

# DIJAGNOSTIČKA/PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST CITOLOŠKOG SUSTAVA GRADIRANJA PO ROBINSONU I MORFOMETRIJSKA OBJEKTIVIZACIJA U ODREĐIVANJU GRADUSA INVAZIVNOG KARCINOMA DOJKE

---

Prvulović, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:277497>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



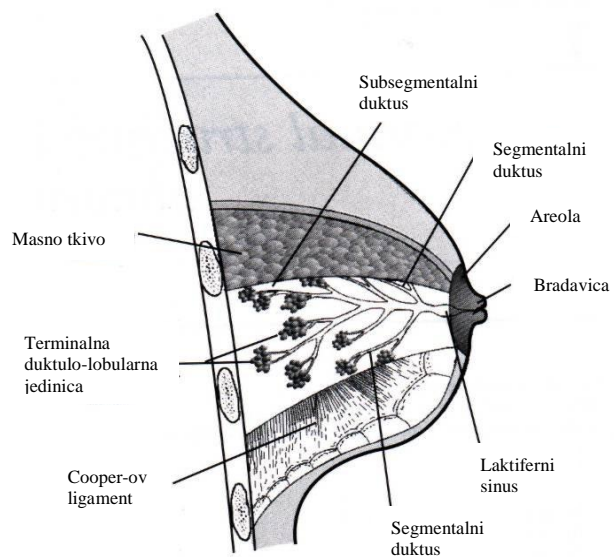
# 1. UVOD

## 1.1. Anatomija i histologija dojke

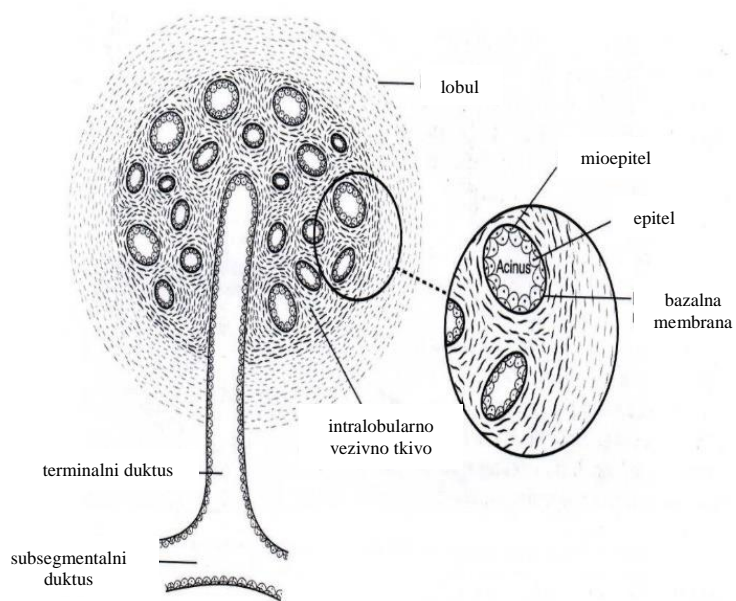
Dojka je modificirana žlijezda znojnica kože koja u žena stvara kompleksnu funkcionalnu jedinicu, a kod muškarca ostaje rudimentarni organ. Ne postoji razlika između dojke muškog i ženskog djeteta. U djevojčice se dojka počinje u pubertetu brže razvijati, a normalnu veličinu doseže najčešće u dobi između šesnaeste i devetnaeste godine. Razvijena dojka žene smještena je na postraničnom dijelu prednje strane prsnog koša i zauzima područje između drugog i sedmog rebra te između lateralnog ruba prsne kosti i srednje pazušne linije.

Dojka je obložena kožom i započinje korijenom dojke, radix mammae, koji se nastavlja u trup dojke, corpus mammae. Na vrhu dojke nalazi se bradavica dojke, papilla mammae. Oko bradavice se nalazi kružno područje pigmentirane kože, areola mammae. Dojku oblikuje žljezdano tkivo mliječne žlijezde, glandula mammaria, uloženo u vezivnu stromu i obloženo masnim tkivom (1). Osnovna morfološko – funkcionalna jedinica dojke je režnjić, lobul, koji je građen od dva temeljna dijela: terminalne duktulo-lobularne jedinice, koja je funkcionalno mjesto stvaranja mlijeka i granajućeg sustava kanalića (Slika 1.1). Cijeli duktulo-lobularni epitelni sustav dojke prekriven je dvoslojnim specijaliziranim epitelom: unutarnji epitel sa sekretornom i absorptivnom funkcijom (epitel u užem smislu) i vanjski sloj mioepitelnih stanica (Slika 1.2). Mjesto nastanka fibrocistične promjene,

epitelne proliferacije i većine karcinoma je upravo terminalno duktulo-lobularna jedinica, a ne sustav velikih kanalića, u kojem nastaje većina solitarnih papiloma (2).



Slika 1.1. Anatomija dojke – prilagođeno iz (3)



Slika 1.2. Histološki prikaz duktulo-lobularne jedinice – prilagođeno iz (3)

## 1.2. Karcinom dojke

### 1.2.1. Definicija, epidemiologija, etiologija

Karcinom dojke najčešći je zloćudni tumor u žena gotovo u svim dijelovima svijeta, koji nastaje kad normalne žljezdane stanice dojke promijene svoja svojstva te počnu nekontrolirano rasti, umnožavati se i uništavati okolno zdravo tkivo (4).

U 2012. godini dijagnosticirano je 1,7 milijuna novooboljelih žena s rakom dojke i evidentirano 6,3 milijuna živih žena kojima je rak dojke dijagnosticiran u prijašnjih pet godina (prevalencija). Procjenjuje se da je od 2008. godine pojavnost raka dojke porasla za više od 20%, dok je smrtnost porasla za 14%. Rak je dojke prema tome najčešći uzrok smrti od raka u žena (522.000 smrtnih slučajeva u 2012.) te najčešće dijagnosticiran rak među ženama u 140 od 184 zemlje u svijetu.

Pojavnost ove bolesti je u porastu u većini regija, ali postoje velike nejednakosti između bogatih i siromašnih zemalja. Stopa je pojavnosti i dalje najviša u razvijenim regijama, ali je smrtnost relativno mnogo veća u manje razvijenim zemljama. Razlog tomu je nemogućnost ranog otkrivanja i loše terapijske mogućnosti u siromašnijim područjima. Na primjer, u zapadnoj Europi, stopa pojavnosti raka dojke iznosi više od 90 novih slučajeva na 100.000 žena godišnje, u usporedbi s 30 novooboljelih na 100.000 godišnje u istočnoj Africi. Nasuprot tome, stopa smrtnosti od raka dojke u ove dvije regije gotovo je identična i iznosi 15 na 100 000, što jasno upućuje na postavljanje dijagnoze u kasnijim stadijima bolesti i kraće preživljenje žena u istočnoj Africi (5).

U Republici je Hrvatskoj 2012. godine bilo registrirano 2227 novooboljelih žena, dok je iste godine od raka dojke u Hrvatskoj umrla 1033 žena (6). Pojavnost raka dojke u Hrvatskoj je u porastu, a otkriću novih slučajeva znatno je pridonijelo i uvođenje Nacionalnog programa probira ranog otkrivanja raka dojke. Vlada Republike Hrvatske je 29. lipnja 2006. godine usvojila Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke – mamografski probir (7). Ciljevi Nacionalnog programa probira su smanjenje mortaliteta od raka dojke za 25% u pet godina nakon uvođenja programa, otkrivanje raka dojke u većem postotku u početnom stadiju umjesto u uznapredovalom stadiju bolesti te posljedično

smanjenje troškova liječenja i poboljšanje kvalitete života bolesnica s karcinomom dojke (7).

Zahvaljujući brojnim istraživanjima danas znamo da etiologija karcinoma dojke uključuje kompleksno međudjelovanje egzogenih i endogenih čimbenika, uključujući i genetske, nasljedne čimbenike (8, 9).

**Nasljedni čimbenici.** Nasljedna sklonost karcinomu dojke predmet je mnogobrojnih istraživanja unazad više od dva desetljeća. Dva gena odgovorna za nasljedni rak dojke otkrivena 1994. i 1995. godine i nazvana Breast Cancer 1 i Breast Cancer 2, odnosno BRCA 1 i BRCA 2, pružila su nam dokaze na molekularnoj osnovi temeljem kojih možemo utvrditi visokorizične pacijentice (10, 11).

U normalnim stanicama BRCA 1 i BRCA 2 geni sprječavaju nekontroliran rast i umnožavanje stanica. U žena u kojih je dokazana mutacija BRCA 1 gena rizik za nastanak raka dojke iznosi 55 do 65%. Kod dokazane mutacije BRCA 2 gena rizik je nešto manji i iznosi oko 45%. Karcinom dojke povezan s mutacijom navedenih gena nastaje u mlađih žena i češće zahvaća obje dojke. Također, žene s ovom mutacijom imaju povećan rizik za razvoj drugih karcinoma, posebice karcinoma jajnika (12, 13).

U Tablici 1.1. i 1.2. prikazani su nasljedni oblici karcinoma, odnosno nasljedni poremećaji gena za popravak DNA što se očituje pojavom jednog ili više tumora u određenoj životnoj dobi. U prikazanim nasljednim sindromima pojavljuje se karcinom dojke te vjerojatnost postojanja mutacije u genu BRCA-1 obzirom na starost oboljele osobe i obiteljsku anamnezu. Još uvijek ne postoje podatci koji bi sa sigurnošću ukazivali na prognostički značaj nasljedne mutacije u osoba oboljelih od karcinoma dojke. Broj objavljenih radova je mali, analizom je obuhvaćen relativno mali broj tumora pa stoga nije iznenađujuće što su rezultati često proturječni (14, 15).

Zbog anamneze ili već dokazane mutacije u genima BRCA 1 i BRCA 2 članice obitelji pacijentica oboljelih od karcinoma dojke moraju biti podvrgnute strožem režimu kliničkog praćenja.

**Tablica 1.1.** Nasljedni oblici karcinoma u kojima se pojavljuje karcinom dojke (15)

Gen	Smještaj na kromosomu	Učestalost	Probojnost	Sijelo tumora	Sijelo združenih zloćudnih i popratnih bolesti
BRCA-1	17q21	niska	visoka	dojka, jajnik	kolon, prostata
BRCA-2	13q12-13	niska	visoka	dojka, jajnik	kolon, prostata, gušterača, muška dojka
? BRCA-3	8p12-22	nepoznato	nepoznato	dojka	nepoznato
p53(Li Fraumeni)	17p13.1	niska	visoka	sarkom, dojka, mozak, leukoze	najvjerojatnije melanom
gen Cowdenove bolesti	10q22-23	vrlo niska	visoka	dojka	štitnjača, hamartomi kože, dojka, sluznica usne šupljine
gen za androgeni receptor	Xq11.2-12	vrlo niska	nepoznato	muška dojka	nepoznato
gen ataksije teleangiektazije (ATM)	11q22-23	visoka	niska	limfoproliferativne bolesti	teleangiektazija, imunodeficijencija, karcinom dojke
H-RAS1 /VNTR	11p15.5	visoka	niska	nepoznato	karcinom dojke, završnog crijeva i mokraćnog mjehura

**Tablica 1.2.** Vjerojatnost postojanja mutacije u genu BRCA 1 s obzirom na starost oboljele osobe i obiteljsku anamnezu (15)

Oboljeli u obitelji i starost oboljelih u vrijeme postavljanja dijagnoze	Vjerojatnost (%) postojanja mutacije u genu BRCA-1
Jedini oboljeli član u obitelji	
Karcinom dojke < 30	12
Karcinom dojke 30-39	6
Karcinom dojke 40-49	3
Karcinom jajnika < 50	7
Sestre	
Dvije s karcinomom dojke < 40	37
Dvije s karcinomom dojke 40-49	20
Karcinom dojke < 50, karcinom jajnika < 50	46
Dvije s karcinomom jajnika < 50	61
Obitelji	
tri oboljele od karcinoma dojke < 50	40
dvije ili više oboljele od karcinoma dojke i jedna ili više oboljela od karcinoma jajnika	82
dvije ili više oboljele od karcinoma dojke i dvije ili više oboljele od karcinoma jajnika	92

Osim čimbenika nasljeđa postoji još nekoliko dokazanih čimbenika rizika koji doprinose nastanku ove bolesti.

**Spol.** Karcinom dojke je 100 puta učestaliji kod žena nego kod muškaraca (5).

**Dob.** Pojava karcinoma dojke raste sa životnom dobi pa je pojavnost najveća između 50 i 65 godine života (5).

**Reproduktivna anamneza.** Reproductivna anamneza usko je povezana s rizikom nastanka raka dojke. Bolest se učestalije pojavljuje među ženama koje su imale ranu menarhu (prije 11. godine) i kasnu menopauzu (poslije 54. godine) (16, 17).



Povećani rizik također imaju žene koje nisu rađale ili su imale prvu trudnoću u kasnijim godinama (nakon 30. godine). Svaki porod, dakle ne samo prva trudnoća, prije 30.-te godine života ima zaštitnu ulogu (18).

Po pitanju pobačaja i dalje postoje kontroverzna mišljenja. Neka istraživanja su pokazala da rizik raste s brojem induciranih pobačaja. Slično je s protektivnim efektom laktacije kojeg se nekoć smatralo vrlo snažnim zaštitnim čimbenikom, ali se pokazalo da je njegov utjecaj ograničen na kumulativni zbroj; za protektivnu ulogu najvjerojatnije je potreban ukupan period laktacije od najmanje 2 godine (19).

**Endogeni hormoni.** Velik broj epidemioloških studija pokazuje važnu ulogu spolnih hormona (androgeni, estrogen i progesteron) u razvoju raka dojke. Pojavnost raka dojke raste u periodu prije menopauze (otprilike 8% godišnje) a u menopauzi pada (otprilike 2% godišnje) što se povezuje sa smanjenom funkcijom jajnika i posljedičnom nižom produkcijom estrogena i progesterona (20). Povišene koncentracije prolaktina povezane su s povećanim rizikom nastanka raka dojke u pre- i u postmenopauzi te su značajno povezane s estrogen pozitivnim rakom dojke (21).

**Egzogeni hormoni.** Ranije se vjerovalo da oralna kontracepcija povećava rizik od raka dojke obzirom da u sebi sadrži estrogen i progestin (sintetički oblik progesterona). Podatci dobiveni iz više od 50 studija (53 000 slučajeva) pružili su pouzdane dokaze da se rizik od nastanka raka dojke tek neznatno povećava čak i u žena koje koriste oralnu kontracepciju duže od deset godina (22). Povezanost raka dojke i postmenopauzalne hormonske nadomjesne terapije predmet je istraživanja brojnih studija unazad više od dva desetljeća. Povećan rizik opažen je u populaciji žena koje uzimaju terapiju duži niz godina, a rizik je ovisan sadrži li nadomjesna terapija samo estrogen ili estrogen i progestin zajedno – žene koje uzimaju hormonsku nadomjesnu terapiju koja sadrži estrogen i progestin imaju značajno veći rizik od nastanka raka dojke (23).

**Pretilost.** Povezanost između debljine (definirane povećanim body mass index-om – BMI) i rizika za nastanak raka dojke u žena u razvijenim zemljama očituje se blagim porastom rizika u postmenopauzalnih žena (24). Nedostatak snažnije povezanosti je iznenađujući s obzirom da se zna da deblje žene imaju skoro dvostruke vrijednosti koncentracije endogenog estrogena u serumu u usporedbi s mršavim ženama, no pretpostavlja se da se radi o protektivnom učinku debljine u ranijoj životnoj dobi (pod pretpostavkom da je većina žena pretilih u postmenopauzalnoj dobi bila pretila i u

premenopauzi) povezanom s rjeđim ovulacijskim ciklusima i posljedično tome manjoj izloženosti organizma ovarijskim hormonima (25, 26).

**Fizička aktivnost.** Povećana fizička aktivnost povezana je s niskim rizikom nastanka raka dojke. Najjači protektivni učinak dokazan je u žena koje održavaju redovitu fizičku aktivnost od menarhe pa do starije životne dobi (27).

**Prehrambene navike, alkohol, pušenje cigareta.** Brojne studije koje su ispitivale povezanost rizika za nastanak raka dojke i tzv. zapadnjačkih nezdravih prehrambenih navika nisu dokazale povezanost. Nasuprot tome, konzumacija alkohola i pušenje cigareta povezani su sa značajnim povećanjem rizika za nastanak bolesti (28).

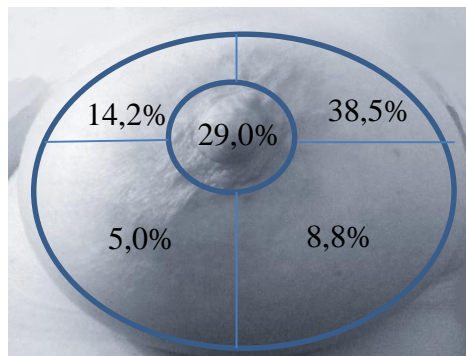
### 1.2.2. Klinička slika karcinoma dojke

Najčešće se invazivni karcinom dojke kod bolesnica prezentira kao bezbolni čvor koji se može napipati u bilo kojem području dojke, najčešće u gornjem vanjskom kvadrantu (Slika 1.3). Ponekad taj čvor može biti i bolan. Prvi znak može biti i pojava smečkasto – krvavog iscjedka. Pacijentica može primijetiti uvlačenje bradavice ili povlačenje kože. Upala oko tumorskog tkiva očituje se oteklinom s crvenilom uz bolnost. Ukoliko se tumor počeo širiti u limfne čvorove, oni se mogu povećati te postati palpabilni kao pomične ili nepomične tvorbe u pazušnoj regiji ili iznad ključne kosti. Pojava drugih simptoma ovisna je o dijelu tijela na koji se tumor proširo. Najčešća sijela metastaza raka dojke su limfni čvorovi, pluća, kosti, mozak i jetra (29).

Svi gore navedeni simptomi u dojci mogu biti i posljedica benignih bolesti dojke te je evaluacija slikovnim i morfološkim metodama u svrhu postavljanja konačne dijagnoze nezaobilazna.



Slika 1.3. Bezbolni čvor – najčešći simptom raka dojke (3)



Slika 1.4. U postocima izražena zastupljenost raka dojke prema lokalizaciji u dojci – prilagođeno iz (3)

### 1.3. Dijagnostičke metode

#### 1.3.1. Trostruki test u dijagnostici promjena u dojci

Jedan od učinaka programa probira za karcinom dojke bilo je usmjeravanje dijagnostičkog procesa za promjene na dojci pa je većina zemalja usvojila pristup „trojne procjene“ tj. kliničke, slikovne i morfološke (30, 31). U mnogim slučajevima je aspiracijska citologija prva tkivna morfološka pretraga. Ekscizijska biopsija promjene u cilju utvrđivanja njene naravi (dobročudna ili zloćudna) nije više prihvatljiv način dijagnosticiranja. Uvođenjem trostrukog testa broj dijagnostičkih ekscizijskih biopsija i ekscizijskih biopsija benignih tvorbi smanjen je jer je postupnikom predviđena mogućnost započinjanja liječenja na osnovu suglasnog trostrukog testa. Ukoliko trostruki test nije suglasan najveću važnost pridaje se citološkom nalazu (32). Ukupna dijagnostička točnost trostrukog testa prema Ghimire i sur. iznosi 98%, osjetljivost 100%, specifičnost 95,2%, a pozitivna prediktivna vrijednost 96,7% (33, 32). Slične rezultate s osjetljivošću i pozitivnom prediktivnom

vrijednosti bliskoj 100% prikazali su brojni autori (34, 35, 36). Trojna procjena je isplativ, lako primjenjiv i vremenski nezahtjevan pristup, ali ga se može rabiti u ustanovama gdje je raspoloživa izvrsna radiološka slikovna oprema i citopatološka služba (32).

### 1.3.2. Citološka dijagnostika

Aspiracijska se citologija godinama upotrebljava kao najekonomičniji način dijagnosticiranja palpabilnih i nepalpabilnih promjena dojke (37, 38). Osobito važnu ulogu ima u trijaži dobroćudnih lezija, također u određivanju proširenosti karcinoma dojke, naročito u detekciji zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova prijeoperacijski te *sentinel* čvora intraoperacijski kao i u praćenju nakon liječenja. Može ju se primijeniti umjesto ili uz *core* biopsiju. Uspjeh aspiracijske citologije u svim navedenim područjima usko je povezan s dostupnošću ekspertize iz citopatologije u pojedinoj ustanovi. Za postizanje točnih i ponovljivih rezultata bitno je poduzimanje mjera kontrole kvalitete te standardizacija provedbe pretraga od prikupljanja i obrade uzorka do tumačenja i izdavanja rezultata (32, 33).

Citološka punkcija tvorbe u dojci indicirana je:

- ❑ kod svih pacijentica u kojih postoji palpabilna tvorba koja zabrinjava pacijenticu ili njezinog liječnika;
- ❑ kod tumorskih tvorbi posebice u mladih žena u kojih ista perzistira kroz dva menstrualna ciklusa;
- ❑ kod prisutne suspektne tumorske mase u žena s pozitivnom obiteljskom anamnezom;
- ❑ kod nepalpabilnih radiološki dokazanih lezija koje su visoko suspektne, suspektne i nisko suspektne na malignitet;
- ❑ kod tvorbi za koje je dokazana atipija na citološkom ili histološkom uzorku, kao i za pregled suspektnog lokalnog recidiva (39, 36).

Aspiracijska citologija izvodi se tankom iglom najčešće pod kontrolom ultrazvuka, a dobiveni materijal u vidu razmaza biva nanesen na stakalce, osušen na zraku i obojan May-Grünwald-Giemsa metodom. Prednosti citološke punkcije leže u činjenici da se radi o kratkotrajnom ambulantnom zahvatu za koji nije potrebna lokalna anestezija, čija je primjena povezana s malom učestalošću komplikacija, a rezultati su vrlo brzo dostupni, te ne manje važno – vrlo je prihvatljive cijene (40). Nedostaci citološke dijagnostike odražavaju se u većem broju neadekvatnih uzoraka (u odnosu na bioptičke uzorke) zbog slabije celularnosti kod specifičnih histoloških tipova tumorskih tvorbi (radijani ožiljak, sklerozirajući duktalni i lobularni karcinom) (41). Dijagnostička osjetljivost, specifičnost, sveukupna točnost te lažno negativni i lažno pozitivni rezultati aspiracijske citologije u dijagnostici karcinoma dojke prema He i sur. iznose 97,72%, 99,4%, 97,94%, 2,28% odnosno 0,6% (42). Isti su ovisni i o edukaciji i vještini osobe koja punkciju izvodi. Singh i sur. su ustvrdili kako su stope neadekvatnosti materijala kod aspiracijske citologije iz različitih izvora bile najniže kad je aspiracijsku punkciju provodio citopatolog (12%), a najviše kad ju je provodio ne-citopatolog (32%) (43).

Posljednjih se godina uz aspiracijsku citologiju ili umjesto nje primjenjuje *core* biopsija (biopsija debelom iglom). U nekim centrima je *core* biopsija u potpunosti zamijenila aspiracijsku citologiju. Autori zaključuju kako tamo gdje su dostupni vješti citopatolozi aspiracijska citologija može biti visoko točna, brza i isplativa metoda za trijažu bolesnika, što tada skuplju *core* biopsiju čini suvišnom (44).

Većina europskih zemalja rabi sustave izvješćivanja za aspiracijsku citologiju dojke u skladu s Europskim smjernicama za osiguranje kvalitete u probiru i dijagnostici raka dojke (C1-C5: C1-neadekvatan uzorak; C2 - tvorba je benigna; C3 - atipična tvorba, vjerojatno benigna; C4 - suspektna tvorba; C5 - tvorba je maligna) (45). Jasan sustav izvješćivanja osigurava visoku pouzdanost citološke dijagnoze, a pretraga smrznutog reza nije potrebna u slučajevima gdje se mamografija/UZV i klinički pregled podudaraju s aspiracijskom citologijom (46).

U Hrvatskoj se aspiracijska citologija dojke rabi kao prva dijagnostička metoda, a izvješće o citologiji dojke prema preporuci Radne grupe Hrvatskog društva za kliničku citologiju uključuje primjerenost materijala, mikroskopski opis i citološko mišljenje koje, ukoliko je moguće, uključuje konačnu dijagnozu nakon čega slijedi patohistološka verifikacija nejasnih, suspektnih i svih malignih dijagnoza. Citološko bi izvješće trebalo sadržavati što je moguće više parametara, uključujući i gradus tumora, koji bi služio kao

prediktor histološkog gradusa, ali i biološkog ponašanja tumora, a u svrhu što kvalitetnijeg planiranja terapijskog pristupa (33).

**Tablica 1.3.** Sustavi citološkog gradiranja objavljeni u razdoblju od 1990.-2000.g. (47).

autor	godina	analizirani parametri					
		arhitektura stanica	jezgra	nukleoli	kromatin	drugo	referenca
Hunt (48)	1990	nakupine %	veličina oblik	prisutnost	-	nekroza	HG
Layfield (49)	1991	nakupine %	histološki nuklearni gradus	prisutnost	-	mitoze	HG
Dabbs (50)	1992	Black-ov nuklearni gradus	HG				
Sneige (51)	1992	Black-ov nuklearni gradus	HG				
Davey (52)	1993	veličina	oblik	prisutnost	struktura	DNA-ploidija	HG
DeGraaf (53)	1994	-	veličina oblik	prisutnost			HG
Pleotis (54)	1994	histološki nuklearni gradus	HG				
Dabbs (55)	1994	histološki nuklearni gradus; mitoze	HG				
Robinson (56)	1994	izolirane st. %	rubovi	prisutnost	struktura	veličina stanice	HG
Cajulis (57)	1994	-	veličina	prisutnost	struktura	mitoze	HG
Bozetti (58)	1996	-	veličina	prisutnost	-	DNA-ploidija	HG
Zoppi (34)	1997	Black-ov nuklearni gradus	HG				

HG - histološki gradus

Postoji nekoliko različitih citoloških sustava gradiranja koji se temelje na različitim citološkim obilježjima poput kohezivnosti stanica, staničnog pleomorfizma, prisutnosti odnosno odsutnosti mioepitelnih stanica i mitoza, pleomorfizma jezgre, prisutnosti nukleola te izgledu kromatina. Primjenom različitih sustava citološkog gradiranja prikazanih u Tablici 1.3. i njihovom usporedbom sa zlatnim standardom odnosno histološkim gradusom pokazalo se da je Robinsonova metoda citološkog gradiranja jednostavna za primjenu, a pokazuje izvrsnu korelaciju s histološkim gradusom te je kao takva najčešće korištena metoda za određivanje citološkog gradusa invazivnog karcinoma dojke (59, 47, 60, 53, 56).

Robinsonova metoda uključuje šest kriterija detaljnije prikazanih u Tablici 1.4. Svakom od navedenih kriterija je pridružen broj od 1 do 3, a zbroj brojeva pridodanih svakom pojedinom kriteriju čini gradus tumora, gradus I: zbroj 6-11, gradus II: zbroj 12-14 i gradus III: zbroj 15-18. Razlika od većine drugih sustava je u tome što Robinsonova metoda uključuje veći broj parametara, a isključuje nekrozu i mitoze kao kriterij koji se teško identificira u citološkom uzorku i kao takav nije pouzdan parametar (56).

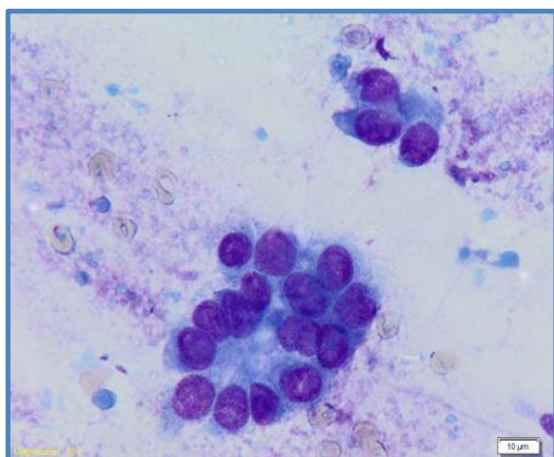
**Tablica 1.4.** Robinsonova metoda citološkog gradiranja (56).

	zbroj 1	zbroj 2	zbroj 3
Kohezivnost	stanice uglavnom u nakupinama	miješano	stanice uglavnom izolirane
Veličina stanice	1-2 x E	3-4 x E	$\geq 5$ x E
Uniformnost stanica	monomorfna	umjerena	pleomorfizam
Nukleoli	nevidljivi	jedva vidljivi	prominentni
Rubovi jezgre	glatki	naborani	ispupčeni, nepravilni
Kromatin	vezikularan	granularan	grudast

E – veličina eritrocita

Slika 1.5. Citološki razmazi invazivnih karcinoma dojke gradirani po Robinson-ovoj metodi citološkog gradiranja (iz fundusa Službe za patologiju i citologiju OB „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod).

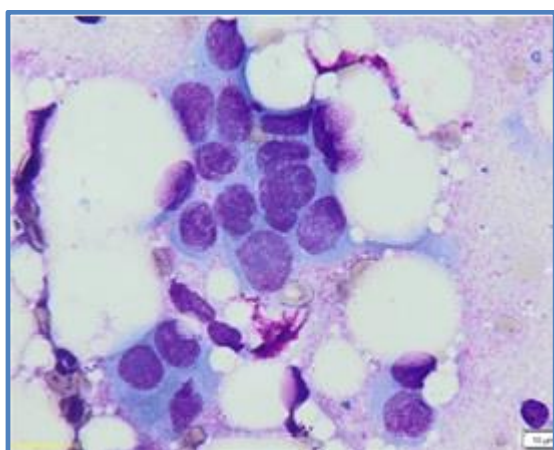
### Gradus I



Kohezivnost	stanice uglavnom u nakupinama
Veličina stanice	1-2 x E
Uniformnost stanica	monomorfna
Nukleoli	nevidljivi
Rubovi jezgre	glatki
Kromatin	vezikularan

1+1+1+1+1+1

### Gradus II

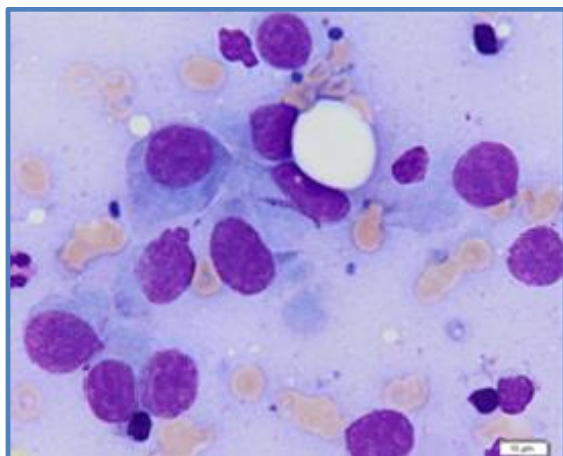


Kohezivnost	miješano
Veličina stanice	3-4 x E
Uniformnost stanica	umjerena
Nukleoli	jedva vidljivi
Rubovi jezgre	naborani
Kromatin	granularan

2+2+2+2+2+2



## Gradus III



Kohezivnost	stanice uglavnom izolirane
Veličina stanice	$\geq 5 \times E$
Uniformnost stanica	umjerena
Nukleoli	prominentni
Rubovi jezgre	ispupčeni, nepravilni
Kromatin	grudast

3+3+2+3+3+3

### 1.3.3. Patohistološka dijagnostika

Dijagnoza invazivnog karcinoma dojke se postavlja na temelju patohistološke potvrde bolesti iz materijala uzetog širokom iglom (engl. *core biopsy*), reseciranog tkiva ili iznimno temeljem citološke punkcije (46, 45, 40).

Histološka slika invazivnog karcinoma dojke je heterogena i uključuje brojne varijable na preglednim rezovima tkiva koje u konačnici dovode do dijagnoze.

Gradiranje dukalnog karcinoma je procjena diferenciranosti tumora. Osim ako nije drugačije navedeno, gradiranje se odnosi na invazivnu komponentu tumora (61). Histološko gradiranje uključuje mikroskopski opis rasta tumora kao i citološke karakteristike diferencijacije. Najčešće korištena metoda histološkog gradiranja temelji se na kriterijima definiranim od Bloom-a i Richardson-a (62) i Elstona-a i Ellis-a (63). Mjereni parametri su: a) postotak tubularnih formacija; b) pleomorfizam jezgara; i c) broj mitozâ. Svakom od navedenih parametara je pridružen broj od 1 do 3, a zbroj brojeva pridodanih svakom pojedinom kriteriju čini gradus tumora, gradus I (dobro diferencirani tumor): zbroj 3-5, gradus II (umjereno diferencirani tumor): zbroj 6-7 i gradus III (slabo diferencirani tumor): zbroj 8-9 (Tablica 1.5., Slika 1.6.).

Histološko gradiranje je subjektivna metoda i predmet je istraživanja brojnih studija. Rezultati dobiveni u nekoliko studija pokazuju vrlo dobru korelaciju među patolozima u slučaju interpretacije tubularnih formacija i mitozâ, a slabiju razinu podudaranja u slučaju interpretacije pleomorfizma jezgara (64, 65). Histološki gradus pokazuje značajnu povezanost ne samo s učestalošću pojave recidiva i smrtnosti zbog invazivnog karcinoma dojke, nego i s razdobljem bez bolesti (*disease free interval*) te stopom preživljenja nakon mastektomije (66).

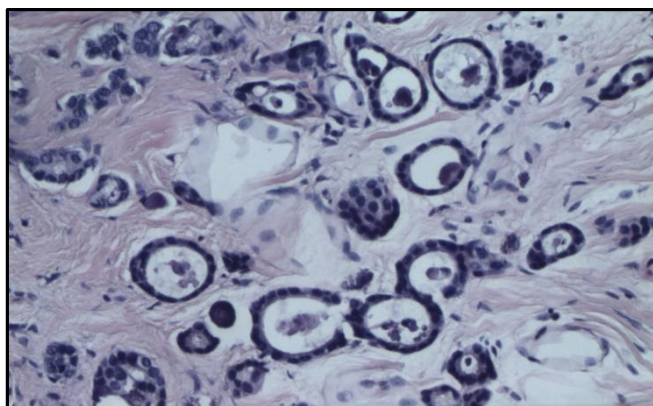
**Tablica 1.5.** Modificirana Bloom-Richardson-ova metoda histološkog gradiranja (67).

Tubularne formacije
zbroj 1: $\geq 75\%$ tumora sastoji se od tubularnih formacija zbroj 2: 10-75% tumora sastoji se od tubularnih formacija zbroj 3: $\leq 10\%$ tumora sastoji se od tubularnih formacija
Veličina jezgre
zbroj1: jezgre tumorske stanice podjednake veličine kao jezgra normalne stanice duktalnog epitela (2-3x E) zbroj 2: intermedijarna veličina jezgre zbroj 3: jako velika jezgra, najčešće sa prominentnim nukleolima
Broj mitozna
na 10 vidnih polja x40 zbroj 1: 0-7 mitozna zbroj 2: 8-14 mitozna zbroj 3: 15 i više mitozna

E – veličina eritrocita

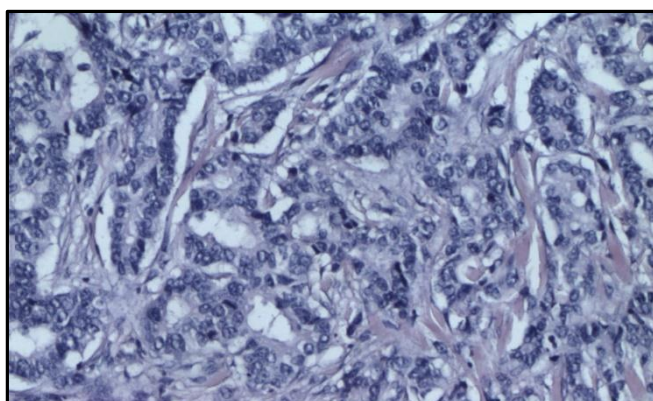
Slika 1.6. Invazivni duktalni karcinom dojke gradiran po modificiranoj Bloom-Richardson-ovoj histološkoj metodi (iz fundusa Službe za patologiju i citologiju OB „Dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod)

gradus I



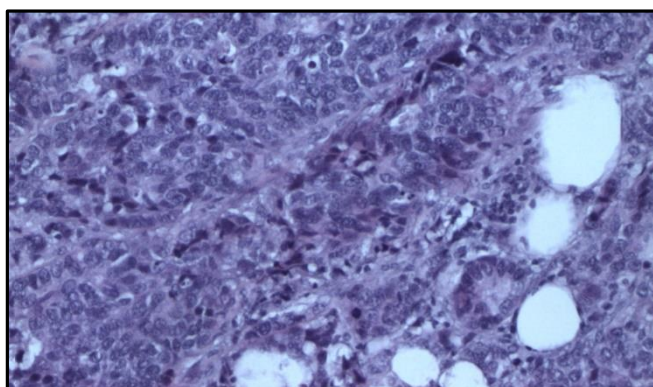
1+1+1

gradus II



2+2+1

gradus III



3+3+3

#### 1.4. Morfometrijska analiza

Termin morfometrija upotrebljava se za različite kvantitativne metode koje uključuju tkivne i stanične analize (68, 69), a sama riječ morfometrija znači mjerenje oblika (grčki morfos = oblik). Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog značenja je da se može koristiti standardno obrađeni materijal. U Tablici 1.6. vidljiv je niz objektivnih parametara koji mogu izmjeriti strukture prepoznatljive pri subjektivnoj citološkoj procjeni (70).

**Tablica 1.6.** Subjektivni citološki kriteriji koje se može kvantificirati (70).

Subjektivni kriteriji	Objektivni kvantitativni parametri
Povećane stanice, jezgre	Povećana površina stanice, jezgre
Anizokarioza	Povećana standardna devijacija površine jezgre
Pleomorfizam	Promijenjeni faktori oblika
Promijenjen odnos jezgra/citoplazma	Promijenjena površina jezgra/citoplazma
Promijenjen izgled kromatina	Promijenjeni parametri teksture jezgre
Smanjena stanična kohezija	Mala veličina skupina

Morfometrijska mjerenja opisuju dvodimenzionalne slike, tako da se često koristi pojam planimetrija. Stanice koje mjerimo u citološkim i histološkim preparatima imaju dvodimenzionalni izgled iako se radi o trodimenzionalnim strukturama. Trodimenzionalnost je uočljivija pod većim povećanjima, ali je zanemariva ukoliko se mjere površine jezgara i citoplazmi. Uz opseg i površinu često se mjeri i struktura objekata, stoga je pojam morfometrija u široj uporabi (71).

Planimetrijski morfološki parametri mogu se podijeliti na:

1. Jednostavne parametre: površina, opseg, promjer, polumjer, os objekta;
2. Čimbenike oblika i izduženosti: mjere (ne)pravilnosti objekta odnosno nedimenzionalne parametre;
3. Dvofazne parametre: odnos jezgre i citoplazme, odnos jezgrice i jezgre, razlika površina;
4. Kontekstualne parametre: površina skupine, oblik skupine, udaljenost među skupinama.

Faktor oblika (form factor, FF) parametar je koji mjeri stupanj zaokruženosti pojedinačnog objekta ( $FF=4\pi \times \text{površina}/\text{opseg}^2$ ) (71, 72). Ima vrijednost 1 za krug,  $<1$  za elipse i  $\ll 1$  za jako nepravilne oblike.

Parametar za objekte koji nisu krug je i faktor izduženosti (aspect ratio), koji opisuje odnos duljine i debljine objekta (duljina/debljina) (68, 53).

Konveksna površina ili konveksnost (convex area, ConvA) definirana je kao površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama (73, 74). Ova površina je veća od standardne površine ako jezgra ima nabranu membranu ili uleknuća (indentacija).

Faktor sličan stupnju ispunjenosti (fullness ratio) je omjer površine i konveksne površine (area/conv Area, ACA) (74).

#### 1.4.1. Računalni sistem za slikovnu analizu

Kompjutorska analiza slike se sve više primjenjuje na različitim poljima dijagnostike omogućujući numeričku objektivizaciju promjena na stanicama. Na taj način omogućuje se objektivna kvantifikacija parametara (75). Klinička i istraživačka primjena slikovne analize predstavlja veliku pomoć u staničnoj morfologiji malignih lezija u području citologije i patologije. Morfološka dijagnoza u citologiji i patologiji rezultat je vizualne percepcije i upotrebe definiranih kriterija za koje je potrebna visoka educiranost morfologa. Brojne studije navode razliku u reproducibilnosti između morfologa. Danas se nastoji povećati dijagnostička točnost uvođenjem sofisticiranih kompjutorskih i molekularnih tehnologija.

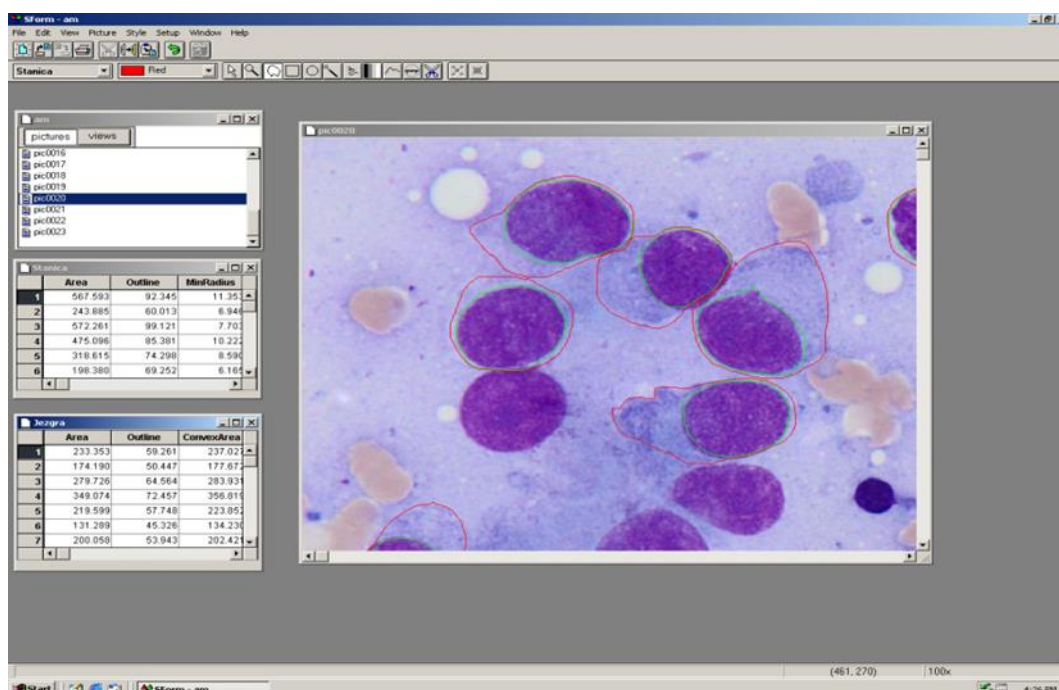
Zaključak morfologa u smislu dobroćudno ili zloćudno nije dostatan za optimalno liječenje već su nužne dodatne informacije da bi se izdvojili pacijenti s tumorom koji imaju povećan rizik recidiva ili brze progresije bolesti. Osim toga, utvrđivanje prekancerogenih lezija u populaciji s visokim rizikom će pomoći u planiranju pristupa strategije probira (68, 76).

Sistem za slikovnu analizu sastoji se od: mikroskopa, visoko rezolutne kamere, monitora u boji, računala te podržavajućeg programa za prihvatanje i analizu slike. Svjetlosni mikroskop pretvara sliku u analogni električni signal pomoću video kamere, koja ga u računalu digitalizira u elemente slike, tzv. piksele (engl. pixels).

Za razliku od ljudskog oka koje razlučuje 30 – 40 zona sivila, računalo razlučuje 256 zona po svakom pikselu (76, 77).

Pogodni uzorci za slikovnu analizu su patološki kirurški materijal dobiven biopsijom ili ekscizijom, svi tipovi citoloških uzoraka (izljevi, obrisci, punktati) te stanične kulture. Digitalni signal može se vratiti u analogni signal te konačno prikazati u boji na monitoru (Slika 1.6.). Temeljni dio slikovnog sistema je mikroskop, koji mora sadržavati uniformni, stabilni izvor svjetla, kvalitetnu optiku te stabilan mehanički dio. Video kamera mora biti visoko kvalitetna, tzv. CCD (engl. Charge Coupled Device), s visokom rezolucijom, te fotometrijskom i prostornom linearnošću.

Računalo sadrži visoko-rezolucijski adapter za prihvatanje slike ili procesor slike, dozvoljavajući izolaciju i selekciju individualnih objekata (piksela) slike. Spremanje slika omogućeno je dodatnom perifernom jedinicom za pohranu podataka. Monitor mora imati visoku rezoluciju u cilju prepoznavanja detalja od posebnog značaja (77).



Slika 6. Slikovni prikaz morfometrijske analize na monitoru, (SFORM program).

#### 1.4.2. Priprema uzoraka za slikovnu analizu i morfološke promjene stanica

Za slikovnu analizu koriste se svi patološki i citološki materijali te stanične kulture. Najpogodnijima se smatraju svježi ili smrznuti patohistološki uzorci. U svježim citološkim preparatima pripremljenima kao razmaz ili sediment mogu se analizirati cjelokupne stanice.

Promjene cjelokupne stanice kod maligne alteracije obično se odnose na poremećaj odnosa jezgre i citoplazme u korist jezgre (povećan omjer jezgra/citoplazma, N/C). Promjene citoplazme manifestiraju se kao bazofilija citoplazme (posljedica povećane sinteze proteina), vakuolizacija citoplazme i stvaranje granula u citoplazmi. Promjene na razini jezgre odražavaju se kao povećanje jezgre, promjena oblika jezgre (jezgra nalik na zrno kave kod Brennerovog tumora, cerebriformnost kod Sezary sindroma i dr.) te promjena strukture koromatina u smislu hipo- ili hiperkromazije (77).



### 1.4.3. Značenje morfometrijske analize

Morfometrijska analiza zbog svojih kvantitativnih obilježja omogućava korelaciju rezultata klasificiranja tumora na temelju morfometrijskih podataka s tradicionalnom klasifikacijom tumora temeljenom na subjektivnoj interpretativnoj histopatologiji, a s ciljem potvrde te klasifikacije, veću pouzdanost i reproducibilnost citoloških i patohistoloških dijagnoza, eventualnu reklasifikaciju tumora na temelju morfometrijskih podataka i korelaciju morfometrijskih podataka s prognostičkim pokazateljima (78, 79).

Murata i sur. primijenili su morfometriju s faktor analizom na jezgrama tumorskih stanica štitnjače. Faktor analiza klasificirala je morfološke karakteristike jezgre kao posebno izdvojene varijable (jezgrina veličina i oblik; heterogenost, kontrast i homogenost izgleda kromatina). Korišteni su jednostavni parametri kao površina, opseg, duljina, debljina, konveksnost; složeni parametri poput faktora oblika i faktora izduženosti, parametri koji opisuju teksturu jezgre i dr. Na taj način bilo je moguće odvojiti i razlikovati benigne jezgre, te jezgre papilarnog i folikularnog karcinoma (73).

Pomoću morfometrijskih parametara moguće je razlikovati pojedine tipove stanica u neneoplastičnim limfnim čvorovima kao i u malignim limfomima. Naime uočeno je da se centroцити lako diferenciraju od ostalih stanica, a slične karakteristike imaju centroblasti i limfociti (71, 80).

Mahovlić je u svom istraživanju dokazala da su primjenom digitalne morfometrijske analize na citološkim uzorcima aspirata endometrija jedinične mjere jezgre znatno veće u uzorcima obojanim po May-Grunwald-Giemsu (MGG) metodi od onih obojanih po Papanicolaou-u. S obzirom na bojanje razlikuje se proliferativan, hiperplastičan i malignan endometrij po površini i konveksitetu površine jezgre, opsegu jezgre, najmanjem i najdužem polumjeru jezgre, dužini i širini jezgre (81).

Brahmi je pomoću automatizirane morfometrije jezgara (površina, opseg, duljina i zaokruženost) istraživao karakteristike tumora malih okruglih stanica u punktatima tankom iglom i dokazao mogućnost razlikovanja pojedinih tumora (82).

Smojver je u svom istraživanju pokazala statistički značajnu razliku između morfometrijskih parametara (površina, opseg, konveksitet, dužina i najveći polumjer) jezgara makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku u akutnoj i kroničnoj sarkoidozi (83).

Dey je našao da se prosječna površina i standardna devijacija površina jezgre, opsega, konveksnosti i opsega konveksnosti statistički značajno povećavaju od benignih lezija dojke i karcinoma dojke (84).

Prvulović i sur. su istraživali parametre: površina, opseg, maksimalni radijus, minimalni radijus, konveksitet, dužina, širina, izduženost, omjer jezgra/citoplazma i faktor oblika i pokazali su da su morfometrijski parametri primijenjeni pojedinačno bili značajno povezani s tipom i gradusom karcinoma dojke, a najznačajniji su parametri i za jezgru i za stanicu bili: površina, konveksitet i opseg (85).

Najvažnija prednost i vrijednost morfometrije nasuprot drugim morfološkim metodama je da omogućuje predstavljanje nalaza u brojčanoj formi što omogućuje objektivnost i reproducibilnost dobivenih podataka, a sama metoda je jeftina i tehnički jednostavna te koristi standardno obrađeni materijal.

## ***2. HIPOTEZA***

Na temelju iznesenih činjenica o važnosti određivanja gradusa na prijeoperativnom materijalu raka dojke postavlja se hipoteza:

- gradiranje na citološkom materijalu, zajedno s morfometrijom, objektivna je i reproducibilna metoda koja povoljno korelira s današnjim zlatnim standardom, odnosno histološkim gradusom;
- gradiranje na citološkom materijalu reproducibilna je tehnika u kvalificiranim rukama, neovisna o karakteristikama citologa

# 3. CILJ

# ISTRAŽIVANJA

Cilj ove studije je:

1. Učiniti citološko i morfometrijsko gradiranje invazivnog tumora dojke na citološkom materijalu ukupno 45 pacijentica (15 po svakom potvrđenom histološkom gradusu) i prosuditi mogućnost rutinske primjene citološkog gradiranja s ili bez morfometrijske analize, umjesto dosadašnje procjene gradusa tumora na histološkom materijalu, u indiciranim slučajevima;
2. Prosuditi reproducibilnost, konzistentnost i varijabilnost citološke tehnike gradiranja među citolozima;
3. Opisati biološku varijabilnost morfometrijskih parametara unutar i između gradusa, u svrhu optimalizacije i utvrđivanja minimalne, trenutno nedefinirane i nestandardizirane, veličine uzorka potrebite za morfometrijsku analizu.

# 4. *ISPITANICI I METODE*

Na temelju prethodne studije "Morfometrija tumorskih stanica u različitim tipovima i gradusima karcinoma dojke" (85), procijenjene su marginalne distribucije analiziranih parametara, u svrhu utvrđivanja potrebite veličine uzorka za ciljnu preciznost i predviđenu statističku snagu (PASS2008 program; Kaysville, Utah, SAD), te su iz arhive Odjela za citologiju, patologiju i sudsku medicinu OB Dr. J. Benčević retrospektivno selektirane pacijentice s citološki potvrđenim invazivnim karcinomom dojke koje su operirane u Općoj bolnici Dr. J. Benčević tijekom 2011. i 2012.g., a koje su zadovoljavale dva kriterija:

1. postojanje patohistološke verifikacije
2. najmanje 100 očuvanih stanica upotrebljivih za morfometrijsku obradu.

Uveden je sistem šifriranja prema kojem nije moguće utvrditi identitet osobe čiji su anamnestički podatci korišteni u daljnjem tijeku istraživanja.

Određivanje histološkog gradusa učinjeno je na resekcijskom materijalu, fiksiranom u formalinu i uklopljenom u parafinske kocke, korištenjem Elstonove modifikacije Bloom-Richardson-ove metode. Histološke karakteristike koje su korištene pri određivanju gradusa su tubularne formacije, pleomorfizam stanica i broj mitozna (63).

Materijali dobiveni citološkom punkcijom osušeni su na zraku i obojani May – Grünwald – Giemsa (MGG) metodom. Gradiranje invazivnog karcinoma dojke učinjeno

je po Robinsonovoj metodi gradiranja i to neovisno u dva navrata od strane tri citologa (od kojih je jedan citolog sa šest godina specijalističkog staža te velikim volumenom uzoraka dojki, jedan sa sedam godina specijalističkog staža, ali se uz opću citologiju bavi prvenstveno ginekološkom citologijom te jedan mladi specijalist). Robinsonova metoda uključuje šest kriterija: disocijacija stanica (nakupine / pojedinačne stanice), veličina stanica (1-2 / 3-4 /  $\geq 5$  eritrocita), uniformnost stanica (monomorfnost / blaga pleomorfija / pleomorfija), nukleoli (nevidljivi / jedva vidljivi / prominentni), rubovi jezgre (glatki / naborani / ispupčeni do rascijepljeni) i kromatin (vezikularni / granularni / grudasti). Svakom od navedenih kriterija je pridružen broj od 1 do 3, a zbroj brojeva pridodanih svakom pojedinom kriteriju čini gradus tumora, gradus I (G1): zbroj 6 – 11, gradus II (G2): zbroj 12 – 14 i gradus III (G3): zbroj 15 – 18 (56).

Morfometrijska je analiza provedena pomoću SFORM računalne aplikacije (Vamstec, Zagreb). Postupak zahtjeva pronalazak očuvane pojedinačne stanice koja se pri povećanju od 1000 puta prikaže na monitoru te se tada računalnim mišem u neprekinutom potezu okruži posebno citoplazma te posebno jezgra stanice, dok se softverski određuju unaprijed odabrani morfometrijski parametri. Morfometrijski parametri bili su: površina, opseg, konveksitet, maksimalni radijus, minimalni radijus te omjer površina citoplazme / površina jezgre. Za svaki će se analizirani slučaj učiniti mjerenja na 100 jezgri i 100 citoplazmi, odnosno ukupno su predviđena mjerenja 4500 jezgara i isto toliko citoplazmi za ukupno 45 pacijentica (15 po svakom gradu).

#### 4.1. Statistička analiza podataka

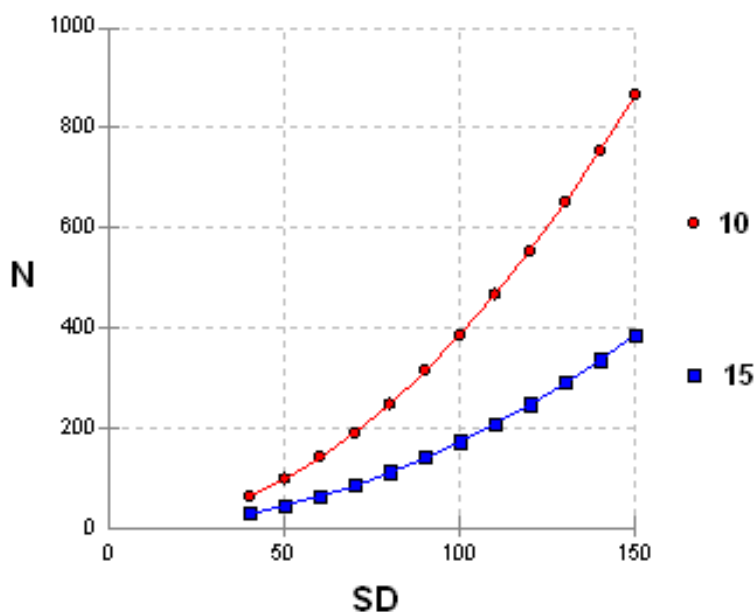
Za statističku analizu konzistentnosti gradiranja ordinalnih varijabli između dva citologa korišten je korigirani Kendall  $\tau$ -B test. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Anderson-Darling testom. Kategoričke varijable opisane su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Srednje vrijednosti kontinuiranih varijabli izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD), odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR) kada je to potrebno. Nominalni pokazatelji prikazani su raspodjelom učestalosti po skupinama i udjelom, i testirani Fisher exact ili  $\chi^2$ -testom. Za

istraživanje razlika između dviju nezavisnih skupina omjernih varijabli upotrijebljen je Mann-Whitney test, a za više od dvije skupine neparametrijska analiza varijance i Dunnov post-hoc test, odnosno generalni linearni model s izvedenicama (GEE (86, 87)). Korelacijska analiza učinjena je Spearman rang-testom.

Statistička analiza učinjena je programskim paketom NCSS2007 s korigiranom dvostranom razinom značajnosti  $<0.05$ , a analiza statističke snage i procjena veličine uzorka PASS2008 programom (v07.1.14, LLC, Kaysville, Utah, SAD) na temelju podataka eksploratorne studije.

### Veličina uzorka

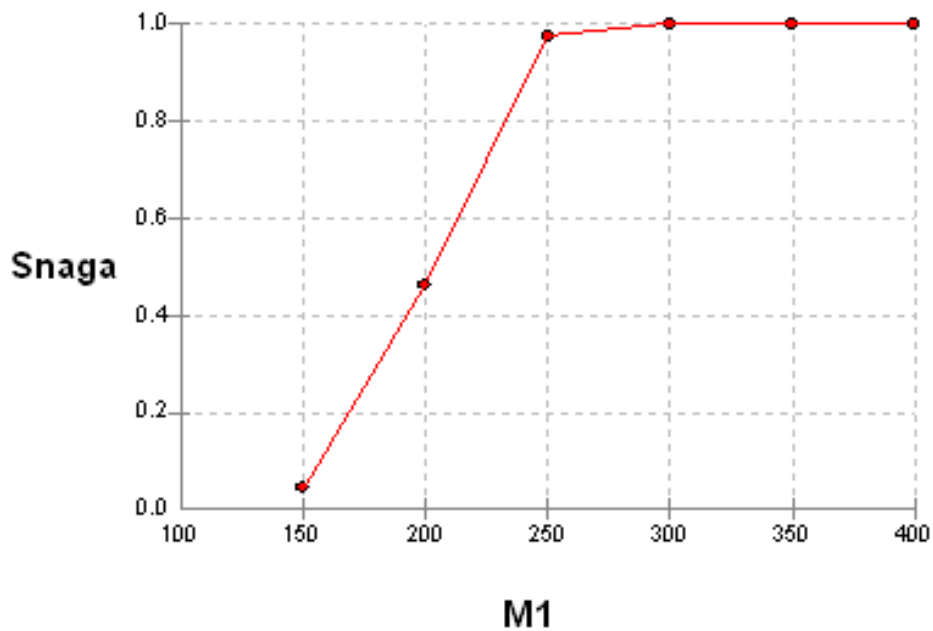
Potrebna veličina uzorka ( $N \sim 100$ ) procijenjena je prema najnepovoljnijem scenariju eksploratorne studije, za varijablu najšireg rasapa mjerenih vrijednosti, stanična površina/konveksna površina, uz dvostrani 95% interval pouzdanosti, SD 50-100, i ciljanu marginu greške  $\pm 10$  (5%), odn.  $\pm 15$  (8%).



N – broj; SD – standardna devijacija

## Statistička snaga

Procjena statističke snage uzorka dana je za Kruskal-Wallis test, 3 jednakobrojne skupine ispitanika ( $n=15$ ),  $H_0: M_0=150$ , preko niza alternativnih hipoteza ( $M_1$ ) u rasponu 150-400 arb.jed., za  $SD=70$ ,  $\alpha=0.05$ .



M1 – niz alternativnih hipoteza



# 5. REZULTATI

## 5.1. Gradiranje invazivnih karcinoma dojke na citološkim uzorcima

Za analizu stupnja podudarnosti citološkog gradusa invazivnog karcinoma dojke s histološkim gradusom koristio se Kendall  $\tau$ -B test.

Također je analizirana: I) reproducibilnost citološkog gradiranja između 3 citologa, II) reproducibilnost Robinsonovih kriterija pojedinačno među citolozima, kao i III) varijabilnost ponovljenih opažanja za svakog pojedinog citologa u tri navrata.

**Tablica 5.1.** Komparacija rezultata gradiranja invazivnog karcinoma dojke na citološkim uzorcima s histološkim gradusom

	Kendall $\tau$ -B
1. promatrač prvo promatranje	0,811
2. promatrač prvo promatranje	0,673
3. promatrač prvo promatranje	0,64
1. promatrač drugo promatranje	0,792
2. promatrač drugo promatranje	0,822
3. promatrač drugo promatranje	0,762

$\tau$ -B vrijednosti pri prvom citološkom gradiranju kretale su se u rasponu od 0,43 – 0,67 (dobro do izvrsno slaganje), dok su u drugom navratu iznosile od 0,63 – 0,70 (izvrsno slaganje).

Nakon što su tri specijalista citologije neovisno jedan o drugome izvršili citološko gradiranje u prvom je navratu potpuno slaganje postignuto kod 21 od 45 slučajeva (46,7%) te u drugom kod 30 od 45 slučajeva (66,6%), a glavnina slaganja postignuta je kod citološkog gradiranja tumora histološki klasificiranih kao gradus I. Za standard među promatračima uzet je promatrač s najvećim volumenom pregledanih uzoraka dojke (promatrač označen brojem 1).  $\tau$  vrijednosti između promatrača uzetog kao standard i druga dva promatrača u prvoj ocjeni gradiranja iznosile su 0,64 i 0,67 (dobro slaganje), a u drugom navratu 0,76 i 0,82 (izvrsno slaganje) za citološko gradiranje. Svi rezultati slaganja promatrača u gradiranju kao i njihovo slaganje u procjeni pojedinih promatranih parametara prikazani su u Tablici 5.2. i 5.3.

**Tablica 5.2.** Slaganje promatrača u gradiranju invazivnih karcinoma dojke na citološkim uzorcima – prvo promatranje

Parametar	1 vs 2	1 vs 3
	$\tau$ -B	$\tau$ -B
Gradus	0.453	0.721
Kohezivnost	0.495	0.42
Veličina jezgre	0.327	0.309
Uniformnost	0.524	0.549
Nukleoli	0.593	0.587
Rubovi jezgre	0.448	0.407
Kromatin	0.346	0.47

1 – promatrač 1, 2 - promatrač 2, 3 - promatrač 3

**Tablica 5.3.** Slaganje promatrača u gradiranju invazivnih karcinoma dojke na citološkim uzorcima – drugo promatranje

Parametar	1 vs 2	1 vs 3
	$\tau$ -B	$\tau$ -B
Gradus	0.795	0.854
Kohezivnost	0.509	0.6
Veličina jezgre	0.544	0.647
Uniformnost	0.539	0,71
Nukleoli	0.571	0.731
Rubovi jezgre	0.447	0.301
Kromatin	0.461	0.373

1 – promatrač 1, 2 - promatrač 2, 3 - promatrač 3

Slaganje pojedinog promatrača pri ponovljenom citološkom gradiranju (intraobserver varijabilnost) iznosi 0,57 – 0,79. Stupanj slaganja se razlikuje kod različitih parametara. Dobro do odlično podudaranje u opetovanom promatranju promatrači pokazuju se pri evaluaciji disocijacije stanica (0,57 – 0,67) i nukleola (0,47 – 0,67), dok je pri evaluaciji rubova jezgre podudarnost prvog i ponovljenog promatranja bila loša do dobra (0,08 – 0,53).

Cjelokupni rezultati su prikazani u tablici 5.4.

**Tablica 5.4.** Slaganje pojedinog promatrača pri ponovljenom citološkom gradiranju istih uzoraka (intraobserver varijabilnost)

Parametar	1	2	3
	$\tau$ -B	$\tau$ -B	$\tau$ -B
Gradus	0.756	0.57	0.789
Kohezivnost	0.571	0.67	0.612
Veličina jezgre	0.435	0.518	0.65
Uniformnost	0.658	0.49	0.498
Nukleoli	0.655	0.4653	0.672
Rubovi jezgre	0.534	0.08	0.5
Kromatin	0.645	0.409	0.2443

1 – promatrač 1, 2 - promatrač 2, 3 - promatrač 3

## 5.2. Morfometrija

Digitalna, planimetrijska mikromorfometrija učinjena je ISSA/SForm sustavom (Visual Analysis and Measurement Systems Technologies d.o.o, Zagreb, Hrvatska) uz pomoć CCD TV kamere u boji visoke razlučivosti za prijenos slike s mikroskopa (Olympus, Tokyo, Japan) na računalo. Za neposrednu računalnu, interaktivnu morfometrijsku analizu objekata ručno obilježenih mišom korištena je slika digitalizirana u rezoluciji 512 x 512 piksela x 24 bita. Analiza je provedena na najmanje 100 dobro očuvanih citoplazmi/jezgara epitelnih stanica, bez preklapanja, bez degenerativnih promjena i artefakata, uz povećanje 1000x.

Analizirane su sljedeće stanične/nuklearne morfometrijske značajke:

- I) površina - područje unutar obilježenog opsega stanice/jezgre.
- II) kontura – obris oblika mjeren kao opseg duljine margine stanice/jezgre jezgre.
- III) maxR - najveći polumjer, odnosno najduža os mjerena od središta do margine unutar obilježenog opsega stanice/jezgre jezgre
- IV) minR - minimalni polumjer, mjerena kao najkraća os od središta do margine unutar obilježenog opsega stanice/jezgre jezgre
- V) konveksna površina – konveksnost; površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama.

Sljedeći parametri oblika jezgre izračunati su na temelju gore izmjerenih vrijednosti:

1. AR, mjera oblika ( $4 \times \text{površina} / \pi \times \text{maxR} \times \text{minR}$ ).
2. FF, čimbenik oblika ( $4\pi \times \text{površina} / \text{kontura}^2$ ); stupanj zaokruženosti objekta; u vrijednosti od 1 ukazuje savršeni krug.
3. Nuklearna zaobljenost,  $1/\text{AR}$  (za okrugle stanice / jezgre, vrijednosti zaobljenosti odgovaraju 1. Ako je stanica / jezgra eliptičnog oblika, zaobljenost postaje  $< 1$ ).

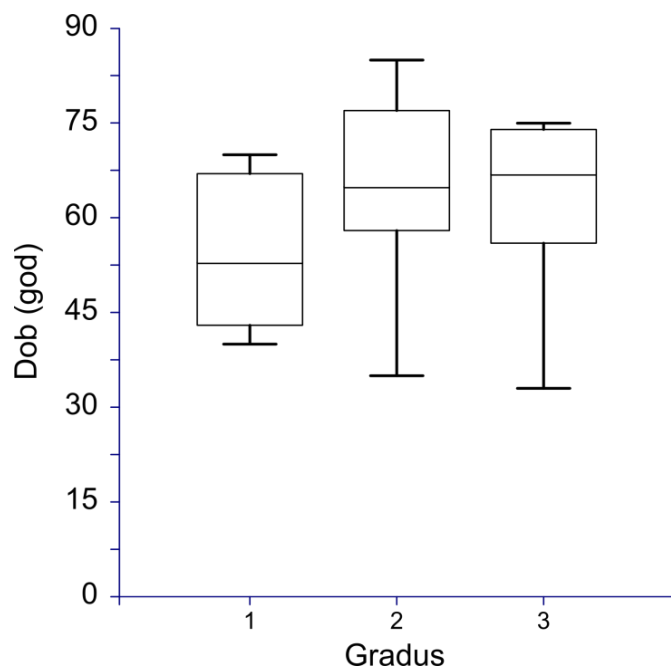
### pTNM klasifikacija

pT stadij definiran je histološki, kao  $T1a+b \leq 1$  cm,  $1 \text{ cm} < T1c+T2 < 5$  cm i  $T3+$  ( $\geq 5$  cm ili T4), a pN binarno, prisustvom ili odsustvom prožetih limfnih čvorova u disektatu dojke i aksile. ITC kategorija limfnih čvorova pridružena je pN1 skupini.

#### 5.2.1. Deskriptivna analiza

S jednim izuzetkom, svi su obuhvaćeni ispitanici ženskog spola, s prosječnom dobi menarhe  $13 \pm 1$  godina, medianom 2 poroda (IQR 1-3, max. 8, 4 nulipare) i prosječnom dobi menopauze (33/44 ispitanica)  $47 \pm 6.6$  godina. Zabilježeno je 14 pT1a+b, 27 pT1c+T2 tumora; 17 s aksilarnim nodalnim metastazama. Tri ispitanice imaju pozitivnu obiteljsku anamnezu raka dojke.

Ispitanici G2 ( $\Delta=2.61$ ) i G3 skupine ( $\Delta=2.15$ ) značajno su stariji od ispitanika G1 skupine ( $P=0.03$ , Kruskal-Wallis test, Slika 5.1.).



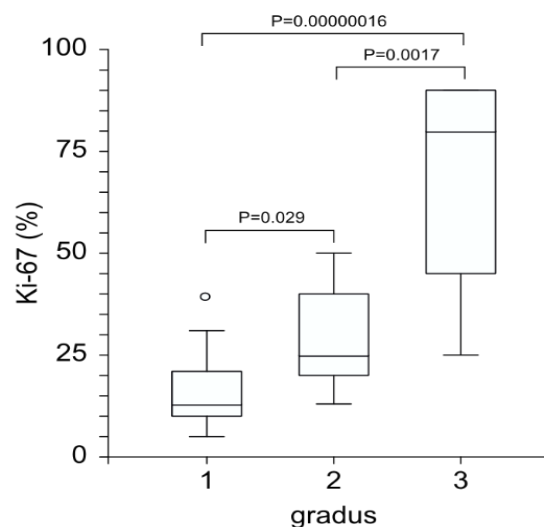
Slika 5.1. Razdioba dobi ispitanika po gradusu invazivnog karcinoma dojke (N=45)

Uočava se pad ekspresije progesteronskih receptora (PRR) s porastom gradusa ( $P=0.027$ , Kruskall-Wallis test), uz značajno nižu ekspresiju PRR u G3 skupini lezija u usporedbi s G1 skupinom [ $\Delta=2.73$ , 3 (0-58) vs 45 (24-69) vs 60 (60-100)%, G3 vs G2 vs G1], kao i značajan, robusan, stupnjeviti porast ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67 s porastom gradusa ( $P=1.4 \times 10^{-6}$ , Kruskall-Wallis test, Slika 5.2.).

Menopauza je značajna odrednica gradusa ( $P=0.013$ , Freeman-Halton test), uz znatno veću učestalost G2 i G3 lezija u postmenopauzalnih ispitanica (24/30 vs 3/11,  $P=0.003$ , Fisherov test).

pT stadij tumora povezan je s gradusom lezije: pT1a+b (<1 cm) tumori značajno su češći u G1 skupini (8/15) nego u G2/3 skupini (6/30,  $P=0.039$ , Fisherov test). Gradus 2 i 3 lezije povezane su s višim pT stadijem (pT1c+T2-4) u trenutku dijagnoze.

Nisu zabilježene razlike u ekspresiji estrogenskih receptora (ER), humanog epidermalnog faktora rasta (Her-2), zastupljenosti pušača duhanskih proizvoda, pN statusu u trenutku dijagnoze, paritetu i dobi menarhe između G1, G2 i G3 skupine lezija. U skupini pušača [ $n=9$ ,  $P=0.032$ , 95 (19-100)% vs 40 (0-90)%] i premenopauzalnih žena [ $n=9$ ,  $P=0.049$ , 80 (38-100)% vs 40 (0-90)%, Mann-Whitney test], zamijećena je značajno viša ekspresija PRR u tumorskim lezijama.



Slika 5.2. Ekspresija proliferacijskog biljega Ki-67 po gradusu (N=45), Kruskall-Wallis s post-hoc Dunn testom

Ekspresija ER inverzno je povezana s pN stadijem: pN0 (n=29) stadij obilježen je značajno višom ekspresijom ER [P=0.039, 95 (80-100)% vs 80 (15-94)%, pN0 vs pN1, Mann-Whitney test]. Gubitak ekspresije ER (4/6 vs 0/39, P=0.0001, Fisherov test) i PRR (3/9 vs 1/35, P=0.044, Fisherov test) povezan je s pT3 stadijem tumora. pT1a+b stadij češći je u pušača (6/9 vs 9/36, P=0.042, Fisherov test). Ekspresija ER i PRR međusobno snažno pozitivno koreliraju ( $\rho=0.68$ ,  $P<10^{-6}$ )

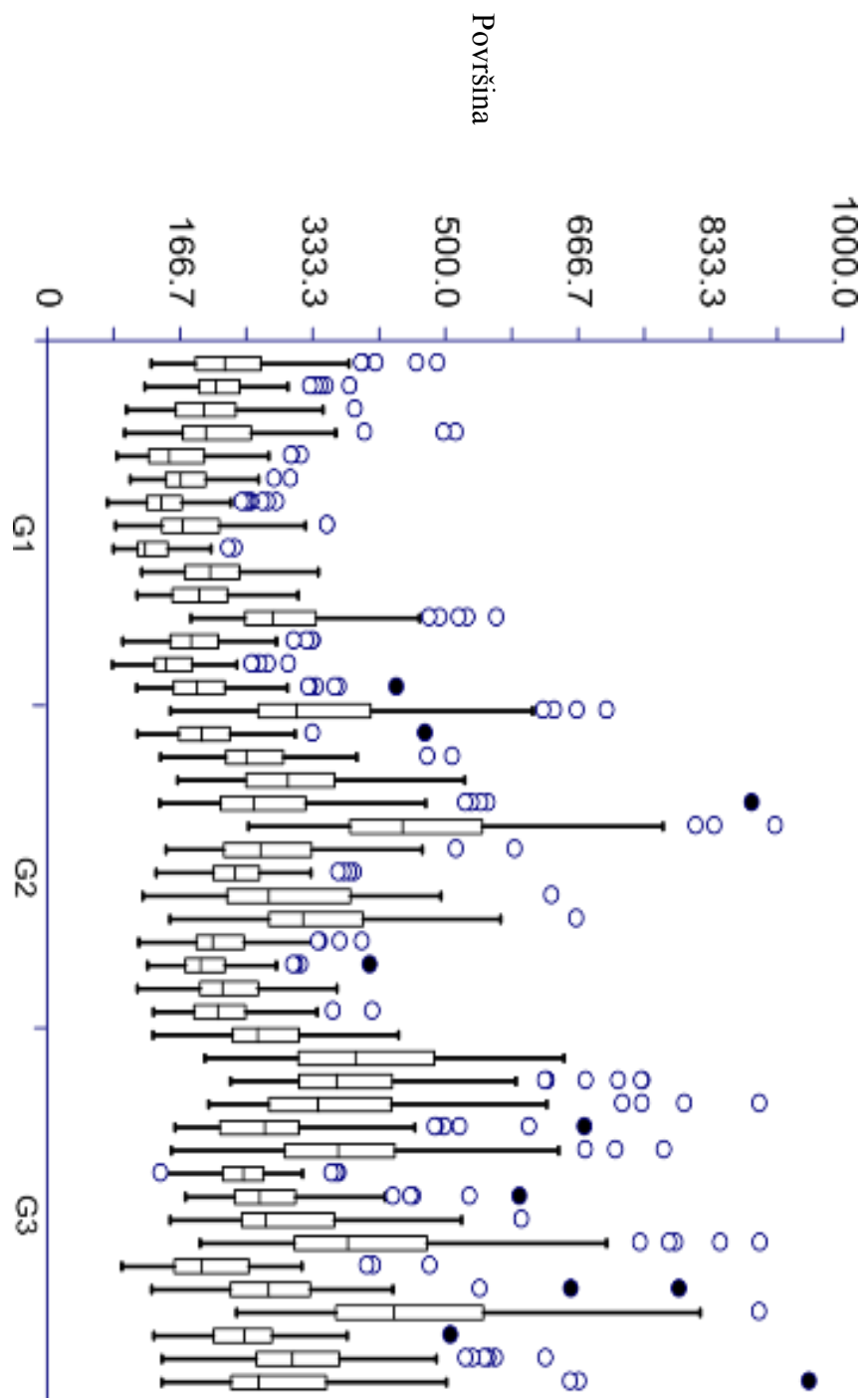
Her 2-pozitivni tumori (n=7) pokazuju značajno nižu ekspresiju PRR [0 (0-2)% vs 70 (30-98)%, P=0.0013, Mann-Whitney test].

Nisu zabilježene razilke u receptorskom statusu, pT i pN stadiju prema paritetu. pN1 stadij povezan je s ranijom prosječnom dobi menarhe [n=15, 12 (12-13) g vs 13 (12-14) g, P=0.028, Mann-Whitney test]. Dojenje i broj reproduktivnih godina u trenutku dijagnoze nisu povezani s niti jednom analiziranom varijablom.

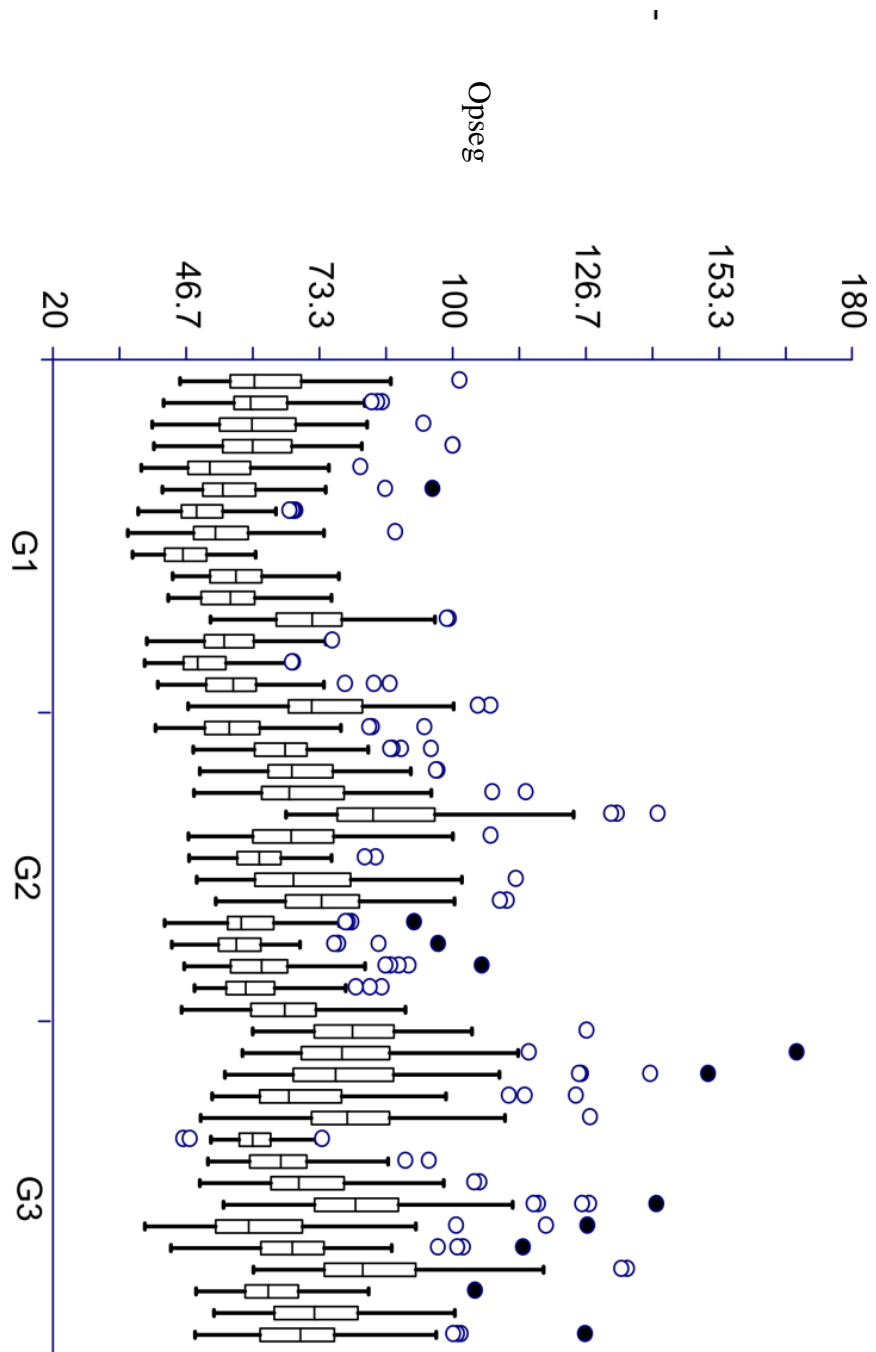
### 5.2.2. Morfometrijske karakteristike

Statistički sažeci morfometrijskih parametara stanice i jezgre prikazani su Slikama 5.3 – 5.12. (○ >1.5xT, ● >3xT).

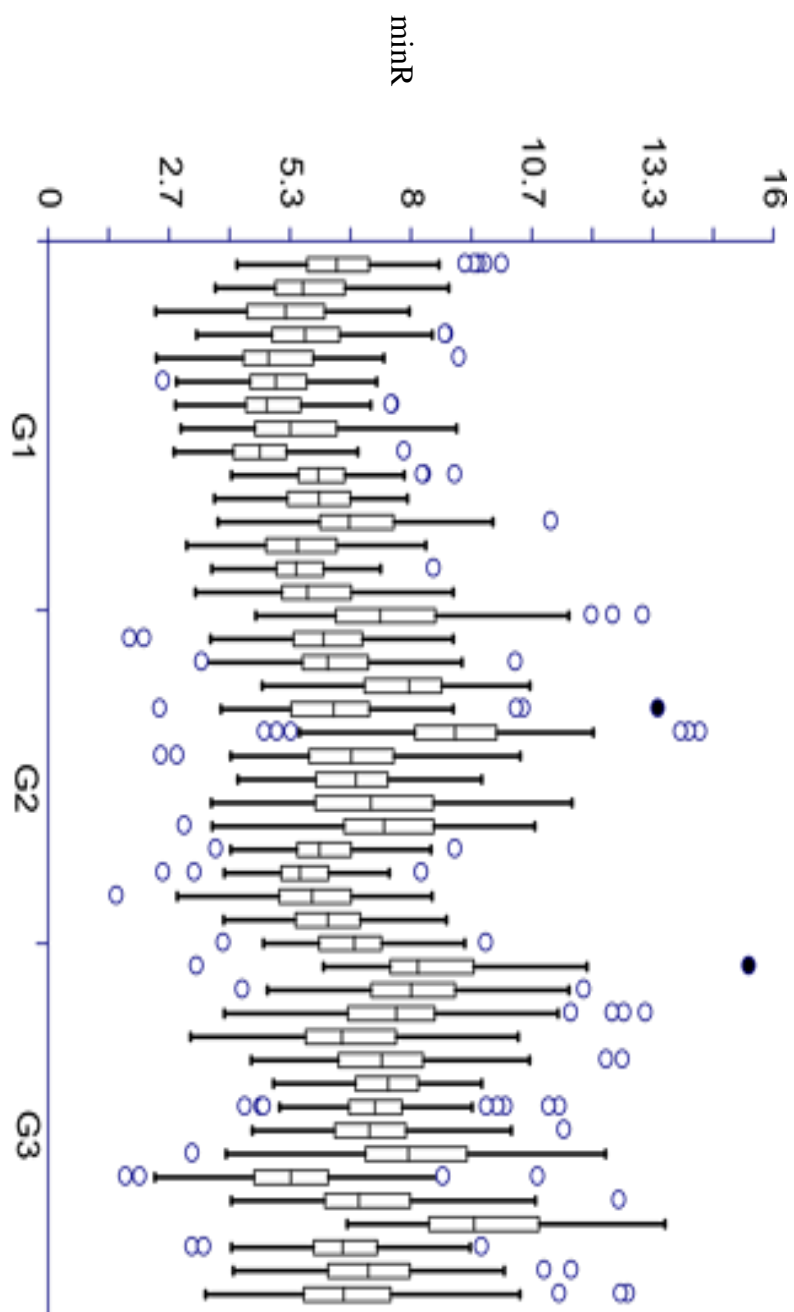




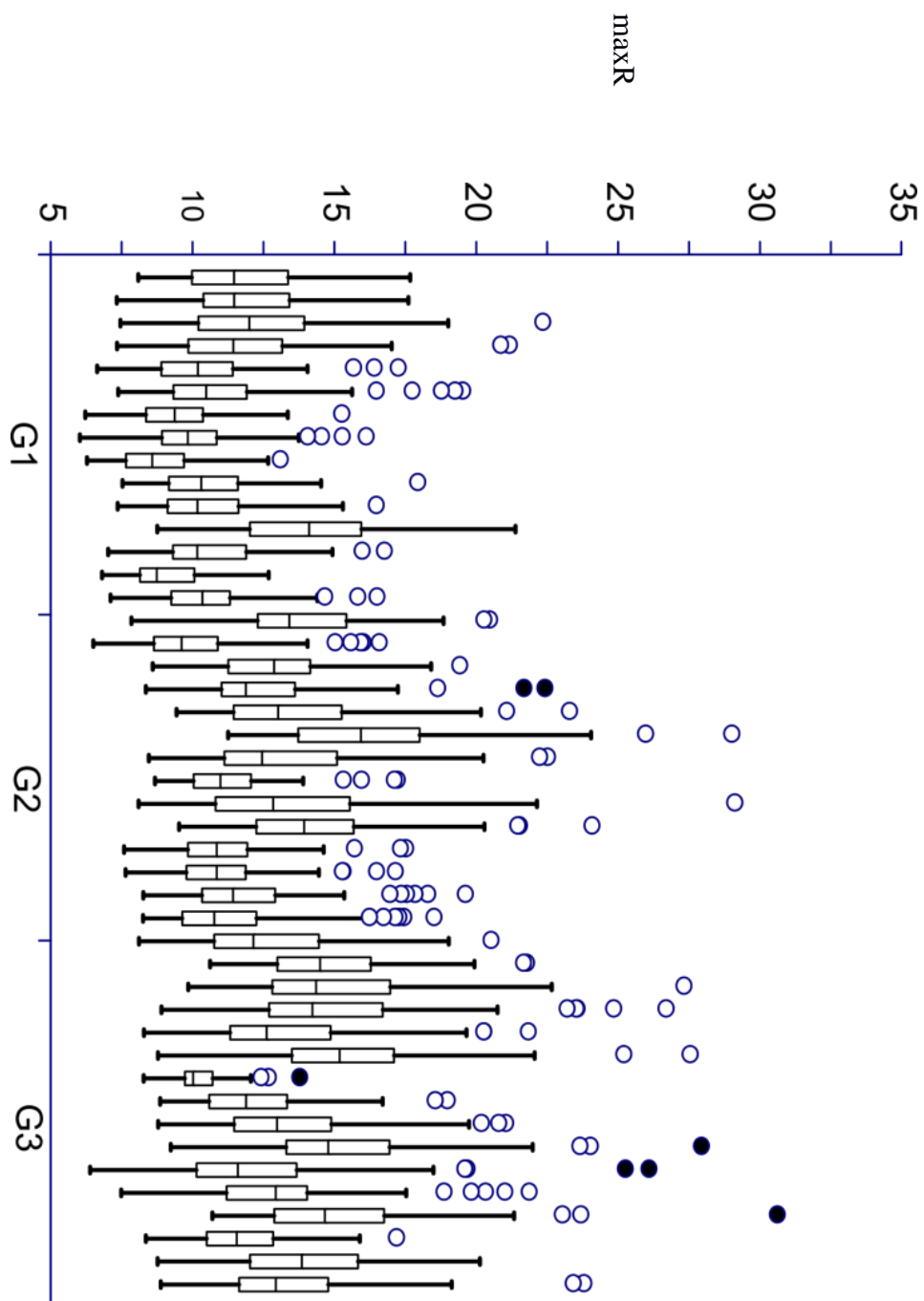
Slika 5.3. Razdioba individualnih planimetrijskih površina stanice [ $\mu\text{m}$ ]<sup>2</sup>, n=45]



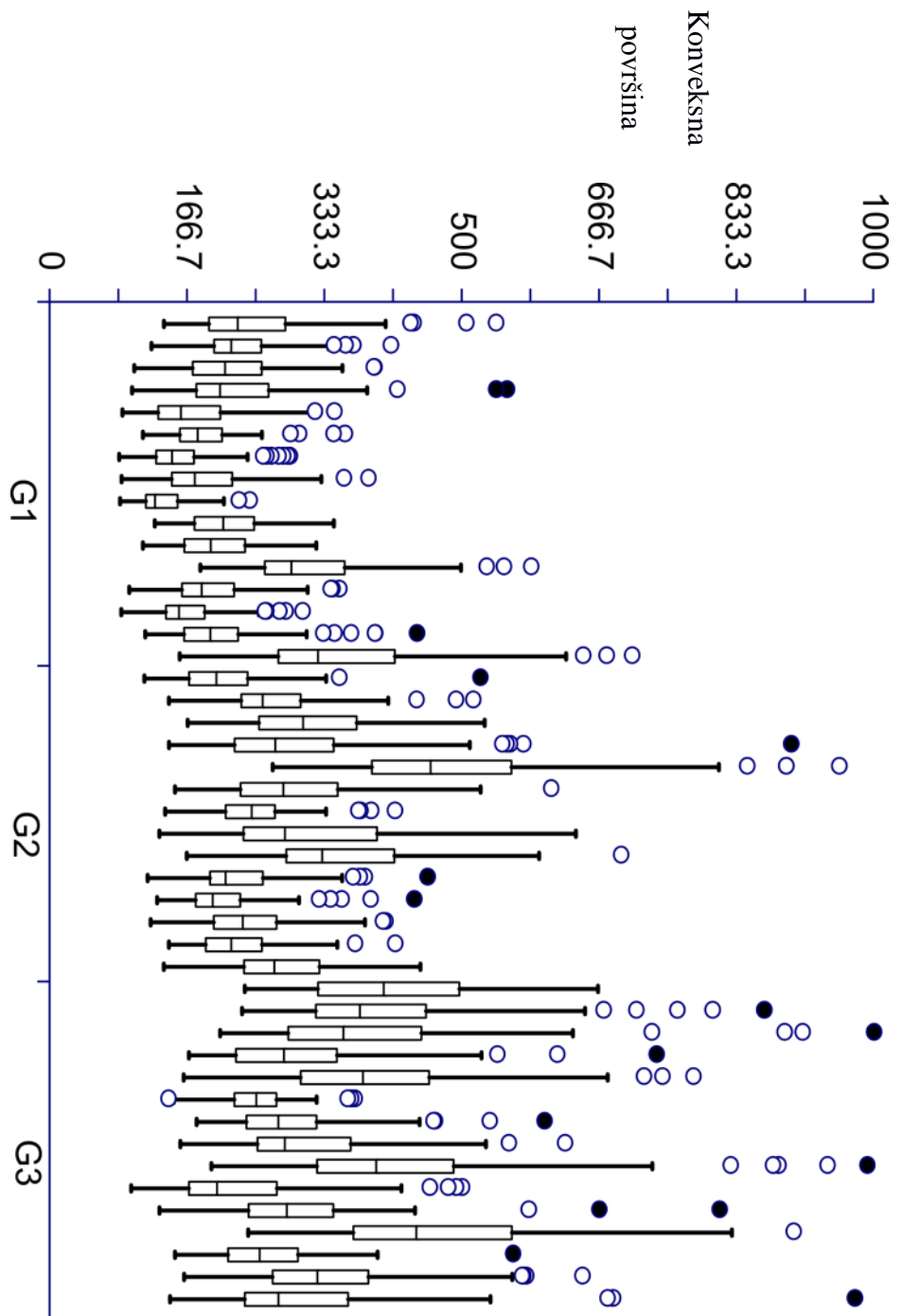
Slika 5.4. Razdioba individualnih opsega stanice (µm, n=45)



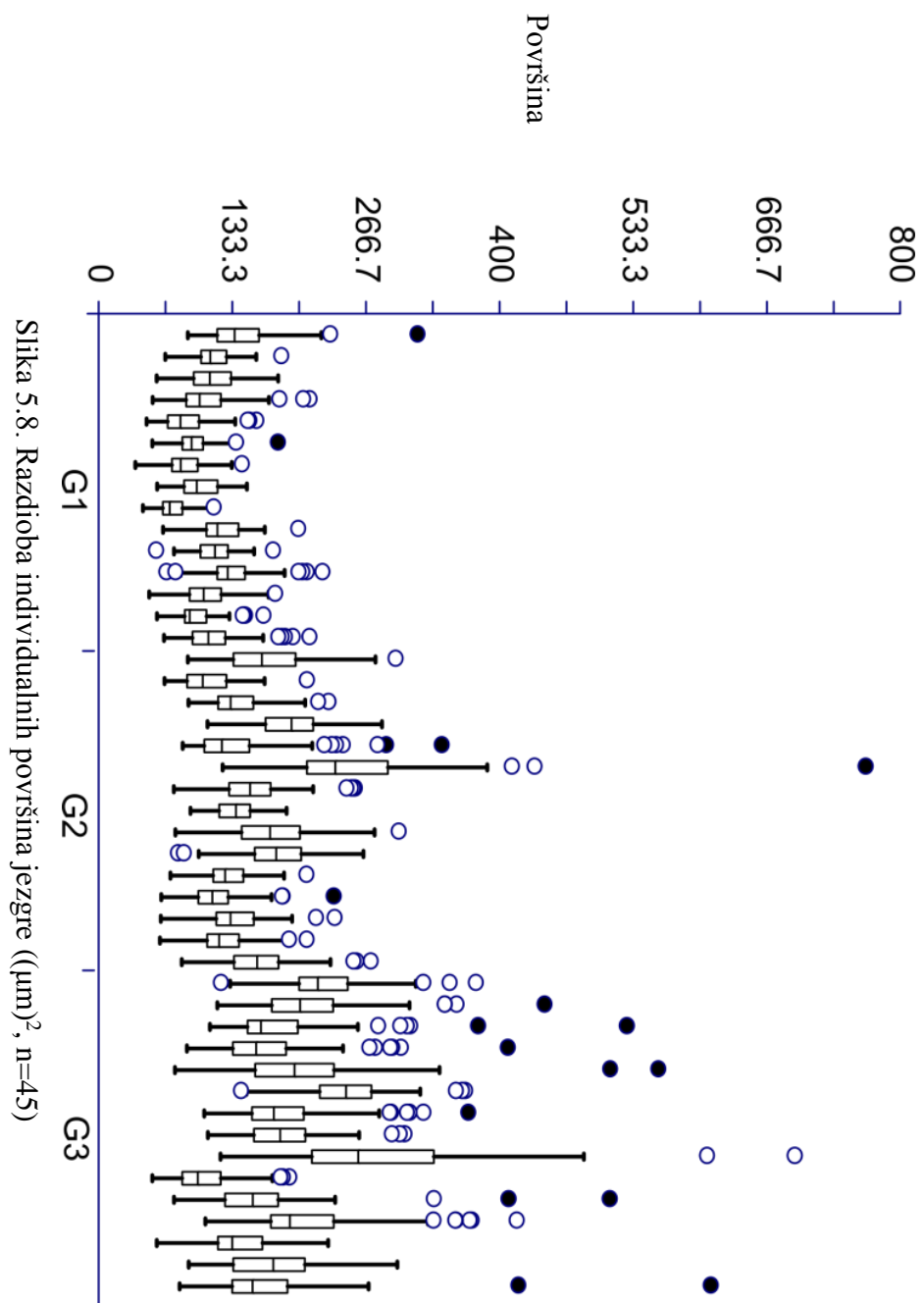
Slika 5.5. Razdioba najmanjih polupjera (minR) stanice (µm, n=45)



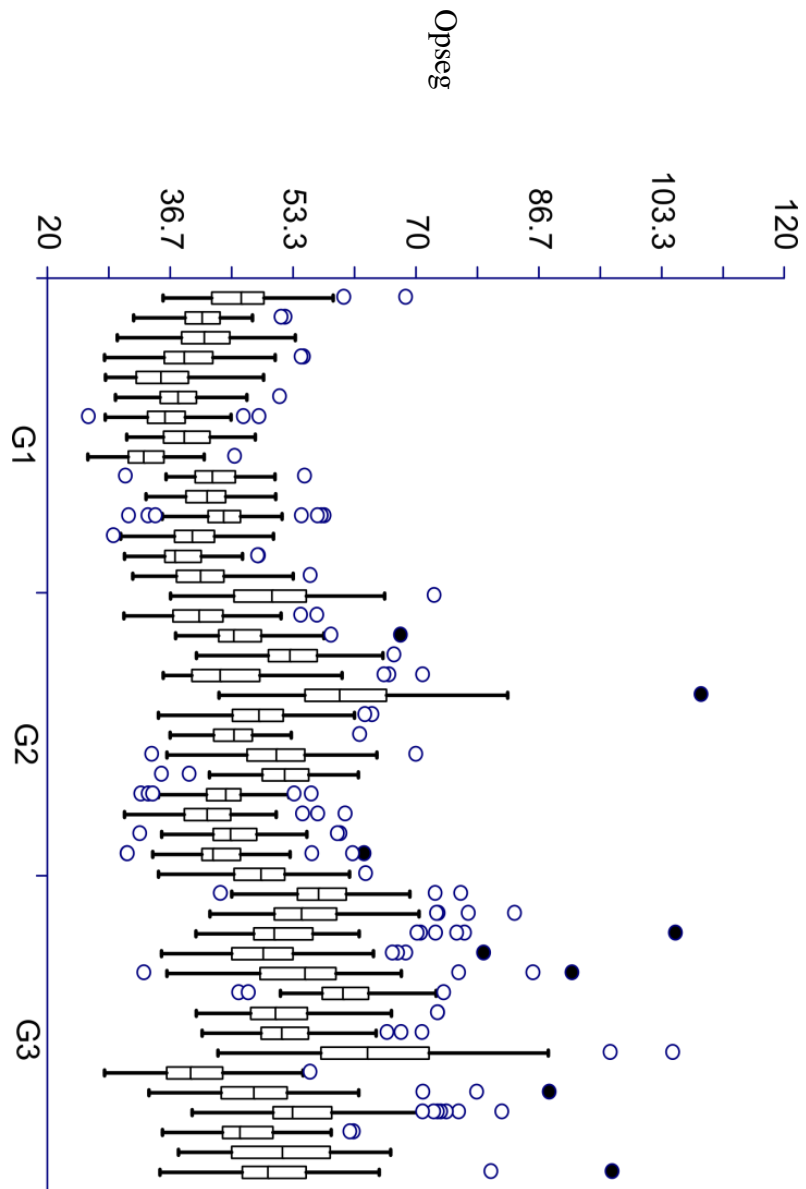
Slika 5.6. Razdioba najvećih polupjera (maxR) stanice (µm, n=45)



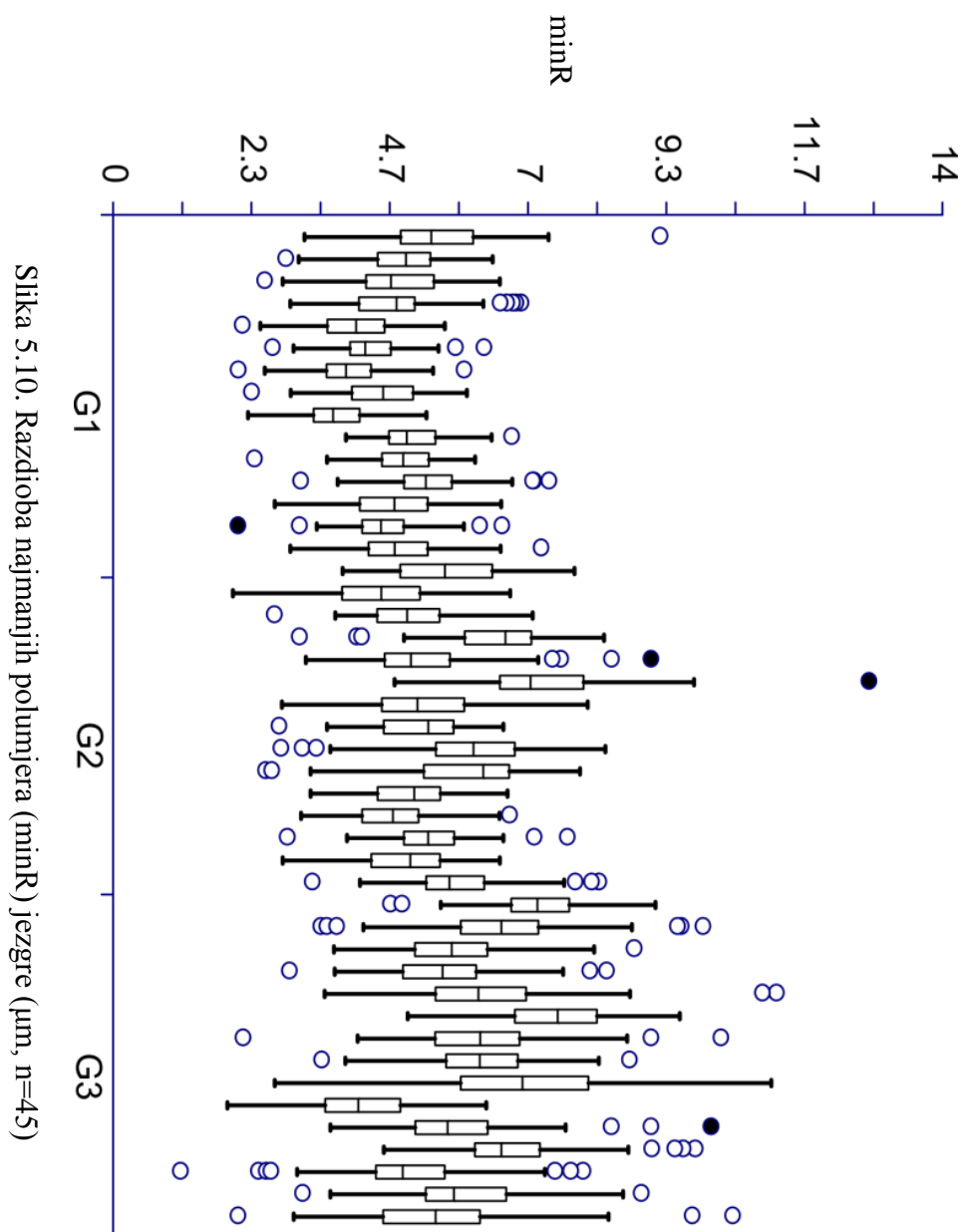
Slika 5.7. Razdioba individualnih konveksnih površina stanice [ $\mu\text{m}^2$ , n=45]



Slika 5.8. Razdioba individualnih površina jezgre ((µm)², n=45)

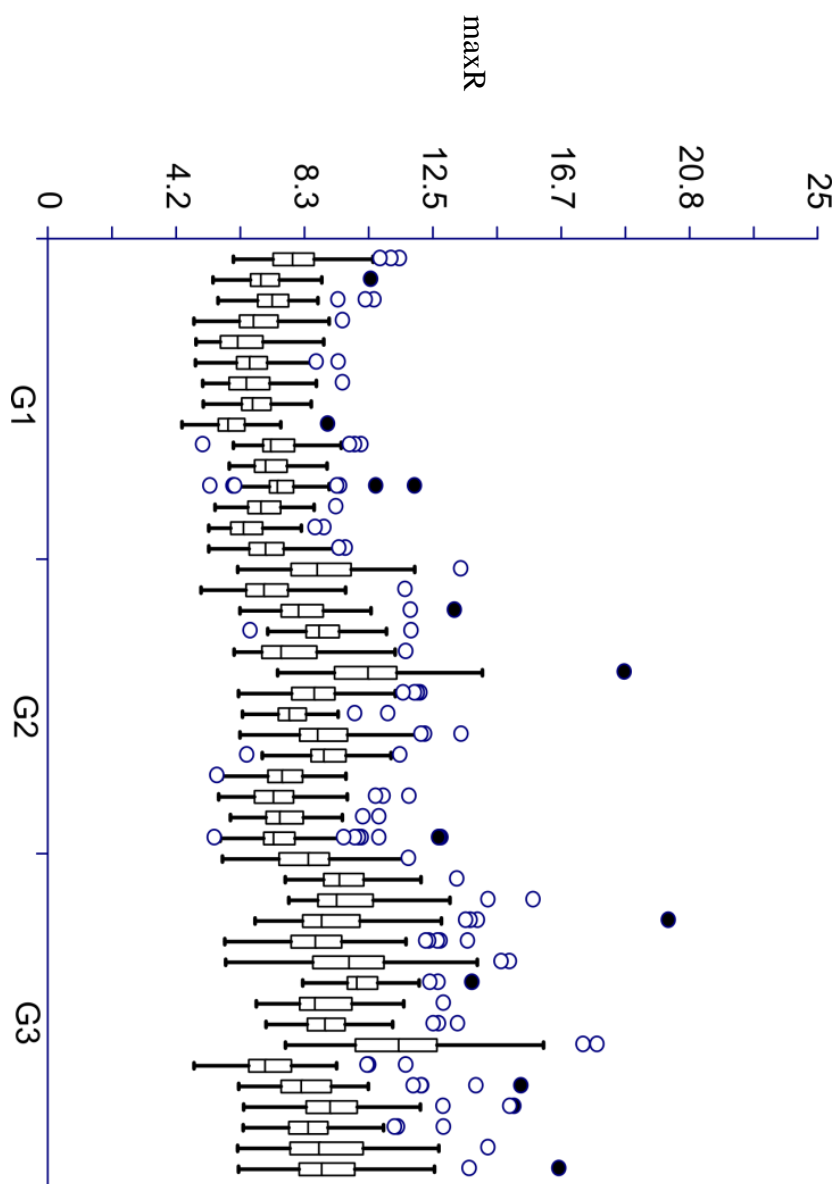


Slika 5.9. Razdioba individualnih opsega jezgre (µm, n=45)

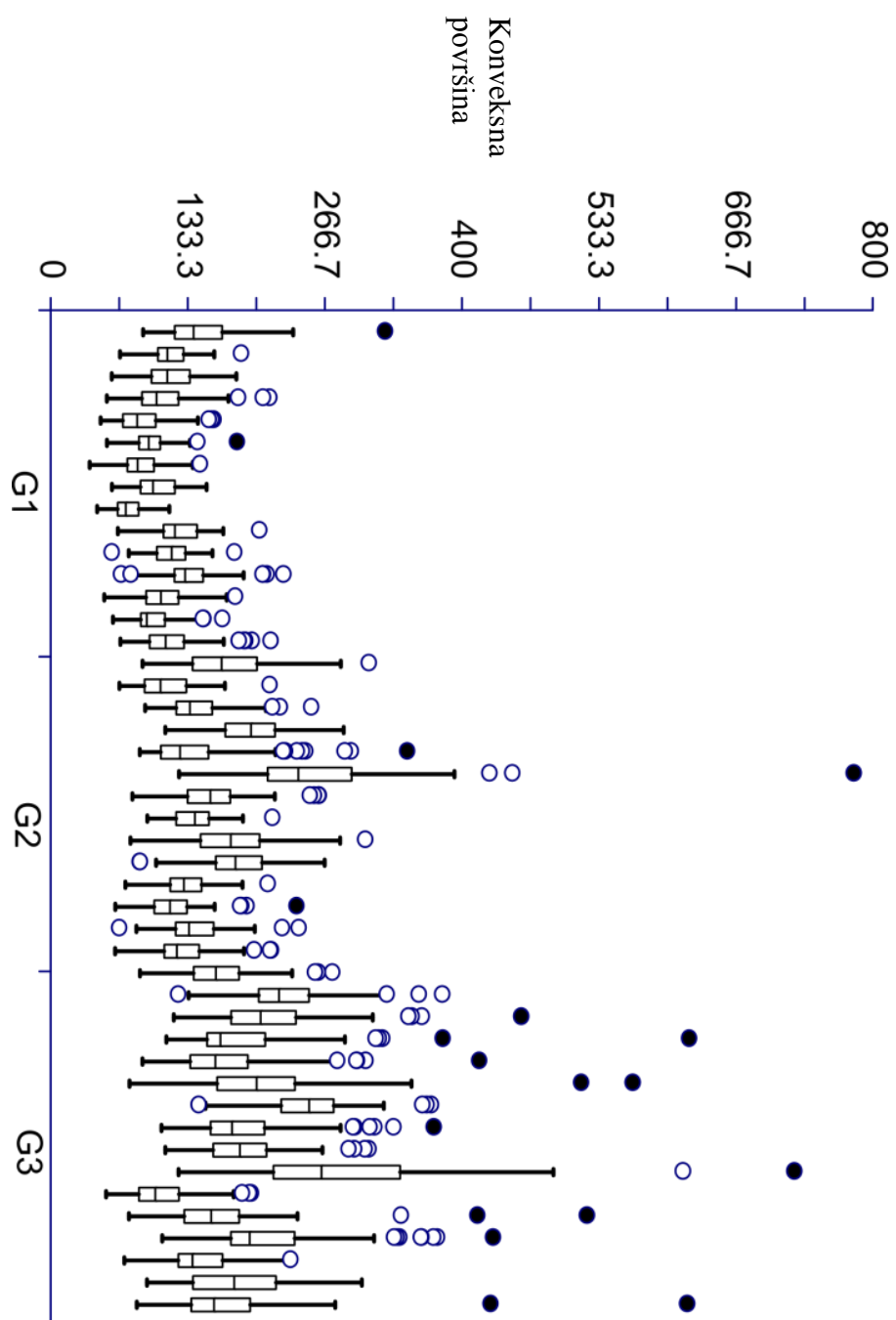


Slika 5.10. Razdioba najmanjih polunijera (minR) jezgre (µm, n=45)





Slika 5.11. Razdioba najvećih polunijera (maxR) jezgre ( $\mu\text{m}$ ,  $n=45$ )



Slika 5.12. Razdioba konveksnih površina jezgre (( $\mu\text{m}$ )<sup>2</sup>, n=45)

Analizom razlika u distribuciji morfometrijskih parametara po gradusu (ugniježđeni model, 15 ispitanika po gradusu, 100 opažanja po ispitaniku, nesignifikantan Shapiro-Wilk test) izdvaja se značajan, stupnjevit porast mjerenih značajki s porastom gradusa. (Tablica 5.5.).

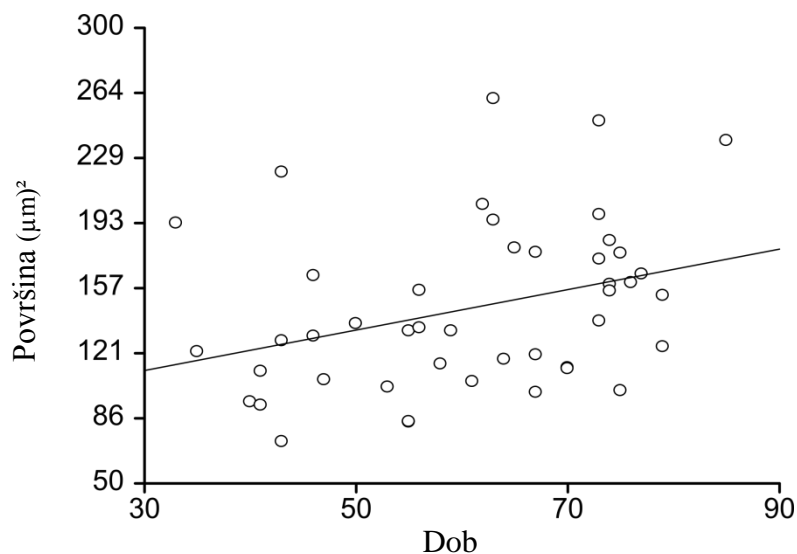
**Tablica 5.5.** Distribucija morfometrijskih parametara stanice i jezgre po gradusu, ugniježđeni model (aritm. sredina ± SD)

	Parametar	G1	G2	G3	P (G)*	% varijance (među gradusima)	% varijance (među ispitanicima, unutar gradusa)
<b>Stanica</b>	<b>površina</b>	197±40.2	280±71	328±71.2	5x10 <sup>-6</sup>	26	72
	<b>opseg</b>	57±6.1	67±8.1	73±7.8	2x10 <sup>-6</sup>	27	70
	<b>minR</b>	5.6±0.6	6.8±0.9	7.4±1	3x10 <sup>-6</sup>	26	70
	<b>maxR</b>	10.9±1.3	12.6±1.6	13.6±1.5	3x10 <sup>-5</sup>	21	75
	<b>konveksna površina</b>	205±42	291±73	341±72.5	3x10 <sup>-6</sup>	26	71
<b>Jezgra</b>	<b>površina</b>	105±18	151±35	182±41.5	3x10 <sup>-7</sup>	32	66
	<b>opseg</b>	40±3.4	48±5.2	52±5.7	2x10 <sup>-8</sup>	37	61
	<b>minR</b>	4.7±0.5	5.5±0.7	6.1±0.9	9x10 <sup>-6</sup>	24	73
	<b>maxR</b>	6.9±0.5	8.3±0.9	9.1±1	2x10 <sup>-7</sup>	41	57
	<b>konveksna površina</b>	108±18	154±35.3	186±41.7	3x10 <sup>-9</sup>	32	66

\* F-statistika (2,42).

Unatoč tome, particijom varijance, gradus je odgovoran za prosječno tek 26, odnosno 35% varijance morfometrijskih obilježja stanice i jezge, uz maksimalni udio za nuklearni maxR, 41%. Glavninu varijance obilježja čine interindividualne i intraindividualne razlike, odnosno heterogenosti među ispitanicima unutar gradusa i unutar tumora istog ispitanika.

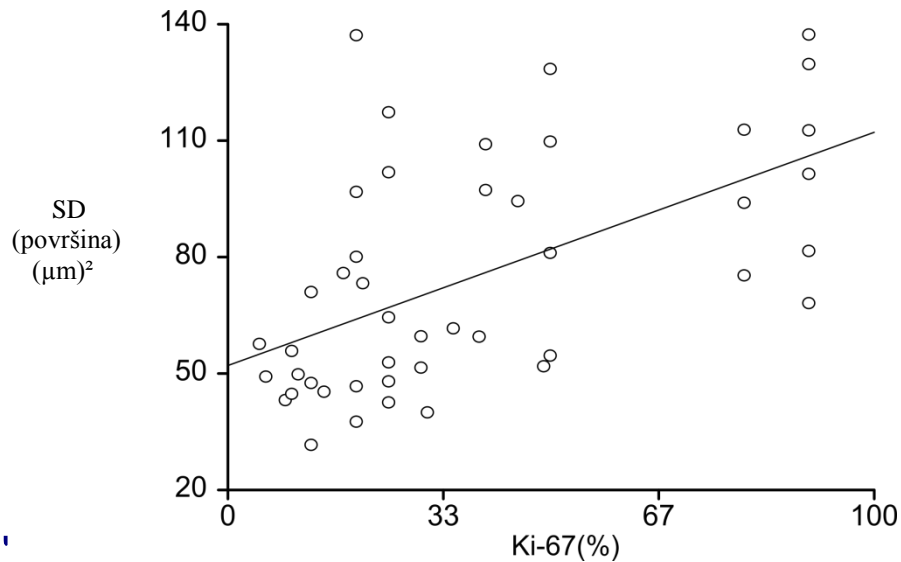
Prosječne vrijednosti i intraindividualne varijance svih staničnih parametara rastu s dobi ispitanika u trenutku dijagnoze (Slika 5.13.), no bez promjena u mjerama oblika stanica i bez promjena u koeficijentima varijacija parametara. Drugim riječima, porast dobi prati porast veličine stanica, a porast veličine razmjerno prati sve izraženija anizocitoza, no bez promjena u obrascu deformacije, odnosno obliku jezgara.



**Slika 5.13.** Odnos dobi (god) i srednje stanične površine, n=45

Stanični opseg ( $\rho=-0.31$ ,  $P=0.042$ ) i maxR ( $\rho=-0.32$ ,  $P=0.031$ ) značajno opadaju s ekspresijom ER; a površina ( $\rho=-0.34$ ,  $P=0.021$ ), opseg ( $\rho=-0.35$ ,  $P=0.019$ ), minR ( $\rho=-0.31$ ,  $P=0.036$ ), maxR ( $\rho=-0.34$ ,  $P=0.024$ ) i konveksna površina ( $\rho=-0.36$ ,  $P=0.014$ ) s ekspresijom PRR. Nasuprot tome, ekspresija proliferacijskog markera Ki-67 snažno je pozitivno povezana s rasapom mjerenih vrijednosti ( $SD: 0.5 < \rho < 0.6$ , maxR < opseg < površina < konveksna površina < minR,  $0.000011 < P < 0.0005$ ), izraženo koeficijentom varijacija

( $0.01 < P < 0.035$ ), no bez učinka na srednje vrijednosti parametara (Slika 5.14). Pri tom, mjere deformiteta nisu povezane s ekspresijom hormonskih receptora.



**Slika 5.14.** Odnos ekspresije Ki-67 i varijabilnosti stanične površine u individualnih ispitanika (N=45)

Her 2-pozitivni tumori odlikuju se značajno većom staničnom površinom [304 (274-354) vs 230 (201-295)  $\mu\text{m}$ ,  $P=0.024$ ], opsegom [72 (66-76) vs 52 (57-70)  $\mu\text{m}$ ,  $P=0.026$ ], minR [7.2 (6.8-7.5) vs 6.2 (5.6-7.1)  $\mu\text{m}$ ,  $P=0.028$ ] i max R [13.7 (12.1-14.3) vs 11.9 (10.5-13.4)  $\mu\text{m}$ ,  $P=0.028$ , Mann-Whitney test].

U pušača, opaža se značajno izraženija anizocitoza, mjereno individualnim koeficijentom varijacije planimetrijske površine stanica (28% vs 24%,  $P=0.044$ ), bez učinka na srednje vrijednosti parametara veličine i oblika.

Slični obrasci vrijede i za nuklearne parametre: opseg, površina, konveksna površina i maxR rastu s dobi i ekspresijom Ki-67, a opadaju s ekspresijom PRR (Tablica 5.6.). MinR marginalno prati porast dobi i ekspresije Ki-67. Niti mjere deformiteta, niti individualni koeficijenti varijacija, odnosno disperzija analiziranih nuklearnih parametara ne ovise o

ekspresiji ER, PRR, Ki-67 ili dobi. Menopauza nije povezana s promjenama u morfometrijskim varijablama, niti stanice, niti jezgre.

**Tablica 5.6.** Spearman koeficijenti korelacija (P-vrijednosti) srednjih vrijednosti izabраних mikromorfometrijskih parametara jezgre i ekspresijskih biljega (N=45)

<b>Parametar</b>	<b>Dob</b>	<b>PRR</b>	<b>Ki-67</b>
<b>površina</b>	0.36 (0.015)	-0.33 (0.029)	0.5 (0.00054)
<b>opseg</b>	0.36 (0.015)	-0.32 (0.031)	0.51 (0.00036)
<b>konveksna površina</b>	0.36 (0.014)	-0.32 (0.03)	0.05 (0.00053)
<b>minR</b>	0.35 (0.019)	NS	0.3 (0.046)
<b>maxR</b>	0.37 (0.012)	-0.36 (0.015)	0.55 (0.00011)

Usporedbom prema pT stadiju, opaža se značajan porast srednjih vrijednosti i staničnih i nuklearnih parametara s porastom veličine tumora (Tablica 5.7.). Nodalno metastatski tumori (n=17) razlikuju se čimbenikom oblika stanica [FF, 0.77 (0.75-0.78) vs 0.79 (0.76-0.8), P=0.035, pN0 vs pN1, Mann-Whitney test].

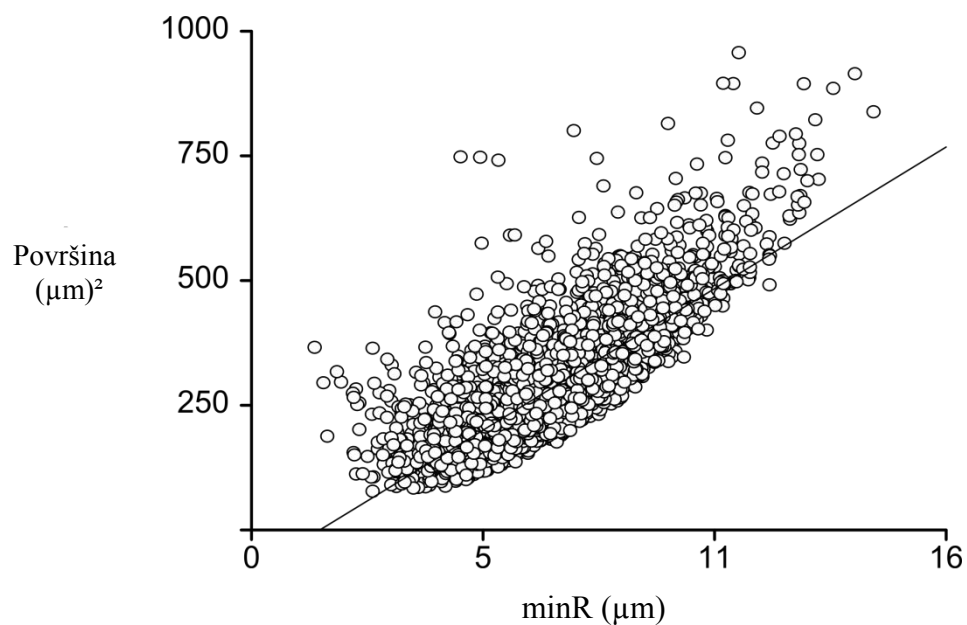
**Tablica 5.7.** Usporedba staničnih i nuklearnih morfometrijskih parametara prema pT stadiju (n=45, Mann-Whitney test)

Parametar	Stanica			Jezgra		
	pT1a+b	pT1c+T2-3	P	pT1a+b	pT1c+T2-3	P
<b>površina</b> [( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup> ]	201 (170-236)	282 (219-329)	0.0094	111 (94-136)	154 (122-178)	0.02
<b>opseg</b> [( $\mu\text{m}$ )]	57 (53-62)	68 (61-74)	0.01	41 (38-459)	49 (43-52)	0.021
<b>minR</b> [( $\mu\text{m}$ )]	5.8 (5.2-6.4)	6.7 (6.1-7.4)	0.01	4.8 (4.4-5.3)	5.5 (5-6.2)	0.03
<b>maxR</b> [( $\mu\text{m}$ )]	11 (9.8-12.1)	13 (11.3-14.1)	0.016	7.1 (6.6-7.7)	8.5 (7.4-9)	0.018
<b>konveksna površina</b> [( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup> ]	210 (178-246)	293 (230-342)	0.009	114 (96-139)	158 (124-182)	0.016

Svi stanični i nuklearni mikromorfometrijski parametri veličine snažno linearno koreliraju s planimetrijskom površinom ( $P < 10^{-7}$ , Tablica 5.8, Slika 5.15.), uz nešto izraženiji rasap staničnog maksimalnog polumjera, maxR s porastom površine. Izuzetak čini opseg, i stanice i jezgre, u pogledu odstupanja od linearnosti u najvišoj kvartili distribucije (Slika 5.16).

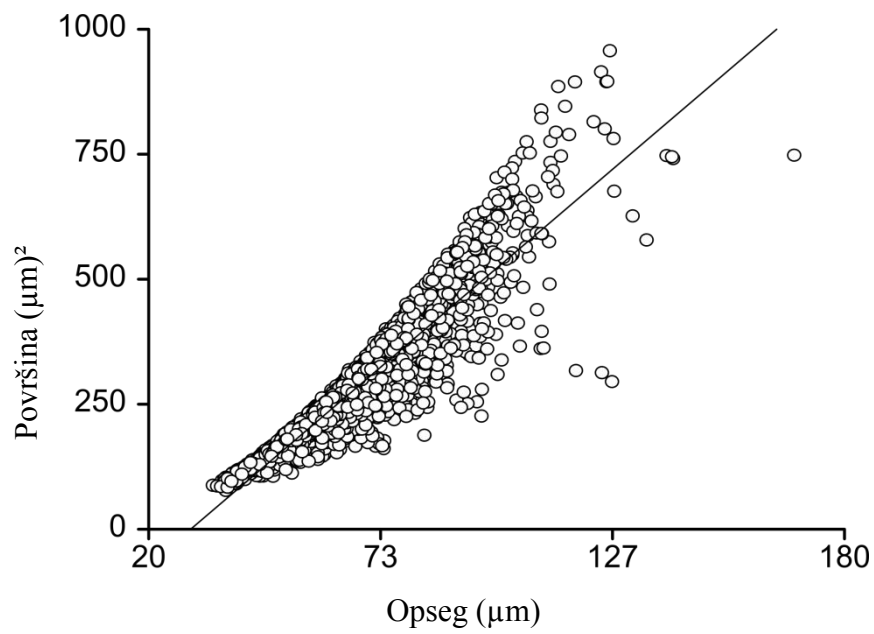
**Tablica 5.8.** Pearsonovi koeficijenti korelacija morfolometrijskih parametara, n=4500

	<b>Parametar</b>	<b>Stanica</b>	<b>Jezgra</b>
<b>površina</b>	<b>opseg</b>	0.93	0.98
	<b>minR</b>	0.79	0.88
	<b>maxR</b>	0.78	0.89
	<b>konveksna površina</b>	0.99	0.99



Slika 5.15. Odnos stanične površine i najmanjeg polumjera stanice (minR), n=4500



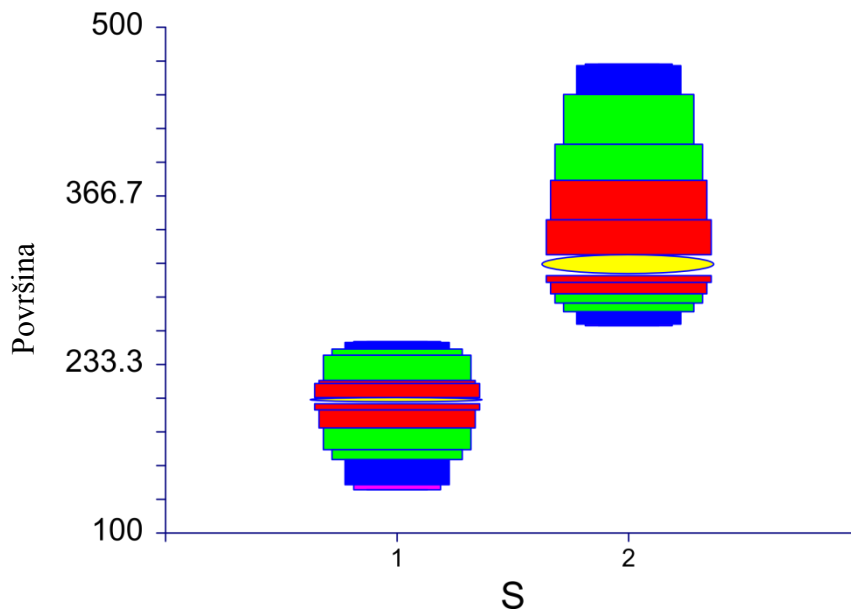


Slika 5.16. Odnos srednje stanične površine i opsega, n=4500

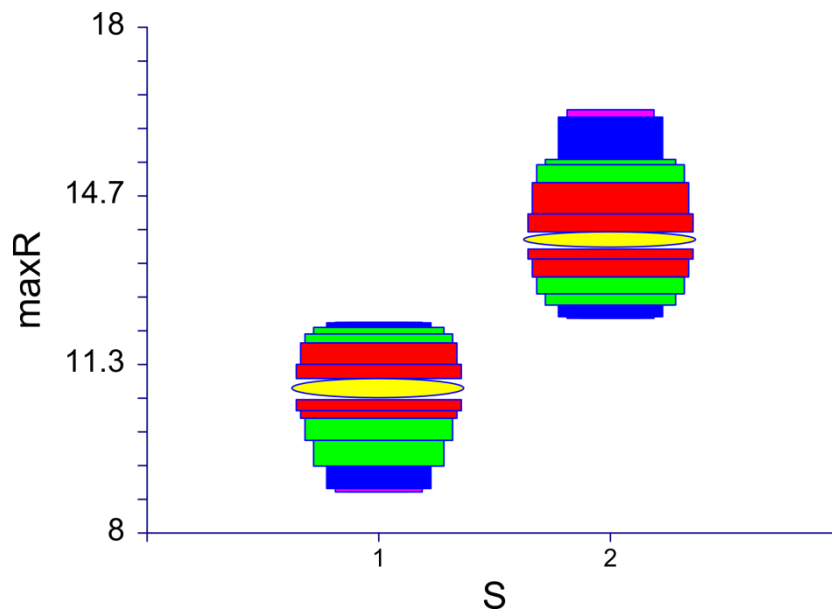
### 5.3 K-medoid grupiranje

#### Morfometrijske varijable

S obzirom na izraženu kolineranost morfometrijskih varijabli, redukcija dimenzionalnosti i analiza staničnih obrazaca provedena je primjenom k-medoid grupiranja na temelju planimetrijske površine, minimalnog i maksimalnog polumjera stanice. Optimalna kvaliteta grupiranja postignuta je izborom 2 skupine, odnosno identifikacijom 2 populacije (SC=0.553), s 23 (S1) i 22 ispitanika (S2), uz kompletnu separaciju po površini (Slika 5.17.) i maxR stanice (Slika 5.18), i gotovo kompletnu separaciju u pogledu minR stanice.



Slika 5.17. Razdioba stanične površine [ $(\mu\text{m})^2$ ] prema morfometrijskim skupinama.



Slika 5.18. Razdioba najvećeg polumjera stanice ( $\mu\text{m}$ ) prema morfometrijskim skupinama.

U slijedećem koraku, testirana je povezanost dviju morfometrijski različitih populacija s pT/N stadijem, gradusom, ekspresijskim biljezima, pušenjem i reproduktivnom anamnezom, odnosno analizirana je diskriminacijska i prediktivna sposobnost morfometrijskih parametara za modificirani pT stadij i gradus.

### **pT, pN, gradus**

Dvije populacije identificirane grupiranjem na temelju morfometrijskih parametara značajno se razlikuju distribucijom pT stadija: makrocitoza je povezana sa značajnom većim udjelom pT1c+T2-3 tumora (19/22 vs 12/23,  $P=0.023$ , Fisherov test). Također, makrocitoza je povezana sa značajnim porastom udjela G3 lezija (12/22 vs 3/23, Tablica 5,  $P=0.005$ ). pN stadij nije povezan s morfometrijskim karakteristikama dviju skupina.

**Tablica 5.9.** Razdioba gradusa prema morfometrijskim skupinama (N=45)

Skupina	Gradus		
	1	2	3
S1	14	6	3
S2	1	9	12

**Dob, Her-2, ER, PRR, Ki-67**

S2 skupina odlikuje se značajno višom dobi ispitanika u trenutku dijagnoze, u prilog povezanosti anizomakrocitoze s dobi bolesnika ( $65 \pm 13.7$  vs  $56 \pm 12.2$  god,  $P=0.025$ , t-test, Levene  $P=0.758$ ), kao i značajno nižom ekspresijom PRR [40 (0-50) vs 90 (24-100)%,  $P=0.021$ ], te značajno višom ekspresijom proliferacijskog biljega Ki-67 [45 (25-80) vs 20 (11-30)%,  $P=0.0004$ , Mann-Whitney test]. Nema značajnih razlika u ekspresiji ER i Her-2.

**Reproduktivna anamneza**

Dob menarhe, broj reproduktivnih godina u trenutku dijagnoze, paritet, i dob menopauze ne razlikuju se među morfometrijskim skupinama.

**Navike**

Makrocitoza (S2) je značajno rjeđa u pušača (1/22 vs 8/23 ispitanika,  $P=0.022$ , Fisherov test).

Testiranje je u cijelosti ponovljeno i grupiranjem ispitanika prema morfometrijskim obrascima jezgre. Optimalna separacija postignuta je s 2 skupine ( $SC=0.591$ ), s 25 i 20 ispitanika, uz kompletnu separaciju po svim parametrima, izuzevši maxR jezgre.

**pT, pN, gradus**

Dvije populacije identificirane grupiranjem na temelju morfometrijskih parametara značajno se razlikuju gradusom, ali ne i pT stadijem lezija: anizomakronukleoza (S2) je povezana sa značajnom većim udjelom G2 (8/23 vs 7/7, P=0.00063, G2 vs G1, Fisherov test) i G3 lezija. Također, makronukleoza je povezana sa značajnim porastom udjela G3 lezija (2/17 vs 13/13, G3 vs G1, Tablica 6, P=0.0000016). pN stadij nije povezan s morfometrijskim obrascima jezgre.

**Tablica 5.10.** Razdioba gradusa prema morfometrijskim skupinama (N=45)

Skupina	Gradus		
	1	2	3
S1	15	8	2
S2	0	7	13

**Dob, Her-2, ER, PRR, Ki-67**

S2 skupina odlikuje se značajno višom dobi ispitanika u trenutku dijagnoze, u prilog povezanosti anizomakronukleoze s dobi bolesnika [55 (44-66) vs 73 (62-74) god, P=0.0059, Mann-Whitney test], kao i značajno višom ekspresijom proliferacijskog biljega Ki-67 [50 (25-80) vs 20 (12-31)%, P=0.0004]. Nema značajnih razlika u ekspresiji PRR, ER i Her-2.

**Reproduktivna anamneza**

Dob menarhe, broj reproduktivnih godina u trenutku dijagnoze, paritet, i dob menopauze ne razlikuju se među morfometrijskim skupinama.

## Navike

Makronukleoz (S2) je značajno rjeđa u pušača (1/20 vs 8/25 ispitanika, P=0.03, Fisherov test).

## Obrasci ekspresije

S obzirom na složene međudnose u ekspresiji hormonskih receptora i biljega, koekspresijski obrasci identificirani su k-medoid grupiranjem sličnosti. Optimalno grupiranje postignuto je uz 2 skupine (SC=0.542), karakterizirane disparatnom ekspresijom hormonskih receptora, Her-2 i Ki-67 biljega:

**Tablica 5.11.** Koekspresijski obrasci karakterizirani disparatnom ekspresijom hormonskih receptora, Her-2 i Ki-67 biljega (N=45)

Skupina	ER	PRR	Ki-67	Her-2
<b>E1 (n=34)</b>	↑↑	↑↑	↓	+
<b>E2 (n=11)</b>	↓	↓	↑↑	-

ER i PRR snažno pozitivne lezije karakterizirane su dominantno (42/45), premda ne isključivo, niskom ekspresijom proliferacijskog biljega Ki-67 i pozitivnim Her-2, i obratno. U 3 ispitanika, zapažen je triple-low (ER/PRR/Ki-67) obrazac.

## pT, pN, gradus

Razlike u obrascima koekspresije udružene su s razlikama u razdiobi pT stadija (Tablica 7): pT3 tumori češći su u E2 skupini (4/11 vs 0/34, P=0.0022, Fisherov test).

**Tablica 5.12.** Razdioba pT stadija prema koekspresijskim obrascima (N=45)

Skupina	pT1a+b	pT1c+T2	pT3+
<b>E1</b>	12	21	0
<b>E2</b>	1	6	4

pN status nije povezan s ekspresijskim obrascima (P=0.072, Fisherov test).

Također, razlike u obrascima koekspresije udružene su s razlikama u gradiranju lezija (Tablica 5.13.): G3 lezije značajno su češće u E2 skupini (9/11 vs 6/34, P=0.00022, Fisherov test).

**Tablica 5.13.** Gradiranje prema koekspresijskim obrascima (N=45)

Skupina	G1	G2	G3
<b>E1</b>	14	14	6
<b>E2</b>	1	1	9

Dob, navika pušenja i reproduktivna anamneza ne razlikuju se među ekspresijskim skupinama.

### Morfometrijske varijable

E2 skupina karakterizirana je porastom parametara veličine stanice i jezgre, bez razlika u obliku i deformitetu staničnih populacija (Tablica 5.14.).

**Tablica 5.14.** Razdioba morfolometrijskih parametara po ekspresijskim obrascima (Mann-Whitney test, n=45)

Parametar	Stanica			Jezgra		
	E1	E2	P	E1	E2	P
<b>površina</b> [( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup> ]	221 (198- 291)	304 (273- 379)	0.004	125 (106- 158)	178 (134- 194)	0.033
<b>opseg</b> ( $\mu\text{m}$ )	61 (56-70)	72 (66- 80)	0.011	44 (40- 50)	52 (46- 54)	0.013
<b>minR</b> ( $\mu\text{m}$ )	6.2 (5.6- 6.9)	7.2 (6.6- 7.6)	0.00083	5 (4.7- 5.7)	6.2 (5.2- 6.4)	0.025
<b>maxR</b> ( $\mu\text{m}$ )	12 (10-13)	14 (12- 15)	0.0022	7.6 (7- 7.8.8)	8.9 (8.3- 9.3)	0.0096
<b>konveksna</b> <b>površina</b> [( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup> ]	230 (205- 303)	316 (282- 396)	0.0026	128 (109- 162)	180 (138- 198)	0.013

#### 5.4. GEE

U generaliziranom linearnom modelu, ekspresija Her-2, PRR i Ki-67 značajna je odrednica morfolometrijskih parametara veličine i stanice i jezgre, uz značajan dodatni učinak i ER na parametre veličine stanice, odnosno dobi na parametre veličine jezgre (Tablica 5.15.).



**Tablica 5.15.** Povezanost receptorskog statusa, dobi, proliferacijskih biljega i pušenja s mikromorfometrijskim značajkama stanice i jezgre (GEE model, regresijski koeficijenti ± SE, s P-vrijednostima).

	Parametar	Her-2*	ER	Pušenje*	Dob	PRR	Ki-67
Stanica	površina	-60±21 (0.004)	- 0.65±0.31 (0.034)	0.23	0.219	-0.69±0.25 (0.007)	1.56±0.79 (0.00007)
		opseg	- 7.9±2.7 (0.003)	- 0.09±0.03 (0.008)	0.149	0.118	-0.08±0.03 (0.006)
	minR	- 0.7±0.2 (0.003)	0.145	0.548	0.395	- 0.009±0.00 4 (0.007)	0.019±0.00 6 (0.002)
	maxR	- 1.6±0.6 (0.004)	- 0.02±0.00 6 (0.004)	0.06	0.068	- 0.02±0.006 (0.011)	0.04±0.007 (0.0000007 )
Jezgra	površina	- 217±11 0 (0.047)	0.324	0.092	10±5 (0.044)	-3.2±1.5 (0.032)	8.4±2.24 (0.0001)
		opseg	-42±16 (0.007)	0.149	38±19 (0.05)	1.6±0.8 (0.034)	-0.6±0.24 (0.014)
	minR	0.087	0.455	0.142	0.054	0.064±0.02 8 (0.021)	0.13±0.04 (0.003)
	maxR	- 2.2±1.1 (0.047)	0.324	0.092	0.1±0.0 5 (0.044)	- 0.03±0.015 (0.032)	0.08±0.02 (0.0002)

\* Referentne skupine: Her-2=0, nepušači.

U kombiniranom modelu, združenim modeliranjem značajnih varijabli iz prvog koraka za svaki morfometrijski parametar, perzistira samo značajan, robustan rezidualni učinak Ki-67 biljega, uz dodatni marginalni neovisni učinak i PRR na minR stanice, odnosno dobi na površinu i opseg jezgre (Tablica 5.16., prikazane su samo značajne asocijacije).

**Tablica 5.16.** Kombinirani model učinaka dobi i ekspresijskih biljega na morfometrijske značajke stanice i jezgre (GEE, regresijski koeficijenti  $\pm$  SE s P-vrijednostima).

	<b>Parametar</b>	<b>Dob</b>	<b>PRR</b>	<b>Ki-67</b>
<b>Stanica</b>	<b>površina</b>	NS	NS	1.4 $\pm$ 0.6 (0.0007)
	<b>opseg</b>	NS	NS	0.2 $\pm$ 0.05 (0.0001)
	<b>minR</b>	NS	-0.006 $\pm$ 0.003 (0.041)	0.017 $\pm$ 0.006 (0.007)
	<b>maxR</b>	NS	NS	0.03 $\pm$ 0.008 (0.0002)
<b>Jezgra</b>	<b>površina</b>	8.2 $\pm$ 4.2 (0.05)	NS	7.3 $\pm$ 2.9 (0.01)
	<b>opseg</b>	1.3 $\pm$ 0.6 (0.039)	NS	1.1 $\pm$ 0.47 (0.023)
	<b>minR</b>	NS	NS	0.11 $\pm$ 0.05 (0.02)
	<b>maxR</b>	NS	NS	0.077 $\pm$ 0.027 (0.004)

### 5.5. Klasifikacijski značaj

U poglavlju 5.2.2. pokazali smo postojanje značajnih, stupnjevito rastućih razlika u morfometrijskim značajkama jezgre i stanice između pojedinih gradusa. U problemu klasifikacije, odnosno uspješnosti gradiranja citoloških razmaza na temelju mjerenih morfometrijskih značajki, pitanje je jesu li ove razlike dovoljno velike i specifične za pouzdano i jednoznačno razvrstavanje razmaza u graduse na temelju mjera jezgre i stanice.

Slično pitanje vrijedi i za ekspresijske obrasce, na temelju prethodno utvrđene povezanosti odabranih ekspresijskih biljega s gradusom lezije.

Za odgovor na ovo pitanje, koristiti ćemo GEE model, kao test povezanosti distribucije individualnih mjera jezgre i stanice s gradusom lezije ispitanika, uz prilagodbu za ekspresijske profile PRR, Ki-67 i dob ispitanika. Izbor PRR i Ki-67 temelji se na rezultatima razlika u ekspresijskim modelima među G skupinama (Poglavlje 5.2.2.) i na rezultatima povezanosti ekspresijskih profila s morfometrijskim značajkama jezgre i stanice (Poglavlje 5.3).

Svi morfometrijski parametri jezgre i stanice značajno su povezani s gradusom, u skladu s rezultatima modela utemeljenog na analizi prosječnih vrijednosti parametara.

**Tablica 5.17.** Povezanost gradusa s morfometrijskim i ekspresijskim značajkama tumora (GEE, ordinalna skala, regresijski koeficijenti  $\pm$  SE, P vrijednosti)

Parametar	Jezgra			Stanica		
	površina	opseg	minR	površina	opseg	minR
-						
	0.001 $\pm$ 0.0001 (5 $\times$ 10 <sup>-9</sup> )	-0.003 $\pm$ 0.0004 (2 $\times$ 10 <sup>-8</sup> )	-0.016 $\pm$ 0.003 (9 $\times$ 10 <sup>-8</sup> )	-0.006 $\pm$ 0.0014 (8 $\times$ 10 <sup>-5</sup> )	-0.042 $\pm$ 0,008 (5 $\times$ 10 <sup>-7</sup> )	-0.31 $\pm$ 0.06 (3 $\times$ 10 <sup>-7</sup> )

U kombinaciji s ekspresijskim profilima i dobi, međutim, stanična površina, opseg i maxR ne pridonose niti značajno niti dodatno klasifikaciji lezija. Nasuprot tome,

reprezentativni parametri jezgre neovisno su udruženi s gradusom (Tablica 5.18., uključujući i maxR, P=0.0002), zajedno s ekspresijskim profilom Ki-67, PRR i dobi.

**Tablica 5.18.** Povezanost gradusa s morfometrijskim i ekspresijskim značajkama tumora (GEE, ordinalna skala, regresijski koeficijenti ± SE, P vrijednosti)

Parametar	Jezgra			Stanica		
	površina	opseg	minR	površina	opseg	minR
	- 0.001±0.0001 (0.0002)	- 0.002±0.0004 (0.0006)	-0.18±0.059 (0.002)	0.089	0.153	0.001±0.0089 (0.002)
<b>PRR</b>	0.019±0.007 (0.006)	0.019±0.007 (0.005)	0.019±0.007 (0.007)	- 0.019±0.007 (0.008)	- 0.019±0.008 (0.016)	-0.019±0.008 (0.016)
<b>Ki-67</b>	-0.094±0.017 (6x10 <sup>-8</sup> )	-0.094±0.017 (7x10 <sup>-8</sup> )	- 0.093±0.017 (6x10 <sup>-8</sup> )	-0.09±0.017 (9x10 <sup>-8</sup> )	- 0.092±0.017 (7x10 <sup>-8</sup> )	-0.093±0.017 (5x10 <sup>-8</sup> )
<b>Dob</b>	0.034±0.017 (0.044)	0.038±0.017 (0.026)	0.035±0.017 (0.037)	- 0.035±0.018 (0.047)	- 0.037±0.017 (0.031)	-0.035±0.016 (0.031)

Doprinos poboljšanju klasifikacije morfometrijskih i ekspresijskih parametara pojedinačno i zajednički procijenjen je diskriminantnom analizom.

Na pojedinačnoj razini, prethodno testirani značajni parametri (dob, PRR, Ki-67, Poglavlje 5.2.2.) umanjuju klasifikacijsku grešku 17, 37 i 50%, uz značajan neovisan učinak samo Ki-67. Od morfometrijskih parametara, opseg jezgre (50%), opseg stanice (43%), površina jezgre (43%), i maxR jezgre (57%) pojedinačno najznačajnije pridonose poboljšanju klasifikacije, uz značajni, no manji učinak i preostalih parametara i stanice i

jezgre (33-40%). U kombiniranom modelu, informacijski očekivano dominira maxR jezgre. U pogledu strukture pogrešno klasificiranih lezija, dominira pomak u višu kategoriju (9/13 instanci).

U konačnici, u združenom modelu morfoloških (maxR) i bioloških parametara (Ki-67), dodatak Ki-67 najvećem polumjeru jezgre (maxR) značajno umanjuje klasifikacijsku grešku, ukupno 73% (Tablica 14). Pri tom, prevladava podcjenjivanje stvarnog gradusa (6/8) pogrešno klasificiranih lezija.

Za skup ispitanica s pouzdanom dobi menopauze (n=41), postmenopauzalni status u trenutku dijagnoze, kao varijabla, umanjuje klasifikacijsku grešku 27%. U kombinaciji s maxR jezgre i Ki-67, perzistira neovisno dodatno značajno poboljšanje u klasifikaciji (P=0.01), ukupno 85%, s trendom podcjenjivanja stvarnog gradusa u G3 kategoriji (3/4 instance). Treba, međutim, oprezno zapaziti smanjenje robustnosti i potencijala generalizacije ovog rezultata smanjenjem veličine uzorka.

Time je opisan klasifikacijski doseg srednjih mjerenih vrijednosti analiziranih morfometrijskih parametara u individualnih ispitanika. Nema značajne klasifikacijske vrijednosti u pogledu primjene ostalih momenata distribucije i mjera varijabilnosti mjerenih vrijednosti u individualnih ispitanika (podaci nisu prikazani) (88, 89).

**Tablica 5.19.** Klasifikacijski potencijal maxR/Ki-67 modela

Stvarna skupina	Predviđanje		
	G1	G2	G3
G1	14	1	0
G2	2	12	1
G3	0	4	11

# 6. RASPRAVA

## Gradiranje na citološkom materijalu

U medicinskoj literaturi postoje brojni dokazi dijagnostičke i prognostičke vrijednosti histološkog gradiranja invazivnog karcinoma dojke (Davis i sur. 1986. (90), Contesso i sur. 1987. (91) i 1989. (92), Elston i Ellis, 1991. (63)). Razne studije ukazale su na superiornost *core* biopsije nad citološkom punkcijom prije svega radi potencijala iste u razdvajanju *in situ* lezija od invazivnih karcinoma i mogućnosti prognostičkog prikaza tumorskih karakteristika (93). Točna predoperativna dijagnoza s iskazanim gradusom tumora ukazuje na predvidivo biološko ponašanje tumora te omogućuje kvalitetno planirani kirurški pristup te određuje hitnost operativnog tretmana pacijentice (94). U traženju optimalnog pristupa bolestima dojke danas u preoperativnoj obradi težimo brzom, točnoj i ekonomičnoj te za pacijenticu što manje traumatičnoj dijagnostici, iz čega proizlazi potreba kombiniranja citoloških i histoloških metoda. Uvođenjem jednodnevnih klinika za bolesti dojke (engl. “*one day clinic*“) citološka je dijagnostika postala neizostavna u predoperativnoj dijagnostici jer dijagnoza biva postavljena isti dan, što uz ubrzavanje dijagnostičko-terapijskog postupka, dokazano smanjuje anksioznost pacijentica, a psihički je status pacijentice iznimno važan za daljnje liječenje i oporavak. Da bi dijagnoza postavljena na citološkom materijalu pružila kirurgu što više informacija poželjno je da citološko izvješće sadrži što je moguće više parametara, uključujući i gradus tumora koji bi služio kao prediktor histološkog gradusa i biološkog ponašanja tumora. Postoji nekoliko različitih citoloških sustava gradiranja koji se temelje na različitim citološkim obilježjima poput kohezivnosti

stanica, staničnog pleomorfizma, prisutnosti odnosno odsutnosti mioepitelnih stanica i mitotičkih jezgri, pleomorfizma jezgre, prisutnosti nukleola te izgledu kromatina. Usporedbom rezultata različitih sustava citološkog gradiranja sa zlatnim standardom odnosno histološkim gradusom pokazalo se da je Robinsonova metoda citološkog gradiranja jednostavna za primjenu, a pokazuje izvrsnu korelaciju s histološkim gradusom te je kao takva najčešće korištena metoda za određivanje citološkog gradusa invazivnog karcinoma dojke (59, 60).

Pandit i Parek su gradirali Robinsonovom metodom 75 citoloških aspirata invazivnog karcinoma dojke te utvrdili slaganje s 64% uzoraka gradiranih Bloom Richardson-ovom metodom gradiranja na histopatološkim materijalima (95). Obzirom na značajnu podudarnost zaključili su da se citološki gradus može upotrijebiti kao prediktor histološkog gradusa. Podudarnost citološkog i histološkog gradusa iznosila je između 43 i 70% ovisno o iskustvu citomorfologa.

Uspješnost gradiranja na citološkom materijalu (mjerena kao slaganje u odnosu na zlatni standard – histologiju) i u našoj je studiji varirala ovisno o iskustvu citologa koji je vršio gradiranje. Morfološki broj jedan, citolog sa značajnim volumenom pregledanih citoloških uzoraka dojke i iskustvom u citološkom gradiranju invazivnog raka dojke u ponovljenom je promatranju bio izrazito dosljedan u interpretaciji jednog te istog nalaza, odnosno pokazao je gotovo identično slaganje između citološkog i histološkog gradiranja invazivnog raka dojke u prvom i u ponovljenom gradiranju. Dobivene  $\tau$  vrijednosti interpretiraju se kao izvrsno slaganje (engl. *excellent agreement*). Izvrsno intra-morfološko (*intraobserver*) slaganje iskusnog morfologa, osim iskustvom i kvalitetom dijelom se može objasniti i identičnim pogreškama u svakoj seriji. Ono pokazuje da jednom kad se čimbenik nedostatka iskustva isključi nema daljnjeg poboljšanja u slaganju s histološkim gradusom. Za to su odgovorni objektivni razlozi kao što su karakteristike samih parametara, odnosno nesavršenost ili limitiranost same citološke metode gradiranja. Reproducibilnost, dakle, može varirati vezano za karakteristike samih parametara, rezultirajući da su svi morfolozi podjednako uspješni u procjeni određenih parametara, odnosno neuspješni u procjeni drugih, imajući u vidu da je ta neuspješnost zapravo neuspjeh analiziranih parametara, a ne odraz karakteristika promatrača (stručne spreme ili iskustva).

Na reproducibilnost, bilo za intra- ili inter-morfološku komparaciju, znatno utječe i selekcija vidnih polja na kojima je evaluacija rađena vezano za staničnu heterogenost unutar različitih tumora karakteriziranih istim gradusom.

Za interpretaciju su osobito interesantni rezultati ponovljenih gradiranja druga dva promatrača, jednog s malim volumenom analiziranih citoloških uzoraka dojke, ali s velikim iskustvom analize uzoraka uopće (promatrač broj 2) te drugog, mladog, slabije iskusnog specijaliste (promatrač broj 3) koji je zaposlen uz našeg promatrača broj 1 – dakle morfologa s velikim volumenom analiziranih uzoraka dojki i koji od istog svakodnevno uči. Slaganje citološkog gradiranja morfologa broj 2 s zlatnim standardom u prvom promatranju odgovaralo je kategoriji dobrog slaganja (engl. *good agreement*), ali u ponovljenom promatranju iskusni je citolog pokazao bitan napredak u korelaciji s histološkim gradusom, odnosno dobivene  $\tau$  vrijednosti neznatno su nadmašile čak i rezultate citologa s velikim volumenom analiziranih uzoraka dojki i odgovaraju kategoriji izvrsnog slaganja. Iz toga proizlazi da je gradiranje na citološkom materijalu brzo i lako naučiva tehnika koja ne predstavlja problem za iskusnog morfologa.

Neiskusni morfolog (promatrač broj 3) također je pokazao napredak u tehnici gradiranja. Njegova krivulja učenja nije toliko strma kao kod iskusnog morfologa, ali su također kappa vrijednosti koje su u prvom promatranju odgovarale kategoriji dobrog slaganja, u drugom promatranju odgovarale kategoriji izvrsnog slaganja. Isto potvrđuje početnu premisu istraživanja o gradiranju na citološkom materijalu kao reproducibilnoj tehnici neovisnoj o iskustvu citologa.

U opisivanju različitih parametara morfolozi su u ovoj studiji uspješni u određivanju kohezivnosti stanica i vidljivosti nukleola, kada je slaganje odgovaralo kategoriji dobrog slaganja. Upitani da subjektivno procijene koje parametre smatraju najjednostavnijim za procjenu, promatrači su izabrali upravo kohezivnost odnosno disocijaciju stanica i vidljivost nukleola, ali i rubove jezgrine membrane i veličinu stanica budući da za potonji parametar postoje objektivni kriteriji koji se osnivaju na komparaciji s veličinom eritrocita. Zanimljivo je da je samo neiskusni morfolog pokazao gotovo savršeno slaganje za parametar veličinu stanice, dok su iskusniji promatrači pokazali slaganje koje odgovara kategoriji slabog slaganja. Iznenadjući je loš rezultat iskusnog morfologa (promatrač broj 2) za parametar rubove jezgrine membrane, koji je isti opisao kao jednostavan za procjenu. Za razliku od njega, oba preostala promatrača su kod istog parametra pokazala dobro slaganje.

U literaturi prevladavaju manje uspješni, ali i dalje statistički značajni rezultati drugih autora. Taniguchi i sur. prikazali su citološko i histološko slaganje standardnom korelacijom



koeficijenta. Unatoč tome što njihovo slaganje pripada kategoriji slabog slaganja (engl. *poor agreement*) dobiveni rezultati statistički su značajni ( $p=0,0015$ ) (96).

Moroz i sur. (97) su na uzorku od 54 citološka aspirata dukalnog karcinoma dojke evaluirali pet morfoloških karakteristika nuklearnog gradusa i utvrdili jaku korelaciju ( $r = 0.8059$ ,  $P < 0.0001$ ) između citološkog nuklearnog gradusa i histološkog gradusa (modificirani Scarff-Bloom-Richardson sustav gradiranja). Zaključili su da citološki nuklearni gradus može biti prediktor histološkog te da morfometrija može razdvojiti duktalne karcinome u dvije kategorije, tumore s niskim i tumore s visokim gradusom. Njihovi su rezultati bliski našima koji izraženi korelacijskim koeficijentima iznose od 0,7 (manje iskusni promatrač u prvom promatranju) do 0,867 (iskusni promatrač – drugo promatranje) uz  $p < 10^{-6}$ .

U dostupnoj medicinskoj literaturi autori istražuju slaganje raznih metoda citološkog gradiranja sa zlatnim standardom histološkim gradusom, opisuju *interobserver* varijabilnost, no nisu zastupljeni radovi koji istražuju *intraobserver* varijabilnost, nema podataka o povezanosti iskustva promatrača i krivulje učenja postupka gradiranja, odnosno limitiranosti same citološke metode gradiranja nakon što se isključi čimbenik nedostatka iskustva.

U konačnici iz svega gore navedenog proizlazi da je unatoč svojim nedostacima i ograničenjima gradiranje na citološkom materijalu objektivna, reproducibilna te lako naučiva metoda koja povoljno korelira s današnjim zlatnim standardom histološkim gradusom.

### Morfometrijsko gradiranje

Morfometrija temeljena na analizi objektivnih parametara dokazane je dijagnostičke i prognostičke vrijednosti.

Uspješnost primjene interaktivne kompjuterizirane morfometrije u razdvajanju benignih od malignih lezija, kako kod lezija u dojci (98, 99) tako i kod lezija drugih organskih sustava kao što je štitna žlijezda (100), prostata (101), bubreg (102) te jetra (103), ispitivana je u posljednja dva desetljeća. Najčešće analizirani morfometrijski parametri su površina jezgre, opseg, konveksitet, maksimalni i minimalni radijus, omjer jezgra /

citoplazma te čimbenik oblika (68, 78, 79, 104, 105, 106). Postoje razlike između različitih publikacija u odabiru morfometrijskih parametara.

Neki su autori (104, 107) u svojim istraživanjima vršili samo nuklearna morfometrijska mjerenja tvrdeći da su mjerenja na cijeloj stanici manje reproducibilna i više subjektivna, što smo se i sami mogli uvjeriti okružujući računalnim mišem pojedine citoplazme slabije uočljivih margina kada smo morali uložiti dodatni napor u točno definiranje površine koju citoplazma zauzima. Morfometrijska smo mjerenja vršili i na jezgri i na cijeloj stanici (citoplazmi) analizirajući samo pojedinačne, dobro očuvane stanice bez degenerativnih promjena i međusobnog preklapanja omogućujući tako parametre jezgre i stanice dostupnima za analizu. Samo jedan uzorak zbog svoje oskudnosti nije mogao zadovoljiti kriterij od 100 dobro očuvanih stanica (citoplazmi) te smo isti morali isključiti iz studije, stoga ne podržavamo stav autora koji smatraju da je preporučljivo analizirati samo jezgru stanice jer je zahtjevno pronaći uzorke s dovoljnim brojem očuvanih stanica (citoplazmi). Naše je iskustvo da ukoliko je maligni uzorak adekvatan gotovo uvijek je dovoljno celularan da pronalazak očuvanih stanica pogodnih za analizu ne predstavlja problem.

Tahlan i sur. (108) su analizirali samo jezgru stanice i zaključili da citološko gradiranje značajno korelira s histološkim gradusom, a korelacija raste uvođenjem morfometrijske analize. U njihovoj su studiji od analiziranih parametara samo srednja površina jezgre i srednji promjer jezgre bili statistički značajni u predviđanju histološkog gradusa.

U našoj smo studiji dobivenim rezultatima pokazali postojanje značajnih, stupnjevito rastućih razlika u morfometrijskim značajkama jezgre i stanice između pojedinih gradusa i dokazali da su svi morfometrijski parametri jezgre i stanice značajno povezani s gradusom. Od morfometrijskih parametara primijenjenih u našem istraživanju, opseg jezgre i opseg stanice, površina jezgre i maksimalni radijus, pojedinačno značajno doprinose poboljšanju klasifikacije uz značajni no manji učinak preostalih parametara i stanice i jezgre. Dey i sur. (84) u svom su istraživanju dobili slične rezultate u smislu porasta vrijednosti morfometrijskih parametara (površina jezgre, promjer jezgre, konveksna površina, polumjer i konveksni polumjer jezgre) kod različitih gradusa, ali nisu bili uspješni u diferenciranju između gradusa 2 i 3 što su pripisali porastu heterogenosti stanične populacije kod tumora većih gradusa. Mi smo također dokazali postojanje varijabilnosti stanica unutar samog

tumora i varijabilnost tumora koje klasificiramo u isti gradus, što odgovara biološkoj stvarnosti budući da tumor čini heterogena populacija stanica kao posljedica tumorske klonalne proliferacije i reangažmana. Rezultati, dakle, ukazuju koliko se unutar individue granaju populacije stanica po gradusima, odnosno kolika je disperzija varijabilnosti stanica unutar gradusa. U odnosu na preliminarni rad (Prvulović i sur. (85)) nadograđena je statistička obrada dobivenih rezultata budući da je u preliminarnom radu sva varijanca pripisana razlici među različitim gradusima. Podatci bi se mogli interpretirati na taj način jedino u slučaju da svaki tumor u svake pojedine žene ima identičnu populaciju stanica, a znamo da to ne odgovara stvarnosti. Rezultati pokazuju veću varijabilnost od osobe do osobe unutar istog gradusa nego između različitih gradusa. Drugim riječima, iako postoji trend izmjene kroz graduse, populacije su stanica toliko heterogene i različite da većina varijabilnosti otpada na interindividualne razlike, a ne na razlike među gradusima, odnosno prije svega dominira varijabilnost unutar tumora. Iz svega navedenog nametnulo se pitanje porijekla tih razlika, odnosno koja individualna obilježja određuju veličinu te disperzije?

Odlučili smo ispitati utjecaj antropometrijskih varijabli, varijabli ekspresije steroidnih receptora i proliferativnih biljega neoplazme. Danas je poznato da su ER, PR, i HER2 status kao i Ki-67 odlični prognostički markeri kod karcinoma dojke (109). Tamaki i sur. su dokazali značajnu pozitivnu korelaciju između Ki-67 i ER/HER2 statusa te histološkog gradusa. Kod ER pozitivnih i HER2 negativnih karcinoma dojke Ki-67 iznosio je između 20 i 25%, a značajno je rastao s porastom gradusa lezije (110). Osim ekspresijskih biljega poznato je da su dob, menopauza, paritet i neke navike poput pušenja cigareta poznati čimbenici rizika za nastanak karcinoma dojke. Pokušavajući odgovoriti na pitanje o porijeklu interindividualnih razlika testirali smo standardni set individualnih obilježja preko svih parametara za svaki pojedini gradus. Dobiveni rezultati pokazali su da prosječne vrijednosti i intraindividualne varijance svih staničnih parametara rastu s dobi ispitanika u trenutku dijagnoze, no bez promjena u mjerama oblika stanica. Drugim riječima, porast dobi prati porast veličine stanica, a porast veličine razmjerno prati sve izraženija anizocitoza, no bez promjena u obrascu deformacije, odnosno obliku jezgara. Stanični opseg i maxR značajno opadaju s ekspresijom ER; a površina, opseg, minR, maxR i konveksna površina s ekspresijom PRR. Nasuprot tome, ekspresija proliferacijskog markera Ki-67 snažno je pozitivno povezana s rasapom mjerenih vrijednosti no bez učinka na srednje vrijednosti parametara. Pri tom, mjere deformiteta nisu povezane s ekspresijom hormonskih

receptora. Her2 pozitivni tumori odlikuju se značajno većom staničnom površinom, opsegom, minR i maxR. U pušača se opaža značajno izraženija anizocitoza bez učinka na srednje vrijednosti parametara veličine i oblika.

Slični obrasci vrijede i za nuklearne parametre: opseg, konveksna površina i maxR rastu s dobi i ekspresijom Ki-67, a opadaju s ekspresijom PRR. MinR marginalno prati porast dobi i ekspresije Ki-67. Niti mjere deformiteta, niti individualni koeficijenti varijacija, odnosno disperzija analiziranih nuklearnih parametara ne ovise o ekspresiji ER, PRR, Ki-67 ili dobi. Menopauza nije povezana s promjenama u morfometrijskim varijablama, niti stanice, niti jezgre.

Generalno možemo reći da daleko veći stupanj disperzije pojedinih parametara pokazuju visoko proliferativne lezije, lezije u pušača, lezije u starijih pacijenata, Her2 pozitivni tumori, te tumori s niskim stupnjem ekspresije hormonskih receptora. Iako u medicinskoj literaturi nismo našli slično postavljenih studija, dobiveni rezultati u skladu su s već poznatim činjenicama o biološkom ponašanju tumora, te sami po sebi ne predstavljaju nove spoznaje, ali pokazuju snagu metode i ukazuju na dokaznu snagu uzorka.

Nadalje smo modelima redukcije dimenzionalnosti pokušali izdvojiti redundantne varijable, odnosno između parametara koji smo analizirali detektirati one koji su međusobno toliko korelirani da jedni druge mogu zamijeniti. S obzirom na izraženu kolinearnost morfometrijskih varijabli, redukcija dimenzionalnosti i analiza staničnih obrazaca provedena je primjenom k-medoid grupiranja na temelju planimetrijske površine, minimalnog i maksimalnog polumjera stanice. Identificirane su 2 populacije ispitanika, uz kompletnu separaciju po svim parametrima, izuzevši maxR jezgre.

U slijedećem koraku, testirana je povezanost dviju morfometrijski različitih populacija s pTN stadijem, gradusom, ekspresijskim biljezima, pušenjem i reproduktivnom anamnezom, odnosno analizirana je diskriminacijska i prediktivna sposobnost morfometrijskih parametara za pT stadij i gradus.

Neovisno je li grupiranje ispitanika izvršeno prema morfometrijskim obrascima jezgre ili citoplazme identificirane populacije značajno se razlikuju na način da je makrocitoza povezana sa značajno većim udjelom pT2-3 tumora, porastom udjela G3 lezija, višom dobi ispitanika, nižom ekspresijom proliferacijskog biljega Ki-67 te značajno rjeđa u pušača.

Slijedeće grupiranje ispitanika izvršeno je s obzirom na ekspresiju hormonskih receptora, Her-2 i Ki-67 biljega također u dvije skupine, gdje jednu skupinu čine ER i PRR snažno pozitivne lezije s najčešće niskom ekspresijom proliferacijskog biljega Ki-67 i pozitivnim Her-2, i obratno. Ovako definirane skupine razlikuju se po gradusu – u E2 skupini znatno je veća učestalost G3 lezija; razdiobi pT stadija – pT3 tumori češći u E2 skupini; te u morfometrijskim parametrima – E2 skupinu karakterizira porast parametara veličine stanice i jezgre.

Dobiveni rezultati također su u skladu su s već poznatim činjenicama o biologiji tumora i ne predstavljaju novi doprinos spoznajama u ovom segmentu.

Kao završno razmišljanje o uspješnosti gradiranja citoloških razmaza na temelju mjerenih morfometrijskih značajki, potrebno je odgovoriti na pitanje jesu li razlike u morfometrijskim značajkama jezgre i stanice između pojedinih gradusa dovoljno velike i specifične za pouzdano i jednoznačno razvrstavanje razmaza u graduse na temelju mjera jezgre i stanice.

Svi morfometrijski parametri jezgre i stanice značajno su povezani s gradusom. Od morfometrijskih parametara, opseg jezgre (50%), opseg stanice (43%), površina jezgre (43%), i maxR jezgre (57%) pojedinačno najznačajnije pridonose poboljšanju klasifikacije, uz značajni, no manji učinak i preostalih parametara i stanice i jezgre (33-40%). U kombiniranom modelu, informacijski očekivano dominira maxR jezgre. U pogledu strukture pogrešno klasificiranih lezija, dominira pomak u višu kategoriju (9/13 instanci).

Za skup ispitanica s pouzdanom dobi menopauze, postmenopauzalni status u trenutku dijagnoze, kao varijabla, umanjuje klasifikacijsku grešku 27%. Činjenica da postmenopauzalni status utječe na klasifikacijski potencijal morfometrijskih varijabli ukazuje da točnost morfometrijske metode u procjeni gradusa može varirati prema dobi odnosno ovarijalnoj funkciji. Isto vrijedi i za druge okolišne faktore koji utječu na morfometrijske karakteristike lezija stoga zaključujemo da primjenjivost morfometrije može neočekivano varirati unutar populacije i između populacija u ovisnosti o manje – više (ne)predvidivim kofaktorima.

Treba naglasiti da je klasifikacijski potencijal varijabli procijenjen upotrebom rezultata gradiranja jednog iskusnog citologa specijaliziranog za patologiju dojke.

Gradiranje može varirati među opažačima, tj. citolozima, stoga interindividualne varijacije mogu proizvesti različite ishode gradiranja, pa time i različite procjene upotrebljivosti pojedinih morfometrijskih parametara. Subjektivne razlike u gradiranju ograničavaju stoga pouzdanost rezultata, odnosno unose dodatnu nepouzdanost u procjeni dosega primjene morfometrijskih parametara, te nameću potrebu definiranja zlatnog standarda u gradiranju prije analize klasifikacijskog potencijala morfometrije. I u optimalnom slučaju, međutim, treba primijetiti niski udio gradusa u varijanci morfometrijskih obilježja (cca <30%), odnosno širok raspon preklapanja morfometrijskih parametara među gradusima, kao objektivno ograničenje klasifikacijskog potencijala.

U konačnici rezultati dokazuju da je gradiranje morfometrijskom metodom statistički značajno te da postoji opravdanost njegove uporabe, ali treba imati na umu da metoda kao takva nema diskriminacijsku nego samo indikativnu sposobnost.

Ostaje još pitanje veličine uzorka potrebite za morfometrijsku analizu. Tek rijetki autori opisuju u materijalima i metodama svojih studija broj stanica na kojima su vršili ispitivanje. Tako Tahlan i sur. (108) analiziraju u svojoj studiji proizvoljan broj stanica, minimalno 50, a maksimalno 100 stanica i zaključuju da citološko gradiranje značajno korelira s histološkim gradusom, a korelacija raste uvođenjem morfometrijske analize. U našoj smo studiji utvrdili širok spektar varijacija morfometrijskih parametara unutar tumora iste osobe odnosno između tumora različitih osoba, a unutar istog gradusa što ukazuje na potrebu dalje analize varijabli na neovisnim uzorcima drugih populacija bolesnika s dobro definiranim kliničkim, anamnestičkim i drugim podacima.

# 7. ZAKLJUČCI

## Citološko gradiranje invazivnih karcinoma dojke

1. Potpuno slaganje tri neovisna promatrača u gradiranju 45 citoloških uzoraka invazivnih karcinoma dojke postignuto je pri prvom promatranju kod 21 uzorka (46,7%), a u drugom promatranju kod 30 uzoraka (66,6%), a glavnina je slaganja postignuta kod citološkog gradiranja tumora histološki klasificiranih kao gradus I.
2. Za analizu stupnja podudarnosti citološkog gradusa invazivnog karcinoma dojke s histološkim gradusom koristio se Kendall  $\tau$ -B test.  $\tau$  vrijednosti u prvom promatranju iznosile su od 0,64 do 0,81 (dobro do izvrsno slaganje), dok su u drugom promatranju iznosile od 0,76 do 0,82 (izvrsno slaganje).
3.  $\tau$  vrijednosti između promatrača uzetog kao standard (promatrač s najvećim volumenom pregledanih uzoraka karcinoma dojke) i druga dva promatrača (*interobserver varijabilnost*) u prvom promatranju iznosile su 0,45 i 0,72 (dobro do izvrsno slaganje), a u drugom promatranju 0,80 i 0,85 (izvrsno slaganje).
4. Slaganje pojedinog promatrača pri ponovljenom citološkom gradiranju (*intraobserver varijabilnost*) iznosi 0,57 – 0,79 (dobro do izvrsno slaganje). Dobro do izvrsno slaganje u ponovljenom promatranju promatrači pokazuju pri evaluaciji disocijacije, odnosno kohezivnosti stanica (0,57 – 0,67) i nukleola (0,47 – 0,67), dok

je pri procjeni rubova jezgre slaganje prvog i ponovljenog promatranja bila slaba do dobra (0,08 – 0,53).

Morfometrijska analiza citoloških uzoraka invazivnih karcinoma dojke

5. S porastom gradusa uočava se:

- ❑ pad ekspresije progesteronskih receptora (PRR)
- ❑ značajan, robustan, stupnjeviti porast ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67
- ❑ viši pT stadij (pT2-4) u trenutku dijagnoze
- ❑ veći udio postmenopausalnih ispitanica.

Nisu zabilježene razlike u ekspresiji estrogenskih receptora (ER), humanog epidermalnog faktora rasta (Her-2), zastupljenosti pušača duhanskih proizvoda, pN statusu u trenutku dijagnoze, paritetu i dobi menarhe između G1, G2 i G3 skupine lezija.

6. Analizom razlika u distribuciji morfometrijskih parametara po gradusu izdvaja se značajan, stupnjevit porast mjerenih značajki s porastom gradusa. Gradus je odgovoran za prosječno tek 26, odnosno 35% varijance morfometrijskih obilježja stanice i jezge, uz max. udio za nuklearni maxR, 41%. Glavninu varijance obilježja čine interindividualne razlike, odnosno heterogenosti među ispitanicima unutar gradusa, uz minimalne intarindividualne varijacije.

7. Daleko veći stupanj disperzije pojedinih parametara pokazuju visoko proliferativne lezije, lezije u pušača, lezije u starijih pacijenata, Her2 pozitivni tumori, te tumori s niskim stupnjem ekspresije ekspresijskih biljega.

8. Minimalnu, trenutno nedefiniranu i nestandardiziranu, veličinu uzorka potrebitu za morfometrijsku analizu normirali smo na 100 stanica po uzorku, budući da ista jamči usku marginu greške.



Citološko gradiranje aspirata invazivnih karcinoma dojke reproducibilno je i neovisno o iskustvu morfologa te dobro korelira sa zlatnim standardom, histološkim gradusom. Posljedično tome predstavlja koristan parametar u predviđanju histološkog gradusa, odnosno biološkog ponašanja tumora i kao takvo može biti od koristi u svakodnevnom radu svih involviranih u liječenje karcinoma dojke.

Gradiranje morfometrijskom metodom statistički je značajno te postoji opravdanost njegove uporabe, ali treba imati na umu niski udio gradusa u varijanci morfometrijskih obilježja (cca <30%), odnosno širok raspon preklapanja morfometrijskih parametara među gradusima, kao objektivno ograničenje klasifikacijskog potencijala, iz čega proizlazi da morfometrija kao metoda nema diskriminacijsku nego samo indikativnu sposobnost.

## 8. SAŽETAK

**CILJ:** Cilj istraživanja bio je učiniti citološko i morfometrijsko gradiranje citoloških uzoraka invazivnog karcinoma dojke i prosuditi mogućnost rutinske primjene citološkog gradiranja s ili bez morfometrijske analize, umjesto dosadašnje procjene gradusa tumora na histološkom materijalu; prosuditi reproducibilnost, konzistentnost i varijabilnost tehnike gradiranja među citolozima; te opisati biološku varijabilnost morfometrijskih parametara unutar i između gradusa, u svrhu optimalizacije i utvrđivanja minimalne, trenutno nedefinirane, veličine uzorka potrebite za morfometrijsku analizu.

**ISPITANICI I METODE:** Istraživanjem je obuhvaćeno 45 ispitanica (15 po svakom gradu) u kojih je dijagnoza karcinoma dojke postavljena na citološkim aspiratima dojke u OB „Dr. J. Benčević“ tijekom 2012. godine. Citološko gradiranje učinjeno je Robinsonovom metodom gradiranja, a određivanje histološkog gradusa korištenjem Elstonove modifikacije Bloom-Richardson-ove metode. Morfometrijska analiza provedena je programom SFORM.

**REZULTATI:** Slaganje tri promatrača u određivanju citološkog gradusa i njegovoj komparaciji s histološkim gradusom procijenjeno je Kendall  $\tau$ -B testom.  $\tau$  vrijednosti iznosile su od 0,64 do 0,82.  $\tau$  vrijednosti između promatrača uzetog kao standard (promatrač s najvećim volumenom pregledanih uzoraka karcinoma dojke) i druga dva promatrača (*interobserver varijabilnost*) iznosile su od 0,45 do 0,85. Slaganje pojedinog promatrača pri ponovljenom citološkom gradiranju (*intraobserver varijabilnost*) iznosilo je od 0,57 do 0,79.

S porastom gradusa uočava se pad ekspresije progesteronskih receptora, značajan, stupnjeviti porast ekspresije proliferacijskog biljega Ki-67, viši pT stadij, te veći udio postmenopauzalnih ispitanica.

Analizom razlika u distribuciji morfometrijskih parametara po gradusu izdvaja se značajan, stupnjevit porast mjerenih značajki s porastom gradusa. Gradus je odgovoran za prosječno tek 26, odnosno 35% varijance morfometrijskih obilježja stanice i jezgre. Glavninu varijance obilježja čine interindividualne razlike, odnosno heterogenosti među ispitanicima unutar gradusa, uz minimalne intraindividualne varijacije.

Minimalnu, trenutno nedefiniranu, veličinu uzorka potrebitu za morfometrijsku analizu normirali smo na 100 stanica po uzorku, budući da ista jamči usku marginu greške.

**ZAKLJUČAK:** Citološko gradiranje aspirata karcinoma dojke reproducibilno je i neovisno o iskustvu morfologa te dobro korelira s histološkim gradusom. Posljedično tome predstavlja koristan parametar u predviđanju histološkog gradusa, odnosno biološkog ponašanja tumora.

Gradiranje morfometrijskom metodom statistički je značajno, ali zbog niskog udjela gradusa u varijanci morfometrijskih obilježja, odnosno širokog raspona preklapanja morfometrijskih parametara među gradusima, morfometrija kao metoda nema diskriminacijsku nego samo indikativnu sposobnost.

**Ključne riječi:** citološko gradiranje, karcinom dojke, citološka aspiracija tankom iglom, histološko gradiranje, morfometrija.

# 9. SUMMARY

**Diagnostic/prognostic value of cytological grading system by Robinson's method and morphometric objectification in determining gradus of invasive breast cancer**

**AIM:** The aim of this study was to evaluate the cytological and morphometrical grading of breast cancer and to estimate the possibility of routine use of cytologic grading with or without morphometric analysis, instead of estimating the tumor grade only on histologic material; to estimate reproducibility, consistency and variability of grading techniques among cytologists and also to describe the biological variability of morphometric parameters within and between grades and to determine the minimum, currently undefined, of sample size required for morphometric analysis.

**MATERIAL AND METHODS:** Forty five patients with histologically confirmed invasive breast carcinoma, treated in General Hospital Dr. J. Benčević in 2012, were selected in the present study. Grading of breast carcinoma was done according to the Robinson's method by three independent observers on two occasions. Histological grading was performed using Elston's modified Bloom Richardsons' scoring. Morphometric analysis was performed by means of the SFORM software.

**RESULTS:** The agreement between observers in determining the cytological grade and it's comparison with histological grade was estimated with Kendall  $\tau$ -B test.  $\tau$  values ranged from 0.64 to 0.82.  $\tau$  values between standard observer (the one with highest volume of examined breast specimens) and the other two observers (*interobserver variability*) ranged from 0.45 to 0.85 for cytological grading. Agreement between the individual observer at the repeated cytological grading (*intraobserver variability*) ranged from 0.57 to 0.79.

With increasing tumor grade we observed the decrease of progesterone receptors expression, significant increase in the expression of the proliferation marker Ki-67, higher pT stage, and large proportion of postmenopausal women.

By analyzing differences in the distribution of morphometric parameters by grade we observed a significant, gradual increase in the measured characteristics with increasing grade. Grade is responsible for an average of 26 or 35% of the variance of morphometric characteristics of cells and nuclei. The majority of the variance features make inter-individual differences or heterogeneity among respondents within the grade.

Minimal sample size which is currently undefined and not standardized and was needed for morphometric analysis, was normalized to 100 cells per sample, since the same guarantees a narrow margin of error.

**CONCLUSION:** Cytological grading of aspirates of breast cancer is reproducible and independent of experience of morphologist and correlates well with established histological grade and as such can be predictor of histologic grade and provide relevant information about the biological behavior of invasive breast cancer.

Morphometric grading method is statistically significant but due to low proportion of grade in variance of morphometric features and a wide range of overlapping morphometric parameters among grades differences, morphometry as a method does not have discriminatory but just indicative capacity.

**Key words:** cytological grading, breast cancer, fine needle aspiration cytology, histological grading, morphometry.

# ***10. LITERATURA***

1. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 1993.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1995.
3. Prof.dr.sc. Snježana Tomić. Patologija dojke (edukacijski materijal u javnoj domeni). Dostupno na adresi: <http://www.slideserve.com/nan/patologija-dojke>. Datum pristupa: 01.10.2014.
4. Šamija M, i sur. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
5. International Agency for research on cancer. World health organization. Dostupno na: [http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf). Datum pristupa: 15.09.2014.
6. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u hrvatskoj 2012. Dostupno na: [http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2012\\_final.pdf](http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/Bilten-2012_final.pdf). Datum pristupa: 26.12.2014.
7. Zavod za javno zdravstvo Brodsko-Posavska županija. Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke. Dostupno na: [http://zzjzbpz.hr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=41:nacionalni-program-ranog-otkrivanja-raka-dojke&catid=8:arhiva](http://zzjzbpz.hr/index.php?option=com_content&view=article&id=41:nacionalni-program-ranog-otkrivanja-raka-dojke&catid=8:arhiva). Datum pristupa: 21.09.2014.
8. Stanely L. Robbins. Osnove patologije. Školska knjiga Zagreb.
9. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. Invasive breast carcinoma: introduction and general features. U: WHO Classification of tumors of the breast. 4. izd. Lyon: IARC, 2012;14-20.

10. Bieche I, Liedereau R. Genetic alteration in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995;14(4):227-51.
11. Blackwood MA, Weber BL. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J. Clin. Oncol.* 1998;16(5):1969-77.
12. Hoskins KF, Stopfer JE, Calzone KA, Merajver SD, Rebbeck TR, Garber JE, et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. *JAMA*. 1995;273(7):577-85.
13. American cancer society. Breast cancer. Dostupno na adresi:[http://www.cancer.org/cancer/breast cancer/detailguide/breast cancer risk factors](http://www.cancer.org/cancer/breast%20cancer/detailguide/breast%20cancer%20risk%20factors). Datum pristupa: 15.10.2014.
14. Foulkes WD, Wong N, Brunet JS, Begin LR, Zhang JC, Martinez JJ, et al. Germline BRCA-1 mutations is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;(3):2465-70.
15. Verhoog LC, Brekelmans CT, Seynaeve C, van den Bosch LM, Dahmen G, van Geel AN et al. Survival and tumor characteristics of breast cancer patients with germline mutations of BRCA-1. *Lancet* 1998;351:316-21.
16. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 1994;139:819-35.
17. Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *Cancer* 2009;100:538-44.
18. Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Warren AS, Greenberg ER, Willett WC. Late age at first full term birth is strongly associated with lobular breast cancer. *Cancer*.2010;117:1946-56.
19. Loof-Johanson M, Brudin L, Sundquist M, Thorstenson S, Rudebeck CE. Breastfeeding and prognostic markers in breast cancer. *Breast*. 2010;20:170-75.
20. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factors status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol*. 2000;152:950-64.

21. Tworoger SS, Hankinson SE. Prolactin and breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008;13:41-53.
22. Collaborative Group on hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. *Contraception* 1996;54:1S-106S.
23. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, i sur. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:321-33.
24. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2008; 61:203-13.
25. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsuyanni K, Lubin F, Marubini E, Modan B, Rohan T. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:561-9.
26. Rich-Edwards JW, Goldman MB, Willet WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adolescent body mass index and infertility caused by ovulatory disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171:171-7.
27. Maruti SS, Willett WC, Feskanich D, Rosner B, Colditz GA. A prospective study of age-specific physical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:728-37.
28. Gonzales CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the european Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer*. 2010;46:2555-62.
29. Vrhovac B i sur. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008;
30. Ahmed I, Nazir R, Chaudhary MY, Kundi S. Triple assessment of breast lump. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2007;17:535-8.
31. National Health Service Guidelines for cytology procedures and reporting on fine needle aspirats of the breast. Cytology Subgroup of the National Coordinating Committe for breast Cancer Screening Pathology. *Cytopathology*. 1994;4:316-34.
32. Kocjan G. Aspiracijska citologija u liječenju bolesti dojke: europske perspektive danas. *Acta Med Croat*. 2011;65:391-402.



33. Ghimire B, Khan MI, Bibhusal T, Singh Y, Sayami P. Accuracy of triple test score in the diagnosis of palpable breast lump. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2008;47:189-92.
34. Morris A, Pommier RF, Schmidt WA, Shih RL, Alexander PW, Vetto JT. Accurate evaluation of palpable breast masses by the triple test score. *Arch Surg.* 1998;133(9):930-4.
35. Morris KT, Pommier RF, Morris A, Schmidt WA, Beagle G, Alexander PW, i sur. Usefulness of the Triple Test Score for Palpable Breast Masses. *Arch Surg.* 2001;136(9):1008-1013.
36. Mokri M, Guity M, Shariat Torbaghan S, Arab Kheradmand A, Arbabai E., Bagherzade M., Atri M. Usefulness of Triple Test Score for Breast Lesions *Iranian Journal of Cancer Prevention Vol.1, No..1, 23-25 2008. Jan*
37. Znidarčić Ž, Jeren T, Kaić G, Kardum-Skelin I, Knežević-Obad A, Smojver-Ježek S, Vince A. Cytology in primary health care of children and adults. *Coll antropol.* 2010;34:737-48.
38. Kocjan G, Bourgain C, Fassina A, Hagmar B, Herbert A, Kapila K, i sur. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology.* 2008;19:271-8.
39. The uniform approach to breast fine needle aspiration biopsy. NIH Consensus Development Conference. *Am. J. Surg.* 1997; 174:371-85.
40. Rimm DL, Stastny JF, Rimm EB, Ayer S, Frable WJ. Comparison of the costs of fine needle aspiration and open surgical biopsy as methods for obtaining a pathologic diagnosis. *Cancer.* 1997; 25;81:51-6.
41. Layfield LJ, Dodd LG. Cytologically low grade malignancies: an important interpretative pitfall responsible for false negative diagnosis in fine needle aspiration of the breast. *Diagn Cytopathol.* 1996. Sep;15:250-9.
42. He Q, Fan X, Yuan T, Kong L, Du X, Zhuang D, Fan Z. Eleven years of experience reveals that fine-needle aspiration cytology is still a useful method for preoperative diagnosis of breast carcinoma. *Breast.* 2007;16:303-6.
43. Singh N, Ryan D, Berney D, Calaminici M, Sheaff MT, Wells CA. Inadequate rates are lower when FNAC samples are taken by cytopathologist. *Cytopathology.* 2003;14:327-31.

44. Farshid G, Rush G. The use of fine needle aspiration cytology and core biopsy in the assessment of highly suspicious mammographic microcalcifications: analysis of outcome for 182 lesions detected in the setting of a population-based breast cancer screening program. *Cancer*. 2003;99:357-64.
45. Perry N, Broeders M, de Wolf C, Tornberg S, Holland R, von Karsa L. European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition - summary document. *Ann Oncol* 2008;19:614-22.
46. Boffin AM, Iydersen S, Isaksen C, Hagmar BM. Interpretation of fine needle aspiration cytology of the breast: a comparison of cytology, frozen section, and final histological diagnoses. *Cytopathology*. 2004;15:297-304.
47. Skrbnic B, Babic A, Cufer T, Us-Krasovec M. Cytological grading of breast cancer in Giemsa-stained fine needle aspiration smears. *Cytopathology*. 2001; 12:15-25.
48. Hunt CM, Ellis IO, Elston CW, Locker A, Pearson D, Blamey RW. Cytological grading of breast carcinoma--a feasible proposition? *Cytopathology*. 1990;1(5):287-95.
49. Layfield LJ, Robert ME, Cramer H, Giuliano A. Aspiration biopsy smear pattern as a predictor of biologic behavior in adenocarcinoma of the breast. *Acta Cytologica*. 1992;36:208-14.
50. Dabbs DJ. Role of nuclear grading of breast carcinomas in fine needle aspiration specimens. *Acta Cytologica*. 1992;37:361-6.
51. Sneige N. Current issues in fine needle aspiration of the breast: cytologic features of in situ lobular and ductal carcinomas and clinical implications of nuclear grading. *Cytopathol Annu*. 1992;2:161-71.
52. Davey DD, Banks ER, Jennings D, Powell DE. Comparison of nuclear grade and DNA cytometry in breast carcinoma aspirates to histologic grade in excised cancers. *Am J Clin Pathol*. 1993;99:708-13.
53. De Graaf H, Willemse P, Ladde BE, Van den Bergen HA, Krebber M, Tjabbes T, i sur. Evaluation of cytological scoring system for predicting histological grade and disease-free survival in primary breast cancer. *Cytopathology*. 1994;5:294-300.

54. Pleotus HL, Gandour ER, O Sullivan D. Application of Scarff-Bloom-Ricardson tumor grading system to fine-needle aspirates of the breast. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:262-5.
55. Dabbs DJ, Silverman JF. Prognostic factors from the fine-needle aspirate: Breast carcinoma nuclear grade. *Diagn Cytopathol.* 1994;10:203-8.
56. Robinson IA, McKee G. Prognostic value of cytological grading of fine-needle aspirates from breast carcinoma. *Lancet.* 1994;334:947-950.
57. Cajulis RS, Hessel RG, Hwang S, Haines K, Frias-Hidvegi D, O'Gorman M. Simplified nuclear grading of fine-needle aspirates of breast carcinoma: concordance with corresponding histologic nuclear grading and flow cytometric data. *Diagn Cytopathol.* 1994;11:124-30.
58. Bozzetti C, Nizzoli R, Naldi N, Guazzi A, Camisa R, Manotti L, Pilato FP, Mazzini G, Cocconi G. Nuclear grading and flow cytometric DNA pattern in fine-needle aspirates of primary breast cancer. *Diagn Cytopathol.* 1996;15(2):116-20.
59. Rekha TS, Nandini NM, Murali Dhar. Validity of different cytological grading systems of breast carcinoma - a hospital-based study in south India. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2011;12:3013-16.
60. Farooq AW, Subhash B, Dinesh K, Pervez K. Cytological grading of breast cancers and comparative evaluation of two grading systems. *J Cytol.* 2010; 27:55-8.
61. Rosen PP. *Invasive duct carcinoma: Assessment of Prognosis, Morphologic Prognostic Markers and Tumor Growth Rate.* U: Breast Pathology. 3. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2009.
62. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1049 cases, of which 359 have been followed 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11:359-77.
63. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow up. *Histopathology.* 1991;19:403-10.
64. Harvey JM, deKlerk NH, Sterrett GF. Histological grading of breast carcinoma: Interobserver agreement and relation to other prognostic factors including ploidy. *Pathology.* 1992;24:63-8.

65. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer*. 1994;73:2765-70.
66. Yoshimoto M, Sakamoto G, Ohashi Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. *Cancer*. 1993;72:2993-3001.
67. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, i sur. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement. *Hum pathol*. 1995;26:873-9.
68. Van Diest PJ, Baak JP. Morphometry. U: Bibbo M, ur. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2006.
69. Marchevsky AM, Erler BS. Morphometry in pathology. U: Marchevsky AM, Bartles PH, ur. *Image analysis. A primer for pathologists*. New York: Raven Press; 1994.
70. Van Diest PJ, Baak JP. Morphometry. U: Bibbo M, ur. *Comprehensive cytopathology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991.
71. Crocker J, Jones EL, Curran RC. A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol*. 1983;36:298-302.
72. Crocker J, Jones EL, Curran RC. The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non-Hodgkin lymphomas and reactive lymph nodes. *J Clin Pathol*. 1983;36:303-6.
73. Murata SI, Mochizuki K, Nakazawa T, Kondo T, Nakamura N, Yamashita H, i sur. Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. *Microsc Res Tech*. 2003;61:457-62.
74. Namyslowski G, Scierski W, Nozynski JK, Zembala- Nozynska E. Morphometric characteristic of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer. *Med Sci Monit*. 2004;10:241-5.
75. Kisner HJ. Principles and clinical application of image analysis. *Clin Lab Med*. 1988;8:723-36.
76. Russack V. Image cytometry: Current applications and future trends. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 1994; 31:1-34.

77. International Academy of Cytology Committee on Quantitative Morphology. Data on automated cytology systems as submitted by their developers. *Anal Quant Cytol Histol.* 1991;13:300-6.
78. Baak JPA. The principles and advances of quantitative pathology. *Anal Quant Cytol Histol.* 1985;9:89-95.
79. Oberholzer M, Chirsten H, Ettl R, Buser M, Oestrecher M Gschwind R. Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on simple, multipurpose analysis system. *Anal Quant Cytol Histol.* 1991;13:316-20.
80. Ricco R, DeBenedictis G, Giardian C, Bufo P, Resta L, Pesce Delfino V. Morphometric analytical evaluations of lymphoid populations in nonneoplastic lymph nodes. *Anal Quant Cytol Histol.* 1985;7:288-93.
81. Mahovlić V. Morfometrijski i kinetički parametri (AgNOR, DNK-citometrija) u citodijagnostici hiperplastičnog i malignog endometrija. Doktorska disertacija, 2010.
82. Brahmi U, Rajwanski A, Joshi K, Dey P, Vohra H, Granguly NK, i sur. Automated nuclear image morphometry of fine needle aspiration smears of malignant round cell tumors. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001;23:287-90.
83. Smojver S. Morfometrija i statička DNA citometrija makrofaga u bronhoalveolarnom ispirku bolesnika sa sarkoidozom. Doktorska disertacija, 2008.
84. Dey P, Ghoshal S, Pattari SK. Nuclear image morphometry and cytologic grade of breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22:483-5.
85. Prvulović I, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Jakić-Razumović J, Manojlović S. Morphometry of tumor cells in different grades and types of breast cancer. *Coll Antropol.* 2010;34:99-103.
86. Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika* 1986;73:13-22.
87. Zeger SL, Liang KY. The analysis of discrete and continuous longitudinal data. *Biometrics* 1986;42:121-30.
88. Zeger SL, Liang KY. Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics.* 1986;42:121-130.

89. Ballinger GA. Using generalized estimating equations for longitudinal data analysis. *Organizational Research Methods*. 2004;7:127-150.
90. Davis BW, Gelber RD, Goldhirsch A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, i sur. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer*. 1986;58(12):2662-70.
91. Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol*. 1987;5(9):1378-86.
92. Contesso G1, Jotti GS, Bonadonna G. Tumor grade as a prognostic factor in primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989;25(3):403-9.
93. Willems SM, van Deurzen CHM, van Diest PJ. Diagnosis of breast lesions: fine-needle aspiration cytology or core needle biopsy? A review. *J clin Pathol*. 2012;65:287-92.
94. Kooistra B, Wauters C, Strobbe L, Wobbbes T. Preoperative cytological and histological diagnosis of breast lesions: A critical review. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36:934-40.
95. Pandit AA, Parek HJ. Cytologic grading of breast carcinoma: comparison of four grading systems *J Cytol*. 2000;17:39-44.
96. Taniguchi E, Yang Q, Tang W, Nakamura Y, Shan L, Nakamura M, Sato M, Mori I, Sakurai T, Kakudo K. Cytological grading of invasive breast carcinoma. Correlation with clinicopathological variables and predictive value of nodal metastasis. *Acta Cytol*. 2000;44:587-91.
97. Moroz K1, Lipscomb J, Vial LJ Jr, Dhurandhar N. Cytologic nuclear grade of malignant breast aspirates as a predictor of histologic grade. Light microscopy and image analysis characteristics. *Acta Cytol*. 1997;41(4):1107-11.
98. Mapstone NP, Zakhour HD. Morphometric analysis from fine needle aspirates from breast lesions. *Cytopathology*. 1990;1:349-55.
99. Boon ME, Trott PA, van Kaam H, Kurver PJH, Leach A, Baak JPA. Morphometry and cytodiagnosis of breast lesions. *Virhows Arch Pathol and Histol*. 1982;396:9-18.

100. Karslioglu Y, Celasun B, Gunhan O. Contribution of morphometry in the differential diagnosis of fine-needle thyroid aspirates, cytometry B. *Clin Cytom.* 2005;65:22-28.
101. Buhmeida A, Kuopio T, Collan Y. Nuclear size and shape in fine-needle aspiration biopsy samples of the prostate. *Analyt Quant Cytol Histol.* 2000;22:291-8.
102. Collan Y, Torkkeli T, Pesonen E, Jantunen E, Kosma VM. Application of morphometry in tumor pathology. *Analyt Quant Cytol Histol.* 1987;9:79-87.
103. Davaris PS, Koutselini H, Lazaris AC, Kavantzias N, Kiritsi N. Significance of nuclear morphometry as a diagnostic tool in fine-needle aspirates of the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000;12:913-21.
104. Abdalla F, Boder J, Buhmeida A, Hashmi H, Elzagheid A, Collan Y. Nuclear morphometry in FNABs of breast disease in Libyans. *Anticancer research.* 2008;28:3985-90.
105. Kalhan S, Dubey S, Sharma S, Dudani S, Preeti, Dixit M. Significance of nuclear morphometry in cytological aspirates of breast masses. *J Cytol.* 2010;27:16-21.
106. Lim CM, Ho BCS, Bay BH, Yip G, Tan PH. Nuclear morphometry in columnar cell lesions of the breast: is it useful? *J Clin Pathol.* 2006;59:1283-6.
107. Elzagheid A, Collan Y. Fine needle aspiration biopsy of the breast. Value of nuclear morphometry after different sampling methods. *Analyt Quant Cytol Histol.* 2003;25:73-80.
108. Tahlan A, Nijhawan R, Joshi K. Grading of ductal breast carcinoma by cytomorphology and image morphometry with histologic correlation. *Anal Quant Cytol Histol.* 2000;22(3):193-8.
109. Howlader N1, Chen VW, Ries LA, Loch MM, Lee R, DeSantis C, Lin CC, Ruhl J, Cronin KA. Overview of breast cancer collaborative stage data items--their definitions, quality, usage, and clinical implications: a review of SEER data for 2004-2010. *Cancer.* 2014;120 Suppl 23:3771-80. doi: 10.1002/cncr.29059.
110. Tamaki K1, Ishida T, Tamaki N, Kamada Y, Uehara K, Miyashita M, Amari M, Tadano-Sato A, Takahashi Y, Watanabe M, McNamara K, Ohuchi N, Sasano H. Analysis of clinically relevant values of Ki-67 labeling index in Japanese breast cancer patients.

111. Breast Cancer. 2014 May;21(3):325-33. doi: 10.1007/s12282-012-0387-5. Epub 2012 Jul 11.)



# 11. ŽIVOTOPIS

## Osobne informacije

<b>Ime i prezime:</b>	Ivana Prvulović
<b>Akademski naslov:</b>	doktor medicine
<b>Ustanova zaposlenja:</b>	OB „Dr. J. Benčević“, Slavonski Brod
<b>E-mail:</b>	ivana.hodak.prvulovic@gmail.com
<b>Datum rođenja:</b>	04. 10. 1974. u Koprivnici
<b>Zaposlenje:</b>	liječnik specijalist kliničke citologije
<b>Strani jezik:</b>	engleski

## Obrazovanje

1989. – 1993.	srednja škola - gimnazijski smjer matematički – informatičar u Križevcima
1993. – 2000.	Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2001.	položila državni ispit za doktora medicine
2002.	započela specijalizaciju iz Kliničke citologije u trajanju od 4 godine.

2004. – 2005. Specijalistički poslijediplomski studij iz kliničke citologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2006. položila specijalistički ispit iz kliničke citologije
2006. Znanstveni poslijediplomski studij iz biomedicine i zdravstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

### Zaposlenje

- 2000.-2001. liječnik – pripravnik, OB „Dr. J. Benčević“, Slavonski Brod
2002. – 2006. liječnik – specijalizant iz kliničke citologije, OB „Dr. J. Benčević“, Slavonski Brod
- od 2006. liječnik – specijalist iz kliničke citologije, OB „Dr. J. Benčević“, Slavonski Brod

### Objavljeni znanstveni i stručni radovi

#### *a) Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:*

1. **Prvulović I**, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Jakić-Razumović J, Manojlović S. Morphometry of tumor cells in different grades and types of breast cancer. Coll Antropol 2010; 34(1): 99–103.
2. Miličić – Juhas V, Perić M, Pajtler M, **Prvulović I**, Čuržik D. Pap test – with or without vaginal smear? Coll Antropol 2010; 34(1): 69–74.

#### *b) Kongresni sažeci publicirani u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:*

1. Miličić V, **Prvulović I**, Perić M, Lončar B, Mrčela M, Pajtler M. Metastasis of lobular carcinoma of breast – pitfalls and differential diagnosis. Cytopathology 2012; 23(1):92
2. Miličić V, **Prvulović I**, Lončar B, Perić M, Erman Vlahović M, Pajtler M. Unusual presentation of epidermal cyst mimicking a primary gynecologic malignancy. Acta Cytol 2013; 57(1): 83
3. Miličić V, **Prvulović I**, Perić M, Pajtler M, Tomić K, Vrselja N. Accuracy of cytological diagnosis of vulvar lesions. Acta Cytol 2013; 57(1): 104

4. **Prvulović I**, Miličić V, Novak NP, Mišić M, Mahovne I, Fuštar-Preradović Lj. Cytological analysis of peritoneal washes in rectal endometriosis – a case report. *Cytopathology* 2012; 23(1):119
5. **Prvulović I**, Miličić V, Mišić M, Tomić K. Cytological analysis of chylothorax – a case report. *Cytopathology* 2012; 23(1):126
6. **Prvulović I**, Miličić V, Mišić M, Tomić K, Mahovne I. Mammary pseudoangiomatic stromal hyperplasia – a case report. *Acta Cytol* 2013; 57(1): 49
7. Mišić M, Fuštar-Preradović Lj, **Prvulović I**, Tomić K, Jakovina T, Mahovne I, Jakovina K. Accuracy of cervicovaginal smears in patients with ovarian and endometrial cancers – our experience. *Cytopathology*, 2012.;23(1):10

#### **SCOPUS (Excerpta medica)**

1. Miličić V, **Prvulović I**, Mišić M, Perić M, Samardžić S, Tomić K. Small Cell Carcinoma Diagnostics - the Value of Cytology and Survival of Patients. *Coll Antropol* 2014;38(2):611–616.
2. Miličić V, **Prvulović I**, Panda N, Bilić-Kirin V, Kraljik N, Šerić V. Features Diagnostic value of cytology of voided urine. *Coll Antropol* 2014;38(2):617–620.

#### ***c) Radovi objavljeni u novim časopisima koji još nisu indeksirani:***

1. Miličić V, **Prvulović I**, Lončar B, Perić M, Rajc J, Bilić-Kirin V. Features of Atypical Granular Cell Tumor on Fine Needle Aspiration - A Case of 8 Months Old Baby. *Case Rep Clin Pathol*. 2014; Vol. 1, No. 2

#### ***d) Kongresni i drugi sažeci publicirani u drugim publikacijama:***

1. **Hodak I**, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Fabijanić I, Jakić-Razumović J, Šeparović V, Manojlović S. Breast tumor morphometry. A preliminary study. 2. Hrvatski kongres kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, svibanj 2005. (Knjiga sažetaka)
2. **Hodak I**, Kardum-Skelin I, Šušterčić D, Fabijanić I, Kušec R, Gašparov S, Planinc-Perajca A, Ostojčić S, Šiftar Z, Kardum-Paro MM, Vrhovac R, Minigo H, Radić D, Dejanović M, Judin S, Jakšić B. T and B clonal malignant lymphoma – a case report.

3. Hrvatski kongres kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija, svibanj 2005. (Knjiga sažetaka)
3. Miličić – Juhas V, Perić M, Pajtler M, **Prvulović I**, Čuržik D. Pap test – with or without vaginal smear? 4. Hrvatski kongres kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, Split, listopad 2009. (Knjiga sažetaka)
4. Ljubica Fuštar-Preradović , Jakovina T, Mišić M, **Prvulović I**, Tomić K, Mahovne I, Jakovina K. Infekcija *Helicobacter pylori* i polip želuca. 11.-ti Hrvatski kongres endoskopske kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem, Slavonski Brod, listopad 2012. (Knjiga sažetaka)

### Stručno usavršavanje

1. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Kardiopulmonalna reanimacija“, Opća bolnica „Dr. Josip Benčević“, 15. – 16. veljače 2002., Slavonski Brod
2. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Prognostički čimbenici u novotvorinama gastrointestinalnog sustava, hepatobilijarnog trakta i gušterače i njihova klinička primjena“, 4.-5-12.2003., Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
3. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Povećani limfni čvor: Dijagnostički i terapijski algoritam“, 28.-29. Ožujka 2003., Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
4. Simpozij „Mjesto citologije u dijagnostičkom algoritmu novotvorina“, 14.12.2004., Zagreb
5. 3. Hrvatski kongres kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, 1. Hrvatski simpozij citotehnologije s međunarodnim sudjelovanjem, 08. – 11. svibnja 2005., Opatija
6. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Izolacija DNA, izolacija RNA, PCR, RT-PCR, Southern blot hibridizacija, dot blot hibridizacija, sekvenciranje i genotipizacija pomoću mikrosatelita“, 21.-25. Studeni, 2005., voditelj dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

7. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Suvremena patohistološka i molekularna dijagnostika raka dojke“, voditeljica prof.dr.sc. J. Jakić-Razumović, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 29. ožujka 2006., Zagreb
8. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije: „Suvremeni pristupi u dijagnostici i liječenju tumora dojke“, voditelj doc.dr.sc. J. Fajdić, Medicinski fakultet Osijek, 13. –14. travnja 2007., Osijek
9. 1.-vi Europski Tutorial iz Citopatologije, Cavtat, Hrvatska, 26. – 30.10. 2008.
10. 4. Hrvatski kongres kliničke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, 2. Hrvatski simpozij citotehnologije s međunarodnim sudjelovanjem, 1. Hrvatski simpozij analitičke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, 11. – 14. listopada 2009., Podstrana, Split
11. Tečaj obnove znanja „UZV dojke“, Zagreb, 23.04.-02.07.2010.
12. 5.-ti Europski Tutorial iz Citopatologije, Trondheim, Norveška, 28.05 – 01.06 2012. Adriatic EUS workshop, course: pancreatic and billiary tract cytology, Zagreb, 2012.

### **Priznanja i nagrade**

2005. – Nagrada za najbolji rad u kategoriji mladih znanstvenika (do 35g.) od strane Europskog društva za citologiju, Pariz, Francuska

### **Stručna aktivnost**

- recenzent časopisa Collegium Antropologicum
- na stručnim sastancima Hrvatskog društva za kliničku citologiju u Zagrebu održala više stručnih predavanja
- predavanja o prevenciji raka dojke u Slavonskom Brodu u organizaciji udruge "Nada" s ciljem isticanja važnosti sekundarne prevencije raka dojke široj populaciji
- humanitarna misija u Nigeriji u organizaciji udruge "Patolozi bez granica" s ciljem osposobljavanja lokalnih citologa za provođenje nacionalnog programa probira za prevenciju raka grlića maternice.

**Članstva**

od 2001.

Hrvatske liječničke komore

Hrvatskog liječničkog zbora

Hrvatskog društva za kliničku citologiju

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Anatomija i histologija dojke .....	1
1.2. Karcinom dojke .....	4
1.2.1. Definicija, epidemiologija, etiologija .....	4
1.2.2. Klinička slika karcinoma dojke .....	9
1.3. Dijagnostičke metode .....	10
1.3.1. Trostruki test u dijagnostici promjena u dojci .....	10
1.3.2. Citološka dijagnostika .....	11
1.3.3. Patohistološka dijagnostika .....	17
1.4. Morfometrijska analiza .....	20
1.4.1. Računalni sistem za slikovnu analizu .....	21
1.4.2. Priprema uzoraka za slikovnu analizu i morfološke promjene stanica .....	23
1.4.3. Značenje morfometrijske analize .....	24
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>27</b>
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>28</b>
4.1. Statistička analiza podataka .....	29
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>32</b>
5.1. Gradiranje invazivnih karcinoma dojke na citološkim uzorcima .....	32
5.2. Morfometrija .....	36
5.2.1. Deskriptivna analiza .....	37
5.2.2. Morfometrijske karakteristike .....	39
5.3 K-medoid grupiranje .....	57
5.4. GEE .....	63II

5.5. Klasifikacijski značaj .....	66
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>69</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>78</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>81</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>83</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>85</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>96</b>



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U  
OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET  
OSIJEK**

**Ivana Prvulović**

**DIJAGNOSTIČKA/PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST  
CITOLOŠKOG SUSTAVA GRADIRANJA PO ROBINSONU I  
MORFOMETRIJSKA OBJEKTIVIZACIJA U  
ODREĐIVANJU GRADUSA INVAZIVNOG KARCINOMA  
DOJKE**

**Doktorska disertacija**

**Osijek, veljača 2015.**

Disertacija je izrađena u Službi za citologiju, patologiju i sudsku medicinu Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu.

MENTOR: doc.dr.sc Valerija Miličić, dr.med.

Rad ima 101 list.

Hvala cijeloj mojoj obitelji na strpljenju, ljubavi i podršci. Velika hvala mom dragom suprugu bez kojega ništa što radim ne bi imalo smisla.

Velika zahvala dragoj mentorici na potpunoj predanosti i pomoći u izradi rada, prof. Štefaniću na podršci i nesebičnom dijeljenju svojeg razumijevanja i znanja te gosp. Đuburu i gosp. Branku koji su velikodušno donirali sofisticiranu opremu koja je omogućila ovo istraživanje.

## POPIS KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU:

BRCA 1	Breast Cancer 1
BRCA 2	Breast Cancer 2
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
BMI	body mass index
MGG	My-Grunwald-Giemsma
G1	gradus 1 invazivnog karcinoma dojke
G2	gradus 2 invazivnog karcinoma dojke
G3	gradus 3 invazivnog karcinoma dojke
SD	standardna devijacija
IQR	interkvartilni raspon
GEE	generalni linearni model s izvedenicama
FF	faktor oblika
ConvA	konveksna površina
CCD	Charge Coupled Device
N/C	omjer jezgra/citoplazma
maxR	najveći polumjer
minR	najmanji polumjer
AR	mjera oblika
PPR	progesteronski receptor
ER	estrogenski receptor
Ki-67	proliferacijski biljeg
Her-2	human epidermal growth factor receptor 2

