коришћена различита антитела за извођење тестова (Zehentner и сар, 2004). Наши резултати су показали да је средња вредност мамаглобина одређеног протеинском експресијом код пацијаната са метастатском

болешћу била у распону од 2,4 ng/ml до 3,75 ng/ml у перитуморском, односно 2,55 ng/ml до 3,8 ng/ml у туморском ткиву. Наше истраживање показује да одређивање протеинске експресије ELISA тестом како у туморском, тако и у перитуморском ткиву има јасну предиктивну вредност када је у питању појава удаљених метастаза код пацијената са карциномом дојке. Отишли смо и корак даље, те смо дефинисали и конкретне cutoff вредности концентрације мамаглобина које са високим степеном вероватноће указују на ризик од појаве удаљених метастаза. Та вредност је за перитуморско ткиво била 0,6704221 ng/ml, а за туморско ткиво 0,5784426 ng/ml. Претрагом доступне литературе нисмо нашли податке које смо могли користити за поређење, што говори у прилог актуелности нашег истраживања.

Када је у питању градус тумора наше истраживање је указало на јасан градацијски пораст протеинске експресије мамаглобина, како у туморском тако и у перитуморском ткиву са порастом градуса тумора. Овакав налаз је логичан када се узме у обзир да су тумори вишег градуса лоше диферентовани и биолошки су агресивнији, тако и у овом случају високе концентрације мамаглобина могу указати на склоност ових тумора ка метастазирању у удаљене органе као што је напред наведено, што још једном говори у прилог предиктивној вредности одређивања протеинске експресије мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке. Слични резултати се могу наћи у малобројним радовима који су анализирали експресију мамаглобина у туморском ткиву карцинома дојке имунохистохемијском методом, док смо ми одређивали протеинску и генску експресију и то не само у туморском већ и у перитуморском ткиву. **Rehman F. са сар.** су такође приметили пораст концентрације мамаглобина у ткиву карцинома са порастом градуса тумора и величине тумора (Rehman и сар., 2010).

Када је у питању корелација између протеинске експресије мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке и хистолошког типа тумора, наши резултати указују да је експресија виша код дукталног хистолошког типа карцинома, него код лобуларног и осталих ређих типова рака дојке. У литератури се могу наћи различити и контрадикторни резултати. Тако, **Watson и Nunez-Villar** нису нашли статистички значајну разлику у експресији мамаглобина у зависности од хистолошког типа

рака дојке (Nunez-Villar и сар., 2003) (Watson и Fleming, 1996). Са друге стране има и студија које су као и наша студија утврдиле повишену протеинску експресију код дукталног карцинома дојке у односу на остале хистолошке типове (Rehman и сар., 2010). Ово је у супротности са студијом спроведеном од стране *Bhargava са сар.* код којих је инфилтративни лобуларни карцином показивао највишу експресију мамаглобина (Bhargawa и сар., 2007).

Нисмо показали корелацију измеђи хормоског статуса (ER и PR) и HER2 са једне стране и протеинске експресије мамаглобина са друге. У литератури се срећу различити подаци по том питању. Тако да *O'Brien. са сар.* наводи да је присуство мамаглобина код пацијената са ER и PR позитивним карциномима дојке добар прогностички параметар (O'Brien и сар., 2015).

*Guan са сар.* показују да је присуство и генске и протеинске експресије мамаглобина удружено са ER позитивношћу (Guan и сар., 2003).

Нисмо показали добну зависност у експресији мамаглобина код пацијената са карциномом дојке, што су резултати конзистентни са литературним (Liu и сар., 2012). Закључак који се јасно намеће из наше студије је да се протеинска експресија мамаглобина како у туморском тако и у перитуморском ткиву може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке. Дефинисали смо конкретне вредности концентрације мамаглобина како за туморско ткиво, тако и за перитуморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације болести. На тај начин прецизно дефинишемо групу пацијената која је под повишеним ризиком за развој системске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана. За перитуморско ткиво гранична вредност протеинске експресије мамаглобина одређана ЕЛИСА тестом је 0,6704221 ng/ml, док је за туморско ткиво та вредност 0,5784426 ng/ml.

Поред протеинске експресије у нашој студији је одређивана и генска експресија мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву пацијаната са карциномом дојке и између ових налаза постоје разлике, поготово када је у питању перитуморско ткиво. Резултати добијени генском експресијом свакако показују исте трендове као и они добијени протеинском експресијом, али се квантитативно разликују, што је чињеница која је позната

и описана у литератури (O'Brien и сар., 2015). Сличан феномен је примећен и код других врста карцинома. Тако *Chen G ca cap.* су показали да само око 21% резултата добијених генским испитивањем корелира са протеинском експресијом када су у питању узорци аденокарцинома плућа (Chen и сар., 2002).

Вероватни разлози су добро познати феномени посттранскрипционе и посттранслационе регулације и модификације, тако да иако је ген експримиран, не мора да значи да ће његов финални продукт-протеин бити функционалан и детектабилан (Wei и сар., 2015). (Vasudevan и сар., 2015).

Када је у питању корелација између генске експресије мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву код пацијената са карциномом дојке, наша студија показује јасно градијентско, статистички значајно повећање генске експресије мамаглобина са порастом величине тумора. Исти тренд постоји и у туморском и у перитуморском ткиву, мада је у перитуморском ткиву нешто мање изражен. У туморском ткиву вредности концентracије мамаглобина добијене генском експресијом се крећу од 1,5 ng/ml у T1 стадијуму до 7,4 ng/ml у T3 стадијуму, док су у перитуморском ткиву те вредности знатно ниже и крећу се од 0,9 ng/ml у T1 стадијуму до 1,7 ng/ml у T3 стадијуму. Резултати су конзистентни са онима добијеним протеинском експресијом и слажу се са онима који се могу наћи у литератури.

Генска експресија мамаглобина показује корелацију са статусом пазушних лимфних нодуса, што је тренд присутан и у случају одређивања протеинске експресије. Апсолутне вредности концентрације мамаглобина одређиване генском експресијом су статистички значајно ниже у перитуморском него у туморском ткиву и крећу се од 0,1 ng/ml у N0 до 0,4 ng/ml у N2 стадијуму болести, док се вредности у туморском ткиву крећу од 1,9 ng/ml у N0 до 5,6 ng/ml у N2 стадијуму. Ови наши подаци се слажу са литературним подацима (Zehentner и сар., 2002). *Marchetti A ca cap.* наводи да је мамаглобин један од најсензитивнијих и најспецифичнијих маркера за детекцију микрометастаза у лимфним нодусима пазушне јаме (Marchetti и сар., 2001).

Концентрација мамаглобина добијена генском експресијом је статистички значајно повишена код пацијената са присутним метастазама у туморском ткиву, али није повишена у перитуморском ткиву. У перитуморском ткиву она је реда величина око 0,3 ng/ml у M0 до 0,5 ng/ml у M1, док се у туморском ткиву те вредности крећу од 2,0 ng/ml у M0 до 5,5 ng/ml



у М1 стадијуму болести. У 12% случајева М статус није био дефинисан тако да су ови пацијенти изузети из анализе.

Студија спроведена од стране *Span et al.* је показала да је повишена генска експресија мамаглобина код пацијената са карциномом дојке независно повезана са дужим периодом без релапса болести. Ова корелација је посебно изражена код пацијената који су примали Тамохифен у терапији, што говори о повезаности са хормонским статусом тумора. Стога, генска експресија мамаглобина се може сматрати добрим и прогностички и предиктивним маркером када је у питању карцином дојке (Span et al., 2004). Са друге стране многи аутори наводе да у својим студијама нису нашли статистички значајну повезаност између нивоа генске експресије мамаглобина и хормонског статуса (Marques et al., 2009) (Fortunato et al., 2009).

Наши резултати се слажу са горе наведеним. Супротно наведеним резултатима, група из Кореје је пронашла статистички значајну корелацију између нивоа мамаглобина у периферној крви и ER и PR статуса пацијената, али не и када је HER2 статус у питању (Lee et al., 2012).

Наша студија указује да је генска експресија значајно виша у туморском него у перитуморском ткиву, као и да је статистички значајно виша када је у питању дуктални у односу на лобуларни и остале хистолошке типове карцинома дојке. Такви налази су у сагласности са литературним (Al Joudi et al., 2014).

Из наше студије се закључује да се генска експресија мамаглобина само у туморском ткиву може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке, али не и генска експресија у перитуморском ткиву. Дефинисали смо конкретне вредности генске експресије мамаглобина за туморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације болести. На тај начин се може издвојити група пацијената под повишеним ризиком за развој метастатске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана. За туморско ткиво гранична вредност генске експресије мамаглобина одређана RT-qPCR је 1.003ng/ml за сензитивност 0.73 и специфичност 0.76.

E-Cadherin се према нашем истраживању статистички значајно чешће јавља код пацијената са дукталним типом карцинома дојке у односу на лобуларни тип. Нисмо демонстрирали прогностичку вредност имунохистохемијски одређиваног E-Cadherin-a, као ни корелацију са протеинском концентрацијом и генском експресијом мамаглобина А код пацијената са карциномом дојке. Научне студије указују да је ниска експресија E-Cadherin-a, када је у питању дуктални инвазивни карцином дојке, значајно повезана са лошијом прогнозом у смислу OS (Overall Survival) и DFS (Disease Free Survival) (Li и сар., 2017).

## 6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

- Протеинска експресија мамаглобина како у туморском тако и у перитуморском ткиву се може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке
- Дефинисали смо конкретне граничне вредности концентрације мамаглобина како за туморско, тако и за перитуморско ткиво, изнад којих се са великом вероватноћом може претпоставити да ће доћи до метастатске дисеминације болести.
- За перитуморско ткиво гранична концентрација мамаглобина одређена ЕЛИСА тестом је 0,6704221 ng/ml, док је за туморско ткиво та вредност 0,5784426 ng/ml.
- Генска експресија мамаглобина се може користити као прогностички маркер хематогене дисеминације рака дојке само када је у питању туморско, али не и када је у питању перитуморско ткиво.
- За туморско ткиво гранична вредност генске експресије мамаглобина одређана RT-qPCR је 1.003ng/ml.
- Анализом мамаглобина у туморском и перитуморском ткиву из веома хетерогене групе пацијената са карциномом дојке дефинишемо оне који су под повишеним ризиком за развој системске болести, те код њих саветујемо примену агресивног адјувантног онколошког третмана у циљу превенције развоја системске болести.
- Одређивање ткивних нивоа мамаглобина код пацијената са карциномом дојке може бити корак у индивидуализацији терапије, која ће бити оптимална за сваког пацијента понаособ.
- Хумани мамаглобин представља значајан прогностички маркер развоја системске болести када је у питању рак дојке.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Al Joudi FS. Human mammaglobin in breast cancer: a brief review of its clinical utility. *Indian J Med Res.* 2014;139(5):675-85.
2. Albert JM, Buzdar AU, Guzman R, Allen PK, Strom EA, Perkins GH, et al. Prospective randomized trial of 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide (FAC) versus paclitaxel and FAC (TFAC) in patients with operable breast cancer: impact of taxane chemotherapy on locoregional control. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 128(2):421-7.
3. Alken S, Kelly CM. Benefit risk assessment and update on the use of docetaxel in the management of breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2013; 5:357-365.
4. Andea A, Bouwman D, Wallis T, Visscher W. Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer.* 2004; 100:20-7.
5. Aristizábal-Pachón AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS. Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2015; 27(4):217-22.
6. Bellone S, et al. Mammaglobin B (SCGB2A1) is a novel tumour antigen highly differentially expressed in all major histological types of ovarian cancer: implications for ovarian cancer immunotherapy. *Br J Cancer.* 2013; 109(2): 462–471.
7. Bendrik C, Dabrosin C. Estradiol increases IL-8 secretion of normal human breast tissue and breast cancer in vivo. *J Immunol* 2009; 182:371-8.
8. Beriwal S, Rungruang B, Soran A, Thull D, Kelley JL, Bhargava R, Lin CJ, Sukumvanich P. Comparison of Locoregional Recurrence with Mastectomy vs. Breast Conserving Surgery Associated Breast Cancer (PABC). *Cancers (Basel).* 2009 ;1(1):12-20.
9. Bernstein JL, Godbold JH, Raptis G, Watson MA, Levinson B, Aaronson SA, et al. Identification of mammaglobin as a novel serum marker for breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:6528–35.
10. Bhargawa R, Berival S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: an immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 2007; 127:103-13.

11. Brandt S, Chen YB, Chadwick P, Shin SJ. Is P120 as effective a E-cadherin (Ecad) in distinguishing lobular (L) from ductal (D) carcinomas of the breast? *Mod Pathol* 2008; 21(suppl 1):24A.
12. Burdette-Radoux S, Muss HB. Optimizing the use of anthracyclines in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2003; 4(4):264-72.
13. Cardoso F, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Senkus E, Thompson A, et al. Primary Breast Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol*. 2013;24(Suppl 6): 7 - 23.
14. Carlson GW, Bostwick J 3rd, Styblo TM, Moore B, Bried JT, Murray DR, Wood WC. Skin-sparing mastectomy. Oncologic and reconstructive considerations. *Ann Surg*. 1997 May;225(5):570-5
15. Carter D, Douglass JF, Cornellison CD, Retter MW, Johnson JC, Bennington AA, et al. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry* 2002; 41: 6714-22.
16. Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, *Nat Rev Cancer*. 2002; 563–572.
17. Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardia SL, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 304–13.
18. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606–16.
19. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hannekens C, Rosner B, Speicer FE. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1999; 332: 1589-1593.
20. Collins CD. The sentinel node in breast cancer: an update. *Cancer Imaging*. 2005 Nov 23;5 Spec No A: 3-9
21. Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1,010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987;5(9):1378-86.
22. Cutuli B. Radiotherapy for breast cancer: which strategy in 2012? *Cancer Radiother*. 2012; 16(5-6):493-502.

23. Dabbs DJ, Bhargava R, Chivukula M. Lobular versus ductal breast neoplasms: the diagnostic utility of P120 catenin. *Amer J Surg Pathol* 2007; 31:427–437.
24. Dabbs DJ, Kaplai M, Chivukula M, et al. The spectrum of morphomolecular abnormalities of the E-cadherin/catenin complex in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Applied immunohistochemistry and molecular morphology* 2007; 15:260–266.
25. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Save- Soderbergh J, Holloway L, Russell I, et al. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1996;58(12):2662-70.
26. De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J Pathol* 1997; 183:404–411.
27. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, von Minckwitz G, Solomayer EF, et al. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1652-8.
28. Driul L, Bernardi S, Bertozzi S, Schiavon M, Londero AP, Petri R. New surgical trends in breast cancer treatment: conservative interventions and oncoplastic breast surgery. *Minerva Ginecol.* 2013 Jun;65(3):289-96.
29. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1995; 312: 146-151.
30. Džodić R, Nešković Konstantinović Z, Gudurić B. *Rak dojke*. Zavod za udžbenike, Beograd; 2014. pp. 53-57.
31. Edge B, Byrd R, Compton C. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York: Springer; 2010.
32. Elston CW, Ellis IO, Goulding H. Role of pathology in the prognosis and management of breast cancer. In: Elston CW, Ellis IO, editors. *The Breast*. London: Churchill Livingstone; 1998.p.385-433.
33. Fanger GR, Houghton RL, Retter MW, Hendrickson RC, Babcook J, Dillon DC, et al. Detection of mammaglobin in the sera of patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2002; 23:212–21.

34. Fisher ER, Anderson S, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer* 1993;71(8):2507-14.
35. Fisher ER, Constantino J, Redmond C. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. *Cancer*. 1993; 71:41-50.
36. Fitzal F, Mittlboeck M, Trischler H, Krois W, Nehrer G, Deutinger M, Jakesz R, Gnant M. Breast-conserving therapy for centrally located breast cancer. *Ann Surg*. 2008 Mar;247(3):470-6.
37. Fodor J, Mózsa E, Zaka Z, Polgár C, Major T. [Local relapse in young (40 years) women with breast cancer after mastectomy or breast conserving surgery: 15-year results]. *Magy Onkol*. 2005;49(3):203, 205-8.
38. Fortunato L, Mascaro A, Baldi A, Farina M, Cortese G, Ventrone MA, et al. Positive bone marrow biopsy is associated with a decreased disease-free survival in patients with operable breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2009;16 (11): 3010–3019.
39. Garcia-Casado Z, Romero I, Fernandez-Serra A, Rubio L, Llopis F, Garcia A et al. A de novo complete BRCA1 gene deletion identified in a Spanish woman with early bilateral breast cancer. *BMC Med Genet* 2011; 12:134.
40. Geyer C, Rodrigues N, Weigelt B, Reis-Filho S. Molecular classification of estrogen receptor-positive/Luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19:39–53.
41. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M i saradnici. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *J Clin Invest* 2010; 120:485-97.
42. Grann VR, et al. Decision analysis of profilactic mastectomy in BRCA 1- positive or BRCA 2- positive patients. *J clin Oncol* 1998; 16: 979-985.
43. Guan XF, Hamedani MK, Adeyinka A, Walker C, Kemp A, Murphy LC, Watson PH, Leygue E. Relationship between mammaglobin expression and estrogen receptor status in breast tumors. *Endocrine* 2003; 21: 245–50.
44. Halsted WS. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann Surg*. 1907 Jul;46(1):1-19.
45. Harigopal M, Shin SJ, Murray MP, et al. Aberrant E-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005; 3:73–83.

46. Harissis HV, Ziogas D, Baltogiannis G. Mastectomy vs breast-conserving surgery: an old dilemma comes again for early breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(7):1966-7.
47. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000; 21:427–433.
48. Hulka BS, Stark AT. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995; 11: 883-887.
49. Inoue K, Fry EA. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer*. 2016; 8:25-42.
50. Joensuu H, Gligorov J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann Oncol*. 2012; (6): 40-5.
51. Keshgegian A, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol*. 1995;104(1):42–9.
52. Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomark Cancer*. 2013; 5:61–70.
53. Klug J, Beier HM, Bernard A, Chilton BS, Fleming TP, Lehrer RI, et al. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Ann NY Acad Sci* 2000; 923: 348-54.
54. Kollias J, Ellias I. O, Elston I. O, Blamey R.W. Clinical and histological predictors of contralateral breast cancer. *EJSO* 2000; 25: 584-589.
55. Koren S, Bentires-Alj M. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. *Mol Cell*. 2015;60(4):537-46.
56. Lagha A, Chraiet N, Labidi S, Krimi S, Ayadi M, Gligorov J, Boussen H. [Impact of taxanes in the adjuvant setting of node-negative breast cancers]. *Bull Cancer*. 2013;100(5):465-71.
57. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet* 2012; 82:105-114.
58. Lapeire L, Hendrix A, Lambein K, Van Bockstal M, Braems G, Van Den Broecke R, et al. Cancer-Associated Adipose Tissue Promotes Breast Cancer Progression by Paracrine Oncostatin M and Jak/STAT3 Signaling. *Cancer Res*. 2014; (74) (23): 6806-6819.



59. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of tissue estrogen and progesterone receptor levels: a survey of current practice, techniques, and quantitation methods. *Breast J.* 2006; 6:189-96.
60. Le M. Pilule et cancer du sein. *Contr Fert Sex* 1999 ; 18: 399-408.
61. Lee GW, Kim JY, Koh EH, Kang D, Choi DS, Maeng KY, et al. Plasma human mammaglobin mRNA associated with poor outcome in patients with breast cancer. *Genet Mol Res*, 2012; 11 (4): 4034–4042.
62. Leung K. VivoTag-S 680-anti-human mammaglobin-A monoclonal antibody. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-13.
63. Lewis GH, Subhawong AP, Nassar H, Vang R, Illei PB, Park BH, et al. Relationship between molecular subtype of invasive breast carcinoma and expression of gross cystic disease uid protein 15 and mammaglobin. *Am J Clin Pathol* 2011; 135 :587-91.
64. Li G, Zhang J, Jin K, He K, Wang H, Lu H, Teng L. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med.* 2011;5(2):249-60.
65. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncology Letters.* 2017;14(5):5865-5870.
66. Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(10):16445-16455.
67. Lifrange E, Andre C, Bleret V, Collignon J, Coucke P, Cusumano P, et al. Hormone therapy for breast cancer. *Rev Med Liege.* 201; 66(5-6): 367-71.
68. Lim E, Winer EP. Adjuvant chemotherapy in luminal breast cancers. *Breast.* 2011; 20 (3): 128-31.
69. Liu Y, Ma L, Liu X, Wang L. Expression of human mammaglobin as a marker of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Exp Ther Med.* 2012;3(3):550-554.
70. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 2002; 24: 885–893.

71. Madden JL, Kandalaft S, Bourque RA. Modified radical mastectomy. *Ann Surg.* 1972; 175(5):624-34.
72. Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F. Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol* 2011;22: 24-30.
73. Marchetti A, Buttitta F, Bertacca G, Zavaglia K, Bevilacqua G, Angelucci D, Viacava P, Naccarato A, Bonadio A, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, et al. mRNA markers of breast cancer nodal metastases: comparison between mammaglobin and carcinoembryonic antigen in 248 patients. *J Pathol* 2001; 195: 186–90.
74. Marković. ITNM klinička klasifikacija. U: Milašinović G, urednik. Vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje raka dojke. Beograd: Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2013.s.58-65
75. Marques AR, Teixeira E, Diamond J, Correia H, Santos S, Neto L, et al. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence. *Breast Cancer Res Treat*, 2009; 114 (2): 223–232.
76. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 2010; 4(3):174-91.
77. McGuire WL, Horwitz KB, Pearson OH, Segaloff A. Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer* 1997; 39 (6): 2934-47.
78. Merkel DE, Osborne CK. Prognostic factors in breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1989; 3(4):641-52.
79. Mikhitarian K, Martin RH, Ruppel MB, Gillanders WE, Hoda R, Schutte del H, et al. Detection of mammaglobin mRNA in peripheral blood is associated with high grade breast cancer: interim results of a prospective cohort study. *BMC Cancer* 2008; 8:55.
80. Nagaraj G, Ma CX. Adjuvant chemotherapy decisions in clinical practice for early-stage node-negative, estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer: challenges and considerations. *J Natl Compr Canc Netw.* 2013;11(3):246-50.
81. Newman S. C., Miller A.B., Howe G. R. A Study of the effect of weight and dietary fat on survival time. *Am J Epidemiol* 1996; 123: 767.

82. Ni J, Kalff-Suske M, Gentz R, Schageman J, Beato M, Klug J. All human genes of the uteroglobin family are localized on chromosome 11q12.2 and form a dense cluster. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 923: 25-42.
83. Nunez-Villar MJ, Martinez-Arribas F, Pollan M, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, et al. Elevated mammaglobin (h-MAM) expression in breast cancer is associated with clinical and biological features defining a less aggressive tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2003; 5: 65-70.
84. O'Brien N, Maguire TM, O'Donovan N, Lynch N, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. Mammaglobin: a promising marker for breast cancer. *Clin Chem*. 2012; 48(8): 1362-4.
85. O'Brien N, O'Donovan N, Foley D, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Use of a panel of novel genes for differentiating breast cancer from non-breast tissues. *Tumour Biol* 2007; 28: 312-7.
86. O'Brien NA, O'Donovan N, Ryan B, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Mammaglobin a in breast cancer: existence of multiple molecular forms. *Int J Cancer* 2005; 114:623-7.
87. O'Brien, N. A., O'Donovan, N., Ryan, B., Hill, A. D.K., McDermott, E., O'Higgins, N. and Duffy, M. J. Mammaglobin a in breast cancer: Existence of multiple molecular forms. *Int. J. Cancer* 2015; 114: 623–627.
88. Osborne MP. Breast anatomy and development. Lippman ME, Morrow M, Osborne CK Harris JR. *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, str. 1-35.
89. Prati R, Apple S K, He J, Gornbei J A, Chanh H R. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J*. 2005;11(6):433-9.
90. Puztai L. Gene expression profiling of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:11.
91. Qureshi HS, Linden MD, Divine G, et al. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:377–385.
92. Raica M, Cîmpean AM, Meche A, Alexa A, Suciuc C, Mureşan A. Analysis of the immunohistochemical expression of mammaglobin A in primary breast carcinoma and lymph node metastasis. *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50: 341-7.

93. Rehman F, Nagi A H, Hussain M. Immunohistochemical expression and correlation of mammaglobin with the grading system of breast carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53:619-23.
94. Reyes C, Gomez-Fernández C, Nadji M. Metaplastic and medullary mammary carcinomas do not express mammaglobin. *Am J Clin Pathol.* 2012;137(5):747-52.
95. Rosen P. Anatomy and physiologic morphology. *Rosen's Breast Pathology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1-21.
96. Saez S, Cheix F, Asselain B. Prognostic value of estrogen and progesterone receptors in primary breastcancer. *Breast Cancer Res Treat* 1983;3(4):345-53.
97. Salomon Đ, Clarc M, Wong G, Levin J, Ullrich A, McGuire L. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235:177-82.
98. Scarff RW., Torloni H. Histological typing of breast tumours. *International Histological Classification of Tumours, No 2 WHO* 1998.
99. Schneebaum S, Stadler J, Cohen M, Yaniv D, Baron J, Skornick Y. Gamma probe-guided sentinel node biopsy--optimal timing for injection. *Eur J Surg Oncol.* 1998; 24(6):515-9.
100. Schnitt S. Traditional and newer pathologic factors. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 30:22-26.
101. Shek LL, Godolphin W. Model for breast cancer survival: relative prognostic roles of axillary nodal status, TNM stage, estrogen receptor concentration, and tumor necrosis. *Cancer Rec* 1998; 48(19):5565-9.
102. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(1):5-29.
103. Silva Al, Tomé MJ, Correia AE, Passos-Coelho JI. Human mammaglobin RT-PCR assay for detection of occult breast cancer cells in hematopoietic products. *Ann Oncol* 2002;13: 422-9.
104. Silverstein MJ. Recent advances: diagnosis and tretment of early breast cancer. *BMJ* 1997; 314: 1736.

105. Sjödin A, Ijuszinder I, Henriksson R, Hedman H. Mammaglobin and lipophilin B expression in breast tumors and their lack of effect on breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res* 2008; 28: 1493-8.
106. Sotiriou C, Pusztai L. Gene expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360:790-800.
107. Span PN, Waanders E, Manders P, Heuvel JJ, Foekens JA, Watson MA, et al. Mammaglobin is associated with low-grade, steroid receptor-positive breast tumors from postmenopausal patients, and has independent prognostic value for relapse-free survival time. *J Clin Oncol* 2004; 22: 691-8.
108. Sun B, Song ST, Jiang ZF, Wang T, Zhang SH, Meng XY, et al. Analysis of the factors affecting pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2013;35(1):38-42.
109. Swartz MA and Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis, *Microsc Res Tech*. 2001; 55: 92–99.
110. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1998;351(9114):1451-67.
111. Tan AR, Swain SM. Ongoing adjuvant trials with herceptin in breast cancer. *Semin Oncol*. 2003; 30(5):54-64.
112. Tavassoli FA, Devilee P. World health organisation classification of tumors. Tumors of the breast and female genital organs. France: IARC Press; 2003.
113. Tichy JR, Lim E, Anders CK. Breast cancer in adolescents and young adults: a review with a focus on biology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(9):1060-9.
114. TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition. *Pathologie*. 2010;31(5):361-6.
115. Toss A, Cristofanilli M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):60.
116. Tot T, Tabar L, Dean P. *Practical Breast Pathology*. 1st ed. Thieme: Medical Publishers; 2002.
117. Trifiletti DM, Sturz VN, Showalter TN, Lobo JM. Towards decision-making using individualized risk estimates for personalized medicine: A systematic review of

- genomic classifiers of solid tumors. PLoS ONE. 2017; 12(5): e0176388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176388>
118. Tseng LM, Hsu NC, Chen SC, Lu YS, Lin CH, Chang DY, et al. Distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(3):290-4.
  119. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S (2013) 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus. *Breast Care* 03/2013.
  120. Valenzuela M, Julian TB. Neo-adjuvant hormonal therapy. *Breast J*. 2008; 14(3):279-83.
  121. Van Rijk MC, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJ, Hoefnagel CA, Kroon BB. Non-axillary breast cancer recurrences after sentinel node biopsy. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15;92(4):292-8.
  122. Vasudevan D, Hickok JR, Bovee RC, et al. Nitric oxide regulates gene expression in cancers by controlling histone posttranslational modifications. *Cancer research*. 2015;75(24):5299-5308.
  123. Vergara-Fernández O, Cortés-González R, Medina-Franco H. Validation of sentinel node in breast cancer]. *Rev Invest Clin*. 2004 May-Jun;56(3):309-13.
  124. Watson MA, Darrow C, Zimonjic DB, Popescu NC, Fleming TP. Structure and transcriptional regulation of the human mammaglobin gene, a breast cancer associated member of the uteroglobin gene family localized to chromosome11q13. *Oncogene* 1998; 16: 817-24.
  125. Watson MA, Dintzis S, Darrow CM, Voss LE, DiPersio J, Jensen R, et al. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 3028-31.
  126. Watson MA, Fleming TP. Isolation of differentially expressed sequence tags from human breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4598-602.
  127. Watson MA, Fleming TP. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 1996; 56:860–865.

128. Wei C, Luo Q, Sun X, et al. microRNA-497 induces cell apoptosis by negatively regulating Bcl-2 protein expression at the posttranscriptional level in human breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(7):7729-7739.
129. Weng B, Wang Q, Lin S, Lu Y. Nasal cavity metastasis of breast cancer: a case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (10): 7028–7033.
130. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P, Hayes M, Gelmon K. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010; 11:174–83.
131. Zafrakas M, Petschke B, Donner A, Fritzsche F, Kristiansen G, Knüchel R, et al. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer*. 2006; 6:88.
132. Zambrano J, Yeh ES. Autophagy and Apoptotic Crosstalk: Mechanism of Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Breast Cancer*. 2016; 10:13-23.
133. Zehentner BK, Dillon DC, Jiang Y, Xu J, Bennington A, Molesh DA, et al. Application of a multigene reverse transcription-PCR assay for detection of mammaglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem* 2002; 48: 1225–31.
134. Zehentner BK, Persing DH, Deme A, Toure P, Hawes SE, Brooks L, et al. Mammaglobin as a novel breast cancer biomarker: multigene reverse transcription-PCR assay and sandwich ELISA. *Clin Chem*. 2004; 50:2069–76.
135. Ariyan S. Prophylactic mastectomy for precancerous and high-risk lesions of the breast. *Can J Surg* 1995; 28: 262-265.