

# PROGNOSTIČKI ZNAČAJ IMP3 I UTICAJ NA PREŽIVLJAV...

By: Nikoleta Sjekloća

As of: Feb 24, 2021 10:17:57 PM  
47,010 words - 83 matches - 44 sources

Similarity Index

4%

Mode: Similarity Report ▼

## paper text:

UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET dr Nikoleta Sjekloća PROGNOSTIČKI ZNAČAJ IMP3 I UTICAJ NA PREŽIVLJAVANJE KOD PACIJENTKINJA SA TROSTRUKO NEGATIVNIM KARCINOMOM DOJKE DOKTORSKA DISERTACIJA Podgorica, 2020.god. PODACI O DOKTORANTU Ime i prezime: Nikoleta Sjekloća

**Datum i mjesto rođenja:** 28. 12. **1983** god.- **Cetinje,** Crna Gora **Naziv završenog**  
studijeskog **programa i godina završetka:**

6

Medicinski fakultet, Podgorica, 2011. god. .

**INFORMACIJE O DOKTORSKOJ DISERTACIJI Naziv doktorskih studija: Doktorske studije Naslov teze:**

6

Prognostički značaj IMP3 i uticaj na preživljavanje kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomima dojke

**Fakultet na kojem je disertacija odbranjena:** Medicinski **fakultet,** Univerzitet Crne Gore **UDK,**  
**OCJENA I ODBRANA DOKTORKE DISERTACIJE Datum prijave doktorske** teze: 6 **.10.** 2016. god.  
**Datum sjednice Senata Univerziteta na kojoj je prihvaćena teza:**

6

16.11.2016 god.

**Komisija za ocjenu podobnosti teze i kandidata: Prof. dr** Filip Vukmirović; **Prof. dr** Snježana  
Tomić; **Prof. dr** Olivera Miljanović i **Prof. dr**

11

Ljiljana Vučković Mentor: Prof. dr Snježana Tomić

Prof. mr Sandra Sjekloća Bjegović; profesor crnogorskog jezika i književnosti Datum odbrane: Datum promocije: Zahvaljujem mentorki Prof. dr Snježani Tomić na neizmjerljivoj podršci, stručnom usmjeravanju i pomoći tokom rada na doktorskoj disertaciji. Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici za безусловnu ljubav i podršku tokom mog cjelokupnog školovanja i profesionalnog usavršavanja. PREGOVOR Trostruko negativni karcinom dojke (TNBC) predstavlja vrlo heterogenu grupu karcinoma dojke. Ovaj tip karcinoma dojke javlja se sa učestalošću 12 - 17% među karcinomima dojke uopšte. Karakteriše se agresivnijim kliničkim tokom u odnosu na ostale tipove karcinoma dojke i sklonošću ka metastaziranju hematogenim putem u pluća i mozak, dok su loko-regionalne metastaze ovih tumora u limfne čvorove znatno rjeđe. Obzirom da ne ispoljavaju receptore koji se u posljednjih nekoliko decenija koriste kao meta novih terapijskih agenasa, a koji su unaprijedili liječenje ostalih tipova karcinoma dojke, opcije liječenja kod trostruko negativnih karcinoma dojke su vrlo ograničene. Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na neoadjuvantne hemioterapijske protokole, pacijentkinje sa ovim tipom tumora imaju visočiju stopu udaljenih metastaza i ultimativno lošiju prognozu. Manje od 30% pacijentkinja sa metastatskim trostruko negativnim karcinomom dojke živi 5 godina i kod svih je uzrok smrti osnovna bolest, uprkos primijenjenoj adjuvantnoj hemioterapiji koja je danas i osnova liječenja ovih pacijentkinja. Stoga, veliki su izazov u onkološkom liječenju. Specifična, agresivna priroda ove bolesti, ograničena efikasnost do danas dostupnih terapijskih opcija i ultimativno loša prognoza, stvaraju veliku potrebu za boljim razumijevanjem molekularne osnove ovog tipa karcinoma dojke i unaprjeđenjem liječenja i prognoze kod pacijentkinja sa ovom bolešću. Upravo ovo je razlog porasta broja istraživanja i publikacija na temu TNBC u poslednjih nekoliko decenija. Nastojanja istraživača ka pronalaženju biomarkera koji bi imali prognostički i prediktivni značaj kod TNBC, do danas su obezbijedila ograničen značaj u rasvjetljavanju prirode ove bolesti i unaprjeđenju liječenja. Upravo otuda motiv da u istraživanju koje smo sprovodili pratimo prognostički značaj IMP3 biomarkera, koji bi omogućio bolju klasifikaciju TNBC i potencijalno mogao poslužiti kao meta novih terapijskih agenasa koji bi time unaprijedili liječenje i prognozu ove bolesti. Prognostički značaj IMP3 i uticaj na preživljavanje kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomima dojke Izvod teze Uvod. Trostruko negativni karcinomi dojke (TNBC) čine 12 - 17% svih karcinoma dojke. To je heterogena grupa tumora koja se povezuje sa agresivnijim kliničkim tokom, češće metastaziraju hematogenim putem u pluća i mozak, dok su metastaze u lokoregionalne limfne čvorove rjeđe u poređenju sa ostalim tumorima dojke. Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na neoadjuvantnu hemioterapiju, pacijentkinje sa ovim tipom tumora imaju visočiju stopu udaljenih metastaza i ultimativno lošiju prognozu. Usljed specifične prirode ove bolesti i loše prognoze, postoji velika potreba za boljim razumijevanjem molekularne osnove TNBC i pronalaženjem novih molekularnih markera koji bi imali prognostički i prediktivni značaj, te omogućili dodatnu subklasifikaciju ovih tumora, a sve u cilju pronalaženja efikasnih metoda liječenja. U našem istraživanju odlučili smo se za praćenje prognostičkog značaja

kao i njegovog uticaja na pokazatelje preživljavanja.

**IMP3 (Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3)**

2

je pripadnik porodice insulinu sličnih faktora rasta tipa II (IGF2) koji ima ključnu ulogu u prenošenju i stabilizaciji mRNK, ćelijskom rastu i migraciji tokom embriogeneze. Povećana ekspresija IMP3 je povezana sa uznapredovalim kliničkim stadijumom bolesti, nalazom udaljenih metastaza i kraćim ukupnim preživljavanjem u različitim malignim tumorima. U našem polaznom istraživanju veličina tumora, bazalni imunofenotip i nalaz metastaza u limfnim čvorovima su bili povezani sa visokim stepenom IMP3 ispoljenosti, dok ovakvu povezanost između histološkog gradusa i stepena ispoljenosti IMP3 nijesmo pronašli, što se objašnjava specifičnošću uzorka ispitanih pacijentkinja, u kom nije bilo niti jedne pacijentkinje sa dobro diferenciranim tumorom (gradus 1). Naše polazno istraživanje, kao i evaluacija malobrojnih radova na temu trostruko negativnog karcinoma dojke, bile su osnova da u ovom istraživanju fokus stavimo na ispoljenost IMP3 kod TNBC i na njegovu korelaciju sa parametrima preživljavanja, preživljavanjem bez progresije bolesti i ukupnim preživljavanjem. Ciljevi teze: 1. Povezanost kliničkih (veličina tumora), demografskih (dob) i patohistoloških pokazatelja (histološki tip, stepen diferencijacije, nalaz vaskularne invazije) i imunohistohemijskog nivoa IMP3 proteina sa dužinom ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova progresije bolesti. 2. Značaj imunohistohemijskog nivoa IMP3 proteina kod trostruko negativnih karcinoma dojke, kao prognostičkog pokazatelja. Metode. U studiju su uključene bolesnice

**oboljele od trostruko negativnog karcinoma dojke koje su** operisane na **Klinici za** kirurgiju **KBC-** **Split,** u periodu **od**

4

01.01.2003. –

**31.12.2009.** godine, čiji **je operativni materijal analiziran** u **Kliničkom zavodu za patologiju,**

4

sudsku medicinu i citologiju. Kao izvor podataka korišćena je medicinska dokumentacija (istorije bolesti bolesnica liječenih u Centru za tumore KBC- Split). Korišćeni su klinički podaci o starosnoj dobi bolesnica, datumu operacije, kliničkom stadijumu bolesti, primijenjenom hirurškom i onkološkom liječenju, toku bolesti (pojavi recidiva, metastaza i dužini perioda bez znakova progresije bolesti), te kliničkom ishodu bolesti. Pregledana su arhivirana patohistološka stakalca, određen

**histološki tip tumora,** stepen **diferencijacije,** prisustvo **bazalne morfologije, postojanje** **vaskularne invazije.** Provjerena je **i**

4

po potrebi ponovo određena ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora, HER2/neu i Ki67 status. Reprezentativni rezovi tumorskog tkiva naknadno su bojani imunohistohemijski, primjenom antitijela na IMP3 protein (DAKO, Glostrup, Danska) u razređenju 1:150. Od statističkih analiza za određivanje značajnosti razlike kvantitativnih varijabli korišćen je T - test, dok je za određivanje značajnosti razlike kvalitativnih varijabli u odnosu na ekspresiju IMP3 proteina korišćen Hi-kvadrat test. Za ispitivanje povezanosti pomenutih varijabli sa ekspresijom IMP3 korišćena je metoda logističke regresije. U analizi preživljavanja korišćena je Kaplan-Meierova metoda i Log-rank test. Uticaj ispitivanih varijabli na preživljenje i relativni rizik od smrtnog ishoda i povratka bolesti analiziran je Coxovom uninominalnom i multinominalnom analizom.

**Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu** sprovedeno **je** na nivou statističke **značajnosti  $p \leq 0.05$ .**

4

Rezultati. Pozitivna ekspresija IMP3 proteina je bila prisutna kod 35.6% trostruko negativnih karcinoma dojke. Bazalna morfologija je bila prisutna kod 46.6% pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Pozitivna ekspresija IMP3 je bila u vezi sa većim dimenzijama tumora, višim kliničkim stadijumom bolesti, i bazalnom morfologijom ( $p=0.039$ ,  $p=0.034$ ,  $p<.001$ ).

**Preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje** bili **su značajno** kraći **kod** pacijentkinja **sa**

23

IMP3 pozitivnim trostruko negativnim karcinomom dojke. Na osnovu rezultata naše studije, možemo zaključiti da ekspresija IMP3 može biti korišćena kao negativni prognostički faktor za trostruko negativne karcinome dojke. U vezi sa time, IMP3 molekul bi mogao biti meta novih imuno-terapijskih agenasa. Ključne riječi: Trostruko negativni karcinom dojke, IMP3, bazalna morfologija, preživljavanje bez progresije bolesti, ukupno preživljavanje Prognostic value of IMP3 and impact on survival in patients with tripple negative breast cancer

**Abstract Triple negative breast cancer (TNBC) account for 12- 17% of all breast cancers. It is a heterogeneous group of tumors associated with aggressive clinical course,**

2

more likely to develop distnt metastasis in the lung and brain. Lymph node dissemination in these tumors is less common than in the other breast cancer types.

**Despite good initial response to** neo-adjuvant **chemotherapy, patients with this type of** cancer **have higher rates of distant metastases and** worse **prognosis.**

2

Due to specific nature of this disease and poor prognosis there is a need for better understanding of the molecular background of TNBC. Identification of new biomarkers with prognostic and predictive value would support better sub-classification and development of efficacious therapies to improve prognosis. In our thesis, we decided to evaluate prognostic value of IMP3 and its impact on survival outcomes. IMP3

**(Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3) belongs to a family of insulin-like growth factor type II (IGF2) and plays a key role in transmission and stabilization of mRNA, cell growth and migration during embryogenesis. IMP3 expression is associated with**

2

advanced clinical stage, distant metastasis and shorter overall survival in different tumor types. In our initial research, tumor size, basal phenotype and lymphnode metastasis have been related with higher IMP3 expression. This relationship was not confirmed for tumor grade due to specific study population, with no any grade 1 tumor included. Based on our initial research and available publications, in the thesis we evaluated IMP3 expression in TNBC and its correlation with

**survival outcomes: progression-free survival (PFS) and overall survival (OS).**

43

Objectives: 1. Correlation between clinical (tumor size), demographic (age) and histopathological (histological type, grade and vascular invasion) and IMP3 expression with progression-free survival and overall survival. 2. Prognostic value of IMP3 expression in TNBC. Our study included 118 patients with TNBC, surgically treated at the Surgery department of Clinical Center Split, from 01.01.2003. – 31.12.2009. whose tumor samples have been analysed in the Pathology Institute of Clinical Center Split. Data source used were patients histories including: age, date of surgery, disease stage, treatment, course (relapse, metastasis, progression-free period) and disease outcome. Histopathology of archived tumor samples was conducted including evaluation of: tumor type, grade, basal morphology and vascular invasion. ER, PR, HER2/neu and Ki67 testing was performed. IMP3 expression was defined immunohistochemically, by using IMP3 antibody (DAKO, 1:150). Statistical methods used were: t-test and chi-square test to define quantitative and qualitative variables differences vs IMP3 expression. Logistic regression was used to determine relationship of all observed variables vs IMP3

**expression. For survival analysis, Kaplan-Meier method and log-rank test** have been **used.**

17

Variables impact on survival and risk of recurrence and lethal outcome was assessed by Cox-uninomial and Cox-multinomial analysis. Statistical significance was claimed on the  $p \leq 0.05$  level. Results. IMP3 expression was positive

**in 35.6% of TNBC,** whereas **basal morphology was observed in 46.6% TNBC. IMP3 expression was** related **with larger** tumor **size, higher stage and basal morphology** ( $p= 0,039,$   $p= 0.034,$   $p$

2

<0.001). DSF and OS were significantly shorter in IMP3 positive TNBC. Progression

**-free survival and** overall survival **were significantly shorter in** patients with **IMP3 positive TNBC.** **According to results of our study IMP3 expression can be used as negative prognostic factor for triple negative breast carcinomas. Targeting IMP3 molecule could be an effective approach to the management of a triple negative breast cancer with new immunological therapies, which**

2

for this group of tumors does not yet exist. Key words: tripple negative breast cancer, IMP3, basal morphology, progression-free survival, overall survival. SADRŽAJ

**1. Uvod 1.1. Epidemiologija karcinoma dojke 1.** 2. Etiologija **karcinoma dojke 1.**

19

2.1. Starost 1.2.2. Pol 1.2.3. Nasljeđe 1.2.4. Reproductivni ciklus žene 1.2.5. Izloženost hormonima 1.2.5.1. Endogeni hormoni 1.2.5.2. Egzogeni hormoni 1.2.6. Histološki faktori rizika 1.2.7. Stil života 1.2.7.1. Gojaznost 1.2.7.2. Fizička aktivnost 1.2.7.3. Ishrana 1.2.7.4. Alkohol 1.2.7.5. Pušenje 1.3. Histološka klasifikacija karcinoma dojke 1.3

**.1. Invazivni karcinom bez posebne oznake (NOS)** 1.3.2. **Invazivni lobularni karcinom**

4

dojke (ILC) 1.3.3. Tubularni karcinom dojke (TC) 1.3.4. Kribriformni karcinom dojke (ICC) 1.3.5. Mucinozni karcinom dojke 1.3.6. Karcinom sa medularnim karakteristikama 1.3.7. Karcinomi sa apokrinom diferencijacijom 1.3.8. Karcinom sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka 1.3.9. Invazivni mikropapilarni karcinom dojke 1.3.10. Metaplastični karcinom dojke 1.3.11. Ostali histološki tipovi karcinoma dojke 1.4. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke 1 1 10 10 11 11 13 14 14 15 18 18 18 19 19 20 20 20 21 24 29 31 33 35 36 38 39 40 45 48 1.5. Imunohistohemijska klasifikacija karcinoma dojke 1.6. TNM klasifikacija karcinoma dojke 1.7. Trostruko negativni karcinom dojke 1.8. Prognostički i prediktivni faktori 1.9. IMP3 biomarker

**2. Ciljevi istraživanja i hipoteza** 2.1. **Ciljevi istraživanja** 2 **.2. Hipoteza** 3. **Materijal i metode**

16

3.1. Ispitanice 3.2. Metode istraživanja 3.3. Imunohistohemijske analize 3.4. Statističke metode 4. Rezultati istraživanja 5.

Diskusija 6. Zaključci 7. Literatura 53 58 61 77 89 98 98 99 100 100 101 102 103 105 130 138 139 1. Uvod 1.1

Epidemiologija karcinoma dojke Karcinom dojke je najčešći karcinom kod žena sa estimiranih 20.88.849

novodijagnostifikovanih bolesnica i 626.679 smrtnih slučajeva godišnje u svijetu. Karcinom dojke na osnovu podataka Globocana iz 2018. godine čini 11.6% od ukupnog broja svih godišnje dijagnostifikovanih karcinoma, sa stopom mortaliteta od 6.6% kod oba pola (1). Kao takav, rangira se na drugom mjestu po učestalosti kod osoba oba pola, nakon karcinoma pluća (Grafikon 1) (1). Grafikon 1: Grafikon predstavlja distribuciju incidence i mortaliteta za 10 najčešćih maligniteta kod žena u 2018. godini. Svako polje u dijagramu predstavlja proporciju ukupnog broja slučajeva ili smrti. Izvor: Globocan 2018 (1). Kod žena, karcinom dojke se javlja sa učestalošću od 24.5%, i značajno prednjači po učestalosti u odnosu na sve druge lokalizacije malignih tumora. Sa smrtnošću od 15%, karcinom dojke je najčešći uzrok smrti kod žena (Grafikon 2) (1).

Grafikon 2: Grafikon predstavlja distribuciju incidence i mortaliteta za 10 najčešćih maligniteta u 2018. godini. Svako polje u dijagramu predstavlja proporciju ukupnog broja slučajeva ili smrti. Izvor: Globocan 2018 (1). Kao kod većine epitelijalnih tumora, incidenca karcinoma dojke se ubrzano povećava sa starenjem. Širom svijeta, incidenca karcinoma dojke varira i razlikuje se i do 10 puta u različitim geografskim regionima. Geografske varijacije incidence karcinoma dojke su uglavnom posljedica izloženosti različitim faktorima rizika i dostupnosti skrininga, kao važne preventivne mjere. Regioni u svijetu sa visokim rizikom obolijevanja od karcinoma dojke su ujedno napredna društva Australije, Evrope i Sjeverne Amerike, gdje

**6% žena razvije invazivni karcinom dojke prije 75. godine života.**

41

Rizik od nastanka karcinoma dojke je manji u manje razvijenim regionima svijeta kao što su: Južna Afrika, djelovi Južne i Istočne Azije uključujući Japan, gdje vjerovatnoća nastanka karcinoma dojke iznosi jednu trećinu vjerovatnoće u razvijenim zemljama. Stopa incidence karcinoma dojke u svijetu varira od 25.9 u Centralnoj i Južnoj Aziji do 92.6 u Zapadnoj Evropi sa prednjačecom Belgijom, te 94.2 u Australiji i na Novom Zelandu. Stopa mortaliteta varira od 8.6 u Istočnoj Aziji do 18.4 u Sjevernoj Africi, 19.1 u Polineziji i najveća je u Melaneziji na ostrvu Fidži 24.5 (Grafikon 3) (1). Grafikon 3: Dijagram prikazuje region specifične stope incidence i mortaliteta kod žena, standardizovane u odnosu na starostnu strukturu, u 2018. godini. Stope su prikazane u opadajućem nizu od najviše do najmanje. Izvor: Globocan 2018 (1). Prognoza karcinoma dojke može biti dobra ukoliko se bolest dijagnostifikuje u ranoj fazi. Napredak u preživljavanju primijećen je u razvijenijim zemljama svijeta od kasnih 70-ih godina i naročito zapažen u 90-im godinama, kao posljedica sistematskog skrininga žena i primjene adjuvantne hormonske terapije i hemioterapije, naročito druge i treće generacije hemioterapijskih agenasa i inhibitora aromataza. Kao rezultat sprovedenih mjera skrininga i hemioterapijskog liječenja nakon 80-ih godina, trend mortaliteta primjetno se smanjio u nekoliko država kao što su: Australija, Kanada i Sjedinjene Američke Države, i nastavio pad do danas. Međutim, u Japanu, Republici Koreji i Rusiji stopa mortaliteta je i dalje u porastu. Bez obzira na opadajući trend mortaliteta u razvijenom svijetu, karcinom dojke je i dalje najčešći uzrok smrti kod žena (Grafikon 4) (1). Grafikon 4: Dijagram prikazuje stope incidence i mortaliteta u regionima svijeta sa visokim/vrlo visokim HDI (Human Development Index) u odnosu na regione sa niskim/vrlo niskim HDI za žene, standardizovane prema starostnoj dobi, u 2018. godini. Stope su prikazane za 15 načešćih tipova karcinoma kod žena u svijetu. Izvor: Globocan 2018 (1). Geografske varijacije, vremenski trendovi i studije

migrirajućih populacija iz niskorizičnih u visokorizične regione svijeta, ukazuju da je u migrirajućoj populaciji, za jednu ili dvije uzastopne generacije, rizik približan onom koji je zabilježen u zemlji domaćinu. Iako 5 – 10% karcinoma dojke nastaje kao posljedica genetskih faktora rizika i nasljeđa, podaci iz studija migracija govore u prilog bitnoj ulozi faktora sredine u nastanku ovog maligniteta i njihovom uticaju na razlike u incidenci između različitih nacija i etničkih grupa. Poređenjem niskorizičnih populacija koje su migrirale u visokorizične regione svijeta, zaključeno je da stopa incidence karcinoma dojke raste u uzastopnim generacijama (2). Povećane stope incidence u državama sa visokim indexom razvoja (HDI) pripisuju se većoj prevalenci poznatih faktora sredine kao faktora rizika za nastanak ove bolesti (3). Međutim, još uvijek se ne zna dovoljno o uticaju geografskih varijacija i vremenskih trendova stope incidence karcinoma dojke na etiološke faktore za nastanak ove bolesti. Najveći porast stope incidence u zemljama u tranziciji u posljednjih nekoliko decenija, bilježi se upravo u onim zemljama čija je stopa incidence istorijski bila relativno niska (Južna Amerika, Afrika i Azija) (3). Dok stope incidence nastavljaju rasti u manje razvijenim zemljama, u razvijenijim zemljama se bilježi stabilizacija i opadanje stope incidence, što se smatra posljedicom sprovođenja skrininga za karcinom dojke. Od 2005. godine zabilježen je pad incidence karcinoma dojke u nekoliko država Evrope i Sjedinjenih Američkih Država, što se pretežno dovodi u vezu sa smanjenom primjenom hormonske supstitucione terapije u ovim državama. Pomenuti trendovi upućuju da demografski faktori, u smislu socio-ekonomskog razvoja, utiču na rizik za nastanak karcinoma dojke zajedno sa ostalim faktorima sredine i skriningom. Prema podacima EUCAN (European Cancer Network) estimacije, preko 3.4 miliona novih slučajeva karcinoma je dijagnostifikovano u Evropi u 2012. godini, od kojih je gotovo 80% karcinoma dijagnostifikovano u državama Evropske Unije. Najčešće dijagnostifikovani su bili karcinom dojke, debelog crijeva, prostate i pluća čineći sveukupno 1.7 miliona slučajeva karcinoma godišnje (4). Najveću incidencu i prevalencu zabilježio je karcinom dojke, dok je daleko najveći mortalitet bio zabilježen od karcinoma pluća (Grafikon 5) (4). Grafikon 5: Estimirani broj slučajeva, smrti i petogodišnja prevalenca za sve lokalizacije karcinoma sem nemelanomskog karcinoma kože. Izvor: EUCAN 2012 (4). Danas u Evropi raspoložemo EUREG podacima, baze koja objedinjuje podatke 130 registara za malignitete različitih država. Na osnovu ovih podataka između 2003. i 2007. godine najveća stopa mortaliteta od karcinoma dojke, kod žena nakon 30. godine života, zabilježena je u zapadno-evropskim državama (43.5 na 100,000 stanovnika), što je za 22% manje nego u periodu od 1988. do 2007. godine. Najniža stopa mortaliteta u ovom periodu zabilježena je u istočnoj Evropi, (40.1 na 100,00 stanovnika), što je za 3% niže u odnosu na period od 1988. do 2007. godine. U ovom periodu

**mortalitet od karcinoma dojke je** zabilježio **trend opadanja u** Zapadnoj i Sjevernoj Evropi u **34**

svim starosnim grupama, uključujući i one koje nijesu bile pokrivena mamografijom kao mjerom skrininga. Stope mortaliteta su zabilježile porast u Južnoj Evropi, u populaciji žena od 80 i više godina (porast za 0.8% godišnje), dok je u Istočnoj Evropi porast zabilježen u populaciji žena od 60 i više godina starosti (0.9% godišnje). Pomenute stope su ubrzano rasle sa starenjem (5). U Crnoj Gori,

**karcinom dojke je najčešće** dijagnostifikovani maligni tumor **kod žena i ujedno najčešći uzrok smrti.** **24**



Prema zvaničnim statističkim podacima estimiranim od strane EUCAN-a 2012. godine, procijenjena stopa incidence u Crnoj Gori iznosila je 75,9 na 100.000 stanovnika, sa 261 novodijagnostifikovanom pacijentkinjom godišnje (Grafikon 6) (4). Prema stopi mortaliteta koja je procijenjena na 27,6 na 100.000 stanovnika, Crna Gora se nalazila na petom mjestu među evropskim državama (Grafikon 7) (4). Grafikon 6: Procijenjena incidenca maligniteta prema lokalizaciji kod žena u Crnoj Gori. Izvor: EUCAN 2012 (4). Grafikon 7: Procijenjena stopa mortaliteta kod žena u Crnoj Gori, prema lokalizaciji maligniteta. Izvor: EUCAN 2012 (4). Ako govorimo o podacima dostupnim u lokalnim bazama podataka u Crnoj Gori, podaci o incidenci, prevalenci i mortalitetu karcinoma dojke dostupni su u okviru Registra malignih neoplazmi Crne Gore koji postoji od 01.01.2013. godine. Podaci Registra malignih neoplazmi Crne Gore za 2013-tu godinu, objavljeni su u prvom izvještaju Instituta za Javno Zdravlje u martu 2018. godine (6). Na osnovu ovih podataka, tokom 2013. godine u Crnoj Gori je registrovano ukupno 2.784 novih slučajeva obolijevanja od malignih neoplazmi (od toga je bilo 325 slučajeva nemelanomskih malignih neoplazmi kože, što predstavlja 11,7% od ukupnog broja malignih neoplazmi. Kod žena, najčešća maligna neoplazma bio je karcinom dojke, čineći jednu četvrtinu svih malignih neoplazmi kod žena (Grafikon 8) (6). Grafikon 8: Vodeće lokalizacije sa procentualnom raspodjelom po polovima. Izvor: Maligne neoplazme u Crnoj Gori 2013. Izvještaj br. 1, mart 2018 (6). Stopa incidence karcinoma dojke u Crnoj Gori na osnovu podataka za 2013. godinu, iznosila je 1.1. Kada govorimo o mortalitetu, skoro svaka peta umrla pacijentkinja od maligne bolesti imala je dijagnozu karcinoma dojke (6). U posljednjoj deceniji, u razvijenim zemljama svijeta je zabilježen pad smrtnosti žena oboljelih od karcinoma dojke. Pad mortaliteta posljedica je izrazitog napretka u liječenju ove bolesti i sve većeg broja raspoloživih terapijskih opcija koje se danas koriste u njihovom liječenju. Naročito je napredak postignut u liječenju HER2 pozitivnog karcinoma dojke, usljed razvoja i dostupnosti bioloških lijekova koji ciljano djeluju i obezbjeđuju značajan benefit u preživljavanju kod ove grupe pacijentkinja. Takođe, pad smrtnosti u razvijenim zemljama svijeta, posljedica je i organizovanog pristupa menadžmenta karcinoma dojke, odnosno implementacije „skreening“ programa i ranog otkrivanja oboljelih žena.

## 1.2. Etiologija karcinoma dojke Etiologija karcinoma dojke je multifaktorijalna.

3

Etiološki put karcinoma dojke započinje još „in utero“ i nastavlja se tokom života izloženošću mnogim faktorima rizika u različitim životnim razdobljima. Deskriptivni etiološki podaci jasno ukazuju da je karcinom dojke bolest naprednog društva koje je usvojilo „zapadnjački životni stil“, a koje karakteriše visoko kalorična ishrana, bogata životinjskim mastima i proteinima, sa manjkom fizičke aktivnosti. Regioni u svijetu koje već dugo karakteriše ovakav životni stil (Australija, Sjeverna Amerika, Sjeverna Evropa) dosegli su plato incidence karcinoma dojke sa godišnjom stopom od 70 do 90 novih slučajeva na 100.000 stanovnika. Međutim, države koje su relativno skoro ušle u fazu industrijalizacije i napretka, pokazuju porast u incidenci i smrtnosti od karcinoma dojke, kao na primjer: Indija, Japan, Republika Korea. Dokazano je da izloženost nekim drugim specifičnim faktorima rizika ima udjela u razvoju karcinoma dojke (kao npr: zračenje, alkohol, egzogeni hormoni), ali je taj udio manji u odnosu na prethodno pomenuti stil života. Faktore rizika za nastanak karcinoma dojke možemo svrstati u sedam kategorija i to: starost, pol, nasljeđe, reproduktivni ciklus žene, izloženost hormonima (endogenim i egzogenim), histološki faktori rizika i stil života (fizička aktivnost, alkohol, pušenje) (7,8). 1.2.1. Starost Karcinom dojke pokazuje porast učestalosti sa starenjem. Oko četvrtina karcinoma dojke nastaje prije 50. godine života. Manje od 5% karcinoma dojke

nastaje prije 35. godine života. Učestalost karcinoma dojke nastavlja da raste sa starenjem ženske populacije (9). 1.2.2. Pol Karcinom dojke se javlja sa većom učestalošću kod osoba ženskog pola u odnosu na muškarace. Rijetko se javlja kod muškaraca i doprinosi ukupnoj učestalosti karcinoma dojke sa oko 1%. Najveći rizik za nastanak karcinoma dojke imaju muškarci koji su nosioci određenih hormonskih dizbalansa, sa kliničkim poremećajima kao što su ginekomastija i ciroza. Takođe, u riziku da obole od karcinoma dojke su i muškarci izloženi zračenju, muškarci sa pozitivnom porodičnom anamnezom i genetskom predispozicijom (10). 1.2.3. Nasljeđe Karcinom dojke pokazuje sklonost porodičnom grupisanju više od bilo koje druge vrste neoplazmi kod čovjeka. Većina studija ukazuje da prvostepeni srodnici pacijentkinja oboljelih od karcinoma dojke

imaju dva do tri puta veći rizik za nastanak ove bolesti,

44

bez obzira na starost i lokalizaciju bolesti. 5% - 10% svih slučajeva karcinoma dojke uzrokovano je nasljeđem. Ovaj procenat se može kretati i do 25% kod žena mlađih od 30 godina (11). Dokazi ukazuju na poligensku prirodu ove bolesti. Međutim, identifikovana su dva visoko penetrantna gena koji u najvećoj mjeri povećavaju rizik od pojave karcinoma dojke. To su BRCA1 i BRCA2. Dodatno, opservacione studije sprovedene na čitavom genomu (GWIS – genome-wide association studies), koje ispituju povezanost setova genskih varijacija kod različitih individua sa rizikom od nastanka bolesti, nedavno su identifikovale dodatne polimorfizme i gene niske do umjerene penetrantnosti, koji nose manji rizik od pojave karcinoma dojke (12). U populacionoj studiji, na uzorku od 559 pacijentkinja oboljelih od karcinoma dojke, dijagnostikovanih prije 80-te godina života, relativni rizik za razvoj karcinoma dojke bio je 1.8 za prvostepene srodnike, njih 49.202 u ovom uzorku (11). Relativni rizik iz ovog ispitivanja potvrdila je Kolaborativna grupa za hormonske faktore kod karcinoma dojke u meta-analizi sprovedenoj na uzorku koji je obuhvatio 58.209 žena sa karcinomom dojke i 10.198 žena bez dijagnoze ove bolesti (13). Mnogi istraživači su utvrdili pojavu multiplih slučajeva karcinoma dojke u porodicama, sistematskim sakupljanjem istorija bolesti oboljelih i njihovih srodnika. Analize srodnika zabilježile su određene razlike u prirodi karcinoma dojke sa pozitivnom porodičnom anamnezom, u odnosu na bolest kod onih u čijoj porodici karcinom dojke nije bio prisutan. Razlike su se ogledale u sljedećem: zabilježen je značajno raniji početak bolesti, pojava bilateralne bolesti, specifična povezanost sa drugim malignitetima u porodici, i vertikalna prenosivost. Zahvaljujući ovim zapažanjima, definisan je sindrom porodičnog karcinoma dojke (14). Prvi značajan pomak u rasvjetljavanju genetske predispozicije za obolijevanje od karcinoma dojke dali su Newman i saradnici 1988. godine, pronalaskom autozomno- dominantnog modela nasljeđivanja sa rijetkim ali visoko penetrantnim predisponirajućim alelom. Rezultati ovog istraživanja su ukazali da je naslijeđena predispozicija za obolijevanje od karcinoma dojke bila prisutna kod 4% porodica u ispitivanom uzorku (15). Uslijedila su brojna istraživanja na cjelokupnom genomu sa ciljem pronalaženja povezanosti genetskih mapa sa pojavom multiplih karcinoma dojke u porodicama, koje su jasno imale autozomno-dominantan obrazac nasljeđivanja. Ovo je dovelo do pronalaska BRCA1 lokusa na 17-om hromozomu 1990. godine i BRCA1 genske sekvence nekoliko godina kasnije (16,17). Istraživanja su pokazala se da se mutacija na BRCA1 lokusu uglavnom javlja kod porodica sa multiplim slučajevima rano nastalog karcinoma dojke (prije 50-te godine), te da je istovremeno značajno predisponirajuća za nastanak karcinoma ovarijuma (18). Ovakav rezultat istraživanja obezbijedio je dokaz genetske osnove Breast-ovarian cancer sindroma, prethodno definisanog 1978. od strane

Henry Lynch-a. Konzorcijum istraživača na čelu sa Michael Stratton-om je prepoznao da porodice sa multiplim slučajevima karcinoma dojke koje imaju bar jedan slučaj karcinoma kod muškog člana, nijesu povezane sa pojavom mutacije na 17q21 na BRCA1 lokusu. Kod ovih porodica ista grupa je identifikovala 13q12 mutaciju na BRCA2 lokusu (19). Pronalazak BRCA1 i BRCA2 gena, omogućilo je razlikovanje specifičnih porodičnih fenotipova karcinoma dojke. Značaj ovih istraživanja je utoliko veći što je pokrenulo čitav niz istraživanja na genomu, koja su urodila pronalaskom niza genskih mutacija predisponirajućih za razvoj karcinoma dojke u okviru nasljednih sindroma. Takva je mutacija PTEN gena pronađena 1997. udružena sa nastankom Cowden sindroma, kojeg karakteriše pojava multiplih hamartoma i povećan rizik za nastanak karcinoma dojke, štitaste žlijezde i karcinoma genito-urinarog trakta (20,21). Takođe i mutacija ATR gena pronađena kod porodica sa rijetkim oboljenjem ataxia telangiectasia, kod koje postoji umjereno povećan rizik za nastanak karcinoma dojke (22,23). U narednim godinama identifikovan je određeni broj genskih mutacija povezanih sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke, analizom sporadičnih, specifičnih uzoraka, kao i čitav niz germline mutacija (24-26). Od 2007. godine do danas, istraživanjima na genomu pronađeno je gotovo 20 novih alela gena udruženih sa nastankom karcinoma dojke, koji za razliku od alela povezanih sa porodičnim karcinomom dojke, imaju višočiju prevalencu u opštoj populaciji, i vrlo mali rizik (manji od 1.25) za nastanak ove bolesti (27). BRCA1 i BRCA2 genske mutacije zajednički i dalje čine najveći procenat porodičnog rizika za nastanak karcinoma dojke (oko 20%). TP53 i PTEN mutacije su isuviše rijetke da bi dale značajan doprinos opštem riziku. Gore pomenutih 20 genskih alela sa niskim rizikom za nastanak karcinoma dojke, čine manje od 5% ukupnog rizika za nastanak ove bolesti (27). Osim porodične istorije karcinoma dojke, smatra se da je lična istorija bolesti, tj. prethodna dijagnoza karcinoma dojke u jednoj dojci povezana sa većim rizikom od nastanka bolesti u kontralateralnoj dojci, kod iste pacijentkinje.

#### 1.2.4. Reproductivni ciklus žene

Reproduktivna životna istorija kod žene je značajno povezana sa rizikom za nastanak karcinoma dojke. Smatra se da određeni događaji u reproduktivnoj dobi žene koji povećavaju njenu sveukupnu izloženost estrogenu, mogu povećati vjerovatnoću za nastanak karcinoma dojke. Pomenuti događaji uključuju sljedeće: pojava merhe prije 12. godine života, prvo rođenje djeteta nakon 30. godine, nuliparitet i menopauza nakon 55. godine (28,29). Sterilitet kao i odsustvo dojenja takođe nose veći rizik za nastanak ove bolesti (30). Većina ovih faktora pronađeno je da su od značaja u zemljama sa nižim rizikom za nastanak karcinoma dojke, kao što su Japan i Kina. Rađanje prije 30-te godine predstavlja protektivni faktor za nastanak karcinoma dojke (31). Smatra se da promjene u reproduktivnom ciklusu kod žene značajnije doprinose povećanju rizika od karcinoma dojke u državama kao što su Kina i Singapur. Istraživanja u afričkoj populaciji potvrđuju udruženost povećanog rizika sa prvim rođenjem u kasnijim godinama, manjim brojem trudnoća i kraćim dojenjem (32). Podaci su oprečni u različitim studijama po pitanju povezanosti abortusa sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke. Mada se dojenje inicijalno smatralo protektivnim faktorom, mnoga istraživanja govore o ograničenom protektivnom značaju dojenja za nastanak ove bolesti. Protektivni značaj smatra se da je ograničen samo na dugotrajno, kumulativno dojenje, po mogućnosti duže od dvije godine (33).

#### 1.2.5. Izloženost hormonima

##### 1.2.5.1. Endogeni hormoni

Brojne epidemiološke studije potvrđuju da polni steroidni hormoni (androgeni, estrogeni i progesteron) imaju značajnu ulogu u nastanku karcinoma dojke. Incidenca karcinoma dojke bilježi oštar porast sa starenjem prije menopauze (oko 8% godišnje); dok je nakon menopauze ovaj porast svega oko 2% godišnje, što se poklapa sa prestankom sinteze estrogena i progesterona u ovarijumima i proporcionalnim padom ovarijalne produkcije androgena (34). Rezultati brojnih istraživanja pokazuju da postoji značajna povezanost nivoa estrogena i testosterona u krvi kod postmenopauzalnih žena sa rizikom za nastanak karcinoma dojke. Podaci prospektivnog istraživanja pokazuju da je ova povezanost nezavisna od nivoa

gojaznosti kod žene i nezavisna od ostalih faktora rizika (35). Rizik od karcinoma dojke je 3 – 4 puta veći sa porastom koncentracije ovih hormona u krvi, i naročito je izražen kod karcinoma klasifikovanih kao estrogen receptor pozitivni (36). Kod predmenopauzalnih žena, visoka folikularna koncentracija totalnog i slobodnog estradiola, kao i testosterona, je povezana sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke. Međutim, visoka koncentracija progesterona i polnog vezujućeg globulina (SHBG – sex hormon binding globulin) nisu u vezi sa povećanim rizikom za nastanak ove bolesti (37). Povećana koncentracija prolaktina je udružena sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke i kod pred i postmenopauzalnih žena (38) i predominantno je udružena sa nastankom estrogen pozitivnog (ER) karcinoma dojke (39).

1.2.5.2. Egzogeni hormoni Upotreba estrogena i progesterona u terapijske svrhe ili u svrhe suplementacije kod različitih stanja povezana je sa rizikom za nastanak karcinoma dojke. Dva najčešća slučaja u praksi su upotreba hormona u svrhe kontracepcije prije menopauze kod žena, kao i upotreba u svrhe hormonske terapije kod postmenopauzalnih žena. Oralni kontraceptivi Inicijalno sprovedena istraživanja su sugerisala da primjena oralnih kontraceptiva može biti u vezi sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke, zahvaljujući sadržaju estrogena i progestina (sintetski progesteron sličan progesteronu) u koncentracijama koje mogu premašiti koncentraciju proizvedenu tokom normalnog ovulatornog ciklusa žene (40). Podaci preko 50 sprovedenih studija koje su obuhvatile 53.000 ispitanica, pokazale su da upotreba oralnih kontraceptiva ima mali doprinos u porastu rizika od karcinoma dojke, čak i kod žena koje su koristile oralne kontraceptive 10 i više godina (41). Međutim, žene koje trenutno uzimaju oralne kontraceptive ili su ih uzimale nedavno (<10 godina od posljednje primjene), imaju umjereno povišen rizik za razvoj karcinoma dojke (relativni rizik 1.24, 24% povišen rizik) u odnosu na one koje nikada nijesu koristile oralne kontraceptive. Međutim, relativni rizik kod žena 1 – 4 godine nakon prestanka primjene oralnih kontraceptiva iznosi 1.16, u poređenju sa relativnim rizikom 1.07 zabilježenim kod onih koje su prije 5 – 9 godina prestale sa primjenom ovih agenasa (42). Prema IARC kombinovani estrogen-progesteron oralni kontraceptivi spadaju u klasu 1 karcinogena. Skorašnja studija sprovedena na nacionalnom nivou u Sjedinjenim Američkim Državama pokazala je da trenutne korisnice oralnih kontraceptiva nemaju rizik od pojave karcinoma dojke, što se smatra da je u vezi sa izmijenjenom strukturom oralnih kontraceptiva koji se danas koriste u poređenju sa pređašnjima (43).

Hormonska supstitucionna terapija u postmenopauzi Brojna istraživanja sprovedena u posljednjih 30 godina upućuju na postojanje povećanog rizika za nastanak karcinoma dojke kod dvije grupe žena post- menopauzalne dobi koje su koristile estrogene kao supstitucionu terapiju: žene koje su dugotrajno na supstitucionoj terapiji i one koje su trenutni korisnici iste. Razlike u visini rizika između ove dvije grupe, uglavnom zavise od toga da li je supstitucionna terapija uključivala samo estrogene ili kombinaciju estrogena sa progestinom. Supstitucionna terapija estrogenima Među postmenopauzalnim ženama koje su koristile supstitucionu terapiju estrogenima, studije su pokazale da najveći rizik za obolijevanje od karcinoma dojke imaju žene koje su najduže koristile mono terapiju estrogenima (42). Među ženama koje su u posljednjih 5 godina bile na ovoj terapiji, relativni rizik je iznosio 1.1 i bio veći kod onih koje su na terapiji bile 1 – 4 godine u odnosu na one koje nikada nijesu bile na supstitucionoj hormonskoj terapiji. Relativni rizik je iznosio 1.3 kod onih koje su na terapiji bile 5 – 9 godina, 1.2 kod onih koje su na terapiji bile 10 – 14 godina, te 1.6 kod onih koje su na terapiji bile 15 i više godina. Rizik je bio značajno veći kod mršavih u odnosu na gojazne žene (koje prirodno imaju viši endogeni nivo estrogena) (42). Kod žena koje su prestale koristiti hormonsku supstitucionu terapiju u postmenopauzi u posljednjih 5 godina ili više, nije primijećen povećan rizik za nastanak karcinoma dojke, bez obzira na dužinu trajanja terapije prije prekida. Kontrolisana randomizovana studija koju je sprovedla Ženska zdravstvena inicijativa (WHI, Women Health Initiative) pokazala je da žene koje su koristile

estrogensku supsticionu terapiju zbog prethodne histerektomije nijesu imale povišen rizik za nastanak karcinoma dojke u narednih devet godina (44). Chen i saradnici su kasnije potvrdili izostanak povišenog rizika u ovoj populaciji žena u narednih 10 godina, dok je nakon 20 godina rizik iznosio 1.42 (95% CI, 1.05–2.07) (45). Takođe, one pacijentkinje kod kojih se javljao, karcinom je pretežno bio ER pozitivan. Podaci studije 1.000.000 žena sprovedene u UK, pokazali su da je povećan rizik za nastanak karcinoma dojke udružen sa primjenom estrogena kao monoterapije, rizik je bio veći kod onih koje su ovu terapiju počele koristiti u prvih 5 godina od nastanka menopauze, kao i kod mršavijih žena (46,47). Supsticiona terapija kombinacijom estrogena i progestina U periodu između 1980. i 2000. godine porasla je primjena kombinovane supsticione terapije, dodatkom progestina estrogenu, što je smanjilo rizik od nastanka hiperplazije i karcinoma endometrijuma, uzrokovanih korišćenjem supsticione monoterapije estrogenima kod postmenopauzalnih žena. Međutim, studije sprovedene u posljednjih 15 godina pokazale su da dodatak progestina ne smanjuje rizik od karcinoma dojke (42, 48). Naprotiv, istraživanje koje je sprovedla Ženska zdravstvena inicijativa (WHI, Women Health Initiative) pokazalo je da žene koje koriste supsticionu terapiju kombinacijom estrogena i progestina imaju povišen rizik za nastanak karcinoma dojke, te da ovaj rizik raste sa dužinom trajanja primjene ove terapije (49,50). Rezultati prethodno pomenute studije 1.000.000 žena sprovedene u UK, su ovo potvrdile, navodeći da je rizik kod žena liječenih mono terapijom estrogenima bio 1.30 (95% CI, 1.22–1.38) u odnosu na one koje nikada nijesu bile na supsticionoj terapiji, dok je relativni rizik bio značajno veći 2.0 (95% CI, 1.91– 2.09) kod onih koje su koristile progestine u kombinaciji sa estrogenima (46). Skorašnje istraživanje iste grupe, ukazalo je da je u istoj ispitivanoj grupi žena povišen i mortalitet od karcinoma dojke (51). Ista studija ukazala je na mali značaj uticaja doze estrogena i formulacije na rizik za nastanak ove bolesti. IARC je 2007. zaključio da je kombinacija estrogena i progestina kancerogena (IARC Working Group Combined estrogen-progestogen) (52).

### 1.2.6. Histološki faktori rizika

Histološke abnormalnosti dijagnostifikovane biopsijom tkiva dojke čine važnu kategoriju među faktorima rizika za nastanak karcinoma dojke. U histološke abnormalnosti kao faktore rizika ubrajamo: duktalni karcinom in situ (DCIS) i proliferativne promjene sa atipijom.

### 1.2.7. Stil života

#### 1.2.7.1. Gojaznost

Veza između gojaznosti i rizika za nastanak karcinoma dojke zavisi od menopauzalnog statusa žene. U naprednim industrijalizovanim zemljama, gojaznost je obrnuto srazmjerna riziku za nastanak karcinoma dojke u predmenopauzi, dok je direktno srazmjerna riziku u postmenopauzi. U predmenopauzi, žene sa višim „body mass index“ (BMI) češće imaju iregularne menstrualne cikluse i povišenu stopu anovulatornog infertiliteta, što sugerise da je njihov manji rizik za nastanak karcinoma dojke rezultat redih ovulatornih ciklusa i manje izloženosti ovarijalnim hormonima (53). Kontrolisane prospektivne studije sprovedene u naprednim industrijalizovanim zemljama, pokazale su iznenađujuće slabu povezanost između povišenog BMI i rizika za nastanak karcinoma dojke (54), uprkos činjenici da gojazne žene u postmenopauzi imaju i do dvostruko viši nivo cirkulišućih estrogena u odnosu na žene sa niskim BMI (55). Ovakvi podaci mogu se objasniti protektivnim uticajem visokog BMI ukoliko je on rezultat gojaznosti stečene u predmenopauzi. Značajniji uticaj na rizik od ove bolesti ima zapravo gojaznost stečena nakon menopauze, kako potvrđuju brojne studije (56-59). Međutim, postmenopauzalnu gojaznost je teško dovesti u jasnu vezu sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke, obzirom da je teško utvrditi da li je visok nivo estrogena kod ovih žena endogenog porijekla ili je posljedica egzogene hormonske terapije. Rezultati Nurse Health studije su pokazali

**da je rizik od** karcinoma **dojke bio** dvostruko veći **kod žena koje su**

39

dobile 25 kg u tjelesnoj masi ili više nakon 18-te godine života, u poređenju sa ženama koje nakon 18. godine nijesu imale više od 2 kg varijacije u tjelesnoj težini (58). IARC je zaključio da je prekomjerna tjelesna težina i gojaznost jedan od uzroka karcinoma dojke u postmenopauzi (60). Manji broj studija je sproveden kod žena koje su u menopauzi izgubile na tjelesnoj težini, uglavnom jer je ovakvih žena manje. Nurse Health studija sprovedena u UK upućuje da je gubitak u tjelesnoj težini nakon menopauze u vezi sa smanjenim rizikom od karcinoma dojke, naročito ER-pozitivnog karcinoma (61). Žene koje izgube 10 ili više kilograma u tjelesnoj težini i taj gubitak održe u post- menopauzi, imaju 40% niži rizik za nastanak karcinoma dojke.

1.2.7.2. Fizička aktivnost Na osnovu istraživanja sprovedenog od strane IARC, može se zaključiti da je viši nivo fizičke aktivnosti udružen sa smanjenim rizikom od karcinoma dojke kako u postmenopauzi, tako i u predmenopauzi (60). Skorašnja istraživanja su pokazala da ovaj protektivni efekat fizičke aktivnosti ne zavisi od rase, niti etničke pripadnosti (62). Najveći značaj u smanjenju rizika od karcinoma dojke, fizička aktivnost ima kod onih žena koje su održale visok nivo fizičke aktivnosti nakon menarhe tokom života (62, 63).

1.2.7.3. Ishrana Postoje podaci koji govore da osobe sa zdravim obrascom ishrane imaju smanjen rizik od nastanka karcinoma dojke. Međutim, skorašnje meta-analize i velike kohortne studije upućuju na nedostatak dokaza o povećanom riziku za nastanak karcinoma dojke kod osoba koje su usvojile „zapadnjački“ nezdravi način ishrane (64-66), kao i da ishrana bogata povrćem nije udružena sa smanjenim rizikom od karcinoma dojke (67). Ubrzan rast i veća tjelesna visina kod odraslih, nastale kao posljedica prekomjerne ishrane u ranim godinama života, nosi povećan rizik za nastanak ove bolesti. Takođe, visok BMI koji je posljedica visokog unosa kalorija, kao i nasrazmjere između unosa i kalorijske potrošnje, je faktor rizika za post- menopauzalni karcinom dojke. Ukupan unos masti, kao i zasićenih životinjskih masti, može povećati rizik. Povećani unos crvenog mesa, naročito prženog, udružen je sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke (66).

1.2.7.4. Alkohol Konzumacija alkohola nosi umjereno povećan rizik za nastanak karcinoma dojke (68,69). Smatra se da postoji dozna zavisna veza (broj alkoholnih pića na dan), te da je čak i nizak nivo konzumacije alkohola udružen sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma dojke. Istraživanja ukazuju da visok unos folata ili visok nivo folata u krvi, smanjuje rizik za nastanak ove bolesti (70).

1.2.7.5. Pušenje Rezultati izvještaja opštih hirurga iz Sjedinjenih Američkih Država o zdravstvenim posljedicama pušenja (US Surgeon Generals' report) iz 2004. godine ukazuje da ne postoji uzročna veza između aktivnog pušenja i karcinoma dojke (71). Međutim, dodatni podaci su prikupljeni u posljednjih desetak godina koji govore suprotno. Kanadska radna grupa je 2009. godine sprovela analizu, koja je rezultovala zaključkom da je aktivno pušenje uzročno povezano sa karcinomom dojke kod žena u pre-menopauzi kao i u postmenopauzi. Štaviše, ovo istraživanje je zaključilo da je sekundarno pušenje („pasivno pušenje“) uzročno povezano sa nastankom predmenopauzalnog karcinoma dojke (72).

1.3. Histološka klasifikacija karcinoma dojke Na osnovu histoloških karakteristika, invazivni karcinomi dojke se dijele u različite podtipove, prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (73): •

**Invazivni karcinom bez posebne oznake (NOS) • Invazivni lobularni karcinom • Tubularni karcinom •** 3  
**Kribriformni karcinom • Mucinozni karcinom • Karcinom** sa **medularnim** karakteristikama •  
**Karcinom** sa **apokrinom diferencijacijom • Karcinom** sa **diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka •**  
**Invazivni mikropapilarni karcinom • Metaplastični karcinom bez posebne oznake**

## • Ostali rijetki podtipovi 1.3.1. Invazivni

**karcinom bez posebne oznake** (NOS) **Invazivni karcinom** dojke **bez** specifične **oznake** (NOS), poznatiji je

3

kao duktalni karcinom dojke NOS, i obuhvata najveću grupu invazivnih karcinoma dojke. Predstavlja heterogenu grupu tomora koje nije jednostavno opisati, obzirom da ne eksprimiraju posebne karakteristike da bi se mogli klasifikovati u neku od histološki specifičnih tipova karcinoma dojke (kao lobularni ili tubularni karcinom dojke). Takođe, nomenklatura ovog tipa karcinoma dojke se mijenjala u prošlosti: od infiltrativni duktalni karcinom, scirozni, karcinom sfernih ćelija, carcinoma simplex do invazivni karcinom bez dodatne oznake (NOS – non otherwise specified). Pojam duktalni koji je često u primjeni, vodi porijeklo od koncepta da su ovi tumori nastali isključivo diobom duktalnih epitelnih ćelija tkiva dojke, što je suštinski pogrešan koncept. Štaviše, dokazano je da većina karcinoma dojke potiče od ćelija distalne jedinice lobulusa (74,75). Invazivni karcinom dojke bez specifične oznake (NOS) je najčešći histološki tip invazivnog karcinoma dojke i u literaturi se javlja sa učestalošću od 40% do 70%. Ovaj histološki tip karcinoma dojke se rjeđe javlja prije 40. godine, ali je procentualno podjednako zastupljen među ostalim histološkim tipovima prije i poslije 40. godine starosti (76). Invazivni karcinom bez specifične oznake (NOS) rjeđe se javlja nakon dijagnoze nekih promjena u dojci koje mogu biti povezane sa povećanim rizikom za nastanak karcinoma, kao što je atipična duktalna hiperplazija i lobularna neoplazija, za razliku od tubularnog i klasičnog lobularnog karcinoma (77,78). Makroskopski, ovi tumori nemaju specifične karakteristike. Najčešće su čvrsti ili čak tvrdi pri palpaciji, mogu dati pjeskovit osjećaj kad se zarezū nožem, a na presjeku njihova površina je obično sivo-bijele boje sa žutim prugama. Mogu varirati u veličini od 10 do 100 mm. Mogu imati nepravilan satelitski oblik ili nodularnu konfiguraciju, bez oštih granica prema bolesnom tkivu. Histopatološka dijagnoza invazivnog karcinoma bez specifične oznake (NOS) postavlja se isključivanjem svih ostalih, specifičnih tipova karcinoma dojke. Posljedično, morfološke karakteristike ovih tumora mogu biti jako varijabilne, uključujući: visoko infiltrativne kao i one sa gurajućim marginama. Tumorske ćelije mogu biti različito organizovane, nekada mogu imati i glandularnu ili tubularnu diferencijaciju, ali sa odsustvom prave citomorfološke slike tubularnog karcinoma. Ćelije mogu pokazivati najrazličitije karakteristike, nekada eozinofilnu citoplazmu. U preko 80% slučajeva ovaj karcinom je udružen sa lokusima duktalnog invazivnog karcinoma in situ (DCIS) istog nuklearnog gradusa (Slika 1)(73). Slika 1: A. Invazivni karcinom nespecifičnog tipa (NOS), gradus I; B. Invazivni karcinom NOS, gradus 2; C. Invazivni karcinom NOS, gradus III bez znakova žljezdane diferencijacije. Izvor: WHO classification of tumor of the breast, 2012 (73). Da bi tumor bio dijagnostifikovan kao NOS tip, potrebno je da je nespecifična komponenta u tumorskoj masi zastupljena sa više od 50%, na pregledima reprezentativnih isječaka tumorskog tkiva. Ukoliko je nespecifična komponenta zastupljena sa 10 - 49%, e ovaj tumor će biti definisan kao mješoviti invazivni NOS i specifični tip ili kao mješoviti invazivni NOS i lobularni tip karcinoma dojke. Opisane su i rijetke varijacije invazivnog karcinoma NOS, koje usljed rijetke zastupljenosti u praksi, na ovom mjestu nećemo detaljno opisivati. Ovdje spadaju: 1) pleomorfni karcinom 2) karcinom sa osteoklast-nalik velikim stromalnim ćelijama 3) karcinom sa horiokarcinomatoznim karakteristikama 4) karcinom sa melanotičnim karakteristikama Slučajevi porodičnog karcinoma dojke udruženog sa BRCA1 mutacijom često su invazivni karcinomi NOS histološkog tipa, ali pokazuju karakteristike medularnom- nalik

karcinomu dojke (14). Porodični karcinom dojke udružen sa BRCA2 mutacijom često je invazivni karcinom NOS histološkog tipa s karakteristikama tubularnom-nalik karcinomu dojke (14). Skorašnja istraživanja povezanosti genetskih mutacija sa određenim histološkim tipom ili gradusom tumora, ukazala su da NOS tip obuhvata veliku grupu tumora nastalih nepovezanim genetskim mutacijama, te da se one razlikuju od onih mutacija koje sriječemo kod specifičnih histoloških tipova karcinoma dojke (79-81). Štaviše, molekularnim profiliranjem je dokazano da se invazivni karcinomi dojke NOS mogu klasifikovati u molekularne podtipove na osnovu obrazaca genetskih mutacija koje eksprimiraju (82,83). Invazivni karcinom dojke bez posebne oznake (NOS) ima 10-to godišnju stopu preživljavanja 35 – 50%, u odnosu na stopu od 55% kod svih karcinoma dojke uopšte (84). Ovakva prognoza svakako je posljedica uticaja prognostičkih faktora: histološkog gradusa, veličine tumora, limfo-nodalnog statusa i vaskularne invazije. Približno 70 – 80% ovih karcinoma su ER-pozitivni, i približno 15% su HER2 pozitivni. Pomenuti prognostički i prediktivni faktori određuju i terapijski izbor kod ovih karcinoma dojke.

### 1.3.2. Invazivni lobularni karcinom dojke (ILC)

Invazivni lobularni karcinom dojke sastoji se od nekohezivnih, rasutih ćelija, ili pak ćelija organizovanih u linearne tračke unutar fibrozne strome. Obično je u vezi sa lobularnim karcinomom in situ (LCIS). Invazivni lobularni karcinom (ILC) predstavlja 5 – 15% svih invazivnih tumora dojke (84-86). Od 80-ih godina prošlog vijeka, incidenca invazivnog lobularnog karcinoma (ILC) zabilježila je porast koji je u vezi sa porastom incidence invazivnog karcinoma dojke bez specifične oznake (NOS) (87). Ovakav porast incidence pripisuje se povećanoj primjeni hormonske supstitucione terapije (88-92) ili povećanoj konzumaciji alkohola (93). Pacijenti sa invazivnim lobularnim karcinomom (ILC) dojke mogu biti neznatno stariji od pacijenata sa invazivnim karcinomom dojke bez specifične oznake (NOS). Srednja starost pacijenata sa ILC je 57 do 65 godina (94-96). Ako govorimo o kliničkim karakteristikama ovog tumora, invazivni lobularni karcinom dojke (ILC) se prezentuje kao palpabilna masa. Rezultati israživanja iz 2007. godine koje su sproveli Wincester i saradnici, ukazuju da se lobularni invazivni karcinom nešto češće javlja sa centralnom lokalizacijom nego NOS tip (97). Radiografski, ovaj karcinom se najčešće prezentuje u vidu nazupčene mase ili kao arhitekturna distorzija. U poređenju sa invazivnim karcinomom NOS tipa, mamografija je manje senzitivna metoda za otkrivanje invazivnih lobularnih karcinoma, i ima senzitivnost 57 – 89%. Stoga, relativno je visok procenat lažno negativnih mamografskih nalaza za LIC, 19% (98,99). Ultrazvuk je senzitivnija metoda od mamografije za otkrivanje lobularnih invazivnih karcinoma dojke, sa senzitivnošću 78 – 95%, mada se njome često potcijeni veličina tumora (100-102). Magnetna rezonanca kao imidžing metoda je mnogo senzitivnija i od veće pomoći sa postavljanje dijagnoze invazivnog lobularnog karcinoma dojke (ILC), zahvaljujući mogućnosti vizuelizacije multifokalnih promjena u dojci, mada i ova tehnika može dati lažno pozitivne nalaze i precijeniti veličinu tumorske mase (103). Kod lobularnog invazivnog karcinoma primijećena je i veća incidenca karcinoma, naročito sinhronih u kontralateralnoj dojci nego kod invazivnog karcinoma NOS tipa, i ona iznosi 5 – 19% (104,105). Na osnovu makroskopskog pregleda lobularni invazivni karcinom je često teško definisati, obzirom da se prezentuje kao nepravilna i nejasno ograničena tumorska masa (106). Iz istog razloga, teško je odrediti i veličini ovih tumora pri makroskopskom pregledu tkiva, mada su često veći od invazivnog NOS karcinoma (107-109). Uobičajeni histopatološki obrazac invazivnog lobularnog karcinoma dojke (ILC) karakterišu male nekohezivne ćelije u slabo celularnom vezivnom tkivu dojke koje su dijelom organizovane u jednostruke ćelijske trake. Često se nalaze koncentrične formacije oko normalnih duktusa u tkivu dojke. Tumorske ćelije obično imaju okrugla ili zarezana ovoidna jedra, tanak obod citoplazme, ponekad mogu imati citoplazmatski lumen ispunjen mukoznom tečnošću (110). Mitoze su rijetke (Slika 2) (73). Ovakve klasične histopatološke karakteristike su iste kao one koje se srijeću kod lobularne neoplazije, koja je u 58% - 98% slučajeva



udružena sa invazivnim lobularnim karcinomom dojke (ILC) (111,112). Slika 2: A. Invazivni lobularni karcinom; B. Gubital ekspresije E-kadherina tipičan za ćelije lobularnog karcinoma; C. Veliki broj ćelija nalik prstenu pečatnjaku i intracitoplazmatski lumeni ispunjeni sekretom. Izvor: WHO classification of tumor of the breast, 2012 (73). U literaturi je opisano nekolikohistoloških varijacija invazivnog lobularnog karcinoma dojke (ILC) koji imaju iste citološke karakteristike ili obrazac rasta kao klasični ILC, ali se razlikuju po odsustvu međućelijske kohezije. 1) Solidni tip karakterišu tipične nekohezivne, male ćelije sa lobularnom morfologijom koje stvaraju veće nakupine. Ćelije su češće pleomorfne sa većim brojem mitozama nego kod klasičnog histološkog tipa invazivnog lobularnog karcinoma (ILC) (113). 2) Alveolarni tip je varijacija klasičnog tipa invazivnog lobularnog karcinoma i razlikuje se od klasičnog po organizaciji ćelija u lobularne agregate od po najmanje 20 ćelija (114). 3) Pleomorfni lobularni karcinom (PLC) zadržao je isti obrazac rasta kao klasični histološki lobularni tip invazivnog karcinoma dojke, ali pokazuje veći stepen ćelijske atipije i pleomorfizma, kao i veći broj mitozama nego klasični tip (115,116). Ova histološka varijacija je često udružena sa lobularnim karcinomom in situ (LCIS) istih pleomorfnih karakteristika. PLC može imati apokrinu (115) ili histiocitnu diferencijaciju (117) ili ćelije u obliku prstena pečatnjaka. 4) Tubulolobularni tip karakteriše mješavina tubularnog ćelijskog rasta i malih uniformnih ćelija sa karakterističnim načinom rasta koju nalazimo u lobularnim karcinomima (118). Kod jedne trećine tubulolobularnih karcinoma javlja se pridružen lobularni invazivni karcinom in situ (LCIS). 5) Mješoviti tip predstavlja histološki kombinaciju klasičnog histološkog tipa invazivnog lobularnog karcinoma dojke (ILC) i bilo koje od preostalih histoloških varijacija ovog tumora (111,117). Invazivni karcinomi bez posebne oznake (NOS) u kombinaciji sa invazivnim lobularnim karcinomom čine 5% svih invazivnih karcinoma dojke (85, 119,120). Dugo je razmatrano koliki je značaj histološkog gradiranja lobularnog invazivnog karcinoma dojke (ILC) obzirom na karakteristike ovih tumora kao što su: odsustvo tubularnih formacija (izuzev kod tubulolobularnog tipa), uniforman izgled malignih ćelija i nizak mitotski indeks. Neke studije upućuju na ograničeni prognostički značaj gradiranja ovih tumora (121), dok se prema drugima gradus tumora smatra nezavisnim prognostičkim faktorom (122,123). Većina, 76% invazivnih lobularnih karcinoma dojke (ILC) klasičnih histopatoloških karakteristika, su gradusa 2. Gradus 3 se najčešće srijeće kod ostalih varijacija (solidnog i pleomorfog tipa). Od tri komponente gradiranja, najveći prognostički značaj kod ovih tumora ima mitotski indeks, te je visok broj mitozama udružen je sa lošijom prognozom (123). Podaci iz literature ukazuju da su 80-95% invazivnih lobularnih karcinoma (ILC) estrogen receptor (ER) pozitivni. Estrogenski receptori se eksprimiraju kod klasičnog i kod ostalih varijanti lobularnog invazivnog karcinoma, ali najčešće kod alveolarnog tipa 100% (114), dok se najrjeđe esprimiraju kod pleomorfog tipa ILC- a (PLC) 10% (124). ER pozitivnost se kod invazivnog karcinoma bez posebne oznake (NOS) ređe srijeće, u 70-80% slučajeva. Progesteronski receptori (PG) su pozitivni kod 60-70% svih invazivnih lobularnih karcinoma (ILC) i karcinoma NOS tipa (125). HER2 amplifikacija i hiperekspresija se rijetko srijeću kod invazivnih lobularnih karcinoma dojke (ILC) (125), mada se može naći kod pleomorfog tipa (PLC) (126,127). Ekspresija p53, bazalnih markera (keratin 14, keratin 5/6, EGFR) i mioepitelnih markera (glatko-mišićni aktin, p63) je rijetka kod LIC (128). Stopa proliferacije mjerena na osnovu MIB1/Ki67 je niska kod invazivnog lobularnog karcinoma (ILC), mada može biti visočija kod histopatoloških varijacija ovog karcinoma (119). Jedna od molekularnih alteracija koja se konzistentno srijeće i kod klasičnog ILC i kod drugih histopatoloških varijacija je odsustvo E-kadherina, međućelijske adhezivne veze, koja rezultira tipično nekohezivnim izgledom ovih tumora (129,130). Većina invazivnih lobularnih karcinoma pokazuje i izmijenjen integritet E-kadherin kompleksa, sa nedostatkom alfa, beta, i gama- katenina, i promjenom lokacije p120 katenina iz ćelijske membrane u citoplazmu (130). Analiza ekspresije E-kadherina i p120, mogu

biti od pomoći u diferencijalnoj dijagnozi lobularnog i nisko gradusnog NOS karcinoma,. Međutim invazivni lobularni karcinomi (ILC) mogu biti pozitivni na E-kadherin u do 15% slučajeva (131). Primjenom protočne citometrije dokazano je da su invazivni lobularni karcinomi dojke (ILC) diploidni u oko 50% slučajeva (132). Invazivni lobularni karcinom (ILC) ima manji broj genetskih alteracija u odnosu na invazivni karcinom bez specifične oznake (NOS). Najčešće identifikovane genetske alteracije su: nedostatak dijela hromozoma 16q, kao i dodatni genetski materijal na 1q i 16p (133). Inaktivacija E- kadherina je najčešća genetska alteracija kod invazivnih lobularnih karcinoma (ILC) i javlja se u ranoj fazi onkogeneze (134). Somatske mutacije na genu za E-kadherin (CDH1, mapiran na 16q22.1 lokusu) zajedno sa nedostatkom promotera metilacije dovode do gubitka ekspresije i nedostatka E-kadherina (134). Rezultati nekoliko studija govore u prilog činjenici da je prognoza invazivnog lobularnog karcinoma dojke (ILC) bolja nego prognoza kod invazivnog karcinoma dojke bez specifične oznake (NOS) (86,135). Neke druge studije, međutim, pokazuju suprotne rezultate (125), dok je prema nekim istraživanjima prognoza kod ove dvije grupe karcinoma gotovo ista (136,137). Studije sprovedene na većem uzorku pacijenata neosporno dokazuju da je invazivni lobularni karcinom dojke (ILC) češće većih dimenzija (>5 mm), uznapredovalog gradusa (3/4) i češće udružen sa zahvaćenošću većeg broja limfnih čvorova, nego NOS tip (95). Rezultati ovih istraživanja upućuju da pacijenti sa lobularnim karcinomom dojke (ILC) imaju bolji ili sličan ishod u odnosu na pacijente sa invazivnim NOS tipom karcinoma, u prvih 10 godina nakon dijagnoze. Međutim, dugoročni ishod je lošiji kod ovih pacijeneta nego kod pacijenata sa invazivnim NOS karcinomom dojke, zbog veće incidence udaljenih metastaza, češće rekurencije bolesti i veće smrtnosti (138,139). Analizom ishoda kod različitih histoloških tipova invazivnog lobularnog karcinoma dojke, nešto bolja prognoza je prijavljena kod klasičnog u odnosu na druge tipove, naročito u odnosu na pleomorfni tip (PLC) (119,140). Međutim, tubulolobularni i alveolarni tip se smatraju nisko gradusnim tumorima (141). Primijećen je drugačiji obrazac metastaziranja kod invazivnog lobularnog (ILC) u odnosu na invazivni NOS tip karcinoma dojke. Aksilarne nodalne metastaze su rjeđe kod ILC nego kod NOS tipa karcinoma i njihova učestalost se kreće u rasponu od 35 do 10% (86). Metastaze invazivnog lobularnog karcinoma dojke pokazuju veću tendenciju širenja ka kostima, gastro-intestinalnom traktu, materici i jajnicima, meningeama, kao i tendenciju difuznog zahvatanja seroze; dok se invazivni karcinom NOS tipa češće širi u pluća (86,107). Za potvrđivanje dijagnoze intra- abdominalnih metastaza ILC imunohistohemijskim putem koriste se antitijela na sljedeće receptore: GCDFP-15, citokeratin 7, ER, PR i E-kadherin.

### 1.3.3. Tubularni karcinom dojke (TC)

Tubularni karcinom dojke je specifični histopatološki tip karcinoma dojke sa povoljnom prognozom. Ovaj karcinom je građen od dobro diferentovanih anguliranih tubularnih struktura sa otvorenim lumenom obloženim jednim redom dobro diferentovanih ćelija. Čisto tubularni tip karcinoma dojke (TC) čini 2% svih invazivnih karcinoma dojke. Nešto češće se srijeće među malim karcinomima stadijuma T1, kao i pri mamografskim pregledima u toku skrininga (142-144). Ako ga uporedimo sa nisko gradusnim invazivnim karcinomom dojke NOS, možemo zaključiti da je tubularni karcinom češće manjih dimenzija, rjeđe udružen sa limfovaskularnom invazijom, rjeđe zahvata limfne čvorove i sveukupno ima bolji ishod. Približno 10-20% svih tubularnih karcinoma ima multifokalnu prezentaciju (141). Mamografski, 22-50% tubularnih karcinoma (TC) se ne prikazuje u obliku tumorske mase. Mogu se vidjeti spikularne forme sa različitom zastupljenošću kalcifikacija. Ultrazvučno, tubularni karcinom dojke se prezentuje kao hipoehogena masa sa nejasno definisanim granicama prema zdravom tkivu, te često sa posteriornom sjenkom na ultrazvučnom nalazu (145-148). Makroskopski, tubularni karcinom dojke (TC) se prezentuje kao nejasno ograničena sivo do bijelo prebojena tumorska masa, čvrste do tvrde konzistencije, dijametra 0.2 do 2.0 cm, najčešće 1.5 cm ili manje u prečniku (144,145). Histopatološki, tubularni karcinom dojke (TC) karakteriše prisustvo

anguliranih tubula, sa jasno otvorenim lumenom koji je obložen jednim redom dobro diferentovanih epitelijalnih ćelija, niskog mitotskog indeksa. Da bi ga svrstali u grupu invazivnih tubularnih karcinoma, više od 90% tumorskog tkiva mora biti ovakve građe. Višeslojnost jedara, vidljiv jedarni pleomorfizam i visok mitotski index, definitivno isključuju histopatološku dijagnozu tubularnog karcinoma dojke (TC). Neoplastični tubuli nisu okruženi mioepitelnim slojem, a uklopljeni su dezmodoplastičnu stromu (Slika 3) (73). Slika 3: Tubularni karcinom. A. Nepravilna distribucija okruglih i angularnih tubula, otvorenih lumena, obloženih jednim slojem epitelijalnih ćelija koje su odvojene reaktivnom fibroblastnom stromom; B. Neoplastične ćelije oblažu tubule oblika suze, bez značajne atipije. Izvor: WHO classification of tumor of the breast, 2012 (73). Tubularni karcinom dojke (TC) se često javlja udružen sa ravnom epitelijalnom ćelijskom atipijom i duktalnim karcinom in situ (DCIS) niskog gradusa, ali rjeđe sa lobularnom neoplazijom (144,149,150). Tubularni karcinom dojke (TC) gotovo uvijek je pozitivan na receptore za estrogen i progesteron (ER, PR), i negativan na HER2, EGFR, P-kadherin, p53 i visokomolekularni keratin (144,151). Diferencijalno-dijagnostički, tubularni karcinom dojke (TC) treba razlikovati od sklerozirajuće adenoze, radijalnog ožiljka, mikroglandularne adenoze, invazivnog NOS karcinoma niskog gradusa i tubulolobularnog karcinoma. Tubularni karcinom dojke (TC) pokazuje manju učestalost genetskih alteracija od ostalih histopatoloških tipova karcinoma dojke. Metodom komparativne genomske hibridizacije kod tubularnog karcinoma dojke, primijećene su genske mutacije pretežno na hromozomima: 16q (gubitak) u 78–86% slučajeva i 1q (dodatak) u 50–62% slučajeva. Ove mutacije se uglavnom javljaju udruženo. Ostale genetske alteracije uključuju 16p, 8p, 3p i 11p lokus (152-154). Genetskim profiliranjem svih gena u humanom genomu, dokazano je da se tubularni tip karcinoma (TC) treba klasifikovati u „luminalni A“ molekularnu klasu karcinoma dojke (155). Žene sa tubularnim karcinomom dojke (TC) imaju odličan dugoročni ishod bolesti i preživljavanje koje se gotovo i ne razlikuje od preživljavanja kod žena bez karcinoma dojke iste starosti (156,157). Rekurencija bolesti, nakon kompletnog hirurškog uklanjanja tumora, je vrlo rijetka. Nakon poštene operacije, imajući u vidu multifokalnu prirodu ove bolesti i potencijalnu udruženost sa duktalnim karcinomom in situ (DCIS), rizik od rekurencije bolesti je toliko mali da mnogi centri čak i adjuvantnu radioterapiju kod ovih pacijentkinja smatraju nepotrebnom. Nakon totalne mastektomije, 10-godišnje preživljavanje i stopa ukupnog preživljavanja kreću se od 99 do 100% nakon parcijalne resekcije (143,157). Metastaze u aksilarne limfne čvorove se ne srijeću često, kreću se u rasponu od 0-20% i rijetko zahvataju više od jednog limfnog čvora. Čak i u slučaju zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova, tubularni karcinom dojke (TC) ima dobru prognozu, te neki autori čak i u tom slučaju smatraju disekciju aksile i adjuvantnu hemioterapiju nepotrebnim (158,159). 1.3.4. Kribriiformni karcinom dojke (ICC) Invazivni kribriiformni karcinom dojke (ICC) je karcinom sa odličnom prognozom. Ovaj tip invazivnog karcinoma dojke u 50% slučajeva ima pridruženu tubularnu komponentu. Invazivni kribriiformni karcinom dojke čini 0.3 – 0.8% svih karcinoma dojke (142,159). Postoje populacije u kojima je učestalost ovog karcinoma do 4%. Srednja starostna dob pacijentkinja sa ovim karcinomom dojke iznosi 53 – 58 godina (160). Invazivni kribriiformni karcinom dojke (ICC) prezentuje se klinički kao tumorska masa, koja radiografski može biti okultna. Na mamografiji, ovaj karcinom se najčešće prezentuje u vidu spikularne mase sa mikrokalcifikatima (161). U 10 – 20% slučajeva je multifokalan. Invazivni kribriiformni karcinom dojke (ICC) je uvijek pozitivan na estrogen receptor (ER), i u 69% slučajeva je progesteron PG-receptor pozitivan (160). Srednja veličina ovog tumora iznosi 3,1 cm. Za postavljanje dijagnoze invazivnog kribriiformnog karcinoma ova komponenta mora činiti više od 90% tumora. Tumorsko tkivo gradi kribriiformne (sitaste) formacije. Unutar lumena ovih formacija može se zapaziti mucinozni sekret, sa ponekad prisutnim mikrokalcifikatima (162). Tumorske ćelije su male do umjerene veličine, pokazuju blag do umjeren pleomorfizam i rijetke mitoze. Karakteristična je prominentna fibroblastna

stroma, ponekad sa osteoklastima sličnim gigantskim ćelijama, histiocitnog porijekla. U 80% slučajeva invazivni kribriiformni karcinom (ICC) je udružen sa duktalnim karcinomom in situ (DCIS) kribriiformnog podtipa. Aksilarne nodalne metastaze se javljaju u 14.3% slučajeva, sa tipičnom kribriiformnom organizacijom. Invazivni kribriiformni karcinom (ICC) može imati do 50% e komponente tubularnog karcinoma (160,162). Diferencijalno-dijagnostički invazivni kribriiformni karcinom treba razlikovati od dobro diferentovanih neuro-endokrinih tumora, adenoid cističnih karcinoma i duktalnog karcinoma in situ (DCIS). Invazivni kribriiformni karcinom dojke (ICC) i tubularni karcinom (TC) imaju vrlo slične genetske i transkripcione karakteristike, te se oba tipa svrstavaju prema molekularnoj klasifikaciji u „luminalni A“ tip karcinoma dojke. Takođe su sličnog imuno-fenotipa, kojeg karakteriše hormon receptor pozitivan status (ER i PR+), kao i HER2 negativan status. Ovi karcinomi pokazuju i udruženost sa istim vrstama prekursornih nisko-gradusnih tumorskih lezija. Slično tubularnom karcinomu dojke (TC), invazivni kribriiformni karcinom (ICC) ima povoljnu prognozu. Desetogodišnje preživljavanje se kreće između 90% i 100%. Ishod je manje povoljan kod pacijentkinja sa mješovitim tipom invazivnog kribriiformnog karcinoma, nego kod onih sa histološki čistim tipom ovog karcinoma dojke, a ipak povoljniji nego kod invazivnog karcinoma dojke bez posebne oznake (NOS) (163).

### 1.3.5. Mucinozni karcinom dojke

Mucinozni karcinom dojke karakterišu grupice malih, uniformnih ćelija koje plutaju u velikoj količini ekstracelularnog mucina. Ovaj

**karcinom dojke poznat je još pod nazivima: koloidni karcinom, mukoidni karcinom**

32

i mucinozni adenokarcinom dojke. Čisti mucinozni karcinom dojke čini 2% svih karcinoma dojke i javlja se pretežno kod žena mlađih od 50 godina (164-166). Mucinozni karcinom dojke na mamografiji nalik je benignoj promjeni. Na magnetnoj rezonanci ovi tumori se prezentuju tipičnim poljima pojačanog signala, dok se ultrasonografski gotovo uvijek vide kao hipehogene strukture (167). Na makroskopskom pregledu tkiva, mucinozni karcinom se obično prepoznaje kao želatinozna masa, meke konzistencije sa gurajućim marginama. Ovaj tumor može biti veličine od 1cm do 20cm u prečniku (166). Histopatološki posmatrano, mucinozni karcinom se odlikuje gnijezdima malignih ćelija koja plutaju u jezeru mucina koje je izdijeljeno tankim septama koje sadrže krvne sudove. Maligne ćelije mogu biti različite veličine i oblika i ponekad stvaraju tubule. Nuklearna atipija je najčešće blaga, rjeđi su slučajevi sa izraženom atipijom i mitozama. Mikropapilarna i kribriiformna intraepitelijalna komponenta se rijetko viđaju. Capella i saradnici opisuju hipercelularnu formu ili B tip mucinoznog karcinoma dojke koji se prezentuje velikim ćelijskim nakupinama i čestom pojavom neuroendokrine diferencijacije, sa pozitivnom ekspresijom chromogranina i sinaptofizina. Tip „A“ mucinoznog karcinoma dojke, koji se često opisuje kao „klasični tip“ ovog tumora; neendokrini tip, karakteriše veća količina ekstracelularnog mucina. Histološki čisti oblik ovog karcinoma sadrži preko 90% mucinozne komponente. Mješoviti tipovi se najčešće javljaju u kombinaciji sa invazivnim karcinomom bez specifične oznake (NOS) (168). Diferencijalno-dijagnostički, na core biopsiji najteže je razlikovati mucinozni karcinom dojke od mukokeli slične lezije (MLL – mucocoella-like lesion) sa ekstravazacijom mucina. Glavnu razliku čine dilatirani, mucinom ispunjeni duktusi i mioepitelne ćelije koje prijanjaju za ćelijske plutajuće trake u jezercima mucina, koje ukazuju na MLL. Mucinozni karcinom dojke obično je pozitivan na estrogenske i progesteronske receptore, sa niskom ekspresijom androgenih receptora, i bez povećane HER2 ekspresije (166,169,170). Metodom transkripcionog profiliranja mucinozni karcinomi dojke su svrstani u „luminalni A“ molekularni podtip karcinoma dojke, i

transkripciono se razlikuje od invazivnog karcinoma dojke bez posebne oznake (NOS) istog gradusa i molekularnog podtipa. Takođe, postoje transkriptomске разлике između mucinoznog „A“ i mucinoznog „B“ tipa karcinoma dojke, gdje histološki mucinozni „B“ tip pokazuje gensku ekspresiju sličnu neuro-endokrinim tumorima (171). Lacroix-Triki i saradnici su pokazali da morfološki čisti mucinozni karcinom pokazuje nizak nivo genetske nestabilnosti i rijetke rekurentne genske amplifikacije, te da je genomski profil različitih tumorskih komponenti u mješovitim mucinoznim tumorima veoma sličan onom kod morfološki čistog mucinoznog karcinoma (172). Čisti mucinozni karcinom dojke ima nisku stopu loko-regionalnih i udaljenih metastaza i odlično petogodišnje preživljavanje bez progresije bolesti (142). Stopa desetogodišnjeg ukupnog preživljavanja se kreće od 90% do 100%. Za razliku od morfološki čistog tipa, mješoviti mucinozni karcinom dojke ima znatno veću incidencu limfo-nodalnih metastaza i daleko lošiju prognozu. Udaljene metastaze se kasnije mogu pojaviti kod oba tipa mucinoznog karcinoma dojke (173).

### 1.3.6. Karcinom sa medularnim karakteristikama

Karcinom sa medularnim karakteristikama obuhvata: medularni karcinom (MC), atipični medularni karcinom i podtip invazivnog karcinoma bez posebne oznake (NOS). Ovi tumori pokazuju neke ili sve od sljedećih karakteristika: cirkumferentne ili gurajuće ivice, sincicijelni rast, ćelije sa visokim nuklearnim gradusom, i prominentnu limfoidnu infiltraciju. Klasični medularni karcinom je rijedak, čini 1% svih karcinoma dojke, mada se u literaturi mogu naći i veći procenti u zavisnosti od strogoće dijagnostičkih kriterijuma. Prosječna starost pacijentkinja sa ovim karcinomom, u momentu dijagnoze se kreće od 45 do 52 godini, ali 26% pacijentkinja su mlađe od 35 godina u momentu dijagnoze (174). Karcinomi sa medularnim karakteristikama su obično dobro definisani klinički i na imidžing metodama. Makroskopski, tumori iz ove grupe su obično dobro ograničeni, mekane do umjereno čvrste konzistencije. Često pokazuju makroskopski vidljive lokuse nekroze i hemoragije, koji mogu biti praćeni cističnom deferencijacijom. U prosjeku su dimenzija od 2 do 2.9 cm u dijametru. Obično se koriste sljedeći kriterijumi za postavljanje histopatološke dijagnoze ovih tumora: prisustvo sincicijelne arhitekture u >75% tumora, oštro ograničene, gurajuće margine, nedostatak tubularne diferencijacije, prominentni i difuzni limfoplazmocitni stromalni infiltrati, tumorske ćelije sa obilnom citoplazmom i vezikularnim jedrima, sa vidljivim jednim ili više jedaraca visokog mitotskog indeksa, a mogu se naći i binarne gigantske ćelije (175). Karcinomi sa medularnim karakteristikama, imunološki posmatrano, obično su negativni na hormonske receptore, kao i na HER2, što znači da spadaju u trostruko- negativne karcinome dojke (TNBC) koji su tema našeg istraživanja i biće detaljnije opisani u poglavlju 1.6. Ovi karcinomi mogu imati različitu ekspresiju keratina 5/6 i 14, glatko-mišićnog aktina, EGFR, P-kadherina, p53, i kaveolina-1. Imunofenotipizacijom je utvrđeno da limfoidni infiltrati u ovim tumorima predominantno sadrže CD3+ T-limfocite i CD8+ citotoksične T-limfocite (176, 177). Veliki procenat tumora iz ove grupe, danas je poznat pod nazivom Bazalnom- nalik karcinom dojke. Česta karakteristika ovih tumora je genetska nestabilnost. Većina tumora kod pacijenata sa germline mutacijama BRCA1 gena imaju medularne karakteristike. Kod tumora sa medularnim karakteristikama primijećene su i somatske mutacije i hipermetilacija promotera BRCA1 gena, što ukazuje na moguću ulogu ovog gena u nastanku karcinoma sa medularnim karakteristikama. Među najčešćim somatskim mutacijama primijećena je alteracija TP53 gena (178). Ranije se smatralo da su medularni karcinomi dojke bolje prognoze od invazivnog karcinoma NOS tipa. Međutim, radovima u kojima su analizirani uzorci invazivnog karcinoma NOS gradusa 3, prisustvo prominentnog limfo-plazmocitnog infiltrata bilo je udruženo sa dobrom prognozom (179). Studijama zasnovanim na metodi genetskog profiliranja, dokazano je da je nivo ekspresije gena odgovornih za imuni odgovor važan prediktivni faktor koji određuje preživljavanje kod ER-pozitivnih i ER-negativnih visoko proliferativnih karcinoma dojke. U vezi sa time, genetska ekspresija kod medularnih karcinoma omogućila je identifikovanje prognostički različitih podgrupa

trostruko-negativnog karcinoma dojke- bazalnog karcinoma (180). Ovi rezultati upućuju da relativno dobar ishod karcinoma sa medularnim karakteristikama može biti u vezi sa prisustvom prominentnog limfo-plazmocitnog infiltrata u ovim tumorima. 1.3.7. Karcinomi sa apokrinom diferencijacijom Bilo koji invazivni karcinom dojke čije ćelije pokazuju apokrine karakteristike može se smatrati karcinomom sa apokrinom diferencijacijom. Fokalna apokrina diferencijacija je česta karakteristika invazivnog karcinoma dojke bez posebne oznake (NOS), ali i nekih histološki specifičnih tipova. Ekstenzivna apokrina diferencijacija viđa se kod oko 4% invazivnih karcinoma dojke (181). Karcinomi dojke sa apokrinom diferencijacijom ne pokazuju neke specifične kliničke karakteristike koje bi ih razlikovale od ostalih invazivnih karcinoma dojke. Ekstenzivna apokrina diferencijacija srijeće se kod invazivnog karcinoma bez posebne oznake (NOS) ali i kod nekih histološki specifičnih tipova karcinoma dojke kao što su: tubularni, lobularni, mikropapilarni i medularni karcinom dojke. Apokrina diferencijacija se može naći i kod lobularnog karcinoma in situ (LCIS) i duktalnog karcinoma in situ (DCIS) (182,183). Na ćelijskom nivou kod karcinoma sa apokrinom diferencijacijom mogu se zapaziti uvećana jedra sa prominentnim jedarcima. Citoplazma može biti granulirana i bojiti se pozitivno PAS bojenjem (što je slučaj kod „A“ tipa ćelija) ili može biti svijetla i pjenušava (kod „B“ tipa ćelija), ili se pak može naći kombinacija ove dvije varijante (184). Imunološki posmatrano, apokrina komponenta ovih invazivnih karcinoma je BCL2-negativna i GCDFFP-15–pozitivna, mada se GCDFFP-15–pozitivnost obično gubi u uznapredovalom stadijumu bolesti. Bojenje na receptore za estrogen i progesteron je obično negativno, mada je nedavno identifikovana izoforma estrogenskog receptora ER-alfa36 koja se povećano eksprimira kod invazivnog karcinoma dojke sa apokrinom diferencijacijom. Tumori s apokrinom diferencijacijom su uglavnom negativni na ER i PR, a pozitivni na androgene receptore i HER2 (185,186). Diferencijalno-dijagnostički karcinomi dojke sa apokrinom diferencijacijom koji su građeni predominantno od ćelija „A“ tipa treba razlikovati od granular cell tumora, dok one koji se sastoje od ćelija „B“ tipa treba razlikovati od histiocitne proliferacije ili inflamatorne reakcije u tkivu dojke. U postavljanju dijagnoze može biti od pomoći imunohistohemijsko bojenje na keratin (187). Komparativnom genomskom hibridizacijom otkriven je značajan broj hromosomskih promjena kod karcinoma dojke sa apokrinom diferencijacijom, kao što su: amplifikacije na 1p, 1q i 2q lokusu i delecije na 1p, 12q, 16q, 17q i 22q. Genomske alteracije na ovim djelovima hromozoma su česte kod karcinoma dojke uopšte. Analizom genetske ekspresije Micro-array metodom, definisan je „apokrini molekularni podtip“ karcinoma dojke, koji se karakteriše povećanom androgenom signalizacijom i značajno se preklapa sa molekularnim HER2 podtipom karcinoma dojke (188,189). Jako je bitno naglasiti da on nije uvijek ekvivalentan histološkom tipu sa apokrinom diferencijacijom. U prosjeku polovina svih karcinoma sa apokrinom histološkom diferencijacijom se svrstava u molekularni apokrini podtip, uključujući u tu grupu i pleomorfni lobularni karcinom sa apokrinom diferencijacijom (190). Rezultati nekih studija govore da karcinomi sa apokrinom diferencijacijom imaju istu prognozu kao invazivni karcinom NOS tipa istog gradusa i stadijuma bolesti, ili čak bolju prognozu (191). Primjenom multigenetskog testa OncotypeDX je utvrđeno da ovi karcinomi imaju visok stepen rekurence, a na osnovu Mammaprint testa da imaju lošu prognozu. Pozitivna androgena signalizacija kod ovih tumora može biti meta ciljanog liječenja antiandrogenim lijekovima. 1.3.8. Karcinom sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka Karcinom sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka karakteriše obilna količina intracelularnog mucina koja gura jedro u stranu, formirajući time ćelije koje liče na prsten pečatnjak. Rijedak je slučaj da je primarni karcinom dojke dominantno građen od ćelija nalik prstenu pečatnjaku, obično se ovakve ćelije vide samo fokalno. Ovaj karcinom dojke ne ispoljava specifične, prepoznatljive kliničke, niti makroskopske karakteristike pri pregledu. Diferencijacija tipa prstena pečatnjaka se najčešće srijeće kod invazivnog lobularnog karcinoma (ILC) i invazivnog

karcinoma bez posebne oznake (NOS). Stoga, karcinomi sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka ne predstavljaju zaseban entitet. Opisana su dva citološka tipa karcinoma sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka u dojci. Citološki tip sa velikim intra-citoplazmatskim vakuolama koje se pozitivno boje na acid-Schiff (PAS)/Alcian plavo i HMFG2. Ovakva citološka karakteristika opisana je još i kod lobularne neoplazije, klasičnog invazivnog lobularnog karcinoma (LIC) i pleomorfnog lobularnog karcinoma dojke (PLC) (192). Drugi citološki tip ovog karcinoma sličan je onom koji se javlja kod ćelija difuznog karcinoma želuca, i karakteriše se acido-mukoznom supstancom koja difuzno ispunjava ćelije i gura jedro na jedan pol ćelije. Maligne ćelije sa diferencijacijom nalik prstenu pečatnjaku mogu se naći i u duktalnom karcinomu in situ (DCIS). Diferencijalno dijagnostički, primarni karcinom dojke sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka treba razlikovati od metastaze karcinoma drugih lokalizacija u dojku, kao što je karcinom želuca. Primarni karcinomi dojke sa diferencijacijom tipa prstena pečatnjaka obično su hormon-receptor i GCDFFP-15 pozitivni. Bojenje na ove receptore će biti odsutno ili slabo kod karcinoma želuca, te može biti od pomoći u diferencijalnoj dijagnozi. Ne postoje podaci o genetskim karakteristikama ovih tumora, a i njihov prognostički značaj je nejasan.

### 1.3.9. Invazivni mikropapilarni karcinom dojke

Invazivni mikropapilarni karcinom se karakteriše prisustvom malih nakupnina ćelija koje grade strukture nalik na morulu s centralnim lumenom, okružne retrakcionim prostorima. Maligne ćelije ovog karcinoma pokazuju obrnuti polaritet, tako da je vršni pol ćelije okrenut ka stromi, a ne ka lumenu formacija. Morfološki čista forma mikropapilarnog karcinoma dojke je rijetka i čini 0.9 – 2% invazivnih karcinoma dojke. Mikropapilarna slika se češće srijeće žarišno u drugim tipovima invazivnog karcinoma dojke, sa učestalošću 7.4%. Starosna dob u kojoj se klinički prezentuje invazivni mikropapilarni karcinom čiste ili mješovite forme odgovara dobi kada se obično javlja invazivni karcinom bez posebne oznake (NOS) (193-195). Klinički se većina mikropapilarnih karcinoma dojke prezentuje kao palpabilna tumorska masa. Mamografski se obično prezentuje kao gusta masa, nepravilnog oblika, sa nejasnim marginama i mikrokalcifikatima. Ultrazvučno, mikropapilarni karcinom se može prezentovati kao hipoehogena masa, mada ponekad može dati izoehogen ili hipoehogen nalaz sa mikrolobularnim segmentima; može katkada biti praćena posteriornom sjenkom (196). Invazivni mikropapilarni karcinom dojke je u 75% slučajeva gradusa 2 ili 3 (197- 199). Velika većina mikropapilarnih karcinoma dojke 41 – 100% su estrogen receptor pozitivni, i progesteron receptor pozitivni u 46 – 83% slučajeva (197-201). Mada su ranije studije govorile u prilog HER2 pozitivnosti u čak do 100% slučajeva mikropapilarnih karcinoma dojke, skorašnje studije ukazuju da je HER2 pozitivnost zastupljena sa 10 – 35%. Sem toga, izgleda da je i HER2 genska amplifikacija kod ovih tumora rjeđa (10 – 30%) (200-203). Genetskim profiliranjem invazivnih mikropapilarnih karcinoma dojke, dokazano je da se ovi karcinomi sa molekularnog aspekta mogu klasifikovati u luminalni „A“ i luminalni „B“ podtip, što je u skladu sa imunohistokemijskim profilom koji je dominantno ER-pozitivan. Metodom komparativne genomske hibridizacije nađeno je amplifikacija na 8q, 17q i 20q kao i delecija na 6q i 13q hromosomu kod ovih karcinoma. Interesantan je podatak da su genske aberacije pronađene u ne-mikropapilarnoj komponenti ovih karcinoma vrlo slične onima u mikropapilarnoj komponenti tumora. Pronađene su i rekurentne amplifikacije gena za MYC, CCND1 i FGFR1 kod 33%, 8% i 17% ovih tumora (155,202-204). Invazivni mikropapilarni karcinom dojke ima lošiju prognozu od invazivnog karcinoma bez posebne oznake (NOS), i češće se prezentuje limfovaskularnom invazijom i limfo-nodalnim metastazama u momentu dijagnoze (204-206).

### 1.3.10. Metaplastični karcinom dojke

Metaplastični karcinom dojke obuhvata grupu neoplazmi koje karakteriše diferencijacija neoplastičnog epitela u skvamozne ćelije i/ili mezenhimalne elemente uključujući hrskavicu, kost, hondroidne ćelije, rabdomioidne ćelije i mnoge druge.

**Ove neoplazme mogu biti građene** u potpunosti **od metaplastičnih elemenata ili** od mješavine **karcinoma**

40

i metaplastičnih područja. Obzirom na vrlo različitu histološku sliku koja proizlazi iz širokog raspona metaplastičnih komponenti koje se mogu vidjeti u ovom tipu karcinoma dojke metaplastični karcinomi su svrstavani u različite podgrupe: karcinosarkom, sarkomatoidni karcinom, karcinom sa pseudosarkomatoznom metaplazijom, karcinom sa pseudosarkomatoznom stromom, karcinom vretenastih ćelija, vretenasto-ćelijski, metaplastični karcinom, karcinom koji produkuje matriks, adenoskvamozni karcinom, nisko-gradusni adeno-skvamozni karcinom, skvamocelularni karcinom, i metaplastični karcinom nalik fibromatozi (207-212). Metaplastični karcinom dojke čini 0.2 – 5% svih invazivnih karcinoma dojke (213). Metaplastični karcinom dojke imaju slične kliničke karakteristike i starostnu distribuciju kao i estrogen (ER) negativni invazivni karcinomi dojke bez specifične oznake (NOS) (214). Makroskopski, metaplastični karcinomi dojke mogu biti dobro ili neoštro ograničeni. Pri makroskopskom se pregledu nerijetko zapažaju cistične degenerativne promjene, naročito kod metaplastičnog skvamocelularnog tipa. Metaplastični karcinom je najčešće velik, veći od invazivnog karcinoma NOS tipa. Srednja veličina ovih tumora iznosi 3.9cm i kreće se u rasponu od 1.2 do > 10 cm) (215-217). Histopatološki, metaplastični karcinom predstavlja vrlo heterogenu grupu. Konsenzusom je prihvaćen deskriptivni sistem histološke klasifikacije ovih tumora u pet grupa. 1) Nisko-gradusni adeno-skvamozni karcinom Građen je od glandularnih i tubularnih struktura sa područjima solidnih nakupina skvamoznih ćelija uklopljenih u vretenasto-ćelijsku stromu. Karcinomatoznu komponentu karakterišu male glandularne strukture, češće okruglog nego angularnog oblika i solidne trake epitelnih ćelija koje mogu sadržati skvamozne ćelije ili skvamozne cistične formacije. Neoplastična komponenta tkiva ovih tumora obično se širi ka periferiji i infiltriše zdravo tkivo dojke (181,218). Nakupine limfocita se obično mogu vidjeti na periferiji ponekad stvarajući strukture nalik na topovsko đule. Primijećena je sličnost između ovog tipa metaplastičnog karcinoma dojke, adenomioepitelioma i sklerozirajućih proliferativnih lezija (219). 2) Metaplastični karcinom nalik fibromatozi Metaplastični karcinom nalik fibromatozi, mikroskopski je građen od mješavine vretenastih ćelija sa eozinofilnom citoplazmom i izduženim jedrima sa fino raspršenim hromatinom, koje su uklopljene u kolageniziranu stromu. Jedarna atipija se ne nalazi ili je blaga. Vretenaste ćelije su obično raspoređene u vidu talasastih, isprepletanih snopića, ili stvaraju dugačke snopove koji se poput prstiju šire u okolno tkivo dojke. Često se mogu zapaziti nakupine i trake većih i zaobljenijih vretenastih ćelija koje poprimaju epiteloidan izgled (219,220). Fokalno se može naći skvamozna diferencijacija. Ovi tumori su obično p63 pozitivni, dok je imunohistokemijsko bojanje na keratin pozitivno samo fokalno, uglavnom u većim i epiteloidnim ćelijama. 3) Svamocelularni karcinom Skvamocelularni karcinom je najčešće cistična promjena. Unutrašnjost ciste je obložena skvamoznim ćelijama sa različitim stepenom nuklearne atipije i pleomorfizma. Neoplastične ćelije infiltrišu okolnu stromu u kojoj se obično nalazi i prominentan inflamatorni infiltrat (221). Opisana je i akantolitična varijanta ovog tumora koja se prezentuje formiranjem nepravilnih prostora, obloženih atipičnim skvamoznim ćelijama (pseudo-glandularni ili pseudo-angio-sarkomatozni izgled). Diferencijalno-dijagnostički, ovaj oblik tumora treba razlikovati od angiosarkoma. Metaplastični skvamocelularni karcinom dojke se može javiti u histopatološki čistoj formi ili u mješovitom obliku, udružen sa invazivnim karcinomom bez posebne oznake (NOS) (222). Skvamozna diferencijacija se može naći i unutar medularnog karcinoma dojke. Primarni skvamocelularni karcinom dojke treba razlikovati od metastatskih tumora, te je u ovom slučaju bitno



isključiti skvamocelularni karcinom bilo koje druge lokalizacije, uključujući i kožu (216). 4) Karcinom vretenastih ćelija Karcinom vretenastih ćelija se histopatološki prezentuje atipičnim vretenastim ćelijama koje mogu imati različite histološke slike: duge snopiće, strukture nalik na točak ili riblju kost, a najčešće se nalazi mješavina svih navedenih formi. (223,224). Citoplazma vretenastih ćelija morfološki može varirati od izduženih do nabubrelih oblika. Prisutan je umjereno do jako izraženi jedarni pleomorfizam.. Mogu se naći i područja gdje maligne ćelije formiraju nakupnine ćelija epiteloidnog izgleda, kao i područja skvamozne diferencijacije. Ovakvi tumori se nalaze na granici između skvamocelularnog karcinoma vretenastih ćelija i mioepitelioma odnosno mioepitelijalnog karcinoma (225). Do danas ne postoje jasni kriterijumi za razlikovanje ove dvije vrste tumora, mada ne postoje ni podaci o značajnim razlikama u njihovom kliničkom ponašanju. Diferencijalno-dijagnostički, metaplastični karcinom vretenastih ćelija je najbitnije razlikovati od atipičnih vretenasto-ćelijskihproliferacija. Za dijagnozu metaplastičnog karcinoma neophodna je potvrda epitelne diferencijacije histopatološkim i imunohistohemijskim metodama. Takođe, nalaz duktalnog karcinoma in situ (DCIS) na periferiji upućuje na dijagnozu metaplastičnog karcinoma vretenastih ćelija. 5) Metaplastični karcinom sa mezenhimalnom diferencijacijom Metaplastični karcinom dojke sa mezenhimalnim elementima obično je građen od mješavinje karcinomske i mezenhimalne komponente koja može biti hondroidna, koštana, rabdomioidna ili čak neurogljalna. U karcinomskom području mogu se naći žljezdane strukture, solidne nakupnine i žarišta skvamozne diferencijacije (226- 228). Mezenhimalna komponenta može biti dobro diferentovana, sa minimalnom atipijom ili izgledati jasno maligno, poput sarkoma mekih tkiva. Dugo se vremena, za tumore u kojima se nalazio nagli prelaz mezenhimalne (najčešće hrkavične) u epitelnu komponentu koristio naziv karcinom koji stvara matriks. Bez obzira na činjenicu da se u ovom tipu karcinoma uglavnom lako uočavaju epitelni elementi, za postavljanje dijagnoze metaplastičnog karcinoma, ponekad je potrebno pregledati veliki broj uzoraka za potvrdu epitelne diferencijacije, kao i koristiti dodatno imunohistohemijsko bojenje na visoko-molekularni keratin (CK5/65). 6) Mješoviti metaplastični karcinom Veliki broj metaplastičnih karcinoma dojke se na multiplim uzorcima prezentuje mješovitim histološkim karakteristikama. Svi ovi slučajevi bi se trebali definisati kao metaplastični karcinom u definitivnoj dijagnozi, sa navođenjem opisa specifičnih, prepoznatljivih histoloških struktura (219). Imunohistohemijski, u više od 90% slučajeva metaplastični karcinomi su negativni na receptore za estrogen i progesteron (ER, PR) kao i na HER2 receptore, s pozitivnim bojenjem na keratine 5/6 i 14, kao i EGFR (229-231). Imunohistohemijski markeri koji se obično koriste u identifikaciji epitelijalne diferencijacije unutar metaplastičnog karcinoma obuhvataju visokomolekularne keratine: 34betaE12, keratin 5/6 i 14, kao i keratin AE1/AE3; dok su nisko- molekularni keratini obično negativni (232). Stepent ekspresije keratina može varirati i nerijetko je fokalne distribucije. Preko 90% metaplastičnih karcinoma dojke ima visoku ekspresiju p63, te se isti može smatrati dijagnostički značajnim markerom za metaplastični karcinom dojke. Njegova ekspresija omogućava razlikovanje ovih tumora od drugih mezenhimalnih tumora (233-235). Filodni tumori sa sarkomatoznim prerastanjem su negativni na p63 i keratine, a pozitivni na CD34 i BCL2. Primjenom metode genetskog profiliranja pokazalo se da većina metaplastičnih karcinoma dojke pripada molekularnom podtipu bazal-like karcinoma dojke (138). Pojedinačne studije upućuju da neki podtipovi ovih karcinoma (karcinom sa vretenastim ćelijama), pokazuju transkriptomске karakteristike koje su slične onima primijećenim kod ćelija sa epitelno-mezenhimalnom tranzicijom (236,237). Ovakvi tumori se mogu klasifikovati u molekularni podtip kladin-niskih tumora, koji se karakterišu većim brojem ćelija sa epitelno-mezenhimalnim karakteristikama i tzv. matičnim tumorskim ćelijama (238). Metaplastični karcinomi imaju vrlo kompleksan genom sličan onom koji se srijeće kod drugih tipova trostruko-negativnog i basal-like molekularnog podtipa karcinoma dojke (239,240).

Mutacije tumor supresor gena TP53 pronađene su kod većine metaplastičnih karcinoma dojke (241). Nedostatak CDKN2A na p16 hromozomu, PTEN mutacija, mutacija gena uključenih u Wnt signalni put, kao i rekurentne mutacije PIK3CA, pronađene su kod određenih podtipova ovih karcinoma (229,230,242,243). Primijećena je i amplifikacija i visoka polizomija EGFR gena kod 10 – 25% ovih karcinoma naročito kod tumora sa skvamocelularnom i vretenasto- ćelijskom diferencijacijom (234-244). Limfo-nodalne metastaze su značajno rjeđe kod metaplastičnog karcinoma dojke nego kod invazivnog karcinoma NOS tipa. (215-217,226,227,245). Kao kod ostalih trostruko-negativnih karcinoma dojke (TNBC) koje ćemo detaljnije opisati u kasnijem tekstu, metaplastični karcinomi daju udaljene metastaze u odsutvu limfo- nodalnih, i to najčešće u mozak i pluća. Trenutno ne postoje validirani markeri sa prognostičkim značajem za metaplastični karcinom dojke. Brojni su napori istraživača da, uglavnom kroz retrospektivne studije, obezbijedi definiciju prognostičkih markera za ovu bolest. Takvi su i naši napori u ovom istraživanju ka rasvjetljavanju molekularne strukture i pronalaženju markera sa prognostičkim i prediktivnim značajem za trostruko-negativne karcinoma dojke kao molekularnu klasu kojem pripada i metaplastični histološki tip karcinoma dojke. Veoma je važno napomenuti da ne postoje podaci koji bi upućivali na to da ovi tumori imaju lošiji odgovor na adjuvantnu hemioterapiju ili lošiju prognozu od ostalih formi trostruko negativnih karcinoma dojke (246).

1.3.11. Ostali histološki tipovi karcinoma dojke 1) Invazivni papilarni karcinom Invazivni papilarni karcinom dojke predstavlja karcinom čija invazivna komponenta dominantno ima resičast izgled (>90%). Solidni papilarni karcinom dojke i intracistični papilarni karcinomi se ne bi trebali svrstavati invazivne papilarne karcinome. Stoga je invazivni papilarni karcinom dojke rijedak. Diferencijalno dijagnostički, ovaj tumor treba razlikovati ne samo od pomenuta dva histološka tipa, već i od sekundarnih depozita, tj. metastatskih papilarnih karcinoma, najčešće u jajnik ili pluća. Ovaj karcinom nema specifične kliničke, niti makroskopske karakteristike. Histopatološki, invazivna komponenta ovih karcinoma je građena od resičastih struktura nježne fibrovaskularne strome koje infiltriraju tkivo dojke. Podaci o genetskim karakteristikama ovih tumora za sada nijesu dostupni, a prognoza zavisi od gradusa i stadijuma tumora. 2)

**Inflamatorni karcinom dojke** Inflamatorni karcinom dojke je rijetka ali vrlo agresivna forma karcinoma dojke

33

sa karakterističnim kliničkim i patološkim karakteristikama. Inflamatorna priroda ovog tumora potiče od brojnih limfatičkih embolusa (247,248). Incidenca ovog karcinoma iznosi 2.5 na 100.000 žena i u konstantnom je porastu. Primijećene su i rasne razlike u incidenci, koje podrazumijevaju najvišu incidencu kod žena afričko-američkog porijekla, i najnižu incidencu kod žena u Aziji i pacifičkim ostrvima. Učestalost ovog karcinoma u literaturi se kreće od 1 – 10%, u zavisnosti od dijagnostičkih kriterijuma. Najčešće se javlja u Sjevernoj Africi, uključujući Tunis i Egipat. Smatra se da kod žena afričko-američkog porijekla visok BMI (body mass index) i mlađa starostna dob u momentu nastanka bolesti zapravo predstavljaju vodeći faktor rizika (249-251). Klinički, inflamatorni simptomi su brzo uvećanje dojke s inflamatornim promjenama kao što su: crvenilo, edem, koža nalik na narandžinu koru, obično bez palpabilne tumorske mase. Promjene često zahvataju više od jedne trećine dojke. Dojka je difuzno tvrda na palpaciju. U aksili sa iste strane, često se palpiraju tvrdi, uvećani limfni čvorovi. Inflamatorni karcinom dojke je najčešće T4d stadijuma (250). Obzirom da tumorska masa makroskopski, a često ni imidžing metodama nije jasno vidljiva, biopsija tankom iglom može obezbijediti dijagnozu. Može se naći izravnanje,

uvlačenje i/ili pojava kruste na bradavici. Patognomonična histološka karakteristika kod ovih tumora jeste nalaz embolusa u limfaticima kože dojke. Embolusi stvaraju opstrukcije i edem, ali ne moraju biti udruženi sa inflamatornim limfocitnim infiltratom. Invazivna komponenta ovog karcinoma je obično bez posebne oznake (NOS) gradusa 3. Imunološke karakteristike ovog karcinoma ukazuju na agresivnu prirodu ovog tumora. Obično su ovi karcinomi hormon-receptor negativni (ER i PR-negativni), a u do 50% slučajeva pokazuju HER2 hiperekspresiju, u oko 40% slučajeva i rjeđe EGFR hiperekspresiju. Takođe, pokazuju obično visoku ekspresiju p53, MUC1 i E- kadherina (252-254). Kod ovih tumora obično se srijeće HER2 i TP53 amplifikacija gena i oni se većinom svrstavaju u morfološki HER2 ili bazalni podtip karcinoma dojke (255,256). Pored brojnih genskih mutacija koje daju hiperekspresiju određenih molekularnih markera, kod ovih karcinoma je nedavno pronađena mutacija koja dovodi do alteracije u aktivaciji signalnog puta za ALK (anaplastic lymphoma kinasis), što može u skorijoj budućnosti omogućiti liječenje ovog karcinoma dojke nekim novim terapijskim modalitetima. Primjena neoadjuvantne hemioterapije poboljšala je stopu preživljavanja ovog tipa karcinoma dojke sa 25 na 50%. Međutim, prognoza ovih karcinoma je još uvijek lošija u odnosu na prognozu kod pacijenata sa ne-inflamatornim lokalno uznapredovalim karcinomom dojke (250). Odgovor na hemioterapiju kod ovih karcinoma je veoma bitan prognostički faktor za ukupno preživljavanje i preživljavanje bez progresije bolesti (257). Kod inflamatornog karcinoma dojke, klasični prognostički faktori nemaju naročitog značaja izuzev ekspresije ER i BCL2. Produkcija ADLH1 od strane stem ćelija je loš prognostički faktor za ovaj tip karcinoma dojke (258).

#### 1.4. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke

Karcinom dojke nije jedinstvena bolest. U pitanju je heterogena bolest koja se može klasifikovati u više podtipova, različite veličine, gradusa, metastatskog potencijala i različite prognoze. Izbor terapije za pacijentkinje sa karcinomom dojke uveliko zavisi od patološkog nalaza u tkivu tumora. Bojenje isječaka tumorskog tkiva standardnom HE (hematoxilin-eosin) metodom, je jeftina, ali vrlo efikasna i moćna dijagnostička metoda, koja obezbjeđuje informaciju neophodnu za adekvatno klasifikovanje tumora ali i za odabir adekvatne terapije (259). Patološki podtip tumora (npr. tubularni ili metaplastični karcinom), zatim gradus tumora (gradus 1 ili 3), veličina tumora, nalaz vaskularnih tumorskih embolusa i nodalni status su parametri koji obezbjeđuju informaciju na osnovu koje se može odrediti najvjerovatniji ishod karcinoma dojke, kao i potreba za adjuvantnim hemioterapijskim liječenjem. Međutim, sprovedene studije i istraživanja donose nova saznanja u oblasti molekularnih i ćelijskih karakteristika koje leže u osnovi nastanka ovih tumora i njegovog širenja, otvaraju nove mogućnosti za dodatnim unapređenjem klasifikacije tumora dojke i unapređenjem njihovog liječenja (82,260). Upotreba imunohistohemije kao dijagnostičke metode, primjenom različitih molekularnih markera, koji se specifično ispoljavaju u određenim ćelijama ili tkivima, kao na primjer: keratina (keratin 5/6, 14), p63, markera bazalne membrane (kolagen IV i laminin), doprinijele su razlikovanju benignih od in situ i invazivnih tumora dojke, ali su obezbijedile i pomak u terapijskom pristupu kod ove bolesti. Imunohistohemijsko bojenje na estrogenske (ER), progesteronske receptore (PR) i HER2 već je postalo standardna dijagnostička metoda u praksi. Za određivanje hormonskog receptorskog statusa imunohistohemijskom metodom, u upotrebi je u praksi ASCO (American Society of Clinical Oncology) vodič (261). Međutim, i pored primjene vodiča za imunohistohemijsko testiranje, razlike u očitavanju među laboratorijama su moguće i dešavaju se u rutinskoj praksi, te je u cilju standardizacije protokola preporučljivo i neophodno raditi unutrašnje i spoljašnje analize kontrole kvaliteta testiranja. Od nedavno, analize genoma i ekspresije gena micro-array metodom obezbijedile su istovremeno sagledavanje promjena na hiljadama gena, što je omogućilo dodatnu sub-klasifikaciju karcinoma dojke i definisanje „genskog potpisa“ tumora, na osnovu kojeg smo u mogućnosti da u momentu dijagnoze napravimo razliku između tumora koji će imati dobru od onog koji će imati lošu

prognozu, te razliku između tumora koji će odgovoriti na terapiju od onog koji neće (262). Međutim, kako je riječ o novoj metodi, predstoji dalji rad na standardizaciji platformi koje su u primjeni, korišćenje adekvatnih kontrola kvaliteta i statističkih metoda. Najveći značaj ove metode ogleda se u njenoj primjeni kao dodatne dijagnostičke procedure, koja omogućava dodatnu sub-klasifikaciju tumora dojke u cilju optimizacije liječenja ovih pacijenata (263-267). Dostupna literatura svjedoči o povezanosti genetskih alteracija, tj. promjena na genima ili promjena u ekspresiji proteinskih produkata aberantnih gena, sa prognozom i odgovorom na terapiju kod karcinoma dojke (259,268). U većini studija ekspresija gena je analizirana korišćenjem RNK, izolovane iz zamrznutog tumorskog materijala. Međutim, treba imati na umu da je obrazac genske ekspresije koji pokazuje jedan tumor, određen ne samo genskom ekspresijom malignih ćelija tumora, već i ekspresijom gena ostalih ćelija koje čine tumorsku masu (fibroblasti, endotelijske, inflamatorne ćelije), koje značajno doprinose sveukupnom ponašanju tumora. Glavna svrha studija genske ekspresije kod tumora dojke jeste da se identifikuje genetski profil tumora udružen sa, za njega specifičnim kliničkim karakteristikama. Metoda transkripcionog profiliranja definisala je karcinom dojke kao heterogenu bolest, identifikujući nekoliko njenih fundamentalno različitih podtipova na osnovu različitih faktora rizika, biološkog ponašanja i različitog odgovora na sistemsko liječenje (82,83). Studija koju su Perou i saradnici objavili 2000. godine, dala je najveći doprinos molekularnoj klasifikaciji karcinoma dojke (82). Perou i saradnici su u svom istraživanju pošli od pretpostavke da fenotipska različitost karcinoma dojke može biti praćena odgovarajućom različitosti u genskoj ekspresiji, koja se može odrediti primjenom cDNA micro-array metode. Studija je sprovedena na 65 hirurških uzoraka tkiva tumora dojke preuzetih od 42 različita pacijenta, te „DNK mikroarray“ metodom obuhvatila analizu 8102 gena u pomenutim uzorcima. Tri posebno upečatljive karakteristike genske ekspresije su identifikovane pomenutom metodom: 1) primijećene su velike varijacije u obrascu genske ekspresije kod ispitivanih tumora; 2) varijacije su bile multidimenzionalne, odnosno različite grupe gena su pokazale različite nezavisne obrasce ekspresije; 3) različiti obrasci ekspresije gena su bili rezultat nekoliko faktora: odnosa među samim genima, odnosa među tumorima i povezanosti određenih gena sa određenim tumorima (82). Na osnovu nivoa ekspresije različitih gena koju su zabilježili ovom metodom, Perou i saradnici su definisali

**5 različitih podtipova karcinoma dojke: luminalni A, luminalni B, HER2 pozitivni, bazalni i podtip**

3

„nalik normalnoj dojci“ (Slika 4) (82,83). Slika 4:

**Različiti tipovi karcinoma dojke razdvojeni metodom transkripcionog profiliranja: luminalni A, luminalni B, HER2-pozitivni, trostruko negativni i podtip**

4

„nalik normalnoj dojci“. Izvor: Sorlie et al. Gene expression patterns of breast carcinomas 2001 (83). Na osnovu stepena ekspresije grupe gena koje su identifikovali, na uzorku koji se sastojao od 38 invazivnih karcinoma (36 infiltrativnih duktalnih karcinoma i 2 lobularna karcinoma), jednog neinvazivnog duktalnog karcinoma, jednog fibroadenoma i tri uzorka normalnog tkiva dojke, u ovoj studiji tumori dojke su razvrstani u dvije grupe: ER-pozitivni i ER-negativni, koji su zatim podijeljeni u

biološki i klinički različite podgrupe (Slika 5) (83). Slika 5: Metodom transkripcijskog profiliranja tumori dojke razdvojeni su u dvije grupe: ER-pozitivnu i ER-negativnu Izvor: Sorlie et al. Gene expression patterns of breast carcinomas 2001 (83).

Estrogen receptor (ER) – pozitivna grupa obuhvata

**luminalne tumore, koji uz ekspresiju gena za ER, ekspiriraju i gene karakteristične za luminalne epitelne** ćelije **(CK8/18)**

3

(82). U naknadno sprovedenom istraživanju luminalni tumori su dodatno razdvojeni u dva podtipa: luminalni A, (koji karakteriše visok stepen

**aktivacije ER puta), te luminalni B** (koji **ima nižu ekspresiju ER, te visoku ekspresiju gena koji** utiču **na** ćelijsku **proliferaciju**) (83). Estrogen receptor **(ER) – negativnu** grupu **čine tri** **biološki** različita podtipa **tumora: HER2-** pozitivni, bazalni i podtip „nalik normalnoj dojci“. „**HER2-** pozitivni“ podtip **većinom ima negativnu ekspresiju ER, te ekspirira gene vezene uz HER2** amplikon (17q11). **Dio tumora koji uz amplifikaciju HER2 gena, ima pozitivnu ekspresiju ER, metodom transkripcijskog profiliranja** grupišu **se zajedno** sa **tumorima** luminalnog „**B**“ podtipa. **Karcinomi bazalnog podtipa**

3

ne ekspiriraju ER i HER2 vezane gene, ali

**ekspiriraju gene karakteristične za bazalne/mioepitelne** ćelije: **CK5, CK17, integrin 4, laminin, P-cadherin i EGFR** (82). Tumori **koja** čine **podtip**

3

"nalik normalnoj dojci" nijesu dovoljno jasno definisani, karakteriše ih visoka ekspresija gena karakterističnih za bazalne epitelne ćelije i adipocite, te niska ekspresija gena za luminalne ćelije (82). Noviji radovi, međutim, dovode u pitanje postojanje podtipa „nalik normalnoj dojci“. Smatra se da bi ovi tumori mogli zapravo biti

**artefakt nastao kontaminacijom uzorka okolnim vezivnim** tkivom **i masnim tkivom dojke.** Pobrajani **podtipovi** karcinoma dojke **imaju različite** faktore **rizika, biološko ponašanje i različit odgovor na sistemsko liječenje.**

3

Dodatni značaj ovog istraživanja leži u rezultatima dobijenim korelacijom sa

**kliničkim ishodom** kojom **je** dokazano **da najbolju prognozu imaju tumori luminalne „A“** grupe, 3  
**dok „HER2 pozitivna“ i „bazalna“** grupa **imaju lošije preživljenje u odnosu na ostale podtipove**

(82). Rezultati navedenih studija dali su izuzetno značajan inicijalni doprinos i napravili pomak u razumijevanju heterogene prirode karcinoma dojke, te stvorili osnovu za nastanak klasifikacije tumora dojke koja se temelji na molekularnim razlikama. Ipak, zbog visoke cijene ovakvih analiza, skupe aparature i potrebe zapošljavanja visoko edukovanih molekularnih biologa, uz još uvijek nedovoljnu standardizaciju metoda, molekularna klasifikacija za sada nije primjenjiva u svakodnevnoj kliničkoj praksi. 1.5. Imunohistohemijska klasifikacija karcinoma dojke Na 12. Internacionalnom sastanku održanom 2011. godine u St. Galenu (269), zaključeno je da karcinom dojke više nije moguće smatrati jedinstvenom bolešću. Na ovom sastanku je predstavljena imunohistohemijska klasifikacija tumora dojke, koja je usvojena kao svojevrsna pouzdana aproksimacija molekularne klasifikacije dobijene transkripcionim profiliranjem (82,270,271). Naime, analiza ekspresije gena primjenom metode transkripcionog profiliranja rezultirala je pronalaženjem nekoliko fundamentalno različitih podtipova karcinoma dojke (82). Obzirom da nije uvijek moguće dobiti informaciju o genskoj ekspresiji metodom transkripcionog profiliranja, predložena je i usvojena pojednostavljena klasifikacija koja odgovara onoj koju su ranije predložili Cheang i saradnici (272). U novo-predloženoj imunohistohemijskoj klasifikaciji, podtipovi definisani na osnovu kliničko-patoloških kriterijuma su slični, ali ne i identični intrinzičnim podtipovima, te predstavljaju pogodnu aproksimaciju molekularne klasifikacije (Tabela 1) (269). Usvojena imunohistohemijska klasifikacija tumora dojke, kao glavni faktor razlikovanja tumora i razvrstavanja istih u podtipove, koristi imunohistohemijsku ispoljenost estrogenskih receptora (ER), progesteronskih receptora (PR), hiperekspresiju i/ili amplifikaciju receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2) i Ki67 proliferacioni indeks. Na osnovu pobrojanih faktora tumori dojke su svrstani u četiri grupe: • • luminalni

**A (ER+/PR+/HER2-/- Ki67≤14%), luminalni B (ER+/PR+/HER2-/- Ki67>14% ili ER+/PR+/HER2+/-** 8  
bilo koji Ki67), • • **HER2** pozitivni **(ER-/PR-/HER2+)** i trostruko negativni **(ER-/PR-/HER2-)**

(269). Tabela 1: Surogat definicije intrinzičnih podtipova karcinoma dojke. Izvor: St Gallen international experts consensus 2011 (269). \*Ova tačka presjeka je izvedena iz poređenja sa podacima genskog array-a kao prognostičkog faktora. Tačka presjeka za Ki-67 indeksa za predviđanje efikasnosti endokrine ili citotoksične terapije može varirati. \*\*Neki tumori eksprimiraju i luminalne i HER2 gene Ova kliničko-patološka klasifikacija zahtijeva svakako dostupnost pouzdanih dijagnostičkih metoda za određivanje pobrojanih parametara, od kojih zavisi kojem imunohistohemijskom podtipu pripada određeni tumor. Za imunohistohemijsko određivanje ispoljenosti estrogenskih (ER) i progesteronskih receptora (PR) u upotrebi je ASCO/CAP vodič iz 2020. godine (273). Za određivanje hiperekspresije i/ili amplifikacije humanog epidermalnog faktor rasta 2 (HER2), u upotrebi je vodič iz 2018. godine (274). Kada govorimo o Ki-67 proliferacionom idneksu i pouzdanosti metoda za njegovo određivanje, situacija je bila značajno komplikovanija. Istraživanja sprovedena u naredne dvije godine, nakon 12. konferencije u St. Galenu, su potvrdila da se pacijenti sa luminalnom bolešću razlikuju, te da postoje razlike u ekspresiji različitih grupa gena kod ovih pacijentkinja naročito onih koje sadrže proliferativne gene, što je naglasilo

važnost uključivanja pokazatelja proliferacije bolesti u klasifikaciju. Smatra se da je upravo proliferaciona aktivnost parametar od najvećeg značaja za razlikovanje luminalnog „A“ od luminalnog „B“ (HER2 negativnog) podtipa. Dvije godine kasnije, u martu 2013. godine, održana je 13. Internacionalna konferencija održana u St. Galenu. Panel eksperata koji je brojao 51 člana iz ukupno 21 država sa Aron Goldhirsch i Eric P. Winer na čelu, donijela je zaključke i nove smjernice nakon razmatranja literature objavljene u prethodne dvije godine (275). Internacionalna konferencija u St. Gallenu iz 2013. godine, dala je značajan progres u patološkoj karakterizaciji podtipova karcinoma dojke. Konferencija je usvojila novu definiciju luminalnog „A“ i luminalnog „B“ tipa karcinoma dojke, i ustanovila da se razlika između njihovih podtipova, „luminalnom A nalik“ i „luminalnom B nalik“, može definisati određivanjem ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora (ER, PgR) i Ki-67 proliferacionog indeksa, bez neophodnog korišćenja molekularne dijagnostike. Definisana je i kao standard prihvaćena vrijednost razgraničenja  $\geq 20\%$  kao indikativna za Ki67 visoki proliferacioni indeks, kao i vrijednost razgraničenja  $\geq 20\%$  za status progesteronskih receptora (PgR). Upravo na osnovu ova dva parametra definisani su različiti imunofenotipovi karcinoma dojke: • luminalni A (ER+/PgR+/HER2-/Ki67 <20%) • luminalni B, HER2 negativan podtip karcinoma dojke (ER+/HER2-/Ki67  $\geq 20\%$  i/ili PgR<20%), • luminalni B HER2 pozitivni karcinom dojke (ER+/HER2+/ bilo koja vrijednost Ki67 i PgR) (Tabela 2) (275). Tabela 2: Surogat definicije intrinzičnih podtipova karcinoma dojke. Izvor: Goldhirsch et al. Panel members. Ann Oncol. 2013 (275). Glavni razlog pokušaja da se napravi razlika između „luminalnog A nalik“ karcinoma dojke koji je više endokrino senzitivniji, indolentan, sa boljom prognozom, i „luminalnog B nalik“ karcinoma dojke sa suprotinim karakteristikama (manje endokrino senzitivniji, agresivniji, sa lošijom prognozom) u ovoj klasifikaciji, jeste različita efikasnost adjuvantne citotoksične terapije u liječenju ovih tumora. U skladu sa time, definisano je da se razlika može napraviti dodavanjem statusa progesteronskih receptora (PGR) definiciji „luminalni A nalik“ tumor. Dodavanjem ove kategorije, smanjuje se broj pacijentkinja čiji tumor spada u kategoriju „luminalni A nalik“, te samim tim povećava broj pacijentkinja kod kojih je citotoksična terapija preporučljiva. Članovi Panela na ovoj konferenciji su bili složni da kliničko-patološki podtipovi mogu uticati na odluku da li koristiti hemioterapiju u liječenju ovih pacijentkinja ili ne, ali da ne mogu uticati na izbor citotoksičnog režima liječenja. Prepoznato je i zaključeno da je za interpretaciju rezultata ovog testiranja neophodno postojanje visokih standarda kvaliteta i uspostavljanje unutrašnje i spoljašnje kontrole kvaliteta testiranja. Kako je primijećeno da apsolutne vrijednosti svakog imunohistohemijskog parametra mogu varirati među različitim laboratorijama, utvrđeno je da je neophodna standardizacija cut-off vrijednosti tj. vrijednosti razgraničenja za visok i nizak Ki-67 proliferacioni indeks, kao i za progesteron receptor (PGR) status. Definisane od strane Panela, gore navedene vrijednosti razgraničenja su uvrštene u St. Galen imunohistohemijsku klasifikaciju karcinoma dojke od 2013. godine (275). Studije odnosa troška i efikasnosti, sprovedene u Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Velikoj Britaniji, Njemačkoj, Izraelu i Japanu, pokušale su definisati različite modele liječenja pacijentkinja sa karcinom dojke na osnovu testiranja ekspresije različitih grupa gena, sa ciljem dokazivanja koristi za zdravstveni sistem. Rezultati ovih studija su zavisili od mnogih faktora: cijene testa, procenta pacijentkinja koje bi primjenom ovog testiranja propustile šansu za citotoksično liječenje, kao i od cijene citotoksičnog tretmana u pomenutim državama koje bi pacijentkinje primale. Zbog komplikovanosti organizacije i dodatnih troškova u zdravstvenim sistemima, testiranje ekspresije grupa gena tj. molekularno testiranje ostaje dostupno pojedinačnim pacijentkinjama uglavnom kroz privatni sektor, ali nedostupno većini pacijentkinja sa ranim karcinomom dojke (276-280).

1.6. TNM klasifikacija karcinoma dojke  
Klinički stadijum bolesti kod karcinoma dojke najčešće se određuje korišćenjem sistema TNM klasifikacije, objavljenog od strane

**AJCC (American Joint Committee on Cancer) – UICC (Union on International Cancer Control).**

29

U upotrebi je posljednje, osmo izdanje TNM klasifikacije (281, 282). TNM sistem klasifikacije zasniva se na tri komponente: veličina i proširenost tumora unutar dojke (tumor ili

**T), zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova** (nodus ili **N**), i postojanje **udaljenih metastaza** (metastaza, ili **M**)(

37

282). Stadijumi bolesti predstavljaju sumiranu informaciju o stepenu lokalne i regionalne proširenosti bolesti (veličina tumora, zahvaćenost kože ili zida grudnog koša, zahvaćenost limfnih čvorova i metastaze u udaljene lokalizacije). Ova informacija o stadijumu bolesti izuzetno je važna za donošenje odluke o liječenju lokalne bolesti, kao i za određivanje sistemske terapije. Genetskim profiliranjem, uz poznat stadijum bolesti, može se dobiti dodatna informacija značajna za procjenu rizika za nastanak budućih metastaza i ponovne pojave bolesti. Kod karcinoma dojke podjednako je bitno odrediti klinički i patološki stadijum bolesti. Klinički stadijum bolesti određuje se kliničkim pregledom i imidžing metodama, uz potvrdu citološkim pregledom tanko-iglenog bioptata kada je to moguće i neophodno. Patološki stadijum bolesti („T“ i „N“ stadijum) određuje se na osnovu makroskopskog i mikroskopskog pregleda uzorka dobijenog hirurškim putem. Tumor ili „T“, u patološkoj TNM klasifikaciji, zavisi od veličine primarnog invazivnog karcinoma kod većine pacijenata. Ukoliko unutar dojke nalazimo veći broj tumora „T“ se definiše prema najvećem tumoru. Katkada je za određivanje veličine tumora potrebno korelirati makroskopski, mikroskopski i imidžing nalaz. Satus limfnih čvorova ili „N“, određuje se detaljnim pregledom kompletnog tkiva limfnog čvora, u cilju potencijalnog pronalaženja makro-metastaza (metastaze veće od 0.2cm), mikrometastaza ( $\geq 0,02$  cm, više od 200 tumorskih stanica, ali  $\leq 0,2$  cm), te izolovanih tumorskih ćelija ( $< 0,02$  cm i/ili  $< 200$  tumorskih ćelija). Metastaze ili „M“ se određuju imidžing metodama, a katkad potvrđuju tkivnom dijagnostikom (281). Osmo izdanje TNM klasifikacije, koje je danas u upotrebi, donijelo je novinu uvođenjem novog stadijuma bolesti „IB“ za tumore „T1“ klasifikovane (veličine 2.0 cm ili manji) sa mikrometastazama u aksliarnim limfnim čvorovima (N1mi) (281,282). U posljednjih nekoliko decenija sve je više u upotrebi neoadjuvantna terapija (terapija koja prethodi definitivnom hirurškom tretmanu). Uvođenje neoadjuvantne terapije zahtijeva određivanje TNM klasifikacije datog tumora, te se ona u ovom slučaju određuje na osnovu kliničkog pregleda, pregleda imidžing metodama i analize uzoraka dobijenih iglenom ili stereotaksičnom biopsijom. TNM klasifikacija tumora određuje se i nakon definitivnog hirurškog tretmana – yT i yN stadijum. Određivanje TNM klasifikacije tumora prije i nakon terapije važno je jer obezbjeđuje informaciju o prognozi bolesti (283,284). TNM klasifikacija tumora: •

**T: primarni tumor • Tx: primarni tumor se ne može odrediti • T0: ne može se dokazati primarni tumor** 1  
**• Tis: neinvazivni (in situ) karcinom • T1: tumor dojke promjera  $\leq 2$  cm • T1mic: mikroinvazija  $\leq 0.1$  cm • T1a: tumor  $> 0.1$  cm, a  $\leq 0.5$  cm • T1b: tumor  $> 0.5$  cm, a  $\leq 1$  cm • T1c: tumor  $> 1$  cm, a  $\leq 2$  cm • T2: tumor dojke promjera**



**>2 cm, a ≤5 cm • T3: tumor dojke promjera >5 cm • T4: tumor dojke bilo koje veličine s proširenošću na torakalni zid ili kožu • T4a: zahvaćenost torakalnog zida • T4b: edem kože (uključujući izgled kože poput narandžine kore) ili ulceracija na koži dojke ili satelitski kožni čvorovi ograničeni na istu dojku • T4c: oboje (T4a i T4b) • T4d: upalni karcinom • N regionalni (ipsilateralni) limfni čvorovi • Nx: postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima nije moguće odrediti • • • N0: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima N1: metastaze u pokretljivim aksilarnim limfnim čvorovima N2: metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima koji su međusobno ili u odnosu na okolinu fiksirani • N3: metastaze u istostranim infraklavikularnim, unutrašnjim mamarnim ili supraklavikularnim limfnim čvorovima • • • M udaljene metastaze M0: bez udaljenih metastaza M1: prisutne udaljene metastaze**

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

## 7. Trostruko negativni karcinom dojke Pojam

**trostruko negativni karcinom dojke (TNBC – triple negative breast cancer)** po prvi put **se** pominje 26  
u

literaturi u oktobru 2005. godine. Od tada, ovaj pojam se pojavljuje u preko 600 publikacija (285). Porast interesovanja za trostruko negativni podtip karcinoma dojke ukazuje na rastući značaj, koji ovoj bolesti pridaje sve veći broj onkologa, patologa i genetičara. Do danas je objavljeno nekoliko studija koje su se bavile izučavanjem epidemiologije trostruko negativnog karcinoma dojke, kao agresivne forme karcinoma dojke. Rasne razlike su primijećene u podacima incidence od karcinoma dojke uopšte u svim starosnim grupama, dok su rasne razlike u mortalitetu primijećene kod mlađih pacijentkinja (286-289). Kod pacijentkinja crne rase karcinom dojke se češće dijagnostifikuje u mlađoj populaciji žena i češće je u pitanju trostruko negativni karcinom dojke, agresivne prirode (290,291). Kod pacijentkinja crne rase mlađih od 40 godina, stopa smrtnosti od karcinoma dojke je visočija nego kod pacijentkinja bijele rase, iste starosne grupacije (286). Rasne razlike primijećene su i u preživljavanju i vjerovatno su posljedica razlika u morfologiji tumora, stadijumu u momentu dijagnoze, pristupačnosti novijih terapijskih opcija i kvalitetu liječenja (292,293). Studija koja je objavljena 2018. godine, a koja je objedinila podatke Centra za kontrolu bolesti (Centers for Disease Control), Nacionalnog programa prevencije kroz registre za rak (Prevention's National Program of Cancer Registries – NPCR) i Nacionalnog instituta za praćenje, epidemiologiju i nadzor rezultata programa za rak

**(National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results Program – SEER)**

18

u Sjedinjenim Američkim Državama, za period od 2004. do 2013. godine, opisala je trendove i varijacije u incidenci, mortalitetu i karakteristikama karcinoma dojke, uključujući i trostruko negativni tip karcinoma (294). Rezultati ove studije upućuju da je u populaciji od 20 – 49 godina starosti, incidenca trostruko negativnog karcinoma dojke dvostruko veća kod pacijentkinja crne rase u odnosu na ostale rasne grupacije (Tabela 3) (294). Tabela 3: Incidenca invazivnih karcinoma dojke kod žena starosti 20 – 49 godina u US, na osnovu rase/etničke pripadnosti, podtipa tumora, NPCR/SEER 2011-2013 godine. Izvor: Miller et al. Disparities in breast cancer survival in the United States (294). Stope su izražena na 100,000, interval povjerljivosti 95% Standardizovano u odnosu na starostnu dob 2000 US u standardnoj populaciji API – Asian or Pacific Islander Ovo istraživanje je pokazalo da incidenca trostruko negativnog karcinoma dojke raste sa starenjem kod svih pacijentkinja, nezavisno od rase i etničke pripadnosti (Grafikon 9) (294). U svim starosnim grupama, incidenca trostruko negativnog karcinoma dojke (TNBC) bila je veća kod žena crne rase u odnosu na ostale rasne i etničke grupe, i ova razlika je bilježila porast sa starenjem ( $p < 0.01$ , za sve grupe). Procenat TNBC kod žena crne rase je bio konzistentan kroz sve starostne grupe, dok je procenat TNBC kod pripadnica ostalih etničkih i rasnih grupa opadao sa starenjem (Grafikon 10) (294). Grafikon 9: Incidenca invazivnog trostruko negativnog karcinoma dojke kod žena na osnovu rase/etničke pripadnosti i starostne dobi. Stope su standardizovane u odnosu na starostnu dob 2000 US u standardnoj populaciji. Izvor: NPCR/SEER 2011–2013. Izvor: Miller et al. Disparities in breast cancer survival in the United States (294). Grafikon 10: Relativna proporcija incidence invazivnih karcinoma dojke kod žena na osnovu podtipa tumora, rase/etničke pripadnosti i starostne dobi. Standardizovano u odnosu na starostnu dob 2000 US u standardnoj populaciji. Izvor: NPCR/SEER 2011–2013. Izvor: Miller et al. Disparities in breast cancer survival in the United States (294). Na osnovu rezultata meta-analize koja je obuhvatila 38.813 pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke, obuhvaćenih američkim nacionalnim registrom za rak iz 2016. godine, incidenca trostruko negativnog karcinoma dojke varira u svijetu i kreće se od 10,8% u Engleskoj do 15,8% u istočnom dijelu Centralne i Južne Amerike. Javlja se kod 13% pacijentkinja ženskog pola i 6% muškaraca. Primijećene su i rasne razlike u učestalosti ove bolesti, sa najvećom stopom kod afro-amerikanaca (23,7%) i najmanjom učestalošću kod Filipinaca (8,9%). Rezultati ove studije ukazuju i na varijacije u incidenci trostruko negativnih karcinoma dojke u odnosu na histološki tip. Najčešći histološki tip TNBC bio je metaplastični karcinom (76%), dok je u ovom uzorku bilo samo 2% infiltrativnih lobularnih karcinoma (295). Studije su pokazale da trostruko negativni karcinomi dojke čine 12 - 17% svih karcinoma dojke (287). U pitanju je heterogena grupa tumora koja se povezuje sa agresivnijim kliničkim tokom (296-298). Češće metastaziraju hematogenim putem u pluća i mozak, dok su metastaze u lokoregionalne limfne čvorove rjeđe u poređenju sa ostalim tumorima dojke (299). Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na neoadjuvantne hemioterapijske protokole, pacijentkinje sa ovim tipom tumora imaju visočiju stopu udaljenih metastaza i ultimativno lošiju prognozu (189,287,296). Manje od 30% pacijentkinja sa metastatskim trostruko negativnim karcinomom dojke živi 5 godina i kod svih je uzrok smrti osnovna bolest, uprkos primijenjenoj adjuvantnoj hemioterapiji koja je danas i osnova liječenja ovih pacijentkinja (299).

**Trostruko negativni karcinom dojke** karakteriše se odsustvom **estrogenskih receptora (ER-** negativan), **progesteronskih receptora (PR-** negativan) kao i

15

odsustvom HER2 receptora (HER2-negativan). Vrlo blizak trostruko negativnom karcinomu dojke je podtip nalik bazalnom karcinomu dojke (basal-like, basal epithelial phenotype, basal breast cancer, basaloid breast cancer). Molekularni podtip nalik bazalnom karakteriše se profilom genske ekspresije koji je sličan onom koji sriječemo u bazalnim mioepitelnim ćelijama zdravog tkiva dojke (82). Brojni nazivi za ovu bolest potiču od postojeće još uvijek nerazjašnjene prirode ove bolesti. Basal-like karcinom predstavlja jednu od pet intrinzičnih grupa karcinoma dojke koje su definisane studijama genetskog profiliranja tumora. Ovaj podtip karcinoma dojke karakteriše se niskom ili odsutnom ekspresijom estrogen receptora (ER), odsustvom prekomjerne ekspresije HER2 i ekspresijom gena koji se obično nalaze u mioepitelijalnim ćelijama zdravog tkiva dojke (82,261,273). Mnogi karcinomi zadovoljavaju definiciju trostruko negativnog i nalik bazalnom tipu karcinoma dojke istovremeno. Međutim, još uvijek ne postoji internacionalno prihvaćena definicija ovih tumora. Većina basal-like karcinoma su istovremeno i trostruko negativni. Takođe,

**većina trostruko negativnih karcinoma dojke, oko 80%, su basal-like karcinomi**

22

prema karakteristikama koje ispoljavaju (300). Upravo iz ovog razloga, inicijalno se smatralo da su basal-like i trostruko negativni karcinom dojke sinonimi (301). Međutim, noviji rezultati kliničkih, imunohistohemijskih i genetskih istraživanja ukazuju na postojanje razlike između ovih tumora, te da ih trebamo smatrati odvojenim entitetima. Na osnovu ovih istraživanja basal-like karcinom dojke i trostruko negativni karcinom dojke opisani su kao dva različita podtipa karcinoma dojke i imaju jasno različitu definiciju. Pouzdana dijagnoza trostruko negativnih karcinoma dojke, koja se temelji na definisanju ER, PR i HER2 negativnosti, od ogromnog je značaja i ima veoma važne implikacije na odabir hemioterapije kod karcinoma dojke, te samim tim indirektno određuje prognozu kod ovih pacijentkinja. Panel eksperata ASCO (American Society of Clinical Oncology) i CAP (College of American Pathologists) 2007. godine su objavili vodič i preporuke koje definišu kada i kako treba određivati ekspresiju HER2 kod karcinoma dojke (302). Pomenuti ASCO/CAP vodič je dodatno unaprijeđen 2013. godine (303,304). Primjena ovog vodiča obezbijedila je standardizaciju HER2 testiranja. Prema preporukama ovog vodiča HER2 negativnim se smatraju tumori dojke čiji je HER2 scor 0+ i 1+, kao i tumori čiji imunohistohemijski skor 2+ nakon provjere metodom in situ hibridizacije ne pokazuje amplifikaciju HER2 gena. Od momenta publikacije ovog vodiča zabilježen je značajan napredak u pouzdanosti HER2 testiranja u preko 1500 laboratorija koje su ovaj vodič uvele u rutinsku patohistološku dijagnostiku (Grafikon 11) (303). Međutim, primijećene su i manje razlike u rezultatima testiranja, što je ukazalo na veliki značaj interne validacije eseja koji se uvode kao novi u dijagnostiku i naročito eksterne kontrole kvaliteta testiranja među laboratorijama. Takođe, pomenute razlike u rezultatima ukazale su na veliki značaj metoda in situ hibridizacije u provjeri nejasnih rezultata imunohistohemijskog testiranja (2+ rezultata). Činjenica da je u posljednjih 15-ak godina pronađen određeni broj novih terapijskih agensa, uglavnom biloških molekula (trastuzumab, pertuzumab, TDM-1, lapatinib (213,304,305) koji ciljaju prekomjerno ekspimirane HER2 receptore te time daju šansu za bolju prognozu pacijentkinjama sa HER2 pozitivnim karcinomom dojke, dodatno je dovela je do potrebe za što preciznijim i pouzdanijim određivanjem HER2 ekspresije kod karcinoma dojke (306-309). Stoga je ASCO/CAP vodič iz 2007. godine dopunjen i unaprijeđen smjernicama 2013. i 2018. godine koje su se naročito odnosile na interpretaciju rezultata testiranja (Tabela 4) (274,303,304). Grafikon 11: Laboratorije koje su učestvovala u unapređenju testiranja prediktivnog

**HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)** biomarkera imunohistohemijskom metodom  
(IHC), određivanja HER2 **in situ**

38

hibridizacijom (ISH) i estrogen receptora (ER) imunohistohemijskom metodom, primjenom ASCO/CAP vodiča. Izvor: Wolf et al. ASCO/CAP Update 2013 (303). Tabela 4: Sumacija preporuka u vodičima za HER2 testiranje iz 2007. i 2013. godine. Izvor: Wolf et al. ASCO/CAP Update 2013 (303). Kada govorimo o histološkim i imunohistohemijskim karakteristikama trostruko negativnih karcinoma dojke (Slika 6: A, B, C, D) karakteristično je da ovi tumori obično imaju gurajuće ivice ka zdravom tkivu dojke i centralnu zonu nekroze (Slika 6: A). Maligne ćelije su obično organizovane u solidne nakupnine (Slika 6: A) ili u gnijezda (Slika 6: B). Prominentni limfocitni infiltrat se nekada može vidjeti na periferiji, ali i u unutrašnjosti tumora (Slika 6: B). Maligne ćelije su atipične i pleomorfne sa jasno vidljivim mitozama na velikom uveličanju mikroskopa (Slika 6: C). Imunohistohemijskim bojenjem se zapaža odsustvo estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR) (Slika 6: D), nedostatak HER2 ekspresije, vide se kao negativna reakcija. Ovakav imunohistohemijski nalaz je od dijagnostičkog značaja za trostruko negativne karcinome dojke. Slika 6 (A, B, C, D, E, F): Histološke i imunohistohemijske karakteristike trostruko negativnih karcinoma dojke. Izvor: Wolf et al. ASCO/CAP Update 2013 (303). Na molekularnom nivou, trostruko negativni karcinomi dojke obuhvataju molekularne podtipove kao što su: Klaudin-low tumori koji se sastoje od ćelija koje su slične matičnim i karakterišu se epitelijalnom do mezenhimalnom tranzicijom; zatim interferonom bogati tumori koji imaju nešto bolju prognozu; te podtip nalik normalnoj dojci. Oko 18 – 40% basal-like karcinoma ne posjeduju trostruko negativni fenotip na imunohistohemijskoj analizi (302). Do 20% basal-like karcinoma ekspirira estrogenske receptore (ER) ili pokazuje prekomjernu ekspresiju HER2. Na genetskom nivou trostruko negativni i basal-like karcinomi su upečatljivo heterogeni. Identifikovana je amplifikacija brojnih genskih lokusa kod ovih tumora, ali je prevalenca svake od zabilježenih amplifikacija niska (310,311). Trostruko negativni i basal-like karcinomi dojke su pretežno većih dimenzija od ostalih podtipova karcinoma dojke, i najčešće se prezentuju kao invazivni duktalni karcinomi nespecifičnog tipa i visokog histološkog gradusa (312-315). Kod ovih tumora, veličina je u slaboj korelaciji sa preživljavanjem (316). Brzi rast ovih tumora i češća pojava kod mlađih žena mogu otežati mamografsko prepoznavanje ovih tumora. Mada, na magnetnoj rezonanci se često prezentuju sa naglašenim obručem koji predstavlja ivicu tumora i signalom visokog intenziteta u unutrašnjosti tumora (317). Skolnost trostruko negativnih karcinoma ka širenju u limfne čvorove je nedovoljno jasno definisana, ali studije govore u prilog sklonosti ovih tumora da rjeđe metastaziraju u loko-regionalne limfne čvorove (318). Nasuprot tome, trostruko negativni karcinom dojke pokazuje veću sklonost ka udaljenim metastazama u meka tkiva nego ostali podtipovi karcinoma dojke, naročito u pluća (40%) i mozak (30%) (318-322). BRCA 1 je značajan predisponirajući gen za nastanak ove bolesti. Rezultati do danas dostupnih istraživanja ukazuju da 20% pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke posjeduje BRCA1 mutaciju (323). Ćelije trostruko negativnog karcinoma dojke pokazuju na svojoj površini biomarkere koji su slični onima koje pokazuju tumorske matične ćelije, sa visokim nivoom ekspresije CD44, i niskim nivoom ekspresije CD24 (324). Uloga tumorskih matičnih ćelija u nastanku trostruko negativnog karcinoma dojke još uvijek je nejasna. Rezultati nekih novijih istraživanja sugerišu da bi mikroglanularna adenoza, koja se rijetko javlja u dojci, mogla imati prekursori značaj u nastanku trostruko negativnog karcinoma dojke (325). Brojne studije ukazuju da trostruko negativni karcinomi dojke imaju nepovoljniju prognozu (326). Nekada su i HER2 pozitivni karcinomi dojke bili tumori sa lošom prognozom. Međutim, danas uz

dostupnost savremenih ciljanih terapija koje targetiraju HER2, prognoza ovih tumora je značajno poboljšana. Usljed nedostatka prepoznatljivih biomarkera za trostruko negativni karcinom dojke, ciljane terapije još uvijek ne postoje, te je i prognoza ovih tumora loša. Krivulja preživljavanja kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke pokazuje oštro smanjenje preživljavanja u prvih 3 - 5 godina nakon dijagnoze, dok je nakon pet godina od dijagnoze udaljeni relaps bolesti rjeđi (Grafikon 12) (314). Nakon deset godina od postavljanja dijagnoze relaps je češći kod pacijentkinja s hormon zavisnim tumorima u odnosu na žene s hormon nezavisnim karcinomima dojke (Grafikon 13) (313). Grafikon 12: Verovatnoća rizika od povratka bolesti kod trostruko negativnih i ne-trostruko negativnih karcinoma dojke. Izvor:

**Dent et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence,**

14

2007. (314). Grafikon 13: Preživljavanje nakon dijagnoze karcinoma dojke. Stopa preživljavanja kod 3477 pacijentkinja na osnovu imunohistohemijskog podtipa. Izvor:

**Cheang et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers,**

30

2008. (313) Kada govorimo o liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke, obzirom na negativnost ER i PR receptora ovi tumori nijesu osjetljivi na hormonsku terapiju. Takođe, usljed HER2 negativnog statusa, trastuzumab neće biti od koristi u liječenju ovih pacijentkinja (327,328). Do danas je hemioterapija jedina opcija liječenja trostruko negativnih karcinoma dojke. Studije koje su ispitivale značaj neo- adjuvantne hemioterapije primijenjene prije hirurškog tretmana, ukazale su da je ova terapija efikasna kod pacijentkinja sa TNBC koje pokazuju kompletan patološki odgovor na ovo liječenje. Međutim, kod većine pacijentkinja koje i dalje imaju rezidualnu bolest nakon tretmana, ova terapija nije od značaja (Tabela 5) (321). Tabela 5: Stopa ukupnog preživljavanja nakon hemioterapije kod žena sa trostruko negativnim i ne-trostruko negativnim karcinomom dojke. Kompletan patološki odgovor je određen na osnovu pregleda tkiva dojke uklonjenog nakon hirurškog tretmana. Izvor: Liedtke

**et al. Response to neoadjuvant therapy and longterm survival in patients with triple-negative breast cancer,**

10

2008. (321). Upotreba ciljane terapije kod trostruko negativnih karcinoma dojke još uvijek je u ranoj fazi istraživanja, pretežno usjed nepostojanja dovoljno dobrih biomarkera za ovu bolest. Do danas su poznati rezultati studije koja je pokazala da kod pacijentkinja sa ER negativnim i PR negativnim statusom (koje su većinom bile i HER2 negativne – trostruko negativna bolest) dodavanje bevacizumaba kao inhibitora angiogeneze paklitakselu, dala je napredak u preživljavanju bez progresije bolesti (329). Obzirom da trostruko negativni karcinomi dojke ekspimiraju EGFR receptor, ispitivana je uloga cetuksimaba (EGFR inhibitora) u terapiji ove bolesti u kombinaciji sa karboplatinom (330). Međutim,

usljed činjenice da trostruko negativni karcinomi dojke eksprimiraju PTEN mutacije koje su udružene sa rezistencijom na anti-EGFR terapije, ova opcija liječenja nije dala rezultate (331). Skorašnja istraživanja, međutim, ukazuju da EGFR/p53 imunohistohemijski fenotip kod TNBC može imati bolju prognozu i odgovor na adjuvantnu hemioterapiju (332). Takođe, istraživanja su pokazala da PARP inhibitori imaju pozitivni terapijski efekat na tumore koji sadrže BRCA1 mutaciju, a koji su većinom trostruko negativni tumori (333). Studija kineske grupe autora iz 2015. godine ukazala je da je kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke koje su nosioci BRCA1 mutacije češći pozitivan odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju baziranu na antraciklinima, nego kod pacijentkinja sa istim podtipom karcinoma koje nijesu nosioci pomenute mutacije (334).

1.8. Prognostički i prediktivni faktori Prognostički i prediktivni faktori su od velikog značaja za predviđnje ishoda bolesti i odgovora na primijenjenu terapiju. Klasični prognostički faktori za tumore dojke temelje se na karakteristikama samih tumora. U klasične prognostičke faktore za tumore dojke spadaju: • veličina tumora, • histološki tip tumora, • stepen diferenciranosti (gradus), • limfo-vaskularna invazija, • udio neinvazivne komponente u sveukupnom tumoru, • status limfnih čvorova, • stadijum proširenosti bolesti. Obzirom da smo u prethodnim poglavljima opisali histološke tipove karcinoma dojke i njima pripadajuću prognozu, kao i stadijume proširenosti bolesti; u ovom dijelu osvrnućemo se na ostale klasične prognostičke faktore. Gradus tumora je veoma moćan prognostički faktor, te stoga informacija o gradusu mora biti dio histološke dijagnoze karcinoma dojke (335). Gradus invazivnog karcinoma dojke nespecifičnog tipa (NOS) i svih ostalih invazivnih karcinoma dojke se određuje prije svega na osnovu udjela tubularne, odnosno žljezdane komponente, na osnovu jedarnog pleomorfizma i broja mitozu. Određivanje histološkog gradusa koje su po prvi put definisali Patey i Scarff 1928. godine (336), te Bloom i Richardson 1957. godine (337), modifikovali su Elston i Ellis 1991. godine (338) dajući ovoj klasifikaciji više objektivnosti, nakon čega su mnoge studije pokazale značajnu povezanosti između histološkog gradusa i prognoze karcinoma dojke (339,340). Za određivanje gradusa tumora posmatraju se gore navedene varijable: prisustvo tubularnih formacija, jedarni pleomorfizam i broj mitozu. Za sve tri varijable koristi se numerička skala od 1 do 3 (Tabela 6) (338). Prisustvo žljezdanih formacija se posmatra i određuje u sveukupnom tumoru i zražava u postotku. Jedarni pleomorfizam se određuje u dijelu tumora koji pokazuje najveći pleomorfizam. Mitoze se takođe broje u oblasti tumora koja pokazuje najviši broj mitozu.. Određivanje broja mitozu zahtijeva veliku pažnju i adekvatnu pripremu tkiva u smislu optimalne fiksacije i adekvatnog rezanja tkiva. Broj mitozu određuje se na 10 vidnih polja pri mikroskopiranju. Za brojanje mitozu biraju se mitotski najaktivniji dijelovi tumora. Za precizno određivanje gradusa na osnovu broja mitozu koristi se skala:

3-5 mitozu (gradus 1, dobro diferentovan),	6-7 mitozu (gradus 2, umjereno diferentovan),	25
8-9		

mitozu (loše diferentovan). Određivanje gradusa na malim uzorcima kao što je core-biopsija je moguće, ali je upravo određivanje broja mitozu na ovakvim uzorcima otežano, te može dati utisak lažno boljeg gradusa od stvarnog gradusa posmatranog tumora (341). Tabela 6: Semi-kvantitativna metoda za određivanje histološkog gradusa kod tumora dojke. Izvor: Elston et al. Pathological prognostic factors in breast cancer 1991 (338). Brojne studije ukazuju da tumori različitog histološkog gradusa pokazuju prepoznatljiv molekularni profil na genomskom, transkriptomskom i imunohistohemijskom

nivou (79,342,343). Na osnovu navedenih studija, može se zaključiti da tumori visokog gradusa obično ne nastaju progresijom iz tumora koji su dijagnostifikovani kao tumori niskog gradusa. Tumori gradusa 1 i gradusa 3 su vjerovatno dvije različite bolesti koje mogu imati različite molekularne karakteristike, patogenezu i ponašanje (344,345). Studije genske ekspresije pokazale su da je histološki gradus tumora bolji pokazatelj prognoze karcinoma dojke od veličine tumora i statusa limfnih čvorova (346). Limfo-vaskularna invazija podrazumijeva prisustvo tumora u malim sudovima van centralne tumorske mase, obično na periferiji invazivnog karcinoma. Mada je limfo-vaskularna invazija udružena sa limfo-nodalnim metastazama ipak se smatra nezavisnim prognostičkim faktorom za pojavu lokalne i udaljene rekurencije bolesti, te je veoma značajna za donošenje odluke o liječenju (346-349). Tumori koje karakteriše istovremeno prisustvo oba prognostička faktora, limfo-vaskularne invazije i limfo-nodalnih metastaza, imaju lošiju prognozu nego oni kod kojih je prisutan samo jedan od pomenuta dva prognostička faktora. Vaskularna zahvaćenost tumorom je poseban otežavajući faktor u menadžmentu same promjene, jer se zahvaćeni sudovi često ponašaju kao rezervoar tumorskih ćelija u koži dojke ili zidu grudnog koša i nije ih često moguće ukloniti standardnim hirurškim tehnikama. Takođe, limfo-vaskularna invazija je vrlo često rezistentna na hemioterapiju na šta upućuju brojni slučajevi rezidualnih karcinoma koji se javljaju u vidu limfo-vaskularne invazije nakon neo-adjuvantne hemio-terapije. Limfo- vaskularna invazija prisutna u dermisu je naročito loš prognostički faktor, obzirom da je često udružena sa pojavom rekurentnih tumora i udaljenih metastaza (350). Limfo-vaskularna invazija u dermisu, kad je ekstenzivna, izaziva promjene na koži koje su tipične na primjer za inflamatorni karcinom dojke. Često javlja udruženo sa multiplim limfo-nodalnim metastazama, mada postoje i slučajevi kada je maskirana prisustvom i karakteristikama samog karcinoma. Limfo-vaskularna invazija je na primjer rijetka kod lobularnih karcinoma, vjerovatno usljed nedostatka adhezije tumora za zidove krvnih sudova. Nasuprot tome, limfo-vaskularna invazija može biti ekstenzivna tako da tumorske ćelije u cjelosti ispunjavaju lumen krvnih sudova, te je tada teško razlikovati od dukalnog karcinoma in situ (DCIS). Limfo-vaskularna invazija je prisutna kod 15% pacijenata bez aksilarnih nodalnih metastaza, i naročito je značajan prognostički faktor kod ove grupe pacijenata. Neki karcinomi dojke nemaju tendenciju širenja u limfne čvorove, već se pretežno šire krvnom strujom i na taj način daju udaljene metastaze. Upravo takav je trostruko-negativni karcinom dojke koji je predmet našeg istraživanja. Trostruko- -negativni karcinom dojke spada u karcinome dojke sa malom incidencijom limfo- nodalnih metastaza tj. obično ne zahvata limfne čvorove, već se širi krvnim sudovima i udružen je sa čestom pojavom udaljenih metastaza (351-353). U većini slučajeva limfo-vaskularna invazija se može odrediti hematoksilin-eozin bojenjem (H&E) korišćenjem jasno definisanih kriterijuma. Danas dostupni imunohistohemijski markeri nijesu u potpunosti specifični, niti senzitivni. U rutinskoj praksi, nije neophodno razlikovati krvne od limfnih sudova, obzirom da tumorska zahvaćenost i jednih i drugih ima prognostički značaj. Status aksilarnih limfnih čvorova je najvažniji izolovani prognostički faktor za sve karcinome dojke osim nekih rjeđih podtipova kao što je basal-like podtip. Metastaze u limfnim čvorovima su u značajnoj korelaciji sa veličinom tumora i (354). Preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje se smanjuju sa svakim novozahvaćenim limfnim čvorom (355). Odnos pozitivnih i negativnih limfnih čvorova takođe obezbjeđuje prognostički značajnu informaciju (356-358). Pozitivni limfni čvorovi su pokazatelj metastatskog potencijala bolesti, te stoga snažan negativan prognostički faktor. Prema rezultatima brojnih studija, prisustvo mikro-metastaza dijametra manjeg od 0.2cm, smatra se da ima prognostički značaj, ali je taj značaj mali, odnosno manji je od 3% i kod 5-godišnjeg i 10-godišnjeg preživljenja u odnosu na pacijentkinje s negativnim limfnim čvorovima Studije su pokazale da oko 80% pacijentkinja kod kojih su pronađene mikrometastaze ima srednje preživljavanje 8 godina bez povratka

bolesti (359-361). Obzirom da se većina pacijenata prezentuje sa malim metastatskim depozitima u ograničenom broju limfnih čvorova, palpacija tokom fizikalnog pregleda i primjena imidžing metode, nijesu dovoljne da se isključi prisustvo metastaza u istim. Karcinom dojke se primarno drenira u jedan ili dva sentinel limfna čvora u aksili. Zahvaćenost sentinel čvorova se detektuje tokom operativnog tretmana pacijentkinje radioaktivnim izotopom ili bojom (362). Smatra se da će 10% pacijentkinja koje ne pokazuju zahvaćenost sentinel čvorova imati metastaze u drugim limfnim čvorovima. Biopsija sentinel čvora (čvor stražar) se pokazala kao pouzdana metoda za razlikovanje karcinoma dojke s pozitivnim od onih s negativnim limfnim čvorovima, s redukcijom komplikacija koje nastaju kao posljedica aksilarne disekcije (363). Ukoliko je biopsija sentinel limfnog čvora (SNLB – Sentinel Lymph Node Biopsy) negativna ili je zahvaćen 1-2 limfna čvora, kod poštadne opeacije dojke kod koje se planira postoperativno zračenje disekcija aksile, nije neophodna (364). Kada govorimo o veličini metastaza, prisustvo malih metastatskih depozita u limfnim čvorovima nakon neoadjuvantne terapije ukazuje na loš odgovor na sistemsko liječenje, pa ove metastaze imaju isto značenje kao i metastaze većih dimenzija. Kompletan odgovor na terapiju u limfonodalnoj metastazi ima veći prediktivni značaj nego odgovor na terapiju u primarnom tumoru. Stoga je prije sprovođenja neoadjuvantnog liječenja potrebno potvrditi postojanje metastaze u limfnom čvoru primjenom citološke punkcije ili biopsijom širokom iglom, umjesto da se limfni čvor hiruški odstrani prije početka neoadjuvantnog liječenja (365). Mada su negativni limfni čvorovi povoljan prognostički pokazatelj, ipak će 10 do 30% pacijentkinja sa negativnim limfnim čvorovima razviti udaljene metastaze. U nekim slučajevima karcinom će se proširiti u neke druge limfne čvorove koji nijesu obično dio rutinskog pregleda. Postoje i rjeđi podtipovi karcinoma dojke koji metastaziraju gotovo isključivo hematogeno, bez zahvaćenosti limfnih čvorova kao što su basal-like tumori. Kod ovakvih tipova karcinoma, ostali pokazatelji će imati veći prognostički značaj. Na osnovu prediktivnih faktora procjenjuje se odgovor na određenu vrstu liječenja. Četiri biomarkera se danas koriste u kliničkom menadžmentu pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke i predstavljaju najznačajnije prediktivne faktore za ovu bolest: • estrogenski receptor (ER) • progesteronski receptor (PR), • HER2 receptorski status i • proliferacijski indeks određen primjenom Ki-67 antitijela (73). Od pobrojanih molekularnih markera estrogen (ER), progesteron (PR) receptor status i HER2 određuju se rutinski, dok je Ki-67 proliferacijski index skorijeg datumai dobar je prognostički pokazater i prediktor odgovora na hemoterapiju. Obzirom na veliki prediktivni značaj pobrojani molekularni markeri su danas mete za nove visoko senzitivne terapijske agense, te je precizno i pouzdano određivanje ovih biomarkera zadatak svake patološke laboratorije. Estrogenski receptor (ER) je jedarni transkripcioni faktor kojeg stimuliše hormon estrogen, što za posljedicu ima stimulaciju rasta normalnih epitelnih ćelija u tkivu dojke (366). Rast epitelnih ćelija u tkivu dojke može biti uzrokovan i prekomjernom ekspresijom estrogenskih receptora (ER) u slučaju karcinoma dojke (367). Estrogenski receptori (ER) u tkivu tumora dojke se danas rutinski određuju imunohistohemijskom metodom na preparatima tumorskog tkiva dojke fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin. Imunohistohemijska metoda je jeftina i dostupna u svim laboratorijama, a pritom je visoko specifična i senzitivna. Mikroskopskim pregledom se određuje procenat pozitivnih ćelija i intenzitet bojenja. Opisanom imunohistohemijskom metodom se pozitivno boje oko 80% invazivnih karcinoma dojke, što znači da pokazuju ekspresiju jedarnog estrogenskog receptora, u proporciji koja se kreće u rasponu od 1% do 100% ćelija (368). Glavni razlog rutinskog određivanja estrogenskih receptora leži upravo u činjenici da je ovo snažan prognostički faktor odgovora na hormonsku terapiju kod karcinoma dojke, kao što je na primjer tamoksifen (369). Kod pacijentkinja sa estrogen receptor pozitivnim invazivnim karcinomom dojke, tamoxifen se vezuje za prekomjerno eksprimirane estrogenske receptore i time inhibira estrogenom stimulisani rast ćelija. Zahvaljujući tome, primjena



tamoksifena kao terapijskog izbora, produžava preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje kod pacijentkinja sa ER – pozitivnim invazivnim karcinomom dojke, u odnosu na pacijentkinje sa ER – negativnom bolešću (370). Noviji hormonski terapijski agensi kao što su inhibitori aromataza koji smanjuju produkciju estrogena, imaju sličan terapijski rezultat, tj. samo invazivni karcinomi dojke koji su estrogen receptor (ER) pozitivni imaju pozitivan terapijski odgovor na ove agense (371). Studije su pokazale da postoji direktna korelacija između nivoa ekspresije estrogenskih receptora (ER) i stepena pozitivnog odgovora na hormonsku terapiju. I tumori sa manjim nivoom ekspresije estrogenskih receptora pokazuju značajno bolji odgovor na pomenutu terapiju u odnosu na estrogen receptor negativne tumore, koji generalno na ovu terapiju ne odgovaraju. Na osnovu rezultata imunohistohemijskih studija, koje su potkrijepili vodiči za imunohistohemijsko testiranje, estrogen receptor (ER) pozitivnim tumorima smatraju se oni kod kojih se  $\geq 1\%$  tumorskih ćelija pozitivno boji na estrogenske receptore (273). Na osnovu pomenutih

**ASCO (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists)**

36

preporuka obavezno je imunohistohemijsko određivanje estrogenskih receptora Takođe, ASCO preporuke obavezuju na pouzdanost rezultata testiranja, zbog čega je izuzetno značajno sprovoditi programe unutrašnje i spoljašnje kontrole kvaliteta testiranja. Progesteronski receptor (PR) je veoma značajan i snažan prediktivni faktor za karcinom dojke, koji se takođe rutinski određuje imunohistohemijskom metodom kod invazivnih karcinoma dojke. Estrogenski receptori regulišu prisustvo i ekspresiju progesteronskih receptora (PR). Stoga pozitivna ekspresija progesteronskih receptora ukazuje na očuvanost i funkcionalnost estrogen receptor (ER) signalnog puta. Ekspimirane progesteronske receptore (PR) stimuliše hormon progesteron i time podstiče rast tumorskih ćelija (366,367). Progesteronski receptori se ekspimiraju u jedrima tumorskih ćelija kod 60 do 70% invazivnih karcinoma dojke, sa procentualnom zastupljenošću progesteron receptor (PR) pozitivnih tumorskih ćelija od 0 do 100%. Slično ER – pozitivnim tumorima, kod progesteron receptor (PR) pozitivnih karcinoma dojke postoji direktna korelacija između nivoa ekspresije progesteronskih receptora i stepena odgovora na hormonsku terapiju (372). Mada je ekspresija progesteronskih receptora (PR) u visokoj korelaciji sa ekspresijom estrogenskih receptora (ER), ekspresija ova dva biomarkera nije uvijek komplementarna. Postoje 4 različita fenotipa karcinoma dojke koji počivaju na različitim kombinacijama estrogen i progesteron (ER i PR) receptorskog statusa. Sva 4 pomenuta fenotipa pokazuju različiti stepen odgovora na hormonsku terapiju (373). Fenotip ER-pozitivan/PR-pozitivan je najčešći (srijeće se u 70% slučajeva) i pokazuje najbolji odgovor na hormonsku terapiju (60%). Po učestalosti sljedeći po redu fenotip je ER-negativni/PR-negativni koji čini 25%, i ne odgovara na hormonsku terapiju (stopa odgovora je 0%). Preostala dva mješovita fenotipa ER- pozitivan/PR-negativan i ER-negativan/PR-pozitivan imaju djelimičan odgovor na hormonsku terapiju, mada se čak dovodi u pitanje postojanje ER-negativnog/PR- pozitivnog karcinoma. Kada govorimo o HER2 statusu karcinoma dojke, bitno je naglasiti da je HER2 gen (ERBB2 gen po standardnoj nomenklaturi) lociran na hromozomu broj 17 i kodira sintezu proteina koji funkcioniše kao

**receptor za humani epidermalni faktor rasta (HER2 – Human Epidermal Growth Factor)**

35

2) na površini epitelnih ćelija dojke. Studije sprovedene u posljednjih dvadesetak godina su pokazale da je ovaj gen umnožen kod nekih 15% karcinoma dojke. Amplifikacija ovog gena je u visokoj korelaciji sa povećanom ekspresijom HER2 proteina (374). Učestalost HER2 pozitivnih karcinoma dojke bila je veća u prošlosti, prije uvođenja programa skrininga, iz prostog razloga što je u tom periodu kasnije otkrivanje tumora davalo dovoljno vremena da se razviju dodatne genetske alteracije kakva je amplifikacija HER2 gena. HER2 status se danas određuje rutinski na preparatima fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin metodom imunohistohemije i/ili metodom in situ hibridizacije (FISH, SISH). Obično su rezultati ove dvije metode komplementarni. Preporuke za imunohistohemijsko i određivanje HER2 statusa ISH metodom definisane su ASCO vodičem iz 2007. godine (303). Skorašnje studije pokazuju da HER2 pozitivni invazivni karcinom dojke pozitivno odgovara na novije terapije koje specifično ciljaju HER2 receptor, kao što su na primjer trastuzumab i lapatinib (372,373). HER2 status se danas upravo i određuje u cilju definisanja pacijentkinja koje su dobri kandidati za novije terapije koje ciljaju HER2 receptor, čime se poboljšava njihovo preživljavanje. Stoga možemo reći da je HER2 status značajan prediktivni faktor koji je od velikog značaja u predviđanju odgovora na HER2 ciljanu terapiju. U skladu sa pomenutim ASCO smjernicama, HER2 pozitivni tumori se karakterišu imunohistohemijski snažno pozitivnim cirkumferentnim bojenjem, čiji se intenzitet na skali definiše kao 3+ u >30% ćelija i/ili amplifikacijom HER2 gena potvrđenom in situ hibridizacijom (ISH). Takođe HER2 pozitivnim se smatraju i tumori koji pokazuju umjereno cirkumferentno bojenje, na skali inteziteta definisano sa 2+ i amplifikaciju HER2 gena in situ hibridizacijom (ISH) (274). Opisani HER2 pozitivni karcinomi dojke pokazuju najbolji klinički odgovor na HER2 ciljane terapijske agense (372,373). HER2 negativni tumori, se karakterišu imunohistohemijski slabim ili potpunim odsustvom bojenja tj. intenzitetom obojenosti 0 ili 1+, i uglavnom imaju normalan broj HER2 genskih kopija tj. ISH negativan nalaz za HER2 gen. HER2 negativni tumori nijesu osjetljivi na HER2 ciljanu terapiju, te ona ne može doprinijeti poboljšanju prognoze kod ovih pacijentkinja. Jedna od prepoznatljivih karakteristika malignih ćelija je nekontrolisana proliferacija, koja se može odrediti različitim metodama: brojenjem mitozama, određivanjem obilježenih nuklotida inkorporisanih u DNK molekule, kao i protočnom citometrijom koja bilježi ćelije u „S“ fazi ćelijskog ciklusa (374,375). Imunohistohemijska metoda određivanja ekspresije Ki-67 je jeftina metoda, pogodna za široku primjenu u kliničkoj praksi. Dowset i saradnici iz radne grupe za karcinom dojke, prepoznali su značaj primjene još jedne metode u određivanju stepena ćelijske proliferacije u tumoru, korišćenjem proliferativnog indeksa Ki-67 i definisali preporuke za određivanje ovog biomarkera (376). Ki-67 je biomarker prisutan u svim ćelijama koje se nalaze u fazi proliferacije, te je dugo godina privlačio pažnju istraživača. Ovaj biomarker eksprimira se u svim fazama ćelijskog ciklusa, izuzev u „G0“ fazi (377). Štaviše, Ki-67 uključen je u grupu prospektivno definisanih gena, njih 21, koji čine Onkotip DX koji se koristi za određivanje rizika za povratak bolesti i benefita od hemioterapije kod pacijentkinja sa negativnim limfnim čvorovima i ER-pozitivnim karcinomom dojke (378,379). Proliferativni indeks se smatra prognostičkim pokazateljem za karcinom dojke (380,381). Pored konzistentnih podataka koji govore u prilog prognostičkog značaja Ki-67 proliferativnog indeksa, prediktivni značaj ovog biomarkera za terapijski ishod još uvijek je u fazi istraživanja. Na osnovu dosadašnjih istraživanja Ki-67 proliferativni indeks se može koristiti u svrhe prognoze relativnog odgovora ili rezistencije na hemioterapiju, u svrhu procjene rezidualnog rizika od povratka bolesti kod pacijenata koji su na standardnoj terapiji, te kao dinamički biomarker za procjenu odhova na liječenje prije, u toku i nakon neo-adjuvantnog liječenja, naročito kod hormonske neoadjuvantne terapije (376). Za određivanje Ki-67 proliferativnog indeksa potrebno je pregledati najmanje 500 tumorskih ćelija. Vrijednost Ki-67 se određuje kao procenat ćelija koje se pozitivno boje na ovaj biomarker u posmatranom uzorku (273, 382). Upotreba Ki-67

proliferativnog indeksa kao prognostičkog faktora široko je istraživana kod karcinoma dojke uopšte. Međutim, mali je broj studija koje su istraživale prognostički značaj ovog biomarkera kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke (TNBC) (383-385). Grupa koreanskih istraživača, pokazala je u svojoj studiji da je visok Ki-67 indeks ( $\geq 10\%$ ) udružen sa statistički značajno lošijim preživljavanjem bez progresije bolesti i ukupnim preživljavanjem kod TNBC (386). Munzone i saradnici su u svom istraživanju pokazali da je Ki-67 proliferativni indeks udružen sa različitom prognozom kod različitih podtipova TNBC, sa tačkom presjeka od 35% (387). U posljednjih 15-ak godina, neveliki broj istraživača se bavio ispitivanjem prognostičkog značaja Ki-67 proliferativnog indeksa kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Rezultati istraživanja koje su sproveli Ricciardi i saradnici 2015. godine na uzorku od 45 pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke, upućuju na činjenicu da je ekspresija Ki-67 nezavisan faktor koji korelira sa ukupnim preživljavanjem kod ovih pacijentkinja. Rezultati ovog istraživanja ukazali su da adrogen receptor (AR) negativna ekspresija i Ki-67 pozitivna ekspresija statistički značajno koreliraju sa lošim ishodom bolesti kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke ispitanih u ovom uzorku (388). Međutim, rezultati istraživanja iz 2016. godine na uzorku od 571 trostruko negativnih karcinoma dojke, ukazali su da prognostički značaj Ki-67 proliferativnog indeksa zavisi od starostne dobi pacijentkinja. U ovom istraživanju visok Ki-67 proliferativni indeks pokazao se kao značajan prognostički faktor kod mlađih pacijentkinja, kod kojih je dijagnoza bolesti postavljena prije 50. godine života. Ove pacijentkinje bi mogle imati koristi od hemioterapije agensima koji uzrokuju DNK oštećenja na signalnim putevima koji su prekomjerno aktivirani kod ove bolesti (389). Rezultati studije koju su sproveli Wang i saradnici 2016. godine upućuju da je visok Ki-67 ( $> 40\%$ ) u statistički značajnoj korelaciji sa lošijom prognozom kod TNBC tumora, bez obzira na veličinu tumora i status limfnih čvorova. Ekspresija Ki-67 proliferativnog indeksa ima prediktivni značaj u vezi sa ishodom na neoadjuvantnu hemioterapiju kod većine karcinoma dojke uključujući i trostruko negativni karcinom (TNBC) (390). U vezi sa time, podtip nalik bazalnom koji je najosjetljiviji podtip karcinoma dojke na hemioterapiju, karakteriše se visokim Ki-67 proliferativnim indeksom (391). Rezultati studije koju su sproveli Nakashoi i saradnici 2017. godine, sugerisali su da pacijentkinje sa TNBC osjetljivim na hemio-terapiju imaju klinički manje uznapređovali tumor, rjeđe prisutne kalcifikacije na mamografiji, negativan adrogen receptor (AR) status i visok Ki-67 proliferativni indeks (392). Navedene studije koristile su različite vrijednosti razgraničenja za određivanje prognostički značajnog Ki-67. Prognostički značajne vrijednosti razgraničenja su se kretale od 10% (385), preko 35% (387), te vrijednosti  $\geq 14\%$  (393), pa do vrijednosti  $\geq 40\%$  u nekim studijama skorijeg datuma (394). Najnoviji rezultati studije koju su sproveli Zhu i saradnici, na uzorku od 1800 pacijentkinja sa ranim invazivnim trostruko negativnim karcinomom dojke, pokazali su da je najrelevantnija vrijednost razgraničenja za prognostički značajan Ki-67 30% ( $p=0.008$ ). Na vrijednosti razgraničenja od 30% zabilježeno je lošije preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje kod pacijentkinja sa visokim Ki-67 proliferativnim indeksom. Ki-67 vrijednost razgraničenja od 30% imala je negativan prognostički i prediktivni značaj čak i kod TNBC veličine  $\leq 2$  cm u dijametru, negativnih limfnih čvorova i stadijuma 1 (395) Međutim, još uvijek nedostaje standardizacija po pitanju vrijednosti razgraničenja za Ki-67 proliferativni indeks, koje bi definisale prognostički značajan Ki-67 proliferativni indeks.

1.9. IMP3 biomarker Kao što smo već naveli, trostruko negativni karcinomi dojke predstavljaju heterogenu grupu tumora koja se povezuje sa agresivnijim kliničkim tokom, sklonošću ka metastaziranju hematogenim putem u pluća i mozak, dok su metastaze u lokoregionalne limfne čvorove rjeđe u poređenju sa ostalim tumorima dojke. Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na neoadjuvantne hemioterapijske protokole, pacijentkinje sa ovim tipom tumora imaju visočiju stopu udaljenih metastaza i ultimativno lošiju prognozu. Manje od 30% pacijentkinja sa metastatskim

trostruko negativnim karcinomom dojke živi 5 godina i kod svih je uzrok smrti osnovna bolest, uprkos primijenjenoj adjuvantnoj hemioterapiji koja je danas i osnova liječenja ovih pacijentkinja (287, 296-299). Usljed specifične prirode ove bolesti i loše prognoze, jasno je da postoji velika potreba za boljim razumijevanjem molekularne osnove trostruko negativnih karcinoma dojke; potreba za pronalaženjem novih molekularnih markera koji bi imali prognostički i prediktivni značaj, te omogućili dodatnu subklasifikaciju ovih tumora, a sve u cilju pronalaženja efikasnih metoda liječenja. U posljednjih 20-ak godina mnogi istraživači su ulagali napore u ispitivanje novih prognostičkih markera kod trostruko negativnog karcinoma dojke. Međutim, rezultati istraživanja nijesu dali neki značajniji pomak u klasifikaciji, niti terapiji ovih tumora do danas. Jedan od novijih biomarkera koji se smatra povezanim sa prognozom bolesti kod TNBC je p53 i smatra se udruženim sa lošijom prognozom kod ove bolesti (393). Takođe, pacijentkinje sa trostruko negativnim karcinomom dojke koji pokazuje EGFR/p53 imunohistohemijskim fenotip, izgleda da imaju bolju prognozu i odgovor na adjuvantnu hemioterapiju (396). U skladu sa savremenim nastojanjima nauke, upravo iz gore navedenih razloga, u ovoj studiji odlučili smo istražiti kliničke i histopatološke karakteristike trostruko negativnih karcinoma dojke, te imunohistohemijsku ispoljenost IMP3 proteina kao potencijalnog prognostičkog pokazatelja u ovoj grupi tumora.

### IMP3 (Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3)

2

je pripadnik porodice insulinu sličnih faktora rasta tipa II (IGF2). Do danas su poznata tri člana IMP3 familije: proteini IMP1, IMP2 i IMP3 (397). Ova tri proteina sadrže 6 RNK vezujućih domena od kojih su dva RNK prepoznatljivi domeni, dok su preostala četiri domena heterogeni ribonukleotidni K-heterogeni (KH) domeni (397). IMP3 molekul posjeduje 65,7% sličnosti u amino-kiselinskom sastavu sa IMP1 i 59,7% sličnosti sa IMP2. Sličnost sekvenci u RNK vezujućim domenima je naročito prisutna u KH domenima (398). Sve tri pomenute izoforme IMP pokazale su visok afinitet za vezivanje za humani IGF2 receptor (399,400). IMP3 molekule je identičan K- homolognom domenu *Xenopus laevis* Vg1 mRNA-vezujućeg proteina (Vg1-RBP/Vera) koji je prekomjerno ekspimiran kod nekih karcinoma (401-403). Do danas se zna za najmanje pet segmenata RNK za koje se ciljano vezuje IMP1, uključujući: IGF-II, c-myc,  $\beta$ -actin, tau, and H19. IMP1 može uticati na stabilizaciju, lokalizaciju i translaciju pomenutih receptora na mRNK (399,404-409). Smatra se da je IMP1 onko-fetalni protein, obzirom na činjenicu da se pretežno eksprimira u toku embrionalnog razvoja i kod nekih tumora. Ekspresija ovog proteina je mala ili potpuno odsutna u tkivima odraslih osoba (410,411). Kako smo već napomenuli, najveća sličnost IMP izoformi je prisutna u njihovom KH domenu. Humani protein koji sadrži K-homologni domen prvi put je opisan kod karcinoma pankreasa kod odraslih osoba (412). *Xenopus*

### *laevis* Vegetal 1 (Vg1) mRNA kodira sintezu transforming growth factor $\beta$ -like protein-

21

a koji stimuliše formiranje mezoderma u vegetativnom korteksu mozga. Vg1-RBP smatra se da takođe ima ulogu u regulisanju migracije ćelija nervne krijeste tokom ranog razvoja nervnog sistema (407). Interesantna je činjenica da je IMP3 po prvi put izolovan iz ćelija rabdiosarkoma i pokazalo se da je bio identičan pomenutom proteinu KOC koji se

prekomjerno eksprimira u nekim karcinomima i ima identičan KH domen (413). Prekomjerna ekspresija IMP3/KOC pokazalo se da je udružena sa remodelovanjem tkiva pankreasa (414). Istraživanja su pokazala da je IMP3 uključen u proces embriogeneze kada je fiziološki eksprimiran i pokazuje sličan obrazac ekspresije kao IMP1; dok je nakon rođenja ekspresija ovog proteina patološka i udružena sa procesom nastanka nekih tumora. Posmatrano sa aspekta funkcije ovog proteina, IMP3 funkcioniše kao regulator procesa translacije na mRNK. Kao takav, smatra se da IMP3 ima ključnu ulogu u prenošenju i stabilizaciji mRNK, ćelijskom rastu, proloferaciji i migraciji tokom embriogeneze (415). Visok nivo iIMP3 mRNK zabilježen je kod karcinoma pankreasa, kao i u tumorskim ćelijama kod karcinoma želuca, sarkoma mekih tkiva, karcinoma debelog crijeva, u ćelijama rabdomosarkoma, kao i u K562 leukemijskim ćelijama (399, 416-417). Yaniv i saradnici su 2003. godine u svom istraživanju obezbijedili dokaz o ulozi IMP3 u stimulaciji ćelijske migracije u toku ranog, embrionalnog razvoja nervnog sistema (418). Uslijedila su nova istraživanja među kojima je od značaja pronalazak Yantissa i saradnika koji upućuje na postojanje korelacije između stadijuma tumora i IMP3 (KOC) ekspresije kod karcinoma pankreasa, na osnovu kojeg se može pretpostaviti da IMP3 ekspresija ima veze sa pojavom displazije i razvojem karcinoma pankreasa (419). Regulatornu ulogu IMP3 u ekspresiji gena i proloferaciji ćelija, ispitivali su Liao i saradnici 2005. godine na uzorku K652 leukemijskih ćelija (420). Ova studija je pokazala da inhibicija IMP3 u pomenutim ćelijama nije uticala na promjenu ekspresije RNK receptora za IMP3. Međutim, nakon inhibicije IMP3, mjereno ELISA metodom, primijećeno je da unutar-ćelijski nivo kao i novo sekretovanog IGF2 opada. Obzirom na činjenicu da endogeni i egzogeni IGF2 u pomenutim K652 ćelijama ima ulogu promotora proliferacije (421-427), to će njegova inhibicija uzrokovana supresijom IMP3, rezultovati smanjenom ćelijskom proliferacijom (421,427). Prema rezultatima ove studije IMP3 ne stupa u vezu sa tipičnim receptorima na RNK za IMP1 (c-myc i  $\beta$ -aktin), već se vezuje za sasvim nezavistan receptor H19 na mRNK. Stoga, ova studija je ukazala i na specifične razlike u receptorima na RNK za IMP3 i IMP1, što ih čini funkcionalno različitim. IMP-3 reguliše ekspresiju gena IGF-II vezivanjem za 3 m-RNA region IGF-II. IGF- II se zatim vezuje za IGF-I i stimuliše tirozinsku fosforilaciju ovog receptora. Tirozin fosforilisani IGF-I receptor šalje ćeliji signal za pokretanje ćelijske diobe. Ovim se gubi regulacija ćelijskog ciklusa i remeti apoptoza, što za rezultat ima nekontrolisanu proliferaciju ćelije odnosno karcinogenezu (425). Nasuprot IMP1, nedavno sprovedena studija od strane korejske grupe istraživača, ukazala je na sinergistički efekat IMP2 i IMP3 proteina u metastaziranju trostruko negativnih karcinoma dojke. Naime, IMP2 i IMP3 povećano se ekspimiraju zajedno kod TNBC i sinergistički stimulišu migraciju i epitelijalno- mezenhimalnu translaciju kod luminalnog podtipa ćelija TNBC, stimulišući time nastanak metastaza ove bolesti (437). Jiang i saradnici ispitivali su prediktivni značaj IMP3 kao biomarkera pri određivanju prognoze karcinoma bubrega (428-430). U ovim studijama IMP3 ekspresija u ćelijama karcinoma bubrega određivana je imunohistohemijskom, PCR i Western blot metodom. U ovom istraživanju je primijećeno da je IMP3 ekspresija bila značajno povećana kod pacijenata čiji su tumori bili praćeni prisustvom metastatske bolesti. Povećana IMP3 ekspresija bila je primijećena ne samo u metastazama ovih tumora, već i u značajnom broju primarnih tumora koji su kasnije dali metastatske promjene. Pacijenti čiji primarni tumor nije pokazao IMP3 pozitivnost imali su statistički značajnije duže preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje od onih čiji je primarni tumor bio IMP3 pozitivan. Ove studije dale su značajan doprinos u otkrivanju prediktivnog značaja IMP3, ukazujući na značajno povećanje metastatskog potencijala kod karcinoma bubrega kod pacijenta koji su imali prekomjernu ekspresiju IMP3(428-430). Skorašnje studije ukazale su na dijagnostički značaj IMP3 kod karcinoma endometrijuma, kao i na udruženost IMP3 ekspresije sa agresivnim histološkim fenotipom kod ovih karcinoma. Imunohistohemijski snažna i difuzna IMP3 ekspresija kod karcinoma endometrijuma

pokazala se kao visoko senzitivna za serozne i svijetlo-ćelijske (clear-cell) karcinome endometrija, kao i za njihove prekursorne lezije, za razliku od indolentnih endometrioidnih karcinoma endometrija kod kojih je IMP3 ekspresija bila slaba. Ovakav nalaz upućuje na značaj pronalaza IMP3 pozitivnosti u prekursornim lezijama u endometriju, kao faktora koji može predvidjeti tip karcinoma endometrija i potencijalni tok bolesti (431). Prvi napori istraživača u ispitivanju veze insulinu sličnog faktora rasta (IGF) i njegovog receptora sa etiopatogenezi karcinoma dojke datiraju iz 2000. godine (432,433). Rezultati ovih istraživanja ukazuju postojanje ove povezanosti, mada je uticaj IMP3 na prirodu i ponašanje karcinoma dojke još uvijek nedovoljno istražen. Takođe, još uvijek je nejasno da li IMP3 ekspresija zapravo inicira malignu transformaciju ćelija i proliferaciju ili je pak posljedica već prisutne maligne transformacije u ćelijama karcinoma dojke. Tek značajno kasnije, 2012. godine, došlo se do zaključka da aktivnost signalnih puteva u već maligno izmijenjenim ćelijama trostruko negativnog karcinoma dojke ima značajan uticaj na ekspresiju IMP3 molekula, kao i da IMP3 protein doprinosi funkciji trostruko negativnog karcinoma dojke (434,435). Prema rezultatima ove studije, aktivacija receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR) izaziva stimulaciju mitogen-aktivirajuće protein kinaze EGFR signalnog puta, što za posledicu ima indukciju transkripcije i ekspresiju IMP3. U ovoj studiji istraživači su pronašli da aktiviran estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) suprimira EGFR transkripciju i na taj način indirektno inhibira ekspresiju IMP3 proteina. Ovaj mehanizam u potpunosti korelira sa poznatom prirodom trostruko negativnog karcinoma dojke koju karakteriše smanjena ekspresija ER $\beta$  i povećana ekspresija EGFR i aktivnost EGFR signalnog puta. Štaviše, rezultati ove studije ukazuju da IMP3 doprinosi EGFR-posredovanoj migraciji i invaziji malignih ćelija kod trostruko negativnog karcinoma dojke (434). Prvi pomak u ispitivanju prognostičkog značaja IMP3 ekspresije kod invazivnog karcinoma dojke, dali su Walter i saradnici 2009. godine (436). U svojoj retrospektivnoj studiji, na uzorku od 138 pacijentkinja sa invazivnim karcinomom dojke, oni su došli do saznanja da je učestalost IMP3 pozitivnosti u njihovom uzorku invazivnih karcinoma dojke 33%. Takođe, ova studija dala je značajan rezultat koji govori da je IMP3 ekspresija u statistički značajnoj korelaciji sa poznatim morfološkim i biološkim prognostičkim faktorima i to sa: visokim gradusom tumora, sa nekrozom u tumoru, povećanom CK5/6 ekspresijom i trostruko negativnim molekularnim podtipom. Rezultati ovog istraživanja su po prvi put sugerisali da IMP3 ekspresija kod trostruko negativnog karcinoma dojke može biti u vezi sa agresivnijim fenotipom i kraćim ukupnim preživljavanjem (436). Međutim, treba imati na umu slabost ove studije, koja se ogleda u vrlo heterogenom uzorku sa svega 32 trostruko negativna karcinoma i poprilično visokom procentu IMP3 pozitivnosti (33%) za tako heterogen uzorak. Svega godinu dana kasnije Sidoni i autori su, na takođe heterogenom uzorku karcinoma dojke, dobili rezultat koji govori da je IMP3 pozitivnost u trostruko negativnim karcinomima dojke bila 41%, te da su ovi tumori imali značajno kraće preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje od TNBC koji su bili IMP3 negativni (437). Ova studija je ukazala da je IMP3 ekspresija češća kod trostruko negativnih karcinoma dojke koji pokazuju agresivniji profil, što ukazuje na činjenicu da je trostruko negativni karcinom dojke vrlo heterogena bolest. Do sličnog zaključka došli su i Vranic i saradnici u studiji sprovedenoj u Sjedinjenim Američkim Državama, čiji rezultati su ukazali na IMP3 ekspresiju kod određenih histoloških formi kao što je adenoidni cistični karcinom dojke, za razliku od primarno apokrinih formi karcinoma kod kojih je IMP3 ekspresija bila odsutna (438). Rezultati navedenih studija dali su pretpostavku da bi određivanje IMP3 moglo biti od pomoći za definisanje novih podtipova karcinoma dojke sa lošijom prognozom. Međutim, heterogeni uzorak koji je korišćen u ovim studijama, učinio ih je značajno ograničenim i nedovoljnim za značajnije zaključivanje o ulozi IMP3 biomarkera. Stoga, studije na reprezentativnom uzorku koji bi se sastojao samo od trostruko negativnih karcinoma dojke, dao bi mnogo bolji doprinos nauci i struci u definisanju

prognostičkog i prediktivnog značaja ovog biomarkera. Posljednjih godina zabilježeni su napori istraživača da dublje ispituju prognostički značaj IMP3 proteina i njegovu potencijalnu korelaciju sa odgovorom trostruko negativnog karcinoma dojke na hemioterapiju. Carey i saradnici opisali su 2007. godine da određeni tumori iz TNBC grupe pokazuju dobar odgovor na neoadjuvantnu hemioterapiju (439). Međutim, skorašnje istraživanje sprovedeno 2017. godine, ukazalo je da je IMP3 pozitivnost udružena često sa rezistencijom na neoadjuvantne hemioterapijske protokole kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Ovo istraživanje sugerira na potencijalnu primjenu IMP3 kao negativnog prognostičkog faktora za TNBC koji može biti od značaja kao prediktor odgovora na hemioterapiju i prediktor ukupne prognoze kod ovih tumora (440). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja iz 2013. godine koje je pokazalo da IMP3 djeluje kao promotor hemiorezistencije trostruko negativnih karcinoma dojke putem regulacije ekspresije breast cancer resistance proteina (ABCR) (441). Na osnovu rezultata, do danas malobrojnih istraživanja značaja IMP3 kod trostruko negativnih karcinoma dojke, možemo reći da je povećana ekspresija IMP3 povezana sa agresivnim ponašanjem tumora, uznapredovalim kliničkim stadijumom bolesti, nalazom udaljenih metastaza i kraćim ukupnim preživljavanjem (296-299). Povećana ekspresija IMP3 u gore navedenim studijama, takođe, je pokazala povezanost sa lošim odgovorom na neoadjuvantne hemioterapijske protokole. Na osnovu do danas sprovedenih istraživanja, smatra se da IMP3 ekspresija ima dokazan dijagnostički i prognostički značaj za TNBC. Prema tome, možemo pretpostaviti da bi IMP3 kao molekularni marker mogao biti potencijalno dobra meta za nove terapijske agenase koji bi unaprijedili liječenje ovih tumora. Međutim, zbog vrlo heterogenih uzoraka koji su korišćeni u dosadašnjim studijama, sa malim brojem trostruko negativnih karcinoma dojke, te brojnih drugih metodoloških ograničenja, neophodne su su dalje studije koje bi obezbijedile pouzdaniji dokaz prognostičkog i prediktivnog značaja IMP3 za trostruko negativni karcinom dojke. Targetiranje IMP3 molekula ciljanim terapijskim agensima mogao bi biti efikasan pristup u menadžmentu trostruko negativnih karcinoma dojke iz više razloga: IMP3 se ne eksprimira u zdravom tkivu dojke, mehanizam djelovanja ovog molekula je poznat (vezivanje za specifične sekvence RNK), a inhibicija ekspresije IMP3 molekula trebalo bi da poveća osjetljivost tumora na hemioterapiju (442). Molekul IMP3, jedan je od najaktuelnijih i za istraživanje najinteresantniji antigen, čija je povećana ekspresija primijećena kod niza gore pomenutih malignih tumora. Zbog svoje imunogeničnosti, odnosno sposobnosti da indukuje snažan i specifičan antitumorski imuni odgovor, epitopi IMP3 molekula mogli bi biti meta nosintetisanih vakcina u liječenju trostruko negativnog karcinoma dojke. Aktivna imunoterapija je još uvijek u fazi istraživanja kao potencijalni način liječenja trostruko negativnih i karcinoma dojke uopšte. Kancer vakcine su dizajnirane tako da ciljaju samo maligne ćelije i obezbjeđuju poštedu zdravog okolnog tkiva. Rezultati dosadašnjih kliničkih studija, pokazali su njihovu sigurnost i gotovo nepostojeći rizik od autoimune reaktivnosti na iste. Ovakav oblik imunoterapije, zasnovan na imunogenoj sposobnosti IMP3 molekula, do danas je ispitan kao novi terapijski modalitet u liječenju karcinoma pluća i ezofagusa (443). Klinička studija faze I pokazala je dobru tolerabilnost vakcine koja aktivira IMP3 specifični T-ćelijski imuni odgovor kod pacijenata sa HLA-A-24 pozitivnim karcinomom ezofagusa. U toku su i studije koje ispituju efikasnost IMP3 specifične imunoterapije kod pacijenata sa HLA-A-2 pozitivnim tumorima, prije svega kod karcinoma pluća (444). Smatra se da isti mehanizam IMP3 specifičnog T-ćelijskog imunog odgovora, predstavlja novu mogućnost za liječenje trostruko negativnog karcinoma dojke. Imajući u vidu rezultate ne naročito brojnih prethodno opisanih istraživanja u oblasti trostruko negativnih karcinoma dojke, naročito imajući u vidu njihove ograničenosti za jasno zaključivanje, u istraživanju koje smo sprovodili odlučili smo prije svega koristiti homogen uzorak trostruko negativnih karcinoma dojke. Korišćenje homogenog uzorka trostruko negativnih karcinoma dojke, značajno povećava statističku moć

zaključivanja, te vjerujemo da je utoliko veći značaj rezultata našeg istraživanja i doprinos nauci. Značaj istraživanja koje smo sproveli ogleda se i u činjenici da smo ovim putem obezbijedili dodatnu morfološku i imunohistohemijsku podlogu za dalje studije usmjerene ka istraživanju uloge IMP3 proteina u trostruko negativnim karcinomima dojke. Takođe, potkrijepljeno rezultatima našeg istraživanja, određivanje IMP3 molekularnog markera omogućiće bolju podjelu unutar heterogene grupe trostruko negativnih karcinoma dojke. Imajući u vidu uopšteno lošu prognozu kod ovih tumora, a na osnovu dobijenih rezultata, vjerujemo da naše istraživanje doprinosi rasvjetljavanju prognostičke uloge biomarkera IMP3. Uloga IMP3 u prognozi TNBC, otvara i pitanje potencijalnog unapređenja liječenja pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke. Poseban značaj našeg istraživanja vidimo u mogućnosti razvoja ciljanih imunoloških terapija, na temeljima rezultata koje ćemo izložiti, a koje za ovaj podtip tumora još uvijek ne postoje. Pronalaženje novih terapijskih agenasa svakako bi bilo od velikog značaja za unaprijedjenje prognoze kod ovih pacijentkinja.

2. Ciljevi istraživanja i hipoteza

2.1. Ciljevi istraživanja U skladu sa tematikom objašnjenom u uvodu teze, ciljevi našeg istraživanja sprovedenog kao predmet doktorske disertacije podrazumijevaju, na ispitanim uzorcima trostruko negativnih karcinoma dojke odrediti:

1. povezanost prognostičkih faktora: kliničkih (veličina tumora), demografskih (dob) i patohistoloških (histološki tip, stepen diferencijacije, nalaz vaskularne invazije) i imunohistohemijskog nivoa IMP3 proteina, sa dužinom ukupnog preživljavanja i preživljavanja bez znakova progresije bolesti.
2. značaj imunohistohemijskog nivoa IMP3 proteina kod trostruko negativnih karcinoma dojke, kao prognostičkog pokazatelja.

Ciljevi našeg istraživanja koje je predmet teze doktorske disertacije, temelje se na osnovnim rezultatima naše teze koje smo detaljno obradili u Polaznim istraživanjima naše studije, a obuhvatili su:

1. određivanje imunohistohemijskog nivoa IMP3 proteina u ispitanim uzorcima trostruko negativnih karcinoma dojke;
2. povezanost kliničkih (veličina tumora), demografskih (dob) i patohistoloških (histološki tip, stepen diferencijacije, nalaz vaskularne invazije) pokazatelja sa imunohistohemijskim nivoom IMP3 proteina.

Dobijeni osnovni rezultati našeg istraživanja koje smo obradili detaljno kao predmet polaznih istraživanja, predstavljaju izuzetno značajnu polaznu osnovu za dalji tok našeg rada i rezultate koje obrađujemo na ovom mjestu. Rezultati polaznih istraživanja su neophodni za zaključivanje o rezultatima naše teze, te kao takvi predstavlja nerazdvojivu cjelinu, na koju ćemo na ovom mjestu napraviti kratak osvrt, u duhu objašnjenja rezultata koji su predmet završne teze.

2.2. Hipoteza

Obzirom na činjenicu da su trostruko negativni karcinomi dojke heterogena grupa tumora, analizom potencijala IMP3 kao prognostičkog faktora, očekujemo da će rezultati našeg istraživanja omogućiti razdvajanje ove grupe tumora u prognostički različite podgrupe, na osnovu morfoloških i imunohistohemijskih karakteristika. Takođe, očekujemo da će:

- pacijentkinje sa trostruko negativnim karcinomom dojke u našoj studiji u oko 35% slučajeva pokazati povećanu ekspresiju IMP3.
- povećana ekspresija IMP3 kod naših pacijentkinja biti češća kod pacijentkinja sa bazalnim imunofenotipom karcinoma dojke, kod pacijentkinja sa nižim stepenom diferencijacije tumora, te povećanom vaskularnom invazijom.
- povećana ekspresija IMP3 kod trostruko negativnih karcinoma dojke u našem istraživanju biti povezana sa kraćim ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti, odnosno, da je IMP3 negativan prognostički pokazatelj kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke.
- potvrda definisanih hipoteza putem rezultata našeg istraživanja, obezbijediti dokaz da je IMP3 bitan prediktivni faktor koji određuje prognozu ovih tumora. Ovakvi rezultati našeg istraživanja bili bi potencijalno i od značaja za moguće unapređenje liječenja trostruko negativnog karcinoma dojke, budućim razvojem terapijskih agenasa koji bi ciljano djelovali na IMP3 molekul koji se prekomjerno eksprimira kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke.

3. Materijal



**i metode Istraživanje je** sprovedeno **na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-**  
**a, Split. U**

9

odnosu na pristup istraživanje je eksperimentalno, nerandomizirano. Prema namjeni istraživanje je primijenjeno. Prema specifičnosti organizacije, radi se o presječnom istraživanju. Prema načinu dobijanja podataka, istraživanje je opservaciono i retrospektivno. 3.1. Ispitanice U studiju su uključene sve bolesnice oboljele

**od karcinoma dojke koje su operisane na** Klinici **za** kirurgiju KBC- Split, **u periodu od 01.01.**

13

2003. –

**31.12.2009.** godine, čiji **je operativni materijal analiziran** u **Kliničkom zavodu za patologiju,**

4

sudsku medicinu i citologiju i postavljena dijagnoza karcinoma dojke sa trostruko negativnim imunofenotipom. Kao izvor podataka korišćena je medicinska dokumentacija tj. istorije bolesti bolesnica liječenih u Centru za tumore KBC- Split u gore navedenom periodu. Korišćeni su klinički podaci o starosnoj dobi bolesnica, datumu operacije, kliničkom stadijumu bolesti, primijenjenom hirurškom i onkološkom liječenju, podaci o toku bolesti (pojavi recidiva, metastaza i dužini perioda bez znakova progresije bolesti), te o kliničkom ishodu bolesti bolesnica obuhvaćenih uzorkom. Iz studije su isključene bolesnice sljedeće sa sljedećim karakteristikama: 1)

**bolesnice koje su prije operacije primale** hemioterapiju, 2) **bolesnice čije** parafinski kalupi  
**tumora** više nijesu **bile**

4

dostupni u momentu sprovođenja našeg istraživanja, 3) bolesnice u čijim je kalupima tumorskog tkiva naknadnom provjerom dokazano prisustvo ER, PR ili HER2 pozitivnog statusa 4)

**bolesnice koje su nakon operativnog zahvata** nastavile **praćenje i liječenje** bolesti **u nekoj drugoj**  
**ustanovi.**

4

Ukupan broj bolesnica koje su zadovoljile kriterijime uključenja u naše istraživanje je 118. 3.2. Metode istraživanja U svrhe našeg istraživanja, izvršili smo ponovni pregled arhiviranih patohistoloških stakalaca bolesnica iz našeg uzorka. Ponovnim

pregledom odredili smo sljedeće parametre: 1) histološki tip tumora, 2) stepen diferencijacije, 3) prisustvo bazalne morfologije, 4) postojanje vaskularne invazije, 5) po potrebi ponovo je određena ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora (ER i PR), 6) po potrebi ponovo je određen

**HER2/neu status. Histološki tip karcinoma dojke,** u našem istraživanju, **određen je** u skladu sa **4**  
**smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije** (445). **Histološki gradus**

tumora određen je korišćenjem

**Elston i Ellis-** e sheme **za sve histološke tipove** karcinoma **dojke** (338). **Ekspresija** **12**  
**estrogenskih i progesteronskih receptora**

**(ER i PR) receptora,** kao i **HER2/neu status,** određeni su **prema smjernicama** ASCO **/CAP** **4**  
**protokola** (304). Vaskularna invazija **tumora**

definisana je na osnovu prisutstva tumorskih ćelija u endotelom omeđenim prostorima. Bazalna morfologija je procijenjena s obzirom na prisustvo specifičnih

**morfoloških karakteristika kao što su:** sincicijalni **način rasta, nekroza u centralnom dijelu** tumora, **4**  
**gurajući rubovi,**

prisustvo limfocitnog upalnog infiltrata na periferiji, te prisustvo metaplastičnih i medularnih elemenata u zahvaćenom tkivu (446). 3.3. Imunohistohemijske analize Kao što smo već naveli, u našem istraživanju smo ponovo pregledali parafinske blokove tumorskog tkiva bolesnica obuhvaćenih našim uzorkom. Reprezentativni rezovi tumorskog tkiva naknadno su, u sklopu imunohistohemijske analize bojeni primjenom imunohistohemijske LSAB (Labeled Streptavidin Biotin) metode, prema standardnom protokolu, u Laboratoriji za imunohistokemiju

**Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC -Split.** **31**

Imunohistohemijska LSAB metoda je metoda bojenja koja koristi streptavidin vezujući konjugat u svrhe detekcije vezujućeg primarnog antitijela u ispitivanom, prebojenom tkivnom uzorku. Uzorci tumora za analizu dobijeni su 3-5µ rezovima

arhiviranih parafinskih blokova. U toku imunohistohemijske analize uzorci su bojeni standardnom metodom hemalaun-eozin i imunohistohemijski, primjenom antitijela na IMP3 protein (DAKO, Glostrup, Danska) u razrjeđenju 1:150. Za imunohistohemijsku analizu, nakon deparafinisanja i rehidracije, histološki rezovi tumorskog tkiva su obrađeni zagrijavanjem u mikrotalasnoj peći (750 W, 110°C) u citratnom puferu. Ohlađeni rezovi su isprani u destilovanoj vodi i PBS (Phosphate Buffered Saline) puferu, a zatim inkubirani sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radi blokiranja endogene peroksidaze. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi i rastvoru PBS fosfatnog pufera, uzorci su inkubirani u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim primarnim vezujućim antitijelima. Nakon ovog postupka, kao sljedeći korak, izvršeno je ispiranje s PBS puferom i inkubacija sa streptavidinom. Nakon ispiranja u PBS puferu preparati su inkubirani sa hromogen diaminobenzidinom (DAKO) u vlažnoj komori, te su kontrastno obojeni hematoksilinom, dehidrirani u gradijentu alkohola, izbistreni u ksilolu i prekriveni kanada balzomom i pokrovnim stakalcima. Bitna stavka u našem istraživanju bilo je imunohistohemijsko određivanje IMP3. Za ovu analizu korišćena je metoda bojenja koja detektuje komplekse primarnog IMP3 antitijela sa odgovarajućim receptorom u uzorku. Bojenje na IMP3 smo procjenjivali semikvantitativno, nalazom smeđe obojenosti citoplazme. U svrhe preciznijeg definisanja rezultata ovog testiranja, intenzitet obojenosti smo procijenili skalom: 1) 0: odsutno citoplazmatsko bojenje, 2) 1: slabo citoplazmatsko bojenje, 3) 2: umjereno citoplazmatsko bojenje i 4) 3: jako citoplazmatsko bojenje. Bojenje na IMP3 smo i kvantitativno definisali, na osnovu stepenovanja postotka obojenih ćelija, kao znaka pozitivne reakcije na IMP3: 1) 0: 0%, 2) 1: 1-25%, 3) 2: 25-50%, 4) 3: 51-75% 5) 4: 75-100% Konačni rezultat bojenja na prisustvo IMP3 ekspresije u uzorcima tumorskog tkiva, interpretirali smo kao rezultat zbira bodova dobijenih procjenom intenziteta obojenosti i postotka obojenih ćelija. Rezultat smo interpretirali na sljedeći način interpretiran na sljedeći način: 1) 0-1: negativno bojenje 2) 2-4: slabo pozitivno bojenje 3) 5-7: jako pozitivno bojenje 3.4. Statističke metode Za analizu podataka dobijenih u ovom istraživanju korišćen je statistički program SPSS Windows. Od statističkih analiza za određivanje značajnosti razlike kvantitativnih varijabli: starost (godine), veličina tumora (u cm) u odnosu na ekspresiju IMP3 proteina korišćen je T - test, dok je za određivanje značajnosti razlike kvalitativnih varijabli (histološki tip, stepen diferencijacije, nalaz vaskularne invazije) u odnosu na ekspresiju IMP3 proteina korišćen HI-kvadrat test. Za ispitivanje povezanosti svih pomenutih varijabli sa ekspresijom IMP3 korišćena je metoda logističke regresije. U analizi preživljavanja prema svim varijablama koristili smo Kaplan-Meierova metoda i Log-rank test. Uticaj ispitivanih varijabli na preživljenje i relativni rizik od smrtnog ishoda i relativni rizik od povratka bolesti analizirali smo Coxovom uninominalnom i multinominalnom analizom. U našem radu, zaključivanje o statističkim hipotezama sproveli smo na nivou statističke značajnosti  $p \leq 0.05$ . 4. Rezultati istraživanja Naše istraživanje je obuhvatilo sve uzastopno dijagnostifikovane bolesnice sa trostruko negativnim karcinomom dojke u Kliničko bolničkom Centru u Splitu u periodu od 01.01.2003. – 31.12.2009. godine, koje imaju dostupne parafinske blokove tumorskog tkiva i kompletne kliničke podatke. U Tabeli 7 prikazano je 118 pacijentkinja oboljelih od TNBC, koje su obuhvaćene našim istraživanjem. U ovoj tabeli, pacijentkinje su prikazane prema ispitivanim kvalitativnim i kvantitativnim varijablama i medijani (minimum – maksimum) kvantitativnih varijabli, ukupno i u odnosu na ishod. Prikazane su prosječne vrijednosti, procenti i rasponi analiziranih varijabli, na način da su ponuđene deskriptivne statističke vrijednosti za poduzorak žena umrlih od karcinoma dojke, poduzorak onih koji su živi ili su umrli od ostalih bolesti, te vrijednosti za cijeli uzorak (N = 118). Tabela 7:

**Prikaz žena oboljelih od TNBC prema ispitivanim kvalitativnim i kvantitativnim varijablama** – medijan 4  
(min-max), **ukupno**

i u odnosu na ishod. VARIJABLE UMRLE OD KARCINOMA DOJKE N= 28 (23.7%) ŽIVE ILI UMRLE OD OSTALIH BOLESTI N= 90 (76.3%) UKUPNO N = 118 Dob (godine) 58 (34-97) 57 (32-85) 57.5 (32-97) Veličina tumora (cm) 3.0 (2.0-6.0) 2.5 (0.8-12.0) 2.5 (0.8-12.0) Histološki tip NOS 27 (96.4) 72 (80.0) 99 (83.9) Ostali 1 (3.6) 18 (20.0) 19 (16.1) IA 6 (21.4) 24 (26.7) 30 (25.4) IIA 3 (10.7) 33 (36.7) 36 (30.5) Klinički IIB 1 (3.6) 10 (11.1) 11 (9.3) Stadijum IIIA 5 (17.9) 10 (11.1) 15 (12.7) IIIB 3 (10.7) 1 (1.1) 4 (3.4) IIIC 10 (35.7) 12 (13.3) 22 (18.6) Bazalna Ne 8 (28.6) 55 (61.1) 63 (53.4) morfolologija Da 20 (71.4) 35 (38.9) 55 (46.6) Stepen 1 0 (0.0) 0 (0.0) 0 (0.0) diferencijacije 2 8 (28.6) 15 (16.7) 23 (19.5) (gradus) 3 20 (71.4) 75 (83.3) 95 (80.5) Vaskularna Ne 15 (53.6) 63 (70.0) 78 (66.1) invazija Da 13 (46.4) 27 (30.0) 40 (33.9) Napomena: Raspon u zagradi predstavlja minimalnu i maksimalnu starostnu dob ispitanica, odnosno u drugom slučaju minimalnu i maksimalnu veličinu tumora. U ostalim slučajevima, broj u zagradi je procenat ispitanika u određenoj kategoriji s obzirom na histološki tip, klinički stadium, bazalnu morfolologiju, gradus i vaskularnu invaziju. Glavni brojevi (vrijednosti van zagrada) su frekvencije ispitanica u svakoj od kategorija (tj. njihov broj), osim u slučaju starostne dobi i veličine tumora, gdje su glavni brojevi medijane (centralne vrijednosti, prosjeci) starosti i veličine tumora, izražene u centimetrima. Podaci iz Tabele 7, upućuju da je prosječna starostna dob ispitanica obuhvaćenih ovim istraživanjem, izražena medijanom, iznosila Mdn = 57.5, odnosno da se starostna dob ispitanica kretala u rasponu od 32 do 97 godina. Prosječna veličina tumora izražena medijanom, iznosila je Mdn=2.5, s rasponom vrijednosti veličina od 0.8 do 12.0. Naše istraživanje je pokazalo da je najčešći histološki tip TNBC bio NOS tj. invazivni karcinom bez posebne oznake (n = 99, odnosno 83.9%), dok je ostalih tipova bilo 19 (16.1%). Najčešći klinički stadijum trostruko negativnog karcinoma dojke u našem uzorku bio je IIA (n = 36, tj. 30.5%), dok je najrjeđi bio IIIB (n = 4, odnosno 3.4%). Prisustvo bazalne morfolologije uočeno je kod 55 ispitanica (46.6%), a odsustvo kod njih 63 (53.4%). Kod 95 ispitanica, tj. 80.5%, tumori su bili slabo diferentovani. Prisustvo vaskularne invazije u našem ispitivanju bilo je izraženo kod 40 ispitanica (33.9%), a njeno odsustvo u 78 slučajeva (66.1%). U daljnim nanalizama smo u metodama opisanu trostepenu skalu sveli na dihotomnu (binarnu), čija je kategorija "jaka ekspresija IMP3" karakterisana kao pozitivno IMP3 bojanje i "slaba ili negativna ekspresije IMP3" karakterisana kao negativno IMP3 bojanje (Slika 7, Slika 8) (Tabela 8). Slika 7: Imunohistohemijska analiza: A) negativno IMP3 bojanje, (B) negativno ER bojanje, (C) negativno PR bojanje, (D) negativno HER2 bojanje, (E) slabo pozitivno IMP3 bojanje, (F) negativno ER bojanje, (G) negativno PR bojanje, (H) negativno HER2 bojanje, (I) jako pozitivno IMP3 bojanje, (J) negativno ER bojanje, (K) negativno PR bojanje i (L) negativno HER2 bojanje. ER = estrogen receptor, HER2 = epidermalni faktor rasta receptor 2, IMP3 = insulinu-sličan faktor rasta II, mRNA vezujući protein 3, PR = progesteron receptor. Izvor: Sjekloća N. et al.

**Prognostic value of IMP3 immunohistochemical expression in triple negative breast cancer. Medicine**  
**2020;99:7(e19091)**

2

(447). Slika 8: (A) sincicijalni obrazac rasta, (B) velika centralna bezćelijska/nekrotična zona, (C) gusti limfocitni infiltrat na periferiji invazivne komponente i (D) vaskularna invazija. Izvor: Sjekloća N. et al.

**Prognostic value of IMP3 immunohistochemical expression in triple negative breast cancer. Medicine**  
**2020;99:7(e19091)**

2

(447). Tabela 8: Odnos kvalitativnih i kvantitativnih varijabli u odnosu na IMP3 ekspresiju. VARIJABLE IMP3+ N= 42 (35.6%) IMP3- N= 76 (64.4%) P Dob (godine) 62 (34-97) 55 (32-85) .664 <52 52-58 59-71 >71 11 (26.2) 8 (19.05) 15 (35.7) 8 (19.05) 13 (17.6) 29 (39.2) 17 (22.9) 15 (20.3) 0.113 Veličina tumora (cm) 3.0 (1.2-6.0) 2.5 (0.8-12.0) 0.039\* < 1.5 1.5-2.5 2.6-3 >3 1 (2.4) 16 (38.1) 10 (23.8) 15 (35.7) 25 (33.3) 25 (33.3) 9 (12.0) 16 (21.3) 0.001\*\* Histološki tip Duktalni NOS Ostali 34 (81.0) 8 (19.0) 65 (85.5) 11 (14.5) 0.517 Klinički Stadij IA IIA IIB IIIA IIIB IIIC 5 (11.9) 11 (26.2) 4 (9.5) 7 (16.7) 3 (7.1) 12 (28.6) 25 (32.9) 25 (32.9) 7 (9.2) 8 (10.5) 1 (1.3) 10 (13.2) 0.034\* Bazalna morfologija Ne Da 5 (11.9) 37 (88.1) 58 (76.3) 18 (23.7) <0.001 Stupanj diferencijacije (gradus) 1 2 3 0 (0.0) 6 (14.3) 36 (85.7) 0 (0.0) 17 (22.4) 59 (77.6) 0.289 Vaskularna invazija Ne Da 27 (64.3) 15 (35.7) 51 (67.1) 25 (32.9) 0.757 \* Hi-kvadrat, odnosno t-statistik je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* Hi-kvadrat, odnosno t-statistik

**je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)**

5

< 0.001 Količnik šansi (OR) je statistički značajan na nivou 0.001 (p < 0.001) Iz Tabele 8, možemo zapaziti

**da ne postoji statistički značajna razlika u** prosječnoj starostnoj dobi **između** grupa ispitanih  
pacijentkinja **sa i bez**

20

ekspresije IMP3 (t = 0.436, p = 0.667), kao ni u odnosu na pripadnost ispitanica različitim dobnim grupama ( $\chi^2 = 5.968$ , p = 0.113). S druge strane, ovo istraživanje je pokazalo da je prosječna veličina tumora statistički značajno veća u gr. "IMP3+" (t = 2.088, p = 0.039), nego u gr. "IMP3-" Isto tako, primjećujemo da postoje i razlike vezane za četiri grupe ispitanica formirane po veličini tumora ( $\chi^2 = 16.195$ , p = 0.001). Grupa ispitanica oboljelih od TNBC kod kojih postoji ekspresija IMP3 i grupa bez ekspresije IMP3 se ne razlikuju statistički značajno po varijabli „histološki tip“ ( $\chi^2 = 0.419$ , p = 0.517). Takođe, kako rezultati našeg ispitivanja pokazuju, slučajevi sa i bez izražene ekspresije IMP3 se ne razlikuju statistički značajno po gradusu tumora ( $\chi^2 = 1.126$ , p = 0.289), niti po vaskularnoj invaziji ( $\chi^2 = 0.096$ , p = 0.757). Prema izloženim rezultatima istraživanja u tabeli 2, primjećujemo da su statistički značajne razlike između "IMP3+" i "IMP3-" grupe ispitanica vezane za klinički stadijum bolesti ( $\chi^2 = 12.048$ , p = 0.034), kao i za prisustvo/odsustvo bazalne morfologije ( $\chi^2 = 45.099$ , p < 0.001). Preciznije, nalaz bazalne morfologije povezan je s jakom IMP3 ekspresijom. U narednoj tabeli (Tabela 9) nalaze se rezultati Log rank testa, nastali kao rezultat analize preživljavanja (u vidu slobodnog intervala bez bolesti, tj. disease-free survival), s obzirom na varijable koje smo ispitivali u našem istraživanju. Tabela 9: Analiza preživljavanja Log rank testom za slobodni interval bez bolesti (DFS) prema ispitivanim pokazateljima. VARIJABLE Prosjek DFS (mjeseci) SE 95%CI LR P Dob (godine)

<52 52-58 59-71 >71 57 94 74 86 8 5 8 8 41-73 84-104 59-90 70-102 8.95 0.030\* Veličina tumora (cm) < 1.5 1.5-2.5 2.6-3 >3 - 83 64 65 - 6 10 9 - 71-96 44-84 48-83 3.3 2.5 0.191 0.114 Histološki tip Duktalni NOS Ostali 97 80 7 4 84-110 71-88 Klinički Stadij IA IIA IIB IIIA IIIB IIIC 87 97 89 52 11 59 7 4 11 7 2 10 74-100 89-106 67-111 38-66 8-14 39-80 28.5 <0.001 Bazalna morfologija Ne Da 93 70 4 6 85-101 57-82 10.35 0.001\*\* Stupanj diferencijacije (gradus) 1 2 3 - 77 84 - 9 4 - 60-94 76-92 0.49 0.482 Vaskularna invazija Ne Da 84 75 5 7 75-94 61-89 1.31 0.253 IMP313 Negativan Pozitivan 97 57 3 7 90-103 42-71 28.70 <0.001 \* LR je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* LR

je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)

5

< 0.001 LR je statistički značajan na nivou 0.001 (p < 0.001) Na osnovu rezultata iz Tabele 9, možemo očitati da postoji statistički značajna povezanost starostne dobi i slobodnog intervala bez bolesti (LR = 8.95, p = 0.030). Prosječni DFS (Disease-free survival tj vrijeme bez progresije bolesti) je najveći u grupi bolesnica od 52 do 58 godina starosti (94 mjeseci), a najkraći u starosnoj grupi ispod 52 godine (57 mjeseci). Preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) u našem istraživanju je pokazao statistički značajnu povezanost i sa sljedećim varijablama: kliničkim stadijumom bolesti (LR = 28.5, p < 0.001), bazalnom morfologijom (LR = 10.35, p = 0.001), IMP313 (LR = 28.702, p < 0.001) i IMP307 (LR = 30.61, p < 0.001). Dakle, slobodni interval bez bolesti veći je u slučajevima u kojima je u pitanju karcinom dojke sljedećih karakteristika: niži klinički stadijum, odsutna bazalna morfologija, negativna ekspresija IMP3. Statistički značajni rezultati iz Tabele 9, odnosno njima pripadajući podaci, prikazani su Kaplan-Meierovim krivuljama preživljavanja (Grafikon 14-17). Grafikon 14: Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljavanja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema starosnoj dobi (plava: manje od 52 godine; zelena: 52-58 god; siva: 59-71 god; ljubičasta: više od 71 godinu). Grafikon 15: Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljavanja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema kliničkom stadijumu (plava: IA; zelena: IIA; siva: IIB; ljubičasta: IIIA; crvena: IIIB i žuta: IIIC). Grafikon 16: Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljavanja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema bazalnoj morfologiji (plava: NE; zelena: DA). Grafikon 17: Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljavanja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema IMP313 (plava: negativan; zelena: pozitivan). U tabeli koja slijedi (Tabela 10), prikazani su rezultati Log rank testa vezani za ukupno preživljenje (overall survival – OS). Tabela 10: Analiza preživljavanja Log rank testom za ukupno preživljenje (OS) prema ispitivanim pokazateljima. VARIJABLE Prosjek OS (mjeseci) SE 95%CI LR P Dob (godine) <52 52-58 59-71 >71 59 94 75 87 8 5 7 8 43-74 84-104 61-90 71-102 8.70 0.034\* Veličina tumora (cm) < 1.5 1.5-2.5 2.6-3 >3 - 85 64 67 - - 6 73-96 9 46-81 8 51-84 3.25 2.49 0.197 0.115 Histološki tip Duktalni NOS Ostali 97 81 7 4 83-110 73-89 Klinički Stadijum IA IIA IIB IIIA IIIB IIIC 89 97 87 54 19 62 6 4 12 6 6 10 78-101 89-106 63-111 41-66 7-30 43-81 28.7 <0.001 Bazalna morfologija Ne Da 94 70 4 6 86-102 58-82 10.58 0.001\*\* Stupanj diferencijacije (gradus) 1 2 3 - 80 84 - 8 4 - 64-96 76-93 0.22 0.637 Vaskularna invazija Ne Da 85 77 4 7 76-94 63-90 0.99 0.320 IMP313 Negativan Pozitivan 97 59 3 7 91-104 45-72 28.33 <0.001 \* LR je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* LR

je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)

5

< 0.001 LR je statistički značajan na nivou 0.001 ( $p < 0.001$ ) U skladu sa prikazanim u prethodnoj tabeli (Tabela 10), možemo reći da su rezultati slični onima vezanim za preživljavanje bez progresije bolesti (DFS). Tako je ukupno preživljenje statistički značajno povezano sa: starostnom dobi pacijentkinja (preciznije, pripadnošću dobnim grupama; LR = 8.70,  $p = 0.034$ ), kliničkim stadijumom bolesti (LR = 28.71,  $p < 0.001$ ), bazalnom morfologijom (LR = 10,58,  $p = 0.001$ ), i rezultatom dobijenim na osnovu IMP3 bojenja (LR = 28.33,  $p < 0.001$ ). Dakle, dužina ukupnog preživljavanja kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke u našem istraživanju je duže kod pacijentkinja koje karakteriše: starostna dob <52 godine, niži klinički stadijum bolesti, odsutna bazalna morfologija, negativna ekspresija IMP3. Varijable koje su u statistički značajnoj korelaciji sa ukupnim preživljavanjem (OS) pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke u našem istraživanju, prikazane su Kaplan-Meierovim krivuljama (Grafikon 18-21). Grafikon 18: Kaplan-Meierova krivulja: prikaz ukupnog preživljavanja (OS) prema starostnoj dobi (plava: manje od 52 godine; zelena: 52-58 god; siva: 59-71 god; ljubičasta: više od 71 godinu). Grafikon 19: Kaplan-Meierova krivulja: Prikaz ukupnog preživljavanja (OS), shodno kliničkom stadijumu (plava: IA; zelena: IIA; siva: IIB; ljubičasta: IIIA; crvena: IIIB i žuta: IIIC Grafikon 20: Kaplan-Meierova krivulja: prikaz ukupnog preživljavanja (OS), u odnosu na bazalnu morfologiju (plava: NE; zelena: DA). Grafikon 21: Kaplan-Meierova krivulja: prikaz ukupnog preživljavanja (OS) u odnosu na IMP3 (plava: negativan; zelena: pozitivan). U cilju ispitivanja potencijalne prediktivne moći ispitivanih varijabli za ukupno vrijeme bez progresije bolesti i za ukupno preživljenje, sproveli smo Cox-ovu uninominalnu regresijsku analizu za svaku varijablu posebno, a u odnosu na DFS kao kriterijum (zavisnu varijablu), kao i na OS kao kriterijum (tj. zavisnu varijablu). Rezultati su prikazani u narednim tabelama (Tabela 11, Tabela 12). Tabela 11: Coxova regresiona uninominalna analiza za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) VARIJABLE RR 95%CI P Dob (godine) <52 52-58 59-71 >71 0.84 0.58-1.20 0.331 Veličina tumora (cm) < 1.5 1.5-2.5 2.6-3 >3 1.89 1.33-2.67 <0.001 Histološki tip Duktalni NOS Ostali 2.97 0.71-12.48 0.137 Klinički Stadij IA IIA IIB IIIA IIIB IIIC 1.44 1.19-1.73 <0.001 Bazalna morfologija Ne Da 3.33 1.52-7.29 0.003\*\* Stupanj diferencijacije (gradus) 1 2 3 0.75 0.33-1.69 0.489 Vaskularna invazija Ne Da 1.52 0.73-3.13 0.261 IMP3 Negativan Pozitivan 6.73 2.98-15.18 <0.001 \* RR je statistički značajan na nivou 0.05 ( $p < 0.05$ ) \*\* RR

**je statistički značajan na nivou 0.01 ( $p < 0.01$ )**

5

< 0.001 RR je statistički značajan na nivou 0.001 ( $p < 0.001$ ) Rezultati u Tabeli 11 govore da sprovedena analiza prediktivnog značaja varijabli sugerise da su sljedeće varijable (prediktori) statistički značajno povezane sa DFS-om (u zagradi su relativni rizik – RR i značajnost njemu korespondentnog koeficijenta): veličina tumora (RR = 1.89,  $p < 0.001$ ), klinički stadijum bolesti (RR = 1.44,  $p < 0.001$ ), bazalna morfologija (RR = 3.33,  $p = 0.003$ ) i IMP3 (RR = 6.73,  $p < 0.001$ ). Na primjer, kod ispitanica kod kojih je odsutna bazalna morfologija, prisutan je 3.33 puta manji rizik za smrtni ishod nego kod onih kod kojih je bazalna morfologija zastupljena u tumoru, imajući u vidu interval bez progresije bolesti (DFS). Ovaj rizik je, 6,73 puta manji kod grupe ispitanica sa negativnim rezultatom testiranja na IMP3, u odnosu na one kod kojih je pozitivan rezultat testiranja na IMP3. Tabela 12: Coxova regresiona uninominalna analiza za ukupno preživljavanje (OS). VARIJABLE RR 95%CI P Dob (godine) <52 52-58 59-71 >71 0.84 0.58-1.21 0.358 Veličina tumora (cm) < 1.5 1.5-2.5 2.6-3 >3 1.88 1.34-2.66 <0.001 Histološki tip Duktalni NOS Ostali 2.97 0.71-12.47 0.137 Klinički Stadij IA IIA IIB IIIA IIIB IIIC 1.42 1.18-1.71 <0.001 Bazalna

morfologija Ne Da 3.36 1.54-7.37 0.002\*\* Stupanj diferencijacije (gradus) 1 2 3 0.82 0.36-1.86 0.641 Vaskularna invazija Ne Da 1.44 0.69-2.97 0.328 IMP3 Negativan Pozitivan 6.66 2.95-15.01 <0.001 \* RR je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* RR

je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)

5

< 0.001 RR je statistički značajan na nivou 0.001 (p < 0.001) U slučaju ukupnog preživljavanja (Tabela 12), dobili smo slične rezultate. Sa ukupnim preživljavanjem, statistički značajno su povezane sljedeće varijable (prediktori): veličina tumora (RR = 1.88, p < 0.001), klinički stadijum (RR = 1.42, p < 0.001), bazalna morfologija (RR = 3.36, p = 0.002) i IMP3 pozitivnost (RR = 6.66, p < 0.001). Manja veličina tumora (<1.5 cm), upoređena sa veličinom većom od 1.5 cm, podrazumijeva 1.88 puta manji rizik od smrtnog ishoda, uzimajući u obzir ukupno preživljenje (OS) kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke obuhvaćenih našim istraživanjem. Kako bismo stekli što bolji uvid u odnos analiziranih varijabli (indikatora) i preživljavanja, sproveli smo Cox-ovu multinominalnu regresionu analizu. Rezultati ove analize su prikazani u Tabelama 13 i 14. U ovu vrstu analize uvrštene su varijable koje su bile statistički značajne za preživljavanje (tj. za DFS i OS). Tabela 13: Multinomialna Cox-ova regresiona analiza za slobodni interval bez bolesti (DFS), uz IMP313 u ulozi jednog od prediktora.

VARIJABLE	Referentni nivo	RR	95%CI	P
Veličina tumora (cm)	< 1.5	1.5-2.5	2.6-3	>3
Klinički Stadij	IA	1.30	1.04-1.61	0.020*
Bazalna morfologija	Ne	Da	Ne	0.54
IMP3	Negativan	Pozitivan	Ne	7.68

7.68 2.27-25.97 0.001\*\* \* RR je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* RR

je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)

5

Kada u Cox-ovu regresionu analizu odjednom uključimo ove četiri varijable (gdje je DFS u svojstvu kriterijuma, odnosno zavisne varijable), primjećujemo da su od prediktivnog značaja samo sljedeći indikatori tj varijable: klinički stadijum (RR = 1.30, p = 0.020) i IMP313 (RR = 7.68, p = 0.001). Ovo bi značilo da trostruko negativni karcinomi dojke u našem uzorku, nižeg kliničkog stadijuma imaju 1.30 puta manji rizik od progresije bolesti tj, 1.30 puta duže preživljavanje bez progresije bolesti u odnosu na tumore višeg stadijuma bolesti. Takođe, pacijentkinje čiji tumor pokazuje ekspresiju IMP313 imaju 7.68 puta veći rizik od progresije bolesti. Isto smo uradili za ukupno preživljenje (OS), u tabeli koja slijedi (Tabela 14). Tabela 14: Multinomialna Coxova regresiona analiza za ukupno preživljavanje (OS), gdje je IMP313 jedna od prediktorskih varijabli.

VARIJABLE	Referentni nivo	RR	95%CI	P
Veličina tumora (cm)	< 1.5	1.5-2.5	2.6-3	>3
Klinički Stadij	IA	1.27	1.03-1.58	0.028*
Bazalna morfologija	Ne	Da	Ne	0.66
IMP3	Negativan	Pozitivan	Ne	6.36

6.36 1.98-20.46 0.002\*\* \* RR je statistički značajan na nivou 0.05 (p < 0.05) \*\* RR

je statistički značajan na nivou 0.01 (p < 0.01)

5



Iz Tabele 14 vidimo da su relevantne (statistički značajne) varijable za ukupno preživljavanje – klinički stadijum bolesti (RR = 1.27, p = 0.028) i IMP313 pozitivnost (RR = 6.36, p = 0.002). Ukoliko je IMP313 negativan u tumoru, rizik za smrtni ishod je manji 6.36 puta, kada je u pitanju ukupno preživljenje (OS). 5. Diskusija Trostruko negativni karcinom dojke, kao kliničko-patološki entitet, prvi put se pominje u literaturi u oktobru 2005. godine (285). Do danas, ovaj termin se pominje u više od 600 publikacija, što svjedoči o prepoznatljivosti značaja ove teme od strane onkologa, patologa i genetičara i kontinuiranim naporima ka unaprjeđenju razumijevanja etiopatogeneze, klasifikacije i liječenja ove bolesti. Trostruko negativni karcinomi dojke čine oko 12 - 17% svih karcinoma dojke. To je heterogena grupa tumora koja se povezuje sa agresivnijim kliničkim tokom. Češće metastaziraju hematogenim putem u pluća i mozak, dok su metastaze u lokoregionalne limfne čvorove rjeđe u poređenju sa ostalim tumorima dojke. Za sada hemioterapija je jedini način liječenja ove bolesti, obzirom da trostruko negativni karcinomi dojke ne ekspimiraju receptore (ER, PgR i HER2) prepoznatljive danas postojećim ciljanim terapijskim agensima. Uprkos dobrom inicijalnom odgovoru na neoadjuvantne hemioterapijske protokole, pacijentkinje sa ovim tipom tumora imaju visočiju stopu udaljenih metastaza i lošiju prognozu bolesti (287, 296-299). Agresivna priroda i nepovoljan tok ove bolesti, mali broj terapijskih opcija sa ograničenom efikasnošću, povod je i izazov brojnih istraživača koji su u posljednjih nekoliko decenija ulagali napore u cilju pronalaženja novih biomarkera koji bi obezbijedili prije svega bolje razumijevanje prirode i karakteristika ove bolesti, bolju klasifikaciju i buduće liječenje ovih tumora. U našem istraživanju analizirali smo IMP3 biomarker kod trostruko negativnih karcinoma dojke.

### IMP3 (Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3)

2

je pripadnik porodice insulinu sličnih faktora rasta tipa II (IGF2) koji se povećano ekspimirira kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Stoga, u našem istraživanju odlučili smo se ispitati korelaciju ekspresije ovog biomarkera i karakteristika same bolesti u cilju boljeg razumijevanja prirode bolesti, kao i prognostičke i prediktivne moći IMP3 biomarkera kod TNBC na osnovu njegovog uticaja na parametre preživljavanja kod pacijentkinja sa ovom bolešću. Rezultati koje smo dobili biće od pomoći u definisanju potencijalno nove klasifikacije trostruko negativnih karcinoma dojke i definisanju karakteristika podtipova u okviru ove heterogene grupe tumora. U poslednje dvije decenije uloženi su veliki naponi u ispitivanje stepena ispoljenosti IMP3 u mnogim tkivima solidnih tumora. U svim ovim ispitivanjima IMP3 je opisan kao molekul odgovoran za ćelijsku proliferaciju, adhezivnost i invazivnost ćelija malignog tumora. Ćelije adultnih tkiva koje prekomjerno ekspimiraju IMP3 na ovaj način gube regulaciju ćelijskog ciklusa, te je njihova apoptoza poremećena, što za rezultat ima nekontrolisanu proliferaciju ćelije i karcinogenezu (432). IMP3 je inicijalno identifikovan 1996. godine u tkivu karcinoma pankreasa (412), a zatim po prvi put izolovan iz ćelijske linije tkiva rabdomiosarkoma, iste godine. Ekspresija IMP3 je negativna u zdravim zrelim tkivima, a pozitivna u zloćudnim tumorima debelog crijeva, bubrega, mokraćne bešike, u duktalnom adenokarcinomu pankreasa, karcinomu želuca, nesitnoćelijskom karcinomu pluća, u malignom melanomu, karcinomu štitaste žlijezde, osteosarkomu i konačno karcinomu dojke. Ako govorimo o stepenu ekspresije IMP3, istraživanja su pokazala da je ispoljenost IMP3 najviša kod adenokarcinoma želuca, te da iznosi 82%, prema istraživanju koje su sproveli Wang et al. (448). Visoka ispoljenost IMP3 dokazana je i kod nekih drugih malignih umora, kao na primjer kod kolorektalnog karcinoma 76,9%, holangiokarcinoma 74%, te kod 70% pacijenata sa adenokarcinomom pluća (449-451). IMP3 ekspresija kod primarnog

superficialnog karcinoma urotela iznosi 20%, kao i kod hepatocelularnog karcinoma (452,453). Kod karcinoma bubrežnih ćelija IMP3 se eksprimira u 30% slučajeva. Kod primarnog meningeoma ispoljenost je svega 6,5% (454). Istraživanja su pokazala da povećana ekspresija IMP3 kod navedenih tumora ima prognostičku vrijednost i povezana je s lošijim preživljavanjem. Do danas su objavljeni rezultati svega nekoliko istraživanja koja su pratila stepen ispoljenosti IMP3 u tkivu karcinoma dojke, njegovu korelaciju sa kliničkim i patohistološkim karakteristikama TNBC i prognostički potencijal ovog biomarkera. Prva ispitivanja procentualne ispoljenosti IMP3 markera kod trostruko negativnih karcinoma dojke objavljena su 2009. godine. Walter i saradnici su na uzorku ispitanica koji je bio sličan uzorku obuhvaćenom našim ispitivanjem (138 ispitanica) dokazali IMP3 pozitivnost u 33% slučajeva (436). U našem istraživanju koje smo sproveli na uzorku od 188 pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke, ustanovili smo povećanu ispoljenost IMP3 kod 35,6% ispitanica, što je u skladu sa rezultatima prethodno sprovedenih istraživanja. Karakteristike trostruko negativnih karcinoma dojke kod pacijentkinja u našem istraživanju i karakteristike klasičnih prognostičkih faktora detaljnije smo opisali u Polaznom istraživanju. Za svrhu teze, na ovom mjestu osvrnućemo se na korelaciju pomenutih karakteristika sa IMP3 ispoljenošću kod TNBC u našem uzorku. Razmotrićemo i prognostički i prediktivni značaj IMP3 i njegov uticaj na preživljavanje. Kada govorimo o klasičnim prognostičkim faktorima za karcinom dojke, opšte je važeći stav da su veća dimenzija tumora, viši gradus i nalaz vaskularne invazije pokazatelji loše prognoze tumora. U vezi sa time, naše istraživanje je pokazalo da visok stepen IMP3 ispoljenosti kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke statistički značajno korelira sa nekim od prognostičkih faktora koji su udruženi sa lošom prognozom i to sa: veličinom tumora, kliničkim stadijumom bolesti i bazalnom morfologijom tumora. Istovremeno, naše istraživanje je pokazalo da neki drugi klasični prognostički faktori kao što su: starostna dob pacijenta, gradus tumora i prisustvo vaskularne invazije, nijesu statistički značajno povezani sa stepenom IMP3 ispoljenosti u našem uzorku pacijentkinja sa TNBC. Istraživanjem koje su objavili 2012. godine, Zhang i saradnici su pokazali da su TNBC kao prognostički loša grupa tumora najčešće veličine od 2 do 5 cm (435), što se podudara s rezultatima našeg istraživanja. S porastom veličine tumora raste stepen IMP3 ispoljenosti u našem istraživanju. Faktor o čijem prognostičkom značaju postoji jedinstveno mišljenje je klinički stadijum bolesti, što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. Prognostički značaj veličine tumora do danas je ispitivan na osnovu korelacije sa pojavom limfonodalnih metastaza i kod različitih istraživača, dao različite rezultate. Kontrolisana studija koju su sproveli Van de Rijn i saradnici 2002. godine (297) upućuje da TNBC imaju veću sklonost razvoju limfonodalnih metastaza u poređenju sa drugim vrstama karcinoma dojke. Međutim, nasuprot ovoj studiji, niz drugih studija su pokazale da nema razlike u učestalosti pojave limfonodalnih metastaza kod TNBC (296,298). Skorašnja kohortna studija sprovedena od strane grupe kineskih autora iz 2018. godine, ukazala je da postoji značajna razlika u preživljavanju pacijentkinja sa TNBC u Kini koje imaju N1 i N2 status limfnih čvorova u odnosu na one čiji ne nodalni status N0 (limfni čvorovi nijesu zahvaćeni). Ovakav rezultat upućuje da bi pacijentkinje sa N1 i N2 stadijumom mogle imati koristi od snažnije hemioterapije (455). Na ispitivanom uzorku od 292 ispitanice sa karcinomom dojke Haffty et al (143) su pokazali da veličina tumora nije u korelaciji sa pojavom limfonodalnih metastaza. U ovoj studiji za tumore veličine <2 cm učestalost limfonodalnih metastaza bio je 42.1%, dok je ovaj procenat iznosio 70.0% kod tumora >5 cm ( $P>0.05$ ). Na osnovu ovoga Haffty i saradnici su zaključili da veličina tumora ne korelira značajno sa pojavom limfonodalnih metastaza, što je u skladu sa nalazom niza studija sprovedenih u Kini. Nalaz vaskularne invazije, pokazali su Rabab i saradnici, je više ispoljen kod trostruko negativnih nego kod ostalih karcinoma dojke. Takođe, nalaz vaskularne invazije kod basal-like karcinoma više je ispoljen nego kod tumora koji nemaju bazalnu morfologiju. Ova

studija je pokazala da je kod basal-like tumora i TNBC vaskularna invazija bila statistički značajno povezana sa većom dimenzijom tumora. U ovom istraživanju nije nađena povezanost nalaza vaskularne invazije sa povećanom ispoljenošću IMP3 proteina. Ako tome dodamo činjenicu da je u ovoj studiji analizom preživljavanja dokazano da mikrovaskularna invazija nije bila povezana sa ukupnim preživljavanjem niti preživljavanjem do progresije bolesti, jasno je da mikrovaskularna invazija u ovoj agresivnoj podgrupi karcinoma dojke gubi svoju prognostičku vrijednost (456). Ovakav nalaz poklapa se sa rezultatima našeg istraživanja. Možemo reći da vaskularna invazija može biti vrlo značajna u početnoj fazi nastanka i rasta tumora, ali se tokom tumorske progresije, sticanjem dodatnih genetskih promjena vezanih uz nastanak metastatskih klonova važnost vaskularne invazije gubi. Na osnovu ovoga možemo pretpostaviti da TNBC mogu imati benefita od primjene antiangiogenezne terapije, ali samo u liječenju ranog karcinoma. U vezi sa time interesantni su rezultati studije (442) koji su pokazali da antiangiogenezna terapija redukuje rast primarnog tumora, ali i da ubrzava invaziju i metastaziranje tumora. Histološki gradus tumora izuzetno je značajan prognostički faktor kod TNBC. Prognostički su najpovoljniji tumori prvog gradusa. Loše diferentovani tumori gradusa 3 udruženi su sa kratkim intervalom do povratka bolesti i kraćim ukupnim preživljavanjem u odnosu na graduse 1 i 2.

**Histološki gradus je značajno povezan sa učestalošću recidiva i dužinom preživljavanja**

42

(440). U našem istraživanju histološki gradus nije pokazao statistički značajnu koelaciju sa stepenom IMP3 ispoljenosti, što se objašnjava specifičnošću uzorka ispitanih pacijentkinja, u kom nije učestvovala niti jedna pacijentkinja sa gradusom 1 trostruko negativnog karcinoma dojke. Odsustvo korelacije gradusa tumora i IMP3 pozitivnosti u našem istraživanju može se objasniti podatkom da u istraživanoj grupi tumora nije bilo niti jednog koji je bio dobro diferentovan, a <20% je bilo srednje diferencirano. U istraživanju koje smo sproveli, ispitanice sa bazalnim fenotipom koji je klinički i patohistološki prediktor agresivnijeg biološkog ponašanja karcinoma dojke i pokazatelj loše prognoze, imale su visoku ispoljenost IMP3. Naše istraživanje je ukazalo da od klasičnih prognostičkih faktora koje smo analizirali u ovoj studiji, samo su starostna dob pacijentkinja, klinički stadijum bolesti i bazalna morfologija tumora bili statistički značajno povezani sa dužinom preživljavanja pacijentkinja bez progresije bolesti (DFS).

**Rezultati našeg istraživanja pokazali su da postoji statistički značajna povezanost starostne dobi**

27

pacijentkinja i preživljavanja bez progresije bolesti (DFS). Prosječni DFS je bilo najduže u grupi bolesnica od 52 do 58 godina starosti (94 mjeseci), dok smo najkraće preživljavanje bez progresije bolesti zabilježili u starosnoj grupi ispod 52 godine (57 mjeseci). Takođe, povećana ekspresija IMP3, novog biomarkera koji smo ispitivali u ovoj studiji, bila je udružena sa lošijim preživljavanjem bez progresije bolesti (DFS). Preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) u našoj studiji, bilo je duže kod pacijentkinja koje su imale karcinom sljedećih karakteristika: niži klinički stadijum, odsustvo bazalne morfologije, odsustna ili nedovoljno izražena ekspresija IMP3. Kada govorimo o povezanosti prognostičkih faktora koje smo ispitivali sa ukupnim preživljavanjem (OS – overall survival) pacijetkinja, u našem istraživanju smo dobili sličan rezultat kao kod prethodno

opisanog preživljavanja bez progresije bolesti (DFS). Isti faktori, starostna dob pacijentkinja, klinički stadijum bolesti, bazalna morfologija i stepen ispoljenosti IMP3, pokazali su statistički značajnu korelaciju sa dužinom ukupnog preživljavanja kod naših pacijentkinja sa TNBC. U našem istraživanju, ukupno preživljavanje (OS) bilo je duže kod pacijentkinja koje karakteriše: starostna dob <52 godine, niži klinički stadijum bolesti, odsutna bazalna morfologija, odsutna ili nedovoljno izražena ekspresija IMP3. Na osnovu navedene analize uticaja pojedinačnih faktora na preživljavanje pacijentkinja u našoj studiji (DFS i OS), možemo reći da starostna dob, klinički stadijum bolesti, bazalna morfologija i IMP3 ispoljenost imaju važan prognostički značaj kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Analiza prediktivne moći faktora navedenih u prethodnom dijelu diskusije, u našem istraživanju je pokazala da veličina tumora, klinički stadijum bolesti, bazalna morfologija i IMP3 ekspresija statistički značajno koreliraju sa preživljavanjem bez progresije bolesti (DFS) i ukupnim preživljavanjem (OS). U našem istraživanju, tumori koji su imali povećanu ekspresiju IMP3 imali 6.73 puta veći rizik za nakstanak progresije bolesti tj. kraće preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) i 6,66 puta veći rizik za kraće ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na IMP3 negativne tumore. Rizik za kraće preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) i kraće ukupno preživljavanje (OS) kod TNBC većih dimenzija (preko 2.6cm) bilo je 1.8 veći. Trostruko negativni karcinomi dojke većeg kliničkog stadijuma bolesti pokazali su 1,4 puta veći rizik za kraće

preživljavanje bez progresije bolesti (DFS) kraće ukupno preživljavanje (OS) u odnosu na

7

one nižeg kliničkog stadijuma bolesti. Ukoliko je TNBC imao bazalnu morfologiju, njeno prisustvo je bilo povezano sa 3,33 puta većim rizikom za kraće DFS-om i OS. Ukoliko je trostruko negativni karcinom dojke imao istovremeno sve gore navedene karakteristike, lošijem DFS-u i ukupnom preživljavanju (OS) doprinosa je samo viši klinički stadijum bolesti od gore pobrojanih karakteristika tumora. Na osnovu navedenog možemo zaključiti da je imunohistokemijski nivo IMP3 proteina značajan prediktor prognoze kod trostruko negativnih karcinoma dojke. Takođe, Cox-ova multinominalna analiza koju smo primijenili u cilju određivanja korelacije prognostičkih faktora i preživljavanja, omogućila nam da sagledamo trostruko negativne karcinome dojke kao heterogenu grupu tumora. Rezultati našeg istraživanja govore da trostruko negativne karcinome dojke možemo sagledati kao heterogenu grupu tumora koje prije svega možemo podijeliti na IMP3 pozitivne i IMP3 negativne tumore. IMP3 pozitivni tumori imaju lošije preživljavanje bez progresije bolesti i ukupno preživljavanje u poređenju sa IMP3 negativnim tumorima i sveukupno lošiju prognozu. IMP3 pozitivan tip trostruko negativnih karcinoma dojke, na osnovu rezultata našeg istraživanja, češće je udružen sa većim dimenzijama tumora, višim kliničkim stadijumom bolesti i bazalnom morfologijom. Naše istraživanje je, takođe, pokazalo da ovi tumori imaju sveukupno lošiju prognozu

(preživljavanje bez progresije bolesti – DFS i ukupno preživljavanje – OS) u odnosu na

7

ostale karcinome dojke. Podtip IMP3 pozitivnog tumora karakteriše se lošijom prognozom. Rizik od progresije bolesti kod ovih tumora je dodatno povećan ukoliko je tumor istovremeno većih dimenzija od 2.5 cm i u slučaju većeg kliničkog

stadijuma bolesti. IMP3 pozitivan karcinom dojke karakteriše se i 6,6 puta većim rizikom od smrtnog ishoda, tj. kraćeg ukupnog preživljavanja u odnosu na IMP3 negativne TNBC tumore. Ovi tumori imaju naročito nepovoljnu prognozu i kraće ukupno preživljavanje ukoliko je IMP3 pozitivnost istovremeno udružena sa višim kliničkim stadijumom bolesti. Poseban značaj našeg istraživanja i doprinos unapređenju dijagnostike, klasifikacije i menadžmenta trostruko negativnih karcinoma dojke, zasniva se na rezultatima našeg istraživanja koji upućuju da bi IMP3 molekularni marker mogao biti dobra meta za nove terapijske agense. Imunohistohemijsko određivanje ovih biomarkera, na način sproveden u našem istraživanju, je sa aspekta troškova za zdravstveni sistem jeftina metoda. Takođe metoda je jedostavna i primjenljiva u praksi te bi se mogla lako integrisati u rutinsku kliničku praksu patologa u budućnosti. Ciljane terapije, vezivanjem za IMP3 receptor, mogle bi blokirati njihovu aktivnost u tkivu tumora, te time omogućiti uspostavljanje normalne apoptoze i ćelijskog ciklusa, tj. ograničile karcinogenezu ili je potpuno zaustavile. Vjerujemo da bi razvoj ciljanih terapija, koje bi djelovale na IMP3 biomarker čiji smo prognostički i prediktivni značaj rasvijetlili u našem istraživanju, mogao promijeniti lice ove bolesti i značajno unaprijediti prognozu kod pacijentkinja sa trostruko negativnim karcinomom dojke.

6. Zaključci: 1. IMP3 biomarker se povećano eksprimira u tkivima trostruko negativnih karcinoma dojke (35.6%). 2. IMP3 biomarker ima prognostički značaj kod trostruko negativnih karcinoma dojke koji značajno utiče na prognozu ovih tumora, te da je povezan sa sveukupno lošijom prognozom (kraćim preživljavanjem bez progresije bolesti – DFS i kraćim ukupnim preživljavanjem – OS) u odnosu na IMP3 negativne karcinome dojke. 3. IMP3 pozitivani trostruko negativni karcinom dojke, češće je udružen sa većim dimenzijama tumora, višim kliničkim stadijumom bolesti i bazalnom morfologijom, te kraćim preživljavanjem bez progresije bolesti (DFS) i kraćim ukupnim preživljavanjem (OS). 4. Nepovoljnijoj prognozi i kraćem preživljavanju kod ovih tumora doprinosi viši klinički stadijum bolesti i veće dimenzije tumora (veći od 2.5cm). Ovi tumori imaju 2.6 puta kraće ukupno preživljavanje u odnosu na IMP3 negativne tumore, čemu može dodatno doprinijeti veća dimenzija tumora (preko 2.5 cm). 5. IMP3 kao novi prognostički i marker za trostruko negativne karcinome dojke, otvara mogućnost za dalja istraživanja, sa ciljem pronalaženja ciljanih terapijskih agenasa koji bi djelovanjem na IMP3 ograničili ili onemogućili progresiju ove bolesti i unaprijedili prognozu kod pacijentkinja sa TNBC.

7. Literatura 1. Freddie Bray, BSc, MSc, PhD1; Jacques Ferlay, ME2; Isabelle Soerjomataram, MD, MSc, PhD3; Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. doi: 10.3322/caac.21492. 2. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:1819-1827. 3. Brinton LA, Gaudet MM, Gierach GL. Breast cancer. In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman CA, Schottenfeld D, eds. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018:861-888. 4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer: IARC Cancer Base Internet* Lyon, France; Dostupno sa <http://eco.iarc.fr/EUCAN/CancerOne> 5. Eva Steliarova-Foucher, Mark O'Callaghan, Jacques Ferlay, Eric Masuyer, Stefano Rosso, David Forman, Freddie Bray, Harry Comber; The European Cancer Observatory: A new data resource; doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.027 6. Maligne neoplazme u Crnoj Gori 2013. Podgorica: Institut za javno zdravlje Crne Gore, Centar za kontrolu i prevenciju nezaraznih bolesti, Registar malignih neoplazmi Crne Gore, 2018 7. Dupont WD, Page DL (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312:146–151. 8. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, Worrell JA, Schuyler PA, Plummer WD (1993). Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 71: 1258–1265. 9. Lee E, Ma H, Kean-Cowdin R, Van Den Berg D, Bernstein L, Henderson BE, Ursin G (2008). Effect of

reproductive factors and oral contraceptives on breast cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers and noncarriers: results from a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 3170–3178. 10. Ottini L, Palli D, Rizzo S et al. Male breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 73(2): 141–155. 11. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH (1994). Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 86: 1600–1608. 12. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, ur. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC: Lyon 2012: 8-31. 13. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 358: 1389–1399. 14. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250: 1684–1689. 15. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3044–3048. 16. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, Van de Vijver M, et al. (1998). Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 90: 1138–1145. 17. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266: 66–71. 18. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265: 2088–2090. 19. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP (1993). Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 52: 678–701. 20. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, Coulon V, et al. (1996). Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 13: 114–116. 21. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, et al. (1997). Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 6: 1383–1387. 22. Swift M, Morrell D, Massey RB, Chase CL (1991). Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325: 1831–1836. 23. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, et al. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268: 1749–1753. 24. De Brakeleer S., De Greve J., Loris R, Janin N, Lissens W, Sermijn E, Teugels E (2010). Cancer predisposing missense and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families. *Hum Mutat* 31: E1175–E1185. 25. de Winter JP, Joenje H (2009). The genetic and molecular basis of Fanconi anemia. *Mutat Res* 668: 11–19. 26. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233–1238. 27. Varghese JS, Easton DF (2010). Genome-wide association studies in common cancers—what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev* 20: 201–209. 28. Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Warren AS, Greenberg ER, Willett WC MD(2010). Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer*. 117:1946- 1956. 29. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V (2009). Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta- analysis. *Br J Cancer* 100: 538–544. 30. Ma H, Wang Y, Sullivan-Halley J, Weiss L, Marchbanks PA, Spirtas R, et al. (2010). Use of four biomarkers to evaluate the risk of breast cancer subtypes in the women’s contraceptive and reproductive experiences study. *Cancer Res* 70: 575–587 31. Rosner B, Colditz GA, Willett WC (1994). Reproductive risk factors in a prospective study of

breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 139: 819–835. 32. Li CI, Malone KE, Daling JR, Potter JD, Bernstein L, Marchbanks PA, et al. (2008). Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 167: 230–239. 33. Loof-Johanson M, Brudin L, Sundquist M, Thorstenson S, Rudebeck CE (2010). Breastfeeding and prognostic markers in breast cancer. *Breast* 20: 170–175. 34. Colditz GA, Rosner B (2000). Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 152: 950–964. 35. Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G (2002). Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 94: 606–616. 36. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE (2004). Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 96: 1856–1865. 37. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE (2006). Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 98: 1406–1415. 38. Su X, Hankinson SE, Clevenger CV, Eliassen AH, Tworoger SS (2009). Energy balance, early life body size, and plasma prolactin levels in postmenopausal women. *Cancer Causes Control* 20: 253–262. 39. Tworoger SS, Hankinson SE (2008). Prolactin and breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 41–53. 40. Bernstein L (2002). Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 3–15. 41. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. *Contraception* 54: 1S–106S. 42. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 350: 1047–1059. 43. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. (2002). Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 346: 2025–2032. 44. Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, Hendrix SL, Rodabough RJ, Paskett ED, et al. (2006). Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA* 295:1647–1657. 45. Chen WY, Manson JE, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC, Colditz GA (2006). Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Arch Intern Med* 166: 1027–1032. 46. Beral V (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362: 419–427. 47. Beral V, Reeves G, Bull D, Green J (2011). Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *J Natl Cancer Inst* 103: 296–305. 48. Yuan JM, Wang XL, Xiang YB, Gao YT, Ross RK, Yu MC (2000). Non-dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Shanghai, China. *Int J Cancer* 85: 364–369. 49. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A (2003). Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 289: 3243–3253. 50. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321–333. 51. Chlebowski RT, Anderson GL, Gass M, Lane DS, Aragaki AK, Kuller LH, et al. (2010). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA* 304: 1684–1692. 52. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2007). Combined estrogen-progestogen contraceptives and combined estrogen-progestogen menopausal therapy. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 91: 1–528. 53. Rich-Edwards JW,

Goldman MB, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE (1994). Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol* 171: 171–177. 54. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsouyanni K, Lubin F, Marubini E, Modan B, Rohan T (1990). Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 82: 561–569. 55. Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Longcope C, Speizer FE (1995). Reproductive factors and family history of breast cancer in relation to plasma estrogen and prolactin levels in postmenopausal women in the Nurses' Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 6: 217–224. 56. Ziegler RG, Hoover RN, Nomura AM, West DW, Wu AH, Pike MC, Lake AJ, Horn-Ross PL, Kolonel LN, Siiteri PK, Fraumeni JF, Jr (1996). Relative weight, weight change, height, and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst* 88:650–660. 57. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B, Speizer FE (1995). The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 332: 1589–1593. 58. Huang Z, Hankinson SE, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Manson JE, Hennekens CH, Rosner B, Speizer FE, Willett WC (1997). Dual effects of weight and weight gain on breast cancer risk. *JAMA* 278:1407–1411. 59. Le ML, Kolonel LN, Earle ME, Mi MP (1988). Body size at different periods of life and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 128:137–152. 60. International Agency for Research on Cancer (2002). Weight control and physical activity. IARC Handbooks of Cancer Prevention, Volume 6. IARC Press: Lyon. 61. Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE (2006). Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA* 296: 193– 201 62. Bernstein L, Patel AV, Ursin G, Sullivan-Halley J, Press MF, Deapen D, et al. (2005). Lifetime recreational exercise activity and breast cancer risk among black women and white women. *J Natl Cancer Inst* 97: 1671–1679. 63. Maruti SS, Willett WC, Feskanich D, Rosner B, Colditz GA (2008). A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 100: 728–737. 64. Alexander DD, Morimoto LM, Mink PJ, Cushing CA (2010). A review and meta- analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. *Nutr Res Rev* 23: 349–365 65. Gonzalez CA, Riboli E (2010). Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 46: 2555–2562. 66. Kabat GC, Cross AJ, Park Y, Schatzkin A, Hollenbeck AR, Rohan TE, Sinha R (2009). Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Int J Cancer* 124: 2430–2435. 67. Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bueno-de- Mesquita HB, et al.(2010). Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst* 102: 529–537. 68. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, van den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, et al. (1998). Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 279: 535–540. 69. Suzuki R, Orsini N, Mignone L, Saji S, Wolk A (2008). Alcohol intake and risk of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 122: 1832–1841. 70. Zhang SM, Willett WC, Selhub J, Hunter DJ, Giovannucci EL, Holmes MD, Colditz GA, Hankinson SE (2003). Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95: 373–380. 71. Talley C, Kushner HI, Sterk CE (2004). Lung cancer, chronic disease epidemiology, and medicine, 1948-1964. *J Hist Med Allied Sci* 59: 329–374. 72. Collishaw N, Boyd NF, Hammond SK, Johnson KC, Millar J, Miller B (2009). Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk. Ontario Tobacco Research Unit: Toronto, Canada. 73. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, ur. WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC: Lyon 2012: 8-31. 74. Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR (1979). Problems in breast pathology. Major problems in pathology. Saunders:



Philidelphia. 75. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 55:231–273. 76. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW (1997). Early-onset breast cancer—histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* 75: 1318–1323. 77. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS (1985). Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 55: 2698–2708. 78. Page DL, Kidd TE, Jr, Dupont WD, Simpson JF, Rogers LW (1991). Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol* 22: 1232–1239. 79. Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, et al. (2001). Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* 194:165–170. 80. Gonzalez CA, Riboli E (2010). Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer* 46: 2555–2562. 81. Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, Sheer D (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59:1433–1436. 82. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747–752. 83. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10869–10874. 84. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20: 479–489. 85. Li CI, Uribe DJ, Daling JR (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 93:1046–1052. 86. Toikkanen S, Pylkkanen L, Joensuu H (1997). Invasive lobular carcinoma of the breast has better short- and long-term survival than invasive ductal carcinoma. *Br J Cancer* 76:1234–1240. 87. Li CI, Anderson BO, Porter P, Holt SK, Daling JR, Moe RE (2000). Changing incidence rate of invasive lobular breast carcinoma among older women. *Cancer* 88: 2561–2569. 88. Bonnier P, Romain S, Giacalone PL, Laffargue F, Martin PM, Piana L (1995). Clinical and biologic prognostic factors in breast cancer diagnosed during postmenopausal hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol* 85:11–17. 89. Daling JR, Malone KE, Doody DR, Voigt LF, Bernstein L, Coates RJ, et al. (2002). Relation of regimens of combined hormone replacement therapy to lobular, ductal, and other histologic types of breast carcinoma. *Cancer* 95: 2455–2464. 90. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE (2003). Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA* 289: 1421–1424. 91. Li CI, Weiss NS, Stanford JL, Daling JR (2000). Hormone replacement therapy in relation to risk of lobular and ductal breast carcinoma in middle-aged women. *Cancer* 88:2570–2577. 92. Reeves GK, Beral V, Green J, Gathani T, Bull D (2006). Hormonal therapy for menopause and breast-cancer risk by histological type: a cohort study and meta-analysis. *Lancet Oncol* 7: 910–918. 93. Li CI, Chlebowski RT, Freiberg M, Johnson KC, Kuller L, Lane D, Lessin L, O'Sullivan MJ, Wactawski-Wende J, Yasmeen S, Prentice R (2010). Alcohol consumption and risk of postmenopausal breast cancer by subtype: the women's health initiative observational study. *J Natl Cancer Inst* 102: 1422–1431. 94. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM (2004). Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 6: R149–R156. 95. Li CI, Uribe DJ, Daling JR (2005). Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer* 93:1046–1052. 96. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. (1996). Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 77: 113–120. 97. Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR,

Bland KI, Winchester DP (1998). A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg* 186: 416–422. 98. Hilleren DJ, Andersson IT, Lindholm K, Linnell FS (1991). Invasive lobular carcinoma: mammographic findings in a 10-year experience. *Radiology* 178: 149–154. 99. Krecke KN, Gisvold JJ (1993). Invasive lobular carcinoma of the breast: mammographic findings and extent of disease at diagnosis in 184 patients. *AJR Am J Roentgenol* 161:957–960. 100. Butler RS, Venta LA, Wiley EL, Ellis RL, Dempsey PJ, Rubin E (1999). Sonographic evaluation of infiltrating lobular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 172: 325–330. 101. Chapellier C, Balu-Maestro C, Bleuse A, Ettore F, Bruneton JN (2000). Ultrasonography of invasive lobular carcinoma of the breast: sonographic patterns and diagnostic value: report of 102 cases. *Clin Imaging* 24: 333–336. 102. Evans N, Lyons K (2000). The use of ultrasound in the diagnosis of invasive lobular carcinoma of the breast less than 10 mm in size. *Clin Radiol* 55: 261–263. 103. Dietzel M, Baltzer PA, Vag T, Groschel T, Gajda M, Camara O, Kaiser WA (2010). Magnetic resonance mammography of invasive lobular versus ductal carcinoma: systematic comparison of 811 patients reveals high diagnostic accuracy irrespective of typing. *J Comput Assist Tomogr* 34: 587– 595. 104. Broet P, de la Rochefordiere A, Scholl SM, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC, Pouillart P, Asselain B (1995). Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 13: 1578–1583. 105. Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y (1999). Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 855–861. 106. Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, Gierson ED, Colburn WJ, Senofsky GM, Gamagami P (1994). Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? *Cancer* 73: 1673–1677. 107. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, et al. (1996). Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 77: 113–120. 108. Silverstein MJ, Lewinsky BS, Waisman JR, Gierson ED, Colburn WJ, Senofsky GM, Gamagami P (1994). Infiltrating lobular carcinoma. Is it different from infiltrating duct carcinoma? *Cancer* 73: 1673–1677. 109. Winchester DJ, Chang HR, Graves TA, Menck HR, Bland KI, Winchester DP (1998). A comparative analysis of lobular and ductal carcinoma of the breast: presentation, treatment, and outcomes. *J Am Coll Surg* 186: 416–422. 110. Quincey C, Raitt N, Bell J, Ellis IO (1991). Intracytoplasmic lumina—a useful diagnostic feature of adenocarcinomas. *Histopathology* 19: 83–87. 111. Dixon JM, Anderson TJ, Page DL, Lee D, Duffy SW (1982). Infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 6: 149–161. 112. Newman W (1966). Lobular carcinoma of the female breast. Report of 73 cases. *Ann Surg* 164: 305–314. 113. Fechner RE (1975). Histologic variants of infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 6: 373–378. 114. Shousha S, Backhous CM, Alaghand-Zadeh J, Burn I (1986). Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast. A tumor rich in estrogen receptors. *Am J Clin Pathol* 85:1–5. 115. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG (1992). Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 23: 655–662. 116. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, Krebs P, Otis CN, Merino MJ (2000). Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 24: 1650– 1656. 117. Walford N, ten Velden J (1989). Histiocytoid breast carcinoma: an apocrine variant of lobular carcinoma. *Histopathology* 14:515–522. 118. Fisher ER, Gregorio RM, Redmond C, Fisher B (1977). Tubulolobular invasive breast cancer: a variant of lobular invasive cancer. *Hum Pathol* 8: 679–683. 119. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, et al. (2008). Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer* 113: 1511–1520. 120. Martinez V, Azzopardi JG (1979). Invasive lobular carcinoma of the breast: incidence and variants. *Histopathology* 3:467–488. 121. Sinha PS, Bendall S, Bates T

(2000). Does routine grading of invasive lobular cancer of the breast have the same prognostic significance as for ductal cancers? *Eur J Surg Oncol* 26: 733–737. 122. Mokbel K (2001). Grading of infiltrating lobular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 27:609–610. 123. Rakha EA, El-Sayed ME, Menon S, Green AR, Lee AH, Ellis IO (2008). Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 111: 121–127. 124. Radhi JM (2000). Immunohistochemical analysis of pleomorphic lobular carcinoma: higher expression of p53 and chromogranin and lower expression of ER and PgR. *Histopathology* 36: 156–160. 125. Rakha EA, El-Sayed ME, Powe DG, Green AR, Habashy H, Grainge MJ, et al. (2008). Invasive lobular carcinoma of the breast: response to hormonal therapy and outcomes. *Eur J Cancer* 44: 73–83. 126. Middleton LP, Palacios DM, Bryant BR, Krebs P, Otis CN, Merino MJ (2000). Pleomorphic lobular carcinoma: morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 24: 1650–1656. 127. Simpson PT, Reis-Filho JS, Lambros MB, Jones C, Steele D, Mackay A, et al. (2008). Molecular profiling pleomorphic lobular carcinomas of the breast: evidence for a common molecular genetic pathway with classic lobular carcinomas. *J Pathol* 215: 231–244. 128. Fadare O, Wang SA, Hileeto D (2008). The expression of cytokeratin 5/6 in invasive lobular carcinoma of the breast: evidence of a basal-like subset? *Hum Pathol* 39: 331–336. 129. Palacios J, Benito N, Pizarro A, Suarez A, Espada J, Cano A, Gamallo C (1995). Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features. *Am J Pathol* 146: 605–612. 130. Rakha EA, Patel A, Powe DG, Benhasouna A, Green AR, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO (2010). Clinical and biological significance of E-cadherin protein expression in invasive lobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 34: 1472–1479. 131. Da Silva L, Parry S, Reid L, Keith P, Waddell N, Kossai M, Clarke C, Lakhani SR, Simpson PT (2008). Aberrant expression of E-cadherin in lobular carcinomas of the breast. *Am J Surg Pathol* 32: 773–783. 132. Flagiello D, Gerbault-Seureau M, Sastre-Garau X, Padoy E, Vielh P, Dutrillaux B (1998). Highly recurrent der(1;16)(q10;p10) and other 16q arm alterations in lobular breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 23:300–306. 133. Nishizaki T, Chew K, Chu L, Isola J, Kallioniemi A, Weidner N, Waldman FM (1997). Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 74: 513–517. 134. Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G, de Leeuw WJ, ter Haar NT, van Roy F, Cornelisse CJ, Peterse JL, Van de Vijver M (1997). E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer* 76: 1131–1133. 135. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW (1992). Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 20: 479–489. 136. Vo TN, Meric-Bernstam F, Yi M, Buchholz TA, Ames FC, Kuerer HM, Bedrosian I, Hunt KK (2006). Outcomes of breast-conservation therapy for invasive lobular carcinoma are equivalent to those for invasive ductal carcinoma. *Am J Surg* 192: 552–555. 137. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Orvieto E, Maiorano E, Galimberti V, et al. (2009). Lack of prognostic significance of «classic» lobular breast carcinoma: a matched, single institution series. *Breast Cancer Res Treat* 117: 211–214. 138. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. (2008). Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* 26: 3006–3014. 139. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Mallon E, Gusterson BA, Price KN, Gelber RD, et al. (2008). Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 International Breast Cancer Study Group clinical trials. *J Clin Oncol* 26: 3006–3014. 140. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG (1992). Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 23: 655–662. 141. Green I, McCormick B, Cranor M, Rosen PP (1997). A comparative study of pure tubular and tubulolobular carcinoma of the

breast. *Am J Surg Pathol* 21: 653–657. 142. Louwman MW, Vriezen M, van Beek MW, Nolthenius-Puylaert MC, van der Sangen MJ, Roumen RM, Kiemeny LA, Coebergh JW (2007). Uncommon breast tumors in perspective: incidence, treatment and survival in the Netherlands. *Int J Cancer* 121: 127–135. 143. Haffty BG, Liu GF, Yang Q, Moran MS (2009). Clinical-pathologic features and longterm outcomes of tubular carcinoma of the breast compared with invasive ductal carcinoma treated with breast conservation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75: 1304–1308. 144. Rakha EA, Lee AH, Evans AJ, Menon S, Assad NY, Hodi Z, Macmillan D, Blamey RW, Ellis IO (2010). Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol* 28: 99–104. 145. Zandrino F, Calabrese M, Faedda C, Musante F (2006). Tubular carcinoma of the breast: pathological, clinical, and ultrasonographic findings. A review of the literature. *Radiol Med* 111: 773–782. 146. Gunhan-Bilgen I, Oktay A (2007). Tubular carcinoma of the breast: mammographic, sonographic, clinical and pathologic findings. *Eur J Radiol* 61: 158–162. 147. Shin HJ, Kim HH, Kim SM, Kim DB, Lee YR, Kim MJ, Gong G (2007). Pure and mixed tubular carcinoma of the breast: mammographic and sonographic differential features. *Korean J Radiol* 8: 103–110. 148. Fedko MG, Scow JS, Shah SS, Reynolds C, Degnim AC, Jakub JW, Boughey JC (2010). Pure tubular carcinoma and axillary nodal metastases. *Ann Surg Oncol* 17 Suppl 3:338–342. 149. Fernandez-Aguilar S, Simon P, Buxant F, Simonart T, Noel JC (2005). Tubular carcinoma of the breast and associated intra-epithelial lesions: a comparative study with invasive low-grade ductal carcinomas. *Virchows Arch* 447: 683–687. 150. Goldstein NS, O'Malley BA (1997). Cancerization of small ectatic ducts of the breast by ductal carcinoma in situ cells with apocrine snouts: a lesion associated with tubular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 107: 561–566. 151. Papadatos G, Rangan AM, Psarianos T, Ung O, Taylor R, Boyages J (2001). Probability of axillary node involvement in patients with tubular carcinoma of the breast. *Br J Surg* 88:860–864. 152. Waldman FM, Hwang ES, Ezzell J, Eng C, DeVries S, Bennington J, Thor A (2001). Genomic alterations in tubular breast carcinomas. *Hum Pathol* 32: 222–226. 153. Aulmann S, El Sawaf Z, Penzel R, Schirmacher P, Sinn HP (2009). Invasive tubular carcinoma of the breast frequently is clonally related to flat epithelial atypia and low-grade ductal carcinoma in situ. *Am J Surg Pathol* 33:1646–1653. 154. Riener MO, Nikolopoulos E, Herr A, Wild PJ, Hausmann M, Wiech T, et al. (2008). Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13 locus on 16q. *Hum Pathol* 39: 1621–1629. 155. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. (2008). Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 216:141–150. 156. Vo T, Xing Y, Meric-Bernstam F, Mirza N, Vlastos G, Symmans WF, et al. (2007). Longterm outcomes in patients with mucinous, medullary, tubular, and invasive ductal carcinomas after lumpectomy. *Am J Surg* 194:527–531. 157. Javid SH, Smith BL, Mayer E, Bellon J, Murphy CD, Lipsitz S, Golshan M (2009). Tubular carcinoma of the breast: results of a large contemporary series. *Am J Surg* 197:674–677. 158. Leikola J, Heikkilä P, von Smitten K, Leidenius M (2006). The prevalence of axillary lymph-node metastases in patients with pure tubular carcinoma of the breast and sentinel node biopsy. *Eur J Surg Oncol* 32: 488–491. 159. Li CI, Daling JR, Malone KE, Bernstein L, Marchbanks PA, Liff JM, Strom BL, et al. (2006). Relationship between established breast cancer risk factors and risk of seven different histologic types of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 946–954. 160. Venable JG, Schwartz AM, Silverberg SG (1990). Infiltrating cribriform carcinoma of the breast: a distinctive clinicopathologic entity. *Hum Pathol* 21: 333–338. 161. Nishimura R, Ohsumi S, Teramoto N, Yamakawa T, Saeki T, Takashima S (2005). Invasive cribriform carcinoma with extensive microcalcifications in the male breast. *Breast Cancer* 12: 145–148. 162. Page DL, Dixon JM, Anderson TJ, Lee D, Stewart HJ (1983). Invasive cribriform carcinoma of the breast. *Histopathology* 7: 525–536. 163. Page DL, Schuyler PA,

Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD, Jr, Simpson JF (2003). Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* 361: 125–129. 164. Scopsi L, Andreola S, Pilotti S, Bufalino R, Baldini MT, Testori A, Rilke F (1994). Mucinous carcinoma of the breast. A clinicopathologic, histochemical, and immunocytochemical study with special reference to neuroendocrine differentiation. *Am J Surg Pathol* 18: 702–711. 165. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E (2008). A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 111: 541–547. 166. Barkley CR, Ligibel JA, Wong JS, Lipsitz S, Smith BL, Golshan M (2008). Mucinous breast carcinoma: a large contemporary series. *Am J Surg* 196: 549–551. 167. Yoo JL, Woo OH, Kim YK, Cho KR, Yong HS, Seo BK, Kim A, Kang EY (2010). Can MR Imaging contribute in characterizing well-circumscribed breast carcinomas? *Radiographics* 30: 1689–1702. 168. Tan PH, Tse GM, Bay BH (2008). Mucinous breast lesions: diagnostic challenges. *J Clin Pathol* 61: 11–19. 169. Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, Park BW, Lee KS (2010). Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 21: 488–492. 170. Domfeh AB, Carley AL, Striebel JM, Karabakhtsian RG, Florea AV, McManus K, Beriwal S, Bhargava R (2008). WT1 immunoreactivity in breast carcinoma: selective expression in pure and mixed mucinous subtypes. *Mod Pathol* 21: 1217–1223. 171. Westenend PJ, Schutte R, Hoogmans MM, Wagner A, Dinjens WN (2005). Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier. *Hum Pathol* 36: 1322–1326. 172. Lacroix-Triki M, Suarez PH, Mackay A, Lambros MB, Natrajan R, Savage K, et al. (2010). Mucinous carcinoma of the breast is genomically distinct from invasive ductal carcinomas of no special type. *J Pathol* 222: 282–298. 173. Fentiman IS, Millis RR, Smith P, Ellul JP, Lampejo O (1997). Mucoïd breast carcinomas: histology and prognosis. *Br J Cancer* 75:1061–1065. 174. Anderson WF, Pfeiffer RM, Dores GM, Sherman ME (2006). Comparison of age distribution patterns for different histopathologic types of breast carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1899–1905. 175. Pedersen L, Holck S, Mouridsen HT, Schodt T, Zedeler K (1999). Prognostic comparison of three classifications for medullary carcinoma of the breast. *Histopathology* 34:175–178. 176. Guo X, Fan Y, Lang R, Gu F, Chen L, Cui L, Pringle GA, Zhang X, Fu L (2008). Tumor infiltrating lymphocytes differ in invasive micropapillary carcinoma and medullary carcinoma of breast. *Mod Pathol* 21: 1101–1107. 177. Kuroda H, Tamaru J, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S (2005). Immunophenotype of lymphocytic infiltration in medullary carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 446: 10–14. 178. Vargas AC, Da SL, Lakhani SR (2010). The contribution of breast cancer pathology to statistical models to predict mutation risk in BRCA carriers. *Fam Cancer* 9: 545–553. 179. Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO, Lee AH (2009). The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer* 45:1780–1787. 180. Sabatier R, Finetti P, Cervera N, Lambaudie E, Esterni B, Mamessier E, et al. (2010). A gene expression signature identifies two prognostic subgroups of basal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 126: 407–420. 181. Rosen PP, ed. (2001). *Rosen's breast pathology*. 2nd ed Edition. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 182. Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 23: 655–662. 183. Leal C, Henrique R, Monteiro P, Lopes C, Bento MJ, De Sousa CP, Lopes P, et al. (2001). Apocrine ductal carcinoma in situ of the breast: histologic classification and expression of biologic markers. *Hum Pathol* 32: 487–493. 184. Moritani S, Ichihara S, Hasegawa M, Endo T, Oiwa M, Shiraiwa M, et al. (2011). Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma. *Am J Surg Pathol* 35: 861–867. 185. Vranic S, Gatalica Z, Deng H, Frkovic-Grazio S, Lee LM, Gurjeva O, Wang ZY (2010). ER- $\alpha$ 36, a novel isoform of ER- $\alpha$ 66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast. *J Clin Pathol* 1533. 186.

Suzuki T, Miki Y, Takagi K, Hirakawa H, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H (2010). Androgens in human breast carcinoma. *Med Mol Morphol* 43: 75–81. 187. Tavassoli FA, Eusebi V, eds (2009). Tumors of the mammary gland. AFIP atlas of tumor pathology. Fourth series ; fasc. 10. American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology: Washington, D.C. 188. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8418–8423. 189. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10869– 10874. 190. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG (1992). Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 23: 655–662. 191. Japaze H, Emina J, Diaz C, Schwam RJ, Gercovich N, Demonty G, et al. (2005). 'Pure' invasive apocrine carcinoma of the breast: a new clinicopathological entity? *Breast* 14: 3–10. 192. Chen YY, Hwang ES, Roy R, DeVries S, Anderson J, Wa C, Fitzgibbons PL, et al. (2009). Genetic and phenotypic characteristics of pleomorphic lobular carcinoma in situ of the breast. *Am J Surg Pathol* 33: 1683–1694 193. Paterakos M, Watkin WG, Edgerton SM, Moore DH, Thor AD (1999). Invasive micropapillary carcinoma of the breast: a prognostic study. *Hum Pathol* 30: 1459–1463. 194. Gunhan-Bilgen I, Zekioglu O, Ustun EE, Memis A, Erhan Y (2002). Invasive micropapillary carcinoma of the breast: clinical, mammographic, and sonographic findings with histopathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 179: 927–931. 195. Zekioglu O, Erhan Y, Ciris M, Bayramoglu H, Ozdemir N (2004). Invasive micropapillary carcinoma of the breast: high incidence of lymph node metastasis with extranodal extension and its immunohistochemical profile compared with invasive ductal carcinoma. *Histopathology* 44: 18–23. 196. Kubota K, Ogawa Y, Nishioka A, Murata Y, Itoh S, Hamada N, Morio K, Maeda H, Tanaka Y (2008). Radiological imaging features of invasive micropapillary carcinoma of the breast and axillary lymph nodes. *Oncol Rep* 20:1143–1147. 197. Tresserra F, Grases PJ, Fabregas R, Fernandez-Cid A, Dexeus S (1999). Invasive micropapillary carcinoma. Distinct features of a poorly recognized variant of breast carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 20: 205–208. 198. Siriaunkgul S, Tavassoli FA (1993). Invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 6: 660–662. 199. Middleton LP, Tressera F, Sobel ME, Bryant BR, Albuquerque A, Grases P, Merino MJ (1999). Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 12: 499–504. 200. Kuroda H, Sakamoto G, Ohnisi K, Itoyama S (2004). Overexpression of Her2/neu, estrogen and progesterone receptors in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Breast Cancer* 11: 301–306. 201. Yamaguchi R, Tanaka M, Kondo K, Yokoyama T, Kaneko Y, Yamaguchi M, et al. (2010). Characteristic morphology of invasive micropapillary carcinoma of the breast: an immunohistochemical analysis. *Jpn J Clin Oncol* 40: 781–787. 202. Marchio C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Savage K, et al. (2009). Mixed micropapillary-ductal carcinomas of the breast: a genomic and immunohistochemical analysis of morphologically distinct components. *J Pathol* 218:301–315. 203. Marchio C, Irvani M, Natrajan R, Lambros MB, Savage K, Tamber N, et al. (2008). Genomic and immunophenotypical characterization of pure micropapillary carcinomas of the breast. *J Pathol* 215: 398–410. 204. Kim MJ, Gong G, Joo HJ, Ahn SH, Ro JY (2005). Immunohistochemical and clinicopathologic characteristics of invasive ductal carcinoma of breast with micropapillary carcinoma component. *Arch Pathol Lab Med* 129:1277– 1282. 205. Li YS, Kaneko M, Amatya VJ, Takeshima Y, Arihiro K, Inai K (2006). Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Int* 56:256–261. 206. Nassar H (2004). Carcinomas with micropapillary morphology: clinical significance and current concepts. *Adv Anat Pathol* 11:297–303. 207. Halpert B, Young MO (1948). Carcinosarcoma of the mammary gland. *Surgery* 23: 289–292. 208. Kaufman MW, Marti JR, Gallager HS, Hoehn

JL (1984). Carcinoma of the breast with pseudosarcomatous metaplasia. *Cancer* 53:1908–1917. 209. Gersell DJ, Katzenstein AL (1981). Spindle cell carcinoma of the breast. A clinicopathologic and ultrastructural study. *Hum Pathol* 12: 550– 561. 210. Gobbi H, Simpson JF, Borowsky A, Jensen RA, Page DL (1999). Metaplastic breast tumors with a dominant fibromatosis-like phenotype have a high risk of local recurrence. *Cancer* 85: 2170–2182. 211. Rosen PP, Ernsberger D (1987). Lowgrade adenosquamous carcinoma. A variant of metaplastic mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 11: 351–358. 212. Podetta M, D'Ambrosio G, Ferrari A, Sgarella A, Dal BB, Fossati GS, et al. (2009). Low-grade fibromatosislike spindle cell metaplastic carcinoma: a basallike tumor with a favorable clinical outcome. Report of two cases. *Tumori* 95: 264–267. 213. Weigelt B, Reis-Filho JS (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 6: 718–730. 214. Carlson JW, Fletcher CD (2007). Immunohistochemistry for beta- catenin in the differential diagnosis of spindle cell lesions: analysis of a series and review of the literature. *Histopathology* 51: 509–514. 215. Wargotz ES, Norris HJ (1989). Metaplastic carcinomas of the breast. III. Carcinosarcoma. *Cancer* 64: 1490–1499. 216. Wargotz ES, Norris HJ (1990). Metaplastic carcinomas of the breast. IV. Squamous cell carcinoma of ductal origin. *Cancer* 65: 272–276. 217. Wargotz ES, Norris HJ (1990). Metaplastic carcinomas of the breast: V. Metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells. *Hum Pathol* 21: 1142– 1150. 218. Drudis T, Arroyo C, Van HK, Cordon, Cardo C, Rosen PP (1994). The pathology of low-grade adenosquamous carcinoma of the breast. An immunohistochemical study. *Pathol Annu* 29 ( Pt 2): 181–197. 219. Gobbi H, Simpson JF, Jensen RA, Olson SJ, Page DL (2003). Metaplastic spindle cell breast tumors arising within papillomas, complex sclerosing lesions, and nipple adenomas. *Mod Pathol* 16: 893–901. 220. Davis WG, Hennessy B, Babiera G, Hunt K, Valero V, Buchholz TA, et al. (2005). Metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast with absent or minimal overt invasive carcinomatous component: a misnomer. *Am J Surg Pathol* 29: 1456–1463. 221. Carley AM, Chivukula M, Carter GJ, Karabakhtsian RG, Dabbs DJ (2008). Frequency and clinical significance of simultaneous association of lobular neoplasia and columnar cell alterations in breast tissue specimens. *Am J Clin Pathol* 130: 254–258. 222. Jones C, Tooze R, Lakhani SR (2003). Malignant adenomyoepithelioma of the breast metastasizing to the liver. *Virchows Arch* 442:504–506. 223. Wargotz ES, Deos PH, Norris HJ (1989). Metaplastic carcinomas of the breast. II. Spindle cell carcinoma. *Hum Pathol* 20:732–740. 224. Carter MR, Hornick JL, Lester S, Fletcher CD (2006). Spindle cell (sarcomatoid) carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 30: 300–309. 225. Hungermann D, Buerger H, Oehlschlegel C, Herbst H, Boecker W (2005). Adenomyoepithelial tumours and myoepithelial carcinomas of the breast—a spectrum of imonophasic and biphasic tumours dominated by immature myoepithelial cells. *BMC.Cancer* 5: 92. Abstract. 226. Wargotz ES, Norris HJ (1989). Metaplastic carcinomas of the breast. I. Matrixproducing carcinoma. *Hum Pathol* 20:628–635. 227. Wargotz ES, Norris HJ (1989). Metaplastic carcinomas of the breast. III. Carcinosarcoma. *Cancer* 64: 1490–1499. 228. Downs-Kelly E, Nayeemuddin KM, Albarracin C, Wu Y, Hunt KK, Gilcrease MZ (2009). Matrix-producing carcinoma of the breast: an aggressive subtype of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 33: 534–541. 229. Hennessy BT, Giordano S, Broglio K, Duan Z, Trent J, Buchholz TA, et al. (2006). Biphasic metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast. *Ann Oncol* 17: 605–613. 230. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, et al. (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset tumours. *Histopathology* 49: 10–21. 231. Sneige N, Yaziji H, Mandavilli SR, PerezER, Ordonez NG, Gown AM, Ayala A (2001). Low-grade (fibromatosis-like) spindle cell carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 25:1009–1016. 232. Adem C, Reynolds C, Adlakha H, Roche PC, Nascimento AG (2002). Wide spectrum screening keratin as a marker

of metaplastic spindle cell carcinoma of the breast: an immunohistochemical study of 24 patients. *Histopathology* 40: 556–562. 233. Koker MM, Kleer CG (2004). p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 28: 1506–1512. 234. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, Pereira EM, Lakhani SR, Schmitt FC (2006). Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 49: 10–21. 235. Reis-Filho JS, Schmitt FC (2002). Taking advantage of basic research: p63 is a reliable myoepithelial and stem cell marker. *Adv Anat Pathol* 9: 280–289. 236. Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DS, Dowsett M et al. (2010). Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 11: 339–349. 237. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS (2009). Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat* 117:273–280. 238. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin- low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: R68. 239. Geyer FC, Lambros MB, Natrajan R, Mehta R, Mackay A, Savage K, et al. (2010). Genomic and immunohistochemical analysis of adenosquamous carcinoma of the breast. *Mod Pathol* 23: 951–960. 240. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, Lambros MB, de Biase D, Vatcheva R, et al. (2010). Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 220: 562–573. 241. Lien HC, Lin CW, Mao TL, Kuo SH, Hsiao CH, Huang CS (2004). p53 overexpression and mutation in metaplastic carcinoma of the breast: genetic evidence for a monoclonal origin of both the carcinomatous and the heterogeneous sarcomatous components. *J Pathol* 204: 131–139. 242. Moulder S, Moroney J, Helgason T, Wheeler J, Booser D, Albarracin C, et al. (2011). Responses to liposomal Doxorubicin, bevacizumab, and temsirolimus in metaplastic carcinoma of the breast: biologic rationale and implications for stem-cell research in breast cancer. *J Clin Oncol* 29: e572–e575. 243. Gilbert JA, Goetz MP, Reynolds CA, Ingle JN, Giordano KF, Suman VJ, et al. (2008). Molecular analysis of metaplastic breast carcinoma: high EGFR copy number via aneusomy. *Mol Cancer Ther* 7:944–951. 244. Geyer FC, Weigelt B, Natrajan R, Lambros MB, de Biase D, Vatcheva R, et al. (2010). Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas. *J Pathol* 220: 562–573. 245. Pitts WC, Rojas VA, Gaffey MJ, Rouse RV, Esteban J, Frierson HF, Kempson RL, Weiss LM (1991). Carcinomas with metaplasia and sarcomas of the breast. *Am J Clin Pathol* 95: 623–632. 246. Luini A, Aguilar M, Gatti G, Fasani R, Botteri E, Brito JA, et al. (2007). Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* 101: 349–353. 247. Lucas FV, Perez-Mesa C (1978). Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 41: 1595–1605. 248. Bonnier P, Charpin C, Lejeune C, Romain S, Tubiana N, Beedassy B, et al. (1995). Inflammatory carcinomas of the breast: a clinical, pathological, or a clinical and pathological definition? *Int J Cancer* 62: 382–385. 249. Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH (2005). Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst* 97: 966–975. 250. Robertson FM, Bondy M, Yang W, Yamauchi H, Wiggins S, Kamrudin S, et al. (2010). Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. *CA Cancer J Clin* 60: 351–375. 251. Charafe-Jauffret E, Mrad K, Intidhar LS, Ben HA, Ben RK, Ben AM, Ginestier et al. (2007). Inflammatory breast cancers in Tunisia and France show similar immunophenotypes. *Breast* 16:352–358. 252. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, Colpaert CG, van Dam P, Merajver S, et al. (2004). Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 85: 13–22. 253. Faille A, De CP, Extra JM, Linares G, Espie M, Bourstyn E, et al. (1994). p53 mutations and overexpression in locally



advanced breast cancers. *Br J Cancer* 69: 1145–1150. 254. Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Bardou VJ, Bertucci F, Ginestier C, Braud AC, et al. (2004). Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an 'inflammatory signature'. *J Pathol* 202:265–273. 255. Van Laere S, Van der Auwera I, Van den Eynden GG, Fox SB, Bianchi F, Harris AL, et al. (2005). Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat* 93:237–246. 256. Turpin E, Bieche I, Bertheau P, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, et al. (2002). Increased incidence of ERBB2 overexpression and TP53 mutation in inflammatory breast cancer. *Oncogene* 21:7593–7597. 257. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z (1995). Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 180:297–306. 258. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, et al. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 16: 45–55. 259. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 12: 207–260. 260. Mollerstrom E, Delle U, Danielsson A, Parris T, Olsson B, Karlsson P, Helou K (2010). High-resolution genomic profiling to predict 10-year overall survival in node-negative breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 198: 79–89. 261. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–145. 262. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999–2009. 263. Adelaide J, Finetti P, Bekhouche I, Repellini L, Geneix J, Sircoulomb F, et al. (2007). Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res* 67: 11565–11575. 264. Cleton-Jansen AM, Buerger H, Haar N, Philippo K, Van der Vijver MJ, Boecker W, et al. (2004). Different mechanisms of chromosome 16 loss of heterozygosity in well- versus poorly differentiated ductal breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41: 109–116. 265. Jonsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J, Ringner M, Holm K, Hegardt C, Gunnarsson H, et al. (2010). Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res* 12: R42–266. 266. Natrajan R, Lambros MB, Rodriguez-Pinilla SM, Moreno-Bueno G, Tan DS, Marchio C, et al. (2009). Tiling path genomic profiling of grade 3 invasive ductal breast cancers. *Clin Cancer Res* 15: 2711–2722. 267. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R, Reyat F, et al. (2008). Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 14: 1956–1965. 268. Ross JS (2009). Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. *Adv Anat Pathol* 16:204–215. 269. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ and Panel members: Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 2011;22:1736-47. 270. Prat A, Perou CM (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 5: 5–23. 271. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T et al. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27:1160–1167. 272. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736–750. 273. Kimberly H. Allison, M. Elizabeth H. Hammond, Mitchell Dowsett, Shannon E. McKernin, et al. . Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Oncol Pract* 2020 38:12, 1346-1366 274. Gordian-Arroyo AM, Zynger DL, Tozbikian GH. Impact of the 2018 ASCO/CAP HER2 Guideline Focused

Update. *Am J Clin Pathol*. 2019 Jun 5;152(1):17-26. doi: 10.1093/ajcp/aqz012. PMID: 30958889. 275. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206-23;Epub 2013 Aug 4. 276. Reed SD, Dinan MA, Schulman KA et al. Cost-effectiveness of the 21- gene recurrence score assay in the context of multifactorial decision making to guide chemotherapy for early-stage breast cancer. *Genet Med* 2013; 15: 203–211. 277. Hannouf MB, Xie B, Brackstone M et al. Cost-effectiveness of a 21-gene recurrence score assay versus Canadian clinical practice in women with early-stage estrogen- or progesterone-receptor-positive, axillary lymph-node negative breast cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 447. 278. Lamond NW, Skedgel C, Rayson D et al. Cost-utility of the 21-gene recurrence score assay in node-negative and node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 1115–1123. 279. Tsoi DT, Inoue M, Kelly CM et al. Cost-effectiveness analysis of recurrence score-guided treatment using a 21-gene assay in early breast cancer. *Oncologist* 2010; 15: 457–465. 280. Klang SH, Hammerman A, Liebermann N et al. Economic implications of 21-gene breast cancer risk assay from the perspective of an Israeli-managed healthcare organization. *Value Health* 2010; 13: 381–387. 281. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2018 Jul;25(7):1783- 1785. doi: 10.1245/s10434-018-6486-6. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29671136. 282. Brierley D. J., Gospodarowicz K. M., Wittekind C., eds. Wiley-Blackwell. International Union against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumors 8th ed. Wiley-Blackwell, ISBN: 978-1-119-26357-9, January 2017.. 283. Carey LA, Metzger R, Dees EC, Collichio F, Sartor CI, Ollila DW, et al. (2005). American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst* 97: 1137–1142. 284. Jeruss JS, Mittendorf EA, Tucker SL, Gonzalez-Angulo AM, Buchholz TA, Sahin AA, (2008). Staging of breast cancer in the neoadjuvant setting. *Cancer Res* 68:6477–6481. 285. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005;23:7350-60. 286. Sobin L.H., M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, *Breast tumours*. U: L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind, ur. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7th ed., Wiley- Blackwell, New York, (2009), pp. 181-94. 287. William D. Foulkes, M.B., B.S., Ph.D., Ian E. Smith, M.D., and Jorge S. Reis-Filho, M.D., Ph.D. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 2010; 363:1938-1948 November 11, 2010. 288. Richardson LC, Henley SJ, Miller JW, Massetti G, Thomas CC; Patterns and trends in age-specific black-white difference in breast cancer incidence and mortality—United States, 1999–2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65(40):1093–1098 289. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A (2016) Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* 66(1):31–42 290. White MC, Espey DK, Swan J, Wiggins CL, Ehemann C, Kaur JS (2014) Disparities in cancer mortality and incidence among American Indians and Alaska Natives in the United States. *Am J Public Health* 104(Suppl 3):S377– S387 291. Newman LA (2014) Breast cancer disparities: high-risk breast cancer and African ancestry. *Surg Oncol Clin N Am* 23(3):579–592 292. Dunn BK, Agurs-Collins T, Browne D, Lubet R, Johnson KA (2010) Health disparities in breast cancer: biology meets socioeconomic status. *Breast Cancer Res Treat* 121(2):281–292. 293. Williams DR, Mohammed SA, Shields AE (2016) Understanding and effectively addressing breast cancer in African American women: Unpacking the social context. *Cancer* 122(14):2138–2149. 294. Miller JW, Lee Smith J, Ryerson BA, Tucker TC, Allemani C: Disparities in breast cancer survival in the United States *Breast Cancer Research and Treatment* 169:595–606 6051 3(2001–2009): findings from the CONCORD- 2 study. *Cancer* 123(S24):5100–5118. 295. Plasilova ML, Hayse B, Killelea BK, Horowitz NR, Chagpar AB, Lannin DR: Features of triple-negative breast cancer: Analysis of 38,813 cases from the national cancer database. *Medicine*.

95(35):e4614, 2016 Aug. 296. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. Stable 'portrait' of breast tumors during progression: data from biology, pathology and genetics. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:497-522. 297. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002;161:1991-6. 298. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5678-85. 299. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res* 2007;9:R4. 300. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68:989-97. 301. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236-40. 302. Guideline Summary: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor HER2 Testing in Breast Cancer. *J Oncol Pract.* 2007;3(1):48-50. doi:10.1200/JOP.0718501. 303. 2013 Update of the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Impact on Immunohistochemistry-Negative Breast Cancers; DOI: 10.1200/JCO.2013.54.2530 *Journal of Clinical Oncology* 32, no. 17 (June 10, 2014) 1856-1857. 304. Wolff A.C., M.E.H. Hammond, D.G. Hicks, M. Dowsett, L.M. McShane, K.H. Allison, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. Clinical Practice Guideline Update. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. November, 2013. 305. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;8:755-68. 306. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68:989-97. 307. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004;4:814-9. 308. Foulkes WD, Metcalfe K, Sun P, et al. Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin Cancer Res* 2004;10:2029-34. 309. Turner N, Lambros MB, Horlings HM, et al. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 2010;29:2013-23. 310. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 2007;109:1721-8. 311. Millikan RC, Newman B, Tse CK, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109:123-39. 312. Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:134. 313. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14:1368-76. 314. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13:4429-34. 315. Colleoni M, Cole BF, Viale G et al. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:2966-73. 316. Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:199-204. 317. Uematsu T, Kasami M, Yuen S.

Triplenegative breast cancer: correlation between MR imaging and pathologic findings. *Radiology* 2009;250:638-47. 318. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* 2010;28:1684-91. 319. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:423-8. 320. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:1533-9. 321. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and longterm survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1275-81. 322. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008;52:108-18. 323. Wong-Brown MW, Meldrum CJ, Carpenter JE, Clarke CL, Narod SA, Jakubowska A, Rudnicka H, Lubinski J, Scott RJ: Prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research & Treatment*. 150(1):71-80, 2015 324. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10:210. 325. Tsang JY, Tse GM: Microglandular adenosis: a prime suspect in triple-negative breast cancer development. *J Pathol* 2016; 239: 129–132 DOI: 10.1002/path.4726 326. Tan DS, Marchío C, Jones RL, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat* 2008;111:27-44. 327. Li M, Zhang J, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Xie Y: Incidence of BRCA1 somatic mutations and response to neoadjuvant chemotherapy in Chinese women with triple-negative breast cancer. *Gene*. 584(1):26-30, 2016 Jun 10. 328. Tsai J, Bertoni D, Hernandez-Boussard T, Telli ML, Wapnir IL: Lymph Node Ratio Analysis After Neoadjuvant Chemotherapy is Prognostic in Hormon Receptor-Positive and Triple-negative breast cancer; *Annals of Surgical Oncology*. 23(10):3310-6, 2016 10. 329. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666- 76.59. 330. Carey LA, Rugo HS, Markom PK, et al. TBCRC 001: EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative (basal-like) breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:Suppl:15s. abstract. 331. Marty B, Maire V, Gravier E, et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008;10:R101. 332. Levva S, Kotoula V, Kostopoulos I, Manousou K, Papadimitriou C, Papadopoulou K, et al: Prognostic Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Genotype and Phenotype Parameters in Triple-negative breast cancers. *Cancer Genomics & Proteomics*. 14(3):181-195, 2017 May- Jun. 333. Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361:123-34. 334. Wang C, Zhang J, Wang Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Xie Y: Prevalence of BRCA1 mutations and responses to neoadjuvant chemotherapy among BRCA1 carriers and non-carriers with triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*. 26(3):523-8, 2015 Mar 335. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Tornberg S, Holland R, von Karsa L (2008). European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition—summary document. *Ann Oncol* 19:614–622. 336. Patey DH, Scarff RW (1928). The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1: 801–804 337. Bloom HJ, Richardson WW (1957). Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11: 359–377. 338. Elston CW, Ellis IO (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term followup. *Histopathology* 19: 403–410. 339. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO (2008). Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 26: 3153–3158.

340. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 12: 207. 341. Harris GC, Denley HE, Pinder SE, Lee AH, Ellis IO, Elston CW, Evans A (2003). Correlation of histologic prognostic factors in core biopsies and therapeutic excisions of invasive breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 27:11–15. 342. Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Marchio C, Tan DS, Vatcheva R, et al. (2009). Loss of 16q in high grade breast cancer is associated with estrogen receptor status: Evidence for progression in tumors with a luminal phenotype? *Genes Chromosomes Cancer* 48: 351–365. 343. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, et al. (2004). Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9309–9314. 344. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. (2005). High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer* 116:340–350. 345. Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A, Sheer D (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59:1433–1436. 346. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98: 262–272. 347. Lu X, Lu X, Wang ZC, Iglehart JD, Zhang X, Richardson AL (2008). Predicting features of breast cancer with gene expression patterns. *Breast Cancer Res Treat* 108:191–201. 348. de Mascarel I, Bonichon F, Durand M, Mauriac L, MacGrogan G, Soubeyran I, et al. (1998). Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 node-negative breast cancers. *Eur J Cancer* 34: 58–65. 349. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ (2009). Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20: 1319–1329. 350. Lee AH, Pinder SE, Macmillan RD, Mitchell M, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW (2006). Prognostic value of lymphovascular invasion in women with lymph node negative invasive breast carcinoma. *Eur J Cancer* 42:357–362. 351. Abramowitz MC, Li T, Morrow M, Sigurdson ER, Anderson P, Nicolaou N, Freedman G (2009). Dermal lymphatic invasion and inflammatory breast cancer are independent predictors of outcome after postmastectomy radiation. *Am J Clin Oncol* 32: 30–33. 352. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, Hanby A (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 49:22–34. 353. Wiechmann L, Sampson M, Stempel M, Jacks LM, Patil SM, King T, Morrow M (2009). Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. *Ann Surg Oncol* 16:2705–2710. 354. Rosen PP (1983). Tumor emboli in intramammary lymphatics in breast carcinoma: pathologic criteria for diagnosis and clinical significance. *Pathol Annu* 18 Pt 2: 215–232. 355. Cabioglu N, Ozmen V, Kaya H, Tuzlali S, Igci A, Muslumanoğlu M, et al. (2009). Increased lymph node positivity in multifocal and multicentric breast cancer. *J Am Coll Surg* 208: 67–74. 356. Michaelson JS, Silverstein M, Sgroi D, Cheongsiatmoy JA, Taghian A, Powell S, et al. (2003). The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. *Cancer* 98: 2133–2143. 357. Vinh-Hung V, Nguyen NP, Cserni G, Truong P, Woodward W, Verkooijen HM, et al. (2009). Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer: a compiled update. *Future Oncol* 5: 1585–1603. 358. Woodward WA, Vinh-Hung V, Ueno NT, Cheng YC, Royce M, Tai P, et al. (2006). Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 24: 2910–2916. 359. Grabau D, Jensen MB, Rank F, Blichert-Toft M (2007). Axillary lymph node micrometastases in invasive breast cancer: national figures on incidence and overall survival.

APMIS 115:828–837. 360. Pugliese M, Stempel M, Patil S, Hsu M, Ho A, Traina T, et al. (2010). The clinical impact and outcomes of immunohistochemistry-only metastasis in breast cancer. *Am J Surg* 200:368–373. 361. Weaver DL, Ashikaga T, Krag DN, Skelly JM, Anderson SJ, Harlow SP, et al. (2011). Effect of occult metastases on survival in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 364: 412–421. 362. Pugliese MS, Stempel MM, Cody HS, III, Morrow M, Gemignani ML (2009). Surgical management of the axilla: do intramammary nodes matter? *Am J Surg* 198: 532–537. 363. Kell MR, Burke JP, Barry M, Morrow M (2010). Outcome of axillary staging in early breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 120: 441–447. 364. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB, III, Bodurka DC, Burstein HJ et al. (2005). American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 7703–7720. 365. Klauber-DeMore N, Ollila DW, Moore DT, Livasy C, Calvo BF, Kim HJ, et al. (2006). Size of residual lymph node metastasis after neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer patients is prognostic. *Ann Surg Oncol* 13: 685–691. 366. Rouzier R, Extra JM, Klijanienko J, Falcou MC, Asselain B, Vincent-Salomon A, et al. (2002). Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes. *J Clin Oncol* 20: 1304–1310. 367. Clarke RB (2003). Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids* 68:789–794. 368. Schiff R, Osborne CK, Fuqua SAW (2010). Clinical aspects of estrogen and progesterone receptors. In: *Diseases of the breast*, 4th edition. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osbourne CK, eds. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia: pp 408–430. 369. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1474–1481. 370. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365: 1687–1717. 371. Allred DC (2010). Issues and updates: evaluating estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol* 23 Suppl 2: S52–S59. 372. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21:1973–1979. 373. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ (2009). Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14: 55–66. 374. Epstein M, Ma Y, Press MF (2010). ERBB2 testing: assessment of status for targeted therapies. In: *Diseases of the breast*, 4th edition. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osbourne CK, eds. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia: pp 431–442. 375. Suci C, Muresan A, Cornea R, Suci O, Dema A, Raica M. Semiautomated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncol Lett*. 2014; 7: 107–114. 376. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the international Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*. 2011; 103: 1656–64. 377. Mrklić I, Čapkun V, Pogorelić Z, Tomić S. Prognostic value of Ki-67 proliferating index in triple negative breast carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2013; 209:296–301. doi: 10.1016/j.prp.2013.02.012 378. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med*. 2010; 1: 747–54. 379. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817–26. 380. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive

breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 3726–34. 381. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010; 11: 174–83. 382. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1504–13. 383. Engstrom MJ, Opdahl S, Hagen AI, Romundstad PR, Akslen LA, Haugen OA, et al. Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 140: 463–73. 384. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Han W, Kim DW, Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Bang YJ. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res*. 2011; 13:R22. doi: 10.1186/bcr2834. 385. Aleskandarany MA, Green AR, Benhasouna AA, Barros FF, Neal K, Reis-Filho JS, Ellis IO, Rakha EA. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2 positive and triple negative biological classes of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012; 14:R3. 386. Miyashita M, Ishida T, Ishida K, Tamaki K, Amari M, Watanabe M, Ohuchi N, Sasano H. Histopathological subclassification of triple negative breast cancer using prognostic scoring system: five variables as candidates. *Virchows Arch*. 2011; 458:65–72. doi: 10.1007/s00428-010-1009-2. 387. Munzone E, Botteri E, Sciandivasci A, Curigliano G, Nolè F, Mastropasqua M, et al. Prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with node-negative, triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 134:277–282. doi: 10.1007/s10549-012-2040-6. 388. Ricciardi GR, Adamo B, Ieni A, Licata L, Cardia R, Ferraro G, et al. Androgen Receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as Emerging Targets and Novel Prognostic Markers in Triple-negative breast cancer (TNBC) Patients. *PLoS ONE* 10(6):e0128368. doi:10.1371/journal.pone.0128368 389. Hao S, He ZX, Yu KD, Yang WT, Shao ZM. New insights into the prognostic value of Ki-67 labeling index in patients with triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(17):24824-31 390. Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, Gerber B, Tesch H, Hilfrich J, Huober J, et al: Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: A translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol* 24: 2786-2793, 2013. 391. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, Valero V, Lehmann BD, Pietenpol JA, Hortobagyi GN, et al: Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 19: 5533-5540, 2013. 392. Nakashoji A., Matsui A., Nagayama A., Iwata Y., Sasahara M., Murata Y: Clinical predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast. *Oncology Letters*. 2017;14 (4) (pp 4135-4141). 393. Pan Y, Yuan Y, Liu G, Wei Y (2017): P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. *PLoS ONE* 12(2):e0172324. doi:10.1371/journal.pone.0172324 394. Wu Q., Ma G., Deng Y., Luo W., Zhao Y., Li W., Zhou Q: Prognostic value of ki-67 in patients with resected triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology*. 2019; Article Number: 1068. 395. Zhu X., Chen L., Huang B., Wang Y., Ji L., Wu J., Di G., Liu G., Yu K., Shao Z., Wang Z: The prognostic and predictive potential of Ki-67 in triple-negative breast cancer. *Scientific reports*. 10 (1) (pp 225), 2020. 396. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1097-104. 397. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC: A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 1999,19(2):1262-1270. 398. Nielsen J, Christiansen J, Lykke- Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G: The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J*

Biol Chem 2005, 280(18):18517-18524. 399. Mori, H., Sakakibara, S., Imai, T., Nakamura, Y., Iijima, T., Suzuki, A., Yuasa, Y., Takeda, M., and Okano, H. (2001) *J. Neurosci. Res.* 64, 132–143 400. Nielsen, J., Kristensen, M. A., Willemoes, M., Nielsen, F. C., and Christiansen, J. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32, 4368–4376 401. Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I., and Yisraeli, J. K. (1995) *EMBO J.* 14, 5109–5114 402. Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S. P., IMP-3 Activates Translation of IGF-II mRNA 18523 Downloaded from <http://www.jbc.org/> by guest on September 13, 2020 403. Standart, N., and Yisraeli, J. K. (1998) *Genes Dev.* 12, 1593–1598 404. Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D., and Ross, J. (1992) *Genes Dev.* 6, 642–654 405. Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L., and Singer, R. H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* 17, 2158–2165 406. Runge, S., Nielsen, F. C., Nielsen, J., Lykke-Andersen, J., Wewer, U. M., and Christiansen, J. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 29562–29569 407. Atlas, R., Behar, L., Elliott, E., and Ginzburg, I. (2004) *J. Neurochem.* 89, 613–626 408. Ioannidis, P., Trangas, T., Dimitriadis, E., Samiotaki, M., Kyriazoglou, I., Tsiapalis, C. M., Kittas, C., Agnantis, N., Nielsen, F. C., Nielsen, J., Christiansen, J., and Pandis, N. (2001) *Int. J. Cancer* 94, 480–484 409. Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A., Ross, J., Prokipcak, R. D., Herrick, D. J., and Bernstein, P. L. (1997) *Oncogene* 14, 1279–1286 410. Ross, J., Lemm, I., Berberet, B., Doyle, G. A., Bourdeau-Heller, J. M., Coulthard, S., Meisner, L. F., Lee, C. H., Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A., Prokipcak, R. D., Herrick, D. J., and Bernstein, P. L. (2001) *Oncogene* 20, 6544–6550 411. Doyle, G. A., Bourdeau-Heller, J. M., Coulthard, S., Meisner, L. F., Ross, J., Lee, C. H., Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A., Prokipcak, R. D., Herrick, D. J., and Bernstein, P. L. (2000) *Cancer Res.* 60, 2756–2759 412. Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, Buczkowski AK, Chung SW, Scudamore CH, Huntsman DG, Ng SS, Owen DA: Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer* 2010, 10:59. 413. Jiang Z, Chu PG, Woda BA i sur. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2006;7:556-564. 414. Mueller-Pillasch, F., Lacher, U., Wallrapp, C., Micha, A., Zimmerhackl, F., Hameister, H., Varga, G., Friess, H., Buchler, M., Beger, H. G., Vila, M. R., Adler, G., and Gress, T. M. (1997) *Oncogene* 14, 2729–2733 415. Wagner, M., Kunsch, S., Duerschmied, D., Beil, M., Adler, G., Mueller, F., and Gress, T. M. (2003) *Gastroenterology* 124, 1901–1914 416. Zhang, J. Y., Chan, E. K., Peng, X. X., Lu, M., Wang, X., Mueller, F., and Tan, E. M. (2001) *Clin. Immunol.* 100, 149–156 417. Yaniv, K., and Yisraeli, J. K. (2002) *Gene (Amst.)* 287, 49–54 418. Yaniv K, Fainsod A, Kalcheim C, Yisraeli JK. The RNA-binding protein Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. *Development* 2003;130:5649-61. 419. Yantiss RK, Woda BA, Fanger GR, et al. KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novel molecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 2005;29:188-95. 420. Liao B, Yan Hu, David J. Herrick, and Gary Brewer: The RNA-binding Protein IMP-3 Is a Translational Activator of Insulin-like Growth Factor II Leader-3 mRNA during Proliferation of Human K562 Leukemia Cells; Vol. 280, No. 18, Issue of May 6, pp. 18517–18524, 2005. 421. Macaulay, V. M. (1992) *Br. J. Cancer* 65, 311–320 422. Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995) *Endocr. Rev.* 16, 3–34 423. Khandwala, H. M., McCutcheon, I. E., Flyvbjerg, A., and Friend, K. E. (2000) *Endocr. Rev.* 21, 215–244 424. Tally, M., Li, C. H., and Hall, K. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148,811–816 425. Weksberg, R., Shen, D. R., Fei, Y. L., Song, Q. L., and Squire, J. (1993) *Nat. Genet.* 5, 143–150 426. Hammarberg, B., Tally, M., Samuelsson, E., Wadensten, H., Holmgren, E., Hartmanis, M., Hall, K., Uhlen, M., and Moks, T. (1991) *J. Biol. Chem.* 266,11058–11062 427. Aro, A. L., Savikko, J., Pulkkinen, V., and von Willebrand, E. (2002) *Leuk. Res.* 26, 831–837 428. Jiang Z, Chu PG, Woda BA i sur. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol*



2006;7:556-564. Kim HY, Ha Thi HT, Hong S: IMP2 and IMP3 cooperate to promote the metastasis of triple-negative breast cancer through destabilization of progesterone receptor. *Cancer Letters*. 415:30-39, 2018 02 28. 429. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, et al. Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2006;7:556-64. 430. Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, et al. Oncofetal protein IMP3: a novel molecular marker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cell carcinomas. *Cancer* 2008;112:2676-82. 431. Zheng W, Yi X, Fadare O, et al. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:304-15. 432. Surmacz E. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:95-105. 433. Yee D, Lee AV. Crosstalk between the insulin-like growth factors and estrogens in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:107-15. 434. Samanta S, Sharma VM, Khan A, Mercurio AM: Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer; *Oncogene*. 31(44):4689-97, 2012. 435. Zhang L, Hao C, Dong G, Tong Z. Analysis of Clinical Features and Outcome of 356 Triple-Negative Breast Cancer Patients in China. *Breast Care (Basel)*. 2012;7(1):13-17. doi:10.1159/000336539 436. Walter O, Prasad M, Lu S, Quinlan RM, Edmiston KL, Khan A: IMP3 is a novel biomarker for triple negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggressive phenotype; *Human Pathology*. 40(11):1528-33, 2009. 437. Sidoni A, Cartaginosa F: IMP3 expression in triple-negative breast carcinoma. *Human Pathology*. 41(9):1355-6; author reply 1356-7, 2010 Sep. 438. Vranic S., Frkovic-Grazio S., Palazzo J., Gatalica Z: IMP3, a novel basal phenotype marker, is commonly overexpressed in triple negative adenoid cystic carcinomas of the breast but not in triple negative apocrine carcinomas. 28th International Congress of the International Academy of Pathology. Sao Paulo Brazil; 57 (SUPPL.1) (pp 26-27), 2010. 439. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329-34. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1109. 440. Ohashi R, Sangen M, Namimatsu S, Yanagihara K, Yamashita K, Sakatani T, Takei H, Naito Z: Prognostic value of IMP3 expression as a determinant of chemosensitivity in triple-negative breast cancer; *Pathology, Research & Practice*. 213(9):1160-1165, 2017 Sep. 441. Samanta S, Pursell B, Mercurio AM : IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression; *Journal of Biological Chemistry*. 288(18):12569-73, 2013 May 03. 442. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2750-67. 443. K. Kono, H. Inuma, Y. Akutsu, H. Tanaka, N. Hayashi, Y. Uchikado, et al. Phase II cancer vaccination trial with multiple peptides derived from novel oncoantigens against advanced esophageal cancer. *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 2504). Dostupno sa <http://meetinglibrary.asco.org/content/83250-102> 444. Yusuke T, Michiko H, Satoru S, Katsunori I, Shinya H, Atsushi I, et al. Peptides derived from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. Article first published online: 19 NOV 2010;102. 445. Ellis IO, Schnitt SJ, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V. et al. Invasive breast carcinoma. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors: *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC press;2003.p.13-48. 446. Ho-Yen C, Bowen RL, Jones JL.Characterisation of basal -like breast cancer, an update. *Diagnostic Hystopathology* 2012;18:104-11. 447. Sjekloča N, Tomić S, Mrklić I, Vukmirović F, Vučković L, Lovasić IB, Maras-Šimunić M. Prognostic value of IMP3 immunohistochemical expression in triple negative breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Feb;99(7):e19091. 448. Wang L, Li H, Xia Z, Lu J, Peng T. IMP3 is a novel

biomarker to predict metastasis et progosis of gastric adenocarcinoma; a retrospective study. Chin Med J 2010;123:3554-3558. 449. Bellezza G, Cavaliere A, Sidoni A: IMP3 expression in non-small cell lung cancer. Hum Pathol 2009, 40(8):1205-1206. 450. Levy M, Lin F, Xu H, Dhall D, Spaulding BO, Wang HL: S100P, von Hippel-Lindau gene product, and IMP3 serve as a useful immunohistochemical panel in the diagnosis of adenocarcinoma on endoscopic bile duct biopsy. Hum Pathol 2010 in press. 451. Yuan RH, Wang CC, Chou CC, Chang KJ, Lee PH, Jeng YM: Diffuse expression of RNA-binding protein IMP3 predicts high-stage lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal adenocarcinoma. Ann Surg Oncol 2009, 16(6):1711-1719. 452. Li L, Xu H, Spaulding BO, Cheng L, Simon R, Yao JL, di Sant'Agnese PA, Bourne PA, Huang J: Expression of RNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. Hum Pathol 2008, 39(8):1205-1211. 453. Noske A, Faggad A, Wirtz R, Darb-Esfahani S, Sehoul J, Sinn B, Nielsen FC, Weichert W, Buckendahl AC, Roske A, et al.: IMP3 expression in human ovarian cancer is associated with improved survival. Int J Gynecol Pathol 2009, 28(3):203-210. 454. Suyang H, T Smith, P. G. Chu, Q Liu, C Young, B. A. Woda, D Lu, P. Lin, S. A. Wang, K. Dresser; The Oncofetal Protein IMP3. A Novel Molecular Marker to Predict Aggressive Meningioma; Arch Pathol Lab Med—Vol 135, August 2011. 455. Yin L, Shuang H, Sheng C, Liang H, Sun XJ, Yang WT, Shao ZM: The Prognostic Value of Nodal Staging in Triple-negative breast cancer - A Cohort from China; Scientific Reports. 8(1):9007, 2018 06 13. 456. Rabab AAM, Stewart GM, Mahmmud MA, Macmillan RD, Green RA, Paish CE, Ellis OI: Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: Findings from a large case series with long-term follow-up; The J.Pathol. 2011, 223(3):358-65. 1 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186

**sources:**

- 1 238 words / 1% - Internet  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)
- 2 236 words / 1% - Internet from 18-Apr-2020 12:00AM  
[journals.lww.com](http://journals.lww.com)
- 3 201 words / 1% - Internet from 02-Dec-2020 12:00AM  
[repozitorij.mefst.unist.hr](http://repozitorij.mefst.unist.hr)
- 4 159 words / < 1% match - Internet from 30-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)
- 5 70 words / < 1% match - Internet from 26-Sep-2017 12:00AM  
[www.horizonti.ekfak.kg.ac.rs](http://www.horizonti.ekfak.kg.ac.rs)

- 
- 6 48 words / < 1% match - Internet from 21-May-2015 12:00AM  
[www.cb-mn.org](http://www.cb-mn.org)
- 
- 7 21 words / < 1% match - Internet  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)
- 
- 8 18 words / < 1% match - Crossref Posted Content  
[Satoi Nagasawa, Yuta Kuze, Ichiro Maeda, Yasuyuki Kojima et al. "Genomic profiling reveals heterogeneous populations of ductal carcinoma in situ of the breast", Cold Spring Harbor Laboratory, 2020](#)
- 
- 9 17 words / < 1% match - Internet from 29-Nov-2020 12:00AM  
[repositorij.mefst.unist.hr](http://repositorij.mefst.unist.hr)
- 
- 10 16 words / < 1% match - Internet from 03-Jul-2020 12:00AM  
[tesis.ucsm.edu.pe](http://tesis.ucsm.edu.pe)
- 
- 11 15 words / < 1% match - Internet from 12-Oct-2020 12:00AM  
[fedora.ucg.ac.me](http://fedora.ucg.ac.me)
- 
- 12 13 words / < 1% match - Internet from 30-Nov-2020 12:00AM  
[repositorij.svkst.unist.hr](http://repositorij.svkst.unist.hr)
- 
- 13 13 words / < 1% match - Internet from 28-Jan-2019 12:00AM  
[www.cris.uns.ac.rs](http://www.cris.uns.ac.rs)
- 
- 14 13 words / < 1% match - Crossref Posted Content  
[Alexander Ring, Pushpinder Kaur, Julie E. Lang. "EP300 Knockdown Reduces Cancer Stem Cell Phenotype, Tumor Growth and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer", Research Square, 2020](#)
- 
- 15 12 words / < 1% match - Internet from 05-Dec-2020 12:00AM  
[repositorij.unios.hr](http://repositorij.unios.hr)
- 
- 16 12 words / < 1% match - Internet from 27-Jun-2017 12:00AM  
[medlib.mef.hr](http://medlib.mef.hr)
- 
- 17 12 words / < 1% match - Internet from 21-Oct-2020 12:00AM  
[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)
- 
- 18 11 words / < 1% match - Internet from 17-Nov-2020 12:00AM  
[www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
-

- 19 11 words / < 1% match - Internet from 02-Dec-2020 12:00AM  
[repozitorij.unios.hr](http://repozitorij.unios.hr)
- 
- 20 11 words / < 1% match - Internet  
[vbs.rs](http://vbs.rs)
- 
- 21 11 words / < 1% match - Internet from 27-Oct-2015 12:00AM  
[www.jbc.org](http://www.jbc.org)
- 
- 22 11 words / < 1% match - Internet from 06-Feb-2015 12:00AM  
[www.umos.org.rs](http://www.umos.org.rs)
- 
- 23 11 words / < 1% match - Internet from 11-Feb-2019 12:00AM  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)
- 
- 24 11 words / < 1% match - Internet from 21-Sep-2018 12:00AM  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)
- 
- 25 11 words / < 1% match - Internet from 27-Jun-2017 12:00AM  
[medlib.mef.hr](http://medlib.mef.hr)
- 
- 26 11 words / < 1% match - Internet from 20-Jan-2020 12:00AM  
[www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com)
- 
- 27 11 words / < 1% match - Internet from 13-Apr-2019 12:00AM  
[porodicanamedicina.com](http://porodicanamedicina.com)
- 
- 28 11 words / < 1% match - Internet from 25-Dec-2009 12:00AM  
[www.uninp.edu.yu](http://www.uninp.edu.yu)
- 
- 29 11 words / < 1% match - Internet from 29-Jul-2019 12:00AM  
[link.springer.com](http://link.springer.com)
- 
- 30 11 words / < 1% match - Crossref Posted Content  
[Paula Cabello Navarro. "Epigenetic regulation of resistance to treatments in triple negative and HER2+ breast cancer: miRNAs involved", Universitat Politecnica de Valencia, 2020](#)
- 
- 31 10 words / < 1% match - Internet from 29-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)
- 
- 32 10 words / < 1% match - Internet from 30-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)

---

33 10 words / < 1% match - Internet from 17-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)

---

34 10 words / < 1% match - Internet from 21-May-2013 12:00AM  
[www.zdravlje.gov.rs](http://www.zdravlje.gov.rs)

---

35 10 words / < 1% match - Internet  
[fedorabg.bg.ac.rs](http://fedorabg.bg.ac.rs)

---

36 10 words / < 1% match - Internet  
[hdl.handle.net](http://hdl.handle.net)

---

37 10 words / < 1% match - Internet from 28-Nov-2020 12:00AM  
[repozitorij.svkst.unist.hr](http://repozitorij.svkst.unist.hr)

---

38 10 words / < 1% match - Internet from 15-May-2018 12:00AM  
[pure.uva.nl](http://pure.uva.nl)

---

39 10 words / < 1% match - Internet  
[www.cris.uns.ac.rs](http://www.cris.uns.ac.rs)

---

40 10 words / < 1% match - Internet  
[medlib.mef.hr](http://medlib.mef.hr)

---

41 10 words / < 1% match - Internet from 27-Jun-2017 12:00AM  
[medlib.mef.hr](http://medlib.mef.hr)

---

42 10 words / < 1% match - Internet from 08-Jun-2016 12:00AM  
[weblibrary.apeiron-uni.eu](http://weblibrary.apeiron-uni.eu)

---

43 10 words / < 1% match - Internet from 30-Sep-2020 12:00AM  
[insights.ovid.com](http://insights.ovid.com)

---

44 10 words / < 1% match - Internet from 21-Dec-2014 12:00AM  
[www.ikvbv.ns.ac.rs](http://www.ikvbv.ns.ac.rs)

---