

# Praćenje učestalosti karcinoma dojke u bioptičkom materijalu Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci u osmogodišnjem razdoblju

---

Kovačević, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:975062>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Mirna Kovačević**

**Praćenje učestalosti karcinoma dojke u**  
**bioptičkom materijalu Odjela za**  
**patologiju i citologiju Opće županijske**  
**bolnice Vinkovci u osmogodišnjem**  
**razdoblju**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

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

**Mirna Kovačević**

**Praćenje učestalosti karcinoma dojke u**  
**bioptičkom materijalu Odjela za**  
**patologiju i citologiju Opće županijske**  
**bolnice Vinkovci u osmogodišnjem**  
**razdoblju**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren na Katedri za patološku anatomiju i sudsku medicinu, Medicinski fakultet Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Dražen Švigelj, dr. med.

Rad ima 38 listova, 5 slika i 6 tablica.

## **PREDGOVOR**

*Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Draženu Švagelju na predloženoj temi i stručnom vodstvu u pisanju diplomskog rada. Hvala Vam na trudu, izdvojenom vremenu i savjetima.*

*Također, zahvaljujem prijateljima, obitelji i dečku na razumijevanju i potpori tokom studija.*

*Najveću zahvalu upućujem roditeljima. Hvala vam na svim odricanjima, razumijevanju i podršci.*

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA .....	II
1. UVOD.....	1
1.1. Dojka .....	1
1.2. Karcinomi dojke.....	1
1.3. ER, PR Ki-67 i amplifikacija HER2/neu .....	2
1.4. Imunofenotipovi karcinoma dojke .....	3
1.5. Epidemiologija .....	3
1.6. Etiologija.....	4
1.7. Klinička slika .....	4
1.8. Dijagnoza .....	5
1.9. Liječenje .....	6
2. CILJ .....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	10
3.1. Ustroj studije .....	10
3.2. Materijali.....	10
3.3. Metode.....	10
3.4. Statističke metode .....	11
4. REZULTATI.....	12
4.1. Opis uzorka .....	12
4.2. Raspodjela po imunofenotipu .....	14
5. RASPRAVA .....	20
6. ZAKLJUČAK .....	24
7. SAŽETAK .....	25
8. SUMMARY .....	26
9. LITERATURA.....	27
10. ŽIVOTOPIS .....	32

## POPIS KRATICA

DCIS – duktalni karcinom *in situ*

LCIS – lobularni karcinom *in situ*

NOS – invazivni karcinomi bez posebnih karakteristika (engl. *not otherwise specified*)

ER – estrogenski receptor

PR – progesteronski receptor

HER2/neu – receptor za tirozinazu (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*)

Ki-67 – proliferacijski indeks

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World health organization*)

CT – računalna tomografija

MR – magnetska rezonancija

KKS – kompletna krvna slika

DKS – diferencijalna krvna slika

RTG – radiografija

UVZ – ultrazvuk

FFPE – fiksirano formalinom i uklopljeno u parafin (engl. *primarily formalin – fixed paraffin – embedded*)

HOD – Hrvatsko onkološko društvo

ASCO – Američko društvo za kliničku onkologiju (engl. *American Society of Clinical Oncology*)

CAP – Američko udruženje patologa (engl. *College of American Pathologists*)

FISH – fluorescentna *in situ* hibridizacija

CISH – kromogena *in situ* hibridizacija

# 1. UVOD

## 1.1. Dojka

Dojke su modificirane žlijezde kože koje su kod žena kompleksne funkcionalne jedinice, a kod muškaraca rudimentarni organi (1). Kod žena tijekom života podliježu kontinuiranim promjenama u okviru menarhe, trudnoće, laktacije i menopauze (2).

Tri su osnovne komponente dojke: koža s potkožnim masnim tkivom, žlijezde i vezivno-masna osnovica. Žljezdani parenhim dojke sastoji se od 15 do 25 lobusa (režnjeva). Lobus je građen od granajućeg sustava duktusa (kanalića). Laktiferni duktus (glavni izvodni kanal) širi se u laktiferni sinus (proširenje) i otvara na bradavici. S druge strane, preko segmentalnih i subsegmentalnih duktusa, sustav duktusa dolazi do terminalne duktulo-lobularne jedinice. Nju čine ekstralobularni duktus i lobul(us). Lobul čine acinus (žlijezda) i intralobularni duktus koji su okruženi rahlom intralobularnom stromom. Između lobula nalazi se gusta, kolagenska i vezivna interlobularna stroma te masno tkivo (1).

Osim dvije glavne strukture i dva tipa strome, dojka ima dva tipa epitelnih stanica. To su luminalne (sekretorne) i mioepitalne stanice (2). Areola, bradavica i završni dio laktifernog kanalića prekriveni su višerednim pločastim epitelom. On postupno prelazi u pseudostratificirani cilindrični epitel, a potom u dvoredni kubični epitel koji oblaže većinu kanalića (3).

## 1.2. Karcinomi dojke

Najčešće je zloćudna novotvorina dojke karcinom. To je zloćudna epitelna novotvorina koja nastaje iz epitela terminalnih kanalića ili duktulo-lobularnih jedinica. Prema invazivnosti dijelimo ga na neinvazivne (*in situ*), mikroinvazivne i invazivne karcinome s prepoznatljivim subtipovima. Za razliku od invazivnog, neinvazivni karcinom nema sposobnost invazije bazalne membrane. Tumorske stanice su ograničene na duktuse ili lobule. U ovaj tip karcinoma ubrajamo duktalni karcinom *in situ* (DCIS), intraduktalni papilarni karcinom i lobularni karcinom *in situ* (LCIS). Invazivne karcinome možemo podijeliti na duktalne i lobularne invazivne karcinome. Većina (80 %) karcinoma nastala je iz epitela izvodnog kanalića terminalne duktulo-lobularne jedinice te čine heterogenu skupinu karcinoma koji se histološki ne mogu svrstati u neku specifičnu kategoriju. Nazivaju se invazivni karcinomi bez



posebnih karakteristika (engl. *not otherwise specified*, NOS). Lobularni invazivni karcinomi nastali iz terminalne duktulo-lobularne jedinice čine 10 %. Ostatak su posebni oblici raka dojke (Pagetova bolest bradavice, karcinom s medularnim karakteristikama, koloidni (mucinozni) karcinom, tubularni karcinom i papilarni invazivni karcinom) (1).

### **1.3. ER, PR Ki-67 i amplifikacija HER2/neu**

Estrogenski receptor (ER) pripada obitelji jezgrinih hormonskih receptora (4). Djeluje kao transkripcijski čimbenik koji aktiviran estrogenom stimulira rast normalnih epitelnih stanica dojke. U karcinomima dojke koji ga ekspimiraju, ER štetno djeluje stimulirajući rast tumorskih stanica (5). Postoje dva oblika ER. To su ER $\alpha$  koji je dominantan i klinički se mjeri te ER $\beta$ . Oko 75 % do 80 % karcinoma dojke izražava ER (4). ER pozitivni (ER+) karcinomi sporijeg su rasta i bolje diferenciranosti te su povezani s povoljnijom prognozom (6).

Progesteronski receptor (PR) pripada superobitelji steroidnih hormonskih receptora. Ekspresija PR ovisi o prisutnosti ER (4). Ekspimiran PR aktivira se progesteronom te također potiče rast tumora. Ekspimirana se u 60 % do 70 % karcinoma dojke (5). Postoje dva oblika PR, PR-A i PR-B (4).

HER2/neu (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) pripada obitelji transmembranskih receptora tirozin kinaze. Sudjeluje u regulaciji rasta stanice, diferencijaciji, preživljenju i migraciji. Također, sudjeluje u signalnim putevima koji potiču rast tumora. HER2/neu amplifikacija gena dovodi do prekomjerne ekspresije onkoproteina što je povezano s karcinomima dojke. Ova pojava prisutna je u 20 % do 30 % karcinoma te ukazuje na agresivni tip karcinoma (4).

Ki-67 antigen je povezan sa staničnom proliferacijom (proliferacijski indeks) (4). Indeks proliferacije Ki-67 izražava se kao postotak pozitivno obojenih stanica u ukupnom broju invazivnih stanica (7). Izražen je u svim fazama staničnog ciklusa osim u G0 fazi. Bitan je u razlikovanju luminal A od luminal B (HER2 -) imunofenotipa karcinoma dojke što pridonosi određivanju terapije (8).

#### 1.4. Imunofenotipovi karcinoma dojke

Karcinomi dojke mogu se svrstati u posebne molekularne subtipove s različitim prognozama. To je omogućeno mikropostrojima (engl. *microarray*) s više od 2000 gena. Ova metoda nailazi na probleme dostupnosti i cijene. Zamjenski je općeprihvaćeno koristiti se imunofenotipskom podjelom karcinoma koja je određena imunohistokemijski ekspresijom ER, PR, Ki-67 i amplifikacijom HER2 (1) (Tablica 1).

**Tablica 1. Imunofenotipovi karcinoma dojke**

	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>
<b>Luminal A</b>	+	+	-	< 20 %
<b>Luminal B (HER2 negativan)</b>	+	- ili nizak	-	> 20 %
<b>Luminal B (HER2 pozitivan)</b>	+	bilo koji	+	bilo koji
<b>HER2 +</b>	-	-	+	bilo koji
<b>Trostruko negativni</b>	-	-	-	bilo koji

Prema ekspresiji ER, PR, Ki-67 i amplifikaciji HER2 karcinome dojke dijelimo na luminal A, luminal B HER2/neu negativan, luminal B HER2/neu pozitivan, HER2/neu pozitivan i trostruko negativan (Tablica 1.).

#### 1.5. Epidemiologija

Karcinom dojke najčešći je tumor kod žena u razvijenim zemljama (9). Zahvaća 2,1 milijun žena godišnje. Prema podacima WHO (engl. *World Health Organization*), u 2018. godini je 627 000 žena umrlo od raka dojke što čini oko 15 % svih smrti uzrokovanih karcinomom kod žena (10). Postoje varijacije u incidenciji karcinoma dojke. Zemljopisna varijacija ukazuje na veći pobol u zapadnim zemljama, a nižu u Japanu i općenito Aziji. Prema ekonomskim varijacijama incidencija u razvijenim zemljama je od 60 do 100/100 000 žena, a u manje razvijenim od 20 do 60/100 000 (9). Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske iz 2016. godine, incidencija u Republici Hrvatskoj je 126,6/100 000, a mortalitet 45,8/100 000 (11).

## 1.6. Etiologija

Na nastanak karcinoma dojke utječe više čimbenika. To su dob, pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob pri prvom porodu, nerotkinje, rana menarha, kasna menopauza, zračenje, debljina, oralni kontraceptivi, hormonska nadomjesna terapija te dijagnoza dobroćudnih parenhimatoznih bolesti dojke (9).

Karcinom je dojke kod žena mlađih od 20 godina rijetkost. Rizik izuzetno raste između starosne dobi od 35 do 40 godina, a nakon toga kontinuirano raste. Oko 10 % tumora dojke povezano je s pozitivnom obiteljskom anamnezom koja povećava rizik nastanka karcinoma dojke. Najpoznatiji nastanak nekih obiteljskih tumora povezan je s mutiranim supresorskim genima BRCA 1 i BRCA 2 (9). Povećani rizik nastanka karcinoma dojke također se povezuje s mutacijom PTEN gena u Cowden sindromu, s heterozigotima za mutaciju ATM gena te kod varijante (1100 decC) CHEK 2 gena (12). Povećani rizik od nastanka karcinoma dojke imaju nerotkinje za razliku od rotkinja isto kao i žene koje su u starijoj životnoj dobi (30-35 godina) imale prvi porod usporedno s onima koje su prvo dijete rodile u ranijoj dobi (20-25 godina). Zbog ranih menarhi i kasnih menopauza, organizam je dulje izložen estrogenu što uvećava rizik (9). Da bitnu ulogu u povećavanju rizika igraju okolišni čimbenici, dokazuje činjenica da migrantske populacije poprimaju rizik zemlje domaćina kroz jednu ili dvije generacije (5). Zračenje također povećava rizik, osobito u žena mlađih od 40 godina. Kod postmenopauzalnih žena estrogen se stvara perifernom konverzijom u masnom tkivu pomoću aromataze. Pretile žene su stoga više izložene estrogenu što povećava rizik nastanka karcinoma dojke. Oralni kontraceptivi izuzetno malo povećavaju rizik ukoliko se koriste prije 25. godine i u vremenu duljem od 4 godine (9). Hormonska nadomjesna terapija povećava rizik nastajanja karcinoma dojke. Dokazano je da rizik znatno povećava terapija estrogenom u kombinaciji s progestinom (12).

Kako bi se tumor otkrio u početnom stadiju potrebno je provoditi programe ranog otkrivanja karcinoma dojke i osvijestiti populaciju o ranim znakovima i simptomima karcinoma dojke (10).

## 1.7. Klinička slika

Bitni klinički nalazi kod sumnje na karcinom dojke su palpabilna masa, kožne promjene, fiksacija za prednju prsnu stijenku, povećanje limfnih čvorova te udaljene metastaze (1). Najčešće se pojavljuje kao bezbolan čvor u dojci. Moguć je krvavo-smeđi iscjedak, uvlačenje

bradavice, navlačenje kože i upala u području tumora. Kod inflamacijskog tumora dojka je otečena, upaljena i crvena, a koža poput kore naranče čemu je uzrok širenje raka u limfne prostore dojke (9). Tumor se može širiti krvnim i limfnim putem. Ovisno o smještaju primarnog tumora, tumor se može širiti u aksilarne limfne čvorove, limfne čvorove uz unutarnju mamarnu arteriju te supraklavikularne limfne čvorove. Hematogenim širenjem nastaju udaljene metastaze, a klinička slika ovisi o zahvaćenom organu. Karcinom dojke najčešće metastazira u pluća, jetru, kosti, mozak i nadbubrežne žlijezde. Nepredvidivi način širenja pokazuje lobularni karcinom koji može metastazirati u hipofizu, nadbubrežnu žlijezdu ili oko (1).

Suvremene dijagnostičke tehnike (mamografija, ultrazvuk, CT ili MR) uz samokontrolu ili palpacijsku liječničku kontrolu omogućuju otkrivanje karcinoma dojke u predkliničkom stadiju, stoga se smatra neuspjehom ukoliko je detektiran primarni tumor dojke veći od dva centimetra (9).

### **1.8. Dijagnoza**

Dijagnostički postupak počinje anamnezom i kliničkim pregledom. Vizualnom inspekcijom promatra se simetrija dojki, nepravilnosti na koži i dojci te uvećanje limfnih čvorova. Palpacija se radi unutrašnjom stranom prstiju, simetrično i komparativno uspoređujući lijevu i desnu stranu. Palpiraju se regionalni limfni čvorovi, aksila i subklaviklurano područje. U slučaju povećanih limfnih čvorova potrebno ih je punktirati i provjeriti zahvaćenost tumorom. U dijagnostici se upotrebljavaju suvremene dijagnostičke tehnike (mamografija, ultrazvuk, CT ili MR). Mamografija je radiološka tehnika koja se primjenjuje u svrhu ranog otkrivanja tumora i potvrdu palpacijskog nalaza (9). Kao metoda probira primjenjuje se kod pacijentica u svrhu dijagnoze okultnog karcinoma dojke. Dijagnostička mamografija primjenjuje se kod pacijentica s utvrđenim promjenama na dojci, kako bi se identificirala etiologija bolesti (12). Ultrazvuk je manje specifična i osjetljiva tehnika od mamografije. Kod postmenopauzalnih žena dolazi do atrofije žljezdanog parenhima koji se nadomješta masnim tkivom. Ultrazvuk ne prodire dobro kroz masno tkivo stoga se primjenjuje kao metoda izbora kod premenopauzalnih žena. MR se koristi pri sumnji na multicentričan tumor kod mlađih premenopauzalnih žena (9). Indicirana je također kod karcinoma povezanih s BRCA mutacijom, pacijentica s implantanima, dijagnosticiranih lobularnih karcinoma, prije neoadjuventne terapije, kada nalazi konvencionalnih pretraga nisu u skladu s nalazima

kliničkih pretraga te kada se procjenjuje odgovor na primarnu sustavnu terapiju (12). Nakon što se detektira primarna zloćudna novotvorina, a prije nego se krene s liječenjem potrebno je isključiti udaljene metastaze. Udaljene metastaze dokazuju se pomoću KKS, DKS, biokemijskih pretraga, RTG pluća i UVZ abdomena, a ukoliko se sumnja na određeni organ rade se ciljane pretrage (9). Nakon kliničkog pregleda i radioloških pretraga potrebno je napraviti patohistološku potvrdu (12).

Ekspresija ER, PR, Ki-67 i amplifikacija HER2 određuje se imunohistokemijski. Imunohistokemija je osjetljiva, specifična, jednostavna i jeftina metoda koja se može provesti na rutinski pripremljenim histološkim uzorcima, fiksiranim formalinom i uklopljenim u parafin (FFPE). Nakon bojanja rezova, pozitivnost stanica procjenjuje se pomoću mikroskopa (5).

Najbolju prognozu ima imunofenotip luminal A, a najgoru trostruko negativni imunofenotip (1). Nakon cjelokupne obrade, u patohistološkom nalazu navodi se veličina tumora, stupanj zloćudnosti, Ki-67 indeks (udio stanica u proliferaciji), status hormonskih receptora, status HER2 receptora (prognostička i prediktivna vrijednost), odnos tumora prema resekcijskim rubovima, broj pregledanih i pozitivnih limfnih čvorova iz aksile te odnos tumora prema krvnim i limfnim žilama (9). Tumori se klasificiraju na temelju TNM klasifikacije u kojoj T opisuje veličinu i proširenost tumora, N zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova, a M udaljene metastaze (5). Nakon TNM klasifikacije određuje se stadij karcinoma dojke koji ukazuje na vjerojatnost izlječenja (9).

### **1.9. Liječenje**

Cilj liječenja lokalnog karcinoma je izlječenje, a proširenog karcinoma maksimalna duljina i kvaliteta života (9). Liječenje ovisi o stadiju karcinoma dojke, histološkom tipu i imunofenotipu te o menopauzalnom statusu (13).

Lokalni, primarno operabilan tumor inicijalno se liječi kiruškim zahvatom. Pribjegava se pošteđnim operacijama (segmentektomija i kvadrantektomija), a mastektomija se radi kod većih tumora, multicentričnih tumora, starijih žena kod kojih je otežana poslijeoperacijska radioterapija, bolesnica s bolestima kolagena te kod onih koje odbiju poslijeoperacijsku radioterapiju. Stadij bolesti ukazuje na stupanj vjerojatnosti lokalnog recidiva i diseminacije karcinoma. Adjuvantna (zaštitna) terapija primjenjuje se nakon zbrinjavanja primarnog

tumora kako bi se uništili zaostali mikrozasadi karcinoma koji mogu dovesti do recidiva bolesti. Adjuvantna terapija može biti radioterapija, kemoterapija, hormonska terapija i imunoterapija. Radioterapija se primjenjuje nakon svih poštenih zahvata i kod svih pacijentica s pozitivnim limfnim čvorovima aksile (9). Klinički pozitivne uvećane pazušne limfne čvorove ili vizualizirane UZV treba punktirati ili napraviti biopsiju. Za klinički negativne limfne čvorove Hrvatsko onkološko društvo (HOD) preporučuje napraviti biopsiju sentinel limfnog čvora (čvora čuvara) o kojoj ovisi disekcija aksile. Disekcija aksile podrazumijeva odstranjenje najmanje 10 limfnih čvorova, a indicirana je nakon neoadjuvantne terapije, kod pozitivnih limfnih čvorova pazuha, te nakon neuspjele diferencijacije limfnog čvora čuvara (14). Hormonska terapija se provodi kod pacijentica s karcinomom pozitivnim na hormonske receptore i to nakon kemoterapije i radioterapije. Zlatni standard kod premenopausalnih žene je tamoksifen, a kod postmenopausalnih inhibitori aromataze. Kemoterapija se inicira prva, prije hormonske terapije i radioterapije (9). Primjenjuje se kod HER2 + i trostruko negativnih karcinoma dojke te kod pozitivnih limfnih čvorova. Kod luminal A i luminal B (HER2 -) karcinoma, odluka o adjuvantnoj kemoterapiji donosi se na temelju ostalih čimbenika. Uglavnom se primjenjuje kombinacija antraciklina i taksina (14). Kao adjuvantna ciljana biološka terapija primjenjuje se najčešće trastuzumab kod pacijentica s HER2 pozitivnim karcinomom i kod karcinoma većih od 1 cm (9).

Lokalni, primarno neoperabilni karcinomi najprije se tretiraju neoadjuvantnom terapijom. To je terapija kojoj je cilj smanjiti primarni karcinom kako bi postao operabilan. Može biti kemoterapija, hormonska terapija ili rijetko radioterapija. Ukoliko tumor postane operabilan indicirana je mastektomija s evakuacijom regionalnih limfnih čvorova. Kod liječenja metastatskih karcinoma mora se uzeti u obzir i simptomatsko-potporno liječenje (9).

U liječenju karcinoma dojke bitni su prognostički i prediktivni čimbenici. Korisni su za identifikaciju: kandidata za određeni tip terapije, pacijentica s lošom prognozom kojima je potrebna agresivna terapija, te onih s jako dobrom prognozom kojima adjuvantna terapija nije potrebna (1). Prognostički čimbenici govore o ishodu liječenja, a prediktivni o vjerojatnosti odgovora na određenu terapiju (12).

Tradicionalnih je morfoloških prognostičkih čimbenika nekoliko. Prognoza ovisi o: zahvaćenosti i broju zahvaćenih limfnih čvorova, o veličini, histološkom tipu te o diferenciranosti karcinoma. Medularnom karcinomu slični, tubularni, mucinozni, lobularni i

papilarni karcinom imaju bolju prognozu od invazivnih karcinoma bez posebnih karakteristika. Karcinomi mogu biti dobro, srednje ili slabo diferencirani. Prognoza također ovisi i o prodoru u krvne i limfne žile, te tumorskoj nekrozi koja se smatra lošim prognostičkim čimbenikom (1).

ER i PR se smatraju slabim prognostičkim i jakim prediktivnim čimbenicima. Karcinomi pozitivni na hormonske receptore imaju bolju prognozu. Prediktivno ukazuju kakav je odgovor na hormonsku terapiju. ER uvelike govori o odgovoru karcinoma na liječenje hormonskom terapijom kao što je tamoksifen koji blokira rast karcinoma stimuliran estrogenom. Također govori i o odgovoru karcinoma na inhibitore aromataze koji suzbijaju nastanak estrogena. HER2/neu povezan je s lošijom prognozom, a i prediktivan je čimbenik. Jedan od glavnih razloga određivanja HER2 statusa je identifikacija kandidata za ciljanu anti-HER2 terapiju (trastuzumabom, lapatinibom, pretuzumab i trastuzumab emtansin) iniciranu kod HER2 + karcinoma dojke. Ki-67 također je prognostički čimbenik pri čemu je veći indeks proliferacije povezan s lošijom prognozom. Prognostički je čimbenik kod neoadjuventne terapije (1, 4, 5, 12).

## 2. CILJ

Ciljevi su ovog istraživanja:

- a) prikazati učestalost karcinoma dojke u svakoj godini zadanog vremenskog razdoblja i utvrditi trend rasta ili pada broja;
- b) utvrditi učestalost različitih imunofenotipova karcinoma dojke te ispitati postoji li razlika u dobi žena oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip;
- c) utvrditi postoji li razlika u učestalosti metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova s obzirom na imunofenotip karcinoma dojke;
- d) utvrditi postoji li razlika u dobi pacijentica s obzirom na prisustvo metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova;
- e) utvrditi postoji li razlika u razini proliferacijskog indeksa (Ki-67) s obzirom na prisustvo metastatski pozitivnih askilarnih limfnih čvorova;
- f) prikazati učestalost pojedinih histoloških tipova zloćudnih epitelnih novotvorevina dojke s obzirom na imunofenotip.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Rad je ostvaren kao presječna studija na povijesnim podacima (15).

#### 3.2. Materijali

Materijal su nalazi dijagnosticiranih karcinoma dojke u razdoblju od 1.1.2011. do 31.12.2018. s Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci. Prikupljeni su podaci 294 pacijentice. U osmogodišnjem razdoblju karcinom dojke dijagnosticiran je kod samo trojice muškaraca te su oni isključeni iz daljnje obrade. Istraživanje je provedeno u 2019. godini.

#### 3.3. Metode

Pretraživanjem arhiva Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci, izdvojeni su nalazi karcinoma dojke. Na uzorcima karcinoma imunohistokemijski je određena ekspresija ER, PR, HER2 i Ki-67.

Nakon biopsije ili resekcije dojke slijedi obrada materijala. Bioptički materijal fiksira se u 4 %-tnom puferiranom formaldehidu, *pro analysi*, Claro-Prom d.o.o. te se obrada radi u Sakura Tissue-Tek VIP 6 vakuumskom uređaju. Zatim se materijal uklapa u Histosec pastile, Merck KGaA te se rade rezovi debljine oko 3 mikrona za standardno imunohistokemijsko i hemalaun eozin bojenje. Preparati se onda stavljaju 180 minuta u termostat na 60 °C (16).

Preparati se boje u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojenje i pokrivaju filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakala Sakura Tissue-Tek Film. Bojenje preparata hemalaun eozinom proces je od nekoliko koraka. Potrebno je napraviti dva urona (po 5 min) u Tissue -Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jedan uron u 2-propanol (5 min), Ph. Eur., Gram-Mol d.o.o., jedan uron u 96 %-tni etanol (5 min), Ph. Eur., Claro-Prom d.o.o., jedan uron u 70 %-tni etanol (5 min), ispiranje u vodovodnoj vodi (2 min), bojenje u Mayers hemalaun solution (5 min), Merck KGaA, ispiranje u vodovodnoj vodi (2 min), jedan uron u limunsku kiselinu (5 s), kratko ispiranje u vodovodnoj vodi, jedan uron u boraks (5 s), kratko ispiranje u vodovodnoj vodi, bojenje u Eosin G (4

min), Merck KGaA, ispiranje u vodovodnoj vodi (3 min), dva urona (po 2 min) u 96 %-tni etanol, Ph. Eur., Claro-Prom d.o.o., dva urona (po 5 min) u 2-propanol, Ph. Eur., Gram-Mol d.o.o. te dva urona (po 5 min) u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek (16).

Nakon termostata, preparati za imunohistokemijsko bojenje prolaze alkoholni niz do vode u Sakura Tissue-Tek Prisma uređaju za automatsko bojenje. U postupku je potrebno napraviti dva urona (po 5 min) u Tissue-Clear (xylen substitut), Sakura Tissue-Tek, jedan uron u 2-propanol (5 min), Ph. Eur., Gram-Mol d.o.o., jedan uron u 96 %-tni etanol (5 min), Ph. Eur., Claro-Prom d.o.o., jedan uron u 70 %-tni etanol (5 min) te završno uron u vodovodnu vodu. Nakon ovoga slijedi postupak u Dako PT Linku. Najprije se preparati zagrijavaju u Dako Target Retrieval Solution koji je visokog pH. Temperatura raste sa 65 °C na 95 °C pri kojoj ostaje 20 min te se onda hladi opet do 65 °C. Nakon što se izvade, uzorci se drže u EnVision FLEX wash bufferu do bojenje u Dako Autostainer Link 48. Preparati se boje Dako EnVision FLEX kitom tako što se uzorak tretira Peroxidas-Blocking Reagentom (5 min), ispire EnVision FLEX wash bufferom te tretira primarnim antitijelom FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen receptor  $\alpha$ , Clone EP1, odnosno ostalim antitijelima FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor, Clone PgR 636, FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Ki-67 Antigen, Clone MIB-1 i Monoclonal Rabbit Anti-Human Her 2 Protein (20 min), ispire EnVision FLEX wash bufferom i boja EnVision FLEX Hematoxylinom. Na kraju se preparati moraju prekriti filmom tvrtke Sakura Tissue-Tek u uređaju za automatsko pokrivanje stakla Sakura Tissue-Tek Film (17).

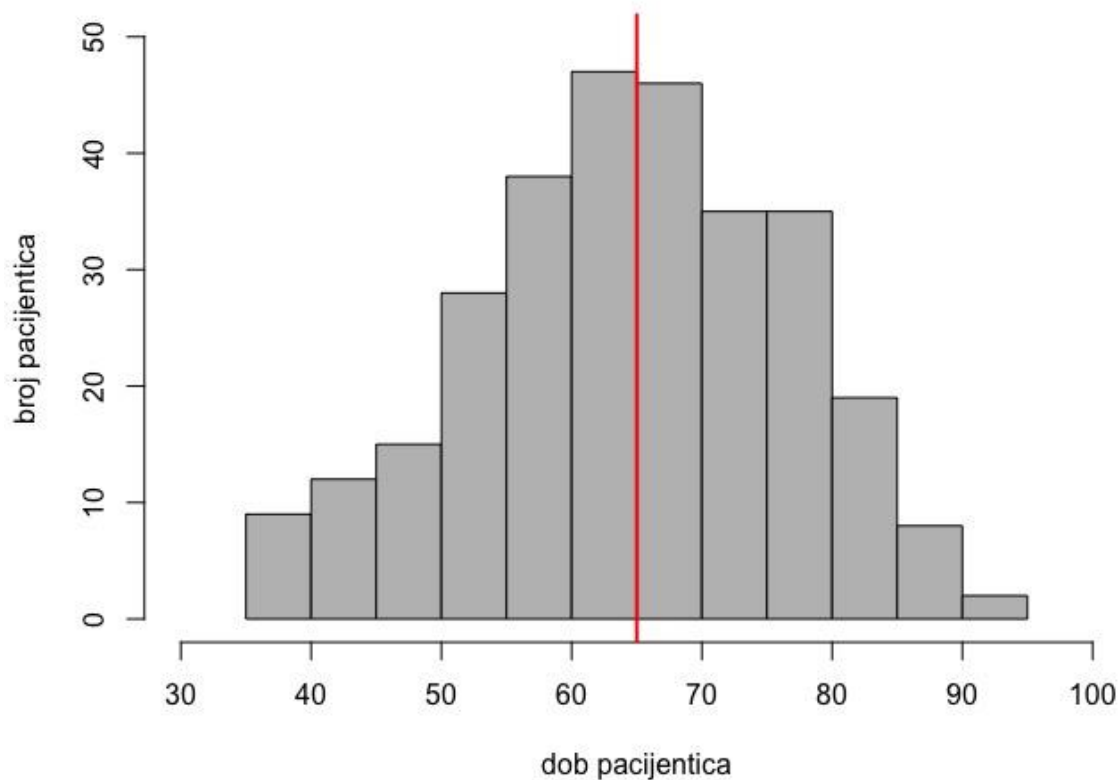
#### 3.4. Statističke metode

Varijable su prikupljene u računalnom sustavu MS Excel i obrađene u programu R. Uzorak je opisan metodama deskriptivne statistike. Za ispitivanje raspodjela numeričkih varijabli korišten je Shapirov test. Međusobna usporedba nominalnih varijabli provedena je korištenjem Pearson  $\chi^2$  testa ili Fisherovog egzaktnog testa ovisno o veličini uzorka. Kod usporedbe više skupina numeričkih varijabli, ovisno o distribuciji podataka, korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), odnosno Kruskal-Walis test, a u slučaju potrebe i adekvatni post-hoc test. Za usporedbu dviju grupa numeričkih varijabli korišten je parametrijski Studentov t-test ili u slučaju raspodjele koja ne slijedi normalnu raspodjelu Mann-Whitney U test. U ovom radu razina statističke značajnosti za sve testove kojima se provode usporedbe je definirana na 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

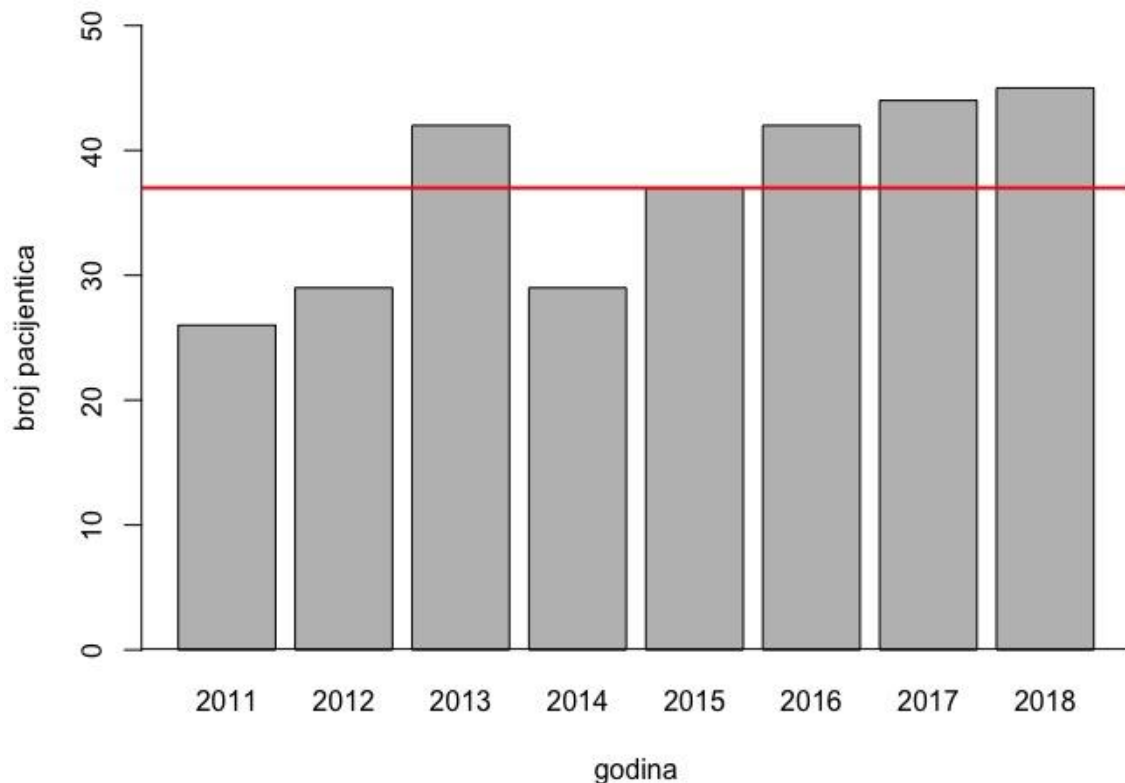
### 4.1. Opis uzorka

Istraživanje je obuhvatilo 297 nalaza biopsije pacijenata oboljelih od karcinoma dojke. U nalazima se nalazi imunohistokemijski ispitana ekspresija ER, PR, Ki-67 i amplifikacija HER2/neu. Od 297 uzoraka karcinoma dojke, 294 (99,01 %) pripada ženskom spolu, a 3 (0,99 %) muškom spolu. Pacijenti muškog spola su isključeni iz daljnje obrade.



**Slika 1. Raspodjela pacijentica prema dobi**

Na slici 1. prikazana je učestalost karcinoma dojke prema dobi pacijentica. Aritmetička sredina dobi ispitanica je 65 godina sa standardnom devijacijom 12,1. Uzorak slijedi normalnu raspodjelu, što je provjereno Kolmogorov-Smirnovim testom ( $D = 0,05$ ;  $p = 0,4$ ).



**Slika 2. Broj pacijentica oboljelih od karcinoma dojke po godinama istraživnog razdoblja**

Graf pokazuje blagi uzlazni trend broja operiranih pacijentica u razdoblju od 2011. do 2018. godine uz iznimku 2013. godine. Ukoliko teorijski rasporedimo ukupan broj oboljelih pacijentica na 8 godina dobijemo prosječno 37 u jednoj godini (crvena linija), te usporedimo li to s dobivenim podacima (stupci), ne nalazi se statistički značajna razlika (hi-kvadrat = 5,87, df = 7, p = 0,55) niti u jednoj od istraživanih godina od 2011. do 2018. unatoč razlikama u učestalosti po godinama (najviše oboljelih ima u 2018. i to 45, a najmanje u 2011. godini 26 oboljelih pacijentica).

Unatoč odsutnosti statističke razlike, na ovom uzorku može se vidjeti blagi porast broja pacijentica oboljelih od karcinoma dojke u razdoblju od 2011. do 2018. godine (Slika 2.).

**Tablica 2. Patohistološka dijagnoza karcinoma dojke**

Patohistološka dijagnoza	Broj oboljelih	Postotak oboljelih (%)
Ca. invasivum mammae	236	80,27
Ca. lobulare invasivum mammae	30	10,20
Ca. mucinosum iwasivum mammae	10	3,40
Ca. ductale in situ mammae	3	1,02
Ca. medullarae mammae	5	1,70
Ca. tubulare mammae	2	0,68
Ca. metaplasticum mammae	2	0,68
Ca. papillare invasivum mammae	3	1,02
Ca. adenosquamosum mammae	1	0,34
Ca. lobulare in situ mammae	1	0,34
Ca. invasivum mammae (apokrini tip)	1	0,34
<b>Ukupno</b>	<b>294</b>	<b>100</b>

Prema patohistološkoj dijagnozi najviše je dijagnosticirano invazivnih karcinoma dojke (236). Invazivnih lobularnih karcinoma dojke dijagnosticirano je 30, a invazivnih mucinoznih 10. Ostale pacijentice imale su rjeđe zastupljene patohistološke tipove karcinoma dojke (Tablica 2.).

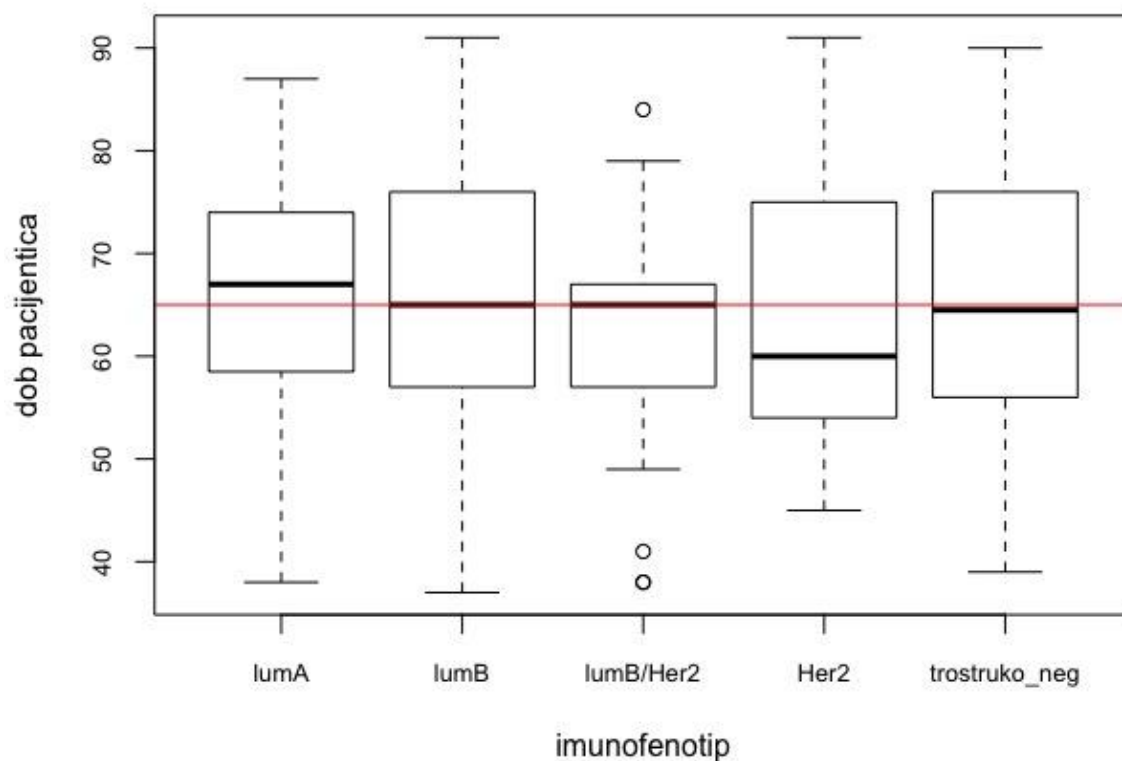
#### 4.2. Raspodjela po imunofenotipu

Imunofenotipove Luminalni A, luminalni B HER2/neu negativan, luminalni B HER2/neu pozitivan te trostruko negativni određuje ekspresija ER, PR, Ki-67 i amplifikacija HER2/neu.

**Tablica 3. Raspodjela pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip po godinama istraživanog razdoblja ( n (%))**

	Luminal A	Luminal B	Luminal B/HER2+	HER2+	Trostruko negativni
<b>2011</b>	12 (15,00)	8 (6,61)	2 (4,44)	1 (5,55)	3 (10)
<b>2012</b>	9 (11,25)	10 (8,26)	4 (8,88)	3 (16,66)	3 (10)
<b>2013</b>	7 (8,75)	27 (22,31)	2 (4,44)	3 (16,66)	3 (10)
<b>2014</b>	11 (13,75)	10 (8,26)	3 (6,66)	1 (5,55)	4 (13,33)
<b>2015</b>	7 (8,75)	15 (12,40)	4 (8,88)	4 (22,22)	7 (23,33)
<b>2016</b>	13 (16,25)	14 (11,57)	10 (22,22)	3 (16,66)	2 (6,66)
<b>2017</b>	10 (12,50)	12 (9,92)	15 (33,33)	3 (16,66)	4 (13,33)
<b>2018</b>	11 (13,75)	25 (20,66)	5 (11,11)	0 (0,00)	4 (13,33)
<b>ukupno</b>	<b>80 (27,21)</b>	<b>121 (41,16)</b>	<b>45 (15,31)</b>	<b>18 (6,12)</b>	<b>30 (10,10)</b>

U tablici 3. prikazana je učestalost karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip po godinama istraživanog razdoblja. U 2011. i 2014. najučestaliji je imunofenotip luminal A, a u 2017. luminal B/HER2 +. U ostalim godinama najučestaliji je luminal B. U istraživanjem obuhvaćenom osmogodišnjem razdoblju najučestaliji je imunofenotip luminal B. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih imunofenotipa s obzirom na godinu pojavljivanja. (hi-kvadrat = 48,1, df = 28, p = 0,01).



**Slika 3. Dob pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip**

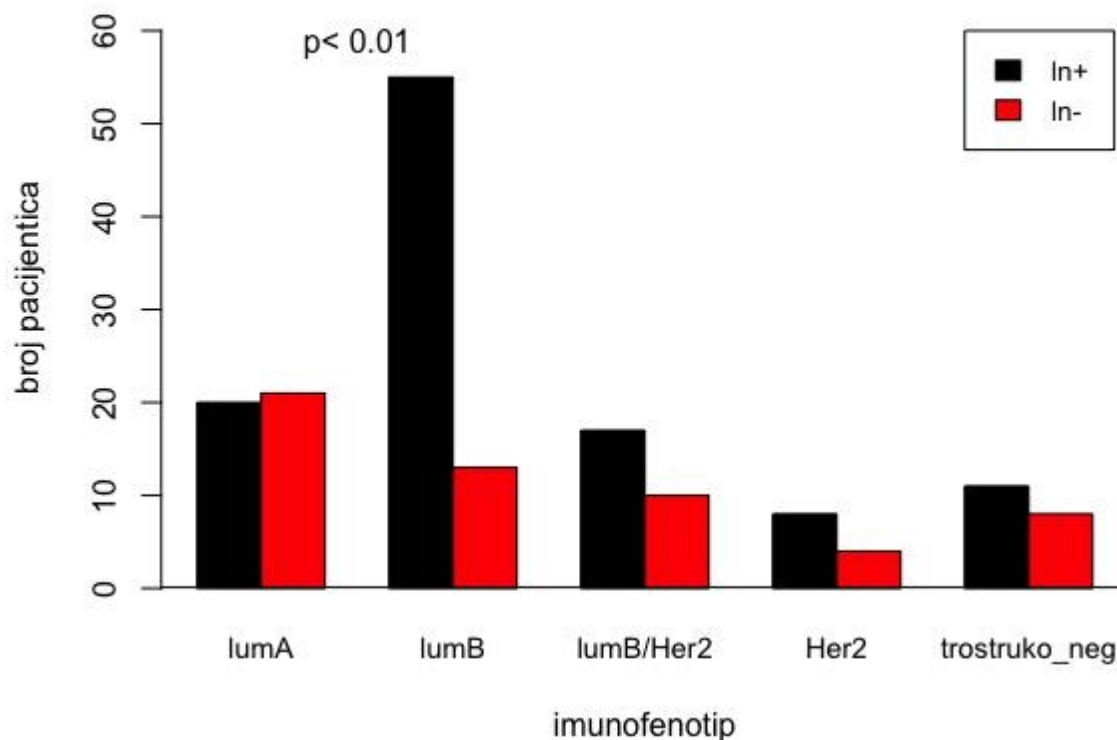
Shapiro-Wilk testom utvrđeno je kako dob svih grupa imunofenotipa, osim Luminal A (lumA), oboljelih pacijentica ima raspodjelu koja odgovara normalnoj raspodjeli. Utvrđena razlika u dobi oboljelih pacijentica s obzirom na imunofenotip karcinoma dojke nije statistički značajna. (Kruskal-Wallis = 35,18, df = 51, p = 0,96). Crvena linija označava medijan dobi svih pacijentica koji je jednak prosjeku i iznosi 65 godina (Slika 3.).

**Tablica 4. Dob pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip**

	<b>Minimalna</b>	<b>Medijan</b>	<b>Aritmetička sredina</b>	<b>Maksimalna</b>
<b>lumA</b>	38	67	65,55	87
<b>lumB</b>	37	65	65,63	91
<b>lumB/HER2</b>	38	65	62,76	84
<b>HER2</b>	45	60	64,39	91
<b>trostruko_neg</b>	39	64,50	65,4	90

U tablici 4. prikazana je dob pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na imunofenotip. Prosjek dobi podjednak je kod svih imunofenotipova te nema statistički značajne razlike.

Kod 167 (57 %) pacijentica odstranjeni su aksilarni limfni čvorovi, dok kod 127 (43 %) resekcija aksile nije rađena. Od 167 oboljelih, kod kojih je rađena resekcija aksile, 111 (66 %) je imalo pozitivne (dokazane presadnice karcinomskog tkiva) limfne čvorove, a 56 (34 %) negativne.



**Slika 4. Učestalost metastatski pozitivnih limfnih čvorova s obzirom na imunofenotip karcinoma dojke**

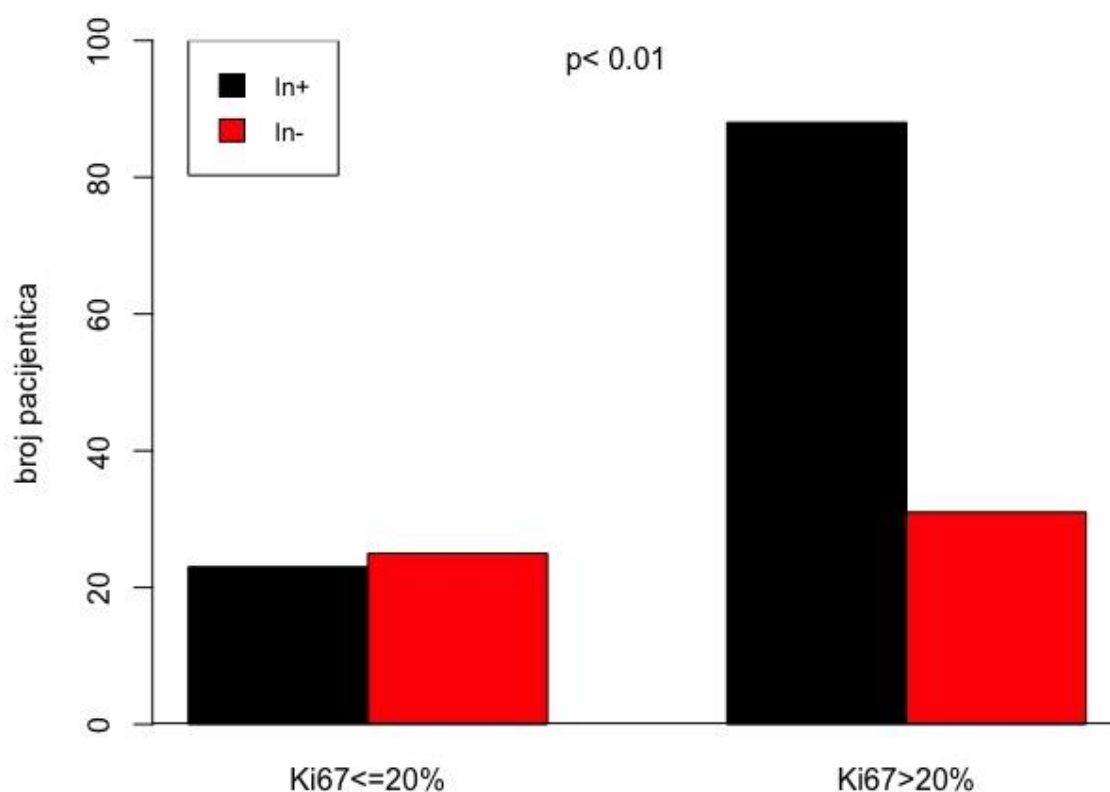
Utvrđena razlika između pojedinih imunofenotipova karcinoma dojke u učestalosti detektiranih metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova je statistički značajna. (hi-kvadrat = 12,87, df = 4,  $p < 0,05$ ), a post-hoc analizom utvrđeno je da imunofenotip luminal B značajno češće ima metastatski pozitivne limfne čvorove u odnosu na imunofenotip luminal A ( $p < 0,01$ ) (Slika 4.).

**Tablica 5. Razlika u dobi pacijentica oboljelih od karcinoma dojke s obzirom na prisutnost metastatski pozitivnih limfnih čvorova**

	Aritmetička sredina	Standardna devijacija
Pozitivni lč	63,97	12,35
Negativni lč	67,07	11,57



U Tablici 5. prikazana je razlika u dobi oboljelih s obzirom na prisutnost metastatski pozitivnih limfnih čvorova. Shapiro-Wilks testom utvrđeno je da raspodjela odgovara normalnoj. Srednja vrijednost dobi pacijentica s pozitivnim aksilarnim metastatskim limfnim čvorovima je nešto niža nego srednja vrijednost dobi pacijentica u kojih nisu nađene metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima, no utvrđena razlika nije statistički značajna ( $t = 1,59, p = 0,11$ ).



**Slika 5. Broj pacijentica s pozitivnim i negativnim aksilarnim limfnim čvorovima ovisno o tome je li razina proliferacijskog indeksa (Ki67) veća ili manja od 20 %**

Razlika u broju pozitivnih limfnih čvorova između pacijentica u kojih je proliferacijski indeks veći od 20 % i onih u kojih je proliferacijski indeks jednak ili manji od 20 % je statistički značajna. (hi-kvadrat = 9,26, df = 1,  $p < 0,01$ ) (Slika 5.).

Tablica 6. Histološki tipovi u odnosu na imunofenotip

	lumA	lumB	LumB /HER2+	HER2	Trostruk onegativan	ukupno
<b>Carcinoma invasivum mammae</b>	52 (21,85 %)	103 (43,28 %)	41 (17,23 %)	18 (7,56 %)	24 (10,08 %)	238
<b>Carcinoma lobulare invasivum mammae</b>	16 (53,33 %)	12 (40,00 %)	2 (6,66 %)	0	0	30
<b>Carcinoma mucinosum invasivum mammae</b>	5 (50,00 %)	5 (50,00 %)	0	0	0	10
<b>Carcinoma medullariae</b>	0	0	0	0	3 (100 %)	3
<b>Carcinoma papillare invasivum mammae</b>	2 (66,66 %)	1 (33,33 %)	0	0	0	3
<b>DCIS</b>	2 (66,66 %)	0	1 (33,33 %)	0	0	3
<b>Ostali*</b>	3 (42,86 %)	0	1 (14,28 %)	0	3 (42,86 %)	7

\* *Carcinoma tubulare mammae, Carcinoma metaplasticum mammae, Carcinoma adenosquamosum mammae, Morbus Paget, LCIS, Carcinoma invasivum mammae (apokrini tip)*

U tablici 6. prikazani su histološki tipovi karcinoma dojke u ovisnosti o imunofenotipu. Najviše je *Carcinoma invasivum mammae* (NOS) od kojih je najčešći imunofenotip luminal B. Kod *Carcinoma lobulare invasivum mammae* nešto je više luminal A od luminal B imunofenotipa. Luminal A i luminal B jednako su zastupljeni kod *Carcinoma mucinosum invasivum mammae*. Od tri karcinoma koja su po histološkom tipu DCIS dva su luminal A, a 1 luminal B imunofenotipa. Sva tri medularna karcinoma su trostruko negativnog imunofenotipa. Od tri *Carcinoma papillare invasivum mammae*, dva su luminal A, a 1 luminal B imunofenotipa.

## 5. RASPRAVA

U ovoj presječnoj studiji napravljenoj na povijesnim podacima analizirani su patohistološki nalazi pacijentica s karcinomom dojke. Podaci od interesa bili su imunofenotip karcinoma određen na temelju imunohistokemijske analize (vrijednosti ekspresije ER, PR, Ki-67 i amplifikacije HER2/neu), histološki tip, dob pacijentice pri dijagnozi karcinoma, odstranjenost aksilarnih limfnih čvorova te prisutnost metastatski pozitivnih limfnih čvorova.

U osmogodišnjem razdoblju prikupljeno je 297 nalaza biopsija karcinoma dojke. U istraživanje su uključeni samo nalazi pacijentica ženskog spola, njih 294. Aritmetička sredina dobi ispitanica je 65 godina sa standardnom devijacijom 12,1. Mitrović O i sur. dobili su slične rezultate, aritmetička sredina dobi bila je 65,59 sa standardnom devijacijom 10,17 (18). U studiji Jakovčević D i sur., aritmetička sredina dobi oboljelih bila je 56 godina (19). Aritmetička sredina dobi je znatno niža u Africi što su pokazala istraživanja provedena u Alžiru i Nigeriji (20, 21). Slični su rezultati i u studijama provedenim u Saudijskoj Arabiji, Indiji, Vijetnamu te Pakistanu u kojem je aritmetička sredina dobi oboljelih 43,3 godine (22-26).

Prema rezultatima našeg istraživanja, postoji blagi uzlazni trend broja operiranih pacijentica u razdoblju od 2011. do 2018. uz iznimku 2013. godine. Podatci za ostala područja Republike Hrvatske dostupni su za razdoblje od 2011. do 2016. u Hrvatskom registru za rak. Uzlazni trend u tom razdoblju može se primijetiti u gotovo svim županijama. Veća učestalost karcinoma dojke u 2013., kao iznimka u uzlaznom trendu, može se primijetiti u Varaždinskoj, Sisačko-Moslavačkoj, Međimurskoj, Krapinsko-zagorskoj, Karlovačkoj, Brodsko-posavskoj, Osječko-baranjskoj te Vukovarsko-srijemskoj županiji (11, 27, 28, 29, 30, 31).

Prema imunofenotipu karcinomi se dojke razvrstavaju na: luminal A, luminal B HER2/neu negativan, luminal B HER2/neu pozitivan, HER2/neu pozitivan i trostruko negativan. Imunofenotip bitan je zbog donošenja odluke o adekvatnom liječenju te za prognozu oboljelih od karcinoma dojke. U našem uzorku od 294 karcinoma dojke, 121 (41,16 %) je luminal B HER2/neu negativan, 80 (27,21 %) luminal A, 45 (15,31 %) luminal B HER2/neu pozitivan, 30 (10,10 %) trostruko negativan i 18 (6,12 %) HER2/neu pozitivan. Studija provedena u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2002. do 2003. na 152 uzorka pokazala je

različite rezultate od našeg istraživanja. Najzastupljeniji imunofenotip bio je luminal A (49,3 %) te su ga slijedili trostruko negativan, luminal B HER2/neu -, luminal B HER2/neu + te HER2 + imunofenotip (19). Gulzar R i sur. su dobili vrlo slične rezultate našima. Redoslijed imunofenotipa po učestalosti je bio jednak našem. U uzorku od 285 oboljelih najzastupljeniji imunofenotip bio je luminal B (48,77 %), a slijedili su ga luminal A (21,5 %), HER2/neu + (18,94 %) te trostruko negativan (11,22 %) (26). Sličnu raspodjelu u učestalosti imunofenotipova pokazale su i studije provedene u Brazilu i Republici Srbiji u kojima je najučestaliji bio luminal B imunofenotip, a slijedili su ga luminal A, trostruko negativan i HER2/neu + (18, 32). Uspoređujući s Europom, studije provedene u Italiji, Njemačkoj i Francuskoj pokazale su da je najučestaliji imunofenotip luminal A te da ga slijedi luminal B HER2/neu -, a da je najmanje učestao HER2/neu + imunofenotip (33-35). Treba napomenuti da su ove tri studije provedene na puno većem uzorku od našega. Slična istraživanja provedena su u Kini i Japanu gdje je također najučestaliji imunofenotip bio luminal A, a slijedili su ga luminal B, trostruko negativan i HER2/neu + (36, 37). Hong Tang V i sur. su pokazali da je od 237 uzoraka karcinoma dojke na području Švedske najzastupljeniji luminal B HER2/neu + (41,3 %) imunofenotip te da ga slijedi luminal A (31,6 %) slično kao i u našoj studiji, dok je najmanje zastupljeni imunofenotip bio HER2/neu + (25). Studije provedene u Saudijskoj Arabiji pokazale su također da je najzastupljeniji imunofenotip luminal A, a da je najmanje zastupljen HER2/neu + (22, 23). Prema podacima iz studije koja je obuhvatila 50 571 uzorak iz Sjedinjenih Američkih Država, luminal A je najučestaliji, a slijede ga trostruko negativan, luminal B i HER2/neu + (38). Trostruko negativan imunofenotip, poznat po lošijoj prognozi, pokazao se najzastupljenijim u studijama provedenim u Nigeriji i Indiji. Slijedili su ga luminal A, HER2/neu + i luminal B (20, 24). Od navedenih studija, najviše je onih koje su pokazale da je najučestaliji imunofenotip luminal A, a najmanje zastupljen HER2 +.

Prosječna dob oboljelih pacijentica u ovoj je studiji 65 godina. Razlika u dobi po učestalosti imunofenotipova karcinoma dojke nije statistički značajna. Mazouni C i sur. također su analizirali dob po učestalosti imunofenotipova. Njihovi su rezultati pokazali nižu prosječnu dob u svim imunofenotipovima, ali također nije utvrđena statistički značajna razlika (35).

U našem istraživanju kod 167 (57 %) pacijentica odstranjeni su aksilarni limfni čvorovi. Kod 127 (43 %) aksilarni limfni čvorovi nisu bili operativno odstranjeni te kod njih nije bila moguća analiza limfnih čvorova. Od njih 167, 111 (66 %) imalo je metastaze u aksilarnim limfnim čvorovima, a njih 56 (34 %) nije. Razlika između pojedinih imunofenotipova

karcinoma dojke u učestalosti utvrđenih metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova statistički je značajna te je utvrđeno da imunofenotip luminal B značajno češće ima metastaze u limfne čvorove u odnosu na imunofenotip luminal A. Prosjek godina pacijentica s pozitivnim aksilarnim metastatskim limfnim čvorovima je nešto niži nego kod pacijentica koje nisu imale metastaze u aksilarne limfne čvorove, no razlika nije statistički značajna. Inić Z i sur. su u svojoj studiji također nisu našli statistički značajnu razliku (39).

Luminal B HER2 - imunofenotip karcinoma dojke trebao bi pokazivati veći Ki-67 od luminal A. Oba imunofenotipa su HER2 - i ER +, ali luminal B HER2 - ima lošiju prognozu stoga je razdvajanje ova dva tipa karcinoma dojke bitno zbog određivanja terapije. Bustreo i sur. ispitali su *cut-off* vrijednosti na 1577 HER2 -/ER + karcinoma dojke. Studijom su potvrdili da je *cut-off* vrijednost veća od 20 % povezana s visoko rizičnim pacijentima, kod luminalnog karcinoma te predlažu da se Ki-67 integrira s ostalim prognostičkim čimbenicima (8). Prema preporuci St. Gallen Oncology Confrences iz 2013. *cut-off* vrijednost za ovaj čimbenik je 20 % dok prema preporukama iz 2015. vrijednost Ki-67 za subklasifikaciju imunofenotipa luminal B treba biti najmanje 20-29 %, a da je 10 % i manje dovoljno niska vrijednost za subklasifikaciju luminal A. U Republici Hrvatskoj koristi se *cut-off* vrijednost 20 % (Ki-67 > 20 % i Ki-67 ≤ 20 %). *Cut-off* vrijednost je bitna u kliničkoj praksi jer ukazuje koje pacijentice trebaju primati agresivniju terapiju (40). U ovoj studiji zanimala nas je razlika u broju pozitivnih limfnih čvorova između pacijentica u kojih je proliferacijski indeks veći od 20 % i onih kod kojih je 20 % ili manji. Razlika se pokazala statistički značajnom. Aksilarni limfni čvorovi češće su bili metastatski pozitivni kod onih s Ki-67 vrijednosti većom od 20 %. Inić Z i sur. također su pokazali da je povezanost između metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova i povišene vrijednosti Ki-67 statistički značajna (39).

Prema ASCO/CAP smjernicama ER, PR i HER2/neu treba odrediti na svim novo dijagnosticiranim primarnim karcinomima dojke te je isto potrebno napraviti na metastatskim lezijama ako su dostupne (41, 42). Za ER i PR pozitivan nalaz je ukoliko je ≥ 1 % tumorskih stanica imunoreaktivno, a ako je < 1 % tada je nalaz negativan (41). Ukoliko je HER2 status 0 ili 1 + nalaz se smatra negativnim. Ukoliko je 3 + smatra se pozitivnim. Ukoliko je HER2 status 2 +, prema smjernicama ASCO/CAP, a kojima se vodi i Hrvatsko onkološko društvo, potrebno je napraviti *in situ* hibridizaciju (FISH/CISH) (14, 41). Status HER2/neu povezan je s lošijom prognozom bolesti i zato je bitno njegovo precizno određivanje. S obzirom na ovo trebala bi se razmotriti mogućnost uvođenja *in situ* hibridizacije kao metode za testiranje HER2 2 + (dvosmislenih) nalaza u Općoj županijskoj bolnici Vinkovci u cilju identifikacije

kandidata za HER2 ciljanu terapiju, jer se sada uzorci bolesnica sa HER2 statusom 2 + upućuju na *in situ* hibridizaciju u druge ustanove, a što znatno produžuje vrijeme do konačne dijagnoze i započinjanja onkološke terapije.

Najčešći patohistološki tipovi u ovoj studiji invazivni su karcinom dojke (NOS) i lobularni invazivni karcinom dojke. NOS je dijagnosticiran kod 236 oboljelih (80,27 %), a lobularni invazivni kod 30 (10,20 %). Ostalo su rjeđi patohistološki tipovi karcinoma nađeni kod 7 pacijentica i samo 3 duktalna karcinoma *in situ*, što je ukupno 3,4 % od svih dijagnosticiranih karcinoma dojke. Usman i suradnici su u svojoj studiji dobili slične rezultate po kojima je 73,2 % karcinoma bilo NOS, 6,8 % lobularni invazivni te 1,2 % DCIS (20). U našem istraživanju najviše pacijentica s invazivnim karcinomom dojke imalo je luminal B HER2/neu - imunofenotip. Drugi po učestalosti patohistološki tip, invazivni lobularni karcinom dojke, najčešće je bio luminal A imunofenotipa. Verma S i sur. također su pokazali da je najučestaliji patohistološki tip bio invazivni karcinom dojke s najčešće luminal B HER2/neu - imunofenotipom. Drugi po učestalosti im je također invazivni lobularni karcinom dojke koji je po imunofenotipu najčešće luminal A (43). S druge strane, Usman A i sur. su u svojoj studiji pokazali da je najučestaliji patohistološki tip bio invazivni karcinom dojke, ali najčešće trostruko negativan (20). U studiji Caldarelle A i sur. najučestaliji patohistološki tip bio je također invazivni karcinom dojke, ali se očitovao najčešće kao luminal A (33).

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedene studije i dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Karcinomi dojke češći su kod osoba ženskog spola.
- Postoji blagi trend porasta broja pacijentica oboljelih od karcinoma dojke u promatranom razdoblju.
- Karcinomi dojke češće se javljaju u starijoj životnoj dobi.
- Pacijentice oboljele od karcinoma dojke određenog imunofenotipa se ne razlikuju prema dobi.
- Imunofenotip luminal B HER2/neu - češće ima metastatski pozitivne limfne čvorove u odnosu na imunofenotip luminal A.
- Pacijentice oboljele od karcinoma dojke ne razlikuju se prema dobi s obzirom na prisutnost metastatski pozitivnih aksilarnih limfnih čvorova.
- Metastaze u aksilarne limfne čvorove, neovisno o imunofenotipu, učestalije su kod pacijentica oboljelih od karcinoma dojke kod kojih je proliferacijski indeks (Ki-67) veći od 20 % nego kod onih s proliferacijskim indeksom (Ki-67) manjim ili jednakim 20 %.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj je istraživanja utvrditi učestalost karcinoma dojke u odnosu na dob, posebne histološke tipove, imunofenotip i metastaze u aksilarne limfne čvorove u osmogodišnjem razdoblju.

**Nacrt studije:** Rad je ostvaren kao presječna studija na povijesnim podacima.

**Materijali i metode:** Pretraživanjem arhiva Odjela za patologiju i citologiju Opće županijske bolnice Vinkovci, izdvojeni su nalazi karcinoma dojke. U istraživanje su uključene 294 pacijentice s dijagnosticiranim karcinomom dojke u periodu od 1.1.2011. do 31.12.2018. godine. Na uzorcima karcinoma imunohistokemijski je određena ekspresija ER, PR, Ki-67 i amplifikacija HER2.

**Rezultati:** Sve 294 biopsije pripadaju pacijenticama ženskoga spola. Aritmetička sredina dobi bila je 65 godina sa SD 12,1. Kod 167 (57 %) pacijentica su odstranjeni aksilarni limfni čvorovi, dok kod 127 (43 %) resekcija aksile nije rađena. Od njih 167, kod 111 (66 %) nađeni su pozitivni aksilarni limfni čvorovi (dokazane presadnice karcinomskog tkiva), a kod njih 56 (34 %) negativni. Najviše je *Carcinoma invasivum mammae* (NOS)-ukupno 239 kod kojih je najčešći imunofenotip luminal B (103). U istraživanjem obuhvaćenom osmogodišnjem razdoblju najučestaliji je imunofenotip luminal B. Imunofenotip luminal B značajno češće ima metastatski pozitivne limfne čvorove u odnosu na imunofenotip luminal A. Aksilarni limfni čvorovi češće su bili metastatski pozitivni kod onih s Ki-67 vrijednosti većom od 20 %.

**Zaključak:** Odluka o liječenju karcinoma dojke i prognoza bolesti ovisi o imunohistokemijskoj analizi stoga je ona obavezna kod oboljelih od karcinoma dojke. Bitno je uskladiti i standardizirati metode određivanja biomarkera te provoditi daljnja istraživanja u svrhu unaprjeđenja dijagnoze, liječenja i prognoze karcinoma dojke.

**Ključne riječi:** dob; imunofenotip; karcinom dojke; proliferacijski indeks; status aksilarnih limfnih čvorova



## 8. SUMMARY

*Monitoring of the eight-years period incidence of breast cancer from the bioptic material of the Department of pathology and cytology of General County Hospital Vinkovci*

**Objectives:** The aim of the study was to determine the incidence of breast cancer in relation to age, specific histological types, immunophenotype and metastasis to axillary lymph nodes in the eight-year period.

**Study Design:** The study was designed as a cross-sectional study.

**Material and methods:** Breast cancer reports were found by searching the archives of the Department of Pathology and Cytology of the General County Hospital of Vinkovci. The study included 294 patients with diagnosed breast cancer during the period from 1/1/2011 until 31/12/2018. Immunohistochemical expression of ER, PR, Ki-67 and amplification of HER2 was determined in the samples of cancer.

**Results:** All 294 biopsies were of female patients. Mean age was 65 years with SD 12.1. Axillary lymph nodes were removed in 167 (57 %) patients, while in 127 (43 %) axillary resection was not performed. Of the 167, 111 (66 %) of the patients had positive axillary lymph nodes (proven carcinoma tissue) and 56 (34 %) had negative ones. The most common histological type was the invasive mammary carcinoma (NOS) – total of 239. In this group the most common immunophenotype was luminal B – total of 103. In the eight-year study, the most common immunophenotype was luminal B. It is more common for luminal B immunophenotype to have positive metastatic lymph nodes than for luminal A. Axillary lymph nodes were more often metastatic positive when their Ki-67 value was over 20 %.

**Conclusion:** The treatment of breast cancer and prognosis depends on the immunohistochemical analysis. Therefore, the analysis is mandatory for breast cancer patients. It is important to harmonize and standardize the methods for biomarker determination and to carry out further research in order to improve diagnosis, treatment and prognosis of breast cancer.

**Keywords:** age; breast cancer; immunophenotype; proliferation index; status of axillary lymph nodes

## 9. LITERATURA

1. Jakić-Razumović J, Tomić S, Bolesti dojke. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, ur. Patologija, 5. izd. / prerađeno i dopunjeno. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 639-658.
2. Lester SC, Hicks DG, Normal Breast. U: Lester SC, Hicks DG, ur. Diagnostic Pathology: Breast, 2. izd. Elsevier; 2016. str. 4-14.
3. Jakić-Razumović J Dojka. U: Damjanov I, Jukić S, ur. Specijalna patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004. str. 463-488.
4. Kos Z, Dabbs DJ. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. *Histopathology*. 2016;68(1):70-85.
5. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ, ur. WHO Classification of Tumors of the Breast, 4. izd. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. str. 10-23.
6. Clancy Keen J, Davidson NE. The Biology of Breast Carcinoma. *American Cancer Society*. 2003;97(3): 825-33.
7. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes CR, Cuzick J, i sur. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103(22):1656-64.
8. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airolidi M, Pedani F, i sur. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;157(2):363-371.
9. Rak dojke. U: Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z, ur. Klinička onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 193-202.
10. World Health Organization. Breast cancer. Dostupno na: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Datum pristupa: 12.5.2019.

11. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb, 2019.
12. Bešlija S, Karcinom dojke-pregled. U: Bešlija S, Vrbanec D, ur. Medicinska/internistička onkologija. Sarajevo: Medicinski fakultet Univerziteta u Sarajevu; 2014. str. 212-232.
13. Di Leo A, Curigliano G, Diéras V, Malorni L, Sotiriou C, Swanton C, i sur. New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *Breast*. 2015;24(4):321-30.
14. Šeparović R, Ban M, Silovska T, Beketić Orešković L, Soldić Ž, Podolski P, i sur. Kliničke upute Hrvatskog onkološkog društva za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica/ka oboljelih od invazivnog raka dojke. *Liječ Vjesn*. 2015;37:143-149.
15. Marušić M i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini, 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
16. Laboratory info. Hematoxylin and Eosin staining: principle, procedure and interpretation. Dostupno na:<https://laboratoryinfo.com/hematoxylin-and-eosin-staining/>. Datum pristupa: 17.5.2019.
17. Taylor CR, Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods, 6. izd. Denmark: Dako Denmark; 2013.
18. Mitrović O, Čokić V, Dikić D, Budeč M, Vignjević S, Subotički T, i sur. Correlation between ER, PR, HER-2, Bcl-2, p53, proliferative and apoptotic indexes with HER-2 gene amplification and TOP2A gene amplification and deletion in four molecular subtypes of breast cancer. *Target Oncol*. 2014;9(4):367-79.
19. Jakovčević D, Dedić-Plavetić N, Vrbanec D, Jakovčević A, Jakić-Ruzmović J. Breast Cancer Molecular Subtypes and Oxidative DNA Damage. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(10):696–703.
20. Usman A, Iliyasu Y, Atanda Taoheed A. Molecular Subtyping of Carcinoma of the Female Breast in a Tertiary Teaching Hospital in Northern Nigeria. *Ann Trop Pathol*. 2019;10(1):20-26.

21. Cherbal F, Gaceb H, Mehemmai C, Saiah I, Bakour R, Rouis A, i sur. Distribution of molecular breast cancer subtypes among Algerian women and correlation with clinical and tumor characteristics: A population-based study. *Breast Dis.* 2015;35(2):95-102.
22. Alnegheimish NA, Alshatwi RA, Alhefdhi RM, Arafah MM, AlRikabi AC, Husain S. Molecular subtypes of breast carcinoma in Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2016;37(5):506-512.
23. Elkablawy MA, Albasry AM, Hussainy AS, Nouh MM, Alhujaily A. Molecular Profiling of Breast Carcinoma in Almadinah, KSA: Immunophenotyping and Clinicopathological Correlation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(17):7819-7824.
24. Paryani J, Gupta S. Is Breast Cancer Problem in India Worse Than That of the West? Reflection of Analysis of Breast Cancer Molecular Subtyping from Tertiary Cancer Care Center in Northern India. *Indian J Surg.* 2018:1-6.
25. Hong Thang V, Skoog L, Ba Duc N, Thanh Van T, Tani E. Cell Proliferation Measured by Ki67 Staining and Correlation to Clinicopathological Parameters in Operable Breast Carcinomas from Vietnamese and Swedish Patients. *J Anal Oncol.* 2015;4(2):58-68.
26. Gulzar R, Shahid R, Saleem O. Molecular Subtypes of Breast Cancer by Immunohistochemical Profiling. *Int J Pathol.* 2018;16(2):129-134.
27. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2011., Bilten 36, Zagreb, 2013.
28. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2012., Bilten 37, Zagreb, 2014.
29. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013., Bilten 38, Zagreb, 2015.
30. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2014., Bilten 39, Zagreb, 2016.
31. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2015., Bilten 40, Zagreb, 2018.

32. de Macedo Andrade AC, Ferreira Junior CA, Guimaraes BD, Pessoa Baros AW, de Almeida GS, Weller M. Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil. *BMC Womens Health*. 2014;14:110.
33. Caldarella A, Buzzoni C, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Apicella P, i sur. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139:617-623.
34. Hennigs A, Riedel F, Gondos A, Sinn P, Schirmacher P, Marmé F, i sur. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer*. 2016;16(1):734.
35. Mazouni C, Rimareix F, Mathieu M, Uzan C, Bourgier C, Andre F, i sur. Outcome in breast molecular subtypes according to nodal status and surgical procedures. *Am J Surg*. 2013;205(6):662-7.
36. Zhu X, Ying J, Wang F, Wang J, Yang H. Estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 status in invasive breast cancer: a 3,198 cases study at National Cancer Center, China. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147(3):551-5.
37. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, i sur. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes*. 2012;5:376.
38. Howlader N, Altekruse SF, Li CI, Chen VW, Clarke CA, Ries LA, i sur. US incidence of Breast cancer Subtypes Defined by Joint Hormone receptor and Her2 Status. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(5).
39. Inić Z, Zegarac M, Inić M, Marković I, Kozomara I, Đurišić I, i sur. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol*. 2014;8: 107-111.
40. Tomić S, Mrklič I, Jakić Razumović J, Jonjić I, Šarčević B, Blažičević V, i sur. Inter-laboratory comparison of Ki-67 proliferating index detected by visual assessment and automated digital image analysis. *Breast Dis*. 2019;38(2):73-79.

41. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, i sur. Breast Cancer Hormone Receptor Guideline, IHC. Arch Pathol Lab Med. 2010;134:48-72.
42. Wolff AC, Hammond Hale M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Barlett JM, i sur. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018;36(20):2105-2122.
43. Verma S, Bal A, Joshi K, Arora S, Singh G. Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of invasive breast cancer: a study from North India. APMIS. 2012;120(12):1008-19.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Ime: Mirna Kovačević

Datum rođenja: 24.12.1995.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Državljanstvo: Republika Hrvatska

E-mail adresa: kovacevic.mirnaa@gmail.com

### Obrazovanje:

U razdoblju od 2010. do 2014. godine pohađala je Gimnaziju Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima. 2014. upisuje Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Isti završava 2017. te pri istom fakultetu upisuje Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika. Od stranih jezika služi se njemačkim i engleskim jezikom.

### Popis aktivnih sudjelovanja na kongresima:

Aktivan je član CMLDSA (Croatian Medical Laboratory Diagnostics Students Association). U listopadu 2017. pasivno sudjeluje na Kongresu dječjeg zdravlja u Osijeku. Iste godine u studenom aktivno sudjeluje u organizaciji i provođenju aktivnosti povodom obilježavanja Međunarodnog dana laboratorijske medicine ("LabMedDay 2017."). U ožujku 2018. aktivno sudjeluje na Tjednu mozga u Osijeku. Iste godine u travnju aktivno sudjeluje na Festivalu znanosti u Osijeku. U svibnju iste godine aktivno sudjeluje na 4th Chohnoky Symposium u Mađarskoj, te 16. Konferenciji o laboratorijskoj dijagnostici u Zagrebu.