

USPOREDBA EKSPRESIJE KALPAINA I ANDROGENIH RECEPTORA U KARCINOMU DOJKE

Ban, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:474799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Josipa Ban

USPOREDBA EKSPRESIJE KALPAINA I ANDROGENIH RECEPTORA U KARCINOMU DOJKE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI

SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Josipa Ban

USPOREDBA EKSPRESIJE KALPAINA I ANDROGENIH RECEPTORA U KARCINOMU DOJKE

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: Prof.dr.sc. Elvira Mustać, dr.med., redoviti profesor i pročelnik Katedre za Opću patologiju i patološku anatomiju.

Diplomski rad ocjenjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc.dr.sc. Emina Babarović, dr.med.

2. Doc.dr.sc. Kovička Matušan Ilijaš, dr.med.

3. Prof.dr.sc. Ines Mrakovčić-Šutić, dr.med.

Rad sadrži 50 stranica, 2 slike, 9 tablica, 70 literaturnih navoda.

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici Prof.dr.sc. Elviri Mustać, dr.med. za njezin trud, angažman, ljudskost i motivaciju koju mi je pružila da se ovaj rad napiše. Hvala joj što mi je pokazala što znači biti izvrstan pedagog i profesor koji se zaista angažira oko studenta.

Hvala mojoj majci koja mi je sve ove godine bila najveći uzor, inspiracija i podrška u svim teškim momentima te koja je svaku moju malu pobjedu radosno slavila. Naučila me je mnogočemu, osobito upornosti, marljivom radu te ljubaznom ophođenju, a njezina požrtvovnost i predanost prate me kroz čitav život.

Mojim prijateljima, mojoj sestri i dečku – hvala vam što ste besprijevakorno vjerovali u mene i moj uspjeh čak i onda kad ja sama nisam.

Popis skraćenica i akronima

WHO - engl. World Health Organization; Svjetska zdravstvena organizacija

BRCA1/BRCA2 - engl. Breast cancer gene; gen s povećanim rizikom za rak dojke

CGHFBC - engl. The Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer; Kolaborativna grupa za hormonske faktore u karcinomu dojke

ER - Estrogenski receptori

PR- Progesteronski receptori

AR- androgeni receptori

IARC - engl. International Agency for Research on Cancer; Internacionalna agencija za istraživanje tumora

OC-engl. Oral contraceptives; oralni kontraceptivi

HRT- engl. Hormonal Replacement Therapy; Hormonska nadomjesna terapija

BMI- engl. Body Mass Indeks; Indeks tjelesne mase

TDLU- Terminalna duktulo lobularna jedinica

DCIS- Duktalni karcinom in situ

LCIS- Lobularni karcinom in situ

IDC- Invazivni duktalni karcinom

PAS –engl. Periodic acid-Schiff

NET – neuroendokrini tumor

TCGA- engl.The Cancer Genome Atlas Research Network; Mreža genomskih atlasa karcinoma

ACS- engl.American Cancer Society; Američko društvo za rak

MR- Magnetna Rezonanca

CK- kreatinin kinaza

EGFR-engl.epidermal growth factor receptor; receptor za epidermalni faktor rasta

HER2/neu-engl.Human epidermal growth factor receptor2: humani receptor za epidermalni faktor rasta

Ki-67- proliferacijski indeks

TP53-tumorski protein

PIK3CA-engl. Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha;

Fosfatidilinozitol bifosfat kinaza katalitička podjedinica alfa

GATA3-transkripcijski faktor kodiran GATA3 genom

PHD- Pato Histološka Dijagnostika

PTEN-engl.phosphatase and tensine homolog; homolog fosfataze i tenzina

Tris-EDTA-tris(hidroksimetil)aminometan etilendiaminotetraoctena kiselina

HMW- engl. High molecular weight; velika molekularna težina

NOS-engl.Not otherwise specified; nije drugačije specificiran

NST-engl.No special type; bez posebnog tipa

ILC- invazivni lobularni karcinom

NPI-eng. Nottingham prognostic indeks; Notingamski prognostički indeks

AJCC -engl.American joint committee on cancer; Američko udruženje za rak

SADRŽAJ

1.Uvod.....	1
1.1.Epidemiologija.....	1
1.2.Etiologija.....	1
1.3.Klasifikacija karcinoma dojke.....	6
1.3.1.Duktalni karcinom in situ (DCIS).....	7
1.3.2.Lobularni karcinom in situ (LCIS).....	8
1.3.3.IDC; Invazivni duktalni karcinom.....	9
1.3.4.Invazivni lobularni karcinom (ILC).....	10
1.3.5.Molekularna klasifikacija.....	12
1.3.6.Genomska klasifikacija.....	14
1.4.Klinička slika.....	15
1.5.Probir i dijagnostika.....	15
1.6.Prognostički i prediktivni čimbenici.....	17

1.6.1.Tradicionalni morfološki prognostički čimbenici.....	17
1.6.2.Prediktivni čimbenici odgovora na terapiju.....	20
1.6.3.Molekularni prognostički i prediktivni čimbenici.....	21
1.6.4.AR kao potencijalni prediktivni čimbenik odgovora na terapiju.....	21
1.6.5.Kalpaini i mogućnost prognostičkog i terapijskog značaja.....	23
1.7.Terapijski postupci.....	24
2.Ciljevi istraživanja.....	25
3.Ispitanici, materijali i postupci.....	26
3.1.Ispitanici i materijali.....	26
3.2.Postupci.....	27
3.2.1.Imunohistokemijsko bojenje.....	27
3.2.2.Imunohistokemijsko bodovanje.....	27
3.2.3.Statistička analiza.....	28
4.Rezultati.....	28
4.1.Kliničko patološka obilježja bolesnika.....	28
4.2.Imunohistokemijska ekspresija kalpaina 1 i AR kod karcinoma dojke.....	30
4.3.Analiza preživljavanja.....	35
5.Rasprava.....	37

6.Zaključak.....	40
7.Sažetak.....	40
8.Summary.....	41
9.Literatura.....	42
10.Životopis.....	52

1.Uvod

1.1. Epidemiologija

Karcinom dojke među najčešćim je karcinomima u populaciji žena diljem svijeta, od kojeg obolijeva četvrtina žena novooboljelih od raka, te je jedan od najvažnijih uzroka smrti. Prema objavljenim studijama incidencija karcinoma dojke varira prema rasi i etničkom porijeklu te je češći u razvijenim zemljama. Jedan je od glavnih uzroka smrti diljem svijeta.(1) Incidencija karcinoma dojke u svijetu varira, pa tako razvijene zemlje imaju višu incidenciju 60 do 100/100 000, a slabije razvijene zemlje između 20 i 60 /100 000.(5) Svake godine se kod preko milijun žena dijagnosticira karcinom dojke, a preko približno 380 tisuća žena umire od ovog karcinoma. Rezultati istraživanja na Europskoj populaciji dali su podatak da nakon postavljanja dijagnoze te provođenja terapije 93% oboljelih preživi jednu godinu, a 73% pet godina, ovisno o uznapređalosti bolesti.(2) Incidencija karcinoma dojke u centralno europskoj populaciji 54,5 /100 000 stanovnika, a u zapadno europskoj populaciji 92,6/100 000 stanovnika.(3) U RH karcinom dojke je na prvom mjestu po incidenciji (5), u 2018. godini, WHO bilježi 2856 novooboljelih žena, što pokazuje stopu incidencije 68,7/100 000, te mortalitet 18,2/100 000 oboljelih.(6) Karcinom dojke rijetko se javlja u žena mlađih od 20 godina, najčešće se javlja kod žena iznad 50 godina života, te ima tendenciju porasta s dobi.(4,5)

1.2. Etiologija

Kao i sam karcinom dojke i njegova etiologija jest heterogena, multifaktorijalna te opsežna. Iako genetski faktori imaju utvrđen i jak utjecaj na obolijevanje od karcinoma dojke, kao što su to mutacije na genima BRCA1 te BRCA2 koji čine svega 5-10 % slučajeva, postoji i dalje jako puno slučajeva koji nisu do kraja razjašnjeni, a mogu biti i ne povezani sa

mutacijama na ovim genima. (7,8) Mnogobrojni su faktori rizika povezani sa obolijevanjem od karcinoma dojke, među njima su dob, pozitivna obiteljska anamneza, reproduktivni faktori, hormonski status, pretilost, konzumacija alkohola, hormonsko nadomjesno liječenje, izloženost ionizirajućem zračenju te genetska predispozicija.(8-10)

Reproduktivni faktori i hormonski status

Dob prve menarhe i početak menopauze

Tijekom reproduktivne dobi žene, jajnici produciraju steroidne hormone koji utječu na razvoj i funkciju dojke. Rana dob pojave prve menarhe te kasniji ulazak u menopauzu dokazano imaju utjecaj na veći rizik pojavnosti karcinoma dojke kod ovih žena.(11) Studija provedena od grupe CGHFBC, pokazala je da se rizik od nastanka karcinoma dojke za svaku godinu preuranjene menarhe povećava za 5%, a za svaku godinu kasnije menopauze 2,9% . Studija također daje podatak da je rizik obolijevanja i do 43% veći u premenopauzalnih žena dobi od 45. do 54. godine, nego postmenopauzalnih žena iste dobi.(11)

Premda etiologija ER/PR negativnih tumora ne mora biti povezana sa hormonskim uzrocima, dugotrajno izlaganje visokim koncentracijama endogenih estrogena povećava rizik nastanka karcinoma dojke u premenopauzalnih te postmenopauzalnih žena.(12,13) Me i sur.(14) u svojoj studiji prikazuju da u skupini sa kasnijom pojavnosti menarhe postoji reduciran rizik od nastanka ER/PR pozitivnog tipa karcinoma dojke za 28%, te ER/PR negativniog tipa za 16%, u usporedbi sa skupinom s ranom pojavnosti menarhe. Stoga rizik nastanka karcinoma dojke ovisi o dobi te menopauzalnom statusu žene. (11)

Nuliparitet i kasna dob prve trudnoće

Povećan teret nastanka karcinoma dojke osobito povećan rizik ER pozitivnog tipa (27%), ali ne i ER negativnog tipa (14), povezan je sa odgađanjem prve trudnoće, sve efektivnijom kontracepcijom i nuliparitetom.(15,16) Na promjenu magnitude povećanog rizika povezanog sa karcinomom dojke utječe dob majke pri porodu te razmak među porodima, što implicira da su povezanost reproduktivne povijesti i rizik nastanka karcinoma dojke kompleksni. Tijekom posljednjih dekada promijenjen je trend nastanka trudnoće, pa se tako rađa manje djece te u kasnijoj dobi što će također vjerojatno utjecati na teret incidencije karcinoma dojke u budućnosti.(17,18)

Dojenje

U recentnoj meta analizi 27 studija (19) Zhou i sur., utvrđeno je da žene koje su dojile imaju 37% manji rizik obolijevanja od karcinoma dojke u usporedbi sa ženama koje nisu nikad dojile te samo trajanje dojenja ukazuje na utjecaj od obolijevanja, utvrdilo se da žene koje su dugo dojile imaju 53% manji rizik u usporedbi sa ženama u kategoriji kratkoročnog dojenja. Smanjen je i rizik od nastanka luminalnog te trostruko negativnog tipa karcinoma dojke kod žena koje su dojile 6.mj i duže.(20)

Egzogeni hormoni

O postojanju adekvatnih dokaza o uzročnoj povezanosti kombiniranih estrogensko - progesteronskih kontraceptiva(OC) i kombinirane estrogensko-progesteronske menopauzalne terapije na karcinom dojke dovelo je istraživanje IARC-a pri evaluaciji lijekova kao humanih kancerogena.(21) Dokazano je da se rizik za nastanak karcinoma dojke povećava produljenom terapijom kombiniranim estrogensko-progesteronskih

kontraceptiva(22), kao i povezanost radiološki povećane gustoće tkiva dojke sa produljenim korištenjem istih.(22) Epidemiološki dokazi upućuju da je korištenje kombinirane estrogensko-progesteronske kontracepcije povezano s visokim rizikom obolijevanja od karcinoma dojke među nosiocima BRCA1 i BRCA2 mutacija i do 21% više nego u nosioca mutacija koji ne koriste kontraceptive.(22-24) Randomizirana studija prikazala je da korištenje kombinirane HRT dulje od dvije godine može povećati mamografski denzitet i tako reducirati senzitivnost mamografa na ranu dijagnozu karcinoma dojke.(25) Reeves i sur. upućuju da korištenje HRT povećava rizik od in situ te invazivnog dukalnog karcinoma dojke u usporedbi sa ženama koje nikad nisu koristile HRT.(26)

Pozitivna osobna i obiteljska anamneza

Osobna anamneza karcinoma dojke in situ ili invazivnog karcinoma povećava rizik od nastanka kontralateralnog invazivnog karcinoma.(27) Žene sa povijesti atipičnog lobularnog ili atipičnom duktalnom hiperplazijom imaju 4.4% veći rizik od razvoja karcinoma dojke nego opća populacija.(28) Žene sa pozitivnom obiteljskom anamnezom karcinoma dojke imaju dva puta veći rizik od obolijevanja, taj je rizik znatno veći ukoliko su u obitelji od karcinoma dojke oboljele majka i sestra.(29) Najčešći nasljedni sindrom upravo je taj za karcinom dojke i jajnika (BRCA1 I BRCA2 mutacije gena) sa 50-80 % rizika nastanka bolesti tijekom života. BRCA 1 često je povezan sa trostruko negativnim karcinomom dojke, dok je BRCA 2 povezan sa hormonski ovisnim te visoko proliferativnim tumorima.(30,31) Mutacije na oba gena povezane su sa razvojem karcinoma u ranijoj dobi te povećanim rizikom od nastanka karcinoma ovarija, osobito kod mutacije gena BRCA 1.(32)

Denzitet dojki na mamogramu

Denzitet dojki povezan je s dobi, ginekološkom i opstetričkom poviješću, HRT, BMI i genetskim determinantama.(33) Meta analiza postotka denziteta mjerenog pre dijagnostičkim mamogramom u općoj populaciji pokazala je da žene sa denzitetom dojki većim od 5%, a osobito one denziteta većeg od 75%, imaju i do 4,64 puta veći rizik od razvoja karcinoma dojke u usporedbi sa ženama koje su pokazale denzitet manji od 5%.(34)

Ionizirajuće zračenje

Jedan od uzročnih faktora za karcinom dojke također je X te gama zračenje prema klasifikaciji IARC-a. Osobe koje su bile izložene zračenju zbog terapije Hodgkinovog limfoma imaju 5.2 puta veći rizik te osobe liječene od tuberkuloze pokazuju 61% veći rizik od obolijevanja, pri čemu su mlađe žene ugroženije.(35-37)

Konsumacija alkohola i cigareta

Povezanost doza-odgovor dokazana je među konzumentima alkohola i cigareta te razvoja karcinoma dojke.(38) Pri čemu žene koje konzumiraju alkohol imaju dokazano 46% veći rizik, a koje su pušači i do 12% veći rizik naspram osoba koje ne pokazuju ovakve životne navike.(39)

Pretilost i povišen BMI

Iako povezanost pretilosti i karcinoma dojke ovisi o premenopauzalnom ili postmenopauzalnom statusu i ER/PR tumor statusu (40,41), pretilost je dokazano povezana sa rizikom nastanka karcinoma dojke u postmenopauzalnih žena.(38) Povećan BMI povezan je sa 33% povećanim rizikom za ER/PR pozitivne tumore, no također se pokazao protektivnim čimbenikom u ER/PR pozitivnih tumora kod premenopauzalnih žena .(41)

Utjecaj prehrane

Dokazi o utjecaju nutrijenata na rizik za nastanak karcinoma dojke jesu heterogeni, kontroverzni te nisu posve razjašnjeni.(38,42-45) U sistemskom pregledu 27 studija dokazano je da (47) protektivno djelovanje mogu imati konzumacija voća, povrća, vlakana, ribe, vitamina B12, folata, fitoestrogena i likopena. Neke studije zaključuju kako pretjerana konzumacija crvenog mesa može doprinjeti nastanku karcinoma dojke.(38) Pronađena je i inverzna povezanost s dijetetskim navikama tipičnih za industrializirane zemlje koje pokazuju negativan efekt naspram tradicionalnih dijetetskih navika koje su se pokazale protektivne.(46)

Fizička aktivnost

Fizička aktivnost pokazala se potencijalno protektivnim faktorom kod žena u postmenopauzi, no dokazi su deficitarni za žene u premenopauzi. Mehanizam kojim se pokazalo da fizička aktivnost može biti korisna, temelji se na efektu na ukupnu tjelesnu masnoću, metabolizam endogenih steroidnih hormona te jačanje samog imunološkog sustava.(38)

1.3. Klasifikacija karcinoma dojke

Klasifikacija karcinoma dojke ima za cilj pružiti preciznu dijagnozu bolesti te predvidjeti ponašanje tumora u svrhu donošenja odluka o daljnjem postupanju. Patolozi odavno tvrde kako je karcinom dojke heterogena bolest sa raznolikim histološkim i biološkim svojstvima zbog raznolikih genetskih, epigenetskih i transkriptomskih promjena, raznolikim kliničkim nalazom, odgovorom na terapiju te sa više entiteta. Ove fenotipske razlike utječu na dijagnozu, terapiju a shodno tome i prognozu karcinoma dojke. Zbog za sad neprepoznatih

specifičnih markera te lošeg razumijevanja epitelnog staničnog razvoja karcinoma dojke, i klasifikacija je nedostatna. Većina malignih oboljenja dojke su adenokarcinomi koji čine više od 95% karcinoma dojke. Invazivni duktalni karcinom (IDC) najčešći je oblik invazivnog karcinoma dojke. Na njega otpada 55% incidencije karcinoma dojke. Svi karcinomi dojke nastaju iz segmenta terminalne duktalne lobularne jedinice (TDLU). Dobro je utvrđena tipizacija invazivnog karcinoma dojke i njegove histološke varijante. Karcinom dojke općenito se dijeli na duktalni karcinom in situ (DCIS) i IDC. DCIS je neinvazivna potencijalno maligna intraduktalna proliferacija epitelnih stanica koja je ograničena na kanale i lobule. Invazivni ili infiltrativni karcinom odnosi se na zloćudnu abnormalnu proliferaciju neoplastičnih stanica u tkivu dojke, koja je kroz stijenku kanala prodrla u stromu. Invazivni karcinom i karcinom in situ klasificirani su kao duktalni i lobularni na temelju mjesta s kojeg tumor potječe. Tumor koji potječe iz kanala poznat je kao duktalni karcinom, dok su oni koji potječu iz lobula poznatiji kao lobularni karcinomi.(48)

1.3.1 Duktalni karcinom in situ (DCIS) je neoplastična proliferacija epitelnih stanica ograničena na kanale ili lobule, karakterizirana nuklearnom kao i staničnom atipijom, potencijalnim malignim kapacitetom te obligatornom tendencijom razvoja naknadno invazivnog karcinoma dojke. Na vanjskom duktalnom sloju, stanice mioepitela obično su sačuvane ali im se broj može smanjiti. Širenje DCIS-a kroz kanale u lobularne acinuse koji rezultiraju velikim lezijama, naziva se lobularna karcinacija.

DCIS se smatra prekursorom za kasniji razvoj invazivnog karcinoma s visokim rizičnim faktorom. Smrt zbog DCIS-a izuzetno je rijetka, ali smrt nastupi nakon inicijalne dijagnoze DCIS-a bilo zbog neotkrivene invazivne komponente ili zbog recidiva invazivne lezije nakon tretmana.

Morfološke vrste DCIS-a

Povijesno, DCIS je podijeljen u pet arhitektonskih podvrsta:

- komedo,
- solidni,
- kribriformni,
- papilarni i
- mikropapilarni.

Neki slučajevi DCIS-a imaju jedinstven obrazac rasta, ali većina pokazuje mješavinu obrazaca.

Manjna lezija DCIS rijetko pokazuje dodatne morfološke varijacije, koje uključuju stanice prstena pečatnjaka, neuroendokrinu diferencijaciju ili multinuklearne gigantske stanice, apokrine metaplastične stanice i pločaste osobine (pločasti stanični karcinom in situ).(49)

1.3.2. Lobularni karcinom in situ (LCIS) je intralobularna proliferacija malih, prilično ujednačenih i slabo kohezivnih stanica, koje potječu iz TDLU-a. Dugoročnim praćenjem žena s lobularnim karcinomom in situ (LCIS) zaključeno je da on predstavlja faktor rizika i neobavezujući prekursor za naknadni razvoj invazivnog karcinoma. Multicentričan je u oko 70% slučajeva, a bilateralan u otprilike 30% - 40% slučajeva. Mikroskopski, LCIS uglavnom ostavlja netaknutu temeljnu arhitekturu i prepoznatljiv je kao lobulus; postoji relativno jednolika populacija okruglih stanica malih i srednjih veličina koje imaju normokromne jezgre koje popunjavaju raširene lobule u nekohezivnom obrascu. Rijetko su prisutne atipične promjene poput pleomorfizma, mitoze i nekroze. Intracelularne kapljice mucina najčešće se viđaju s jezgrama prstenastog sloja. Postoje dva imunohistokemijska obilježja za razlikovanje LCIS-a, nedostatak ekspresije E-kadherina i β -katenina i pozitivnost na keratin visoke molekulske mase (HMW). Uz karakterističnu ekspresiju CK8-18, koji pokazuje karakterističan

perinuklearni izraz dok boji perifernu citoplazmu duktalnih stanica. DCIS je konstantno pozitivan na E-kadherin i p-katenin i pokazuje smanjeni ili nikakav HMW keratin, koji se normalno izražava u duktalnom bazalnom sloju, s tipičnom perifernom ekspresijom CK8-18. Aberantna ekspresija ovih markera nije nesvakidašnja, a neki slučajevi s intermedijarnim značajkama pokazuju i hibridna imunohistokemijska svojstva. Gubitak E-kadherina u LCIS nastaje zbog mutacije gena.

1.3.3. IDC Invazivni duktalni karcinomi su karcinomi dojke koji imaju malignu duktalnu proliferaciju zajedno sa stromalnom invazijom u prisutnosti ili odsutnosti DCIS-a, s relativnim udjelima. IDC je klasificiran u više histoloških podtipova prema širokom rasponu kriterija, uključujući vrstu stanice (kao kod apokrinog karcinoma), količinu, vrstu i mjesto izlučivanja (kao kod mucinoznog karcinoma), arhitektonske karakteristike (kao u papilarnom, tubularnom i mikropapilarnom karcinomu), i imunohistokemijski profil (kao u neuroendokrinom karcinomu). IDC su heterogena skupina tumora razvrstanih prema citoarhitektonskim značajkama, jer imaju širok opseg morfološke varijacije. Neki od njih imaju dovoljno karakterističnih osobina i određenog ponašanja da bi ih mogli svrstati u posebne podvrste, dok većina, koja čini oko 75% IDC-a, ne pokazuje dovoljno morfoloških karakteristika da bi se klasificirala kao specifični histološki tip i općenito se označava kao IDC, a ne naveden NOS. Također nekolicina drugih klasifikacija radije koristi „bez posebnog tipa“ (NST) kako bi naglasila razliku od tumora specifičnog tipa, što je međunarodno prihvaćeno. Neki od podtipova iako su iznimno rijetki javljaju se češće u starijih od 60 godina, tj postmenopausalnih žena, kao što su to tubularni, invazivni kribriformni, mucinozni karcinom kojeg također obilježava produkcija uglavnom ekstracelularnog mucina. *Medularni* karcinom dojke je rijedak, povezan je sa nositeljima mutacije BRCA1, karakteriziraju ga difuzan rast,

metaplazija vretenastih stanica, gigantske tumorske stanice i nekroza. Česte su metastaze u aksilarne limfne čvorove. *Invazivni papilarni i mikropapilarni* karcinomi kojima invazivna komponenta čini 90% su karakterizirani papilarnom odnosno mikropapilarnom komponentom te reverznom polarnošću stanica. Često metastaziraju u limfne čvorove te imaju lošu prognozu. Jedan od karcinoma dojke visokog gradusa također je i *apokrini* karcinom kojeg karakterizira pozitivitet pri PAS bojenju. Kod *neuroendokrinog* tumora (NET) 50% stanica imunohistokemijski eksplicira neuroendokrini marker – kromogramin A i sinaptofizin, koji i potvrđuju dijagnozu NET-a. Kod ovog karcinoma ,tumorske stanice svojom organizacijom tvore gnjezda, trabekule, rozete te palisade na periferiji. Prema klasifikaciji WHO tumora dojke iz 2012. godine, NET se može histološki svrstati u tri podvrste i to dobro diferenciran NET, slabo diferenciran / sitnostanični NET te invazivni karcinom dojke s neuroendokrinom diferencijacijom. *Metaplastični* karcinom dojke je agresivni invazivni karcinom karakteriziran dominantnom komponentom metaplastične diferencijacije bilo skvamozne, mezenhimalne ili vretenaste. *Karcinom dojke bogat lipidima* je izuzetno rijedak karcinom koji zahvaća veću dobnu skupinu u rasponu 33 do 81 godine. Karakterizira ga citoplazma bogata lipidima koja se prikazuje Oil Red bojenjem. Jedan od karcinoma dojke niskog gradusa je *sekretorni tj. juvenilni* karcinom dojke koji čini svega 0.15% svih karcinoma dojke, ovaj karcinom zahvaća djecu i adolescente, te tu pokazuje dobru prognozu, ali i starije žene gdje pokazuje agresivniji tijek. *Adenoidni cistični* karcinom je također karcinom niskog gradusa, sa povoljnom prognozom, a dob incidencije je 25 do 80 godina no češći je u postmenopauzi. Metastazira u aksilarne limfne čvorove te u 10% slučajeva daje i distalne metastaze najčešće u pluća.

1.3.4. Invazivni lobularni karcinom (ILC) je drugi glavni biološki različit invazivni karcinom mliječnih žlijezdi. On čini 5% -15% invazivnog karcinoma dojke i obično pogađa žene starije

dobne skupine zahvaćene konvencionalnim IDC. Tumorske stanice ILC-a obično su okrugle, male, relativno jednolike i nekohezivne i imaju karakterističan obrazac rasta s infiltracijom u stromu. Dijagnoza ILC se može postaviti i kad nema in situ komponente, ali u prisutnosti ovih citoarhitektonskih obilježja. Incidencija ILC-a raste, posebno kod žena u postmenopauzi, a ovaj se nalaz može dijelom povezati s nadomjesnim hormonskim liječenjem. Karakteristične su molekularne promijene kao što su inaktivacija E- kadherina mutacijom, gubitkom heterozigotnosti ili metilacijom u ILC-u. ILC ima pet različitih histoloških varijanti. *Klasični tip* ILC izražava tipične citoarhitektonske značajke ILC-a, obično je to prisutnost malih jednoličnih tumorskih stanica koje su pojedinačno raspoređene u stromi, tvoreći uzorak plamena svijeće i okruženi lobulima koncentričnog uzorka. Obično se vide žarišta stromalne elastoze u okolini vena i duktusa s različitom limfatičnom infiltracijom. Diferencijacija žlijezda nije obilježje ove varijante ILC-a.

Pleomorfni lobularni karcinom sastoji se od većih stanica s obilnom eozinofilnom citoplazmom. Jezgra je hiperkromatska s ekscentrično istaknutim nukleolusom, ova varijanta ima isti obrazac rasta kao i klasični ILC, ali obično pokazuje žarišne stanice prstenastih signala i apokrinu diferencijaciju. Ovaj tip ILC obično ima negativnu ekspresiju hormonskih receptora s većom ekspresijom TP53 i HER2 / neu.

Histiocitoidni lobularni karcinom u potpunosti se sastoji od velikih tumorskih stanica raspoređenih u difuznom obrascu rasta. Stanice tumora su velike s pjenastom citoplazmom koja sadrži obilne granule. U većini slučajeva E-kadherin je negativan.

Karcinom prstena pečatnjaka ILC obično pokazuje citoarhitektonske značajke klasičnog ILC u kombinaciji sa značajnim brojem stanica prstena pečatnjaka s ekscentričnim, semilunarnim jezgrama i prozirnim citoplazmatskim vakuolama. Važno je razlikovati ovaj tip karcinoma od mucinoznog karcinoma sa značajkama prstena pečatnjaka zbog različitih prognoza.

Tubulo lobularni karcinom je varijanta ILC karakterizirana dvostrukom ekspresijom malih cjevastih formacija sa ili bez lumena i pojedinačno rastućih stanica koje tvore linearni uzorak klasičnog ILC-a. Obično je prisutna in situ komponenta. Uglavnom je duktalna ili lobularna, ali ponekad se mogu vidjeti obje.(48)

1.3.5. Molekularna klasifikacija

Perou i sur. klasificirali su karcinom dojke u različite podskupine na temelju sličnosti profila genske ekspresije pomoću tehnologije microarray-a kako bi se dopunila morfološka klasifikacija karcinoma dojke s molekularnim parametrima koji mogu pružiti jasniji uvid u heterogenost karcinoma dojke i bolje predviđanje ponašanja tumora kako bi se u skladu s time postavili i terapijski ciljevi i strategije. Provođenje molekularnih pristupa u kliničku svakodnevnu praksu koji podržavaju morfološka obilježja i imunohistokemijski profil je kritičan za točniju prognozu bolesti. Molekularni podtipovi karcinoma dojke prepoznati po njihovom genskom potpisu su sljedeći:

Luminalni A tip predstavlja 50% invazivnih karcinoma dojke. On je ER / PR pozitivan ili HER2 negativan. Sadrži širok raspon varijanti niskog gradusa, kao što su tubularni karcinom, kribriformni karcinom, nisko gradusni IDC NST i klasični lobularni karcinom i obično izražava citokeratine male molekularne težine, koji naglašavaju luminalne duktalne stanice, s visokom ekspresijom hormonskih receptora i pridruženim genima. Ima dobru prognozu i obično je niskog gradusa i ER pozitivan.

Luminalni B tip

Ova kategorija obuhvaća 20% invazivnih karcinoma dojke. ER / PR je pozitivan, dok je HER2 / neu promjenjiv odnosno može biti pozitivan ili negativan. Stopa indeksa proliferacije izražena Ki-67 i histološkim razredima veća je od luminalne A. Uključuje većinu IDC NST gradusa 2 i mikropapilarni karcinom. Ekspresija citokeratina niske molekularne mase

luminalnih epitelnih stanica je pravilo, s umjerenom do slabom ekspresijom hormonskih receptora i pripadajućih gena. Odgovor na endokrinu terapiju i kemoterapiju je promjenjiv, a prognoza mu je lošija nego luminalnom A tipu.

HER2 prekomjerna ekspresija

Od svih invazivnih karcinoma dojke ova kategorija čini 15%. ER / PR je obično negativan, dok je HER2 / neu po definiciji pozitivan. Ekspresija Ki-67 je visoka, a mutacija TP53 uobičajena. Vrlo je često da su ti tumori visokog gradusa uz metastaze na limfnim čvorovima. Njihov genski potpis pokazuje visoku ekspresiju HER2 i nisku ekspresiju ER i pridruženih gena. Ova skupina karcinoma dojke podrazumijeva lošu prognozu i pokazuje najveću osjetljivost na terapiju trastuzumabom (herceptinom).

Bazalni tip je tako nazvan zbog svog načina ekspresije sličnog bazalnim epitelnim stanicama i normalnim mioepitelnim stanicama tkiva žlijezda. To je obično CK5 / 6 i / ili EGFR pozitivan, ER / PR negativan i HER2 negativan tip odnosno trostruko negativan, s visokim izrazom Ki-67 indeksa i mutacijom TP53, što je uobičajeno. Ovaj tip karcinoma čini 15% svih invazivnih karcinoma dojke. Obrasci ekspresije gena uključuju visoku ekspresiju bazalnih epitelnih gena, pozitivnih na bazalne citokeratine; nisku ekspresiju ER i pridruženih gena; i nisku ekspresiju HER2 / neu. Većina invazivnih karcinoma visokog gradusa i drugi posebni podtipovi niskog gradusa IDC-a povezani su sa dobrom prognozom, oni koji su pokazali nisku stopu indeksa proliferacije Ki-67, poput sekretornog, adenoidno cističnog i medularnog karcinoma, također su uključeni u ovu skupinu. Ovaj tip tumora ne pokazuje odgovor na endokrinu terapiju ili trastuzumab, ali čini se da je osjetljiv na kemoterapiju na bazi platine i inhibitore polimeraze (adenozin difosfat-riboze). Općenito ima lošu prognozu.

Trenutno postoji mnogo kliničkih istraživanja koja koriste antitijela za podjelu tumora dojke različitim molekularnim podvrstama. Ta antitijela uključuju ER, PR, HER2 / neu, citokeratin

5/6, EGFR i Ki-67. Nesklad nije rijetkost i trenutno ne postoje široko dogovoreni kriteriji za definiranje pozitivnog imunološkog stanja u tu svrhu.(48-50)

1.3.6. Genomska klasifikacija

Istraživačka mreža TCGA (engl. The Cancer Genome Atlas Research Network) provela je opsežnu genomsku analizu karcinoma dojke. Analizirani su primarni karcinomi dojke pomoću genske matrice DNK kopija, DNK metilacijom, sekvencama egzoma, nizovima RNA glasnika, sekvencioniranjem mikroRNA i reverznim fazama proteina. Definirani su podtipovi ekspresije gena i dokazalo se postojanje četiri glavne klase karcinoma dojke pri kombiniranju podataka s multiplih platformi od kojih svaka pokazuje značajnu molekularnu heterogenost. U svih karcinoma dojke pronađene su somatske mutacije u tri gena (TP53, PIK3CA i GATA3) sa incidencijom >10%, međutim pronađene su i brojne mutacije gena povezane s podtipom, uključujući specifične mutacije u luminalnom podtipu A na GATA3, PIK3CA i MAP3K1. Definirane ekspresijom proteina identificirane su i dvije nove podskupine koje su vjerojatno producirane stromalnim/mikrookolišnim elementima, također su identificirani i integriranim analizama specifični signalni putevi dominantni za svaki molekularni podtip uključujući HER2 / fosforilirani HER2 / EGFR / fosforilirani EGFR potpis unutar HER2 obogaćenog podtipa. Usporedba bazalnih tumora dojke s seroznim tumorima jajnika visokog gradusa, pokazala je mnoge molekularne sličnosti, što ukazuje na povezanost etiologije i slične terapijske mogućnosti. Hipoteza da se velik dio klinički vidljive plastičnosti i heterogenosti događa unutar ovih glavnih bioloških podtipova raka dojke postavlja se upravo na biološkom nalazu glavnih podtipova karcinoma dojke a koji su uzrokovani raznovrsnim genetskim i epigenetskim abnormalnostima.(50)

1.4. Klinička slika

U ranim stadijima karcinom dojke se može prezentirati bez simptoma ili raznolikošću simptoma od tipičnih do atipičnih. Najčešći tipični simptom je palpabilna masa u dojci koja se otkrije samopregledom dojke i javlja se u čak 83% pacijenata, a sumnju na karcinom pobudit će bezbolna, tvrda i nepravilna masa. Osim palpabilne mase od tipičnih simptoma pojavljuju se promjene na koži dojke u vidu crvenila, uvučenja ili nabrane kože dojke koji se javljaju zbog dezmodoplastične reakcije, vrlo često se prezentira i u vidu abnormalnosti bradavice ukoliko tumor zahvaća glavni izvodni kanalić, bolovima, otečenosti i ulceracijama dojke te abnormalnostima same konture dojke. Zbog širenja tumora limfnim žilama dolazi do povećanja limfnih čvorova odnosno limfadenopatije, ovisno o samoj lokalizaciji tumora u dojci ona može biti aksilarna, supraklavikularna ili zahvaćat limfne čvorove uz a. mammaria interna. Od manje tipičnih simptoma najčešći su upala dojke, muskulo-skeletna bol, bol u prsima i abdomenu, iscjedak iz bradavice. Kasnije u tijeku bolesti ili kod uznapredovale bolesti može doći do fiksacije za prednju prsnu stjenku zbog proširenosti prema dubokoj fasciji, zbog mogućeg hematogenog širenja tumor može dati i udaljene metastaze najčešće u pluća pa se može pojaviti dispneja i manje tipični kašalj, hematogene metastaze se još mogu pojaviti i u jetri, kostima, mozgu i nadbubrežnoj žljezdi, a od simptoma tipični su i malaksalost te ne namjerni gubitak tjelesne težine.(52)

1.5. Probir i Dijagnostika

U svrhu postavljanja dijagnoze karcinoma dojke, potrebno je obaviti niz pretraga. Prvi korak u dijagnostici, svakako je **fizikalni pregled** dojke od strane liječnika. Jedna od važnijih pretraga je **mamografija**, metoda koja se osim u dijagnostici koristi i u probiru tj. screeningu. Upravo zbog toga što se dokazalo da mamografski pregled u premenopausalnih žena značajno smanjuje rizik nastanka uznapredovalog karcinoma dojke, ACS (engl.American

Cancer Society) u smjernicama iz 2018.god. uvedena je preporuka ove pretrage u žena prosječnog rizika već u dobi od 40-54. godine i to na godišnjoj bazi. Kod žena starije dobi (>55 godina) s prosječnim rizikom nastanka karcinoma dojke preporuča se nastavak probira na godišnjoj bazi dok god je osoba dobrog zdravstvenog stanja s očekivanim trajanjem života 10 godina i više. Za osobe sa većim rizikom od uobičajenog preporučeno je jednom godišnje napraviti mamografski pregled i MR, temeljeno na specifičnim faktorima kao što je: 1.pozitivna obiteljska anamneza na BRCA1 i BRCA2 mutaciju-preporučeno je napraviti mamografiju uz MR jednom godišnje već od 30. godine života; 2. Osobe sa genetskim sindromima visokog rizika (LiFraumeni sy. , Cowden sy. , Bannayan-Riley-Ruvalcaba sy.); 3. Osobe koje su provele terapiju zračenjem toraksa zbog mb.Hodgkin između 10. i 30. godine života.(53) **Ultrazvuk** je neinvazivna dijagnostička metoda pri kojoj imamo i mogućnost color dopplera i elastografije. Preporučan je kao primaran pristup mlađim ženama (30-35god.) i trudnicama, koje se javljaju sa strukturnim abnormalnostima dojke, palpabilnom masom, aksilarnom limfadenopatijom, pozitivnom obiteljskom anamnezom BRCA mutacije i sličnim tegobama. Ultrazvuk se također preporuča ženama s intermedijarnim rizikom zbog povećanog denziteta dojki, kao dodatna metoda detekcije nakon negativnog nalaza mamografije. Kod već poznatog karcinoma dojke, ultrazvuk se koristi i za praćenje tijeka bolesti te utvrđivanje stadija bolesti. Može se koristiti i kao slikovna metoda za provođenje perkutanih intervencija na dojci te za praćenje tijeka bolesti kod pacijenata koji primaju neoadjuvantnu terapiju.(54)

Biopsija je najpouzdanija dijagnostička metoda koja pruža precizan uvid u stadij i gradus karcinoma dojke. Postoje razne vrste biopsija kao što je aspiracijska, incizijska i ekscizijska. Biopsija u lokalnoj anesteziji provodi se kod fine iglene aspiracije kad je masa jasno palpabilna, kod biopsije vođene ultrazvukom te kod biopsije vođene MR-om kad masa nije

vidljiva ultrazvučno ili mamografski. Ekscizijska biopsija, biopsija sentinel limfnog čvora ili kod lezija kože dojke – „skin-punch“ biopsija mogu se provoditi u lokalnoj ili općoj anesteziji.(55)

Magnetna rezonanca je suplementarna metoda koja se koristi pri probiru žena visokog rizika za nastanak karcinoma dojke, pri određivanju proširenosti novo otkrivenog karcinoma dojke, za detaljnu evaluaciju promjena na mjestu prethodne ekscizije tumora te u reevaluaciji karcinoma i praćenju pacijenata na neoadjuvantnoj terapiji.(56)

1.6. Prognostički i prediktivni čimbenici

Prognostički i prediktivni čimbenici imaju značajnu ulogu u određivanju vrste terapije te osjetljivosti samog tumora na terapiju. Nekoliko je vrsta ovih čimbenika; 1.Tradicionalni morfološki prognostički čimbenici; 2.Prediktivni čimbenici odgovora na terapiju; 3.Molekularni prognostički i prediktivni čimbenici(49); 4.AR kao potencijalni prediktivni čimbenici odgovora na terapiju; 5.Kalpaini i mogućnost prognostičkog i terapijskog značaja.

1.6.1. Tradicionalni morfološki prognostički čimbenici

Najvažniji jesu veličina tumora, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, tumorska nekroza, histološki tip tumora, diferenciranost tumora (gradus) i vaskularna invazija. Mlađa životna dob, ranija menopauza, veliki primarni tumor, tumorska nekroza, trostruko negativni tumor te zahvaćeni limfni čvorovi nepovoljni su prognostički faktori. Tubularni, mucinozni, medularni, lobularni ili papilarni karcinomi povezani su sa boljom prognozom i preživljenjem. Kako bi odredili stadij tumora prema kojem dalje određujemo terapiju i prognozu koristimo se TNM klasifikacijom .(Tablica 1.) (57)

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma dojke. Prema: AJCC osmo izdanje, 2012.god.

PRIMARNI TUMOR(T)	REGIONALNI LIMFNI ČVOROV(I)N)	UDALJENE METASTAZE(M)
Tx – primarni tumor se ne može odrediti T0 – nema dokaza o postojanju primarnog tumora	Nx – regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti N0 – bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	M0 – nema kliničkih ili slikovnih dokaza o udaljenim metastazama M0(i+) - nema kliničkih ili

<p>Tis – karcinom in situ Tis (DCIS) – duktalni karcinom in situ Tis (Paget) – Pagetova bolest nepovezana s invazivnim karcinomom ili DCIS T1 – tumor promjera ≤ 20 mm T1 mi – mikroinvazija ≤1mm T1a – tumor promjera >1mm do ≤5mm T1b - tumor promjera > 5mm do ≤10mm T1c – tumor promjera > 10mm do ≤20mm T2 – tumor promjera > 20mm do ≤50mm T3 – tumor promjera > 50mm T4 – tumor s direktnom ekstenzijom u stijenku prsnog koša sa zahvaćanjem kože i makroskopskim promijenama T4a – tumor s invazijom stijenke prsnog koša T4b – tumor s makroskopskim promijenama kože uključujući ulceraciju i/ili satelitne lezije i/ili edem T4c – tumor s kriterijima T4a i T4b T4d – upalni (inflamatorni) karcinom dojke</p>	<p>N1 – metastaze u pomičnim čvorovima ipsilateralne pazušne jame levela I i/ili II N1mi - mikrometastaze N2 – metastaze u limfnim čvorovima ipsilateralne aksile koji su međusobno fiksirani i/ili infiltriraju okolno tkivo levela I i/ili II; ili metastaze unutrašnjih mamarnih limfnih čvorova bez metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima N2a – metastaze u limfnim čvorovima ipsilateralne aksile levela I i/ili II koji su fiksirani i/ili infiltriraju okolno tkivo N2b – metastaze unutrašnjih mamarnih limfnih čvorova, bez metastaza u pazušnim limfnim čvorovima N3 – podijeljeno u stadije kako slijedi: N3a – metastaze u ipsilateralnim aksilarnim limfnim čvorovima levela III sa ili bez metastaza aksilarnih limfnih čvorova levela I i/ili II N3b - metastaze ipsilateralnih unutrašnjih mamarnih limfnih čvorova sa zahvaćenošću aksilarnih limfnih čvorova levela I i/ili II N3c - metastaze ipsilateralnih supraklavikularnih limfnih čvorova</p>	<p>slikovnih dokaza o udaljenim metastazama, ali u odsustvu kliničkih znakova i simptoma postoje tumorske stanice ili depoziti ≤0.2mm u cirkulirajućoj krvi, koštanoj srži ili drugim ne regionalnim nodalnim tkivima M1 – postoje udaljene metastaze bazirane na kliničkom ili slikovnom nalazu veličine >0.2mm</p>
---	--	---

Pomoću TNM klasifikacije određuje se stadij bolesti. (Tablica 2.)

Tablica 2. Stadij karcinoma dojke. Prema: Šoša T i sur. (2007) (57)

STADIJ 0	Tis N0 M0
STADIJ I	T1 N0 M0
STADIJ IIa	T0 N1 M0 T1 N1 M0 T2 N0 M0

STADIJ IIb	T2 N1 M0 T3 N0 M0
STADIJ IIIa	T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
STADIJ IIIb	T4 N0 M0 T4 N1 M0 T4 N2 M0
STADIJ IIIc	Bilo koji T N3 M0
STADIJ IV	Bilo koji T, bilo koji N M1

Gradus tumora temelji se na nekoliko čimbenika, i govori nam o diferenciranosti tumora . Što je gradus veći slabija je diferenciranost tumora te se on tada povezuje s lošijom prognozom.

Tablica 3. Gradus tumora (49)

GRADUS	1	2	3
Diferencijacija tumora	>75% tumora tvore žlijezde	10-75% tumora tvore žlijezde	<10% tumora tvore žlijezde
Nuklearni pleomorfizam	Uniformne stanice sa malim nukleusima slične normalnim epitelnim stanicama	Stanice veće od normalnih s otvorenim vezikularnim nukleusima , vidljivim nukleolima, umjerene varijabilnosti veličine i oblika stanica .	Stanice sa vezikularnim nukleusima i prominentnim nukleolima , značajne varijabilnosti veličine i oblika.
Broj mitozna	<7 mitozna na 10 vidnih polja	Od 8 do 15 mitozna na 10 vidnih polja	>16 mitozna na 10 vidnih polja

Nottinghamski prognostički indeks (NPI) jedini je prognostički indeks za karcinom dojke čija je vrijednost potvrđena retrospektivnim i prospektivnim istraživanjima.(58) NPI parametri jesu status limfnih čvorova, veličina tumora i histološki stupanj tumora. Izračun se vrši prema formuli: $NPI = 0.2 \times \text{promjer tumora (cm)} + \text{status limfnih čvorova (1-3)} + \text{histološki stupanj (1-3)}$.(58,59)

Tablica 4. 10–godišnje preživljenje i NPI. Prema: Blamey RW i sur. (2007)

PROGNOSTIČKA GRUPA	NPI	10-GODIŠNJE PREŽIVLJENJE
Odlična	2.08-2.4	96%
Dobra	2.42-3.4	93%
Umjereno dobra I	3.42-4.4	81%
Umjereno dobra II	4.42-5.4	74%
Loša	5.42-6.4	50%
Jako loša	>6.5	38%

1.6.2. Prediktivni čimbenici odgovora na terapiju

Zbog osjetljivosti tumora dojke na hormonski utjecaj, time i mogućnosti endokrine terapije, primjenjuju se lijekovi koji će inhibirati utjecaj hormona na tumorske stanice. Receptori za steroidne hormone kao što su estrogeni i progesteroni, smješteni su u staničnoj jezgri te difuzijom ili aktivnim transportom ti hormoni dolaze u jezgru tvoreći kompleks steroid-receptor, koji se veže za specifičnu promotorsku regiju regulacijskih gena na segmentu DNK. Sudjelovanjem nekih od gena reguliranih steroidnim receptorima u nadzoru staničnog rasta, dolazi do utjecaja estrogenskih receptora na ponašanje tumora i odgovor na terapiju karcinoma dojke. Pozitivnost tumora na hormonske steroidne receptore rezultira odgovorom na hormonsku terapiju u 80% bolesnica, a kod negativnih odgovor je svega 10%. Receptori za čimbenike rasta kao što je HER2/neu (eng.Hormon epidermal growth factor/neuraminidase) također koriste kao prediktivni čimbenici odgovora na terapiju. Taj transmembranski glikoprotein uključen je u kontrolu staničnog rasta, a amplifikacija gena

nađena je u 15-20% karcinoma dojke što se određuje metodama imunohistokemije te u svjetlom polju ili in situ hibridizacijom (ISH). Amplifikacija ovog transmembranskog glikoproteina povezana je s nepovoljnom prognozom. No u takvih bolesnika primjenjuju se protutijela na dio receptora za epidermalni čimbenik rasta – trastuzumab (Herceptin) koji ciljano djeluje na stanice sa amplifikacijom gena za taj receptor.(49)

1.6.3. Molekularni prognostički i prediktivni čimbenici

Temeljem tehnike genetske postrojbe (engl.microarray), karcinomi dojke svrstavaju se u prethodno opisane molekularne podtipove što je bitno zbog različitih prognoza karcinoma. Podjela ovih karcinoma temeljena je na podrijetlu stanica karcinoma (luminalnom ili bazalnom) te ekspresiji prognostičkih i prediktivnih čimbenika. Zbog učestale nedostupnosti ove metode, opće prihvaćen je i tzv. Surogatni molekularni tip tumora koji se temelji na imunohistokemijskoj ekspresiji ER, PR, HER-2 i Ki-67 proliferacijskog indeksa.(49)

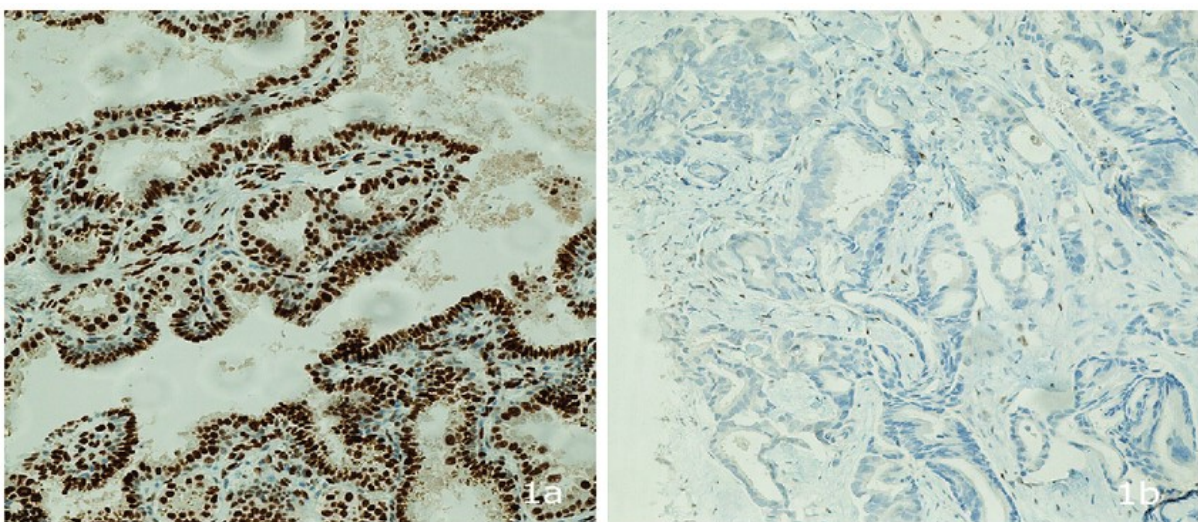
Tablica 5. Surogatni molekularni tipovi karcinoma dojke

PODTIP KARCINOMA DOJKE	IMUNOHISTOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE	INCIDENCIJA
Luminalni A	ER+, PR+, HER-2 -, Ki-67 <20%	40%
Luminalni B HER-2 negativni	ER+ , HER-2- , i najmanje jedno od: -PR negativan ili nizak (<20% +stanica) - Ki-67 visok (>20%)	10-15%
Luminalni B HER-2 pozitivni	ER+, HER-2+, Ki-67 bilo kakav, PR bilo koji	10-15%
HER-2 pozitivni	HER-2+, ER-, PR-	10-15%
Trostruko negativni	HER-2-,ER-,PR-	15-20%

1.6.4. AR kao potencijalni prediktivni čimbenik odgovora na terapiju

Podobitelj troje molekularnih receptora čine i androgeni receptori (AR), koji svoju aktivnost ostvaruju vezanjem jednog od androgenih hormona, testosterona ili

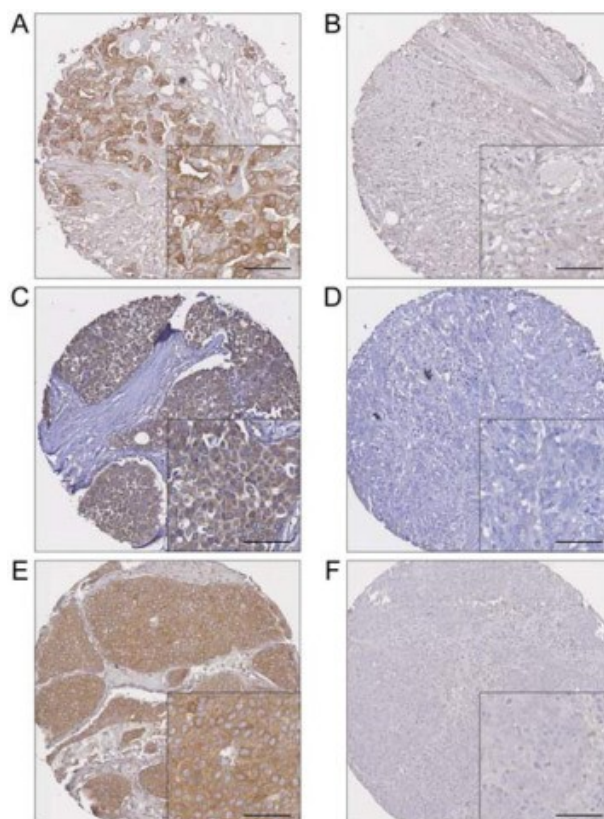
dihidrotestosterona u citoplazmi nakon čega ih translociraju u jezgru. Jedan od ciljnih gena aktivacije AR je inzulin sličan faktor rasta (IGF-IR). Nedavno je također pokazana ne genomska funkcija AR u vidu izmjene transporta iona putem proteina odgovornih za prijenos signala. Prema na animalnim uzorcima provedenim studijama, otkriveno je da AR svoju ulogu obavlja ometajući aktivnost MAPK (mitogenom aktivirane protein kinaze) i signalizaciju ER, što dalje dovodi do smanjene ekspresija IGF-IR, a time i smanjene proliferacije terminalnih pupoljaka i usporen razvoj žlijezda dojke.(66) Aktivacija AR može imati stimulatívno ali i inhibitorno djelovanje na rast tumorskih stanica, ovisno o vrsti stanične linije karcinoma dojke što je vjerojatno uvjetovano ekspresijom ER. Mehanizam inhibicije ER pozitivnog karcinoma dojke putem AR temelji se na vezivanju na ERE (element odgovora na estrogen), na mjesto estrogena te tako dovodi do inhibicije ER ciljnih gena.(67) Također je dokazana unakrsna komunikacija među AR i HER2 signalnim putevima. Navedena otkrića i bolje poznavanje ovih mehanizama od velikog su značaja poradi moguće primjene terapijskih blokada anti-AR i anti-HER2, zbog samog sinergizma zabilježenog u navedenoj kombinaciji na staničnu proliferaciju i apoptozu.



Slika 1. Prikaz imunohistokemijskog bojenja a) Karcinom dojke pozitivan na AR; b) Karcinom dojke negativan na AR (Preuzeto sa: researchgate.net)

1.6.5. Kalpaini i mogućnost prognostičkog i terapijskog značaja

Kalpainski sustav dio je intracelularnih, o kalciju ovisnih proteaza raznih funkcija među kojima su remodeliranje citoskeleta, stanično preživljavanje i apoptoza. Ovaj enzimski sustav sadrži više izoformi, no najpoznatiji su mili(m-) i mikro(μ -) kalpain te kalpstatin koji je endogeni inhibitor kalpainske aktivnosti. Imunohistokemijskom analizom otkriveno je da većina stanica, osobito agresivnih fenotipa karcinoma dojke, eksprimira faktore kalpainskog sustava.(68) Prognostički, kalpainski sustav, osobito visoke ekspresije kalpaina 1 i 2, povezan je sa faktorima kao što je to limfovaskularna invazija što nadalje ima bitnu ulogu u metastaziranju a time i prognozi samog karcinoma dojke. Nasuprot tome, aktivnost kalpstatina pruža protekciju protiv limfoinvazije blokirajući mehanizam kalpaina.(69) Stoga stoji da je visoka ekspresija kalpaina povezana s ranijim metastaziranjem u limfne čvorove i lošijim ishodom preživljenja, radi čega se upravo kalpaini smatraju potencijalnom metom u liječenju karcinoma dojke (70).



Slika 2. Prikaz visoke(A) i niske(B) ekspresije kalpaina1; visoke(C) i niske(D) ekspresije kalpaina2; visoke(E) i niske(F) ekspresije kalpstatina. (Preuzeto sa: annalsofoncology.org)

1.7. Terapijski postupci

Kod primarnih lokalnih tumora dojke koji su operabilni, terapijski pristup je *kirurški zahvat* u svrhu uklanjanja primarnog tumora i moguće metastaze aksilarnih limfnih čvorova. Ovisno o prognostičkim čimbenicima ovisi i tip kirurškog zahvata koji će se primijeniti. Tako se kod *jednostavne mastektomije* uklanja žljezdano tkivo dojke, bradavica i koža iznad prsnog mišića. Pristup u *modificiranoj radikalnoj mastektomiji* obuhvaća odstranjenje aksilarnih limfnih čvorova sa tri razine uz uklanjanje struktura kao kod jednostavne mastektomije. *Kvadrantektomija* podrazumijeva uklanjanje kvadranta odnosno dijela dojke oko tumora s pripadajućim aksilarnim limfnim čvorovima, ona predstavlja pošten zahvat te je nakon nje indicirana radioterapija. Pri planiranoj *primarnoj rekonstrukciji dojke*, izvodi se mastektomija u kojoj se odstranjuje žljezdano tkivo dojke uz poštedu kože i bradavice. Kod kirurških zahvata bitno je napraviti probir bolesnica za disekciju aksilarnih limfnih čvorova, to podrazumijeva prijeoperacijsko označavanje limfnog čvora „stražara“ (prvi drenirajući limfni čvor u aksili) koji se zatim intraoperativno uklanja te šalje na patohistološku analizu. Ukoliko je taj limfni čvor zahvaćen tumorom, tada se vrši i disekcija aksilarnih limfnih čvorova, ukoliko nije zahvaćen, aksilarni limfni čvorovi se ne uklanjaju. Još jedna od terapijskih metoda je *adjuvantna radioterapija* koja svoju primjenu nalazi nakon primarnog zbrinjavanja tumora u cilju sprječavanja ponovne pojave tumora u operirane dojke ili regionalne limfne drenaže, a indicirana je u svih bolesnica sa pozitivnim limfnim čvorovima aksile te nakon svih poštenih zahvata. Ovim načinom smanjuje se učestalost lokalnog recidiva za oko 30% i povećava se vjerojatnost izlječenja za 5-7%. Kod pacjenta sa pozitivnim nalazom hormonskih receptora primjenjuje se *adjuvantna hormonska terapija*, ovaj vid terapije

provodi se nakon adjuvantne kemoterapije i radioterapije. Svim pacijenticama sa srednjim i visokim rizikom ponovne pojave bolesti te onima sa pozitivnim aksilarnim limfnim čvorovima indicirana je *adjuvantna kemoterapija* koja se primjenjuje prije adjuvantne radioterapije i hormonske terapije. Primjenom adjuvantne kemoterapije vjerojatnost smrtnosti karcinoma dojke smanjuje se za 30%. *Adjuvantna imunoterapija* trastuzumabom primjenjuje se u pacijentica koje imaju HER-2 pozitivni karcinom veličine veće od jednog centimetra. Kemoterapija kao prvi oblik liječenja provodi se u pacijentica s lokalnim, primarno inoperabilnim tumorom, a u svrhu smanjenja primarnog tumora kako bi se on doveo u operabilno stanje. Po smanjivanju takvog lokalnog tumora kemoterapijom slijedi mastektomija s odstranjenjem regionalnih limfnih čvorova. Ukoliko kemoterapijom tumor nije doveden u operabilno stanje, primjenjuje se primarna radioterapija. Pri liječenju metastatske bolesti cilj jest maksimalno produljiti život pacijentica te osigurati adekvatnu kvalitetu života što se osim simptomatskom terapijom, provodi mnogim metodama kao što su hormonska terapija, kemoterapija, imunoterapija, angiostatička terapija i radioterapija. (57,60)

2. Ciljevi istraživanja

Glavni cilj ovog istraživanja jest analizirati ekspresiju kalpaina i AR u karcinomu dojke. Sporedni ciljevi jesu izdvojiti bioptičke uzorke karcinoma dojke, pregledati i klasificirati uzorke prema kliničko patološkim parametrima, utvrditi prognostički značaj ekspresije tumorskih markera, razmotriti postoji li mogućnost korištenja kalpaina kao potencijalnih meta odgovora na terapiju, odrediti ekspresiju kalpaina i povezanost s gradusom, proliferacijom i apoptozom te odrediti ekspresiju AR i povezanost s gradusom, proliferacijom i apoptozom.

3. Ispitanici , materijali i postupci

3.1. Ispitanici i materijali

U ovoj studiji retrospektivnom analizom sudjelovalo je 219 novodijagnosticiranih pacijentica koje su kirurški obrađene na klinici za kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka (KBC), u periodu od siječnja 2000. do prosinca 2004. godine. Patohistološke analize uzoraka napravljene su na Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Rijeka i Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci. Postavljeni su kriteriji za uključivanje u studiju, i to; dijagnoza invazivnog karcinoma dojke, dostupnost parafiniziranih uzoraka i kliničkih podataka te isključujući kriterij – primjena neoadjuvantne kemoterapije. Pacijentice su tretirane mastektomijom ili širokom lokalnom ekscizijom nakon koje je uslijedila radioterapija. Prema Nottingham Prognostic Index-u, te ovisno o ER statusu te menopauzi primjenjena je i sistemna adjuvantna terapija. Kliničko patološki podatci koji su prikupljeni iz baze podataka Zavoda za patologiju jesu dob i inicijalna dijagnoza, veličina tumora, histološki gradus, prisutnost egzulceracija i multifokalnost tumora. Također su određeni i prognostički prediktivni faktori tumora i to TNM, ER, PR, HER-2, Ki-67 te metastaze u limfne čvorove. Promatrani tumori klasificirani su u molekularne podtipove po St.Gallen klasifikaciji iz 2013.godine. Klinički stadij određen je prema AJCC/TNM stadiju (osmo izdanje). Protokol studije odobren je sa strane etičkog povjerenstva KBC-a Rijeka. Uzorci su obrađeni tehnikom genske postrojbe (engl.microarray). Blokovi tkiva uklopljeni u parafin koji su sadržavali invazivnu komponentu karcinoma rezani su na rezove debljine 4 μ m te su bojani HE tehnikom po standardnom protokolu u svrhu morfološke procjene, također su napravljeni presjeci za imunohistokemijsko bojenje.

3.2. Postupci

3.2.1. Imunohistokemijsko bojenje

Formalinom fiksirani blokovi tkiva uklopljeni u parafin koji su sadržavali invazivni karcinom rezani su na rezove debljine 4 μm , potom deparafinizirani u nadomjestku ksilena i rehidrirani standardnim postupkom. Rezovi su uronjeni u Tris-EDTA pufer (Ph 9.0) te kuhani u vodenoj kupki na 97°C tijekom 15 minuta te su na taj način akvirirani antigeni za primarna protutijela. Za kalpain 1 bojenje korištena su zečja monoklonska IgG kalpain 1 protutijela (klon EPR3323, Abcam, Cambridge, UK) u razrijeđenju 1:1000. AR bojenje određeno je koristeći mišja monoklonska IgG anti-humana AR protutijela (klon AR441, Dako Cytomation Glostrup, Danska) u razrijeđenju 1:100. Sljedeći koraci napravljeni su prema uputama proizvođača, čiji je automatski bojač korišten (DakoAutostainer Plus; DakoCytomation, Fort Collins, SAD), adekvatno koristeći DakoREAL otopine. Potom je napravljena i imunohistokemija pomoću detekcijskog uređaja EnVision Flex + detekcijskog sistema (K8000; Dako, Glostrup, Danska). Za pozitivne kontrole su se koristili tumori dojke gradusa 1 i 2, a primarna protutijela zamijenjena su fiziološkom otopinom puferiranom fosfatima te korištena kao negativne kontrole.

3.2.2. Imunohistokemijsko bodovanje

Ukoliko je zastupljeno obojenje u uzorku preko 1% kod ER tada se oni smatraju pozitivnim, kod PR se smatra pozitivnim rezultatom obojenje uzorka veće od 20% te za HER-2 pozitivan rezultat smatra se onaj koji imunohistokemijski ima više od 10% tumorskih stanica koje pokazuju difuzno membranozno obojenje intenziteta 3+ ili nižeg intenziteta 2+ ali uz potvrdu FISH metodom. Ki-67 procijenjen je kao nizak ukoliko je <20% jezgara pozitivno odnosno kao visok ukoliko je $\geq 20\%$ jezgara tumorskih stanica pozitivno. AR su pozitivni ako je nalaz pozitivnih jezgri tumorskih stanica $\geq 5\%$. Kalpain 1 je

imunohistokemijskim bojenjem procijenjivan semikvantitativnom metodom koristeći Olympus BX46 mikroskop s uvećanjem 200x, te imunohistokemijskim H rezultatom. Imunohistokemijska reakcija gradirana je na sljedeći način: nema reakcije-0, slaba reakcija-1, srednje jaka reakcija-2, jaka reakcija-3. H rezultat je izračunat umnoškom intenziteta bojenja sa površinom bojenja što je rezultiralo H rezultatom u rasponu od 0 do 300. Naknadna statistička analiza za kalpain 1 imunohistokemijski H rezultat, napravljena je koristeći se dihotomiziranim podatcima. Optimalne statističke granične vrijednosti izračunate su pomoću x-tile softvera prema recidivu pacijenata. Prema tome je generiran H rezultat granične vrijednosti 92, pacijenti su podjeljeni u dvije grupe; 1. Niska imunoreaktivnost kalpaina 1 sa H rezultatom <92 i 2. Visoka imunoreaktivnost kalpaina sa H rezultatom ≥ 92 .

3.2.3. Statistička analiza

Statistička analiza podataka provedena je koristeći MedCalc program za Windows, verzija 19.1.6 (MedCalc Statistical Software bvba, Ostende, Belgija). Razlike među kategoričkim varijablama provedene su koristeći se Fischer-ovim testom i χ^2 -testom.

Za ispitivanje korelacije kalpaina 1 i AR ekspresije korištena je Pearson korelacija. Kaplan Meier metodom procijenjivana je povezanost analiziranih podataka sa ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez bolesti. Statistički značajnim rezultatom smatra se $p < 0.05$ u svim testovima.

4. Rezultati

4.1. Kliničko patološka obilježja bolesnika

Medijan dobi prilikom dijagnoze za analizirane bolesnike bio je 65 s rasponom 31 do 88 godina. Pri čemu je 156/219 (73,9%) pacijentica bilo starije od 50 godina. Od ukupnog broja, 44 tumora (21,4%) bilo je dobro diferencirano (G1), 111 (53,9%) tumora bilo je umjereno diferencirano (G2) i 51 (24,8%) tumor bio je slabo diferenciran (G3). Tumori manji od 2 cm

bili su prisutni u 94 (45,4%) pacijenata. U kliničkom stadiju 1 bilo je ukupno 67 (33,7%) bolesnika, 67 (33,7%) bolesnika u stadiju 2, 61 (30,7%) bolesnik u stadiju 3 te 4 (2,0%) bolesnika u stadiju 4. Pozitivni aksilarni limfni čvorovi pronađeni su u 103 od 219 bolesnika (51,5%). Tumori su klasificirani kao luminalni A 116 slučajeva (52,9%), luminalni B 37 slučajeva (16,9%), luminalni B-HER-2 pozitivni 11 slučajeva (5,0%), HER-2 obogaćeni 22 slučaja (10,1%) i trostruko negativni 33 (15,1%) slučaja. U tijeku praćenja pacijenata recidivi bolesti javljaju se kod 25 njih (11,4%). Medijan mjeseci do nastanka prvih recidiva bilo je 39 i to u rasponu 2 -108 mjeseci. Kliničkim pregledom i slikovnim metodama određen je datum recidiva te je potvrđen patohistološki. Sedamdeset i osam od 205 pacijenata (37,7%) koji su u cijelosti praćeni umrlo je od primarne bolesti (karcinoma dojke). Medijan praćenja među još uvijek živim bolesnicima bio je 159 mjeseci u rasponu od 8 do 212 mjeseci.

Klinički i morfološki podaci pacijenata s invazivnim duktalnim karcinomom, kao i rezultati imunohistokemijske analize prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Kliničkopatološka obilježja bolesnica s karcinomom dojke

Kliničko patološka obilježja (N=219)

Dob	Slučajevi (%)
≤ 50 godina	55 (26.1)
>50 godina	156 (73.9)
Histološki gradus	Slučajevi (%)
1	44 (21.4)
2	111 (53.9)
3	51 (24.8)
Veličina tumora	Slučajevi (%)
<2 cm	94 (45.4)
≥2 cm	113 (54.6)
Multifokalnost	Slučajevi (%)
Nije prisutna	206 (97.2)
Prisutna	6 (2.8)
Egzulceracija	Slučajevi (%)
Nije prisutna	192 (90.6)
Prisutna	20 (9.4)

Klinički stadij bolesti	Slučajevi (%)
1	67 (33.7)
2	67 (33.7)
3	61 (30.7)
4	4 (2.0)
Status limfnih čvorova	Slučajevi (%)
Negativni	97 (48.5)
Pozitivni	103 (51.5)
Pojava recidiva/metastaza	Slučajevi (%)
Ne	186 (88.2)
Da lokalni recidiv	9 (4.3)
Da udaljena metastaza	16 (7.6)
Broj mjeseci do pojave recidiva/metastaze	
Medijan (Raspon)	39 (2 - 108)
Praćenje (mjeseci)	
Medijan (Raspon)	159 (8 – 212)
Umrle od bolesti [N (%)]	78 (37.7)

4.2. Imunohistokemijska ekspresija kalpaina 1 i AR kod karcinoma dojke

Imunohistokemijsko bojenje kalpaina 1 pokazalo je heterogeno citoplazmatsko obojenje različitog intenziteta i postotka pozitivnih tumorskih stanica, u rasponu od potpuno negativnih kroz umjereno do snažno pozitivnog obojenja. Bojenje koje je bilo nedetektibilno ili slabo smatrano je negativnim, a umjereno i snažno bojenje smatrano je pozitivnim. Prema postavljenom standardu 6 tumora (3,1%) pokazalo je potpuno negativno bojenje kalpainom 1, nisku ekspresiju kalpaina 1 pokazalo je 89 (49,6%), te je 106 (54,4%) klasificirano kao visoka ekspresija kalpaina 1. Srednja vrijednost H-rezultata za kalpain 1 iznosila je 100, u rasponu od 0 do 300. Znakom aktiviranja androgena smatrano je nuklearno bojenje AR u tumorskim stanicama. Medijan postotka AR pozitivnih jezgri tumorskih stanica bio je 1,5%, u rasponu od 0 do 100% i 94 uzorka (46,1%) su klasificirana kao AR pozitivni tumori s $\geq 5\%$ pozitivnih tumorskih stanica. Nije bilo vidljive statistički značajne povezanosti među ekspresijom kalpaina 1 i AR ($r = 0,09$, $p = 0,17$). U 80 (61,1%) slučajeva ER pozitivnih tumora detektirana je visoka ekspresija kalpaina 1 kao i u 71 (55,0%) slučajeva PR pozitivnih tumora i

u 17 (54,8%) pozitivnih HER-2 tumora. Pozitivni AR su detektirani su u 73 (52,9%) ER pozitivnih karcinoma dojke, u 70 (51,1%) PR pozitivnih te kod 17 (53,1%) HER-2 pozitivnih slučajeva. Visoka ekspresija kalpaina 1 bila je povezana sa starijom dobi ($p = 0,005$) te pozitivnim ER statusom ($p = 0,009$). Nije uočena značajna povezanost između ekspresije kalpaina 1 sa veličinom tumora ($p = 0,662$), prisutnom multifokalnošću ($p = 0,378$), prisutnom egzulceracijom ($p = 0,813$), histološkim gradusom ($p = 0,467$), prisutnosti metastaza na limfnim čvorovima ($p = 0,462$), PR statusom ($p = 0,879$), HER 2 statusom ($p = 1,00$) i Ki-67 indeksom proliferacije ($p = 0,746$). Velika je vjerojatnost da će žena s AR negativnim karcinomom dojke biti starija ($p = 0,016$), da će imati veći tumor ($p = 0,032$), viši stadij bolesti ($p = 0,026$) i da ima egzulceraciju ($p = 0,017$). Promatrana povezanost AR negativnih tumora sa slabo diferenciranim tumorima, gradusa 3 ($p = 0,055$) i sa prisutnošću metastaza na limfnim čvorovima ($p = 0,059$) nije dostigla statističku značajnost. Karcinomi koji su AR pozitivni sa većom vjerojatnošću pokazali bi i nizak Ki 67 proliferacijski indeks ($p = 0,027$) te pozitivan ER status ($p = 0,007$), a povezanost s pozitivnim PR statusom nije dostigla statistički značaj ($p = 0,052$). Ekspresija kalpaina 1 i AR pokazala je značajnu razliku među molekularnim podvrstama kod pacijenata ($p = 0,002$ i $p = 0,042$, respektivno). Značajno je bila veća učestalost ekspresije visokog kalpaina 1 u bolesnika s tumorima obogaćenim HER 2 14/18 (77,8%). Većina trostruko negativnih tumora pokazala je slabu ekspresiju kalpaina 1 20/31 (64,5%) i negativan AR 25/32 (78,1%). Između ostalog, primijetili smo da samo jedan od devet (11,1%) luminalnih B Her 2 pozitivnih tumora pokazalo visoku ekspresiju kalpaina 1. U tablici 7 sažeti su navedeni rezultati ekspresije kalpaina 1, te u tablici 8 rezultati ekspresije AR.

Tablica 7. Usporedba kliničkopatoloških prognostičkih parametara i ekspresije kalpaina 1

Značajke	Ekspresija kalpaina 1		P vrijednost
	Nisko	Visoko	
Dob (godine)	N (%)	N (%)	
≤ 50god	32 (36.4)	19 (17.9)	0.005*
>50god	56 (63.6)	87 (82.1)	
Klinički stadij			
I	27 (32.1)	30 (30.6)	0.445 [†]
II	29 (34.5)	34 (34.7)	
III	28 (33.3)	31 (31.6)	
IV	0 (0.0)	3 (3.1)	
Veličina tumora (cm) medijan (opseg)			
<2 cm	36 (40.9)	45 (44.1)	0.662*
≥2 cm	52 (59.1)	57 (55.9)	
Veličina tumora			
T1	43 (48.3)	58 (54.7)	0.658 [†]
T2	31 (34.8)	34 (32.1)	
T3	4 (4.5)	2 (1.9)	
T4	11 (12.4)	12 (11.3)	
Podtip tumora			
Luminalni A	38 (43.7)	58 (56.9)	0.002*
Luminalni B HER2 negativan	17 (19.5)	18 (17.6)	
Luminalni B HER2 pozitivni	8 (9.2)	1 (1.0)	
HER2 tip	4 (4.6)	14 (13.7)	
Trostruko negativni	20 (23.0)	11 (10.8)	
Klasifikacija			
Ne trostruko negativni	68 (77.3)	92 (89.3)	0.025*
Trostruko negativni	20 (22.7)	11 (10.7)	

Multifokalnost

Ne	88 (98.9)	102 (96.2)	0.378*
Da	1 (1.1)	4 (3.8)	

Egzulceracije

Ne	79 (88.8)	96 (90.6)	0.813*
Da	10 (11.2)	10 (9.4)	

Histološki gradus

1	16 (18.4)	25 (24.0)	0.467*
2	47 (54.0)	57 (54.8)	
3	24 (27.6)	22 (21.2)	

Status limfnih čvorova

Negativan	42 (50.0)	44 (44.4)	0.462*
Pozitivan	42 (50.0)	55 (55.6)	

ER status

Negativan	38 (42.7)	26 (24.5)	0.009*
Pozitivan	51 (57.3)	80 (75.5)	

PR status

Negativan	31 (34.8)	35 (33.0)	0.879*
Pozitivan	58 (65.2)	71 (67.0)	

HER-2 status

Negativan	74 (84.1)	89 (84.0)	1.00*
Pozitivan	14 (15.9)	17 (16.0)	

Ki-67

< 20%	62 (70.5)	75 (73.5)	0.746*
≥20%	26 (29.5)	27 (26.5)	

Tablica 8. Usporedba kliničkopatoloških prognostičkih parametara i ekspresije AR

Značajke	Ekspresija AR		P vrijednost
	Nisko	Visoko	
Dob(godine)	N(%)	N(%)	
≤ 50 god	21(19.1)	32(34.4)	0.016*
> 50 god	89(80.9)	61(65.6)	
Klinički stadij			
I	26(24.5)	36(42.4)	0.026
II	41(38.7)	25(29.4)	
III	37(34.9)	23(27.1)	
IV	2(1.9)	1(1.2)	
Veličina tumora (cm) Medijan (opseg)			
<2 cm	40(37.0)	48(52.7)	0.032*
≥2 cm	68(63.0)	43(47.3)	
Veličina tumora			
T1	47(42.7)	61(64.9)	0.003
T2	41(37.3)	26(27.7)	
T3	3(2.7)	3(3.2)	
T4	19(17.3)	4(4.3)	
Podtip tumora			
Luminalni A	47(44.3)	53(57.0)	0.043
Luminalni B HER 2 negativan	21(19.8)	19(20.4)	
Luminalni B HER 2 pozitivan	4(3.8)	5(5.4)	
HER 2 tip	9(8.5)	9(9.7)	
Trostruko negativan	20(23.0)	11(10.8)	
Klasifikacija			
Ne trostruko negativni	82(76.6)	87(92.6)	0.002*
Trostruko negativni	25(23.4)	7(7.4)	
Multifokalnost			

Ne	108(98.2)	91(96.8)	0.663*
Da	2(1.8)	3(3.2)	
Egzulceracije			
Ne	94(85.5)	90(95.7)	0.017
Da	16(14.5)	4(4.3)	
Histološki gradus			
1	21(19.3)	21(23.1)	0.055
2	54(49.5)	55(60.4)	
3	34(31.2)	15(16.5)	
Status limfnih čvorova			
Negativni	45(41.7)	47(56.0)	0.059*
Pozitivni	63(58.3)	37(44.0)	
ER status			
Negativan	45(40.9)	21(22.3)	0.007*
Pozitivan	65(59.1)	73(77.7)	
PR status			
Negativan	43(39.1)	24(25.5)	0.052*
Pozitivan	67(60.9)	70(74.5)	
HER 2 status			
Negativan	94(86.2)	77(81.9)	0.443*
Pozitivan	15(13.8)	17(18.1)	
Ki 67			
<20%	69(65.1)	74(79.6)	0.027*
≥20%	37(34.9)	19(20.4)	

4.3. Analiza preživljavanja

Ukupno preživljenje u odnosu na analizirane parametre prikazano je u tablici 9.

Molekularni podtipovi pokazali su statistički značajan utjecaj na opće preživljavanje ($p = 0,0007$). Za razliku od značajno kraće stope preživljavanja pacijenata s tumorima obogaćenim

Her-2 i luminalnim B-Her-2 pozitivnim tumorima, pacijenti s luminalnim tumorima A imaju najbolju stopu preživljavanja. Ekspresija kalpaina 1 i AR u karcinomu dojke nije bila povezana s ukupnim za bolest specifičnim preživljavanjem u ukupnoj skupini bolesnika u ispitivanju ($p = 0,81$ i $p = 0,09$, respektivno), ali kad smo analizirali trostruko negativnu podskupinu bolesnika otkrili smo da su pacijenti s niskom ekspresijom kalpaina 1 imali značajno kraću stopu preživljavanja ($p = 0,018$). Nije nađeno statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju između AR pozitivnog i AR negativnog karcinoma dojke kod skupine bolesnika s trostruko negativnim karcinomom ($p = 0,821$).

Molekularni podtipovi pokazali su statistički značajan utjecaj na preživljavanje bolesnika bez bolesti ($p < 0,0001$). Stope preživljavanja u razdoblju bez bolesti tijekom pet godina bile su značajno kraće u bolesnika s niskom ekspresijom kalpaina 1 za razliku od onih s visokom ekspresijom kalpaina 1 ($p = 0,03$). Ekspresija AR kod tumora dojke nije bila značajno povezana s preživljavanjem bez bolesti u ukupnoj skupini bolesnika koji su sudjelovali u ispitivanju ($p = 0,25$). Ekspresija kalpaina 1 i AR u karcinomu dojke nije bila povezana s preživljavanjem bez bolesti u trostruko negativnoj skupini bolesnika ($p = 0,725$ i $p = 0,293$, respektivno).

Tablica 9. Univarijatna analiza ukupnog preživljavanja kod bolesnika s karcinomom dojke

Variable		Broj pacijenata	Umrli od bolesti	% 5-godišnje preživljenje	Log-rank test (χ^2 -test) p-vrijednost
Veličina tumora	< 2 cm	91	24	85	0.001
	≥ 2 cm	111	51	62	
Dob	≤ 50 god	54	17	76	0.183
	>50god	152	60	70	
Multifokalnost	Ne	202	75	73	0.265
	Da	5	3	60	

Egzulceracija	Ne	187	61	76	< 0.0001
	Da	20	17	20	
Histološki gradus	1	44	7	94	< 0.0001
	2	110	39	75	
	3	49	29	49	
Status limfnih čvorova	Negativni	95	24	85	0.0002
	Pozitivni	100	49	60	
Estrogen	Negativan	65	31	63	0.029
	Pozitivan	142	47	78	
Progesteron	Negativan	67	31	61	0.026
	Pozitivan	140	47	78	
HER-2	Negativan	174	57	76	0.0001
	Pozitivan	31	20	40	
Kalpain-1	Nizak	88	37	65	0.81
	Visok	106	41	70	
AR	Negativni	109	47	65	0.09
	Pozitivni	94	31	78	

5. Rasprava

Brojni su poznati i nepoznati mehanizmi koji utječu na karcinogenezu te mogu utjecati i na ishod oboljelih od karcinoma dojke. Iako već postoje biomarkeri koji imaju poznatu prognostičku i prediktivnu vrijednost kao što su to ER i HER2, postoji potreba za daljnjim istraživanjem u svrhu što preciznije stratifikacije te određivanja terapijskih mogućnosti pojedinih podtipova ovog karcinoma. Jedan od novijih biomarkera, koji je član familije steroidnih receptora je i AR. Kao i u prethodnim studijama, i u ovoj je AR ekspresija predominantno lokalizirana u jezgrama.(61) Pri promatranju povezanosti kliničko patoloških varijabli i AR, u jednoj od studija AR je bio značajno eksprimiran u pacijenata sa manjim tumorom i nižim histološkim gradusom, stoga je i sama ekspresija AR povezana s povoljnim prognostičkim faktorima, no nije bilo statistički značajne povezanosti AR sa starosnom dobi,

zahvaćenosti limfnih čvorova te TNM stadijem.(62) U drugoj studiji ekspresija AR povezana je sa starijom dobi, niskim ili intermedijarnim gradusom ER i PR pozitivnim statusom ali i terapijskim modalitetima uključujući endokrinu terapiju i kemoterapiju.(61) Promatrajući iste parametre u ovoj studiji, negativan status AR vjerojatnije će biti nađen u starijoj dobi, kod većih tumora, visokog stadija bolesti i sa egzulceracijama. Pojedine varijable kao što je to nizak proliferacijski indeks Ki67 te pozitivan ER i HER2 status pokazuju veću učestalost visoke ekspresije AR, dok kod PR nije bilo statistički značajne povezanosti u ovoj studiji. Uspoređujući rezultate naše sa drugom studijom u kojoj nije nađena značajna povezanost s veličinom tumora i HER2 statusom zaključujemo da je na temelju ovih razlika potrebno provesti dodatno istraživanje koje će dati precizniji odgovor, također nema značajne povezanosti sa zahvaćenosti limfnih čvorova i taj rezultat se podudara sa promatranjima u ovoj studiji.(61) Isto tako u jednoj od studija nije nađena statistički značajna povezanost među ekspresijom AR i HER2 ili Ki67 pozitivnim statusom.(62) Imunohistokemijski AR je u navedenoj studiji značajno eksprimiran u ER, PR pozitiviteta te tumorima koji nisu trostruko negativni, te je nađena značajna povezanost AR ekspresije sa HER2 prekomjernom ekspresijom kod ER negativnog statusa.(62) U našoj studiji, kao i u prethodnima pronađeno je da statistička značajnost promatrane povezanosti negativnog nalaza AR nije dosegnuta pri prisutnosti metastaza, zahvaćenosti limfnih čvorova te slabije diferenciranim tumorima, kao i činjenica da će AR negativnog statusa sa velikom vjerojatnošću biti prisutan kod trostruko negativnih tumora. Kod ukupne skupine bolesnika koji su sudjelovali u ovoj studiji nije nađeno statistički značajne razlike u preživljenju pri ekspresiji AR, kao ni razlike u preživljenju među AR pozitivnog ili AR negativnog statusa kod skupine pacijenata sa trostruko negativnim karcinomom. Iako druge studije nalaze dokaze da tumori koji eksprimiraju AR pozitivni status imaju značajno veće ukupno preživljenje nego oni koji ne pokazuju ekspresiju AR.(61)

Kalpainski sustav ima značajnu ulogu u mnogim aspektima progresije karcinoma uključujući migraciju i preživljenje stanica.(63) U odnosu na kliničkopatološke parametre u ovoj studiji, ekspresija kalpaina 1 povezana je sa starijom dobi, pozitivnim ER i PR statusom te većom učestalošću ekspresije kod tumora obogaćenih HER2. Međutim u jednoj od studija pronađeno da je ekspresija kalpaina 1 povezana s niskim gradusom tumora, negativnim ER statusom te pozitivnim PR statusom, kao i sa trostruko negativnim tumorima.(64) Isto kao i u našoj studiji nije nađena povezanost ekspresije kalpaina 1 sa statusom zahvaćenosti limfnih čvorova, veličinom tumora i metastazama, no kod povišene ekspresije kalpaina 1 nađena je povezanost sa tumorima pozitivnog PR statusa. U navedenoj studiji uočena je i povezanost ekspresije kalpaina 1 sa kalpstatinom, no ne i sa kalpainom 2.(65) Studija koju smo proveli ne pokazuje ni značajnu povezanost među kalpainom 1 i gradusom, metastazama, egzulceracijama, multifokalnošću te PR, HER2 i Ki67 statusom. Iako je ukupna stopa preživljavanja neovisno o ispitivanim parametrima bila veća kod pacijenata sa Luminalnim A podtipom, ekspresija kalpaina 1 nije bila statistički značajno povezana sa ukupnim za bolest specifičnim preživljenjem, no analizom skupine pacijenata sa trostruko negativnim karcinomom otkriveno je da pacijenti sa sniženom ekspresijom kalpaina 1 imaju značajno sniženu stopu preživljenja. Stopa preživljenja u razdoblju remisije tijekom pet godina bila je značajno kraća u bolesnika sa sniženom ekspresijom kalpaina 1. Kao i u našoj studiji, ni druge studije nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa za bolest specifičnim preživljenjem, no nije dosegnuta ni povezanost sa intervalom remisije u kohorti ispitivanih pacijenata, a pokazan je i negativan ishod kod pacijenata sa niskom razinom ekspresije kalpaina 1.(64,65) Ovakvi rezultati ukazuju da sustav kalpaina igra znatnu ulogu u različitim stadijima progresije karcinoma dojke te odgovora na terapiju.

6.Zaključak

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na povezanost određenih kliničko patoloških parametara sa povišenom ekspresijom AR. Stoga je veća vjerojatnost da će pacijentica sa visokom ekspresijom AR imati tumor manje veličine, nižeg stadija, bez zahvaćenosti limfnih čvorova, metastaza i egzulceracija. Iako preživljenje specifično za bolest nije doseglo statističku značajnost, ovakvo razmatranje upućuje na važnost AR kao potencijalnog biomarkera u prognozi karcinoma dojke. Pri visokoj ekspresiji kalpaina 1 utvrđeno je povoljnije preživljenje kod pacijenata sa određenim podtipom tumora kao što je luminalni A podtip i trostruko negativni, kao i duža stopa preživljenja u razdoblju remisije tijekom pet godina. Takav rezultat također pruža specifičniji prognostički i prediktivni odgovor te može naći svoju primjenu u budućoj svakodnevnoj kliničkoj praksi no isto tako može koristiti kao terapijska meta za određene podtipove tumora.

7.Sažetak

Karcinom dojke među najčešćim je karcinomima u populaciji žena diljem svijeta od kojeg obolijeva četvrtina žena novooboljelih od raka, te jedan od najvažnijih uzroka smrti. Prema objavljenim studijama incidencija karcinoma dojke varira prema rasi i etničkom porijeklu te je češći u razvijenim zemljama. Cilj ovog istraživanja jest analizirati ekspresiju kalpaina i AR u karcinomu dojke, utvrditi prognostički značaj ekspresije tumorskih markera, razmotriti postoji li mogućnost korištenja AR i kalpaina kao potencijalnih meta odgovora na terapiju. U studiji je sudjelovalo 219 novodijagnosticiranih pacijentica u periodu od siječnja 2000. do prosinca 2004. godine. Kliničko patološki podatci prikupljeni su pomoću baze podataka Zavoda za Patologiju. Medijan dobi prilikom dijagnoze bio je 65 godina. Uzorci su obrađeni tehnikom genske postrojbe (engl.microarray). Blokovi tkiva uklopljeni u parafin koji su sadržavali invazivnu komponentu karcinoma rezani su na rezove debljine 4 μ m te su

bojani HE tehnikom po standardnom protokolu u svrhu morfološke procjene, također su napravljeni presjeci za imunohistokemijsko bojenje. Statistička analiza podataka provedena je koristeći MedCalc program za Windows, verzija 19.1.6 (MedCalc Statistical Software bvba, Ostende, Belgija). Za ispitivanje korelacije kalpaina 1 i AR ekspresije korištena je Pearson korelacija. Utvrđena je povezanost određenih kliničko patoloških parametara sa povišenom ekspresijom AR i kalpaina 1, povoljnije preživljenje kod pacijenata sa određenim podtipom tumora, kao i duža stopa preživljenja u razdoblju remisije tijekom pet godina. Takav rezultat može naći svoju primjenu u budućoj svakodnevnoj kliničkoj praksi no isto tako može koristiti kao terapijska meta za određene podtipove tumora.

Ključne riječi: Androgeni receptori, kalpain 1, karcinom dojke

8. Summary

Breast cancer is among the most common cancers in the population of women around the world, affecting a quarter of women newly diagnosed with cancer, and one of the most important causes of death. According to published studies, the incidence of breast cancer varies by race and ethnicity and is more common in developed countries. The aim of this study is to analyze the expression of calpain 1 and AR in breast cancer, to determine the prognostic significance of the expression of tumor markers, to consider whether there is a possibility of using AR and calpain 1 as a potential target response to therapy. The study involved 219 newly diagnosed patients between January 2000. and December 2004. Clinically pathological data were collected using the database of the Department of Pathology. The median age at diagnosis was 65 years. The samples were processed using the microarray method. Tissue blocks embedded in paraffin containing an invasive component of cancer were cut into 4 μm thick sections and stained with HE technique according to a

standard protocol for the purpose of morphological evaluation, and sections for immunohistochemical staining were also made. Statistical analysis of the data was performed using MedCalc program for Windows, version 19.1.6 (MedCalc Statistical Software bvba, Ostend, Belgium). The Pearson correlation was used to examine the correlation of calpain 1 and AR expression. The association of certain clinically pathological parameters with increased expression of AR and calpain 1, more favorable survival in patients with a certain tumor subtype, as well as a longer survival rate in the remission period of five years were found. Such a result can find its application in future everyday clinical practice but can also be used as a therapeutic target for certain tumor subtypes.

Key words: Androgen receptors, calpain 1, breast cancer

9.Literatura

- 1.Zhore Momenimovahed, Hamid Salehinija . Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer int he world. Breast Cancer-Targets and Therapy. Volume April 2019:11, 151-164. Dostupno na: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
2. Rudan, Igor; Rudan, Nikola; Strnad, Marija; Kolarić, Krsto. The Causes of Breast Cancer Incidence Growth in Croatia: Part I. // Collegium Antropologicum, 18 (1994), 2; 291-299 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni). Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/148723?rad=148723>
3. iarc.fr, Cancer incidence and mortality statistics worldwide.Globocan 2018. Dostupno na: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
4. hzjz.hr . Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke. Objavljeno 28. Rujna 2018. Dostupno na:<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/nacionalni-program-ranog-otkrivanja-raka-dojke/>

5. E.Vrdoljak, I.Belac Lovasić, Z.Kusić, D.Gugić, A.Juretić. Klinička onkologija. 3.izdanje. Zagreb, Medicinska naklada. 2018.
6. who.int .The global cancer observatory; Croatia ; Incidence, Mortality and prevalence by cancer site. Objavljeno : Svibanj 2019. Dostupno na:<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/191-croatia-fact-sheets.pdf>
7. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors (2012). Diseases of the breast, 4th edition. Philadelphia (PA), USA: Lippincott Williams & Wilkins.
8. Stuckey A (2011). Breast cancer: epidemiology and risk factors. Clin Obstet Gynecol. 54(1):96– 102. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1097/GRF.0b013e3182080056> PMID:21278508
- 9.Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O’Meara ES, et al. (2012). Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med. 156(9):635–48. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-156-9-201205010-00006>
10. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, et al.; International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2015). Breast-cancer screening–viewpoint of the IARC Working Group. N Engl J Med. 372(24):2353–8. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMSr1504363> PMID:26039523
11. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol. 13(11):1141–51. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70425-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70425-4) PMID:23084519
- 12.Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, et al.; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer–collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515

- women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 87(11):1234–45. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6600596> PMID:12439712
13. McPherson K, Steel CM, Dixon JM (2000). ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 321(7261):624–8. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.321.7261.624> PMID:10977847
14. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G (2006). Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res*. 8(4):R43. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1186/bcr1525> PMID:16859501
15. Rosner B, Colditz GA (1996). Nurses' Health Study: log-incidence mathematical model of breast cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*. 88(6):359–64. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/88.6.359> PMID:8609645
16. Colditz GA (2005). Epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14(4):768–72. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0157> PMID:15824141
17. Lee SH, Akuete K, Fulton J, Chelmow D, Chung MA, Cady B (2003). An increased risk of breast cancer after delayed first parity. *Am J Surg*. 186(4):409–12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00272-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00272-1)
18. Parkin DM, Fernández LMG (2006). Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. *Breast J*. 12(S1):S70–80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1075-122X.2006.00205.x> PMID:16430400
19. Zhou Y, Chen J, Li Q, Huang W, Lan H, Jiang H (2015). Association between breastfeeding and breast cancer risk: evidence from a meta-analysis. *Breastfeed Med*. 10(3):175–82. <http://dx.doi.org/10.1089/bfm.2014.0141> PMID:25785349

20. Phipps AI, Malone KE, Porter PL, Daling JR, Li CI (2008). Reproductive and hormonal risk factors for postmenopausal luminal, HER-2-overexpressing, and triple-negative breast cancer. *Cancer*. 113(7):1521–6. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23786> PMID:18726992
21. Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2009). A review of human carcinogens—Part A: pharmaceuticals. *Lancet Oncol*. 10(1):13–4. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70286-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70286-9) PMID:19115512
22. IARC (2012). Pharmaceuticals. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 100A:1–437. PMID:23189749. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/index.php>.
23. Iodice S, Barile M, Rotmensz N, Feroce I, Bonanni B, Radice P, et al. (2010). Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 46(12):2275–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.04.018> PMID:20537530
24. Friebel TM, Domchek SM, Rebbeck TR (2014). Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 106(6):dju091. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dju091> PMID:24824314
25. McTiernan A, Martin CF, Peck JD, Aragaki AK, Chlebowski RT, Pisano ED, et al.; Women’s Health Initiative Mammogram Density Study Investigators (2005). Estrogen-plus-progestin use and mammographic density in postmenopausal women: Women’s Health Initiative randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 97(18):1366–76. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/dji279> PMID:16174858
26. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V; Million Women Study Collaborators (2012). Comparison of the effects of genetic and environmental risk factors on in situ and invasive

ductal breast cancer. *Int J Cancer*. 131(4):930–7. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26460>

PMID:21952983

27. Nichols HB, Berrington de González A, Lacey JV Jr, Rosenberg PS, Anderson WF (2011).

Declining incidence of contralateral breast cancer in the United States from 1975 to 2006. *J*

Clin Oncol. 29(12):1564–9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.32.7395> PMID:21402610

28. Dupont WD, Page DL (1985). Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med*. 312(3):146–51.

<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198501173120303> PMID:3965932

29. Pharoah PDP, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BAJ (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 71(5):800–9.

[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970529\)71:53.O.CO;2-B](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970529)71:53.O.CO;2-B) PMID:9180149

30. Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, Spicer DV, Van Den Berg D, Bernstein L, et al. (2011).

Characteristics of triple-negative breast cancer in patients with a BRCA1 mutation: results from a population-based study of young women. *J Clin Oncol*. 29(33):4373–80.

PMID:22010008

31. Mavaddat N, Peock S, Frost D, Ellis S, Platte R, Fineberg E, et al.; EMBRACE (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE.

J Natl Cancer Inst. 105(11):812–22. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djt095> PMID:23628597

32. Malone KE, Daling JR, Doody DR, Hsu L, Bernstein L, Coates RJ, et al. (2006). Prevalence and predictors of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of breast cancer in white and black American women ages 35 to 64 years. *Cancer Res*. 66(16):8297–308.

<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0503> PMID:16912212

34. McCormack VA, dos Santos Silva I (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(6):1159–69. <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0034> PMID:16775176
33. Gram IT, Bremnes Y, Ursin G, Maskarinec G, Bjurstam N, Lund E (2005). Percentage density, Wolfe's and Tabár's mammographic patterns: agreement and association with risk factors for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7(5):R854–61. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr1308> PMID:16168132
35. IARC (2012). Radiation. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 100D:1–437. PMID:23189752. Dostupno na: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100D/index.php>.
36. Clemons M, Loijens L, Goss P (2000). Breast cancer risk following irradiation for Hodgkin's disease. *Cancer Treat Rev.* 26(4):291–302. <http://dx.doi.org/10.1053/ctrv.2000.0174> PMID:10913384
37. Singletary SE (2003). Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg.* 237(4):474–82. <http://dx.doi.org/10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87> PMID:12677142
38. WCRF/AICR (2007). Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Dostupno na: http://www.dietandcancerreport.org/cancer_resource_center/downloads/Second_Expert_Report_full.pdf 13
39. Gaudet MM, Gapstur SM, Sun J, Diver WR, Hannan LM, Thun MJ (2013). Active smoking and breast cancer risk: original cohort data and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 105(8):515–25. PMID:23449445

40. Ceschi M, Gutzwiller F, Moch H, Eichholzer M, Probst-Hensch NM (2007). Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Swiss Med Wkly.* 137(3-4):50–6.
PMID:17299670
41. Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A (2009). Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status—a meta-analysis. *Int J Cancer.* 124(3):698–712. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23943> PMID:18988226
42. Jung S, Spiegelman D, Baglietto L, Bernstein L, Boggs DA, van den Brandt PA, et al. (2013). Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status. *J Natl Cancer Inst.* 105(3):219–36. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djs635> PMID:23349252
43. Boyd NF, Stone J, Vogt KN, Connelly BS, Martin LJ, Minkin S (2003). Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br J Cancer.* 89(9):1672–85. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6601314> PMID:14583769
44. Brennan SF, Cantwell MM, Cardwell CR, Velentzis LS, Woodside JV (2010). Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 91(5):1294–302. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.28796> PMID:20219961
45. Sieri S, Krogh V, Ferrari P, Berrino F, Pala V, Thiébaud AC, et al. (2008). Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr.* 88(5):1304–12. PMID:18996867
46. Stefani ED, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Correa P, Boffetta P, Aune D, et al. (2011). Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a factor analysis in Uruguay. *Asian Pac J Cancer Prev.* 12(3):753–9. PMID:21627378
47. Torres-Sánchez L, Galván-Portillo M, Lewis S, Gómez-Dantés H, López-Carrillo L (2009). [Diet and breast cancer in Latin-America]. *Salud Publica Mex.* 51(2S2):s181–90. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342009000800008> PMID:19967273

48. Jaffar Maki (2015.) Diversity of breast carcinoma : Hystological subtypes and clinical relevance. Clin Med Insights Pathol. 2015; 8: 23–31. Published online 2015 Dec 21. doi: 10.4137/CPath.S31563. Dostupno na:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689326/>
49. Damjanov I, Seiwert S, Jukić S, Nola M (2014.) Patologija. 4.izdanje, Medicinska naklada ,Zagreb.
50. Sinn HP, Kreipe H (2013.). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. Breast Care (Basel). 2013 May; 8(2): 149–154. Published online 2013 Apr 26. doi: 10.1159/000350774 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3683948/>
51. Koboldt, D., Fulton, R., McLellan, M. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 490, 61–70 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11412>
52. Minjung Monica Koo, Christian von Wagner, Gary A. Abel, Sean McPhail, Greg P. Rubin, and Georgios Lyratzopoulos (2017.) Typical and atypical presenting symptoms of breast cancer and their associations with diagnostic intervals: Evidence from a national audit of cancer diagnosis. PMID: 28549339 Cancer Epidemiol. 2017 Jun; 48: 140–146. doi: 10.1016/j.canep.2017.04.010
53. Robert A. Smith et al. Cancer screening in the United States, 2018: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening ;CancerJournalForClinicians ; <https://doi.org/10.3322/caac.21446>
54. Andrew Ewans et al. Breast ultrasound: recommendations for information to women and referring physicians by the European Society of Breast Imaging ; Published online 2018 Aug 9. doi: 10.1007/s13244-018-0636-z

55. [hopkinsmedicine.com.Breast biopsy](https://www.hopkinsmedicine.com/Breast%20biopsy). Dostupno na:
https://www.hopkinsmedicine.org/breast_center/treatments_services/breast_cancer_diagnosis/breast_biopsy.html
56. [radiologyinfo.com](https://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=breastmr) , Magnetic resonance Imaging – Breast . Dostupno na:
<https://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=breastmr>
57. Šoša T, Sutlić Z, Stanec Z, Tonković I, i sur. Kirurgija. 1.izd. Zagreb: Naklada Ijevak; 2007. str.886-889
58. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AHS, Macmillan RD, Morgan DAL, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer*. 2007;43(10):1548–55.
59. Aydiner A, Igci A, Soran A. *Breast Disease Diagnosis and Pathology*. Springer US; 2016.
60. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. *Klinička onkologija*. 1.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
61. Sultana A., Idres R., Naqvi Z.A., Azam I., Khan S., Siddiqui A.A., Lalani E-N.(2014.) Expression of the Androgen Receptor, pAkt and pPTEN in Breast Cancer and their Potential in Prognostication. *Transl Oncol*. 2014 Jun; 7(3): 355–362. Published online 2014 May 13. doi: 10.1016/j.tranon.2014.04.004
- 62.S.Park, J. Koo, H. S. Park, J.H. Kim, S.Y. Choi, J. H. Lee, B.-W. Park & K. S. Lee. (2009.) Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Annals of Oncology* 21:488-492,2010. Doi: 10.1093/annonc/mdp510
63. Storr SJ, Carragher NO, Frame MC et al. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 364–374
64. S. J. Storr, K. W. Lee , C. M. Woolston, S. Safuan, A. R. Green, R. D. Macmillan, A. Benhasouna, T. Parr, I. O. Ellis & S. G. Martin.(2012.) Calpain system protein expression in

basal-like and triple-negative invasive breast cancer . *Annals of Oncology* 23: 2289–2296, 2012 doi:10.1093/annonc/mds176 Published online 27 June 2012

65. Storr SJ, Zhang S, Perren T, Lansdown M, Fatayer H, Sharma N, Gahlaut R, Shaaban A, Martin SG. The calpain system is associated with survival of breast cancer patients with large but operable inflammatory and non-inflammatory tumours treated with neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):47927-47937.doi:10.18632/oncotarget.10066.

66. Grattarola R. [Increased androgenic activity in the etiology of cancer of the breast]. *Cancro* 1970; 23: 147-151.

67. Pietri E, Conteduca V, Andreis D et al. Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: R485-498.

68. Croall DE, DeMartino GN: Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 1991;71:813-847

69. Shiba E, Kim S, Fujitani M, et al: Possible involvement of calpain in the growth of estrogen receptor positive breast cancer cells. *Anticancer Res* 1996; 16:773–777.

70. Storr SJ, Mohammed RA, Woolston CM, et al: Calpastatin is associated with lymphovascular invasion in breast cancer. *Breast* 2011;20:413–418.

10.Životopis

Josipa Ban rođena je 09.siječnja 1993.godine u Rijeci. Završila osnovnu školu „Nikola Tesla“ te paralelno i osnovnu glazbenu školu „Ivan Matetić Ronjgov“ gdje stječe obrazovanje na instrumentu klavir. Djeluje i u kick-boxing klubu „Viktorija“ za koji osvaja 3.mj. u svojoj kategoriji u RH. Paralelno uči tri jezika i to engleski i talijanski u školi jezika „Linguae“ te francuski u sklopu Francuske alijanse u Rijeci. Srednjoškolsko obrazovanje nastavlja u Medicinskoj školi u Rijeci stječući time zvanje fizioterapeuta. Fakultetsko obrazovanje započinje 2011.godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Banja Luci, te se 2013.godine vraća u rodni grad nastavljajući obrazovanje na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom posljednje tri godine studija sudjeluje na brojnim stručnim i studentskim kongresima. Aktivno se uključuje u projekte i radove na Katedri za opću patologiju i patološku anatomiju.