

# Odnos između vrijednosti imunohistokemijskih parametara (ER, PR, HER2 i Ki-67) i klasičnih prognostičkih čimbenika raka dojke.

---

**Julardžija, Angelika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:234892>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

*Angelika Julardžija*

**ODNOS IZMEĐU VRIJEDNOSTI**  
**IMUNOHISTOKEMIJSKIH**  
**PARAMETARA (ER, PR, HER2 I Ki-67) I**  
**KLASIČNIH PROGNOŠTIČKIH**  
**ČIMBENIKA RAKA DOJKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Angelika Julardžija**

**ODNOS IZMEĐU VRIJEDNOSTI  
IMUNOHISTOKEMIJSKIH  
PARAMETARA (ER, PR, HER2 I Ki-67) I  
KLASIČNIH PROGNOСТИČKIH  
ČIMBENIKA RAKA DOJKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek, na Katedri za patologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Milanka Mrčela, specijalist patologije

Rad ima 30 listova i 12 tablica.

## **Predgovor**

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Milanki Mrčela, na nesebičnom trudu, strpljenju, stručnom vodstvu i vremenu izdvojenom tijekom izrade diplomskog rada. Također, neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj ljubavi, razumijevanju i potpori.

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Anatomija dojke .....	1
1.2. Karcinom dojke .....	1
1.2.1. Rizični čimbenici.....	1
1.3. Tipovi karcinoma dojke.....	2
1.3.1. TNM klasifikacija.....	2
1.4. Prognostički pokazatelji karcinoma dojke .....	4
1.4.1. Veličina tumora .....	4
1.4.2. Status aksilarnih limfnih čvorova.....	4
1.4.3. Histološki gradus.....	5
1.4.4. Status estrogenskih i progesteronskih receptora .....	5
1.4.5. Proliferacijska aktivnost .....	6
1.4.6. Receptor HER2/neu.....	6
2. Ciljevi istraživanja.....	8
3. Materijal i metode .....	9
3.1. Ustroj studije .....	9
3.2. Ispitanici .....	9
3.3. Metode.....	9
3.4. Statistička obrada podataka .....	10
4. Rezultati .....	11
5. Rasprava .....	16
6. Zaključak.....	18
7. Sažetak .....	19
8. Summary .....	20
9. Literatura .....	21
10. Životopis.....	24

## Popis oznaka, kratica i simbola

**AJCC** Američki odbor za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)

**BRCA1** engl. *Breast Cancer 1*

**BRCA2** engl. *Breast cancer 2*

**ER** estrogenski receptor

**FISH** fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *Fluorescence in situ hybridization*)

**HE** hemalaun-eozin

**HER2/neu** receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (engl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*)

**Ki-67** proliferacijski marker

**PR** progesteronski receptor

**TNM** tumor – limfni čvor – metastaze (engl. *tumour, node, metastases*)

**UICC** Internacionalni odbor za kontrolu raka (engl. *International Union Against Cancer*)

## 1. Uvod

### 1.1. Anatomija dojke

Dojka ili mliječna žlijezda modificirana je žlijezda znojnica koja se neprestano mijenja s obzirom na konstantan utjecaj hormona. Sastoji se od 15 do 20 žljezdanih režnjeva, a između režnjeva nalazi se vezivno i masno tkivo koje odvaja pojedine režnjeve (1). Režnjevi se sastoje od granajućih sustava kanalića, duktusa i glavnog izvodnog kanalića. Izvodni kanali dojke otvaraju se u bradavici (lat. *papilla mammaria*). Najveći broj karcinoma dojke počinje u duktusima (duktalni karcinom), a manji broj u stanicama lobula (lobularni karcinom) (2).

### 1.2. Karcinom dojke

Karcinom dojke najčešći je uzrok smrti žena u dobi od 35 do 59 godina, a bolest je izlječiva u visokom postotku ako se otkrije u ranijem stadiju (3). Incidencija karcinoma dojke varira s obzirom na pojedina područja, a najniža je u azijskim zemljama. Svake godine umre oko pola milijuna žena, a smrtnost se kontinuirano smanjuje u zemljama Europske Unije. Republika Hrvatska bilježi gotovo dvostruki rast incidencije u zadnjih 25 godina, sukladno trendovima u svijetu (4). Nagli porast incidencije karcinoma dojke može se pripisati uvođenjem Nacionalnog programa probira ranog otkrivanja raka dojke koji je usvojen 2006. godine. U Hrvatskoj se kod 46 % žena tumor otkriva u lokaliziranom stadiju. S obzirom na etiologiju, bolest ima heterogene značajke i usprkos brojnim istraživanjima, etiologija bolesti je još uvijek nepoznata. Postoje mnogobrojni rizični faktori, a najvažniji su hormonska neravnoteža, obiteljska anamneza i genetski faktori. Ne treba zaboraviti kako se karcinom dojke može javiti i kod muškaraca. Može se reći da je rak dojke postao javnozdravstveni problem i važno je uložiti velike napore u rano otkrivanje i liječenje te maligne bolesti.

#### 1.2.1. Rizični čimbenici

S obzirom na konstantan napredak novih tehnologija i zahvaljujući mnogim istraživanjima, znamo da karcinom dojke uključuje složeno međudjelovanje egzogenih i endogenih čimbenika (5). Točan uzrok još uvijek nije poznat, ali postoje brojni rizični faktori kao što su dob, genetska predispozicija, hormonska terapija, uporaba oralne kontracepcije, veći broj menstrualnih ciklusa, smanjena tjelesna aktivnost i prehrana (6, 7). Rizični faktori poput starije životne dobi, jedan ili dva bliska srodnika s dijagnosticiranim rakom dojke, prisustvo nasljednih genetskih mutacija (BRCA1 i/ili BRCA2) mogu do nekoliko puta povećati rizik za razvoj karcinoma dojke (8, 9). U rizične čimbenike ubrajamo i one na koje možemo i sami utjecati, kao što su stres, prekomjerna tjelesna težina, pušenje i alkoholizam, stoga odgovornim ponašanjem



možemo doprinijeti smanjenju rizika za obolijevanje. Postojanje jednog ili više rizika ne znači da će žena oboljeti, ali rano otkrivanje i pravovremena terapija daje najbolje mogućnosti uspješnog liječenja.

### 1.3. Tipovi karcinoma dojke

Histološki, ovisno o probijanju bazalne membrane, karcinome dojke dijelimo na invazivne i neinvazivne. Duktalni *in situ* karcinom je neinvazivni karcinom koji nije probio bazalnu membranu. Na njega otpada oko 15 % svih karcinoma dojke. Invazivni karcinom dojke se može proširiti na druga tkiva i u ostale dijelove tijela. Najčešći je invazivni duktalni karcinom koji čini oko 80 % svih invazivnih karcinoma dojke. Nastaje abnormalnom proliferacijom epitelnih stanica u mliječnim kanalićima. Uglavnom nije palpabilan i otkriva se slučajno, ali ima dobru prognozu s obzirom da proces nastanka invazivnih promjena traje godinama. Lobularni invazivni karcinom počinje u mliječnim žlijezdama dojke i čini svega 10 % svih invazivnih karcinoma dojke. Tubularni, mucinozni, papilarni i karcinom s medularnim obilježjima rjeđe su vrste invazivnih karcinoma i imaju malo bolju prognozu.

#### 1.3.1. TNM klasifikacija

Bolesnici/e oboljeli od raka dojke svrstavaju se u određene stupnjeve kako bi se došlo do najprikladnije terapije i procjene prognoze. Brojne studije pokazale su kako su veličina tumora i status limfnih čvorova iznimno važni za procjenu prognoze karcinoma dojke (10, 11, 12). Sukladno zapažanjima međunarodno prihvaćenih studija, Američki odbor za rak (*engl. American Joint Committee on Cancer, AJCC*) i Internacionalni odbor za kontrolu raka (*engl. International Union Against Cancer, UICC*) objavio je TNM sustav (*engl. tumour, node, metastases*), koji nastaje na temelju fizikalnog pregleda, laboratorijskih i radioloških nalaza. TNM klasifikacija standard je za procjenu stupnja razvoja i proširenja karcinoma. Opisuje karcinom pomoću tri parametra, T (veličina tumora i njegova invazivnost), N (zahvaćenost limfnih čvorova) i M (prisustvo metastaza). Općenito, tumori većih dimenzija, sa zahvaćenim limfnim čvorovima i postojanjem metastaza pripadaju u viši stadij i imaju lošiju prognozu. Tablica 1. prikazuje TNM klasifikaciju karcinoma dojke (13).

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma dojke

<b>VELIČINA TUMORA (T)</b>	
Tis	Karcinom <i>in situ</i>
T1	Tumor do 2 cm u promjeru
T2	Tumor od 2 do 5 cm
T3	Tumor veći od 5 cm
T4	Tumor koji zahvaća kožu ili prsni koš
<b>REGIONALNI LIMFNI ČVOROVİ (N)</b>	
N0	Bez zahvaćanja limfnih čvorova
N1	Zahvaćena 1-3 limfna čvora u aksili
N2	Zahvaćena 4-9 limfna čvora u aksili
N3	Zahvaćeno 10 i više limfnih čvorova u aksili
<b>UDALJENE METASTAZE (M)</b>	
M0	Ne postoje metastaze
M1	Prisutne metastaze

Nakon što se karcinom klasificira pomoću TNM sustava korištenjem dobivenih informacija definira se stadij karcinoma dojke (6). On se izražava rimskim brojevima od I (početni stadij karcinoma) do IV (uznapredovali stadij karcinoma) (Tablica 2.).

Tablica 2. Stadiji karcinoma dojke

<b>Stadij 0</b>	Tis, N0, M0
<b>Stadij I</b>	T1, N0, M0
<b>Stadij IIa</b>	T0-T2, N0-N2, M0
<b>Stadij IIb</b>	T2N1M0, T3N0M0
<b>Stadij III</b>	T0N2M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0
<b>Stadij IV</b>	Bilo koji T, bilo koji N, M1

#### 1.4. Prognostički pokazatelji karcinoma dojke

Prognoza karcinoma dojke varira od slučaja do slučaja stoga se određivanju prognoze mora individualno pristupiti. Ako se karcinom dojke otkrije u ranoj fazi, izlječiv je u više od 90 % slučajeva. Postoji niz kliničkih i patoloških prognostičkih pokazatelja koje možemo podijeliti na tradicionalne i novije koji su još predmet istraživanja. U prognostičke pokazatelje ubrajamo dob, veličinu tumora, status aksilarnih limfnih čvorova, histološki gradus i tip tumora, status hormonskih receptora, ekspresija gena za receptor humanog epidermalnog čimbenika rasta (HER2/neu) i proliferacijski indeks.

##### 1.4.1. Veličina tumora

Veličina tumora definira se kao najveći promjer tumora i posebno je važan kod bolesnica s negativnim pazušnim limfnim čvorovima. Postoji linearni odnos između veličine tumora i zahvaćenosti limfnih čvorova te veličine i preživljenja. Prognoza je bolja kod manjih tumora, premda je kod ekstremno velikih tumora prognoza nešto bolja od onih srednje veličine (14). Stope preživljenja navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Stope preživljenja s obzirom na veličinu tumora

Veličina tumora	Preživljenje
Tumori manji od 1cm	99 %
Tumori od 1 do 2cm	91 %
Tumori od 2 do 5cm	80 %
Tumori veći od 5cm	63 %

##### 1.4.2. Status aksilarnih limfnih čvorova

Najvažniji je prognostički pokazatelj karcinoma dojke status aksilarnih limfnih čvorova koji se najčešće utvrđuje kirurškim zahvatom ili biopsijom limfnog čvora. Bolesnice s pozitivnim limfnim čvorovima imaju nekoliko puta veću smrtnost od onih kojima limfni čvorovi nisu zahvaćeni tumorskim tkivom. Istraživanja su pokazala kako postoji povezanost između broja zahvaćenih limfnih čvorova i pojave udaljenih metastaza (15). Tablica 4. pokazuje stopu preživljenja s obzirom na broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova.

Tablica 4. Stopa preživljenja s obzirom na broj zahvaćenih limfnih čvorova

Broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova	Stopa petogodišnjeg preživljenja
0	82,8 %
1-3	73,0 %
4-12	45,7 %
>12	28,4 %

Ovisno o zahvaćenosti aksilarnih limfnih čvorova primjenjuje se određena terapija. S obzirom na moguće recidive kod osoba koje imaju pozitivne limfnih čvorova primjenjuje se adjuvantna sistemna terapija (16).

#### 1.4.3. Histološki gradus

Histološki gradus predstavlja biološki potencijal tumora, odnosno pokazuje manju ili veću agresivnost tumora. Tumori višeg gradusa su agresivniji od nižeg gradusa i prema tome viši gradus ima lošiju prognozu. Postoji nekoliko sustava stupnjevanja, ali najčešće se koriste Scarff-Bloom-Richardsonov i Nottinghamski sustav (17, 18). Ovisno o stupnju diferencijacije tumorskih stanica, tumore dijelimo u tri gradusa. Gradus I čine dobro diferencirani tumori, gradus II čine srednje diferencirani i gradus III čine slabo diferencirani tumori. Histološki gradus primarno se koristi kod određivanja vrste terapije za osobe kojima aksilarni čvorovi nisu zahvaćeni tumorskim tkivom (19).

#### 1.4.4. Status estrogenskih i progesteronskih receptora

Rast tkiva dojke regulira se hormonima estrogenom i progesteronom. Njihovi receptori pripadaju obitelji steroidnih receptora koji kontroliraju gene za proliferaciju stanica. Aktiviranjem estrogenskih receptora dolazi do proliferacije stanica dok se aktivacijom progesteronskih receptora potiče diferencijacija i kontrolira proliferacija zdravih stanica. Procjenjuje se da je gotovo 75 % svih karcinoma dojke hormonski pozitivno. Kod starijih bolesnika povećava se i udio tumora pozitivnih na estrogenske receptore. Prisutnost tih receptora ima prediktivni i prognostički značaj (20). Izraženost estrogenskih i progesteronskih receptora određuje se imunohistokemijskom metodom bojenja i označava kao postotak

obojenih tumorskih jezgara. Tumori pozitivni na estrogenske i progesteronske receptore su manje agresivni i ukoliko su oba receptora pozitivna, uglavnom dobro odgovaraju na hormonsku terapiju (7). Pozitivni estrogenski receptori u korelaciji su s nižim histološkim gradusom, manjom veličinom tumora, nižim proliferacijskim indeksom i manjim brojem zahvaćenih limfnih čvorova. Tumori koji su hormonski negativni obično su agresivniji i imaju veći rizik od povrata bolesti (21).

#### 1.4.5. Proliferacijska aktivnost

Proliferacijska aktivnost važan je prognostički pokazatelj karcinoma dojke. Procjena proliferacijske aktivnosti radi se uz pomoću imunohistokemijskih metoda, a najčešće korišten proliferacijski biljeg je Ki-67 (22). Prisutan je u stanicama samo u aktivnim fazama staničnog ciklusa i izražava se u postotku nakon što se imunohistokemijski odredi. U zdravom tkivu dojke gotovo da i nije izražen, svega do 3 %, dok mu je u karcinomima izraženost do 90 %. Visok pozitivitet Ki-67 korelira s histološkim gradusom i brojem zahvaćenih limfnih čvorova, dok s veličinom tumora ne pokazuje podudarnost. Ne pokazuje povezanost s hormonskim receptorima i općenito visoka ekspresija tog biljega povezana je s lošijom prognozom i mogućim relapsom bolesti (23, 24).

#### 1.4.6. Receptor HER2/neu

Uz steroidne receptore na proliferaciju epitelnih stanica utječu i receptori humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (eng. *Human epidermal growth factor receptor*, HER2/neu). Najčešće se određuje imunohistokemijskim metodama (HerceptTest) i/ili nekom od metoda hibridizacije *in situ* (25). Imunohistokemijski testovi brži su i jeftiniji, ali su metode hibridizacije *in situ* osjetljivije i pouzdanije, stoga se one koriste u slučajevima dvojbene rezultata. Interpretacija rezultata imunohistokemijskog bojanja najčešće se očitava kao 0 i 1+ (negativan), 2+ (nejasan) i 3+ (pozitivan). Samo intenzitet jačine 3+ (jako obojenje, oko 2 milijuna receptora po stanici) označava se kao pozitivan nalaz i takve pacijentice su kandidati za terapiju Herceptinom. Ukoliko je očitavanje imunohistokemijskim metodama pokazalo 2+, nalaz se potvrđuje fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (engl. *Fluorescence in situ hybridization*, FISH). Ekspresija HER2/neu je negativna u epitelnim stanicama kanalića dojke, a visoku izraženost nalazimo u oko 10-40 % invazivnih karcinoma dojke. Povišena količina receptora HER2/neu povezana je sa slabije diferenciranim tumorima, tumorima koji su se proširili u aksilarne limfne čvorove, većim tumorima i s negativnim hormonskim receptorima

(26, 27, 28). Dobra strana što točnijeg određivanja ekspresije HER2/neu receptora je izdvajanje bolesnica koje su pogodne za terapiju trastuzumabom.

### 2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog rada jesu:

1. Prikupiti podatke pacijentica s rakom dojke dijagnosticirane s obzirom na dob, patološki tip, histološki gradus, veličinu tumora i prisustvo nodalnih metastaza i patološkog statusa te vrijednosti ER, PR, HER2/neu i Ki-67.
2. Na materijalu dobivenom pomoću biopsije ispitati povezanost veličine tumora dojke s pojavom metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.
3. Ispitati povezanost histološkog gradusa i statusa ER, PR i Her2/neu receptora.
4. Klasične prognostičke čimbenike pacijenata s dijagnosticiranim karcinomom dojke usporediti s omjerom ER/PR.

### 3. Materijal i metode

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija.

#### 3.2. Ispitanici

Ispitanici uključeni u istraživanje su bolesnice i bolesnici oboljeli od raka dojke podvrgnuti mastektomiji na Klinici za kirurgiju KBC-a Osijek u petogodišnjem periodu od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2018. godine. Uključni kriteriji: pacijentice i pacijenti oboljeli od invazivnoga karcinoma dojke kojima je patohistološki pregledano tkivo dojke i aksile te je određena veličina invazivnoga tumora dojke, histološki tip i gradus tumora, broj zahvaćenih aksilarnih limfnih čvorova, status estrogenskih i progesteronskih receptora, status HER2/neu receptora i status proliferacijskog biljega Ki-67. Isključni kriteriji: bolesnice i bolesnici s neinvazivnim karcinomom dojke, bolesnice i bolesnici s invazivnim karcinomom dojke u čijoj dokumentaciji nedostaju neki od podataka koji su važni za ovo istraživanje (veličina tumora, broj limfnih čvorova zahvaćenih tumorom, status steroidnih receptora i HER2/neu receptora). Uključeno je ukupno 650 ispitanika kojima je dijagnosticiran invazivni karcinom dojke.

#### 3.3. Metode

Podaci o dobi pacijentica i patohistoloških obilježja tumora: veličina tumora, histološki gradus, zahvaćenost aksilarnih limfnih čvorova, imunohistokemijska ekspresija receptora za estrogen i progesteron, status HER2/neu receptora i proliferacijskog biljega Ki-67 prikupljeni su iz dostupne medicinske dokumentacije Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek. U istraživanju su korišteni patohistološki nalazi bolničkog informacijskog sustava. Uzorci dobiveni mastektomijom obrađeni su standardnom histološkom metodom koja podrazumijeva fiksaciju tkiva u formalinu, uklapanje u parafinske blokove, deparafiniziranje i bojanje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE). Histološki gradus određen je prema Scarff-Bloom-Richardson metodi pri čemu su tumori s 3-5 bodova svrstani u gradus 1, tumori s 6-7 bodova u gradus 2 i tumori s 8-9 bodova gradus 3. S obzirom na veličinu i status aksilarnih limfnih čvorova tumori su podijeljeni sukladno TNM klasifikaciji dojke. Za dokaz prisutnosti estrogenskih, progesteronskih, HER2/neu receptora i Ki-67 korištena je imunohistokemijska metoda s komercijalno dostupnim protutijelima.



Intenzitet ekspresije HER2/neu određivao se semikvantitativno kako slijedi:

0 i 1+ – slab intenzitet ekspresije (negativno)

2+ – umjeren intenzitet ekspresije (nejasno)

3+ – jak intenzitet ekspresije (pozitivno)

Samo uzorci koji su pokazivali 3+ definirani su kao pozitivni. Kod uzoraka s dvojbom nalazom (2+) dodatno se napravila in situ hibridizacija.

#### 3.4. Statistička obrada podataka

Numerički podaci predstavljeni su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Pomoću Pearsonovog i Spearmanovog koeficijenta korelacije testirana je povezanost između dviju varijabli. Razlike kategorijskih varijabli testirane su hi-kvadrat testom, a sve p vrijednosti dvostrane su. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program IBM SPSS (inačica 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

#### 4. Rezultati

Prema patohistološkim nalazima iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju i sudsku medicinu KBC-a Osijek utvrđeno je ukupno 650 pacijenata s dijagnosticiranim karcinomom dojke u promatranom razdoblju, odnosno od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2018. Ispitanici su imali od 28 do 93 godine, a prosjek godina iznosio je 61,36. Od 650 ispitanika 11 su muški ispitanici. S obzirom na histološki tip tumora, najveći broj ispitanika imao je duktalni invazivni karcinom (74,1 %). Manji dio ispitanika imao je lobularni invazivni karcinom (11,1 %), dok je preostalih 14,8 % imalo neki drugi tip histoloških tumora (Tablica 5.).

Tablica 5. Udio ispitanika s obzirom na histološki tip tumora

Histološki tip tumora	Broj (%) ispitanika
Duktalni invazivni karcinom	483 (76,4 %)
Lobularni invazivni karcinom	73 (11,6 %)
Miješani tip karcinoma	24 (3,8 %)
Mucinozni karcinom	19 (3,0 %)
Papilarni invazivni karcinom	12 (1,8 %)
Medularni karcinom	11 (1,7 %)
Tubularni invazivni karcinom	9 (1,4 %)
Neuroendokrini karcinom	1 (0,2 %)

Ispitanicama je određen histološki gradus, prema kojemu je najveći broj tumora, njih 44,1 %, bilo histološkog gradusa II (srednje diferencirani). Manji dio činila je skupina histološkog gradusa III (29,6 %). Dobro diferencirani tumori činili su 26,3 % (Tablica 6.).

Tablica 6. Udio pojedinih histoloških gradusa

		Broj (%) ispitanika
HISTOLOŠKI GRADUS	srednje diferenciran	265 (44,1)
	slabo diferenciran	178 (29,6)
	Dobro diferenciran	158 (26,3)
Ukupno		601 (100,0)

Dobivena je značajna povezanost veličine tumora i pojave metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima ( $\chi^2$  test=119,83,  $p < 0,001$ ). Značajno je veći udio ispitanika koji imaju veći tumor s većim brojem pozitivnih limfnih čvorova (Tablica 7.).

Tablica 7. Povezanost veličine tumora s pojavom metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima

Veličina tumora	Broj pozitivnih limfnih čvorova				Ukupno	p*
	0	1-3	4-5	>10		
T1a (do 0,5cm)	7 (1,87 %)	1 (0,90 %)	1 (1,32 %)	0	9 (1,47 %)	<b>&lt;0,001</b>
T1b (0,5-1cm)	86 (22,90 %)	6 (5,45 %)	1 (1,32 %)	0	93 (15,22 %)	
T1c (1-2cm)	171 (45,60 %)	40 (36,36 %)	16 (21,05 %)	8 (16 %)	235 (38,46 %)	
T2 (2-5cm)	100 (26,67 %)	53 (48,20 %)	48 (63,16 %)	33 (66 %)	234 (38,29 %)	
T3 (>5cm)	11 (2,93 %)	10 (9,09 %)	10 (13,16 %)	9 (18 %)	40 (6,54 %)	
Ukupno	375 (100 %)	110 (100 %)	76 (100 %)	50 (100 %)	611 (100 %)	

\*  $\chi^2$  test

Utvrđivanjem povezanosti metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i statusa ER, PR i HER2 također nije utvrđena statistički značajna korelacija ( $\chi^2$  test=2,36,  $p = 0,31$ ) (Tablica 8.).

Tablica 8. Povezanost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i statusa ER, PR i HER2

Metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima	ER pozitivni	PR pozitivni	HER2 pozitivni	p*
Pozitivne	212 (37,19 %)	195 (36,59 %)	45 (44,55 %)	0,31
Negativne	358 (62,81 %)	338 (63,41%)	56 (55,45 %)	

\*  $\chi^2$  test

Postoji značajna povezanost histološkog gradusa sa statusom ER, PR i HER2/neu ( $\chi^2$  test=46,89,  $p < 0,001$ ). Značajno je manji udio pacijenata s dobro i umjereno diferenciranim histološkim gradusom koji su HER2/neu pozitivni, dok je udio pacijenata koji su HER2/neu pozitivni značajno veći kod slabo diferenciranog histološkog gradusa (Tablica 9.).

Tablica 9. Povezanost histološkog gradusa sa statusom ER, PR i HER2/neu

Histološki gradus	ER pozitivni	PR pozitivni	HER2 pozitivni	p*
Dobro diferencirani	156 (28,94 %)	153 (29,37 %)	9 (9,18 %)	<b>&lt;0,001</b>
Umjereno diferencirani	250 (46,38 %)	243 (46,64 %)	35 (35 %)	
Slabo diferencirani	133 (24,67 %)	125 (23,99 %)	54 (55 %)	
Ukupno	539 (100 %)	521 (100 %)	98 (100 %)	

\*  $\chi^2$  test

Postoji značajna povezanost histološkog gradusa i statusa ER/PR ( $\chi^2$  test=73,31,  $p < 0,001$ ) (Tablica 10.). Značajno je veći udio ispitanika sa ER- i/ili PR- kod umjerenog i slabo diferenciranog histološkog gradusa u odnosu na dobro diferencirani histološki gradus.

Tablica 10. Povezanost statusa ER/PR i histološkog gradusa

Status ER/PR	Histološki gradus			p*
	dobro	umjereno	slabo	
ER+/PR+	150 (96,77 %)	238 (90,15 %)	121 (68,36 %)	<b>&lt;0,001</b>
ER+/PR-	3 (1,94 %)	10 (3,79 %)	9 (5,08 %)	
ER-/PR+	0	3 (1,14 %)	2 (0,56 %)	
ER-/PR-	2 (1,23 %)	13 (4,92 %)	45 (25,42 %)	
Ukupno	155 (100 %)	264 (100 %)	177 (100 %)	

\*  $\chi^2$  test

Postoji značajna povezanost statusa ER/PR i veličine tumora ( $\chi^2$  test=40,45,  $p < 0,001$ ). Značajno je veći udio ispitanika sa ER- i/ili PR- kod većih tumora, nego kod manjih tumora (Tablica 11.).

Tablica 11. Povezanost veličine tumora i statusa ER/PR

Status ER/PR	Veličina tumora					Ukupno	p*
	T1a	T1b	T1c	T2	T3		
ER+/PR+	10/10	93	214	190	21	528	<b>&lt;0,001</b>
ER+/PR-	0	2	22	11	2	37	
ER-/PR+	0	0	3	3	0	6	
ER-/PR-	0	4	23	41	12	80	
Ukupno	10/10	99 (100 %)	262 (100 %)	245 (100 %)	35 (100 %)	651 (100 %)	

\*  $\chi^2$  test

Nema značajne povezanosti između broja pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova i statusa ER/PR ( $\chi^2$  test=13,8, p = 0,13). Značajno je manji udio ER+/PR+ kod više od 10 pozitivnih limfnih čvorova, a veći udio ER-/PR+ i ER-/PR- (Tablica 12.).

Tablica 12. Povezanost broja pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova i statusa ER/PR

Status ER/PR	Broj pozitivnih limfnih čvorova				Ukupno	p*
	0	1-3	4-5	>10		
ER+/PR+	336 (82,56 %)	93 (84,54 %)	57 (81,43 %)	31 (64,58 %)	517 (81,42 %)	0,13
ER+/PR-	23 (5,65 %)	7 (6,36 %)	4 (5,71 %)	2 (4,17 %)	36 (5,67 %)	
ER-/PR+	3 (0,74 %)	0	0	2 (4,17 %)	5 (0,79 %)	
ER-/PR-	45 (11,06 %)	10 (9,09 %)	9 (12,86 %)	13 (27,08 %)	77 (12,13 %)	
Ukupno	407 (100 %)	110 (100 %)	70 (100 %)	48 (100 %)	635 (100 %)	

\*  $\chi^2$  test

## 5. Rasprava

U provedenome istraživanju ispitani su podatci bolesnika oboljelih od karcinoma dojke tijekom petogodišnjeg razdoblja, od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2018. godine. Analizirani uzorci dobiveni su mastektomijom pri čemu je istraživanje obuhvatilo 650 bolesnika. Prema navodima literature najzastupljeniji histološki tip karcinoma dojke je duktalni invazivni karcinom koji čini oko 80 % ukupnoga broja karcinoma dojke. U skladu s navodima literature, najveći broj ispitanika u radu imao je duktalni invazivni karcinom, a drugi po učestalosti je lobularni invazivni karcinom (29). U literaturi je gradus II opisan kao najčešći nalaz, a iz podataka dobivenih provedenim istraživanjem gotovo polovina ukupnog broja ispitanika imao je histološki gradus II (30).

Podatci dobiveni u istraživanju pokazuju statistički značajnu pozitivnu korelaciju između veličine tumora i pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova. Manji tumori povezani su s povoljnijom prognozom, dok na lošiju prognozu upućuju veći tumori i metastazama zahvaćeni limfni čvorovi (12, 31). Većina tumora su bili T1c (1-2cm) i T2 (2-5cm) tumori. Pozitivni aksilarni limfni čvorovi pronađeni su kod 236 (38,6 %) ispitanika. Dobiveni rezultat sličan je brojnim provedenim studijama, a Carter i suradnici su pokazali kako bolesnici s tumorom manjim od 1cm imaju ukupno petogodišnje preživljenje oko 99 % (14). Metastaze u limfnim čvorovima iznimno su važne za procjenu dužine preživljenja. Bolesnici s negativnim limfnim čvorovima imaju petogodišnje preživljenje iznad 80 % (15). Kod pozitivnih limfnih čvorova petogodišnje preživljenje je ispod 60 %. Lošija prognoza je povezana i s većim brojem zahvaćenih limfnih čvorova.

S obzirom na imunohistokemijske parametre, najveći broj ispitanika imao je pozitivan hormonski status i negativan HER2/neu status. Status hormonskih receptora važan je za predviđanje odgovora na terapiju (7). Pozitivni estrogenski i progesteronski receptori daju odgovor na endokrinu terapiju oko 80 %, dok negativni estrogenski i progesteronski receptori daju odgovor ispod 10%. Prema navodima literature, pozitivni hormonski receptori povezani su s dužim preživljenjem (32). Rezultati ove studije mogu se usporediti s rezultatima drugih studija u kojima je potvrđena povezanost negativnih hormonskih receptora s višim tumorskim gradusom (33). Prekomjerna ekspresija HER2/neu proteina u većini studija je povezana s agresivnijim tijekom bolesti i lošijom prognozom (25). Osim toga, prekomjerna ekspresija HER2/neu proteina vidi se u slabije diferenciranim tumorima, većim tumorima i tumorima s

negativnim hormonskim receptorima. Povoljna strana prekomjerne ekspresije HER2/neu receptora mogućnost je terapije Herceptinom (trastuzumab), monoklonskim protutijelom koji inhibira rast tumorskih stanica. Primjenjuje se samo kod pacijenata s prisutnim metastazama, s obzirom da je poznata nuspojava lijeka kardiotsičnost. Ekspresija estrogenskih i progesteronskih receptora i negativan status HER2/neu receptora najvećim dijelom je odlika tumora žena starije životne dobi i imaju povoljni fenotip u terapijskom i prognostičkom smislu. Triple negativna fenotipska skupina ima negativne hormonske receptore i negativan HER2/neu receptor i karakteriziraju ih visoki histološki gradus, manja veličina tumora, lošija prognoza i javlja se češće kod žena premenopauzalne dobi (34).

S obzirom da je karcinom dojke heterogena bolest s različitim patološkim obilježjima i biološkim ponašanjem, prognostički faktori iznimno su važni u predviđanju ishoda bolesti i samog odabira terapije. Ovi podatci imaju važan klinički značaj jer se može zaključiti da se kombinacijom višestrukih prognostičkih čimbenika može doći do individualnije terapije za pojedince i smanjiti mogućnost teških posljedica koje nose agresivne terapije.



## 6. Zaključak

Na temelju provedenoga istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) U petogodišnjem razdoblju od 1. siječnja 2014. do 31. prosinca 2018. ukupno je dijagnosticirano 650 bolesnika i bolesnica s invazivnim karcinomom dojke.
- 2) Najveći je broj karcinoma dojke duktalni invazivni karcinom (74,1 %).
- 3) Najveći broj tumora dojke je srednje diferenciran (histološkog gradusa II).
- 4) Postoji statistički značajna povezanost veličine tumora i pojave metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima.
- 5) Nije utvrđena statistički značajna povezanost metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima i statusa ER, PR i HER2/neu.
- 6) Utvrđen je značajno manji udio pacijenata s dobro i umjereno diferenciranim histološkim gradusom koji su HER2/neu pozitivni.
- 7) Značajno je veći udio ispitanika sa ER- i/ili PR- kod umjerenog i slabo diferenciranog histološkog gradusa.
- 8) Postoji značajna povezanost statusa ER/PR i veličine tumora.

## 7. Sažetak

Cilj istraživanja: Cilj je ovog rada prikupljene podatke pacijentica s dijagnosticiranim rakom dojke, koji se odnose na klasične prognostičke čimbenike (dob, patološki tip karcinoma dojke, histološki gradus, veličina tumora, prisustvo metastaza u limfnim čvorovima i patološki status) korelirati s imunohistokemijskim parametrima kao što su ER, PR, HER2/neu i Ki-67. Navedeni parametri također su uspoređeni s posebnim osvrtom na omjer ER/PR prema drugim parametrima.

Nacrt studije: Presječna studija.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 650 ispitanika kojima je dijagnosticiran invazivni karcinom dojke. Iz dostupne medicinske dokumentacije prikupljeni su arhivski podatci o patohistološkom nalazu tkiva dobivenog mastektomijom. Odabrani uzorci obrađeni su standardnom histokemijskom metodom. Za dokaz prisutnosti estrogenskih, progesteronskih, HER2/neu receptora i Ki-67 korištena je imunohistokemijska metoda s komercijalno dostupnim protutijelima.

Rezultati: Najveći broj ispitanika imao je duktalni invazivni karcinom (74,1 %). Također, najvećem broju ispitanika utvrđen je histološki gradus II. Utvrđena je statistički značajna povezanost između veličine tumora i metastaza u limfne čvorove. Značajno je manji udio pacijenata s dobro i umjereno diferenciranim histološkim gradusom koji su HER2/neu pozitivni. S obzirom na veličinu tumora i status ER/PR, značajno je veći udio ispitanika sa ER- i/ili PR- kod većih tumora.

Zaključak: Najčešći je invazivni duktalni karcinom dojke. Manji tumori povezani su s povoljnijom prognozom, dok na lošiju prognozu upućuju veći tumori i metastazama zahvaćeni limfni čvorovi. Pozitivni hormonski receptori povezani su s dužim preživljenjem. Prekomjerna ekspresija HER2/neu proteina je povezana s agresivnijim tijekom bolesti i lošijom prognozom.

Ključne riječi: karcinom dojke, prognostički i prediktivni faktori, ER, PR, HER2/neu

## 8. Summary

### **Relationship between the values of immunohistochemical parameters (ER, PR, HER2 and Ki-67) and classical prognostic factors of breast cancer**

**Objective:** The aim of this study is to correlate the collected data of patients diagnosed with breast cancer, which relate to classical prognostic factors (age, pathological type of breast cancer, histological grade, tumor size, lymph node metastases and pathological status) with immunohistochemical parameters, i.e. ER, PR, HER2/neu and Ki-67. The mentioned parameters were also compared with a special reference to the ER/PR ratio to other parameters.

**Material and methods:** The study involved 650 cases of breast cancer. Data regarding the pathohistological status of breast tissue was obtained from available medical records. Histological specimens were analyzed for tumor size, axillary lymph node status, histological grade, estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), HER2/neu, and Ki-67.

**Results:** The most common histological type was invasive ductal carcinoma (74,1 %). A statistically significant association was found between tumor size and lymph node metastases. Given the size of the tumor and the status of ER / PR, there is a significantly higher number of patients with ER- and / or PR- in larger tumors. There is a higher percentage of HER2/neu positive tumors in high grade tumors than in low grade tumors.

**Conclusion:** Positive correlation is established between tumor size and number of positive lymph nodes. The study results show that the well differentiated tumors are statistically significantly smaller in size, and the hormone receptors are positive in more cases. Positive hormone receptors are associated with longer survival. Overexpression of HER2/neu protein is associated with a more aggressive course of the disease and a poorer prognosis.

**Key Words:** breast cancer, prognostic and predictive factors, ER, PR, HER2

**9. Literatura**

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. ANATOMIJA ČOVJEKA. Medicinska naklada: Zagreb 2011;324-9.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1995.
3. Dong G, Wang D, Liang X, Gao H, Wang L, Yu X, Liu J. Factors related to survival rates for breast cancer patients. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Oct 15;7(10):3719-3724.
4. Znaor A. Epidemiologija raka dojke. 1. Hrvatski kongres ginekološke onkologije s međunarodnim sudjelovanjem. Knjiga sažetaka/ ESGO, Hrvatsko ginekološko društvo (ed).- Zagreb: Hrvatsko ginekološko onkološko društvo. 2008,56-57.
5. 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.
6. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. 1.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
7. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. 3.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
8. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet*. 2012;82:105-114.
9. Boyle P, Autier P, Bertelink H, Baselga J i sur. European Code Against Cancer and scientific justification: Third version(2003). *Annals of Oncology* 2003;14:973-1005.
10. Adair F, Berg J, Jow, Robbins G. Long-term follow-up of breast cancer patients: The 30-year report. *Cancer* 1974;33:1145-1150.
11. Ketterhagen JP, quackenbush SR, Haushalter RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 1984;158:120-123.
12. Freedman LS, Edwards DN, McConnell EM, Downham DY. Histological grade and other prognostic factors in relation to survival of patients with breast cancer. *Br J Cancer* 1979;40:44-55.
13. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(17):3628-36.
14. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.
15. Jakić-Razumović J, Unušić J. Patohistološka analiza aksilarnih limfnih čvorova s posebnim osvrtom na postupak kod biopsije „sentinel“ limfnog čvora . U: Bolesti dojke

- (zbornik radova XI. Znanstvenog sastanka „Bolesti dojke“). Prpić I i sur. (ur). Zagreb 2001; 107-118.
16. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:3817-27.
  17. 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.
  18. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:207–19.
  19. NCCN - National Comprehensive Cancer Network: Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Breast Cancer. V.2; 2012.
  20. Hilsenbeck SG, Ravdin PM, de Moor CA, et al. Time-dependence of hazard ratios for prognostic factors in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;52:227-37.
  21. Scawn R, Shousha S. Morphologic spectrum of estrogen receptor negative breast carcinoma. *ArchPatholLabMed* 2002;126:325-330.
  22. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31(1):13–20.
  23. De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96(10):1504–13.
  24. Keshgegian AA, Cnaan A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol.* 1995;104:42-9.
  25. Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, i sur. Determination of HER2/neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000;13:37-45.
  26. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990;50:4322-7.
  27. Winstanley J, Cooke T, Murray GD, et al. The long term prognostic significance of c-erb2 in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63:447-50.
  28. Paterson MC, Dietrich KD, Danyluk J, et al. Correlation between c-erb-2 amplification

and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 1991;51:566-7.

29. Pinder SE, Elston CW, Ellis IO. Invasive carcinoma - usual histological types. Invasive carcinoma of no special type (ductal NST). U: Elston CW, Ellis IO, (ur). *The Breast*, London: Churchill Livingstone, 1998;284-287.

30. Iqbal J, Abukhatir M, Shafi AA, Alyahya GM, Alharthi BN. Hormone receptore status of breast cancer in patients of different age groups, lymph node status, histological type and tumor grade. *Pak J Surg*. 2014;30:296-300.

31. Anber AL, Collins L, Peiro G, Recht A, Come S, Shulman LN, i sur. Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer*. 1998;83:2502-2508.

32. Urmila Devi P, Prasad U, Lakshmi HB, Rao GS. A study of correlation of expression of ER, PR an HER2/neu receptor status with clinico-pathological parameters in breast carcinoma at tertiary care centre. *Int J Res Med Sci*. 2015;3:165-173

33. Layfield LJ, Gupta D, Mooney EE. Assessment of Tissue Estrogen and Progesterone Receptor Levels: A Survey of Current Practice, Techniques, and Quantitation Methods. *Breast J*. 2000;6:189-196.

34. Chlebowski RT, Anderson GL, Lane DS i sur. Predicting risk of breast cancer in postmenopausal women by hormon receptor status. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1695-705.

**10. Životopis**Osobni podatci

Ime i prezime	Angelika Julardžija
Adresa	Zrinsko-Frankopanska 7, Eminovci, 34308 Jakšić
Mobilni telefon	0998260898
E-mail	angelika.julardzija8@gmail.com
Godina rođenja	1995.

Školovanje

	<b>Medicinski fakultet u Osijeku</b>
rujan 14 – rujan 17 Fakultet	Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika
rujan 10 – svibanj 14 Srednja škola	<b>Gimnazija Požega</b> Smjer: opći