

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Nebojša Đ. Miletić

**ISPITIVANJE KORELACIJE EKSPRESIJE HER-2  
ONKOPROTEINA U PRIMARNOM TUMORU SA KLINIČKIM  
I PATOLOŠKIM STADIJUMOM REGIONALNIH LIMFNIH  
ČVOROVA U AKSILI KOD BOLESNICA SA OPERABILNIM  
KARCINOMOM DOJKE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Nebojša Đ. Miletić

**EXAMINATION OF THE CORRELATION OF EXPRESSION  
OF HER-2 ONCOPROTEIN IN THE PRIMARY TUMOR WITH  
CLINICAL AND PATHOLOGICAL STAGING OF REGIONAL  
LYMPH NODES IN THE AXILLA IN PATIENTS WITH  
OPERABLE BREAST CANCER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

**Mentor:** dr Ivana Golubičić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

**Komentor:** dr Svetislav Jelić, naučni savetnik, Institut za onkologiju i  
radiologiju Srbije

**Komisija u sastavu:**

dr Radan Džodić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski  
fakultet

dr Svetislav Tatić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski  
fakultet

dr Snežana Vidaković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski  
fakultet

dr Srbislav Knežević, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski  
fakultet

dr Zora Nešković-Konstatinović, naučni savetnik, Institut za onkologiju i  
radiologiju Srbije

**Datum odbrane doktorske disertacije:**

*Z a h v a l j u j e m: svom mentoru Prof. Univ. dr Ivani Golubičić, profesoru Medicinskog fakulteta u Beogradu, na podršci i korisnim savetima kojima me je usmeravala u izradi doktorske teze i bez čije bi velike pomoći izrada teze bila mnogo teža.*

*Trud uložen u ovaj rad posvećujem uspomeni na oca.*

## SAŽETAK

**Cilj:** *Određivanje povezanosti statusa humanog epidermalnog faktora rasta (HER-2) onkoproteina, potvrđene metodom hromogene in situ hibridizacije (CISH), sa starosnom dobi, menstrualnim statusom, porodičnom anamnezom, lokalizacijom tumora, kao i kliničkom i patološkom Tumor, Nodus, Metastaza, klasifikacijom tumora (TNM), histopatološkim tipom, histološkim i nuklearnim gradusom, nalazom steroidnih receptora i vrstom sprovedenog hiruškog lečenja, kod primarno operabilnog unicentričnog karcinoma dojke, u određivanju strategije inicijalnog lečenja.*

**Metode:** *Poređeni su klinički TNM nalazi i opšte karakteristike bolesnica kod kojih je lečenje započeto inicijalnim operativnim zahvatom u periodu 2006-2009. godine, sa definitivnim HP nalazom kojim je određivan tip tumora, veličina, patološki pT i pN, histološki i nuklearni gradus, nalaz steroidnih receptora i CISH amplifikacija.*

**Rezultati:** *U osnovnoj grupi analizirano je 346 bolesnica sa duktalnim (DC), lobularnim (LC) i drugim tipovima karcinoma dojke. U osnovnoj grupi amplifikacija HER-2 receptora pokazala se kod 72 (20,81%) bolesnica. Za potrebe ovog istraživanja poređene su grupe sa i bez CISH amplifikacije.*

*U odnosu na starosnu dob ( $p=0.41$ ) i menstrualni status ( $p=0.54$ ) nije utvrđena statistički značajna razlika. Statistička značajnost nije dobijena ni u odnosu na lokalizaciju tumora ( $p=0.65$ ), kao ni prema opštoj i porodočnoj anamnezi vezanoj za maligne bolesti dojke ( $p=0.77$  i  $p=0.5$ ).*

*U odnosu na HP nalaz, utvrđena je statistički značajna razlika. Sa CISH amplifikacijom je bilo DC - 55 (76,39%), kod LC - 11 (15,28%), ostalo 4 (5,56%), mešoviti karcinomi - 2 (2,78%),  $p=4.22 \cdot 10^{-5}$ . Prema kliničkom nodalnom statusu ( $p=0.78$ ), i patološkom nodalnom statusu ( $p=0.81$ ), nije utvrđena statistička značajnost.*

*Značajna statistička razlika dobijena je u odnosu na histološki gradus ( $p=0.015$ ), nuklearni gradus ( $p=0.00135$ ), kao i na odnos prema steroidnim receptorima (ER  $p=3 \cdot 10^{-5}$ , PR*

$p=4\cdot 10^{-5}$ ).

Narednu analizu smo radili po PH tipu karcinoma unutar kategorija pT. Podatke o pT i CISH je imalo 337/346 (97.4%) bolesnica, od čega je sa DC ukupno 183/346 (52.89%) bolesnica, dok je LC imalo 118/346 (34.1%) pacijentkinja.

U formiranoj podgrupi samo duktalnih i lobularnih karcinoma, analizirani su nalazi 301 bolesnice. Amplifikacija HER-2 onkoproteina pokazala se kod 66 (21,93%) bolesnica. Za potrebe ovog istraživanja poređene su grupa sa i bez CISH amplifikacije. U odnosu na starosnu dob ( $p=0.08$ ) i menstrualni status ( $p=0.68$ ), nije utvrđena statistički značajna razlika. Prema lokalizaciji tumora ( $p=0.82$ ), i kliničkom T ( $p=0.21$ ) i N statusu ( $p=0.95$ ), nije utvrđena statistička značajnost. U odnosu na HP nalaz DC vs LC, utvrđena je statistički značajna razlika. Sa CISH amplifikacijom je bilo DC 55 (83,33%) a kod LC 11 (16,67%) ( $p=2\cdot 10^{-5}$ ). Statistička značajnost nije utvrđena kod patološkog pT ( $p=0.17$ ) ni kod patološkog pN ( $p=0.95$ ). U ovoj podgrupi potvrđeni su nalazi dobijeni i u osnovnoj grupi sa neznatno izmenjenim vrednostima. Statistička značajnost potvrđena je i za histološki ( $p=0.079$ ) i nuklearni gradus ( $p=0.00371$ ). Intrigirani dobijenim nalazima dalju analizu smo radili po PH tipu karcinoma unutar kategorija pT. Podatke o pT i CISH je imalo 293/301 (98.34%) pacijenata od čega je sa DC ukupno 178/183 (97.27%) bolesnica, dok je LC imalo 115/115 (100%) pacijentkinja. Kod pacijentkinja sa DC u odnosu na LC pokazana je statistički značajno veća učestalost CISH amplifikacije. Ova značajnost iskazana je i kod poređenja veličine tumora pT1 ( $p=4.9\cdot 10^{-4}$ ), u odnosu na pT2+3 ( $p=0.019$ ).

**Zaključak:** Shodno dobijenim rezultatima zaključili smo da nema statistički značajne korelacije sa kliničkim i patološkim nodalnim statusom i HER-2 amplifikacije određene CISH metodom kod karcinoma dojke. Potvrdili smo da se kod duktalnih karcinoma statistički značajno obrnuto češće javlja CISH amplifikacija nego kod lobularnih karcinoma. Takođe je potvrđena i statistički veća učestalost CISH amplifikacije u odnosu na manje vrednosti steroidnih receptora, kao i direktno proporcionalna statistička značajnost sa CISH amplifikacijom u odnosu na histološki i nuklearni gradus. Potvrdili smo veću učestalost CISH ampifikacije kod duktalnih nego kod lobularnih karcinoma.

*Utvdili smo da je amplifikacija statistički značajno veća kod manjih tumora (pT1) nego kod većih (pT2+3). Ovaj nalaz ukazuje na veću biološku agresivnost manjih tumora, pogotovo duktalnih karcinoma, u odnosu na veće tumore. Iako nije jedini prognostički i prediktivni faktor, amplifikacija HER-2 onkoproteina prema PH tipu i veličini tumora može uticati na buduću strategiju inicijalnog lečenja primarno operabilnih karcinoma dojke kliničkog stadijuma I i II.*

***Ključne reči:*** dojka, karcinom, duktalni, lobularni, TNM, HER-2



## **SUMMARY**

**Purpose:** *To determine the association of status of human epidermal growth factor (HER-2) oncoprotein, chromogene confirmed using in situ hybridization (CISH), with age, menstrual status, family history, tumor localization and the clinical and pathological tumor, nodes, metastasis, the classification of tumors (TNM), histopathological type, histological and nuclear grade, steroid receptor findings and type of surgical treatment carried out, the primary operable breast cancer unicentric, in determining initial treatment strategies.*

**Methods:** *The comparison of the clinical TNM and general characteristics of patients in whom treatment was started with initial surgical procedure in the period of 2006 to 2009, with definite findings that HP was determined by tumor type, size, pathological pT and pN, histologic and nuclear grade, a finding steroid receptors and CISH amplification.*

**Results:** *The primary group analyzed 346 patients with ductal (DC), lobular (LC) and other breast carcinoma. The amplification of the fundamental group of HER-2 receptor is shown in 72 (20.81%) patients. For the purposes of this study group were compared with and without CISH amplification. In relation to age ( $p=0.41$ ) and menstrual status ( $p=0.54$ ) was not statistically significant difference. Statistically significance was not obtained even in relation to the localization of the tumor ( $p=0.65$ ), as well as the general anamnesis and family anamnesis related to malignant breast disease ( $p=0.77$  and  $p=0.5$ ). Compared to the HP findings, a statistically significant difference. With CISH amplification was DC - 55 (76.39%), with LC - 11 (15.28%), other - 4 (5.56%), two mixed carcinomas (2.78%),  $p=4.22 \cdot 10^{-5}$ . According to the clinical nodal status ( $p=0.78$ ), and pathologic nodal status ( $p=0.81$ ), not statistically significant. Statistically significant difference was observed in relation to histological grade ( $p=0.015$ ), nuclear grade ( $p=0.00135$ ), and the relationship to steroid receptors (ER  $p=3 \cdot 10^{-5}$ , PR  $p=4 \cdot 10^{-5}$ ).*

*Subsequent analysis we did for PH type of cancer within the pT category. Data on pT and CISH had the 337/346 (97.4%) patients, of which the total DC 183/346 (52.89%) patients, while LC had a 118/346 (34.1%) patients.*

*In the subgroup formed only DC/LC were analyzed the results of 301 patients. Amplification of HER-2 oncoprotein is shown in 66 (21.93%) patients. For the purposes of this study group were compared with and without CISH amplification. In relation to age ( $p=0.08$ ) and menstrual status ( $p=0.68$ ), there isn't statistically significant difference. According to the localization of the tumor ( $p=0.82$ ), and clinical T ( $p=0.21$ ) and N status ( $p=0.95$ ), there isn't statistically significant difference. Compared to the HP DC/LC findings, there is a statistically significant difference. CISH with DC amplification was 55 patients (83.33%) and the LC 11 patients (16.67%) ( $p=2 \cdot 10^{-5}$ ). The statistical significance was not found in pathological pT ( $p=0.17$ ) or in pathological pN ( $p=0.95$ ). In this subgroup confirmed the findings obtained in the primary group with slightly altered values. Statistical significance was confirmed histologically and for ( $p=0.079$ ) and nuclear grade ( $p=0.00371$ ). Intrigued by these findings, we did further analysis on PH type of cancer within the pT category. Data on pT and CISH had the 293/301 (98.34%) patients, of which the total DC 178/183 (97.27%) patients, while LC had a 115/115 (100%) patients. In patients with DC in relation to the LC demonstrated a statistically significantly higher incidence of CISH amplification. This significance is presented and comparisons with pT1 tumor size ( $p=4.9 \cdot 10^{-4}$ ), compared to pT2+3 ( $p=0.019$ ).*

**Conclusion:** *According to the results, we concluded that there was no statistically significant correlation with clinical and pathological nodal status and HER-2 amplification determined using CISH methods in breast cancer. We have confirmed that in ductal carcinoma significantly more frequently than CISH amplification lobular cancer. It was also confirmed by the statistically inversely higher frequency of CISH amplification compared to the low value of steroid receptors, and directly proportional to the statistical significance of the CISH amplification with respect to histologic and nuclear grade. We confirmed a higher frequency of CISH amplification in ductal carcinomas than in lobular. We found that amplification was significantly higher in small tumors (pT1) than in larger*

*(pT2+3). This finding suggests a greater biological aggressiveness of smaller tumors, particularly ductal carcinoma, as compared to larger tumors. Although that is not the only prognostic and predictive factor, amplification of HER-2 oncoprotein by PH type and size of the tumor, may affect the future strategy of initial treatment of primary operable breast cancer clinical stage I and II.*

***Key words:*** *breast cancer, ductal, lobular, TNM, HER-2*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. ISTORIJAT LEČENJA PRIMARNO OPERABILNIH KARCINOMA DOJKE .....	1
1.2. EMBRIOLOGIJA DOJKE .....	4
1.3. ANATOMIJA DOJKE .....	6
1.4. PATOMORFOLOŠKI ASPEKT KARCINOMA DOJKE .....	7
1.5. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE .....	8
1.6. KARCINOM DOJKE KAO SOCIJALNO MEDICINSKI PROBLEM .....	11
1.7. KARCINOM DOJKE KAO SISTEMSKA BOLEST .....	12
1.8. OPERATIVNI PRISTUP U LEČENJU MALIGNIH TUMORA DOJKE .....	15
<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	17
2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	17
2.2. RADNA HIPOTEZA .....	18
<b>3. MATERIJAL I METODOLOGIJA</b> .....	19
3.1. MATERIJAL .....	19
3.2. METODOLOGIJA HER-2 TESTIRANJA .....	20
3.3. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA STEROIDNIH RECEPTORA.....	21
3.4. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA HISTOLOŠKOG I NUKLEARNOG GRADUSA .....	21
3.5. STATISTIČKA OBRADA I TEKSTOVI .....	21
<b>4. REZULTATI</b> .....	23
4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE BOLESNICA, OBOLJENJA I LEČENJA (N=346) .....	23
4.1.1. Karakteristike bolesnica .....	23
4.1.2. Kliničke karakteristike oboljenja .....	25
4.1.3. Karakteristike hirurškog lečenja .....	29
4.1.4. Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa .....	30
4.1.5. Status steroidnih receptora i HER-2 status određen CISH metodom ....	34
4.2. HER-2 STATUS ODREĐEN CISH METODOM I OPŠTE KARAKTERISTIKE BOLESNICA I OBOLJENJA .....	37
4.2.1. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica	37
4.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i karakteristike oboljenja .....	38
4.2.2.1. Povezanost kliničkih i histopatoloških karakteristike oboljenja .....	38
4.2.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike oboljenja .....	40
4.2.2.3. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike oboljenja .....	41
4.2.2.4. HER-2 status određen CISH metodom i histološki i nuklearni gradus tumora .....	42
4.2.2.5. HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori .....	44
4.2.2.6. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološki tipovi tumora	45

4.3.HER-2 STATUS ODREĐEN CISH METODOM U PODGRUPI BOLESNICA SA DUKTALNIM I LOBULARNIM KARCINOMOM DOJKE (N=301) .....	46
4.3.1. Opšte karakteristike bolesnica, oboljenja i lečenja .....	46
4.3.1.1. Karakteristike bolesnica .....	46
4.3.1.2. Kliničke karakteristike oboljenja .....	47
4.3.1.3. Karakteristike hirurškog lečenja .....	48
4.3.1.4. Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa .....	49
4.3.1.5. Status steroidnih receptora i HER-2 status određen CISH metodom	51
4.3.2. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica i oboljenja .....	52
4.3.2.1. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica .....	52
4.3.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i karakteristike bolesnica .....	53
4.3.2.2.1. Povezanost kliničkih i histopatoloških karakteristike bolesnica .....	53
4.3.2.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike bolesnica .....	55
4.3.2.2.3. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike bolesnica .....	56
4.3.2.2.4. HER-2 status određen CISH metodom i histološki i nuklearni gradus tumora .....	57
4.3.2.2.5. HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori .....	59
4.3.2.2.6. HER-2 status određen CISH metodom i pT vrednosti histopatoloških tipova tumora (DC/LC) .....	60
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>62</b>
<b>6. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>70</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>72</b>
<b>8. SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU .....</b>	<b>85</b>
<b>9. BIOGRAFIJA .....</b>	<b>86</b>

## 1. UVOD

### 1.1. ISTORIJAT LEČENJA PRIMARNO OPERABILNIH KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke predstavlja jednu od najrasprostranjenijih bolesti na osnovu brojnih sprovedenih naučnih, kliničkih, eksperimentalnih i epidemioloških studija. Globalne statističke analize urađene još 80-ih godina prošlog veka, nažalost i danas nisu bitno promenjene. Karcinom dojke je i dalje jedno od najučestalijih malignih oboljenja i vodeći je uzrok smrti kod žena obolelih od malignih bolesti [1]. Svake godine se otkrije više od milion novoobolelih u celom svetu. Kod muškaraca se javlja retko i odnos je 1:100 [2].

Uprkos sve ranijoj dijagnostici, u svetskim razmerama oko 40-60% bolesnica u vreme postavljanja dijagnoze ima zahvaćene regionalne limfne čvorove u homolateralnoj aksili [3]. Iako je u trenutku otkrivanja bolest moguće već metastazirala u regionalne limfne noduse, u ovu grupu spadaju i bolesnice kliničkog stadijuma I i II, koje su primarno operabilne. U podacima razvijenih zemalja sa organizovanim skrining programima, navodi se da se udeo lokalizovane bolesti (klinički i patološki stadijum I) u novotkrivenim slučajevima raka dojke kreće i do 80%. Zbog verovatnog postojanja udaljenih mikrometastaza, oko 50%-70% bolesnica će u narednih 10 godina dobiti recidiv bolesti [4].

Iako je podatak iznet unazad 34 godina, a i pre definisanja standardne adjuvantne hemio-hormono terapije, procenat bolesnica koje umiru zbog relapsa bolesti je i dalje relativno visok, a pitanje mogućnosti trajnog izlečenja čak i ranog karcinoma dojke je i dalje nejasno [5,6,7,8,9].

Uz kvalitet inicijalnog hiruškog lečenja, do sada poznati i definisani osnovni parametri prognoze su određeni veličinom tumora (T), histološkim i nuklearnim gradusom, statusom aksilarnih limfnih nodusa (N), prisustvom udaljenih metastaza (M) kao i statusom estrogenskih, progesteronskih i HER-2 receptora i Ki67 nuklearnim proteinom u samom tumoru.

HER-2 (human epidermal growth-factor receptor) pripada grupi transmembranskih receptora za faktore rasta. U ovoj grupi od do sada otkrivenih 4 receptora koji učestvuju u međućelijskoj komunikaciji (HER-1-4), HER-2 predstavlja

složeni protein koji se nalazi na površini ćelije i u normalnim uslovima kontroliše rast i deobu ćelije. Kodiran je protoonkogenom *cerB-2*, lokalizovanom na 17 hromozomu koji se u literaturi se nalazi pod imenima *HER-2/neu*, *HER-2* onkoprotein, onkogen i protoonkogen [10].

Određivanje ekspresije i amplifikacije *HER-2* u karcinomu dojke postalo je neophodan vodič za svakodnevnu kliničku praksu.

Osnovne metode testiranja su: 1. imunohistohemijska metoda(IHH), kojom se identifikuje povećana proteinska ekspresija na ćelijskoj membrani i 2. metoda in situ hibridizacija (ISH), bilo fluorescenta in situ hibridizacija (FISH) ili hromogena in situ hibridizacija (CISH), kojoma se determinišu postojanje genske amplifikacije.

*HER* grupu receptora čine četiri membranska proteina: receptor humanog epidermalnog faktora rasta *HER1* (*EGFR*), *HER2* (poznat i kao *neu/c-erb B2*), *HER3* (*c-erb-B3*) i *HER4* (*c-erb-B4*).

Strukturno, *HER* receptori se sastoje od tri regiona: 1. ekstracelularnog dela za vezivanje liganda, 2. transmembranskog glikoproteinskog dela u kome se receptor vezuje za ćelijsku membranu i 3. intracelularnog područja (izuzev *HER3*) koji određuje aktivnost tirozin-kinaze. U inaktivnom stanju *HER* receptori su monomeri. Vezivanjem liganda i aktivacijom receptora dolazi do njihove homo i heterodimerizacije i aktivacije enzima tirozin-kinaze. Na taj način aktivira se kaskadni mehanizam biohemijskih promena u samoj ćeliji, što dovodi do ćelijske proliferacije, apoptoze, angiogeneze, promena u adhezivnosti i motilitetu ćelija. Poremećaj bilo koje faze ovog mehanizma može da dovede do prekomerne proliferacije, migracije ćelija i njihovog metastaziranja [11,12,13].

Klinički značaj amplifikacije gena receptora humanog epidermalnog faktora rasta *HER2*, lokalizovanog na hromozomu 17, u karcinomu dojke je ustanovljen pre više od dve decenije, kada je Slamon sa saradnicima objavio rezultate svojih istraživanja [14].

Od tada je u brojnim studijama dokazano da *HER2* genska amplifikacija i/ili povećana proteinska ekspresija predstavljaju faktor loše prognoze udružen sa rapidnim tumorskim rastom, povećanim rizikom za pojavu recidiva nakon hirurškog tretmana, slab odgovor na konvencionalnu hemioterapiju i hormonsku terapiju i kraće preživljavanje [15,16,17,18,19].

Povećana ekspresija HER2 može, ali i ne mora biti udružena sa drugim faktorima loše prognoze, kao što su veličine tumora, visok gradus histološke i nuklearne diferencijacije, negativan status steroidnih receptora (SR) estrogen (ER) i progesteron (PR) i visok proliferativni indeks [20,21].

HER2 genska amplifikacija ili povećana proteinska ekspresija viđa se kod 10-34% karcinoma dojke [11]. Amplifikacija ovog gena (više od deset kopija) dovodi do izrazito povećane (over) ekspresije HER-2 receptora (povećana sinteza membranskog glikoproteina – receptora). Ovo podrazumeva HER-2 pozitivan tumorski status kod karcinoma dojke, a za rezultat ima nekontrolisan rast i deobu ćelija što predstavlja osnovu tumorske transformacije [22].

U poslednjih dvadeset godina otkriven je i definisan značaj HER-2 receptora, koji pokazuje overekspresiju u primarnom tumoru u 10-34% bolesnica sa karcinomom dojke. Pozitivnost HER-2 ima ne samo prognostički, već i prediktivni značaj, jer se na taj način mogu selektovati bolesnice koje su kandidati za primenu trastuzumab-a, monoklonskog antitela koje se vezuje za HER-2 receptore, dovodeći do ciljanog uništavanja tumorskih ćelija. Već prvi rezultati potvrdili su značajno veću terapijsku efikasnost kombinacije hemioteapije sa trastuzumab-om u odnosu na samo hemioterapiju [23,24].

Više studija pokazalo je da je petogodišnje preživljavanje kod većine ostalih maligniteta samo interval, nakon koga je recidiv izuzetno redak, a smrtni ishod veoma izvestan. Za karcinom dojke rizik od recidiva (kao lokalne ponovne pojave bolesti), traje godinama, pa čak i decenijama od inicijalne dijagnoze i sprovedenih modaliteta lečenja. Ovo se posebno odnosi na bolesnice kod kojih je karcinom dojke dijagnostikovao pre 50-te godine starosti, (oko 1/4 svih bolesnica), i kod kojih se karcinom dojke skoro može smatrati hroničnom bolešću. Naime, desetogodišnje preživljavanje za bolesnice sa ranim stadijumima bolesti iznosi 80-90% [8,9].

Takav tok bolesti opravdava tezu da je karcinom dojke od početka sistemska bolest sa mikrometastazama koje mogu "mirovati" godinama, a zatim preći u klinički manifestnu bolest.

Konsenzus o izboru najsvrsihodnije terapije u različitim stadijumima i fazama kliničke evolucije karcinoma dojke na osnovu HER-2 statusa je u stalnim dopunjavanjima, a pojedine dileme perzistiraju (najadekvatnija hemioterapijska



kombinacija u adjuvantnom pristupu, izbor hormonoterapije u SR+ i HER-2 3+ statusu, broj linija hemioterapije u kojima istu treba kombinovati sa Trastuzumab-om, primena Trastuzumab-a u karcinomu dojke koji pokazuje HER-2 pozitivnost ali ne i 3+ hiperekspresiju), kao i primena Trastuzumab-a u neodjuvantom pristupu.

Poslednjih desetak godina u literaturi je publikovan veći broj radova u kojima su istraživani različiti aspekti prediktivne i prognostičke značajnosti ekspresije HER-2 onkoproteina u karcinomu dojke kao i overekspresije HER-2 kao faktora nepovoljne prognoze. Međutim, podaci vezani za međuzavisnost HER-2 statusa prema položaju, veličini, tipu tumora, njegovog histološkog i nuklearnog gradusa, zahvaćenosti regionalnih limfnih nodusa kao i drugih faktora rizika, ne daju odgovore na sva pitanja [25,26,27,28,29,30,31,32,33].

## 1.2. EMBRIOLOGIJA DOJKE

Prvi embrionalni začeci dojki vide se u toku pete nedelje embrionalnog razvića a ispoljavaju se u vidu primitivne ektodermalne trake ili "mlečne linije" koja se pruža od aksile pa do sredine ingvinalnog predela. U grudnom delu od ove trake nastaje mlečni greben dok ostali deo mlečne linije podleže regresiji. Nekompletna regresija ili nekompletno iščezavanje primitivne mlečne trake osnov je za pojavu akcesornog tkiva dojke koje srećemo kod 2-6 % odraslih žena.

Između 7 i 8 nedelje gestacije javlja se zadebljanje mamarnog začetka (stadijum mlečnog brežuljka), nakon čega sledi invaginacija u mezenhim zida grudnog koša (diskoidni stadijum) i trodimenzionalni rast (globularni stadijum). Dalja invazija mezenhima grudnog koša rezultira u spljoštavanju mlečne brazde (konusni stadijum) koji se vidi između desete i četrnaeste nedelje gestacije. Između 12-te i 16-te nedelje, mezenhimske ćelije se diferenciraju u glatke mišićne ćelije bradavice i areole. Zatim se razvijaju epitelni pupoljci (stadijum pupljenja), a onda se isti granaju stvarajući 15-250 epitelnih pruga (16-ta nedelja, stadijum grananja). Ove epitelne trake predstavljaju buduće sekretorne alveole dojke. Zatim nastaje sekundarni mamarni začetak sa diferencijacijom folikula dlaka, lojnih žlezda i znojnih žlezda ali su samo znojne žlezde vidljive u ovom periodu. Veruje se da se filogenetski paranhim dojke razvija od znojnih

žlezda od kojih nastaju Montgomery-eve žlezde ove bradavice. Ovaj razvoj nije pod hormonskim uticajem.

Za vreme trećeg trimestra trudnoće, placentarni seksualni hormoni ulaze u fetalnu cirkulaciju i indukuju tunelizaciju razgranatog epitelnog tkiva (kanalikularni stadijum). Proces traje od 32 do 40-te nedelje razvića. U vreme termina za porođaj formirana su 15-25 duktusa koji se spajaju sa duktusima lojnih žlezda u blizini epiderma.

Paranhimska diferencijacija ispoljava se između 32 i 40-te nedelje kada se vide lobulo-alveolarne strukture koje sadrže kolostrum (terminalni vezikularni stadijum). U ovom stadijumu se vidi četvorostruko uvećanje mase mlečnih žlezda a istovremeno se razvija i bradavica – areolarni kompleks sa naglašenijom pigmentacijom. Kod neonatusa oba pola stimulirano tkivo dojke luči kolostrum koji se istiskuje iz dojke u toku 4-7 postpartalnih dana.

Lučenje kolostruma regresira između 3-4 nedelje kada dolazi i do involucije dojki zbog nestanka placentarnih hormona.

Najčešće, pubertet kod devojčica počinje između desete i dvanaeste godine kao rezultat delovanja hipotalamičnih hormona koji se luče u hipotalamično-hipofizni portalni venski sistem. Bazofilne ćelije oslobađaju folikulostimulirajući i lutenizirajući hormon koji utiču na primarne ovarijalne folikule da sazrevaju u grafove folikule. Oni dalje luče estrogene najčešće u obliku 17-beta estradiola. Ovi hormoni indukuju rast i maturaciju dojki i genitalnih organa.

U toku 1-2 godine posle menarhe hipotalamično hipofizna funkcija nije izbalansirana. U ovom periodu je sinteza estrogena izraženija od sinteze progesterona. Estrogeni izazivaju uzdužni rast duktusa dojki i rast dukalnog epitela. Terminalni duktuli, takođe, stvaraju pupoljke koji su prethodnici lobula dojki. Simultano se razvija periduktalno vezivno tkivo sa pojačanom vaskularnošću i razvojem masnog tkiva. Ove su promene indukovane estrogenima, sintetisanim u nezrelim ovarijalnim folikulima koji su anovulatorni. Kasnije folikuli ovuliraju i žuta tela stvaraju progesteron. Relativna uloga ovih hormona nije u potpunosti razjašnjena. Sam estrogen indukuje naglašeno povećanje duktusa dok progesteron to ne čini. Oba hormona indukuju duktulo-lobulo-alveolarni rast [34].

### 1.3. ANATOMIJA DOJKE

Dojka je modifikovana znojna žlezda čiji se začeci javljaju u šestoj nedelji fetalnog razvoja iz zadebljanja epiderma na ventralnoj strani tela. Posle rođenja kod muškaraca ostaje rudimentirani organ, a kod žena se progresivno razvija u pubertetu, da bi u trudnoći dostigla svoju punu morfološku zrelost i funkcionalnu aktivnost. U menopauzi dolazi do njene involucije i atrofije. Dojka se nalazi na prednjem zidu grudnog koša, između II i V rebra, prednje aksilarne i parasternalne linije. Sastoji se od strome i žlezdanog tkiva. Stromu čini masno tkivo koje obavlja mlečnu žlezdu i fibrozno tkivo. Površna (potkožna) fascija kao i duboka koja pokriva m. pectoralis major obavijaju tkivo dojke i povezane su fibroznim trakama - Kuperovi ligamenti - čije zatezanje objašnjava retrakcija kože prilikom ravoja malignog tumora u dojci. Žlezdanih režnjeva dojke ima 15-20, i oni su međusobno odvojeni stromom. Svaki režanj ima veći broj režnjica (lobulusa), a svaki od lobulusa ima 10-100 acinusa. Lobulus je strukturna jedinica mlečne žlezde. Acinusi su obloženi kockastim epitelom i izlivaju se u mamilu preko mlečnih kanalića koji su obloženi cilindričnim epitelom. Ovakvih mlečnih kanalića (duktusa) ima oko 20 i oni se na putu prema bradavici proširuju u ampule koje su obložene pločastoslojevitim epitelom. Kako dojka predstavlja target tkivo, ciklično se odigravaju histološke promene u njoj pod dejstvom ovarijalnih hormona, estrogena i progesterona.

Pod dejstvom estrogena proliferišu eptiel duktusa i acinusa, a pod dejstvom progesterona dolazi do rasta i edema strome, do pojačane sekretorne aktivnosti acinusa i do proširenja duktusa. U daljem toku odigrava se skvrčavanje duktusa, deskvamiraju ćelije i nestaje edem.

Vaskularizacija dojke ima sledeću anatomsku šemu:

- medijalni deo dojke ishranjuje se preko rami perforantes-a. a. mamariae interne
- duboka strana dojke vaskularizovana je bočnim probojnim granama interkostalnih arterija
- najveći deo tkiva dojke, oko 80% irigira a. axillaris i njene grane: a. thoracoacromialis, a. thoracica lateralis i a. thoraco dorsalis.

Vene prate istoimene arterije a njihov je značaj u rasejavanju malignih ćelija iz tumora dojke u opštu cirkulaciju. Razlikuju se sledeće grupe vena:

- aksilarna vena sa pritokama odvodi krv direktno u desno srce što objašnjava veliki procenat metastaza u plućima
- površne (potkožne) vene dojke
- grane v. mammae interne takodje preko v. anonime odvede krv u plućnu cirkulaciju
- Interkostalne vene komuniciraju sa vertebralnim venskim plexusom koji nema valvula pa je moguća retrogradna cirkulacija pri promeni intraabdominalnog pritiska. To favorizuje diseminaciju malignih ćelija u kičmu, lobanju, karlicu, femur.

Limfna drenaža dojke:

Putem difuznog kutanog limfnog plexusa i dubokog, subareolarnog (intramamarnog) plexusa više od 85% limfne drenaže odvija se preko aksilarnih limfnih sudova i nodusa. U manjoj meri limfa ide u noduse mammae interne (parasternalno), u paravertebralne limfne noduse, pozadi, preko interkostalnih limfnih sudova, kao i u infra i supraklavikularne limfne noduse.

Komunikacije limfnog sistema dojke sa suprotnom dojkom postoji preko retromanubrijalnih limfnih nodusa kao i sa subdijafragmalnim nodusima i jetrom preko limfnih sudova mišića prednjeg trbušnog zida [34].

#### 1.4. PATOMORFOLOŠKI ASPEKT KARCINOMA DOJKE

Maligni tumori dojke mogu biti porekla kože, masnog tkiva, mezenhimalnog tkiva i u najvećem procentu epitelnih struktura. Karcinom dojke potiče iz epitela kanalića (duktalni) i acinusa (lobularni).

Klasifikacija karcinoma dojke – prema UICC

I Neinvazivni karcinomi

1. duktalni in situ (intraductale)
2. lobularni in situ

## II Invazivni karcinomi

### 1. duktalni

- papilarni
- tubularni
- medularni
- mucinozni
- Mb. Paget

### 2. lobularni

### 3. adenocistični

- sekretorni (juvenilni)
- apokrini

Duktalni karcinomi su najčešći i čine 70%- 80% svih malignih tumora dojke, pri čemu je najviše zastupljen histološki oblik, invazivni duktalni karcinom (2/3 svih duktalnih). Lobularni karcinom je zastupljen u manjem procentu [35].

## 1.5. EPIDEMIOLOGIJA KARCINOMA DOJKE

Karcinom dojke je bolest žena. Kod muškaraca se javlja retko i odnos je 1:100 [36]. U mnogim razvijenim zemljama kao i u zemljama u razvoju karcinom dojke je najčešće maligno oboljenje i vodeći je uzrok smrti kod žena obolelih od malignih bolesti [2,37].

Procenjuje se da je rak dojke u porastu kako zbog uticaja različitih faktora rizika, tako i zbog produženja životnog veka, bolje dijagnostike, tačnijih statističkih podataka i dr.

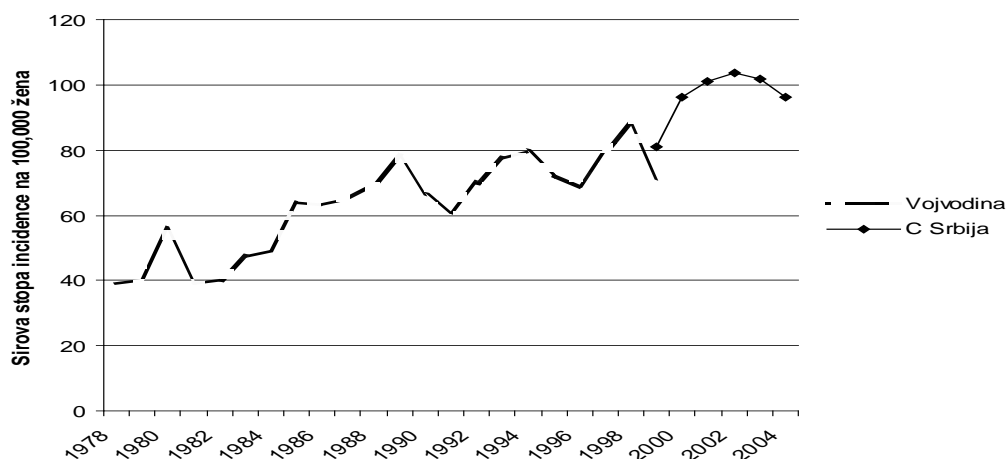
Incidenca raka dojke varira širom sveta: ona je najniža u manje razvijenim zemljama a najveća u razvijenim zemljama. U dvanaest svetskih regiona, godišnje standardizovane stope incidencije na 100.000 žena su: u istočnoj Aziji 18, južna i središnja Azija 22, podsaharska Afrika 22, jugoistočne Azija 26, severna Afrika i zapadna Azija 28, južna i srednja Amerika 42, istočna Evropa 49, južna Evropa 56, severna Evropa 73, okeanija 74, zapadna Evropa 78, u severnoj Americi 90.

Porast incidence karcinoma dojke je u razvijenim zemljama je delimično objašnjiv modernim načinom života i većim mogućnostima rane dijagnostike. U ovim zemljama u starosnoj strukturi samo 5% žena oboljeva od raka dojke u dobi ispod 40 godina.

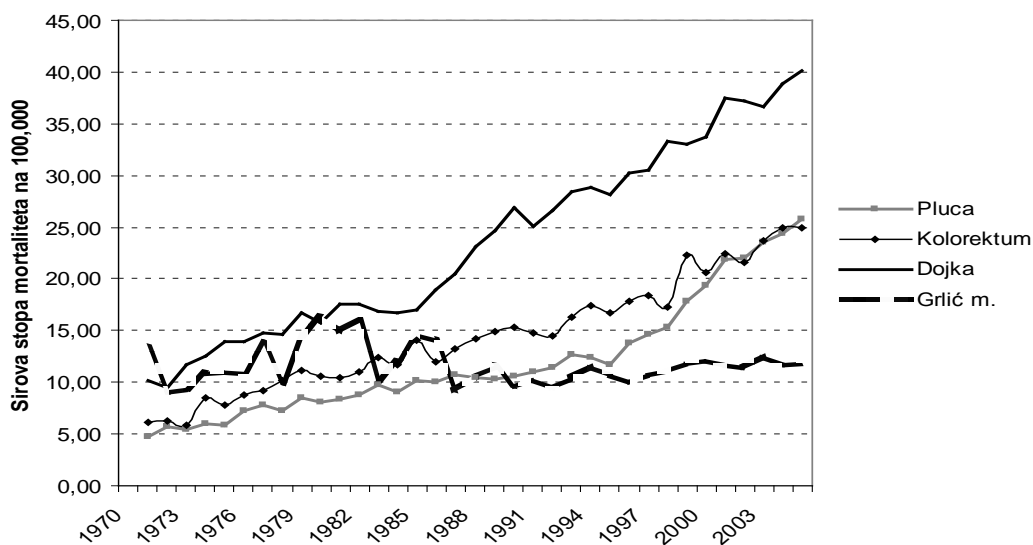
Kod žena u Srbiji, rak dojke je najčešći maligni tumor odgovoran za više od četvrtine svih malignih bolesti. Procenjuje se da svake godine otkrije oko 4000 novih slučajeva raka dojke. Ovaj karcinom je ujedno i vodeći uzrok smrti među malignim tumorima kod žena. U Srbiji su od raka dojke 2006. godine umrle 1574 žene, što čini oko 18% smrtnosti od kancera u ženskoj populaciji.

Incidenca raka dojke u Srbiji je u neprekidnom porastu (Slika 1).

Sirova stopa mortaliteta se od 1970. godine povećala 4 puta, sa 10 na 100,000 žena na 40 u 2004. godini (Slika 2). Standardizovana stopa mortaliteta povećala se u istom periodu 2,5 puta (sa 8,3 na 20,7) [38].

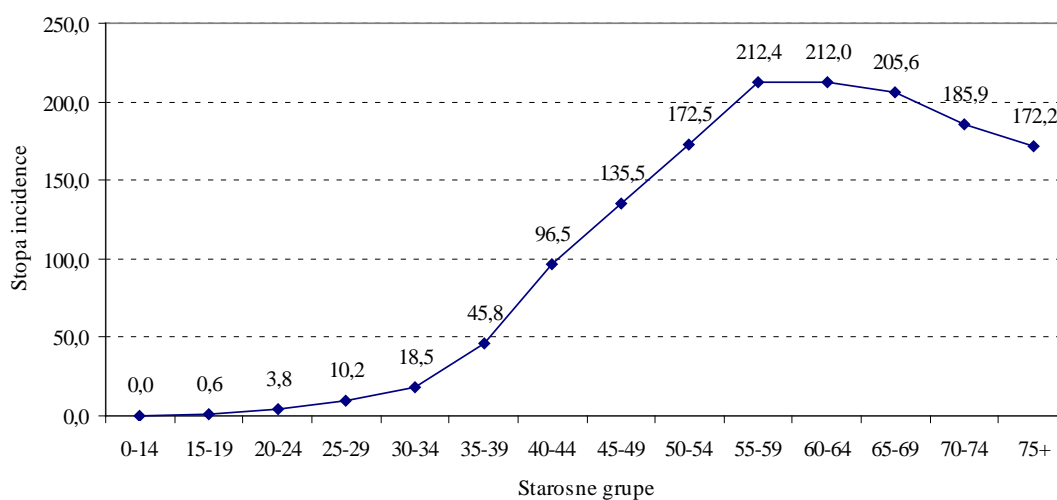


Slika 1. Stope incidence raka dojke kod žena u centralnoj Srbiji i Vojvodini (sirove stope incidence na 100 000 žena, Registar za rak centralne Srbije, 2004. godina)



Slika 2. Stopa mortaliteta vodećih malignih bolesti kod žena u Srbiji (sirova stopa mortaliteta na 100 000 žena, Registar za rak centralne Srbije, 2004. godina)

Učestalost raka dojke počinje naglo da raste nakon 40. godine života (Slika 3). Prema podacima za centralnu Srbiju za 2004. godinu, kod 22% žena je rak dojke dijagnostikovao pre 50. godine starosti.



Slika 3. Uzrasno-specifične stope incidence raka dojke u centralnoj Srbiji (stope incidence na 100,000 žena, Registar za rak centralne Srbije, 2004. godina).

## 1.6. KARCINOM DOJKE KAO SOCIJALNO MEDICINSKI PROBLEM

Dojka je organ pristupačan pregledu. Sam pregled je jednostavan i bezbolan ali pravovremeno javljanje žena obolelih od malignih tumora dojkama lekaru nije zadovoljavajuće. Razlozi za to mogu biti subjektivni i objektivni. Strah od bolesti, smrti, svesno skrivanje bolesti, nivo zdravstvene kulture i vaspitanje kao i podmukli razvoj bolesti u najvećem broju slučajeva (bezbolni tumori), najčešće su uzrok kasnijeg javljanja obolelih lekaru.

Zbog svoje učestalosti i posledica karcinom dojke je veliki socijalno medicinski problem. Pre svega zbog toga što u značajnom broju pogađa žene u rano produktivnom periodu života, tako da pored fizičkih i psiholoških postoje i društveno ekonomske posledice [39].

To su odsustvovanja sa posla, nastanak invalidnosti, cena lečenja kao i prerana smrt obolelih. Iz tog razloga svetska zdravstvena organizacija (WHO) nacionalne programe za dojku različitih zemalja usmerava tako da podstakne pacijente kako bi dijagnostičko terapijski tretman započeo u ranoj fazi bolesti. Uprkos savremenom pristupu o sistemskom karakteru humanog karcinoma dojke, detekcija u ranom stadijumu znači dobru prognozu. U našim uslovima većina bolesnica otkriva tumor u dojci sama, najčešće slučajno.

Iz tog razloga je razumljiva preporuka WHO da je neophodno edukovati žene i ukazati im na bitne simptome kako mogu prepoznati bolest u ranoj fazi. A to su:

- tvrdina u dojci
- otekline
- izrasline
- uvučene bradavice
- ranice
- sukrvica iz bradavice

Nadalje, potrebno je sprovoditi selektivni skrining za žene sa visokim rizikom za oboljenje od karcinoma dojke. Hagenssen je sugerisao još pedesetih godina prošlog veka da je značajnije obučavanje žena za vršenje samopregleda nego edukacija lekara tehnicima pregleda dojki [40].



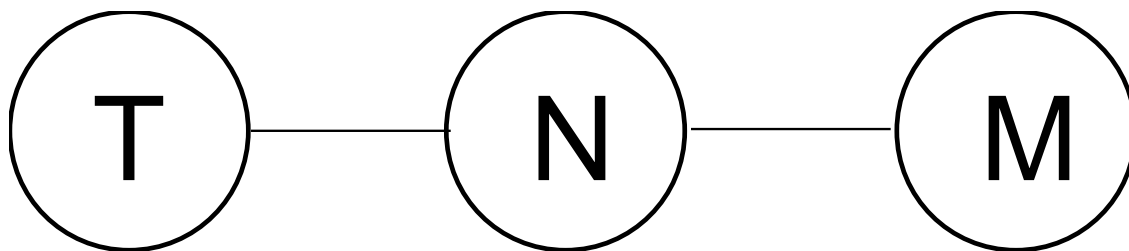
Dosadašnji rezultati nesumnjivo ukazuju da se žene od 40-65 godina starosti, osposobljene za samopregled u većoj meri javljaju lekaru sa nekim od obolenja dojke.

### 1.7. KARCINOM DOJKE KAO SISTEMSKA BOLEST

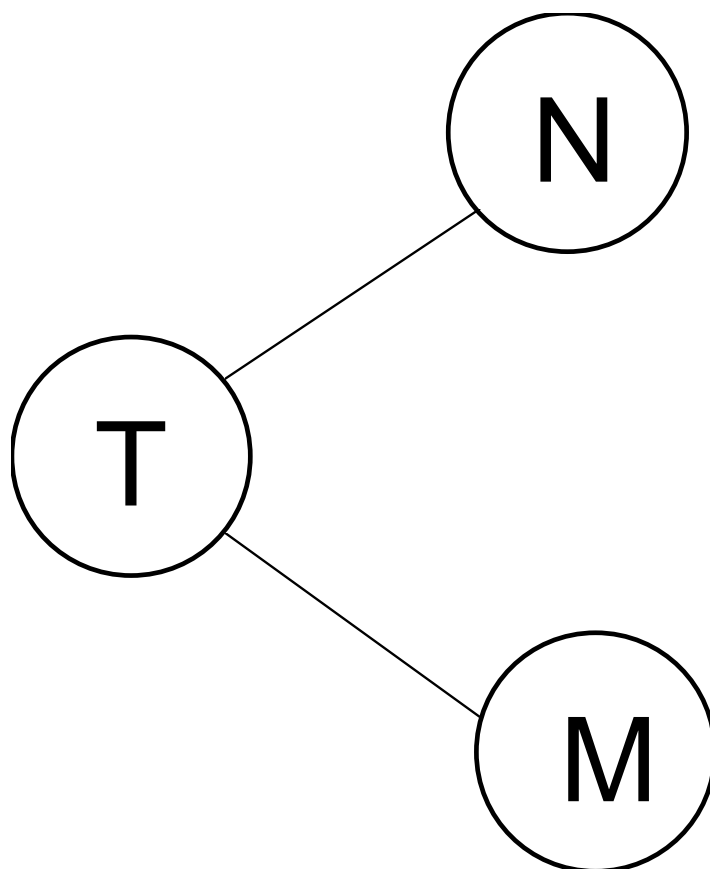
U poslednjih pet decenija promenilo se shvatanje o biologiji i evoluciji karcinoma dojke. Novija saznanja o biologiji malignih tumora u suprotnosti su sa nekadašnjim stavom koji je ukazivao da je maligna bolest postepeni, kaskadni proces, u kome hematogeno rasejavanje malignih ćelija po organizmu nastaje nakon invazije regionalnih limfnih čvorića. Prema savremenim saznanjima karcinom dojke je sistemska bolest, a diseminacija malignih ćelija nastaje u najranijoj fazi razvoja tumora. To znači da zahvatanje regionalnih limfnih žlezda malignim ćelijama već predstavlja manifestaciju opšteg rasejavanja. Ovakva priroda maligne bolesti je najbolje proučena na primeru karcinoma dojke, međutim, sve je više dokaza da se i karcinom jetre, pluća, kolona, kao i maligni melanom ponašaju na isti način.

Mehanička teorija Virhovljevog shvatanja razvoja malignog procesa u tri faze:

T – tumor, N – region, nodusi, M – udaljene metastaze (TNM)



Savremeni pristup:



Karcinom dojke počinje da metastazira u predkliničkoj fazi razvoja. To je period kada je tumor dijagnostički nedostupan. U momentu postavljanja dijagnoze započinje klinička faza razvoja karcinoma dojke, koja traje kraće, u poređenju sa vremenom proteklom od nastanka tumora, do prepoznavanja bolesti [41].

Rasejavanje malignih ćelija iz primarnog tumora odigrava se između desete i dvadesete deobe i to limfogeno, hematogeno i per continuitatem, mada je osnovni put kojim se prenose ćelije do vitalnih organa hematogeni. Maligne ćelije prodiru u krvne sudove direktno unutar tumora ili kroz limfatikovenske kanale limfnih nodusa. Utvrđeno je da tumorska masa do 2mm u dijametri može u dužem periodu da se ishranjuje putem difuzije. Dalji razvoj tumora praćen je urastanjem novoformiranih kapilara u tumorsku masu te ovaj proces neovaskularizacije putem angiogeneze favorizuje rasejavanje malignih ćelija [42,43,44].

Smatra se da limfni nodusi ne predstavljaju mehanički mikrofilter, već su sedište imunološkog nadzora. Kancerske ćelije se mogu zadržati i razvijati unutar njih formirajući sekundarni depozit, da prolaze bez reakcije ili mogu biti uništene. Sistem limfnih sudova i vaskularna mreža čine usko povezani cirkulatorni sistem tako da maligne ćelije višestruko prelaze iz jednog sistema u drugi i formiraju mikrometastatska ognjišta koja se sadašnjim dijagnostičkim metodama ne mogu otkriti.

Evolucija maligne bolesti nije samo posledica agresivnosti i malignog potencijala tumora, već je u sprezi sa otpornošću obolelog domaćina [45,46].

Nezahvaćenost regionalnih – aksilarnih limfnih nodusa metastazama karcinoma dojke je bitan, ali ne i isključivi pokazatelj povoljne prognoze obolelih. Dugoročne kliničke studije ukazuju na veliku smrtnost obolelih od karcinoma dojke sa negativnim limfnim nodusima u aksili nakon 30 i 40 godina od operacije [47].

Adair-ovo 30-godišnje praćenje pokazuje da samo 20% obolelih živi bez znakova bolesti [48]. Ovaj podatak ukazuje da uništavanje malignih ćelija rasejanih u ranoj fazi razvoja karcinoma dojke može poboljšati dugoročno preživljavanje i pokreće pitanje primene sistemske terapije u obolelih sa negativnim aksilarnim statusom: citotoksične hemioterapije, hormonske ili neke druge terapije koja bi povećala imunološki kapacitet obolele osobe.

Avgusta 1981. godine National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) je započeo randomizirani trajal B-13 kod obolelih od karcinoma dojke sa negativnim (histološki) limfnim nodusima u aksili i negativnim ER receptorskim statusom tumora (ER < 10 fmol/mg prot.). Rezultat ovog trajala je sledeći: preživljavanje bez znakova bolesti je značajno duže u bolesnica koje su nakon operacije (mastektomije) primale sistemsku hemoterapiju (Metotrexat i Fluorouracil) [49,50].

Milanski trajal za istu kategoriju bolesnica (negativni nodalni status i negativni ER receptorski status tumora) uvodi i Ciklofosfamid uz Metotrexat i Fluorouracil. Izveštaj ovog trajala ukazuje na duže preživljavanje, ukupno i bez znakova bolesti ovih bolesnica [51].

## 1.8. OPERATIVNI PRISTUP LEČENJU MALIGNIH TUMORA DOJKE

Prve kriterijume operabilnosti karcinoma dojke postavio Haagensen još 1943.godine [40]. Od tada se oni neprekidno menjaju [52].

Protokolom za dijagnostiku i lečenje malignih tumora dojke, predviđeno je operativno lečenje bolesnika sa mobilnim tumorom, bez znakova biološke agresivnosti i bez udaljenih metastaza. Indikaciono područje za primarni hirurški tretman obuhvata tumore klasifikovane prema TNM sistemu kao T1-3N0-1M0. Uslovno inoperabilni tumori klasifikovani su kao T1-4b, N2, M0 bez ili sa znacima biološke agresivnosti. Uz prethodnu biopsiju radi patohistološke verifikacije maligniteta i preoperativnu neoadjuvantnu i/ili zračnu terapiju, mogu se lečiti odgovarajućom hiruškom procedurom.

Operativno lečenje tumora dojke započinje 1868. godine kada Pauer tumorektomijom pokušava da oslobodi žene ove opake bolesti. Krajem devetnaestog veka (1894. god.) Halsted uvodi radikalnu mastektomiju sa disekcijom aksile i ova operacija ostaje do danas prisutna u lečenju malignih tumora dojke.

Primena ove operativne metode zasnivala se na shvatanju da je karcinom dojke u početku lokoregionalni proces, koji se širi striktno limfogeno, najpre u limfne žlezde istostrane aksile. Iz tog razloga se pretpostavljalo da se širokom ekscizijom kože dojke, uklanjanjem tkiva dojke, dezinsercijom velikog i malog grudnog mišića i evakuacijom (disekcijom) limfnih čvorova i masnog tkiva aksile, može postići eradikacija svih malignih ćelija.

Hematogena diseminacija tada nije bila poznata. Prevazilaženjem shvatanja o razvoju maligne bolesti kao postepenom, kaskadnom procesu, sužava se indikaciono područje za primenu Halsted-ove operacije na tumore koji fiksiraju pektoralni mišić.

Manje radikalne, tzv. modifikovane radikalne mastektomije koje se primenjuju, uz eventualnu adjuvantnu terapiju, jesu operacije po Patey-u i po Madden-u.

Operacija po Patey-u obuhvata amputaciju dojke, dezinserciju malog grudnog mišića i blok disekciju limfnih čvorića i masnog tkiva čitave aksile. Manje radikalna je operacija po Madden-u kojom se uklanja dojka, donja i srednji sprat aksile. Fisher i Veronesi 1976. godine započinju nezavisno, randomizirane trajale čiji nalazi dovode do promene u radikalnosti hiruškog pristupa u lečenju malignih tumora dojke. Naime, trajal

NSABP i trajal Nacionalnog kancer instituta – Milano, pokazali su da se tumori dijametra do 2 cm, sa klinički negativnim (neopipljivim) nodusima u aksili, mogu lečiti segmentnom resekcijom dojke i disekcijom aksile uz primenu postoperativne zračne terapije, kao i adjuvantne hemio i/ili hormono terapije shodno definitivnom histopatološkom nalazu. Kako nije utvrđena statistički značajna razlika u preživljavanju u odnosu na radikalnu mastektomiju, Unija za Međunarodnu Kontrolu Raka (UICC) prihvata i promoviše stav da se tumori klasifikovani kao T1 N0 M0, mogu lečiti kvadrantektomijom uz disekciju aksile i primenu postoperativne zračne terapije i/ili adjuvantne hemio i hormono terapije [53,54,55].

Trend u konzervativnom odnosno poštednom lečenju karcinoma dojke, malog dijametra, niskog histološkog i nuklearnog gradusa, ide u pravcu lampektomije. Tom prilikom se uklanja segment dojke sa tumorom.

U poslednjih 20 godina poštedne operacije su od slobodnih ivica resekcije tumora, koje su se u početku kretale od 2 do 5 cm, promenile, tako da je danas adekvatna tumorektomija ona kod koje su ivice resekcije slobodne a da su pri tome u samom hiruškom radu te distance svedene na 1 do 2 mm [56,57] .

Takođe je i obim disekcije istostrane pazušne jame sveden na minimum uvođenjem sentil provere i odstranjivanjem samo pozitivnih stražarskih limfnih nodusa [34,58,59,60,61,62,63].

Ovo napredovanje se i dalje nastavlja uz prateće novine hemio, hormono i zračne terapije.

## **2. CILJEVI RADA**

### **2.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

2.1.1. Određivanje ekspresije HER-2 receptora u primarnom tumoru bolesnica sa inicijalno operabilnim karcinomom dojke kliničkog stadijuma I i IIA i IIB.

2.1.2. Ispitivanje povezanosti HER-2 statusa u primarnom tumoru sa:

- a.** kliničkim stadijumom regionalnih limfnih čvorova u aksili prema TNM klasifikaciji (N0 i N1);
- b.** patološkim stadijumom regionalnih limfnih čvorova u aksili prema pTNM klasifikaciji (pN0, pN1, pN2) i brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova u aksili u slučaju patološkog pN stadijuma;
- c.** lokalizacijom primarnog tumora u odnosu na kvadrante dojke (lateralna, medijana i centralna);
- d.** veličinom primarnog tumora prema TNM i pTNM klasifikaciji (T1-T3; pT1-pT3).
- e.** vrednostima histološkog i nuklearnog gradusa tumora

2.1.3. Analiza povezanosti sledećih faktora rizika:

- a.** pozitivna vs negativna porodična i lična anamneza
- b.** starosti bolesnica pri postavljanju inicijalne dijagnoze ( $\leq 45$  vs  $> 45$ );
- c.** menstrualnog statusa bolesnica (premenopauzne vs postmenopauzne);
- d.** ekspresije/amplifikacije HER-2 u primarnom tumoru potvrđena CISH analizom;
- e.** statusom estrogenskih receptora u primarnom tumoru (Er scor  $\leq 3$  vs Er scor  $> 3$ );
- f.** statusom progesteronskih receptora u primarnom tumoru (Pgr scor  $\leq 3$  vs Pgr scor  $> 3$ );
- g.** vrednostima histološkog i nuklearnog gradusa tumora;
- h.** kliničkog statusa regionalnih limfnih čvorova u aksili (N0 vs N1);
- i.** patološkog statusa regionalnih limfnih čvorova (pN0 vs pN1-2);
- j.** brojem zahvaćenih regionalnih limfnih čvorova u aksili kod lateralne, medijalne i centralne lokalizacije primarnog tumora ( $\geq 4$  vs  $< 4$ );

## 2.2. RADNA HIPOTEZA

Naša radna hipoteza polazi od pretpostavke da postoji korelacija između overekspresije HER-2 onkoproteina u primarnom tumoru i metastatski zahvaćenih regionalnih limfnih nodusa u istostranoj aksili, kod bolesnica sa inicijalno operabilnim karcinomom dojke, uzimajući u obzir lokalizaciju primarnog tumora (lateralni, medijalni, centralni kvadrant dojke) i broj zahvaćenih pozitivnih regionalnih limfnih nodusa u aksili.

Kod medijalne i centralne lokalizacije primarnog tumora u dojci nepovoljan faktor prognoze je zahvaćenost jednog ili više limfnih čvorova, a kod lokalizacije u lateralnim kvadrantima pozitivan nalaz u najmanje četiri od deset ili više limfnih čvorova.

Dalje smo pretpostavili da postoji zavisnost između amplifikacije HER-2 onkoproteina i veličine primarnog tumora u dojci (T1-T3 i pT1-pT3), patohistološkog nalaza tipa tumora, histološkog i nuklearnog gradusa tumora, i kliničkog i patološkog stadijuma bolesti (klinički stadijum I vs II, patološki stadijum I vs II).

S obzirom da je overekspresija HER-2 onkoproteina faktor nepovoljne prognoze, takođe smo pretpostavili da postoji korelacija sa drugim faktorima nepovoljne prognoze u ličnoj anamezi (rana menarha, kasna menopauza, bez trudnoće i porođaja, starosno doba, hormonska nezavisnost karcinoma dojke, benigne bolesti dojke, prethodna endokrina terapija) i porodičnoj anamnezi (karcinom dojke, ovarijuma i ostali karcinomi u prvoj i drugoj liniji srodstva).

### 3. MATERIJAL I METODOLOGIJA

#### 3.1. MATERIJAL

Naše naučno istraživanje je eksperimentalno-klinička studija sprovedena u Institutu za onkologiju i radiologiju u Beogradu (IORS), u periodu od 2006 do 2009. godine, u koju su bile uključene 346 bolesnice sa inicijalno operabilnim karcinomom dojke. Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili:

1. patološki dokazan karcinom dojke,
2. klinički stadijum I i II,
3. ženski pol,
4. starosna dob (od 24 do 84 godina starosti),
5. bez prethodne maligne bolesti u ličnoj anamnezi.

Kod svih bolesnica je, osim inicijalnog određivanja HER-2 statusa IHH metodom, rađena i dopunska provera CISH metodom, a čiji su nalazi uzimani kao definitivni. Obrađivani su svi podaci. U daljoj analizi evaluirani su podaci za duktalni invazivni (DC) i lobularni invazivni karcinom (LC), dok pacijentkinje sa mešovitim, in situ ili drugim tipovima karcinoma dojke, nisu uzimane u obradu.

Za donošenje konzilijarne odluke u preoperativnoj pripremi uz klinički pregled rađeni su mamografija, ehosonografija dojki i abdomena, nativni Rtg pluća i osnovne laboratorijske analize sa biohemijom. U pojedinim slučajevima, a zbog nalaza prethodnih analiza, rađene su i dodatne analize poput MRI dojki, scintigrafija skeleta, Rtg koštanog sistema i određivanje Tu markera CEA i CA 15-3 [64].

Medicinska dokumentacija je u formi istorije bolesti u kojoj su sadržani podaci potrebni za statističke analize rezultata: a. pozitivna vs negativna porodična i lična anamneza; b. starost; c. menstrualni status bolesnica; d. klinički i patološki stadijum regionalnih limfnih nodusa iz disektata istostrane aksile; e. lokalizacija primarnog tumora u odnosu na kvadrante dojke; f. veličina primarnog tumora; g. histološki i nuklearni gradus tumora; h. status steroidnih receptora određenih patološki imunohistohemijskom metodom (IHH); i. HER-2 status iz primarnog tumora će se inicijalno određivati IHH metodom a potvrđivati i uzimati kao definitivni rezultat dobijen korišćenjem CISH metode.



### 3.2. METODOLOGIJA HER-2 TESTIRANJA

Osnovne metode testiranja koje se koriste za određivanje HER2 statusa jesu: 1. imunohistohemijska (IHH), za povećanu membransku ekspresiju i 2. in situ hibridizacija (ISH), korišćenjem bilo fluorescencije (FISH) ili hromogena (CISH), kojima se određuje genska amplifikacija. Važnost ranog testiranja je u tome da se HER2 pozitivnost razvija u ranom stadijumu kancerogeneze, kao i da HER2 status primarnog tumora korelira sa metastatskim žarištima [13].

Imunohistohemija je primarna metoda utvrđivanja HER2 statusa kojom se, primenom anti-HER2 antitela, u svrhu terapijskog tretmana, odvajaju jasno pozitivni (skor 3+) od negativnih (skor 0/1+) slučajeva i, takođe, vrši trijaža graničnih (skor 2+) slučajeva koji zahtevaju dalje ispitivanje FISH ili CISH tehnikom, kako bi se utvrdilo da li pokazuju gensku amplifikaciju.

Godine 1969 Gall i Pardue su predstavili stručnoj javnosti tehniku poznatu kao in situ hibridizacija (ISH), kojom je omogućeno lokalizovanje nukleinskih kiselina u pojedinačnim ćelijama [65].

Ova metoda se do danas razvila u standardno primenjivu fluorescentnu in situ hibridizaciju (FISH) koja koristi fluorohrom-konjugovane nucleotide, i sve šire korišćenu hromogenu in situ hibridizaciju (CISH) [13, 66,67,68,69].

Alternativna metoda FISH tehnici za utvrđivanje broja kopija HER2 gena i njihove moguće polizomije, jeste CISH metoda koja koristi hromogeni metod detekcije [70,71,72,73,74,75,76].

Za razliku od već potvrđene FISH metode u kojoj se koriste dve boje, CISH se bazira na kolorimetrijskoj detekciji samo jedne probe. Nakon detaljne i pažljive optimizacije metode, kao tačka koja označava graničnu vrednost za definisanje HER2 amplifikacije prihvaćeno je šest ili više kopija. Tipična genska amplifikacija CISH predstavlja peroksidaza-pozitivne grupe (klastere) multiplih kopija gena, koji se lako identifikuju na mikroskopu sa 40 puta objektivskim povećanjem.

U slučajeve sa visokom amplifikacijom gena ubrajaju se oni sa deset i više kopija po ćeliji, u više od 50% tumorskih ćelija. Slabom amplifikacijom smatraju se oni sa 6-9 kopija po ćeliji u više od 50% tumorskih ćelija. Bez amplifikacije su oni sa 1-5 kopija po ćeliji u više od 50% tumorskih ćelija.

Kao najveća prednost CISH metode smatra se to što se rezultati mogu očitavati na standardnom svetlosnom mikroskopu, bez upotrebe objektiva sa uljnom imerzijom. FISH metoda, sa druge strane, zahteva skupi fluorescentni mikroskop snabdeven sistemom za snimanje slike. Takođe, FISH pločice se teško mogu arhivirati, dok je čuvanje CISH pločica jednostavno izvodljivo [77].

### 3.3. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA STEROIDNIH RECEPTORA

Za određivanje statusa steroidnih receptora ER i PR u primarnom tumoru korišćena je IHH metoda monoklonskim antitelima. Dobijene vrednosti su interpretirane prema scoring sistemu 0-8. Skor 4 je granična vrednost. Za skor 3 i manje tumorski receptori se smatraju negativnim a skor 4 i više pozitivnim.

### 3.4. METODOLOGIJA ODREĐIVANJA HISTOLOŠKOG I NUKLEARNOG GRADUSA

Interpretacija vrednosti histološkog i nuklearnog gradusa se izražava u 3 kategorije (gradusa). Za ocenjivanje se koriste arhitektura tumorskog tkiva, oblik i veličina ćelija i jedra, tip i raspored hromatina i broj uočenih mitoz. Gradus I izražava dobru diferentovanost, gradus II umerenu a gradus III slabu diferentovanost.

### 3.5. STATISTIČKA OBRADA I TEKSTOVI

Statistička metodologija je obuhvatala:

- ispitivanje saglasnosti uzoračkih raspodela sa normalnom raspodelom (grafici: Normal Q-Q Plot i Histogram; testovi: Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk)
- opis parametara od značaja pomoću mera deskriptivne statistike (frekvencije, procenti, srednja vrednost (prosek), medijana, standardna devijacija (SD) i opseg).

- testiranje razlika između ispitivanih parametara, pomoću testova: Pearson  $\chi^2$  test; Fisher exact test i Wilcoxon rank sum test with continuity correction.
- Za nivo statističke značajnosti usvojena je vrednost  $p=0.05$
- Analiza podataka je rađena u statističkom programu R version 2.8.1 (2008-12-22) Copyright (C) 2008 The R Foundation for Statistical Computing; ISBN 3-900051-07-0.
- Za grafički prikaz podataka korišćen je Microsoft Office Excel 2007.

## 4. REZULTATI

### 4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE BOLESNICA, OBOLJENJA I LEČENJA

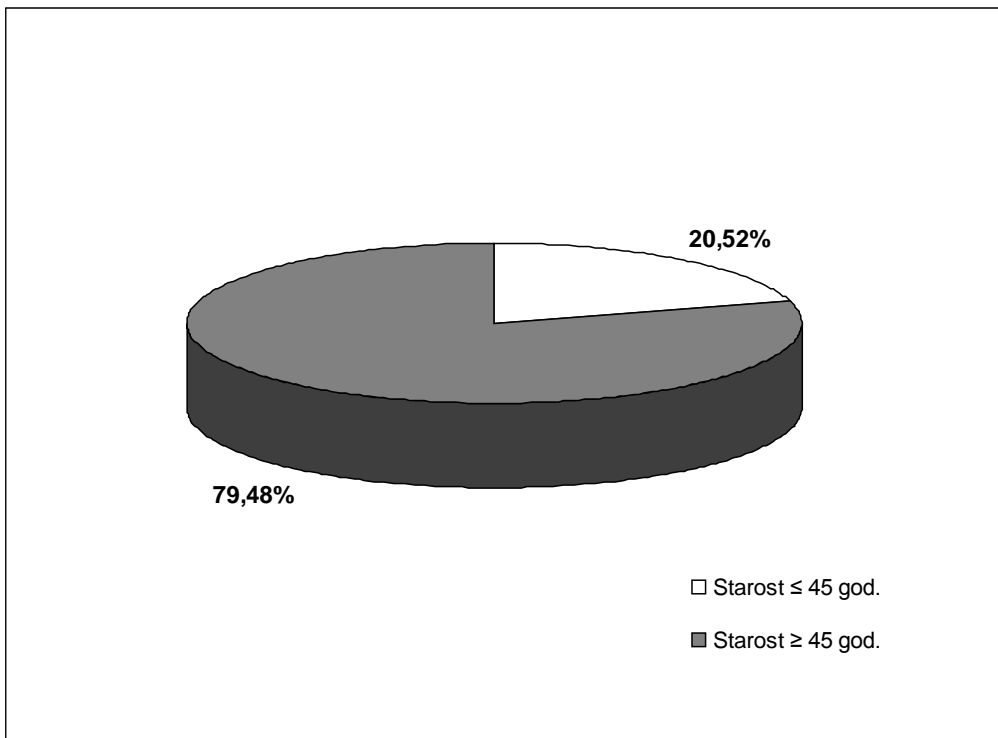
#### 4.1.1. Karakteristike bolesnica

U analizu je uključeno ukupno 346 bolesnica. Starosna dob je određivana u vreme postavljanja dijagnoze i početka inicijalnog lečenja. Srednja vrednost (SD) je 56,23 (12.63%). Medijana starosti je 56 godina sa rasponom od 24-84 godina. Granična vrednost za analizu je starost do 45 godina i 45 i više godina. Menstrualni status je određivan kao premenopauzne, perimenopauzne i postmenopauzne bolesnice. Pozitivna porodična anamneza za sve malignitete je nađena kod 93 bolesnice (26,88%), a za maligne bolesti dojke kod 29 bolesnica (8,38%). Osnovne karakteristike bolesnica prikazane su u tabeli 1 i na grafikonima 1, 2 i 3.

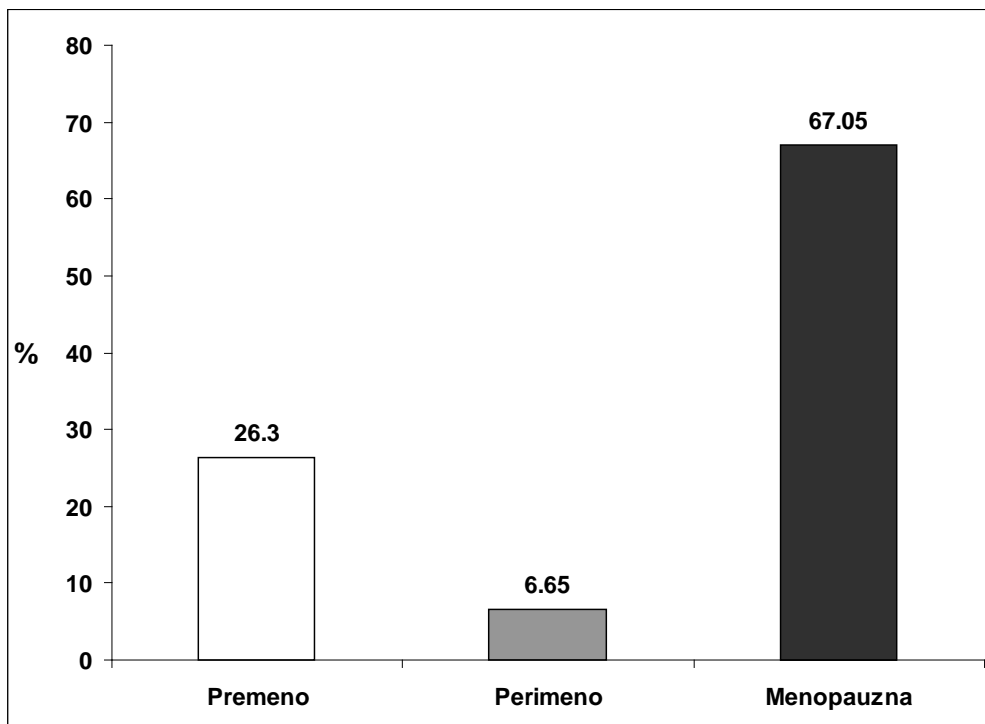
*Tabela 1 – Opšte karakteristike bolesnica*

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Ukupno bolesnica</i></b>	346 (100%)
<b><i>Starost (godine)</i></b>	
Srednja vrednost (SD)	56.23 (12.63)
Medijana (opseg)	56 (24-84)
<b><i>Starost – kategorije</i></b>	
od ≤45	71 (20.52%)
od >45	275 (79.48%)
<b><i>Menostatus</i></b>	
Premeno	91 (26.3%)
Perimeno	23 (6.65%)
Menopauza	232 (67.05%)
<b><i>Porodična anamneza</i></b>	
Ne	198 (57.23%)
Da	93 (26.88%)
Bez podataka	55 (15.9%)
<b><i>Porodična anamneza –dojka</i></b>	
Dojka	29 (8.38%)
Drugo	64 (18.5%)
Bez podataka	253 (73.12%)

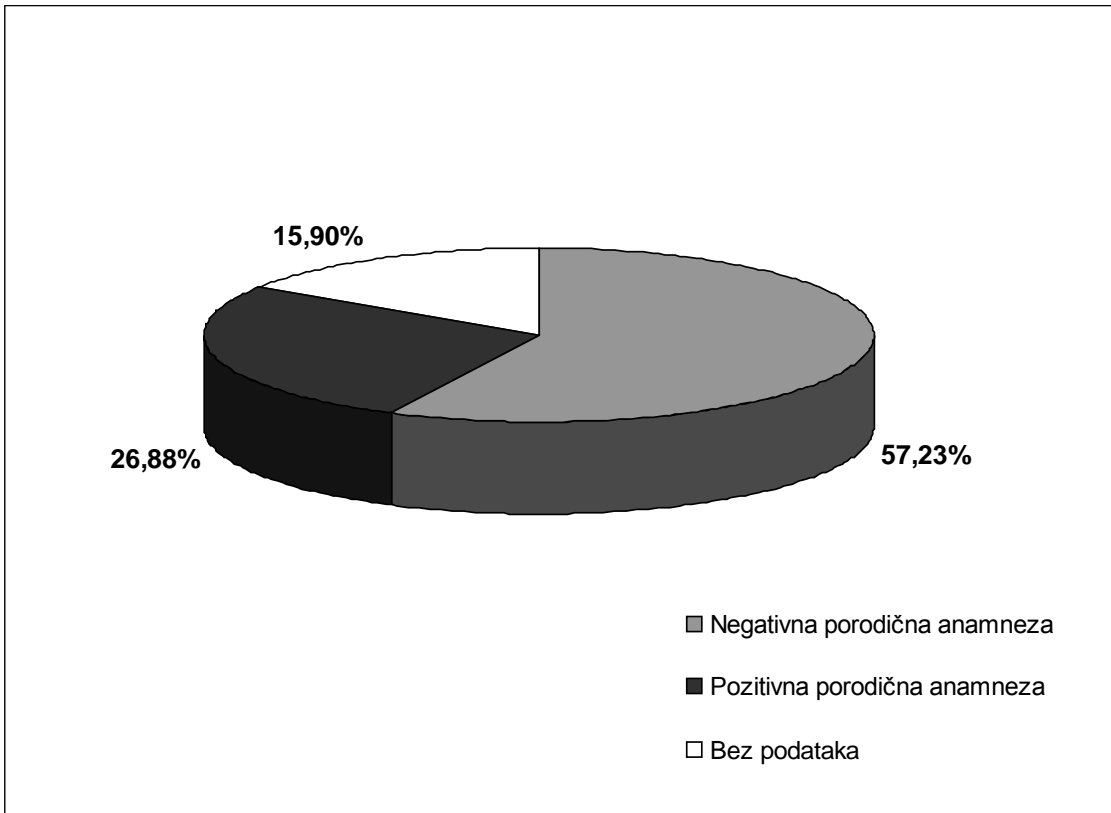
Kao što je prikazano u tabeli 1, bolesnice su uglavnom starosti preko 45 godina, prosečna starost iznosi 56 godina (grafikon 1), u najvećem broju menopauzne (grafikon 2) i bez pozitivne porodične anamneze (grafikon 3).



Grafikon 1. Starost bolesnica



Grafikon 2. Menstrualni status bolesnica



Grafikon 3. Porodična anamneza bolesnica

#### 4.1.2. Kliničke karakteristike oboljenja

U studiju su uključene bolesnice sa kliničkom veličinom tumora kategorija T1 (0-2cm), T2 (2-5cm) i T3 (preko 5cm), kao i sa kategorijama limfnih nodusa N0 (nepalpabilni) i N1 (palpabilni limfni nodusi) u istostranoj aksili. Sve bolesnice su bile bez verifikovanih metastaza - M0.

Klinički stadijum bolesti je obuhvatao kategorije: klinički stadijum I (T1N0M0), klinički stadijum IIA (T0N1M0 ili T1N1M0 ili T2N0M0) i klinički stadijum IIB (T2N1M0 ili T3N0M0), dok je lokalizacija tumora (određivana u odnosu na kvadrant dojke) bila centralna, lateralna ili medijalna. Za nepalpabilne tumore, lokalizacija je kategorisana kao nepoznata.

Osnovne kliničke karakteristike oboljenja su prikazane u tabeli 2 i na grafikonima 4, 5, 6 i 7.

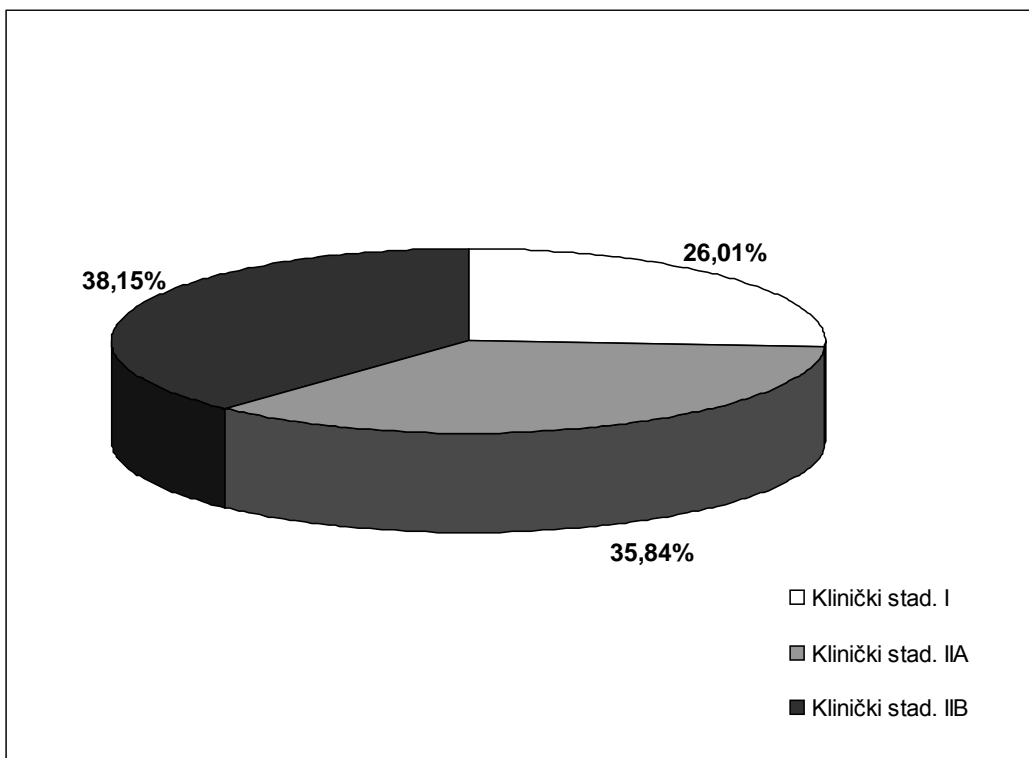
Tabela 2 – Kliničke karakteristike oboljenja

Karakteristike	N (%)
<b>Klinički stadijum bolesti</b>	
I (T1N0)	90 (26.01%)
IIA (T0N1 ili T1N1 ili T2N0 )	124 (35.84%)
IIB (T2N1 ili T3N0)	132 (38.15%)
<b>Klinički stadijum bolesti – kategorije</b>	
I	90 (26.01%)
IIA	124 (35.84%)
IIB	132 (38.15%)
<b>T u TNM klasifikaciji</b>	
T0	6 (1.73%)
T1	128 (36.99%)
T2	193 (55.78%)
T3	19 (5.49%)
<b>N u TNM klasifikaciji</b>	
N0	189 (54.62%)
N1	157 (45.38%)
<b>Lokalizacija tumora – kvadrant dojke</b>	
Centralni kvadrant	33 (9.54%)
Lateralni	244 (70.52%)
Medijalni	58 (16.76%)
Nepoznato (nepalpabilni)	11 (3.18%)

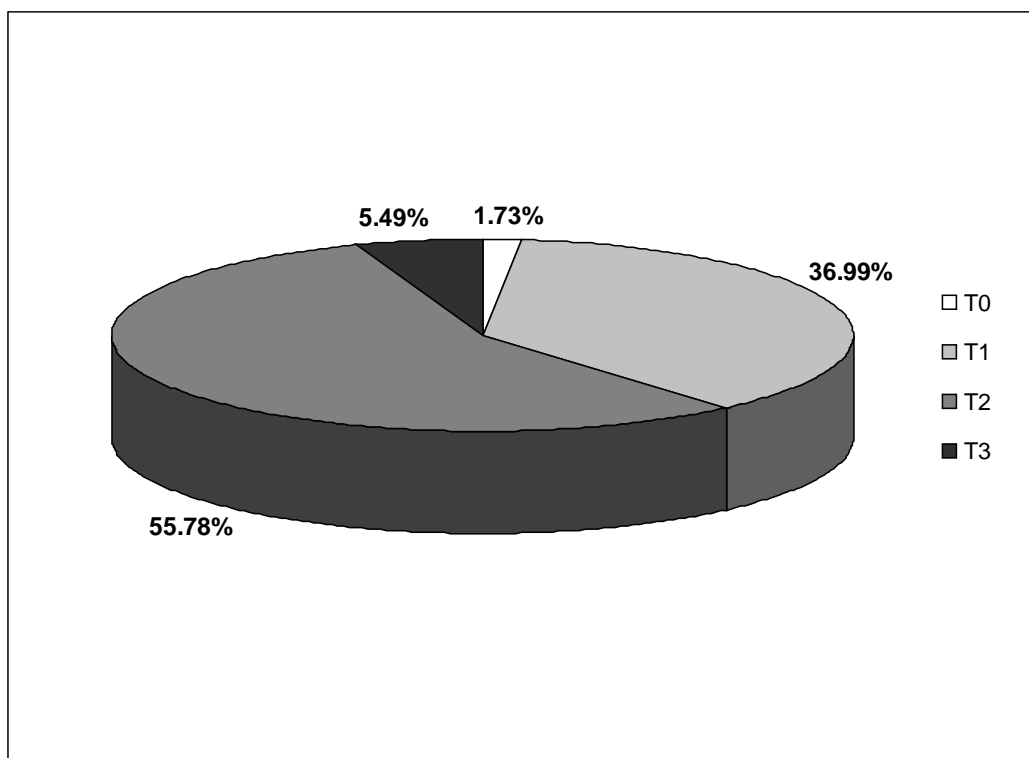
Kao što se vidi iz tabele 2, klinički stadijumi IIA i IIB su slične učestalosti, dok je najmanje zastupljen bio klinički stadijum I (grafikon 4).

U TNM klasifikaciji, najučestalija veličina tumora je bila T2 (grafikon 5), dok su u nodalnom statusu N0 i N1 vrednosti bile slične učestalosti (grafikon 6).

Prema položaju lateralna lokalizacija tumora je bila najfrekventnija (grafikon 7).

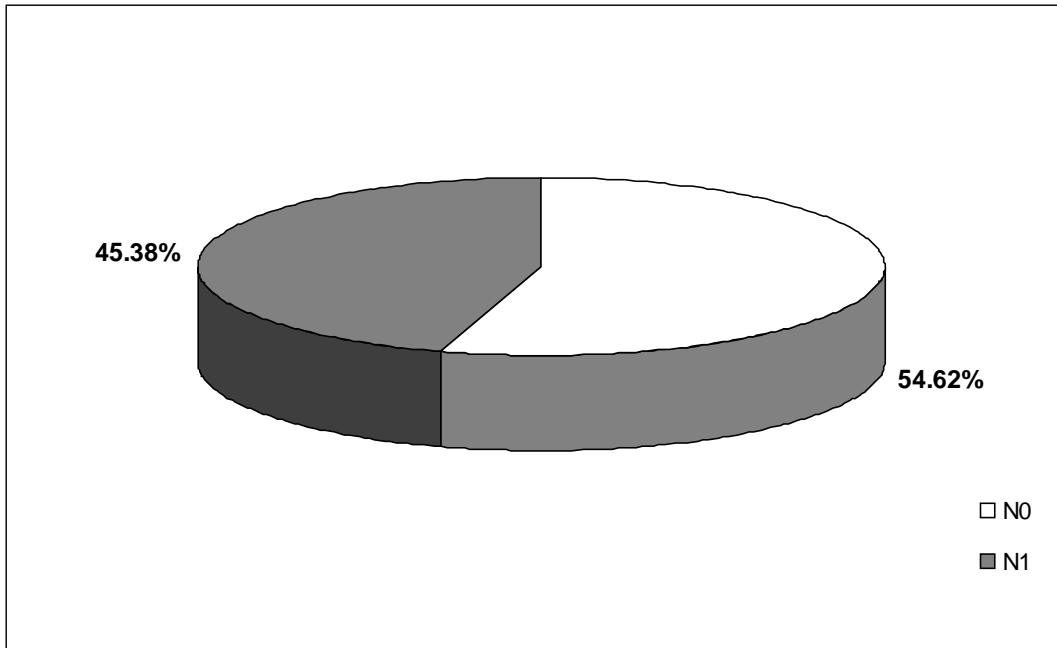


Grafikon 4. Klinički stadijum bolesti – kategorije

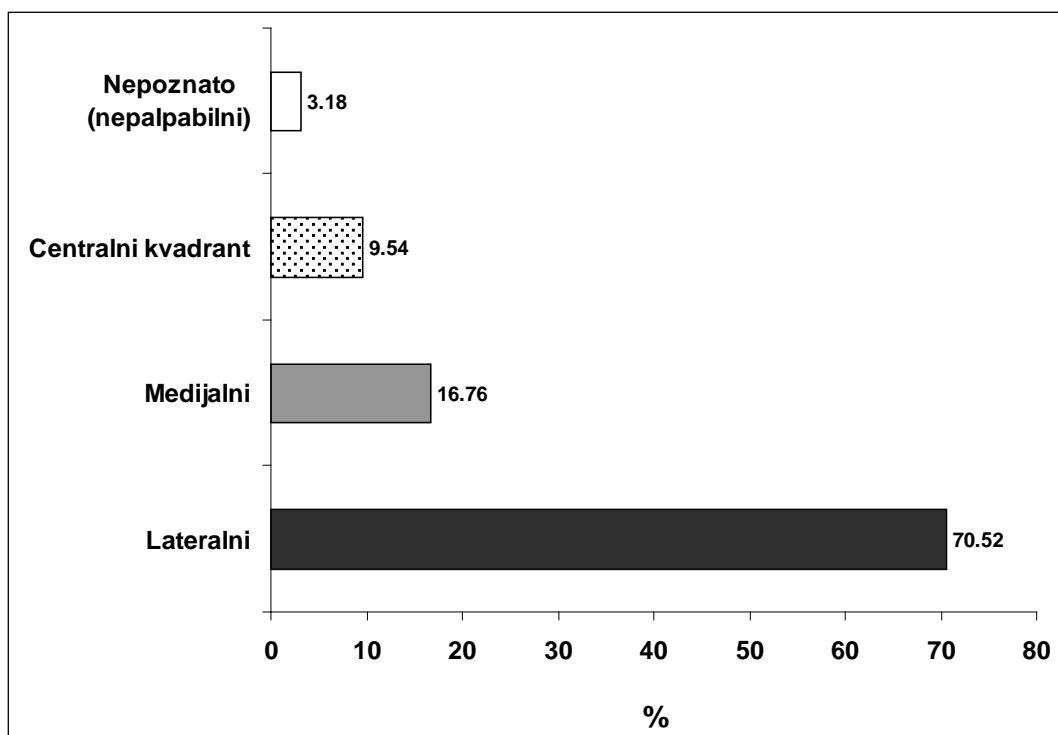


Grafikon 5. T u TNM klasifikaciji





Grafikon 6. N u TNM klasifikaciji



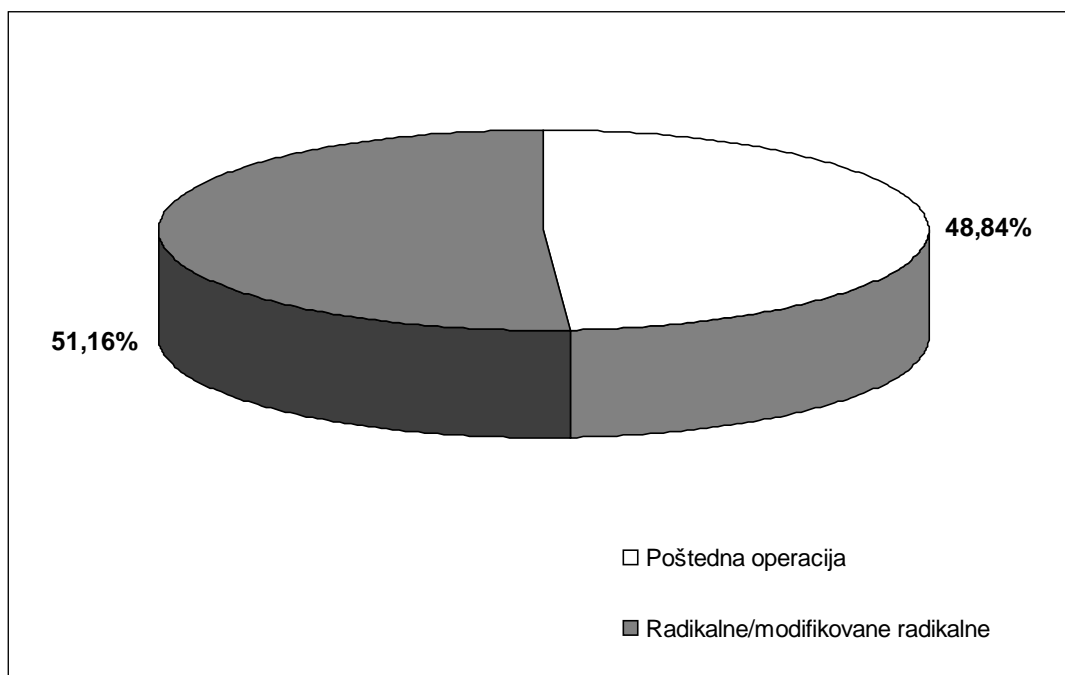
Grafikon 7. Lokalizacija tumora – kvadrant dojke

#### 4.1.3. Karakteristike hirurškog lečenja

Sprovedeno operativno lečenje je svrstano u dve osnovne kategorije. Poštedne operacije i modifikovane radikalne operacije. Njihova učestalost je prikazana u tabeli 3 i grafikonu 8.

Tabela 3 – Karakteristika hirurškog lečenja

Karakteristike	N (%)
<b>Tip hirurške intervencije</b>	
Poštedna operacija	169 (48.84%)
Radikalne/modifikovane radikalne	177 (51.16%)



Grafikon 8. Tip hirurške intervencije

#### 4.1.4. Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa

U definitivnom histopatološkom nalazu, određeni su tipovi tumora kao: duktalni invazivni, lobularni invazivni, mešani duktalno-lobularni karcinomi i ostali tipovi tumora (svi drugi tipovi).

Od strane patologa određivana je veličina tumora pT čije su kategorije bile: pT1 - tumori veličine do 2cm, pT2 - tumori veličine od 2 do 5cm i pT3- tumori veličine više od 5cm, dok su bez podataka kategorisane one bolesnice kod kojih patolog nije mogao da odredi veličinu karcinoma.

Histološki i nuklearni gradusi su obeležavani na isti način: 0 - kada se gradus nije mogao odrediti, 1 - najveći stepen diferencijacije, 2 - srednji stepen, 3 - najmanji stepen diferencijacije.

Nodalni status određivan od strane patologa prikazan je kroz ukupan broj odstranjenih limfnih nodusa istostrane aksile, bez metastaza i sa metastazama.

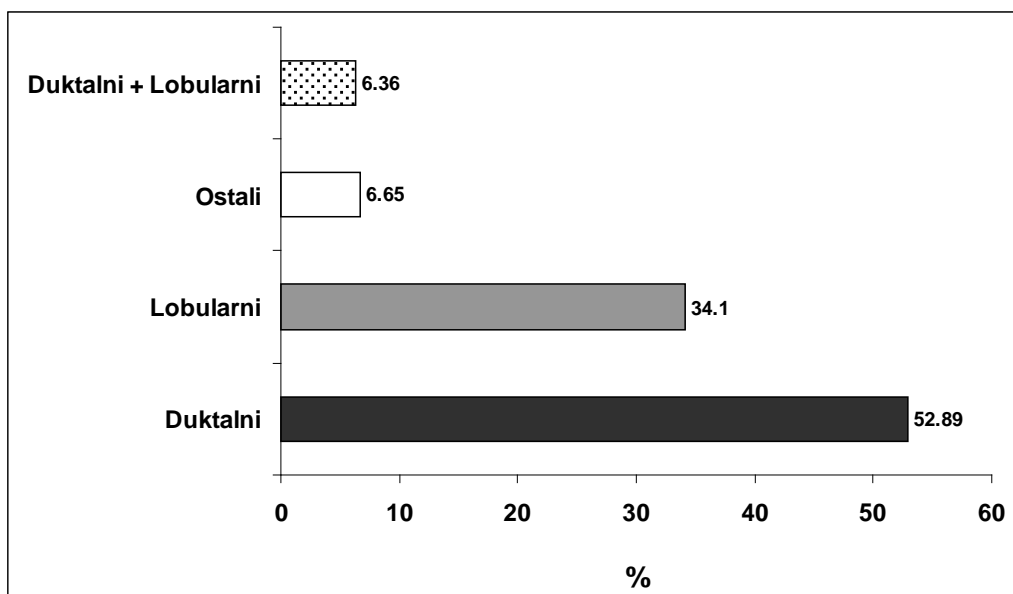
Za određivanje postoperativnog stadijuma bolesti korišćen je pT, pN sistem stadiranja u okviru patološke TNM klasifikacije.

Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 4 i na grafikonima 9, 10, 11, 12, 13 i 14.

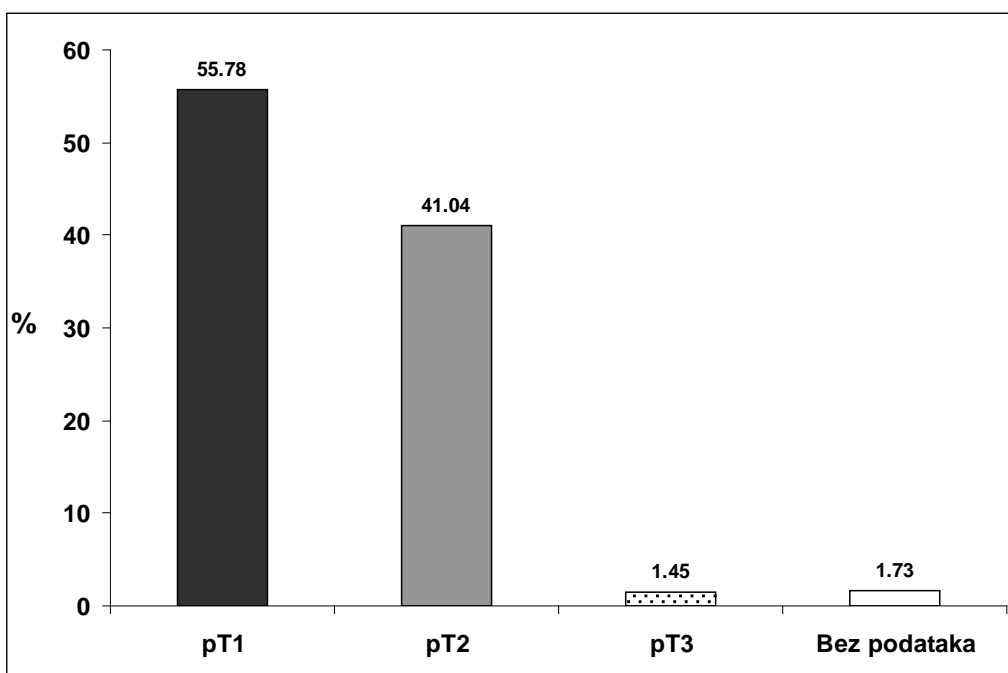
*Tabela 4 – Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa*

<b>Patohistološke karakteristike</b>	<b>N (%)</b>	<b>Patohistološke karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b>Tip tumora</b>		<b>Patološki N u celoj grupi pacijenata</b>	
Duktalni	183 (52.89%)	Bez zahvaćenih nodusa	171 (49.42%)
Lobularni	118 (34.10%)	Sa zahvaćenim nodusima	149 (43.06%)
Ostali	23 (6.65%)	Nema podataka	26 (7.51%)
Duktalni + lobularni	22 (6.36%)		
<b>pT tumora</b>		<b>Lgl ekstirpirane</b>	
pT1	193 (55.78%)	Srednja vrednost (SD)	16.03 (5.41)
pT2	142 (41.04%)	Medijana (Opseg)	15 (1-43)
pT3	5 (1.45%)	Bez podataka	26
Bez podataka	6 (1.73%)		
<b>Histološki gradus</b>		<b>Lgl pozitivne</b>	
1	16 (5.32%)	Srednja vrednost (SD)	1.94 (3.63)
2	262 (87.04%)	Medijana (Opseg)	0 (0-31)
3	11 (3.99%)	Bez podataka	26
Bez podataka	12 (4.62%)		
<b>Nuklearni gradus</b>		<b>Postoperativni stadijum</b>	
1	26 (8.64%)	I	115 (33.24%)
2	242 (80.4%)	IIA	117 (33.82%)
3	27 (8.97%)	IIB	82 (23.70%)
Bez podataka	6 (1.99%)	Bez podataka	32 (9.25%)

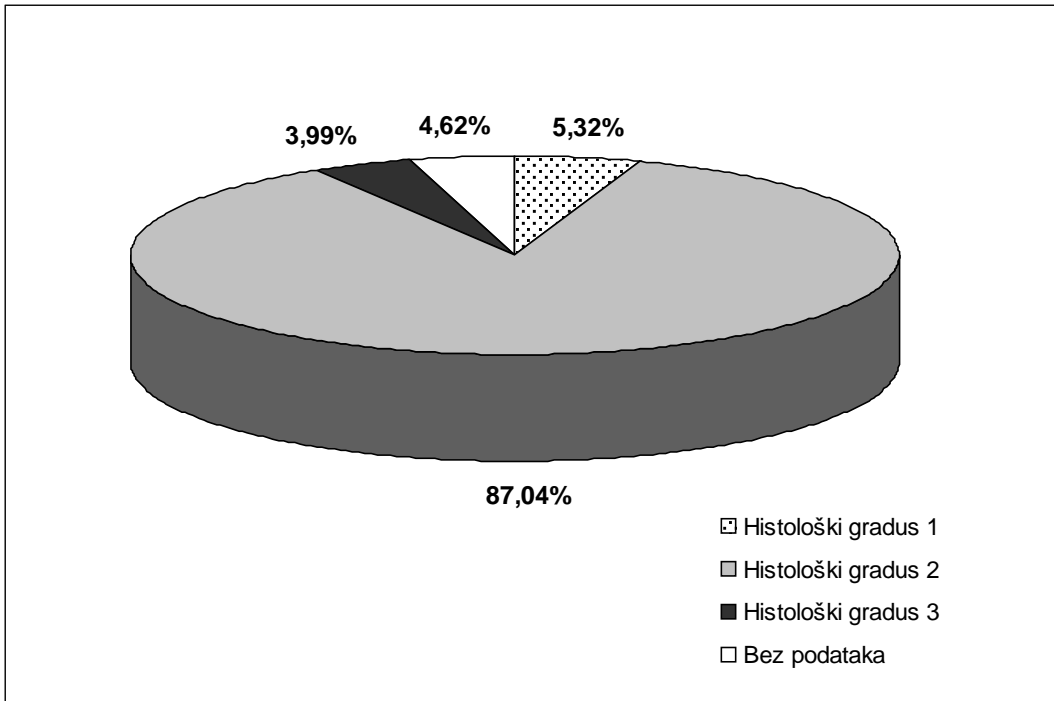
Kao što se vidi iz tabele 4, najučestaliji je duktalni tip tumora (grafikon 9), patohistološka pT1 pa pT2 kategorija (grafikon 10), dok je najučestaliji histološki gradus 2 (grafikon 11), i nuklearni gradus 2 (grafikon 12). Slična je učestalost patološki zahvaćenih i nezahvaćenih limfnih nodusa (grafikon 13), dok su postoperativni stadijumi I i IIA slične frekventnosti (grafikon 14).



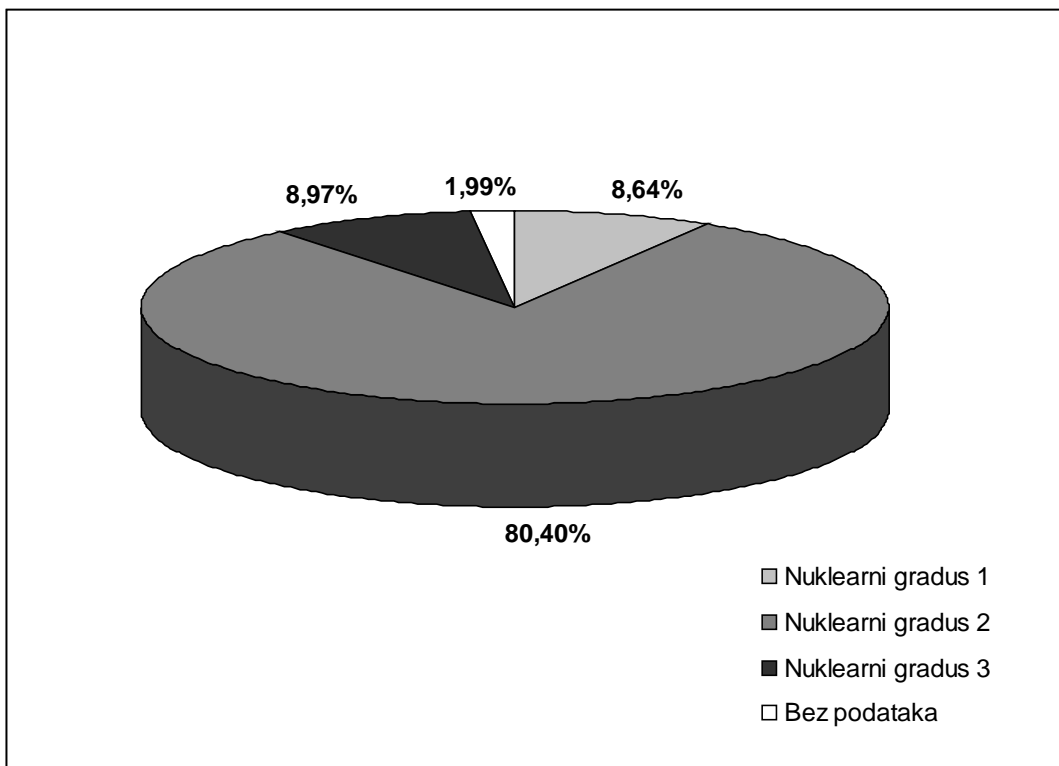
Grafikon 9. Patohistološke karakteristike – Tip tumora



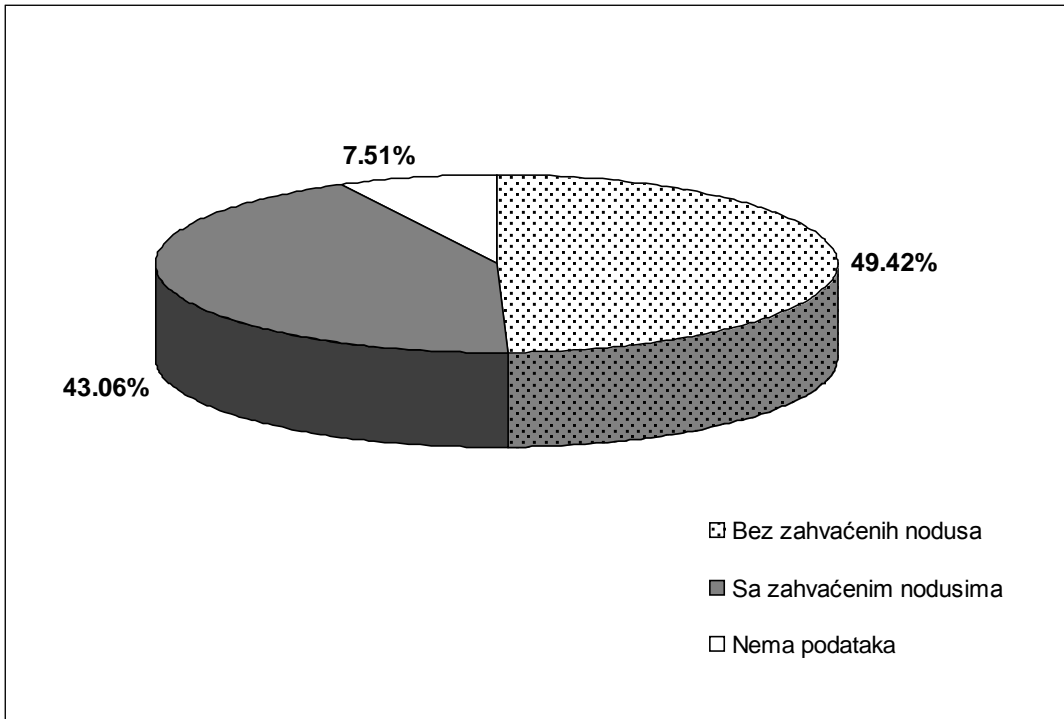
Grafikon 10. Patohistološke karakteristike – pT tumora



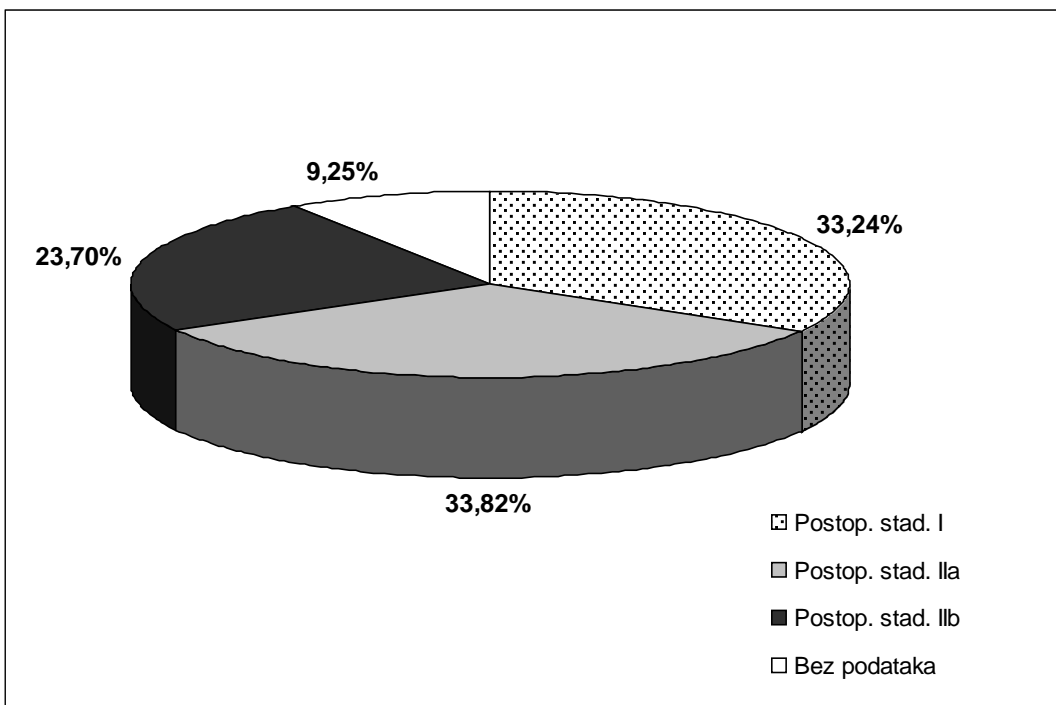
Grafikon 11. Patohistološke karakteristike – Histološki gradus tumora



Grafikon 12. Patohistološke karakteristike – Nuklearni gradus tumora



Grafikon 13. Patohistološke karakteristike – Patološki N



Grafikon 14. Patohistološke karakteristike – Postoperativni stadijum

#### 4.1.5. Status steroidnih receptora i HER-2 status određen IHH i CISH metodom

Estrogenski i progesteronski receptori određivani su IHH metodom i njihove kategorije su bile: ER+ tj. PR+ (skor 4 i više), odnosno ER- tj. PR- (skor 3 i manje).

Istom (IHH) metodom, kao početni nalaz, određivana je i HER-2 ekspresija, odnosno njene kategorije: 1+ (negativna), 2+ (granična) i 3+ (pozitivna).

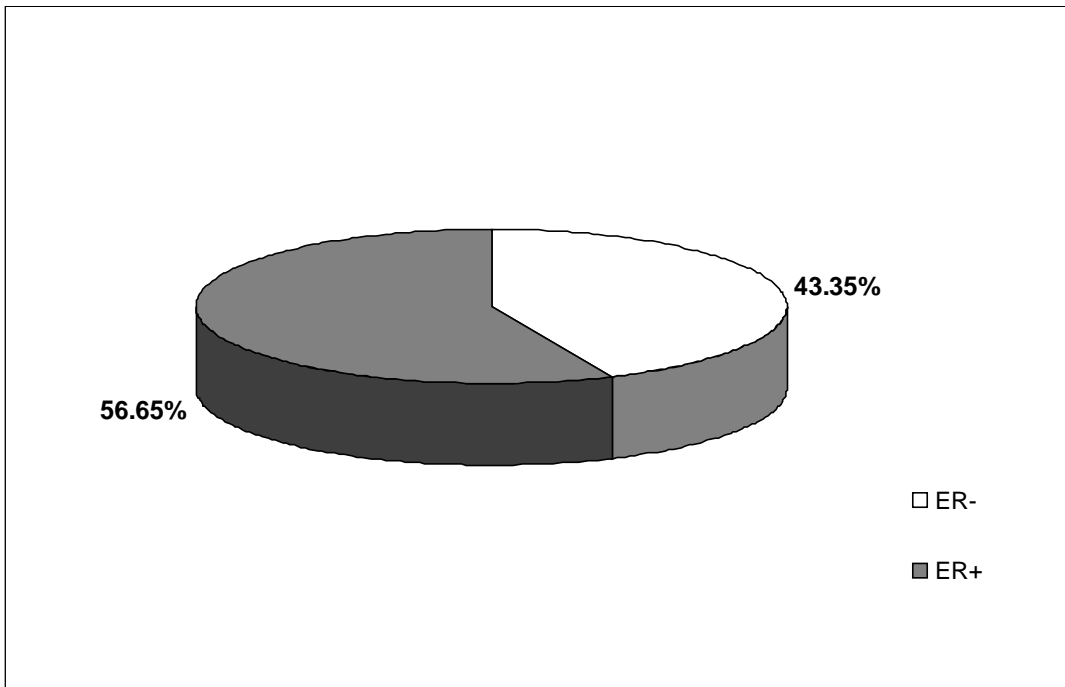
Definitivni nalaz HER-2 statusa odredivan je CISH metodom, a dobijene kategorije su bile: CISH- (bez amplifikacije) i CISH+ (sa amplifikacijom).

Karakteristike steroidnih receptora prikazane su u tabelama 5 i 6 i grafikonima 15, 16 i 17.

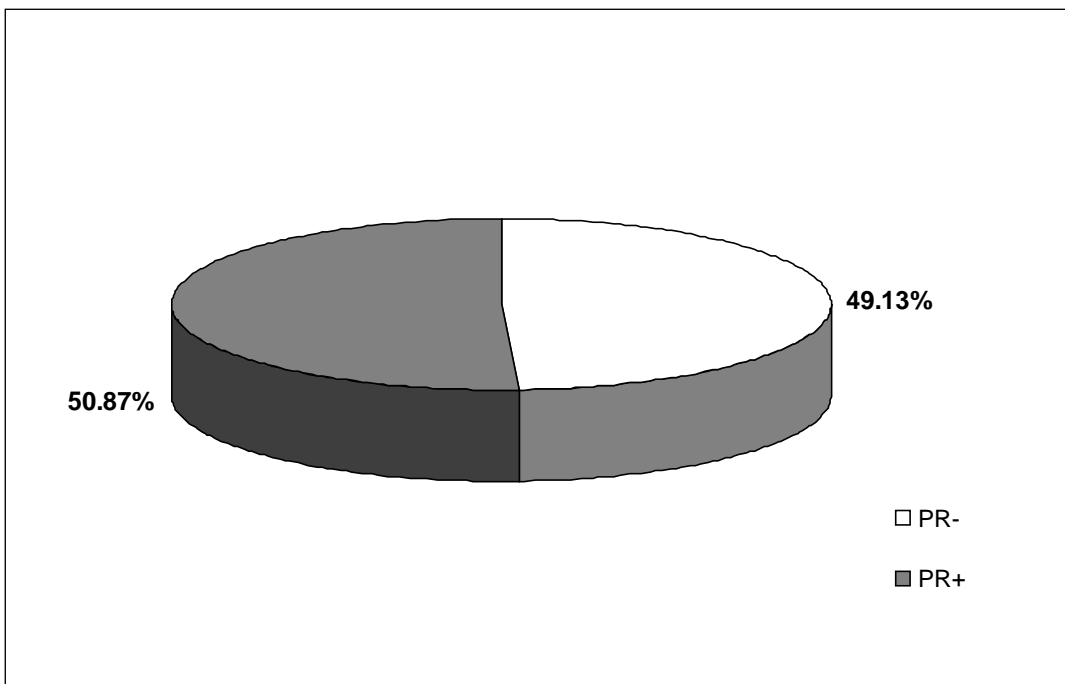
Tabela 5 – Status steroidnih receptora određen IHH metodom

<b>Steroidni receptori</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Estrogen</i></b>	
Srednja vrednost (SD)	4.1 (3.47)
Medijana (opseg)	6 (0-8)
Bez podataka	0
<b><i>Estrogen pozitivnost u celoj grupi bolesnika</i></b>	
ER negativno ( $\leq 3$ )	150 (43.35%)
ER granična vrednost (=4)	7 (2.02%)
ER pozitivno ( $> 4$ )	189 (54.62%)
<b><i>Estrogen pozitivnost – kategorije</i></b>	
ER negativno ( $\leq 3$ )	150 (43.35%)
ER ( $\geq 4$ )	196 (56.65%)
<b><i>Progesteron</i></b>	
Srednja vrednost (SD)	3.47 (3.38)
Medijana (opseg)	4 (0-8)
Bez podataka	0
<b><i>Progesteron pozitivnost u celoj grupi pacijenata</i></b>	
PR negativno ( $\leq 3$ )	170 (49.13%)
PR granicna vrednost (=4)	19 (5.49%)
PR pozitivno ( $> 4$ )	157 (45.38%)
<b><i>Progesteron pozitivnost – kategorije</i></b>	
PR negativno ( $\leq 3$ )	170 (49.13%)
PR ( $\geq 4$ )	176 (50.87%)

Kao što se vidi iz tabele 5, prosečni skor progesterona je bio nešto niži nego kod estrogena. Pozitivne kategorije i ER i PR (skor  $\geq 4$ ) su neznatno učestalije od negativnih (grafikon 15 i 16).



Grafikon 15. Steroidni receptori: Estrogen - kategorije



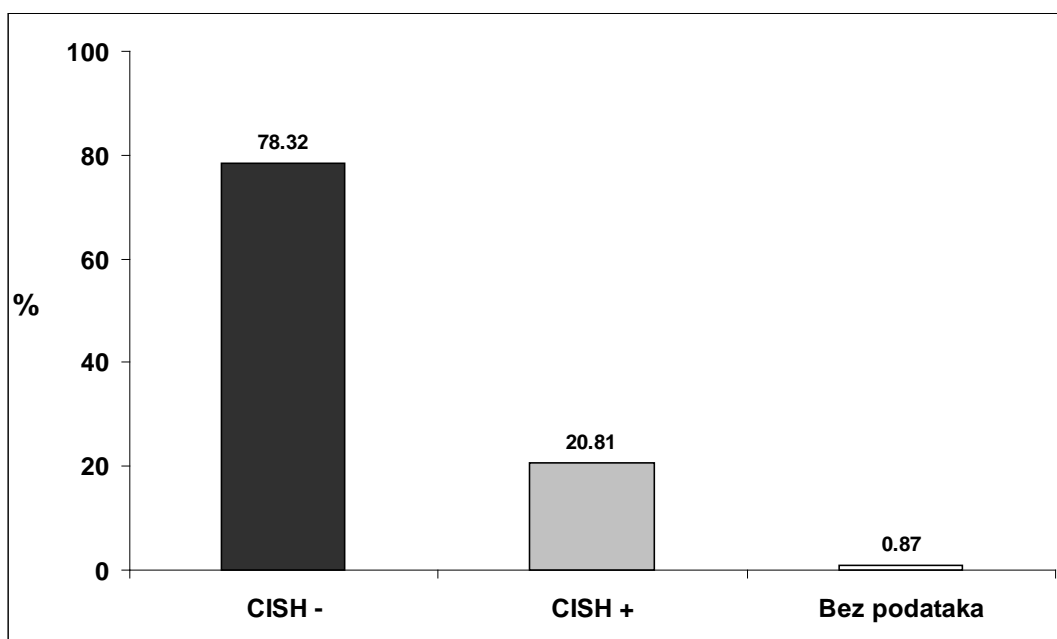
Grafikon 16. Steroidni receptori: Progesteron - kategorije



Tabela 6 – Prikaz parametra HER-2 ekspresije i HER-2 amplifikacije određen CISH metodom u celoj grupi bolesnika

Status	N (%)
<b>HER2 status</b>	
HER2 + (negativno)	218 (63.01%)
HER2 ++	76 (21.97%)
HER2 +++	52 (15.03%)
<b>CISH status</b>	
CISH-	270 (78.32%)
CISH+	72 (20.81%)
Bez podataka	3 (0.87%)

Kao što se vidi iz tabele 6, najučestalije su negativne kategorije i HER2 i CISH statusa (grafikon 17).



Grafikon 17. CISH status

## 4.2. HER-2 STATUS ODREĐEN CISH METODOM I OPŠTE KARAKTERISTIKE BOLESNICA I OBOLJENJA

### 4.2.1. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica

Prema amplifikaciji c-erbB-2 gena određenoj po CISH metodi, bolesnice su podeljene u dve grupe: CISH+ (sa amplifikacijom) i CISH- (bez ampifikacije).

Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7 - HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike obolelih

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<i>Starost (godine)</i>				
Prosek(SD)	56.86 (12.61)	53.15	3	Wilcoxon rank sum* W=11280; p=0.41
Medijana (opseg)	30-84	(12.12) 24-80	3	
<i>Starost – kategorije</i>				Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=1.03$ ; p=0.31
od ≤45 godina	53 (19.56%)	18 (25%)	0 (0%)	
od >46 godina	218 (80.44%)	54 (75%)	3 (100%)	
<i>Menstrualni status</i>				Fisher Exact test p=0.54
Premeno	69(25.46%)	22(30.56%)	(0%)	
Perimeno	20(7.38%)	3(4.17%)	0(0%)	
Menopauza	182(67.16%)	47(65.28%)	3(100%)	
<i>Porodična anamneza</i>				Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.09$ ; p=0.77
negativna	150(55.35%)	45(62.5%)	3(100%)	
pozitivna	73(26.94%)	20(27.78%)	0(0%)	
Bez podataka	48(17.71%)	7(9.72%)	0(0%)	
<i>Porodična anamneza - dojka</i>				Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.45$ ; p=0.5
Dojka +	24(8.86%)	5(6.94%)	0(0%)	
Drugo +	49(18.08%)	15(20.83%)	0(0%)	
Bez podataka	198(73.06%)	52(72.22%)	3(100%)	

\*Wilcoxon rank sum test with continuity correction

Kao što se vidi iz tabele 7, CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su homogene po svim navedenim parametrima (starosna dob - godine i kategorije, menstrualni status, opšta porodična anamneza i porodična anamneza vezano za maligne bolesti dojke).

#### 4.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i karakteristike oboljenja

##### 4.2.2.1. Povezanost kliničkih i histopatoloških karakteristika oboljenja

Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije veličina tumora u tabeli 8.

*Tabela 8 – T u TNM klasifikaciji u odnosu na patološki T*

Klinički T u TNM	Patološki T - N(%)				Total
	pT1	pT2	pT3	Bez podataka	
T0	5(1.45%)	0(0%)	0(0%)	1(0.29%)	6(1.73%)
T1	109(31.5%)	19(5.49%)	0(0%)	0(0%)	128(36.99%)
T2	79(22.83%)	109(31.5%)	2(0.58%)	3(0.87%)	193(55.78%)
T3	0(0%)	14(4.05%)	3(0.87%)	2(0.58%)	19(5.49%)

Kao što se vidi iz tabele 8, adekvatno je stadirana veličina tumora kod 221/346 (63,87%) bolesnice. Od toga je T1=pT1 kod 109 bolesnica (31,5%), T2=pT2 takođe kod 109 bolesnica (31,5%) i T3=pT3 kod 3 bolesnice (0,87%).

Podstadirano je 26/346 (7,51%) bolesnica. Od toga je kod 5 (1,45%) bolesnica stadiran T0 a potvrđen pT1, kod 19 (5,49%) bolesnica stadiran je T1 a potvrđen pT2, dok je kod 2 (0,58%) bolesnice stadiran T2 a potvrđen pT3.

Prestadirano je ukupno 93/346 (26,88%) bolesnice, a od toga je kod 79 (22,83%) bolesnica stadiran T2 a potvrđen pT1 i kod 14 (4,05%) bolesnica je stadiran T3 a potvrđen pT2.

Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije nodalnog statusa u tabeli 9.

*Tabela 9 – N u TNM klasifikaciji u odnosu na patološki N*

Klinički N u TNM	Zahvaćenost nodusa - N(%)			Total
	Nezahvaćeni	Zahvaćeni	Bez podataka	
N0	106(30.64%)	68(19.65%)	15(4.34%)	189(54.62%)
N1	65(18.79%)	81(23.41%)	11(3.18%)	157(45.38%)

Kao što se vidi iz tabele 9, po nodalnom statusu adekvatno je stadirano 187/346 (53,95%) bolesnica. Od toga N0=pN0 106 (30,64%) i N1=pN1 81 (23,41%). Podstadirano je 65 bolesnica(19,65%) a prestadirano 65 (18,79%).

Na osnovu dobijenih nalaza kliničkog i patološkog T i N, određivani su klinički i postoperativni (patološki) stadijumi bolesti. Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije stadijuma bolesti u tabelama 10 i 11.

*Tabela 10 – Klinički i postoperativni stadijum*

<b>Klinički stadijum</b>	<b>Postoperativni stadijum N (%)</b>		
	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>Bez podataka</b>
Klinički stadijum I	55(15.9%)	31(8.96%)	4(1.16%)
Klinički stadijum II	60(17.34%)	168(48.55%)	28(8.09%)

Kao što se vidi iz tabele 10, adekvatno su stadirani stadijumi bolesti kod 223/346 (64.45%) bolesnica. Podstadirano je 31/346, a prestadirano je 60/346.

*Tabela 11 – Klinički i postoperativni stadijum (detaljno)*

<b>Klinički stadijum</b>	<b>Postoperativni stadijum</b>			<b>Bez podataka</b>
	<b>I</b>	<b>IIA</b>	<b>IIB</b>	
Klinički stadijum I	55(15.9%)	27(7.8%)	4(1.16%)	4(1.16%)
Klinički stadijum IIA	45(13.01%)	40(11.56%)	27(7.8%)	12(3.47%)
Klinički stadijum IIB	15(4.34%)	50(14.45%)	51(14.74%)	16(4.62%)

Adekvatno su stadirani stadijumi bolesti kod 146/346 (42.2%) bolesnica. Podstadirano je 58/346 (16.76%), a prestadirano je 110/346 (31.8%).

#### 4.2.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike oboljenja

Za potrebe ovog istraživanja bilo je od značaja ispitivanje razlika između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnica po karakteristikama oboljenja. Rezultati analize prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12 - HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike oboljenja

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Kvadrant dojke</b>				
centralni	25(9.23%)	8(11.11%)	0(0%)	Fisher Exact Test p=0.65
lateralni	195(71.96%)	47(65.28%)	2(66.67%)	
medijalni	43(15.87%)	14(19.44%)	1(33.33%)	
nepoznato (nepalpabilni)	8(2.95%)	3(4.17%)	0(0%)	
<b>T u TNM klasifikaciji</b>				
T0	3(1.11%)	3(4.17%)	0(0%)	Fisher Exact Test p=0.17
T1	104(38.38%)	24(33.33%)	0(0%)	
T2	147(54.24%)	43(59.72%)	3(100%)	
T3	17(6.27%)	2(2.78%)	0(0%)	
<b>N u TNM klasifikaciji</b>				
N0	148(54.61%)	38(52.78%)	3(100%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.08$ ; p=0.78
N1	123(45.39%)	34(47.22%)	0(0%)	
<b>Klinički stadijum detaljno</b>				
I	70(25.83%)	20(27.78%)	0(0%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.45$ ; p=0.8
IIA	98(36.16%)	23(31.94%)	3(100%)	
IIB	103(38.01%)	29(40.28%)	0(0%)	
<b>Klinički stadijum</b>				
I	70(25.83%)	20(27.78%)	0(0%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.11$ ; p=0.73
II	201(74.17%)	52(72.22%)	3(100%)	

CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su homogene po svim karakteristikama oboljenja (lokalizacija tumora, veličina, nodalni status i klinički stadijumi bolesti). Statistička značajnost nađena je samo kod veličine tumora (p=0.17)

#### 4.2.2.3. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike oboljenja

Za potrebe ovog istraživanja bilo je od značaja ispitivanje razlika između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnica po histopatološkim karakteristikama oboljenja. Rezultati analize prikazani su u tabeli 13.

*Tabela 13 - HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike oboljenja*

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b><i>Patološki T</i></b>				
pT1	149(54.98%)	41(56.94%)	3(100%)	Fisher Exact Test p=0.28
pT2	117(43.17%)	25(34.72%)	0(0%)	
pT3	3(1.11%)	2(2.78%)	0(0%)	
Bez podataka	2(0.74%)	4(5.56%)	0(0%)	
<b><i>Patološki N</i></b>				
bez zahvaćenih nodusa	132(48.71%)	37(51.39%)	2(66.67%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.05$ ; p=0.81
sa zahvaćenim nodusima	118(43.54%)	31(43.06%)	0(0%)	
Bez podataka	21(7.75%)	4(5.56%)	1(33.33%)	
<b><i>Postoperativni stadijum</i></b>				
postop. stadijum I	92(33.95%)	21(29.17%)	2(66.67%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=1.34$ ; p=0.51
postop. stadijum IIA	89(32.84%)	28(38.89%)	0(0%)	
postop. stadijum IIB	67(24.72%)	15(20.83%)	0(0%)	
Bez podataka	23(8.49%)	8(11.11%)	1(33.33%)	

Kao što se vidi iz tabele 13, između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnica nema statistički značajne razlike u odnosu na kategorije patološkog T, patološkog N i postoperativnih stadijuma.

#### 4.2.2.4. HER-2 status određen CISH metodom i histološki i nuklearni gradus tumora

U daljem toku istraživanja bilo je od značaja ispitivanje razlika između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnika po histološkim i nuklearnim gradusima tumora. Rezultati analize prikazani su u tabeli 14 i na grafikonima 18 i 19.

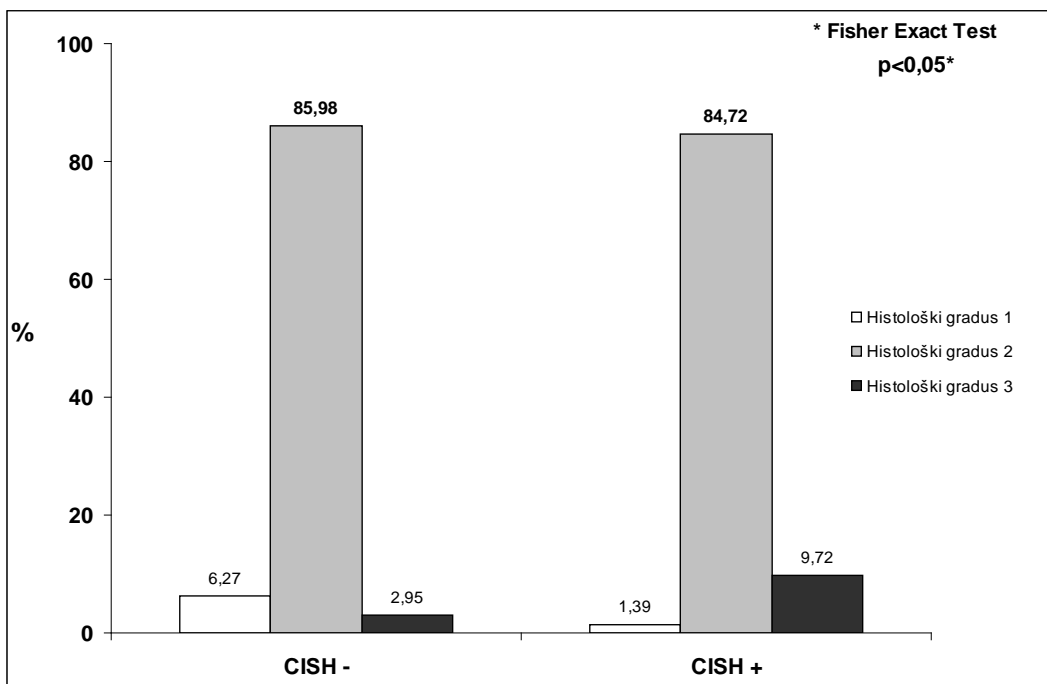
*Tabela 14 – Histološki i nuklearni gradus tumora*

Gradusi	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b><i>Histološki gradus</i></b>				
Hist. gradus 1	17(6.27%)	1(1.39%)	1(33.33%)	Fisher Exact Test p=0.015
Hist. gradus 2	233(85.98%)	61(84.72%)	2(66.67%)	
Hist. gradus 3	8(2.95%)	7(9.72%)	0(0%)	
Bez podataka	13(4.8%)	3(4.17%)	0(0%)	
<b><i>Nuklearni gradus</i></b>				
Nuk.gradus 1	26(9.59%)	2(2.78%)	1(33.33%)	Fisher Exact Test p=0.00135
Nuk.gradus 2	221(81.55%)	53(73.61%)	1(33.33%)	
Nuk.gradus 3	19(7.01%)	15(20.83%)	1(33.33%)	
Bez podataka	5 (1.85%)	2 (2.78%)	0 (0%)	

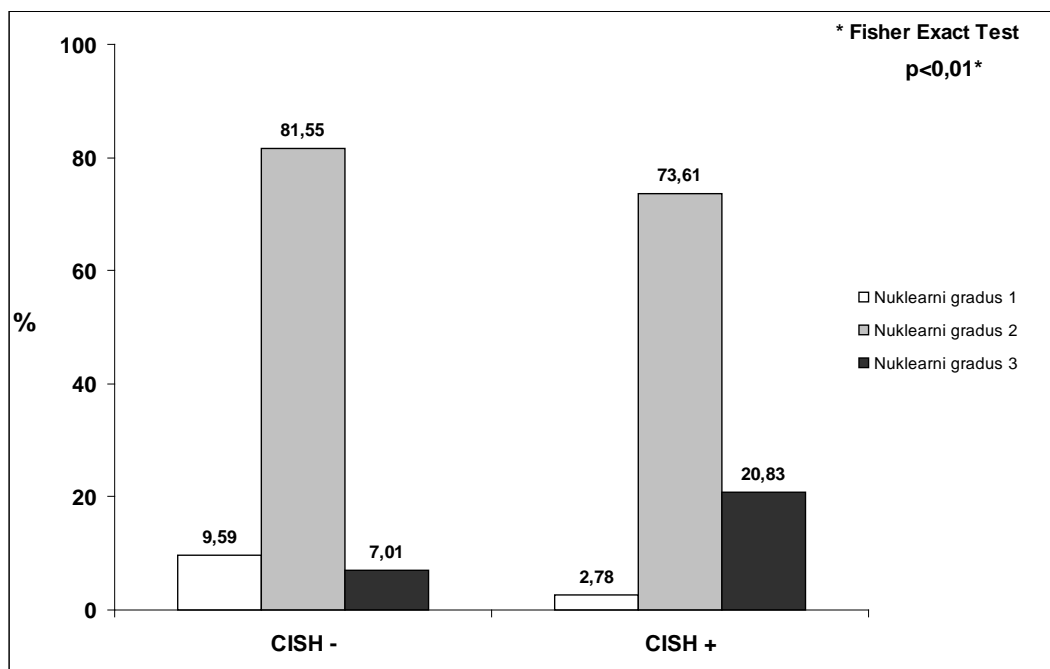
Analizirajući povezanost CISH statusa sa histološkim i nuklearnim gradusom tumora dobijene su statistički značajne razlike (tabela 14).

Histološki gradus 2 je najzastupljeniji u obe podgrupe. U CISH- je učestaliji histološki gradus 1, dok je u CISH+ učestaliji histološki gradus 3 (grafikon 18).

Nuklearni gradus 2 je najzastupljeniji u obe podgrupe. U CISH- je učestaliji nuklearni gradus 1, dok je u CISH+ učestaliji nuklearni gradus 3 (grafikon 19).



Grafikon 18. Histološki gradus tumora



Grafikon 19. Nuklearni gradus tumora



#### 4.2.2.5. HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori

Rezultati testiranja steroidnih receptora u odnosu na CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su prikazani u tabeli 15 i na grafikonu 20.

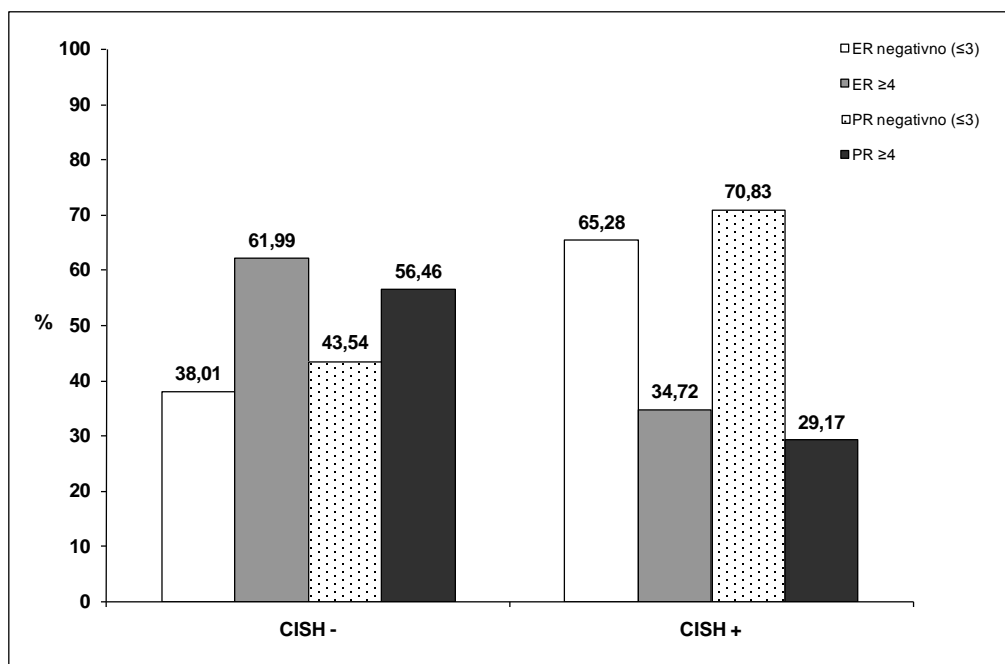
*Tabela 15 - HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori*

Steroidni receptori	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Estrogen</b>				Wilcoxon rank sum*
Prosek (SD)	4.56 (3.42)	2.25 (3.02)	3/346	W=13511; $p=1.77 \cdot 10^{-7}$
Medijana (opseg)	6 (0-8)	0 (0-8)	(0.87%)	
<b>Estrogen pozitivnost</b>				Fisher Exact Test
ER negativno ( $\leq 3$ )	103(38.01%)	47(65.28%)		$p=1.5 \cdot 10^{-5}$
ER granicna vrednost (=4)	4(1.48%)	3(4.17%)	3(100%)	
ER pozitivno ( $>4$ )	164(60.52%)	22(30.56%)		
<b>Estrogen kategorije (poz./neg.)</b>				Pearson $\chi^2$ test
ER negativno ( $\leq 3$ )	103(38.01%)	47(65.28%)	0(0%)	$\chi^2_1=17.19$ ; $p=3 \cdot 10^{-5}$
ER $\geq 4$	168(61.99%)	25(34.72%)	3(100%)	
<b>Progesteron</b>				Wilcoxon rank sum*
Prosek(SD)	3.88 (3.41)	1.83 (2.77)	3/346	W=13006; $p=4.57 \cdot 10^{-6}$
Medijana (opseg)	5 (0-8)	0 (0-8)	(0.87%)	
<b>Progesteron pozitivost</b>				Pearson $\chi^2$ test
PR negativno ( $\leq 3$ )	118(43.54%)	51(70.83%)	1(33.33%)	$\chi^2_1=19.56$ ; $p=6 \cdot 10^{-5}$
PR granicna vrednost (=4)	14(5.17%)	5(6.94%)	0(0%)	
PR pozitivno ( $>4$ )	139(51.29%)	16(22.22%)	2(66.67%)	
<b>Progesteron kategorije (poz./neg.)</b>				Pearson $\chi^2$ test
PR negativno ( $\leq 3$ )	118(43.54%)	51(70.83%)	1(33.33%)	$\chi^2_1=16.95$ ; $p=4 \cdot 10^{-5}$
PR $\geq 4$	153(56.46%)	21(29.17%)	2(66.67%)	

\*Wilcoxon rank sum test with continuity correction

Analizirajući povezanost CISH statusa sa steroidnim receptorima dobijene su statistički značajne razlike (tabela 15).

U CISH+ u odnosu na CISH- podgrupu vrednosti estrogena i progesterona su značajno niže i značajno su frekventnije ER- i PR- kategorije (grafikon 20).



Grafikon 20. ER i PR vrednosti u odnosu na CISH metodu

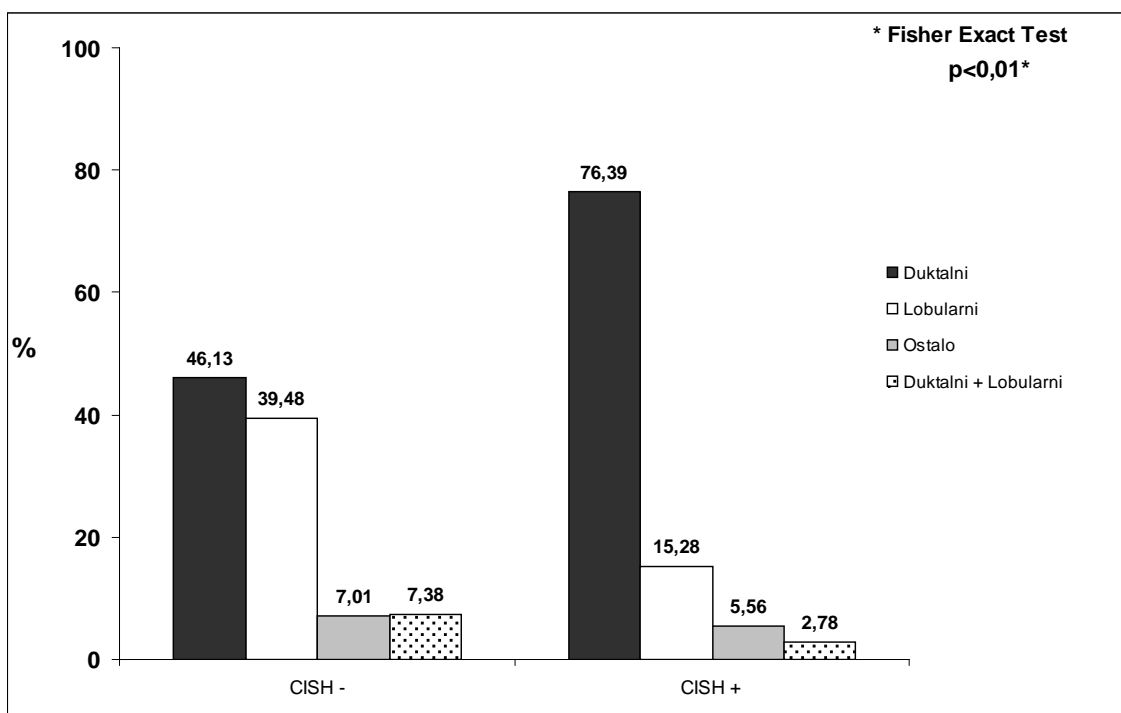
#### 4.2.2.6. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološki tipovi tumora

Rezultati testiranja PH tipova tumora u odnosu na CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su prikazani u tabeli 16 i na grafikonu 21.

Tabela 16 – PH tip tumora

PH tip tumora	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
Duktalni	125(46.13%)	55(76.39%)	3(100%)	Fisher Exact Test $p=4.22 \cdot 10^{-5}$
Lobularni	107(39.48%)	11(15.28%)	0(0%)	
Ostalo	19(7.01%)	4(5.56%)	0(0%)	
Duktalni+lobularni	20(7.38%)	2(2.78%)	0(0%)	

Analizirajući povezanost CISH statusa sa PH tipovima tumora dobijena je statistički značajna razlika (tabela 16). Naime, u obe podgrupe dominira duktalni tip tumora, pri čemu je njegova učestalost značajno veća u CISH+ nego u CISH- podgrupi, dok je lobularni tip značajno učestaliji u CISH- nego u CISH+ podgrupi.



Grafikon 21. PH tip tumora

#### 4.3. HER-2 STATUS ODREĐEN CISH METODOM U PODGRUPI BOLESNICA SA DUKTALNIM I LOBULARNIM KARCINOMOM DOJKE (N=301)

##### 4.3.1. Opšte karakteristike bolesnica, oboljenja i lečenja

##### 4.3.1.1. Karakteristike bolesnica

Starosna dob formirane podgrupe DC/LC od 301 bolesnice je prikazana kroz srednju vrednost (SD) 55,93 (12,48) i medijanu (opseg) 56 (24-83). Granična vrednost za analizu je starost do 45 godina i 45 i više godina. Menstrualni status je određivan kao premenopauzne, perimenopauzne i postmenopauzne bolesnice. Pozitivna porodična anamneza za sve malignitete je nađena kod 78 (25,91%) bolesnice a za maligne bolesti dojke kod 24 (7,97%) bolesnica. Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 17.

Tabela 17 – Opšte karakteristike bolesnica

<b>Karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b>Starost (godine)</b>	
Prosek(SD)	55.93 (12.48)
Medijana (opseg)	56 (24-83)
<b>Starost – kategorije</b>	
od ≤45	61 (20.27%)
od >45	240 (79.73%)
<b>Menstrualni status</b>	
Premeno	79 (26.25%)
Perimeno	21 (6.98%)
Menopauza	201 (66.78%)
<b>Porodična anamneza</b>	
Ne	177 (58.8%)
Da	78 (25.91%)
Bez podataka	46 (15.28%)
<b>Porodična anamneza –dojka</b>	
Dojka	24 (7.97%)
Drugo	54 (17.94%)
Bez podataka	223 (74.09%)
<b>Ukupno bolesnica</b>	<b>301 (100%)</b>

Kao što se u tabeli 17 vidi, bolesnice su uglavnom starosti preko 45 godina (prosečna starost iznosi 56 godina), menopauzne i bez pozitivne porodične anamneze.

#### 4.3.1.2. Kliničke karakteristike oboljenja

U studiju podgrupe DC/LC su uključene bolesnice sa kliničkom veličinom tumora kategorija T1 (0-2cm), T2 (2-5cm) i T3 (preko 5cm), kao i sa kategorijama limfnih nodusa N0 (nepalpabilni) i N1 (palpabilni limfni nodusi) u istostranoj aksili. Sve bolesnice su bile bez verifikovanih metastaza - M0.

Ovo je podrazumevalo kliničke stadijume bolesti I i IIA i IIB.

Lokalizacija tumora (određivana u odnosu na kvadrant dojke) bila je centralna, lateralna ili medijalna, dok je za nepalpabilne tumore lokalizacija kategorisana kao nepoznata. Osnovne kliničke karakteristike oboljenja prikazane su u tabeli 18.

Tabela 18 – Kliničke karakteristike oboljenja

Karakteristike	N (%)
<b>Klinički stadijum bolesti</b>	
I (T1N0)	79 (26.25%)
IIA (T0N1 ili T1N1 ili T2N0 )	110 (36.54%)
IIB (T2N1 ili T3N0)	112 (37.21%)
<b>Klinički stadijum bolesti – kategorije</b>	
I	79 (26.25%)
IIA i IIB	222 (73.75%)
<b>T u TNM klasifikaciji</b>	
T0	6 (1.99%)
T1	114 (37.87%)
T2	167 (55.48%)
T3	14 (4.65%)
<b>N u TNM klasifikaciji</b>	
N0	162 (53.82%)
N1	139 (46.18%)
<b>Lokalizacija tumora – kvadrant dojke</b>	
Centralni kvadrant	30 (9.97%)
Lateralni	212 (70.43%)
Medijalni	50 (16.61%)
Nepoznato (nepalpabilni)	9 (2.99%)

Dobijeni rezultati pokazuju da su klinički stadijumi IIA i IIB slične učestalosti, dok je najmanje zastupljen bio I klinički stadijum. U TNM klasifikaciji, najučestalija vrednost je bila T2 zatim T1, dok su N0 i N1 bili slične učestalosti. Lateralna lokalizacija tumora je bila najfrekventnija.

#### 4.3.1.3. Karakteristike hirurškog lečenja

Sprovedeno operativno lečenje je svrstano u dve osnovne kategorije. Poštedne operacije i modifikovane radikalne operacije. Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 19.

Tabela 19 – Karakteristika hiruškog lečenja

	N (%)
<b>Tip hiruške intervencije</b>	
Poštedna operacija	150 (49.83%)
Radikalne/modifikovane radikalne	151 (50.17%)

Kao što se vidi iz tabele 19, učestalost radikalnih tipova operacija je nešto malo veća od poštednih operacija.

#### 4.3.1.4. Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa

U definitivnom histopatološkom nalazu, određeni su tipovi tumora kao: duktalni invazivni, lobularni invazivni, mešani duktalno-lobularni karcinomi i ostali tipovi tumora (svi drugi tipovi).

Od strane patologa određivana je veličina tumora pT čije su kategorije bile: pT1 - tumori veličine do 2cm, pT2 - tumori veličine od 2 do 5cm i pT3- tumori veličine više od 5cm, dok su bez podataka kategorisane one bolesnice kod kojih patolog nije mogao da odredi veličinu karcinoma.

Histološki i nuklearni gradusi su obeležavani na isti način: 0 - kada se gradus nije mogao odrediti, 1 - najveći stepen diferencijacije, 2 - srednji stepen, 3 - najmanji stepen diferencijacije.

Nodalni status određivan od strane patologa prikazan je kroz ukupan broj odstranjenih limfnih nodusa istostrane aksile, bez metastaza i sa metastazama.

Za određivanje postoperativnog stadijuma bolesti korišćen je pT, pN sistem stadiranja u okviru patološke TNM klasifikacije. Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 20.

Tabela 20 – Patohistološke karakteristike tumora i nodalnog statusa

<b>Patohistološke karakteristike</b>	<b>N (%)</b>
<b>Tip tumora</b>	
Duktalni	183 (60.8%)
Lobularni	118 (39.2%)
<b>pT tumora</b>	
pT1	171 (56.81%)
pT2	121 (40.2%)
pT3	4 (1.33%)
Bez podataka	5 (1.66%)
<b>Histološki gradus</b>	
1	16 (5.32%)
2	262 (87.04%)
3	11 (3.65%)
Bez podataka	12 (3.99%)
<b>Nuklearni gradus</b>	
1	26 (8.64%)
2	242 (80.4%)
3	27 (8.97%)
Bez podataka	6 (1.99%)
<b>Patološki N</b>	
Bez zahvaćenih nodusa	149 (49.5%)
Sa zahvaćenim nodusima	131 (43.52%)
Nema podataka	21 (6.98%)
<b>Lgl ekstirpirane</b>	
Prosek(SD)	16.13 (5.55)
Medijana (Opseg)	15 (1-43)
Bez podataka	21
<b>Lgl pozitivne</b>	
Prosek(SD)	2.06 (3.83)
Medijana (Opseg)	0 (0-31)
Bez podataka	21
<b>Postoperativni stadijum</b>	
I	100 (33.22%)
IIA	104 (34.55%)
IIB	71 (23.59%)
Bez podataka	26 (8.64%)

Najučestaliji je duktalni tip tumora. Najučestaliji pT je pT1 (171 bolesnica), zatim pT2 (121 bolesnica) i najmanje pT3 (4 bolesnice). Bez podataka je bilo 5 bolesnica.

Histološki i nuklearni gradus 2 su najučestaliji. Slična je učestalost patološki zahvaćenih i nezahvaćenih limfnih nodusa, dok su postoperativni stadijumi I i IIA slične frekventnosti.

#### 4.3.1.5. Status steroidnih receptora i HER-2 status određen CISH metodom

Estrogenski i progesteronski receptori određivani su IHH metodom i njihove kategorije su bile: ER+ tj. PR+ (skor 4 i više), odnosno ER- tj. PR- (skor 3 i manje).

Istom (IHH) metodom, kao početni nalaz, određivana je i HER-2 ekspresija, odnosno njene kategorije: 1+ (negativna), 2+ (granična) i 3+ (pozitivna).

Definitivni nalaz HER-2 statusa odredivan je CISH metodom, a dobijene kategorije su bile: CISH- (bez amplifikacije) i CISH+ (sa amplifikacijom).

Osnovne karakteristike steroidnih karakteristike prikazane su u tabelama 21 i 22.

*Tabela 21 – Status steroidnih receptora određen IHH metodom*

<b>Steroidni receptori</b>	<b>N (%)</b>
<b><i>Estrogen - vrednosti</i></b>	
Prosek (SD)	4.05 (3.44)
Medijana (opseg)	6 (0-8)
Bez podataka	0
<b><i>Estrogen pozitivnost</i></b>	
ER negativno ( $\leq 3$ )	132 (43.85%)
ER granična vrednost (=4)	7 (2.33%)
ER pozitivno ( $> 4$ )	162 (53.82%)
<b><i>Estroge - kategorije (poz./neg.)</i></b>	
ER negativno ( $\leq 3$ )	132 (43.85%)
ER ( $\geq 4$ )	169 (56.15%)
<b><i>Progesteron - vrednosti</i></b>	
Prosek(SD)	3.52 (3.38)
Medijana (opseg)	4 (0-8)
Bez podataka	0
<b><i>Progesteron pozitivnost</i></b>	
PR negativno ( $\leq 3$ )	147 (48.84%)
PR granicna vrednost (=4)	17 (5.65%)
PR pozitivno ( $> 4$ )	137 (45.51%)
<b><i>Progesteron - kategorije (poz./neg.)</i></b>	
PR negativno ( $\leq 3$ )	147 (48.84%)
PR ( $\geq 4$ )	154 (51.16%)

Kao što se vidi iz tabele 21, prosečni skor progesterona je bio nešto niži nego kod estrogena. Pozitivne kategorije i ER i PR su neznatno učestalije od negativnih.



Tabela 22 – Prikaz parametra HER-2 ekspresije i HER-2 amplifikacije (CISH)

Status	N (%)
<b>HER2 status</b>	
HER2 + (negativno)	187 (62.13%)
HER2 ++	66 (21.93%)
HER2 +++	48 (15.95%)
<b>CISH status</b>	
CISH-	232 (77.08%)
CISH+	66 (21.93%)
Bez podataka	3 (1.00%)

Rezultati prikazani u tabeli 22 pokazuju da su najučestalije kategorije HER-2 i CISH statusa.

#### 4.3.2. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica i oboljenja

##### 4.3.2.1. HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike bolesnica

Prema amplifikaciji HER-2 onkoproteina određenoj po CISH metodi, bolesnice su podeljene u dve grupe: CISH+ (sa amplifikacijom) i CISH- (bez amplifikacije). Osnovne karakteristike prikazane su u tabeli 23.

Tabela 23 - HER-2 status određen CISH metodom i opšte karakteristike obolelih

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Starost (godine)</b>				
Prosek(SD)	56.51 (12.43)	53.12 (12.11)	3	Wilcoxon rank sum* W=8737; p=0.08
Medijana (opseg)	57 (30-83)	53 (24-80)	3	
<b>Starost – kategorije</b>				
od ≤45 godina	46 (19.83%)	15 (22.73%)	0 (0%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.27$ ; p=0.61
od >46 godina	186 (80.17%)	51 (77.27%)	3 (100%)	
<b>Menstrualni status</b>				
Premeno	60(25.86%)	19(28.79%)	(0%)	Fisher Exact test p=0.68
Perimeno	18(7.76%)	3(4.55%)	0(0%)	
Menopauza	154(66.38%)	44(66.67%)	3(100%)	
<b>Porodična anamneza</b>				
negativna	131(56.47%)	43(65.15%)	3(100%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=0.25$ ; p=0.61
pozitivna	61(26.29%)	17(25.76%)	0(0%)	
Bez podataka	48(17.24%)	6(9.09%)	0(0%)	
<b>Porodična anamneza</b>				
Dojka +	20(8.62%)	4(6.06%)	0(0%)	Fisher Exact test p=0.56
Drugo +	41(17.67%)	13(19.7%)	0(0%)	
Bez podataka	171(73.71%)	49(74.24%)	3(100%)	

\*Wilcoxon rank sum test with continuity correction

Kao što se vidi iz tabele 23, CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su homogene po svim navedenim parametrima (starosna dob – godine i kategorije, menstrualni status, opšta porodična anamneza i porodična anamneza vezana za maligne bolesti dojke). Nije nađena statistička značajna razlika u analiziranim kategorijama.

#### 4.3.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i karakteristike oboljenja

##### 4.3.2.2.1. Povezanost kliničkih i histopatoloških karakteristike oboljenja

Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije veličina tumora u tabeli 24.

*Tabela 24 – T u TNM klasifikaciji u odnosu na patološki T*

Klinički T u TNM	Patološki T - N(%)				Total
	pT1	pT2	pT3	Bez podataka	
T0	5 (1.66%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.33%)	6 (1.73%)
T1	98 (32.56%)	16 (5.32%)	0 (0%)	0 (0%)	128 (36.99%)
T2	68 (22.59%)	95 (31.56%)	2 (0.66%)	2 (0.66%)	193 (55.78%)
T3	0 (0%)	10 (3.32%)	2 (0.66%)	2 (0.66%)	19 (5.49%)

Adekvatno je stadirana veličina tumora kod 195/301 (64,78%) bolesnice. Od toga je T1=pT1 kod 98 bolesnica (32,56%), T2=pT2 kod 95 bolesnica (31,56%) i T3=pT3 kod 2 bolesnice (0,66%).

Podstadirano je 23/301 (7,64%) bolesnica. Od toga T0 vs pT1 5 (1,66%), T1 vs pT2 16 (5,32%) i T2 vs pT3 2 (0,66%).

Prestadirano je ukupno 78/301 (25,91%) bolesnica, a od toga T2 vs pT1 68 (22,59%) i T3 vs pT2 10 (3,32%).

Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije nodalnog statusa u tabeli 25.

*Tabela 25 – N u TNM klasifikaciji u odnosu na patološki N*

Klinički N u TNM	Zahvaćenost nodusa - N(%)			Total
	Nezahvaćeni	Zahvaćeni	Bez podataka	
N0	91(30.23%)	59(19.6%)	12(3.99%)	162(53.82%)
N1	58(19.27%)	72(23.92%)	9(2.99%)	139(46.18%)

Prema nodalnom statusu adekvatno je stadirano 163/301 (54,15%) bolesnica. Od toga N0=pN0 91 (30,23%) i N1=pN1 72 (23,92%). Podstadirano je 59 bolesnica (19,6%), a prestadirano 58 (19,27%).

Na osnovu dobijenih nalaza kliničkog i patološkog T i N, određivani su klinički i postoperativni (patološki) stadijumi bolesti. Za potrebe ovog istraživanja prikazane su kliničke i patohistološke kategorije stadijuma bolesti u tabelama 26 i 27.

*Tabela 26 – Klinički i postoperativni stadijum*

Klinički stadijum	Postoperativni stadijum N (%)		
	I	II	Bez podataka
Klinički stadijum I	49(16.28%)	26(8.64%)	4(1.33%)
Klinički stadijum II	51(16.94%)	149(49.5%)	22(7.31%)

Kao što se vidi iz tabele 26, adekvatno su stadirani stadijumi bolesti kod 198/301 (65,78%) bolesnica, podstadirano je 26/301 (8,64%) a prestadirano je 51/301 (16,94%) bolesnica.

Tabela 27– Klinički i postoperativni stadijum (detaljno)

Klinički stadijum	Postoperativni stadijum			Bez podataka
	I	IIA	IIB	
I	49(16.28%)	23(7.64%)	3(1%)	4(1.33%)
IIA	39(12.96%)	35(11.63%)	25(8.31%)	11(3.65%)
IIB	12(3.99%)	46(15.28%)	43(14.29%)	11(3.65%)

Kao što se vidi iz tabele 27, adekvatno su stadirani stadijumi bolesti kod 127/301 (42,20%) bolesnica, podstadirano je 51/301 (16,95%) a prestadirano je 97/301 (32,23%) bolesnica.

#### 4.3.2.2.2. HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike oboljenja

Ispitujući razlike između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnica po karakteristikama oboljenja, nismo dobili statističku značajnost. Rezultati analize su prikazani u tabeli 28.

Tabela 28 - HER-2 status određen CISH metodom i kliničke karakteristike oboljenja

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Kvadrant dojke</b>				
centralni	23(9.91%)	7(10.61%)	0(0%)	Fisher Exact Test p=0.82
lateralni	166(71.55%)	44(66.67%)	2(66.67%)	
medijalni	36(15.52%)	13(19.7%)	1(33.33%)	
nepoznato (nepalpabilni)	7(3.02%)	2(3.03%)	0(0%)	
<b>T u TNM klasifikaciji</b>				
T0	3(1.29%)	3(4.55%)	0(0%)	Fisher Exact Test p=0.21
T1	93(40.09%)	24(31.82%)	0(0%)	
T2	124(53.45%)	40(60.61%)	3(100%)	
T3	12(5.17%)	2(3.03%)	0(0%)	
<b>N u TNM klasifikaciji</b>				
N0	124(53.45%)	35(53.02%)	3(100%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_{1}=0.004$ ; p=0.95
N1	108(46.55%)	31(46.97%)	0(0%)	
<b>Klinički stadijum detaljno</b>				
I	62(26.72%)	17(25.76%)	0(0%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_{1}=0.12$ ; p=0.95
IIA	84(36.21%)	23(34.85%)	3(100%)	
IIB	86(37.07%)	26(39.39%)	0(0%)	
<b>Klinički stadijum</b>				
I	62(26.72%)	17(25.76%)	0(0%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_{1}=0.024$ ; p=0.87
II	170(73.28%)	49(74.24%)	3(100%)	

Kao što se vidi iz tabele 28, CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su homogene po svim karakteristikama oboljenja (lokalizacija tumora, veličina, nodalni status i klinički stadijumi bolesti).

#### 4.3.2.2.3. HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike oboljenja

Analizom histopatološki određene veličine tumora, zahvaćenosti limfnih nodusa i postoperativnim/patološkim stadijumom bolesti i poređenjem sa CISH vrednostima, nismo dobili statičku značajnost koja bi ukazivala na njihovu međuzavisnost. Rezultati su prikazani na tabeli 29.

Tabela 29 - HER-2 status određen CISH metodom i histopatološke karakteristike oboljenja

Karakteristike	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Patološki T</b>				
pT1	129(55.6%)	39(59.09%)	3(100%)	Fisher Exact Test p=0.17
pT2	99(42.67%)	22(33.33%)	0(0%)	
pT3	2(0.86%)	2(3.03%)	0(0%)	
Bez podataka	2(0.86%)	3(4.55%)	0(0%)	
<b>Patološki N</b>				
bez zahvaćenih nodusa	114(49.14%)	33(50%)	2(66.67%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_{1}=0.004$ ; p=0.95
sa zahvaćenim nodusima	102(43.97%)	29(43.94%)	0(0%)	
Bez podataka	16(3.9%)	4(6.06%)	1(33.33%)	
<b>Postoperativni stadijum</b>				
postop. stadijum I	78(33.62%)	20(30.3%)	2(66.67%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_{1}=1.34$ ; p=0.51
postop. stadijum IIA	80(34.48%)	24(36.36%)	0(0%)	
postop. stadijum IIB	56(24.14%)	15(22.73%)	0(0%)	
Bez podataka	18(7.76%)	7(10.61%)	1(33.33%)	

#### 4.3.2.2.4. HER-2 status određen CISH metodom i histološki i nuklearni gradus tumora

Za potrebe ovog istraživanja bilo je od značaja ispitivanje razlika između CISH- i CISH+ podgrupa bolesnica po histološkim i nuklearnim gradusima tumora. Rezultati analize su prikazani u tabeli 30 i na grafikonima 22 i 23.

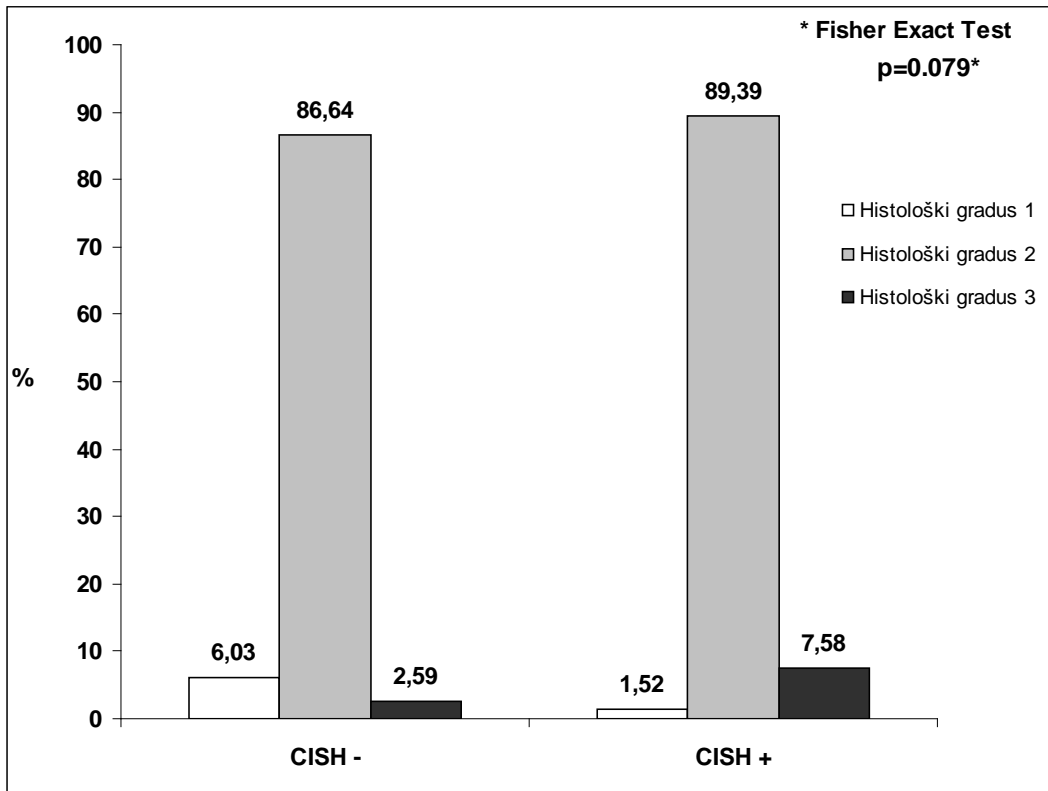
Tabela 30 – Histološki i nuklearni gradus tumora

Gradusi	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Histološki gradus</b>				
Hist. gradus 1	14(6.03%)	1(1.52%)	1(33.33%)	Fisher Exact Test p=0.079
Hist. gradus 2	201(86.64%)	59(89.39%)	2(66.67%)	
Hist. gradus 3	6(2.59%)	5(7.58%)	0(0%)	
Bez podataka	11(4.74%)	1(1.52%)	0(0%)	
<b>Nuklearni gradus</b>				
Nuk.gradus 1	23(9.91%)	2(3.03%)	1(33.33%)	Fisher Exact Test p=0.00371
Nuk.gradus 2	191(82.33%)	50(75.76%)	1(33.33%)	
Nuk.gradus 3	14(6.03%)	12(18.18%)	1(33.33%)	
Bez podataka	4(1.72%)	2(3.03%)	0(0%)	

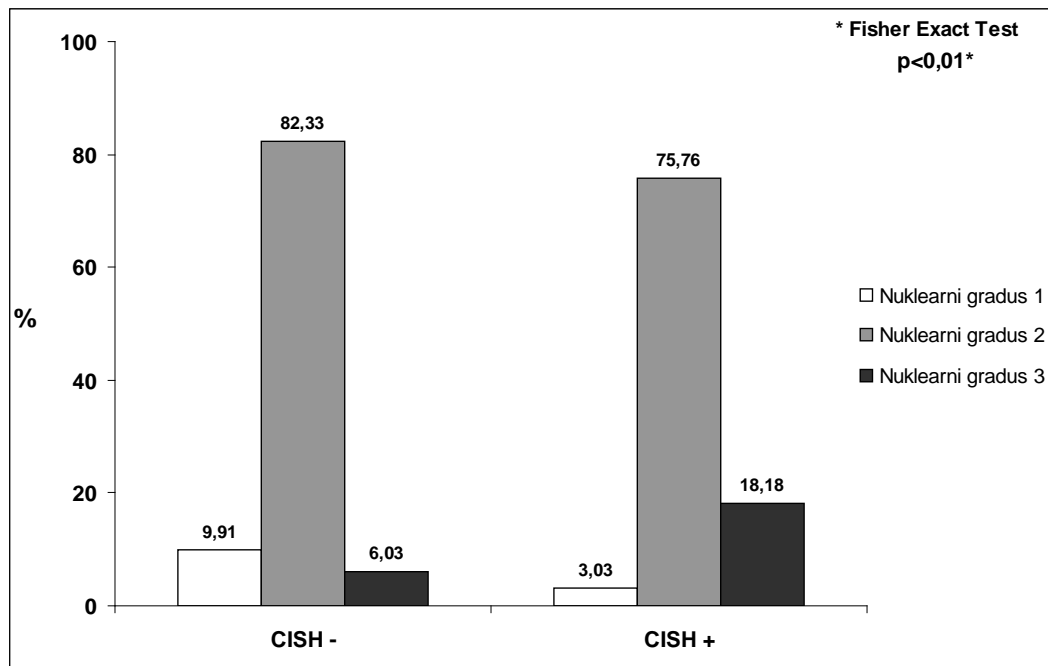
Analizirajući povezanost CISH statusa sa histološkim i nuklearnim gradusom tumora dobijene su statistički značajne razlike za nuklearni ali ne i histološki gradus (tabela 30).

Histološki gradus 2 je najzastupljeniji u obe podgrupe. U CISH- je učestaliji histološki gradus 1, dok je u CISH+ učestaliji histološki gradus 3 (grafikon 22).

Nuklearni gradus 2 je najzastupljeniji u obe podgrupe. U CISH- je učestaliji nuklearni gradus 1, dok je u CISH+ učestaliji nuklearni gradus 3 (grafikon 23).



Grafikon 22. Histološki gradus tumora



Grafikon 23. Nuklearni gradus tumora

#### 4.3.2.2.5. HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori

Statističke značajnosi su dobijene i poređenjem CISH statusa sa vrednostima estrogenskih i progesteronskih receptora. Za testiranje su korišćene srednja vrednost (SD) i medijana (opseg) i vrednosti receptora po grupama i kategorijama. Rezultati su prikazani u tabeli 31.

Tabela 31 - HER-2 status određen CISH metodom i steroidni receptori

Steroidni receptori	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
<b>Estrogen</b>				Wilcoxon rank sum*
Prosek (SD)	4.49 (3.41)	2.36 (3.06)	3/346	W=10391;
Medijana (opseg)	6 (0-8)	0 (0-8)	(0.87%)	p=4.18·10 <sup>-6</sup>
<b>Estrogen pozitivnost</b>				Fisher Exact Test
ER negativno (≤3)	90(38.79%)	42(63.64%)		p=0.00017
ER granicna vrednost (=4)	4(1.71%)	3(4.55%)	3(100%)	
ER pozitivno (>4)	138(59.48%)	21(31.82%)		
<b>Estrogen kategorije (poz./neg.)</b>				Pearson $\chi^2$ test
ER negativno (≤3)	90(38.79%)	42(63.64%)	0(0%)	$\chi^2_1=12.85$ ;
ER ≥4	142(61.21%)	24(36.36%)	3(100%)	p=0.00034
<b>Progesteron</b>				Wilcoxon rank sum*
Prosek(SD)	3.94 (3.41)	1.92 (2.82)	3/346	W=10192;
Medijana (opseg)	5 (0-8)	0 (0-8)	(0.87%)	p=1.55·10 <sup>-6</sup>
<b>Progesteron pozitivost</b>				Pearson $\chi^2$ test
PR negativno (≤3)	100(43.1%)	46(69.7%)	1(33.33%)	$\chi^2_1=17.47$ ;
PR granicna vrednost (=4)	12(5.17%)	5(7.58%)	0(0%)	p=0.00016
PR pozitivno (>4)	120(51.72%)	15(22.73%)	2(66.67%)	
<b>Progesteron kategorije(poz./neg.)</b>				Pearson $\chi^2$ test
PR negativno (≤3)	100(43.1%)	46(69.7%)	1(33.33%)	$\chi^2_1=14.54$ ;
PR ≥4	132(56.9%)	20(30.3%)	2(66.67%)	p=0.00014

\*Wilcoxon rank sum test with continuity correction

U CISH+ u odnosu na CISH- podgrupu vrednosti estrogena i progesterona su značajno niže i značajno su frekventnije ER- i PR- kategorije.



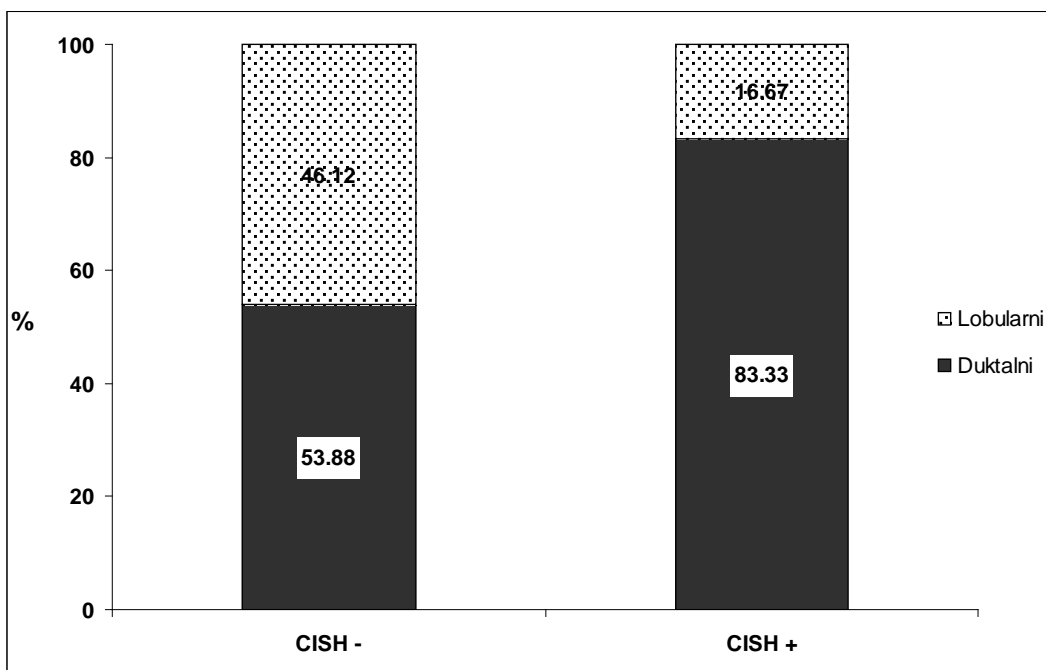
4.3.2.2.6. HER-2 status određen CISH metodom i pT vrednosti histopatoloških tipova tumora (DC/LC)

Rezultati testiranja PH tipova tumora u odnosu na CISH- i CISH+ podgrupe bolesnica su prikazani u tabelama 32 i 33 i na grafikonima 24 i 25.

Tabela 32 – PH tip tumora

PH tip tumora	CISH status - N(%)			Test
	CISH-	CISH+	Bez podataka	
Duktalni	125(53.88%)	55(83.33%)	3(100%)	Pearson $\chi^2$ test $\chi^2_1=18.64$ $p=2 \cdot 10^{-5}$
Lobularni	107(46.12%)	11(16.67%)	0(0%)	

Analizirajući povezanost CISH statusa sa PH tipovima tumora dobijena je statistički značajna razlika (tabela 32). Naime, u obe podgrupe dominira duktalni tip tumora, pri čemu je njegova učestalost značajno veća u CISH+, nego u CISH- podgrupi, dok je lobularni tip značajno učestaliji u CISH-, nego u CISH+ podgrupi.

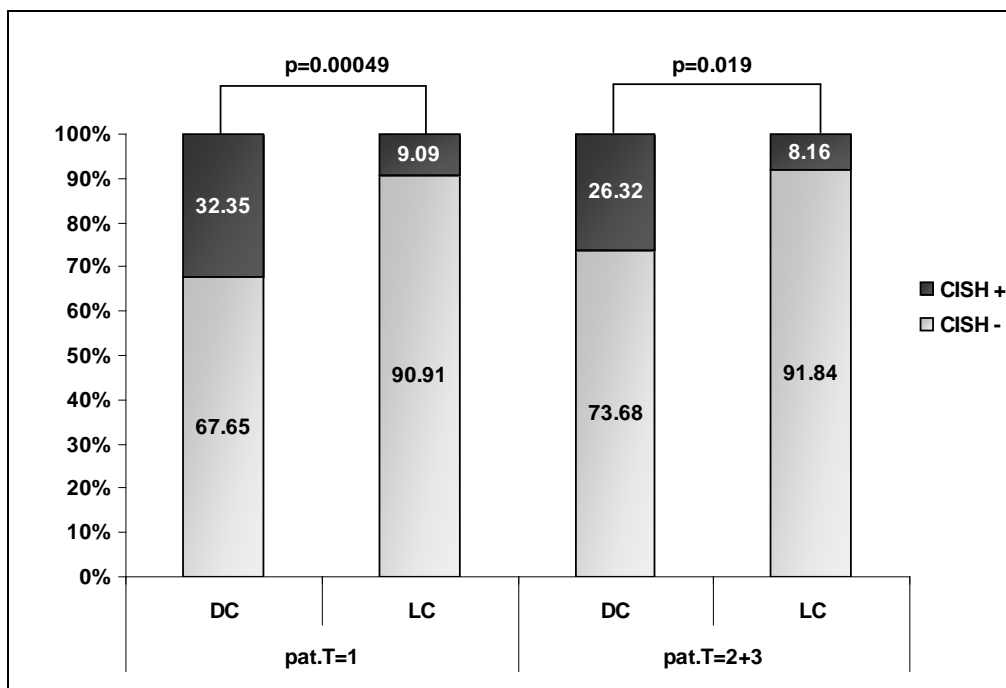


Grafikon 24. PH tip tumora

Analiza CISH amplifikacije u odnosu na tipove tumora pokazala je značajnu statističku razliku i to najviše kod duktalnog karcinoma 55 bolesnica (83,33%) a kod lobularnih karcinoma 11 bolesnica (16,67%). Daljom analizom ustanovljena je značajna statistička razlika i u veličini tumora u odnosu na CISH ampifikaciju. Naime pT1, posebno duktalni karcinomi, pokazali su znatno veću statističku razliku amplifikacije HER-2 onkoproteina u odnosu lobularne karcinome iste ili veće patološki merene veličine.

Tabela 33- CISH+ u odnosu na kategorije PH tipa karcinoma i pT

Karakteristika	DC	LC	Test
<b>pT1</b>	<b>102 (100%)</b>	<b>66 (100%)</b>	Pearson $\chi^2$ test
CISH-	69 (67.65%)	60 (90.91%)	$\chi^2_1=12.16; p=4.9*10^{-4}$
CISH+	33 (32.35%)	6 (9.09%)	
<b>pT2</b>	<b>73 (100%)</b>	<b>48 (100%)</b>	Fisher exact test
CISH-	55 (75.34%)	44 (91.67%)	p=0.0294
CISH+	18 (24.66%)	4 (8.33%)	
<b>pT3</b>	<b>3 (100%)</b>	<b>1 (100%)</b>	Fisher exact test
CISH-	1 (33.33%)	1 (100%)	p=1
CISH+	2 (66.67%)	-	
N (%)	178 (100%)	115 (100%)	-



Grafikon 25. CISH+ u odnosu na PH tip Ca i kategorije pT1 i pT2+3

## 5. DISKUSIJA

S obzirom na specifičnost problematike, većina do sada objavljenih studija u ovoj oblasti su retrospektivne, najčešće bazirane na hospitalnim serijama i relativno velikim brojem bolesnika. Nedostatak prospektivnih studija je što zahtevaju izuzetno dugi, praktično neograničeni period istraživanja. Do sada sprovede neprospektivne studije su ograničene kratkim vremenom praćenja (1-5 godina od postavljanja dijagnoze) i nedovoljne da daju odgovore na kompleksnu povezanost prognostičkih i prediktivnih faktora rizika za karcinom dojke.

Pre 25 godina Salamon i autori su otkrili da je amplifikacija HER-2 onkoproteina udružena sa lošijim ishodom bolesti [14]. Jedna od najvećih meta analiza koje je objavio Ross sa saradnicima obuhvatala je više od 27000 bolesnica sa karcinomom dojke. Analizirani su rezultati 81 studije, univarijantnom ili multivarijantnom metodom. U više od polovine studija potvrđeno je da je pozitivan HER-2 status nezavisni faktor loše prognoze. Ovakvi rezultati su dobijeni bez obzira na metodologiju određivanja HER-2 statusa, koja se u međuvremenu menjala i usavršavala [22].

Učestalost HER-2 amplifikacije (c-erbB-2 gena) potvrđena CISH metodom u grupi naših bolesnica iznosi 20,81%, što je za više od 5% u odnosu na HER-2 overekspresiju utvrđenu IHH metodom (15,03%). Ovi nalazi se uklapaju sa objavljenim rezultatima koji daju razlike u HER-2 overekspresiji utvrđivanoj IHH metodom sa HER-2 amplifikacijom utvrđenom FISH ili u našem radu CISH metodom, gde od većine objavljenih i u uvodu navedenih, izdvajamo radove Achima sa saradnicima i Bharagve sa saradnicima [78,79].

Poredeći godine starosti i starosnu dob kroz kategorije (granična vrednost je iznosila 45), kao i menstrualni status i opštu i porodičnu anamnezu vezanu za dojku, nismo dobili značajnost statističke razlike u odnosu na CISH pozitivnost. Godine starosti ( $p=0.41$ ). Starosna dob ( $p=0.31$ ). Menstrualni status ( $p=0.54$ ). Porodična anamneza opšta ( $p=0.77$ ), vezano za dojku ( $p=0.5$ ). Ovim smo potvrdili da se opšti prognostički faktori ne mogu dovesti u direktnu vezu sa c-erb-B-2 genskom amplifikacijom, iako su značajni faktori rizika, a što su svojim radovima pokazali i drugi istraživači (Dirier, El Sagfir i Finek sa saradnicima) [27,80,81].

U daljim analizama testirali smo specifične faktore rizika koji su i prognostički ali

i prediktivni faktori.

Najčešća lokalizacija tumora je bila u lateralnim kvadrantima 244 bolesnice (70,52%), u medijalnim kvadrantima kod 58 bolesnica (16,76%) a u centralnom kvadrantu najmanja 33 bolesnice (9,54%). Testirajući njihovu međuzavisnost sa CISH pozitivnošću nismo došli do statistički značajne razlike ( $p=0.65$ ). Time smo utvrdili da lokalizacija tumora nije u međuzavisnosti sa HER-2 amplifikacijom.

U kliničkoj TNM klasifikaciji najveći je broj T2 tumora 193 (55,78%), potom T1 128 (36,99%), T3 19 (5,49%) i T0 6 (1,73%). Klinički N0 status je imalo 189 bolesnica (54,62%), N1 157 bolesnica (45,38%). Iz ovih rezultata proistekli su i nalazi kliničkih stadijuma. U inicijalnom kliničkom stadijumu I je bilo 90 bolesnica (26,01%) a u stadijumu II 256 bolesnica (73,99%). Testirajući njihovu međuzavisnost u odnosu na HER-2 amplifikaciju nismo utvrdili statistički značajnu međuzavisnost Klinički T ( $p=0.17$ ). Klinički N ( $p=0.78$ ) Klinički stadijum bolesti ( $p=0.73$ ). Svakako, nodalni status je važan u prognozi bolesti (Andrulic sa saradnicima), ali u odnosu na postavljene ciljeve, bitan zaključak je da nismo dokazali korelaciju kliničkog regionalnog aksilarnog nodalnog statusa sa HER-2 amplifikacijom utvrđenu CISH metodom [82,83].

Tip hiruške intervencije u inicijalnom lečenju karcinoma dojke nije se mogao predvideti unapred u odnosu na HER-2 amplifikaciju. HER-2 status je određivan postoperativno a tip hiruške intervencije je bio determinisan preoperativnim i intraoperativnim (EX tempore) nalazima. Poštednih operacija je bilo 169 (48,84%) a radikalnih 177 (51,16%).

Analizirajući patološki T i patološki N uključujući u analizu i broj odstranjenih limfnih nodusa, kao i postoperativni (patološki) stadijum bolesti koji je proistekao iz patološkog T i N, nismo dobili statistički značajnu razliku u odnosu na CISH amplifikaciju. Patološki T ( $p=0.28$ ), patološki N ( $p=0.81$ ), patološki stadijum bolesti ( $p=0.51$ ). Značajan zaključak ovih analiza u odnosu na postavljene ciljeve, je da i patološki N, kao i klinički, ne korelira sa CISH amplifikacijom. Do ovog zaključka došli smo uzimajući u obzir i poređenje stadiranja kliničkog T i N i kliničkog stadijuma bolesti sa patološkim pT i pN i patološkim stadijumom bolesti. Nalazi adekvatno stadiranih bolesnica po stadijumima bolesti 243 (64,45%), podstadiranih 31 (8,96%) i prestadiranih 60 (17,34%), nisu uticali na rezultat statističke analize.

Po tipu tumora najzastupljeniji su bili duktalni karcinomi 183 (52,89%), lobularni 118 (34,10%) a ostalih 45 (13,01%). Koristeći Fisher Exact Test dobili smo statistički značajnu razliku u odnosu na tip tumora prema CISH pozitivnosti ( $p=4.22 \cdot 10^{-5}$ ). Iako se ovakvi nalazi podudaraju sa većinom sličnih dobijenih nalaza, a među kojima su bila prva istraživanja Harrisa i saradnika još 1984. godine, to je bio i glavni povod da u sledećoj fazi formiramo podgrupu samo duktalnih i lobularnih karcinoma [84].

Pre formiranja podgrupe DC/LC uradili smo analize ostalih faktora rizika u osnovnoj grupi.

Testirajući vrednosti steroidnih receptora u odnosu na CISH pozitivnost koristili smo srednju vrednost i medijanu (opseg). Estrogen i progesteron vrednosti po skorovima smo određivali u grupama. Skor 3 i manje je negativan (prva grupa), skor 4 je granična vrednost (druga grupa) a više od 4 je smatran pozitivnim nalazom (treća grupa). Zbog lakšeg testiranja, a u neposrednoj vezi radi primene ovih nalaza u kliničkoj praksi, estrogen i progesteron vrednosti smo podelili u dve kategorije. Skor manji od 3 je smatran negativnim a skor 4 i više pozitivnim nalazom. Posle analiziranja dobili smo statistički značajnu razliku za obe kategorije u odnosu na CISH vrednosti. Naime, estrogen pozitivna kategorija je bila zastupljena u 61,21% bolesnica ( $p=3 \cdot 10^{-5}$ ), progesteron pozitivna kategorija je bila zastupljena kod 56,9% bolesnica ( $p=4 \cdot 10^{-5}$ ). Vrednosti za obe kategorije su dobijene u grupi bez CISH amplifikacije. Ovo se podudara sa nalazima Cianfroccae i Joensuu sa saradnicima i uklapa se u većinu nalaza sličnih istraživanja [85,86].

Analizirajući histološke i nuklearne graduse kao klasične faktore rizika, koje je Bloom prezentovao još davne 1957. godine, a dopunio Fisher B. 1969. godine, dobili smo sledeće rezultate. Histološki gradus 2 je imalo 262 bolesnica (87,04%), gradus 1 je imalo 16 bolesnica (5,32%) a gradus 3 11 bolesnica (3,99%). Nuklearni gradus 2 je takođe imao najveći broj bolesnica 242 (80,4%), gradus 3 je imalo 27 bolesnica (8,97%) i gradus 1 je imalo 26 bolesnica (8,64%). U odnosu na CISH pozitivnost dobili smo statistički značajnu razliku za nuklearni ( $p=0.00135$ ) i za histološki gradus ( $p=0.015$ ). CISH pozitivnost je bila značajno prisutnija kod većih gradusa [87].

Zbog dobijenih statističkih značajnosti odlučili smo da formiramo podgrupu samo duktalnih i lobularnih karcinoma i izvršimo retestiranje po svim parametrima. Formirana podgrupa je imala 301 bolesnicu.

Učestalost HER-2 amplifikacije (c-erbB-2 gena) potvrđena CISH metodom u formiranoj podgrupi 301 bolesnica (DC/LC), iznosi 21,93%, što je za više od 5% u odnosu na HER-2 overekspresiju utvrđenu IHH metodom (15,95%). Ovi nalazi dobijeni u podgrupi se bitno ne razlikuju u odnosu na one dobijene u osnovnoj grupi.

Poredeći godine starosti i starosnu dob kroz kategorije (granična vrednost je iznosila 45), kao i menstrualni status, porodičnu anamnezu za druge malignne bolesti i porodičnu i ličnu anamnezu vezanu za dojku, nismo dobili značajnost statističke razlike u odnosu na CISH pozitivnost, što se takođe slaže sa rezultatima u osnovnoj grupi.

Najčešća lokalizacija tumora je bila u lateralnim kvadrantima 212 bolesnica, u medijalnim kvadrantima kod 50 bolesnica, a u centralnom kvadrantu najmanja, 30 bolesnica. Testirajući njihovu međuzavisnost sa CISH pozitivnošću nismo došli do statistički značajne razlike, koja se nije pokazala ni u osnovnoj grupi. Time smo utvrdili da lokalizacija DC/LC tumora nije u međuzavisnosti sa HER-2 amplifikacijom.

U kliničkoj TNM klasifikaciji najveći je broj bolesnica su imale tumor T2 (167), potom T1 (114), T3 (14) i T0 (6). Klinički N0 status je imalo 162 bolesnica a N1 139 bolesnica. Iz ovih rezultata proistekli su i nalazi kliničkih stadijuma. U inicijalnom kliničkom stadijumu I je bilo 79 bolesnica, a u stadijumu II 222 bolesnica. Testirajući njihovu međuzavisnost u odnosu na HER-2 amplifikaciju nismo utvrdili statistički značajnu međuzavisnost, što je sličan nalaz kao i za osnovnu grupu.

Tip hiruške intervencije u inicijalnom lečenju karcinoma dojke nije se mogao predvideti unapred u odnosu na HER-2 amplifikaciju. HER-2 status je određivan postoperativno a tip hiruške intervencije je bio determinisan preoperativnim i intraoperativnim (EX tempore) nalazima. Poštednih operacija je bilo 150 (49,83%) a radikalnih 151 (50,17%).

Analizirajući patološki T i patološki N uključujući u analizu i broj odstranjenih limfnih nodusa, kao i postoperativni (patološki) stadijum bolesti koji je proistekao iz patološkog T i N, nismo dobili statistički značajnu razliku u odnosu na CISH amplifikaciju, što je takođe bio nalaz i u osnovnoj grupi. Značajan zaključak ovih analiza u odnosu na postavljene ciljeve, je da i patološki N ne korelira sa CISH amplifikacijom. Do ovog zaključka došli smo uzimajući u obzir i poređenje stadiranja kliničkog T i N i kliničkog stadijuma bolesti sa patološkim pT i pN i patološkim stadijumom bolesti. Razlike u kliničkom i patološkom stadiranju bolesti odgovaraju

nalazima u osnovnoj grupi.

Slične nalaze, čak favorizujući veće tumore (pT3), dobili su Ake i saradnici 1990. godine, kao i Toikkanen sa saradnicima 1992. godine. Ovi nalazi su u suprotnosti sa rezultatima koje smo mi dobili u daljim analizama samo CISH pozitivnih karcinoma analizirajući ih po PH tipu unutar pT kategorija (veličina) [88,89].

Po tipu tumora najzastupljeniji su bili duktalni karcinomi kod 183 bolesnica (60,8%) a lobularni znatno manje kod 118 bolesnica (39,2%). Testirajući nalaze dobili smo statistički značajnu razliku u odnosu na tip tumora prema CISH pozitivnosti ( $p=2 \cdot 10^{-5}$ ). Rezultati naše studije su u saglasnosti sa većinom podataka iz literature. Referentna literatura je navedena u prethodnim poglavljima, a načešće citirani su rezultati istraživanja Lewisa i saradnika, Prati i saradnika, Huang i saradnika, Diriera i saradnika, Aksu i saradnika, Dowsetta i saradnika, Slamona i saradnika [13,20,21,27,90,91,92].

Testirajući vrednosti steroidnih receptora u odnosu na CISH pozitivnost koristili smo srednju vrednost i medijanu (opseg). Estrogen i progesteron vrednosti po skorovima smo određivali u grupama. Skor 3 i manje je negativan, skor 4 je granična vrednost a više od 4 je smatran pozitivnim nalazom. Zbog lakšeg testiranja, a u neposrednoj vezi radi primene ovih nalaza u kliničkoj praksi, estrogen i progesteron vrednosti smo podelili u dve kategorije. Skor manji od 3 je smatran negativnim a skor 4 i više pozitivnim nalazom.

Posle analiziranja dobili smo statistički značajnu razliku za sve kategorije u odnosu na CISH pozitivnost, što se podudara sa nalazima dobijenim u osnovnoj grupi.

Analizirajući histološke i nuklearne graduse kao klasične faktore rizika dobili smo sledeće rezultate. Histološki gradus 2 je imalo 262 bolesnica (87,04%), gradus 1 je imalo 16 bolesnica (5,32%) a gradus 3 11 bolesnica (3,99%). Nuklearni gradus 2 je, takođe, imao najveći broj bolesnica 242 (80,4%), gradus 3 je imalo 27 bolesnica (8,97%) i gradus 1 je imalo 26 bolesnica (8,64%). Ovi su nalazi identični za oba gradusa u odnosu na osnovnu grupu od 346 bolesnica. U odnosu na CISH pozitivnost dobili smo za oba gradusa statistički značajnu razliku. CISH pozitivnost je bila značajno prisutnija kod većih gradusa (gradus 2 i 3).

Zbog sve većeg broja publikovanih radova koji sa dilemom upoređuju veličinu primarnog karcinoma dojke sa HER-2 amplifikacijom, kao i drugim faktorima rizika,

odlučili smo da dalju analizu uradimo po PH tipu karcinoma unutar kategorija pT po CISH amplifikaciji. Utvrdili smo da je statistički značajno veća učestalost CISH amplifikacije kod duktalnih karcinoma, a naročito kod onih do 2cm. (pT1) u odnosu na lobularne karcinome. Slične nalaze dobili su i Allred sa saradnicima 1992. godine, kao i Junnan sa saradnicima koji je svoje nalaze publikovao 2012. godine. Potvrdu rezultata našeg istraživanja pronašli smo i u zaključcima radova Ana i saradnika i Harolda i saradnika [93,94,95,96].

Radovi Parise i saradnika, Kelly i saradnika i Roisina i saradnika, istovremeno analiziraju više faktora rizika. Veličinu i HP tumora, nodalni status, status steroidnih receptora i status HER-2 onkoproteina. Bez decidnih zaključaka, u njihovim istraživanjima se nameće sve prisutnija dilema: koji je faktor rizika važniji u adjuvantnom pristupu lečenja [97,98,99].

Iako to nije tema ovog istraživanja, nemoguće je bilo ignorisati. Možda najbolji prikaz ovako različitih stavova koji određuju vrstu lečenja i prognozu bolesti, daje Diana Crivellari, iznoseći rezultate dve velike slične retrospektivne studije [100].

Sličnu dilemu u svojim radovima iznose i Swede i saradnici, Curigliano i saradnici i Azizun-Nisa i saradnici [101,102,103].

Kako su poštedne operacije kod ranog karcinoma dojke, već dugo standard u lečenju, adjuvantni pristup zavisi od procene nalaza dobijenih u standardnoj HP analizi [104,105,106,107,108].

Mišljenja smo da svaka poštedna operacija u toku preparisanja tkiva – tumorektomije, stvara mogućnost za lokalnu diseminaciju. Takođe, i sentinel biopsija, ukoliko su stražarski limfni nodusi pozitivni, stvara mogućnost za lokalnu diseminaciju. Imajući u vidu mogućnost preoperativne HP dijagnostike core biopsijom, kao i određivanje, histološkog i nuklearnog gradusa, nalaza steroidnih i HER-2 receptora, nameće se zaključak da se i kod malih tumora kliničkog stadijuma I i II, pogotovo za duktalni karcinom, inicijalno lečenje može započeti primenom neoadjuvantne hemioterapije, kao i primenom monoklonskog antitela Trastuzumab-a [25, 26,109,110,111,112].

Trastuzumab deluje na više različitih načina, ali jedan od najznačajnijih mehanizama dejstva je aktivacija imunog odgovora organizma, koji putem antitelo-zavisne ćelijski posredovane citotoksičnosti (ADCC, *antibody-dependent cellular*



*cytotoxicity*) dovodi do smrti tumorskih ćelija zaostalih ili diseminovanih u toku inicijalnog hiruškog lečenja [113].

Efikasnost ovog leka u tretmanu bolesnica sa agresivnom formom HER2 pozitivnih karcinoma dojke prvi put je dokazana 1998. godine, u klinickoj studiji u kojoj je Herceptin korišćen kao druga i treća linija monoterapije kod žena sa metastatskom bolešću koje su prethodno bile tretirane hemioterapijom [13].

Primenjen u prvoj liniji metastatskog karcinoma dojke u kombinaciji sa taksanima Herceptin, dokazano je, poboljšava sve parametre klinickog odgovora uključujući i preživljavanje [114,115].

U skorije vreme, prospektivne randomizirane studije koje je sproveo u Americi National Surgical Adjuvant Breast Project (NSABP) B-31 i Breast Cancer Intergroup Study (N-9831), a u Evropi Herceptin Adjuvant trial (HERA), dokazale su da adjuvantna primena trastuzumaba u trajanju od 1 godine, nakon primenjene standardne hemioterapije, dovodi do smanjenja rizika od recidiva i smanjenja mortaliteta kod bolesnica sa HER2 pozitivnim ranim stadijumom karcinoma dojke [116,117,118,119,120]

Ispitivanjem međuzavisnosti ekspresije HER-2 onkoproteina u primarnom tumoru i drugih (klasičnih) faktora prognoze (vrednosti steroidnih receptora, histološkog i nuklearnog gradusa), uz očekivane korelacije, mogla bi se preciznije odrediti biološka agresivnost tumora i time, verovatno, uticati na postojeće modalitete lečenja. Naučni doprinos doktorske teze, a iz koga će proizaći i klinički doprinos, će se odnositi na mogućnost redefinisavanja indikacija za sve modalitete lečenja, a naročito za primenu adjuvantne/neoadjuvantne zračne i hemio/hormono terapije kao i terapije monoklonskim antitelom – trastuzumab-om [18,121,122,123].

Bolesnice sa HER-2 overekspresijom (3+) imaju lošiji terapijski odgovor na hormonoterapiju tamoksifenom, a bolji terapijski odgovor na primenu lekova iz grupe inhibitora aromataze treće generacije. Takođe, overekspresija HER-2 u primarnom tumoru može uticati na izbor hemioterapije, (antraciklinska ili neantraciklinska hemioterapija ili taksanske kombinacije) ili kombinaciju sa trastuzumab-om [124,125].

Ispitivanje povezanosti ekspresije HER-2 sa kliničkim i patološkim stadijumom lokalne i regionalne bolesti prema TNM i pTNM klasifikaciji, kao i ostalim definisanim

faktorima rizika, opravdava određivanje HER-2 statusa u inicijalnoj patološkoj dijagnostici operabilnog karcinoma dojke, kliničkog stadijuma I i II [126,127].

## 6. ZAKLJUČAK

Naše naučno istraživanje je eksperimentalno-klinička studija, sprovedena u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u periodu 2006.-2009. godine, u koju je bilo uključeno 346 bolesnica kliničkog stadijuma I i II, a na osnovu dobijenih rezultata izveli smo sledeće zaključke:

1. U osnovnoj grupi od 346 bolesnica, u odnosu na starosnu dob, porodičnu i ličnu anamnezu, menstrualni status, veličinu i lokalizaciju tumora, nismo dobili statistički značajnu korelaciju sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom.
2. Klinički i patološki stadijum istostranih aksilarnih limfnih nodusa, prema kliničkom i patološkom TNM stadiranju bolesti, kod unicentričnog primarno operabilnog karcinoma dojke, nije u statistički značajnoj korelaciji sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom.
3. Potvrdili smo statistički značajnu učestalost HER-2 amplifikacije određene CISH metodom kod duktalnih karcinoma kliničkog i patološkog stadijuma 1,2 i 3 u odnosu na druge karcinome istih stadijuma bolesti prema TNM klasifikaciji ( $p=4.22 \cdot 10^{-5}$ ).
4. Potvrdili smo obrnuto srazmernu korelaciju steroidnih receptora sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom. ER ( $p=3 \cdot 10^{-5}$ ), PR ( $p=4 \cdot 10^{-5}$ ).
5. Potvrdili smo statistički značajnu korelaciju histološkog ( $p=0.015$ ) i naročito nuklearnog gradusa ( $p=0.00135$ ), sa HER-2 amplifikacijom utvrđenu CISH metodom.
6. Zbog dobijenih statističkih značajnosti odlučili smo da formiramo podgrupu samo duktalnih i lobularnih karcinoma i izvršimo retestiranje po svim parametrima. Formirana podgrupa je imala 301 bolesnicu. Nalazima dobijenim u podgrupi u odnosu na starosnu dob, porodičnu i ličnu anamnezu, menstrualni status, veličinu i lokalizaciju tumora, nismo dobili statistički značajnu korelaciju sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom. Takođe, klinički i patološki stadijum istostranih aksilarnih limfnih nodusa, prema kliničkom i patološkom TNM stadiranju bolesti, kod unicentričnog

primarno operabilnog karcinoma dojke, nije u statistički značajnoj korelaciji sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom.

7. Potvrdili smo statistički značajnu učestalost HER-2 amplifikacije određene CISH metodom kod duktalnih karcinoma kliničkog i patološkog stadijuma 1,2 i 3 u odnosu na lobularne karcinome istih stadijuma bolesti prema TNM klasifikaciji ( $p=2 \cdot 10^{-5}$ ).
8. Potvrdili smo obrnuto srazmernu korelaciju steroidnih receptora sa HER-2 amplifikacijom potvrđenom CISH metodom. ER ( $p=0.00034$ ), PR ( $p=0.00014$ ).
9. Potvrdili smo statistički značajnu korelaciju histološkog ( $p=0.079$ ) i nuklearnog gradusa ( $p=0.00371$ ), sa HER-2 amplifikacijom potvrđenu CISH metodom.
10. Upoređujući po CISH amplifikaciji karcinome unutar podgrupe DC/LC, sa njihovom veličinom po pTNM stadiranju, došli smo do zaključka da je kod malih DC (pT1) u odnosu na male LC (pT1), pokazana je statistički značajno veća učestalost CISH amplifikacije. pT1 DC/LC ( $p=4.9 \cdot 10^{-4}$ ), kao i na pT2 DC/LC ( $p=0.019$ ). Grupa pT3 DC/LC tumora nije pokazala statistički značajnu razliku najverovatnije zbog malog broja bolesnica (4).
11. Zaključili smo da mali duktalni karcinomi (T1/pT1), imaju statistički značajnije veću učestalost HER-2 amplifikacije, da su obrnuto proporcionalni vrednostima steroidnih receptora i da su u direktnoj korelaciji sa histološkim i nuklearnim gradusom tumora.
12. Na osnovu našeg naučnog istraživanja smatramo da je potrebno sprovesti studije na većim kohortama bolesnica sa inicijalno operabilnim karcinomom dojke, u cilju istraživanja povezanosti amplifikacije HER-2 onkoproteina i veličine kao i HP tipa primarnog tumora dojke, koje će ukazati na to da li je potrebno ili ne, kod malih primarnih tumora veličine do 2cm. dukalnog tipa i višeg histološkog i nuklearnog gradusa, primeniti neoadjuvantu terapiju Herceptinom ili ne.

## 7. LITERATURA

1. Stanly K. Women and cancer. *World Health Stat. Q.* 1987; 40, p.267.
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, and Parkin D.M. GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. IARCPress, Lyon, 2004.
3. Ranaboldo CJ, Mithchel A, Boyle GT, et al. Axillary nodal status in women with screendetected breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 1993; 19:130-133.
4. Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi V. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. *Cancer* 1978; 41:1170-1178.
5. Rosen P, Groshen S, Kinne D, et al. Prognosis in T2N0M0 stage I breast carcinoma: a 20 year follow-up study. *J Clin Oncol* 1991; 9:1650-1661.
6. Rosen P, Groshen S, Siago P, et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. A study of 644 patients with median follow- up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989; 7:1239-1251.
7. Joensuu H, Taikkanen S. Cured of breast cancer? *J Clin Oncol* 1995; 13:62-69.
8. Saphner T, Torney D, Gray R. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer after primary therapy. *J Clin Oncol* 1996; 14:2738-2746.
9. Brenner H, Hakulinen T. Are patients with breast cancer before age 50 years ever cured ? *J Clin Oncol* 2002; 22: 432-438.
10. Hudis CA. Trastuzumab- Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med* 2007; 357:39-51.
11. Ross JS, Fletcher .TA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist* 1998;3 :237-252.
12. Sehnitt SJ. Breast cancer in the 21st century: neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol* 2001;14(3):213-218.

13. Lewis F, Jackson P, Lane S, Coast G, Hanby AM. Testing for HER2 in breast cancer. *Histopathology* 2004;45 :207-217.
14. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG et al. Human breast cancer. Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
15. Slamon DJ, Clark GM. Amplification of C-ERB-B2 and aggressive breast tumors? *Science* 1998;240: 1795-1798.
16. De Potter CR. The neu oncogene: more than a prognostic indicator? *Hum Pathol* 1994;25: 1264-1268.
17. Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, et al. Amplification of the c-erb B-2 oncogene in prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:160-163.
18. Paik S, Bryant J, Park C, et al. ErbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph-node positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90: 1361-1370.
19. Carlomagno C, Perone F, Gallo C, et al. C-erbB-2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastasis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2702-2708.
20. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chanh HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J* 2005; 11(6):433-439.
21. Huang HJ, Neven P, Drijckoningen R, et al. Association between tumor characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary breast cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58:611-616.
22. Ros JS, Fletcher JA, Linette GP . The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist* 2003; 8:307-325.

23. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpress HER-2. *N Engl J Med* 2001; 344:183-792.
24. Viani G, Alfonso S, Stefano E, et al. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2 positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007; 7:153.
25. Dinh P, Sotiriou C, Piccart MJ. The evolution of treatment strategies: aiming at the target. *The Breast* 2007; 16: 10-16.
26. Dowsett M et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Annals of Oncology* 2006; 17: 818–826.
27. Dirier A, Burhaneddin-Zincircioglu S, Karadayi B, Isikdogan A, Aksu R. Characteristics and prognosis of breast cancer in younger women. *J BUON* 2009; 14: 619-623.
28. Hamaker ME, Schreurs WH, Uppelschoten JM, Smorenburg CH. Breast cancer in the elderly: retrospective study on diagnosis and treatment according to national guidelines. *Breast J* 2009; 15:26-33.
29. Menard S, Balsari A, Tagliabue E et al. On behalf of the OMEMO group. Biology, prognosis and response to therapy of the breast carcinomas according to HER2 score. *Ann Oncol* 2008; 19: 1706-1712.
30. Meng S, Tripathy D, Shete S, et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *National Academy of Science of the USA(PNAS)* 2004; 25:9393-9398.
31. Sjorgen S, Inganas M, Lindgren A, et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 over expression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. *J Clin Oncol* 1998; 16:462-469.
32. Tandon A, Clarc G, Chamness G, et al. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 7:1120-1128.

33. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.
34. Džodić R. Hirurgija raka dojke. Beograd: Dosije 2005; ISBN-7738-020-5
35. Oprić M, Granić M. editors. Tumori dojke. Beograd: Institut za onkologiju i radiologiju Srbije 1996; ISBN-86-7240-003-1.
36. Hill TD, Khanis HJ, Tyczynski JE, Berkel HJ. Comparison of male and female breast cancer incidence trends, tumor characteristics, and survival. *Ann Epidemiol* 2005; 15/10: 773-780.
37. Parkin DM. Global Cancer Statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-543.
38. Jovićević-Bekić A. Epidemiologija i prevencija raka dojke. In: Nešković-Konstantinović Z, Borojević N, Vučković-Dekić Lj editors. *Novine u dijagnostici i terapiji karcinoma dojke*. Beograd: Akademija medicinskih nauka SLD i Institut za onkologiju i radiologiju Srbije; 2008; Serija B, vol 2(1):p 11-24. ISBN 978-86-85313-84-4.
39. Waljee JF, Hu ES, Ubel PA et al. Effect of esthetic outcome after breast conserving surgery on psycho social functioning and quality of life. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3331–3337.
40. Haagensen CD, Stout AP. Carcinoma of the breast: Criteria of operability. *Ann Surg* 1943;118:859-870.
41. Bugarski M. Karcinom dojke. Beograd: 1981. Savremena administracija
42. Norton L. A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988; 48:7067-7071.
43. Susan E Clare, Faina Nakhlis, John Carl Panetta. Molecular biology of breast metastasis. The use of mathematical models to determine relapse and to predict response to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2:430-435.



44. Kocic B, Filipovic S, Petrovic B, Mijalkovic D, Rancic N, Poultzidi A. Clinical and biological characteristics of breast cancer. *J BUON* 2010; 15: 660-667.
45. Bloom H, Ricardson W, Harries E. Natural history of antreated breast cancer (1805-1933). Comparasion of antreated and treated cases according to histological grade of malignacu. *BMJ* 1962; 2: 213-221.
46. Park S, Jiang Z, Mortenson ED et al. The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity. *Cancer Cell* 2010; 18:160–170.
47. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis. *JAMA* 2011; 305:569-575.
48. Adair F, Berg J, Joubertl, et al. Long-term follow-up of breast cancer patients. The 30- year report. *Cancer* 1974; 33: 1145-1150.
49. Fisher B, Redmond C, Elias EG, Evans J, Foster R, Jochimsen P, Lawrence W, Lerner H, LiCalzi N, Margolese R, et al. Adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview of NSABP findings. *Int Adv Surg Oncol.* 1982;5:65–90.
50. Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project. VIII. Relationship of chemotherapeutic responsiveness to tumor differentiation. *Cancer.* 1983 Jan 15;51(2):181–191.
51. Bonadonna G, Valagussa P, Zambetti M, Bozzoni R, Moliterni A. Milan adjuvant trials for stage I and II breast cancer. In *Adjuvant Therapy of Cancer V*, Salmon, S.E. (ed.). Grune & Stratton: Orlando, FL.1987; p:211
52. Goldhirsch A. Glick JH, Gelber RD et al. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16:1569-1583.
53. Fisher B, Fisher ER, Redmond C. Ten-year results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) clinical trial evaluating the use of L-

phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1986 Jun;4(6):929–941.

54. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Wolmark N. Systemic adjuvant therapy in treatment of primary operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *NCI Monogr*. 1986;(1):35–43.
55. Veronesi U, Salvadori B, Luini A et al. Breast conservation is a safe method in patients with small cancer of the breast. Long-term results of three randomized trials on 1973 patients. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1574-1579.
56. Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R.: The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1996; 22(1):17-22.
57. Olsha O, Shemesh D, Carmon M et al. Resection Margins in Ultrasound-Guided Breast-Conserving Surgery. *Ann Surg Oncol* 2011;18:447-452.
58. McMasters KM, Tuttle TM, Carlson DJ, et al: Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: A suitable alternative to routine axillary dissection in multi-institutional practice when optimal technique is used. *J Clin Oncol* 2000; 18:2560-2566.
59. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al: A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med* 2003; 349:546-553.
60. Miller AR, Thomason VE, Yeh IT, et al: Analysis of sentinel lymph node mapping with immediate pathologic review in patients receiving preoperative chemotherapy for breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 243-247.
61. Tafra L, Lannin DR, Swanson MS, et al: Multicenter trial of sentinel node biopsy for breast cancer using both technetium sulfur colloid and isosulfan blue dye. *Ann Surg* 2001; 233:51-59.

62. Zirngibl C, Steinfeld-Birg D, Vogt H, et al: Sentinel lymph node biopsy before neoadjuvant chemotherapy—Conservation of breast and axilla. *Br Ca Res Treat* 2002; (suppl 1; abstr 516) :76:S129.
63. Fisher B, Gebardt MC. The evolution of breast cancer surgery: past, present and future. *Semin Oncol* 1978; 5:385-394.
64. Hossami N, Hayes D. Review of pre-operative magnetic resonance imaging (MRI) in breast cancer: should MRI be performed on all women with newly diagnosed, early stage breast cancer? *CA Cancer J Clin* 2009; 59:290-302.
65. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969 Jun;63(2):378–383.
66. Di Palma S, Collins N, Bilous M et al. A quality assurance exercise to evaluate the accuracy and reproducibility of chromogenic in situ hybridization for HER2 analysis in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008;61:757-760.
67. Walker RA, Bartlett MS, Dowsett M, et al. HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol* 2008; 61: 818-824.
68. Persos DL, Bui MM, Lowery MC, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for determination of HER-2/neu amplification in breast cancer: a multicenter portability study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:41-48.
69. Bartlett JMS, Forsyth A. HER2 FISH in breast cancer. Chapter 7. In: Roulston JE. Bartlett ./MS. eds. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Vol. 79. Totowa. N./: Humana Press; 2004.
70. Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, et al. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005; II (12): 4393-4399.
71. Hyun CL, Lee HE, Kim KS, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008; 6 1:317-321.

72. Isola T, Tanner M. Chromogenic in situ hybridization in tumor pathology. Chapter 10. In: Roulston JE, Bartlett JMS, eds. *Methods in molecular medicine: molecular diagnosis of cancer*. Vol. 79. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
73. Saez A, Andreu FJ, Segui MA, et al. HER-2 gene amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer: a study of two hundred cases. *Breast* 2006;15:519-527.
74. Marquez A, Wu R, Zhao T, Yu Y, Tao T, Shi Z. Detection of EGFR gene amplification and protein expression by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in a series of archival human cancers. *Diagn Mol Pathol* 2004; 13: 1-8.
75. Zhao T, Wu R, Au A, Marquez A, Yibing Y, Zuorong S. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002; 15(6):657-665.
76. Hanna WM, Kwok K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Mod Pathol* 2006; 19:48 I-48
77. Ivković-Kapicel T, Knežević-Ušaj S. Testiranje receptora humanog epidermalnog faktora rasta 2 u karcinomu dojke. *Med Pregl* 2010; LXIII (1-2): 69-74.
78. Achim W, Christian K, Verena G et al. Effects of guideline adherence in primary breast cancer- A 5- year multi-center cohort study of 3976 patients. *The Breast* 2010; 19: 120-127.
79. Bhargava R, Lal P, Chen B. Chromogenic in situ hybridization for the detection of HER-2/neu gene amplification in breast cancer with an emphasis on tumors with borderline and low-level amplification. *Am J Pathol* 2005; 123:237-243.
80. El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK et al. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *Bio Med Central Cancer* 2006; 6:194. DOI: 10.1186/1471-2407-6-194.

81. Finek J, Holubec L Jr, Topolacan O, Elgrova L, Skalova A, Pecen L. The importance of prognostic factors in premenopausal women with breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27:1893-1896.
82. Andrulis I, Bull s, Blackstein M, et al. Neu/erb/B-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1340-1349.
83. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, et al. HER-2/neu oncogene amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 1990; 50:4332-4337.
84. Harris M, Howell A, Chrissohou M, et al. A comparasion of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating ductal carcinoma of the breast. *BrJ Cancer* 1984; 50:23-26.
85. Cianfrocca M, GoldsteinL. Prognostic and predictiv factors in early breast carcinoma. *Oncologist* 2004; 9: 606-616.
86. Joensuu H, Jorma I, Lundin M, et al. Amplification of erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer. A nation widw population-based study. *Clin Cancer Res* 2003; 9:923-930.
87. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *BrJ Cancer* 1957; 11: 359-377.
88. Åke B, Atul K. T, Helgi S,at al. HER-2/neu Amplification Predicts Poor Survival in Node-positive Breast Cancer. *Cancer Res* July 15, 1990 50; 4332.
89. Toikkanen S, Helin H, Isola J, Joensuu H. Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *JCO* 1992; 10: 1044-1048.
90. Aksu G, Duman C, Gurbuz Y et al. Correlation between c-erbB2 expression, lymphovascular invasion and other biological and clinical prognostic factors and

preoperative tumor markers in patients with early-stage and locally advanced breast cancer. *J BUON* 2011; 16: 52-57.

91. Dowsett M et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 1059–1065.
92. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;15:344(11):783-792.
93. Harold J. Burstein and Eric P. Winer. Refining Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer: T Stands for Trastuzumab, Tumor Size, and Treatment Strategy *JCO* Dec 1, 2009;5671-5673;
94. Ana M. Gonzalez-Angulo, Jennifer K. Litton, Kristine R. Broglio et al, High Risk of Recurrence for Patients With Breast Cancer Who Have Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive, Node-Negative Tumors 1 cm or Smaller. *J Clin Oncol* 2009; 27:5700-5706.
95. Allred D.C, Clark G.M, Tandon A.K, et al HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *JCO* April 1992;vol. 10 no. 4:599-605.
96. Junnan Li, Xiaodong Liu and Zhongsheng Tong\*. Clinical Features and Survival Analysis of T1mic, a, bN0M0 Breast Cancer *J. Clin. Oncol.* 2012; 42 (6): 471-476.
97. Roisin M. Connolly and Aditya Bardia. Trastuzumab for Small HER-2+ Breast Cancer: Small Tumor, Big Decision *The Oncologist* Apr 1, 2012:508-511.
98. Kelly C. M, \*Pritchard K. I, Trudeau M, Andreopoulou E, Hess K, Puztai L. Coping with uncertainty: T1a, bN0M0 HER2-positive breast cancer, do we have a treatment threshold? *Ann Oncol* 2011; 22 (11): 2387-2393.
99. Parise C, Bauer K, Caggiano V. Is tumor size important in HER2-positive breast cancer? *J Clin Oncol* 28:15s, 2010 (suppl; abstr 1582)

100. Diana Crivellari. Small Tumor Size and Node-Negative HER2-Positive Breast Cancer: A Step Forward for a Better Treatment? *JCO* 2009; Vol.28, No 16: p257
101. Azizun-Nisa, Bhurgri Y, Raza F, Kayani N. Comparison of ER, PR and HER-2/neu (C-erb B 2) reactivity pattern with histologic grade, tumor size and lymph node status in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008 Oct-Dec;9(4):553-556.
102. Swede H, Moysich KB, Winston JS, et al. Variation of the prognostic significance of HER-2 expression in breast cancer according to tumor size. *Breast J*. 2003; 9(2): 98-105.
103. Curigliano G, Viale G, Bagnardi V, et al. Clinical relevance of HER2 overexpression/amplification in patients with small tumor size and node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:5693–5699.
104. Lialiaris TS, Georgiou G, Sivridis E et al. Prognostic and predictive factors of invasive ductal breast carcinomas. *J BUON* 2010; 15: 79-88.
105. Kaplan HG, Malmgren JA. Impact of triple negative phenotype on breast cancer prognosis. *Breast J* 2008;14:456-463.
106. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, et al. American Society of Clinical Oncology. Updates of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 2006; 24:5091-5097.
107. Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER-2/neu oncogene in breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002; 59:102-108.
108. Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H et al. First results of the NeoALTTO trial (BIG 01-06 / EGF 106903): A phase III, randomized, open label, neoadjuvant study of lapatinib, trastuzumab, and their combination plus paclitaxel in women with HER2-positive primary breast cancer. 33rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 2010 (abstr S3-3).
109. Dowsett M et al. Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1

year of trastuzumab: the HERA trial. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27: 2962–2969.

110. Dowsett M et al. Relationship between quantitative estrogen and progesterone receptor expression and human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) status with recurrence in the arimidex, tamoxifen, alone or in combination trial. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 1059–1065.
111. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2 positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:1673-1684.
112. Smith IE, Lipton L. Preoperative neoadjuvant medical therapy for early breast cancer. *Lancet Oncol* 2001; 2:561-570.
113. Nahta R, Esteva FJ. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 2006;8:215.
114. Marty M, Cognetti F, Maraninchi O, Snuder R, Mauriac L, Taubiana-Hulin M, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment. *J Clin Oncol* 2005;23:4265-4274.
115. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344(11):783-792.
116. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353: 1673-1684.
117. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353: 1659-1672.
118. Badve SS. Standardisation of HER2 testing-inconsistency raises questions. *Connect Dako* 2008;II :58-60.



119. Dhesy-Third B, Pritchard KI, Messersmith H, O'Malley F, Elavathil L, Trudeau M. HER2/neu in sistematic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 109:209-229.
120. Yeon C, Pegram MD. Anti-erbB-2 antybody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005;23:391-409.
121. Ellis P, Smith I, Ashley S, et al: Clinical prognostic and predictive factors for primary chemotherapy in operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16:107-114.
122. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER-2 for metastatic breast cancer that overexpress HER-2. *N Engl J Med* 2001; 344:183-792.
123. Konecny G, Pauletti G, Pegram M. Qantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Ins* 2003; 95:142-153.
124. Wang Y, Klijn JGM, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymh-node negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; 365:671-679.
125. Winer E, Piccart-Gebhart M, Rugo H, et al. Menagement of HER2-positive breast cancer. In: *ASCO Educional Book* 2006; 3-14.
126. Aksu G, Duman C, Gurbuz Y et al. Correlation between c-erbB2 expression, lymphovascular invasion and other biological and clinical prognostic factors and preoperative tumor markers in patients with early-stage and locally advanced breast cancer. *J BUON* 2011; 16: 52-57.
127. Aldred DC, Clarc GM, Tandon AK et al. HER-2/neu in node negative breast cancer. Prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 599-605.

## 8. SKRAĆENICE KORIŠĆENE U TEKSTU

TNM – Tumor, Nodus, Metastaza

UICC - Unija za Međunarodnu Kontrolu Raka

WHO - Svetska Zdravstvena Organizacija

HER 2 - human epidermal growth factor receptor 2 (humani epidermalni faktor rasta)

HER 2 - neu kod miševa koji su imali neuroblastom

EGF - epidermalni faktor rasta ili erb B za celu grupu

Her 2 - neu erb B2 humani EGF

HER - receptor za humani epidermalni faktor rasta

EGFR - receptor za epidermalni faktor rasta

DC - duktalni karcinom

LC - lobularni karcinom

ADCC - antitelo-zavisna ćelijski posredovana citotoksičnost

NSABP - National Surgical Adjuvant Breast Project

HERA - HERceptin® Adjuvant trial

IHH - imunohistohemija

ISH - in situ hibridizacija

FISH - fluorescentna in situ hibridizacija

CISH - hromogena in situ hibridizacija

UK NEQAS - United Kingdom National External Quality Assessment Service

NordiQC - Nordic immunohistochemical Quality Control

USCAP - United States and Canadian Academy of Pathology

## 9. BIOGRAFIJA

Dr Nebojša Đ. Miletić je rođen u Nišu, aprila 1960. godine. Oženjen je i otac je dvoje dece. Diplomirao je 1985. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Specijalistički ispit iz opšte hirurgije položio je 1992. godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Odbranio je magistarsku tezu "Postoperativna psihogena trauma kod amputacije dojke" u Centru za multidisciplinarnu studiju Univerziteta u Beogradu 2000. godine, pod mentorstvom Prof. Univ. dr Ivane Golubičić. Zvanje "Primarijus" stekao je odlukom Ministarstva zdravlja Republike Srbije, 2004. godine.

Na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije zaposlen je od 1989. godine. Trenutno je na funkciji načelnika operacionih sala sa Dnevnom hiruškom bolnicom.

Učestvovao je u projektu br. 1649 Ministarstva za nauku Srbije 2002-2004.

Dr Nebojša Đ. Miletić je 1997. godine boravio na tomesečnom stručnom usavršavanju u Evropskom Institutu za Onkologiju u Milanu - „Škola rekonstruktivne hirurgije dojke“. U okviru stručnog usavršavanja iz oblasti onkologije učestvovao je na veše domaćih i stranih kurseva i kongresa.

U toku profesionalne karijere objavio je, kao autor ili koautor, 51 stručni rad u domaćim i stranim časopisima, knjigama sažetaka i zbornicima radova. Od toga jedan rad je objavljen u međunarodnom časopisu, štampan u celini, referisan u indeksnim bazama Current Contents (CC) ili Science Citation Index-u (SCI) M21=8 bodova, impact factor 7,178. Jedan rad je objavljen u međunarodnom časopisu, štampan u celini, referisan u indeksnim bazama SCI expanded M23=3 boda, impact factor 0,6. Tri rada objavljena su u domaćim časopisima, štampani u celini, koji nisu indeksirani u pomenutim indeksnim bazama, ali se nalaze u MEDLINE M51=2 boda. Jedan rad objavljen je u domaćem časopisu nacionalnog značaja, u celini M52=1,5 boda. Jedan rad saopšten je na međunarodnom skupu, štampan u celini M33=1 bod. 18 radova je saopšteno na međunarodnim skupovima, štampanih u izvodu M34=0,5 boda. 25 rada je saopšteno na domaćim skupovima, štampanih u izvodu M64=0,2 boda.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Nebojša Đ. Miletić

Broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

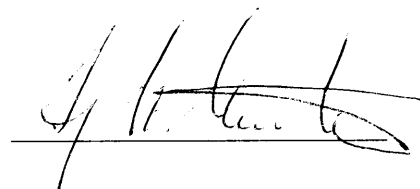
Da je doktorska disertacija pod naslovom

„Ispitivanje korelacije ekspresije her-2 onkoproteina u primarnom tumoru sa  
kliničkim i patološkim stadijumom regionalnih limfnih čvorova u aksili kod  
bolesnica sa operabilnim karcinomom dojke“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 16.08.2012.



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nebojša Đ. Miletić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada „Ispitivanje korelacije ekspresije her-2 onkoproteina u primarnom tumoru sa kliničkim i patološkim stadijumom regionalnih limfnih čvorova u aksili kod bolesnica sa operabilnim karcinomom dojke“

Mentor dr Ivana Golubičić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor dr Svetislav Jelić, naučni savetnik, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Potpisani Nebojša Đ. Miletić

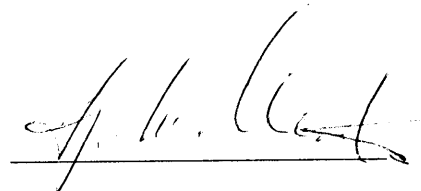
Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datuma odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranta**

U Beogradu, 16.08.2012.



### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Ispitivanje korelacije ekspresije her-2 onkoproteina u primarnom tumoru sa kliničkim i patološkim stadijumom regionalnih limfnih čvorova u aksili kod bolesnica sa operabilnim karcinomom dojke“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 16.08.2012.

**Potpis doktoranta**

