

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tihana Klarica Gembić

ULOGA GLIKOPROTEINA 96 I ANDROGENIH RECEPTORA U
BOLESNICA S KARCINOMOM DOJKE

Doktorski rad

Rijeka, 2025.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Tihana Klarica Gembić

ULOGA GLIKOPROTEINA 96 I ANDROGENIH RECEPTORA U
BOLESNICA S KARCINOMOM DOJKE

Doktorski rad

Mentor: izv. prof. prim. dr. sc. Damir Grebić, dr.med.

Komentorica: izv. prof. dr. sc. Tamara Gulić, mag. bio.

Rijeka, 2025.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Tihana Klarica Gembić

THE ROLE OF GLYCOPROTEIN 96 AND ANDROGEN
RECEPTORS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

DOCTORAL THESIS

Mentor: Assoc. Prof. Damir Grebić, MD, PhD

Co-mentor: Assoc. Prof. Tamara Gulić, mag. bio., PhD

Rijeka, 2025.

Mentor rada: izv. prof. prim. dr. sc. Damir Grebić, dr.med.

Komentorica: izv. prof. dr. sc. Tamara Gulić, mag. bio.

Doktorski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____ (titula, ime i prezime)

2. _____ (titula, ime i prezime)

3. _____ (titula, ime i prezime)

4. _____ (titula, ime i prezime)

5. _____ (titula, ime i prezime)

Rad ima _____ listova.

UDK: _____

PREDGOVOR

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka te Zavodu za fiziologiju i imunologiju i Zavodu za opću patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod mentorstvom izv. prof. prim. dr. sc. Damira Grebića, dr. med. i komentorstvom izv. prof. dr. sc. Tamare Gulić, mag. bio., a u sklopu poslijediplomskog sveučilišnog doktorskog studija „Klinička medicina“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Rad je izrađen u sklopu projekata Potpore Sveučilišta u Rijeci izv. prof. prim. dr. sc. Damira Grebića „Imunomodulacijska svojstva proteina gp96 u bolesnica oboljelih od raka dojke u ovisnosti o njegovim molekularnim podtipovima“ (broj potpore 18.07.2.1.02, broj projekta 871.10.2202), „Glikoprotein 96 i androgen receptori kao novi prognostički i prediktivni čimbenici karcinoma dojke“ (uniri-iz-25-45) i „Metalotionein kao potencijalno novi prediktivni čimbenik karcinoma dojke“ (uniri-iskusni-prirod-23-93) te projekata izv. prof. dr. sc. Tamare Gulić, mag. bio. „Imunoregulacijski mehanizmi stanica urođene imunosti u patogenezi različitih imunofenotipova karcinoma dojke“ (uniri-pr-biomed-19-171498), „Uloga bjelančevine toplinskog šoka 70 u ovisnosti o različitim imunofenotipovima karcinoma dojke“ (uniri-iskusni-biomed-23-1852021) i „Uloga stanica urođene imunosti i bjelančevina toplinskog šoka 70 u karcinomu dojke“ (šifra projekta 100.21.0002).

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Utvrditi izražaj glikoproteina 96 (GP96) i androgenih receptora (AR) na tumorskim stanicama karcinoma dojke te ispitati njihovu povezanost s kliničko-patološkim karakteristikama tumora i zahvaćenošću aksilarnih limfnih čvorova (aLČ) metastazama, kao i povezanost kliničko-patoloških karakteristika, GP96 i AR-a s ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez recidiva bolesti. Također smo ispitali kliničku, prediktivnu i prognostičku vrijednost ekстранodalne ekstenzije (ENE) u limfnom čvoru čuvaru (LČČ).

Materijali i metode: U istraživanje je retrospektivno uključeno 107 pacijentica s cT1-T2 invazivnim karcinomom dojke i metastazom u LČČ, koje su u razdoblju od 2007. do 2016. godine operirane na Klinici za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka i praćene najmanje pet godina. Od arhivskih uzoraka patohistoloških materijala karcinoma dojke Zavoda za patologiju i patološku anatomiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, izrađene su tkivne mikroareje na kojima je učinjena imunohistokemijska (IHC) analiza izražaja GP96 i AR-a. ENE u LČČ je mjeren u najvišem (nvENE) i najširem (nšENE) promjeru. Relativan izražaj gena GP96 određen je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR).

Rezultati: ENE u LČČ najsnažniji je prediktor metastaza u drugim limfnim čvorovima (*engl. non-sentinel lymph node*; nSLN) te većeg broja metastazama zahvaćenih nSLN. Pacijentice s nšENE>nvENE imale su viši rizik za pojavu metastaza u nSLN i lošije preživljenje bez recidiva bolesti. Tumori s niskim izražajem GP96 češće su bili hormonski ovisni, HER2-negativni i s niskim mitotskim proliferacijskim indeksom (Ki-67). Nije utvrđena povezanost izražaja GP96 i AR-a. Hormonski ovisni tumori najčešće su imali niski izražaj GP96 i visoki izražaj AR-a. Visoki izražaj GP96 povezan je s većim rizikom od lokoregionalnog recidiva bolesti, dok je negativan izražaj AR-a povezan s većim rizikom od lokoregionalnog i udaljenog recidiva bolesti. Dob, histološki gradus 3, ekstenzivna intraduktalna komponenta i veći omjer broja pozitivnih i izvađenih limfnih čvorova (*engl. lymph node ratio*; LNR) nezavisni su prediktori ukupnog preživljenja. Histološki gradus 3, ekstenzivna intraduktalna komponenta, veći LNR te negativna ekspresija AR-a povezani su s lošijim preživljenjem bez recidiva bolesti. Razina glasničke RNK za GP96 povišena je u stanicama karcinoma u odnosu na zdravo tkivo dojke. Utvrđena je značajna razlika u razini glasničke RNK za GP96 između trostruko negativnog i luminalnih karcinoma dojke, s višim razinama u trostruko negativnom karcinomu.

Zaključak: ENE u LČČ najsnažniji je prediktor zahvaćenosti i opsega metastaza u nSLN. Izražaj GP96 nije povezan s preživljenjem, dok je AR značajan prognostički čimbenik te bi mogao imati ulogu u planiranju terapije i praćenju pacijentica s karcinomom dojke.

Ključne riječi: Androgeni receptori; Glikoprotein 96; Imunohistokemijska analiza; Karcinom dojke; Limfni čvor čuvar; Prognoza.

SUMMARY

Objectives: The aim of our study is to determine the correlation of glycoprotein 96 (GP96) and androgen receptor (AR) expression with clinicopathological features and the extent of additional axillary lymph node involvement in early-stage breast cancer (BC) patients with sentinel lymph node (SLN) involvement, as well as their impact on 5-year overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). In addition, we also explore the clinical relevance and the predictive and prognostic implications of extranodal extension (ENE) in SLN.

Materials and methods: We retrospectively included 107 female patients with cT1-T2 invasive BC and SLN involvement, who underwent surgery at the Department of General and Oncological Surgery, Clinical Hospital Center Rijeka between 2007 and 2016, and with at least five years of clinical follow-up data. Expression of GP96 and AR was immunohistochemically evaluated on tissue microarrays constructed from two 2-mm diameter cores of formalin-fixed, paraffin-embedded tumour specimens from each patient. ENE in SLN was measured in the highest (HD-ENE) and widest diameters (WD-ENE). Additionally, relative GP96 gene expression was quantified using real-time quantitative PCR (RT-qPCR).

Results: The analysis demonstrated that ENE in SLN was the strongest predictor of metastasis in non-sentinel lymph nodes (non-SLN) and of a higher metastatic burden. Patients with WD-ENE>HD-ENE exhibited an even higher risk of non-SLN metastases and reduced DFS. Tumours with low GP96 expression were more frequently hormone receptor-positive, HER2-negative, and showed lower mitotic proliferative index (Ki-67). No significant correlation was observed between GP96 and AR expression. Hormone receptor-positive tumours typically presented with low GP96 and positive AR expression. High GP96 expression was associated with an increased risk of locoregional recurrence, whereas negative AR expression was correlated with an increased risk of both locoregional and distant recurrence. Additional independent predictors of OS included age, histological grade 3, extensive intraductal component (EIC), and a higher lymph node ratio (LNR). Worse DFS was associated with histological grade 3, EIC, higher LNR, and negative AR expression. Finally, GP96 mRNA levels were significantly higher in BC tissue compared with normal breast tissue. Notably, triple-negative BC showed increased expression relative to luminal subtypes.

Conclusion: ENE in SLN is the strongest predictor of both the presence and the extent of metastases in non-SLN and may also have prognostic significance. While GP96 expression showed no association with survival outcomes, AR expression is a significant prognostic marker, and could serve as a valuable biomarker for treatment planning and follow-up in BC patients.

Keywords: Androgen receptors; Breast neoplasms; HSP90 heat shock proteins; Immunohistochemistry; Prognosis; Sentinel lymph node

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Epidemiologija karcinoma dojke	1
1.2. Čimbenici rizika za nastanak karcinoma dojke.....	3
1.3. Klasifikacija karcinoma dojke	3
1.3.1. Histološka klasifikacija karcinoma dojke	3
1.3.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke.....	4
1.3.3. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke	6
1.4. Prognostički čimbenici karcinoma dojke	7
1.4.1. Veličina primarnog tumora	7
1.4.2. Histološki tip.....	8
1.4.3. Histološki gradus.....	8
1.4.4. Status aksilarnih limfnih čvorova.....	9
1.4.5. Limfovaskularna invazija.....	12
1.4.6. Estrogenski i progesteronski receptori.....	13
1.4.7. Receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2).....	14
1.4.8. Mitotski proliferacijski indeks Ki-67	14
1.5. Liječenje karcinoma dojke	15
1.6. Bjelančevine toplinskog šoka – Glikoprotein 96 (GP96)	16
1.6.1. Građa i funkcija GP96.....	16
1.6.2. Uloga GP96 u patogenezi karcinoma dojke.....	18
1.7. Androgeni receptori	20
1.7.1. Građa i funkcija androgenih receptora.....	20
1.7.2. Biološka funkcija AR.....	21
1.7.3. Uloga androgenih receptora u karcinomu dojke	22
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	24
3. ISPITANICI I METODE.....	25
3.1. Ispitanici.....	25
3.2. Metode	25
3.2.1. Bioptički materijal i patohistološke karakteristike karcinoma dojke	25
3.2.2. Izrada tkivnih mikroareja (TMA).....	28

3.2.3. Imunohistokemijsko bojenje i analiza.....	29
3.2.4. Analiziranje aktivacije gena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR).....	32
3.2.5. Etički aspekti istraživanja	33
3.2.6. Statistička obrada podataka.....	33
4. REZULTATI.....	35
4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitivane skupine	35
4.2. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u normalnom tkivu dojke i karcinomu dojke.....	37
4.2.1. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u normalnom tkivu dojke.....	37
4.2.2. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u karcinomu dojke	37
4.2.3. Odnos ekspresije GP96 i kliničko-patoloških parametara	38
4.3. Imunohistokemijska analiza izražaja AR-a u karcinomu dojke.....	39
4.3.1. Odnos ekspresije AR-a i kliničko-patoloških parametara.....	39
4.3.2. Odnos koekspresije GP96 i AR-a s ostalim kliničko-patološkim karakteristikama	42
4.4. Usporedbe na temelju podjele ispitanica ovisno o statusu limfnih čvorova nečuvara.....	44
4.5. Logistička regresijska analiza prediktora statusa limfnih čvorova nečuvara.....	46
4.6. Usporedbe na temelju podjele ispitanica ovisno o orijentaciji ENE u limfnom čvoru čuvaru	47
4.7. Analiza petogodišnjeg preživljenja ispitanica (Kaplan-Meierove krivulje i Cox regresijski model)	48
4.8. Rezultati analize aktivacije gena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR).....	54
5. RASPRAVA	56
6. ZAKLJUČCI.....	65
7. LITERATURA	66
ILUSTRACIJE.....	77
POPIS SLIKA.....	77
POPIS TABLICA	79
POPIS POKRATA.....	80
ŽIVOTOPIS.....	83

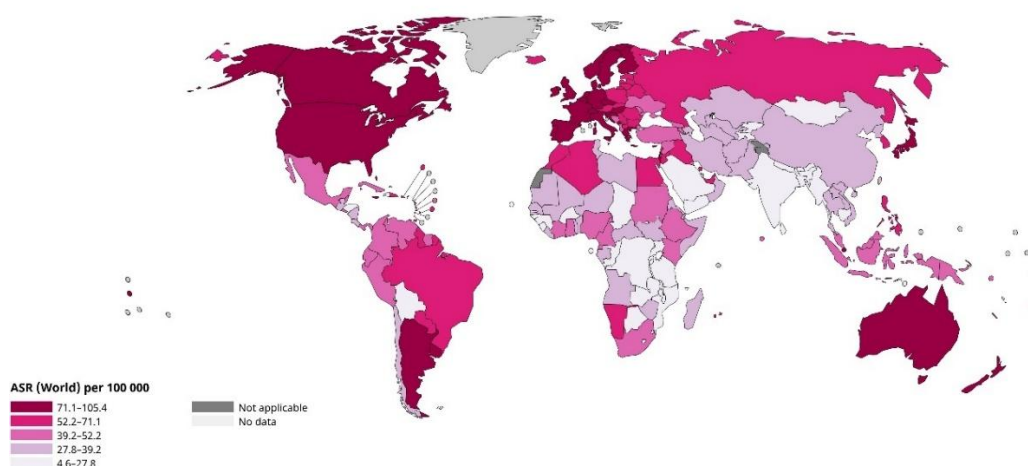
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Epidemiologija karcinoma dojke

Karcinom dojke najčešći je maligni tumor u žena i jedan od vodećih uzroka smrtnosti žena u cijelom svijetu [1]. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer, IARC*), 2022. godine u svijetu je bilo 2.296.840 novo dijagnosticiranih karcinoma dojke, što je činilo 23,8% svih novo otkrivenih karcinoma različitih sijela u žena. U istom razdoblju od raka dojke umrlo je 666.103 žena, što predstavlja 15,4% svih smrtnih slučajeva povezanih s rakom. Prema IARC, prosječna stopa incidencije karcinoma dojke u svijetu je 46,8/100.000 stanovnika, dok je prosječna stopa smrtnosti 12,7/100.000 stanovnika. Procjenjuje se da će do 2050. godine globalna incidencija karcinoma dojke porasti na 3,3 milijuna novih slučajeva godišnje, uz očekivanu smrtnost od 1,1 milijun osoba. Ovaj trend porasta incidencije i smrtnosti od karcinoma dojke objašnjava se prvenstveno povećanjem ukupnog broja stanovnika i starenjem populacije.

U Republici Hrvatskoj stopa incidencije raka dojke iznosi 134,9/100.000 stanovnika, uz smrtnost 25,2/100.000 stanovnika, što je u skladu s prosjekom zemalja članica Europske unije (EU-27) gdje incidencija iznosi 147,6/100.000 stanovnika, uz smrtnost 34,8/100.000 stanovnika.

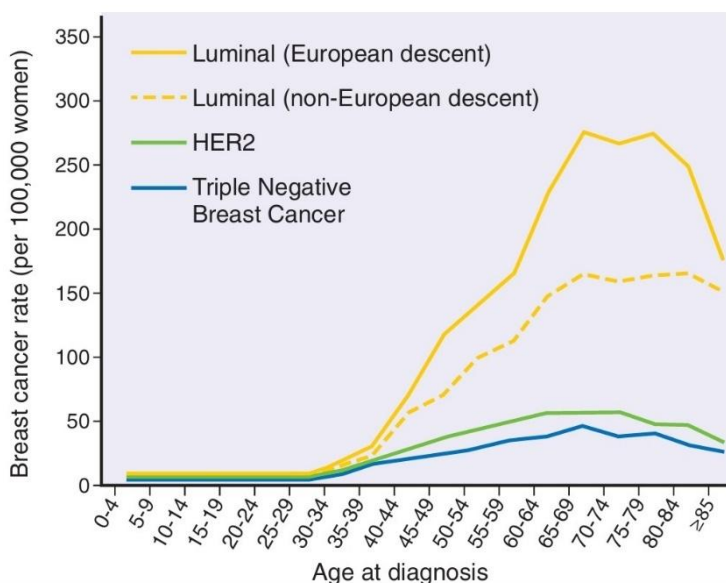
Incidencija raka dojke značajno varira u različitim dijelovima svijeta, vjerojatno kao posljedica razlika u socioekonomskom statusu, načinu života, dostupnosti zdravstvene skrbi i strategijama probira. Najviša incidencija karcinoma dojke bilježi se u razvijenim zemljama poput Sjedinjenih Američkih Država, Kanade, pojedinih zapadnoeuropskih zemalja, Australije i Zelanda, dok su najniže stope incidencije zabilježene u zemljama Afrike i jugoistočne Azije (Slika 1) [2,3].



Slika 1. Dobno standardizirana stopa incidencije karcinoma dojke na 100.000 žena u različitim dijelovima svijeta. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2022. [Internet]. Dostupno na: <https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&sexes=2&cancers=20>

U slabije razvijenim zemljama, karcinom dojke često se dijagnosticira u uznapredovalom stadiju što je povezano s lošijim preživljenjem i zbog čega je stopa mortaliteta u ovim zemljama viša, unatoč niskoj incidenciji [4].

Incidencija i biologija karcinoma dojke razlikuju se i s obzirom na etničku pripadnost. Najvišu incidenciju imaju žene europskog podrijetla, kod kojih se bolest najčešće dijagnosticira u prosječnoj dobi od 63 godine, a samo 20% slučajeva čine žene mlađe od 50 godina. Kod žena afričkog podrijetla, prosječna dob pri postavljanju dijagnoze je 59 godina, no u toj skupini čak 35% oboljelih čine žene mlađe od 50 godina. Žene hispanskog podrijetla u prosjeku imaju 56 godina u trenutku postavljanja dijagnoze, a 20% slučajeva dijagnosticira se u žena mlađih od 50 godina. Etnička pripadnost bolesnica utječe i na zastupljenost različitih surogata molekularnih podtipova karcinoma dojke u pojedinim populacijskim skupinama. Kod žena europskog podrijetla najčešće se dijagnosticiraju luminalni podtipovi karcinoma dojke, čija incidencija značajno raste s dobi. Nasuprot tome, incidencija HER2-obogaćenog i trostruko negativnog surogata molekularnog podtipa karcinoma dojke ostaje relativno stabilna nakon 40. godine života (Slika 2) [2].



Slika 2. Incidencija luminalnog (ER-pozitivan/HER2-negativan), HER2-obogaćenog i trostruko negativnog (ER-negativan/HER2-negativan) karcinoma dojke prema dobnim skupinama na 100.000 žena. Preuzeto: Lester SC. The Breast. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, ur. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 1037–64.

U Republici Hrvatskoj je 2006. godine pokrenut Nacionalni program ranog otkrivanja raka dojke s ciljem ranog otkrivanja bolesti i poboljšanja kvalitete života oboljelih žena te smanjenja smrtnosti od karcinoma dojke za 25-30%. Ovim sustavnim probirom obuhvaćene su sve žene u dobi od 50 do 69

godina te je do sada provedeno osam ciklusa poziva za besplatnu preventivnu mamografiju, s devetimi ciklusom u tijeku. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, odaziv u program iznosi oko 62% te se bilježi povećanje postotka žena kojima je dijagnosticiran rak dojke u ranom, lokaliziranom stadiju, što jedan od glavnih ciljeva programa (Internet stranica HZJZ, <https://www.hzjz.hr/nacionalni-programi/rano-otkrivanje-raka-dojke/>) [5].

1.2. Čimbenici rizika za nastanak karcinoma dojke

Etiologija karcinoma dojke nije u potpunosti razjašnjena, no poznati su brojni čimbenici rizika koji utječu na povećan rizik od nastanka ove bolesti. Najznačajniji rizični čimbenici su ženski spol i životna dob. Poznato je da žene oboljevaju sto puta češće nego muškarci te da se karcinom dojke rijetko javlja u žena mlađih od 25 godina. Incidencija značajno raste nakon 30. godine života te se od ukupnog broja dijagnosticiranih karcinoma dojke u žena, 50% otkrije u dobnoj skupini od 45 do 69 godina [6–8]. Od drugih čimbenika rizika tu su još rana prva menarha (<12 godine) i kasna menopauza (>55 godina), prva trudnoća poslije 35. godine ili nuliparitet, postmenopauza, uporaba oralnih kontraceptiva ili hormonske nadomjesne terapije, genetska predispozicija, pozitivna obiteljska anamneza, benigne promjene u dojčkama sa znakovima atipije, izloženost ionizirajućem zračenju, prehrana bogata životinjskim mastima, povećana konzumacija crvenog i/ili prženog mesa, pretilost, pušenje, smanjen unos svježeg voća, povrća i fitoestrogena, prekomjerna konzumacija alkohola i nedostatak fizičke aktivnosti [4,9,10]. Oko 10% slučajeva karcinoma dojke je nasljedno [11]. Najčešće su povezani s mutacijama gena BRCA1 i BRCA2 (engl. *breast cancer gene*), koji su do danas i najsveobuhvatnije istraženi [12]. Obje mutacije nasljeđuju se autosomno-dominantno te su povezane s prosječnim kumulativnim rizikom nastanka karcinoma dojke tijekom života od oko 70% [13]. Također je utvrđena njihova povezanost s nastankom drugih karcinoma kao što su karcinom jajnika, prostate i gušterače [14]. Brojne studije dokazale su utjecaj i drugih tumor-supresorskih gena na povećan rizik za nastanak raka dojke, poput TP53, PTEN, PALPB2 i CHEK2. Većina ovih gena ima složenu ulogu u održavanju genske stabilnosti putem popravaka dvostrukog lanca DNK [15–17].

1.3. Klasifikacija karcinoma dojke

1.3.1. Histološka klasifikacija karcinoma dojke

Karcinomi dojke heterogena su skupina bolesti, porijeklom iz stanica terminalnih kanalića lobularne jedinice dojke. Prema histološkom podtipu dijele se na neinvazivne (*in situ*) i invazivne lezije. Kod *in situ* karcinoma, tumorske stanice proliferiraju unutar duktusa i lobulusa, uz očuvani sloj mioepitelnih stanica, ne probijaju bazalnu membranu i ne invadiraju okolnu stromu te nemaju sposobnost metastaziranja. Dijele se u dvije skupine: duktalni karcinom *in situ* (DCIS) i lobularni karcinom *in situ*

(LCIS) [18,19]. Invazivni karcinomi najčešće su duktalni adenokarcinomi koji probijaju bazalnu membranu te imaju sposobnost lokalnog i udaljenog širenja. Prema morfologiji, dijele se na više podtipova, a najzastupljeniji je invazivni karcinom ne specijalni tip (engl. *no special type*, NST), koji čini 80% svih slučajeva karcinoma dojke. Slijedi invazivni lobularni karcinom koji se javlja u 10-15% bolesnica [19,20].

1.3.2. TNM klasifikacija karcinoma dojke

Proširenost karcinoma dojke određuje se prema TNM klasifikaciji, koju je standardiziralo Američko zajedničko povjerenstvo za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) i Međunarodna unija protiv raka (engl. *Union for International Cancer Control*, UICC). Stadij bolesti određen prema TNM klasifikaciji koristi se za procjenu prognoze i odabir optimalnog načina liječenja pacijenata. Ranijih godina TNM klasifikacija bazirala se isključivo na anatomskim kriterijima: veličini tumora (engl. *tumour size*, T), statusu limfnih čvorova (engl. *nodal status*, N) i postojanju metastaza (engl. *metastases*, M). Prema uputama Nacionalne sveobuhvatne mreže za rak (engl. *National Comprehensive Cancer Network*, NCCN), za određivanje anatomskog stadija bolesti važno je uzimanje detaljne anamneze, potom fizikalni pregled, radiološka dijagnostika (ultrazvučni pregled dojki, mamografija, nuklearna magnetska rezonancija) te citološka i/ili patohistološka verifikacija suspektnih lezija uz određivanje statusa hormonskih receptora.

Anatomska TNM klasifikacija uključuje četiri kategorije. Prva kategorija je klinički stadij te se označava prefiksom „c“, a bazira se na fizikalnom pregledu, radiološkim pretragama i nalazu biopsije ili citološke punkcije prije liječenja. Druga kategorija je patološki stadij, označen prefiksom „p“, a temelji se na patohistološkom nalazu primarnog tumora i nalazu biopsije limfnog čvora čuvara (LČČ). Treća kategorija je postterapijski *staging*, oznake „yp“, a odnosi se na pacijente koji su liječeni bilo kojim oblikom neoadjuvantne terapije. Zadnja kategorija je *restaging* i odnosi se na slučajeve kada je u pitanju recidiv bolesti [21].

Tijekom godina, kako se otkrivala biološka i molekularna heterogenost karcinoma dojke, nove spoznaje značajno su utjecale i na TNM klasifikaciju, tako da su sada, uz tradicionalni anatomski sustav za određivanje stadija bolesti, uvršteni i molekularni biomarkeri koji značajno utječu na klinički ishod liječenja, prognozu bolesti i preživljenje. Biomarkeri uključeni u prognostičke kategorije su status estrogenskih i progesteronskih receptora, status receptora za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2), histološki gradus i multigeneske analize za karcinom dojke (engl. *multigene assays*) poput Oncotype DX i MammaPrint [22,23]. U Tablici 1. prikazana je patološka klasifikacija karcinoma dojke (pTNM).

Tablica 1. Patološka klasifikacija karcinoma dojke (pTNM)

Primarni tumor (pT)	
TX	Primarni tumor se ne može odrediti
pT0	Primarni tumor se ne može dokazati
pTis (DCIS)*	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
pTis (Paget)	Pagetova bolest bradavice bez invazivnog karcinoma i/ili karcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumor najvećeg promjera ≤ 20 mm
pT1mi	Tumor najvećeg promjera ≤ 1 mm
pT1a	Tumor veličine >1 mm, ali ≤ 5 mm u najvećem promjeru
pT1b	Tumor >5 mm, ali ≤ 10 mm u najvećem promjeru
pT1c	Tumor >10 mm, ali ≤ 20 mm u najvećem promjeru
pT2	Tumor >20 mm, ali ≤ 50 mm u najvećem promjeru
pT3	Tumor >50 mm
pT4	Tumor bilo koje veličine sa zahvaćanjem torakalne stijenke i/ili kože
pT4a	Tumor sa širenjem na torakalnu stijenku (s izuzetkom pektoralnog mišića)
pT4b	Ulceracija i/ili edem kože dojke i/ili satelitski kožni nodusi iste dojke
pT4c	T4a + T4b
pT4d	Inflamatorni karcinom
Regionalni limfni čvorovi (pN)	
pNX	Regionalni LČ se ne mogu procijeniti (npr. nisu izvađeni)
pN0	Bez metastaza u regionalnim LČ ili samo ITC
pN0(i+)	samo ITC (nakupine $<0,2$ mm)
pN0(mol+)	pozitivan molekularni nalaz (RT-PCR); nema ITC
pN1	mikrometastaze ili metastaze u 1-3 aksilarna LČ, i/ili klinički negativni unutarnji mamarni LČ s mikrometastazama ili makrometastaza u LČČ
pN1mi	Mikrometastaza (oko 200 stanica; veličina 0,2-2 mm)
pN1a	Metastaze u 1-3 aksilarna LČ; najmanje jedna >2 mm
pN1b	Metastaze u unutarnjim mamarnim LČČ, bez ITC
pN1c	pN1a + pN1b
pN2	Metastaze u 4-9 aksilarnih LČ ili pozitivni unutarnji mamarni LČ na slikovnim pretragama, u odsutnosti metastaza u aksilarnim LČ
pN2a	Metastaze u 4-9 aksilarnih LČ (bar jedan depozit >2 mm)
pN2b	Metastaze u klinički evidentnim unutarnjim mamarnim LČ, sa/bez mikroskopske potvrde i bez metastaza u aksilarnim LČ
pN3	Metastaze u ≥ 10 aksilarnih LČ, ili infraklavikularnim LČ, ili pozitivni interni mamarni LČ na slikovnim pretragama uz jedan ili više pozitivnih aksilarnih LČ razine I i II, ili >3 pozitivna aksilarna LČ i mikro- ili makrometastaza na biopsiji LČČ u klinički negativnim internim mamarnim LČ, ili supraklavikularnim LČ

pN3a	Metastaze u ≥ 10 aksilarnih LČ (najmanje jedan depozit > 2 mm) ili metastaza u infraklavikularnom LČ
pN3b	pN1a ili pN2a uz cN2b (pozitivni interni mamarni LČ na slikovnim pretragama)
pN3c	Metastaze u ipsilateralnim supraklavikularnim LČ
<hr/>	
Udaljene metastaze (M)	
M0	Nema kliničkih ni radioloških znakova udaljenih metastaza
pM1	patohistološki dokazane udaljene metastaze, ili metastaze u neregionalnim LČ $> 0,2$ mm

* Lobularni karcinom *in situ* (LCIS) je benigna lezija te je izbačena iz TNM klasifikacijskog sustava u AJCC, 8. izdanje. Kratice: ITC – izolirane tumorske stanice (engl. *isolated tumour cells*), LČČ – limfni čvor čuvar, LČ – limfni čvor.

1.3.3. Molekularna klasifikacija karcinoma dojke

Gensko sekvencioniranje omogućilo je kategorizaciju karcinoma dojke u četiri glavna intrinzična podtipa, karakterizirana različitim biomarkerima, biološkim ponašanjem i prognozom [24,25]. Kao surogati genske ekspresije za klasifikaciju molekularnih podtipova u kliničkoj praksi koriste se klasični imunohistokemijski biomarkeri, ekspresija hormonskih i HER2 receptora te mitotski proliferacijski indeks Ki-67. Glavni surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke su luminal A, luminal B HER-negativan, luminal B HER2-pozitivan, HER2 obogaćeni i trostruko negativan surogat (Tablica 2) [26]. Luminalni karcinomi su estrogen pozitivni tumori koji čine otprilike 70% svih slučajeva karcinoma dojke te se najčešće prezentiraju kao invazivni karcinom NST [10]. Luminalni A surogat obično je niskog histološkog gradusa, sporo rastući te ima najpovoljniju prognozu s petogodišnjim preživljenjem od 95%. Luminalni B surogat češće je višeg histološkog gradusa i ima lošiju prognozu s nešto nižim ukupnim petogodišnjim preživljenjem, unatoč sličnosti s luminalnim A surogatom. Razlog je u različitoj ekspresiji gena ili proteina karakterističnih za luminalni epitel, kao što su progesteronski receptori i transkripcijski faktor FOXA1 [27]. Luminalni B podtip dijeli se u dvije podskupine ovisno o izražaju HER2 receptora. HER2-obogaćeni surogat čini oko 10-15% svih karcinoma dojke. Karakteriziran je prekomjernom ekspresijom HER2 receptora u odsutnosti ekspresije estrogenskih i progesteronskih receptora. Obično pokazuju brži rast u odnosu na luminalne karcinome, agresivniji tijek bolesti i viši histološki gradus. Međutim, uvođenjem ciljane anti-HER2 terapije značajno se poboljšalo preživljenje pacijenata s ovim molekularnim podtipom karcinoma dojke [28]. Trostruko negativan surogat ne pokazuje ekspresiju niti hormonskih niti HER2 receptora, a čini oko 20% svih karcinoma dojke. Biološki je najagresivniji i s najlošijom prognozom. Prema dosadašnjim spoznajama, 20-30% pacijenata s trostruko negativnim surogatom ima BRCA1 ili BRCA2 mutaciju [29]. Genskom analizom potvrđena je heterogenost trostruko negativnog karcinoma dojke te je unutar ovog molekularnog entiteta identificirano čak šest različitih podtipova [19,30].

Tablica 2. Surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke prema preporukama konferencije iz St. Gallena iz 2013. godine [26]

Surogat molekularnog podtipa	ER	PR	HER2	Ki-67*
Luminal A	pozitivan	pozitivan	negativan	<20%
Luminal B HER2-negativan	pozitivan	negativan ili <20%	negativan	≥20%
Luminal B HER2-pozitivan	pozitivan	pozitivan/negativan	pozitivan	bilo koji
HER2-obogaćeni	negativan	negativan	pozitivan	bilo koji
Trostruko negativan	negativan	negativan	negativan	bilo koji

* prihvaćena granična vrijednost za visoki Ki-67 prema preporuci panela iz St. Gallena je ≥20%.

1.4. Prognostički čimbenici karcinoma dojke

Klinički ishod pacijentica s karcinomom dojke ovisi o biološkim karakteristikama tumora i stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Prognostički čimbenici omogućuju optimalan odabir terapije te procjenu tijeka i kliničkog ishoda bolesti, dok su prediktivni čimbenici ključni u definiranju odgovora na specifično liječenje karcinoma dojke. Glavni prognostički čimbenici u karcinomu dojke su: veličina primarnog tumora, histološki tip, diferenciranost tumora odnosno histološki gradus, status aksilarnih limfnih čvorova, limfovaskularna invazija, postojanje udaljenih metastaza, potom status estrogenskih i progesteronskih receptora, HER2 status i mitotski proliferacijski indeks Ki-67.

1.4.1. Veličina primarnog tumora

Veličina primarnog tumora se, uz status limfnih čvorova aksile smatra najznačajnijim prognostičkim čimbenikom u karcinomu dojke [31]. Jedan je od tri ključna parametra koji se koriste za procjenu proširenosti karcinoma dojke i određivanje anatomske stadija prema TNM klasifikaciji. Prema preporukama Američkog društva za kliničku onkologiju (engl. *American Society of Clinical Oncology*, ASCO) i Udruženja američkih patologa (engl. *College of American Pathologists*, CAP), veličina tumora trebala bi se mjeriti u dvije različite dimenzije, a za klasifikaciju se uzima najveća izmjerena vrijednost. Mjerenje treba potvrditi mikroskopskom analizom, osobito kod manjih tumora. Tumori s izraženom *in situ* komponentom također se trebaju mjeriti mikroskopski, no ta se komponenta ne uključuje u ukupnu veličinu tumora. Kod multicentričnih karcinoma, svakom tumorskom žarištu treba odrediti veličinu i zasebno je prikazati [32]. Povećanjem veličine primarnog tumora povećava se i rizik od nastanka metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima. Kod tumora većih od 20 mm, rizik za metastaze u LČČ 1,5 puta je veći u usporedbi s tumorima manjim od 20 mm (39% vs. 26%). Prema TNM klasifikaciji, rizik za pozitivne LČČ iznosi 23,6% u stadiju T1, 42,4% u stadiju T2 te 50% u stadiju T3 [33]. Pacijentice s karcinomom dojke veličine do 1 cm i negativnim aksilarnim limfnim čvorovima imaju 10-godišnje

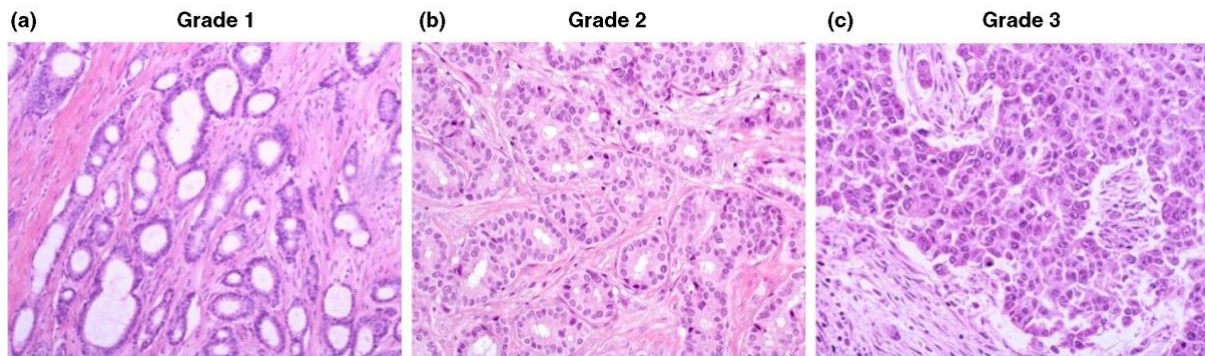
preživljenje preko 90%, dok kod karcinoma većih od 2 cm preživljenje opada na 77%. Također je utvrđena obrnuta povezanost veličine tumora i petogodišnjeg preživljenja. Pacijentice s karcinomima manjim od 1 cm imaju stopu petogodišnjeg preživljenja 99%, one s karcinomima veličine 1-3 cm oko 89%, dok je kod karcinoma veličine 3-5 cm preživljenje 86% [9,34].

1.4.2. Histološki tip

Histološka klasifikacija karcinoma dojke također je jedan od značajnih čimbenika rizika za klinički ishod i prognozu bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija klasificirala je karcinom dojke u preko 20 različitih histoloških tipova s obzirom na morfologiju stanica, obrazac rasta i strukturalne uzorke. Najčešći među njima je invazivni karcinom NST, dok specijalni tipovi čine oko 25%, a razlikuju se po svojim specifičnim morfološkim i prognostičkim obilježjima. Dokazano je da invazivni mikropapilarni, invazivni apokrini i metaplastični karcinom dojke imaju lošiju prognozu u odnosu na invazivni karcinom NST. S druge strane, rani stadij lobularnog karcinoma dojke ima sličnu prognozu kao i invazivni karcinom NST, a tubularni tip karcinoma dojke ima povoljne patohistološke karakteristike. Određivanje histološkog tipa karcinoma dojke ima značajan utjecaj na terapijski pristup te pojedini povoljni histološki tipovi ne zahtijevaju agresivno sistemsko liječenje. Poznato je da mucinozni, tubularni i papilarni tip, potom adenoidni cistični i kribriformni tip karcinoma imaju izrazito povoljnu prognozu, bez obzira na status aksilarnih limfnih čvorova [35]. Međutim, miješani tipovi mucinoznog karcinoma dojke češće imaju metastaze u limfnim čvorovima, prekomjernu ekspresiju HER2 receptora i visoki Ki-67 te su povezani s lošijom prognozom u odnosu na čisti mucinozni tip [35–37].

1.4.3. Histološki gradus

Histološki gradus određuje se prema stupnju diferenciranosti tumorskog tkiva odnosno njegove sličnosti sa stanicama zdravog tkiva iz kojeg tumor potječe. Danas se prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije najviše koristi Scarff-Bloom-Richardsonova metoda modificirana po Elstonu i Ellisu odnosno tzv. Nottinghamska metoda (Slika 3). Procjenjuju se tri morfološke karakteristike: stupanj tubularnih ili žljezdanih formacija, pleomorfizam jezgara i broj mitoz. Svaka od tri navedena obilježja ocjenjuje se s 1 do 3 boda, a krajnji gradus dodjeljuje se prema zbroju svih bodova. Postoje tri stupnja diferenciranosti: dobro diferencirani, srednje diferencirani i slabo diferencirani tumori [38].



Slika 3. Histološki gradus invazivnog karcinoma dojke procijenjen Nottinghamskom metodom. A) dobro diferencirani tumor koji pokazuje visoku sličnost s normalnim kanalićima lobularne jedinice, ima formirane tubule (>75%), blagi stupanj nuklearnog polimorfizma i niski broj mitozama. B) srednje diferencirani tumor. C) slabo diferencirani tumor sa značajnim stupnjem staničnog polimorfizma, učestalim mitozama i bez tubularnih formacija (<10%). Preuzeto iz reference [38].

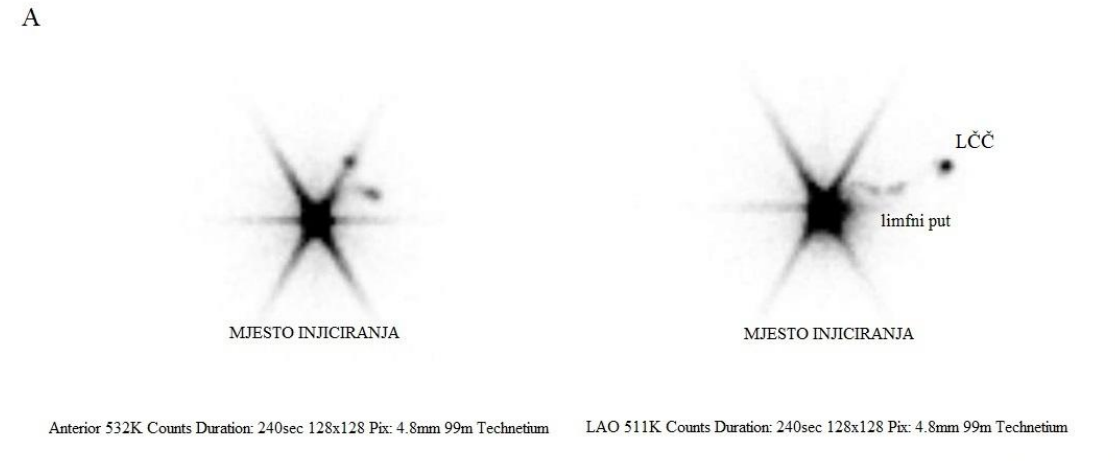
Brojne studije pokazale su podjednaku prognostičku vrijednost histološkog gradusa i statusa limfnih čvorova, dok je superiornija prognostička vrijednost histološkog gradusa u odnosu na veličinu tumora [38]. Kombinacijom histološkog gradusa, statusa limfnih čvorova i veličine tumora, izveden je Nottinghamski prognostički indeks, koji omogućuje stratifikaciju pacijenata s karcinomom dojke u tri prognostičke skupine u 15-godišnjem praćenju [39]. Viši histološki gradus korelira s lošijim preživljenjem i ranim recidivom bolesti, bez obzira na veličinu tumora, status hormonskih receptora ili status limfnih čvorova [40]. Hensen i sur. su u svom istraživanju, koje je obuhvaćalo preko 22 000 slučajeva karcinoma dojke, pokazali kako pacijenti s histološkim gradusom 1 i stadijem bolesti II imaju jednako preživljenje kao skupina pacijenata s tumorima histološkog gradusa 3 i stadijem bolesti I. Autori su također zaključili da pacijenti s tumorima histološkog gradusa 1 i dimenzija manjim od 2 cm imaju izvrsno petogodišnje preživljenje (99%), čak i ako imaju metastaze u limfnim čvorovima [41]. Visoki histološki gradus smatra se jednim od prediktora patološki potpunog odgovora nakon neoadjuvantne kemoterapije u trostruko negativnim ili HER2-pozitivnim karcinomima [42]. Histološki gradus 3 povezan je s lošijim kliničko-patološkim karakteristikama, poput negativnog ER statusa, visoke ekspresije Ki-67 i većom imunogenošću [40]. Također, jedan je od ključnih čimbenika za donošenje odluke o primjeni kemoterapije uz hormonsku terapiju za liječenje ER-pozitivnih, HER2-negativnih karcinoma [43].

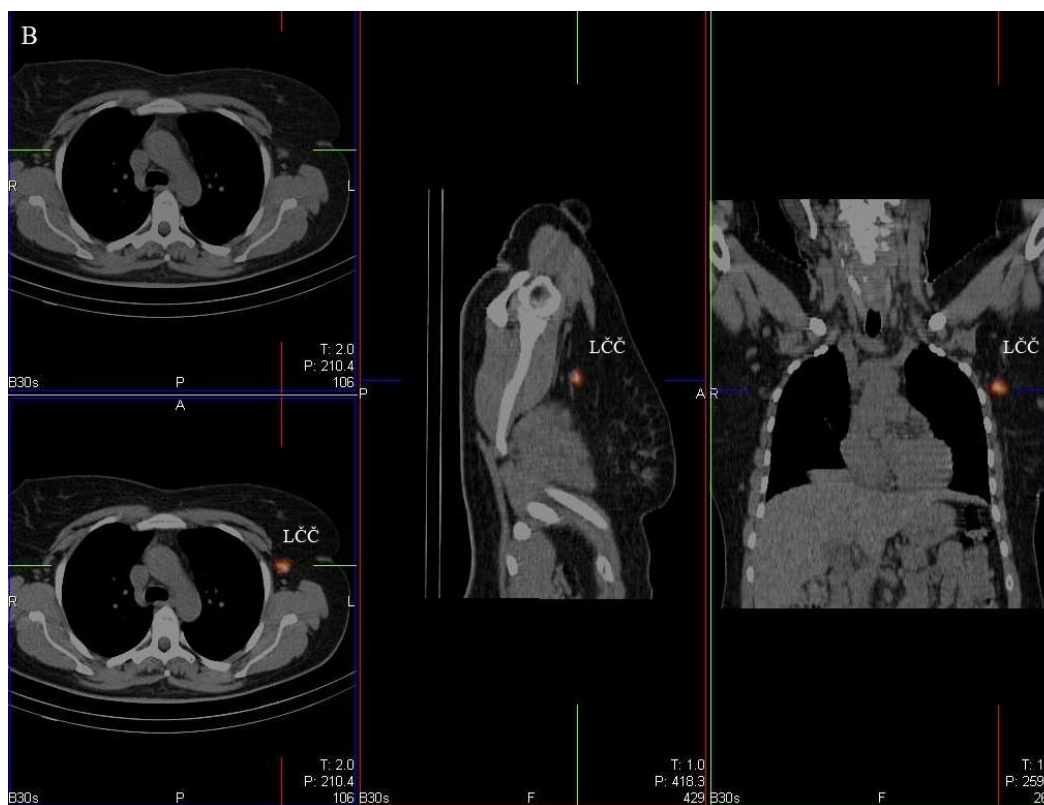
1.4.4. Status aksilarnih limfnih čvorova

Status aksilarnih limfnih čvorova (aLČ) jedan je od najznačajnijih prognostičkih čimbenika u bolesnica s karcinomom dojke koji utječe na rizik pojavnosti recidiva bolesti i preživljenje. Prisutnost metastaza u aLČ te broj i lokalizacija pozitivnih aLČ određuju opseg kirurškog zahvata i potrebu za sistemskom terapijom i/ili adjuvantnom radioterapijom. U pacijenata s karcinomom dojke bez metastaza u aLČ,

petogodišnje preživljenje iznosi 98,8%, dok je u onih sa zahvaćenim aLČ niže i iznosi 85,8% [44]. Potpuna aksilarna limfadenektomija dugo je bila standardna metoda za određivanje statusa aLČ, omogućujući preciznu procjenu patološkog stadija i lokoregionalnu kontrolu bolesti. Ovaj opsežan kirurški zahvat kojim se odstranjuju limfni čvorovi pazušne regije, povezan je sa značajnim morbiditetima poput boli, neuropatije, ograničene pokretljivosti ruke, utrnutosti, limfedema i povećanog rizika od celulitisa, što značajno utječe na kvalitetu života pacijenata [45]. Danas je biopsija LČČ postala standardna kirurška metoda u liječenju pacijentica s ranim stadijem karcinoma dojke i klinički negativnim aLČ (nepalpabilni ili ultrazvučno i/ili citološki dokazano negativni limfni čvorovi na tumorsku invaziju), čime je uvelike zamijenila potrebu za aksilarnom limfadenektomijom. LČČ je prvi regionalni limfni čvor u koji se izravno drenira limfa iz područja primarnog tumora i u koji će se tumor najčešće prvo i proširiti, dok se preostali aLČ nazivaju limfnim čvorovima nečuvanima (engl. *non-sentinel lymph nodes*, nSLN). Druge indikacije za biopsiju LČČ uključuju multicentrične tumore, DCIS u pacijentica predviđenih za mastektomiju, široku resekciju ili onkoplastičnu operaciju koja može poremetiti limfnu drenažu, kao i visok rizik invazivne bolesti u bolesnica s DCIS-om kod kojih se planira poštedna operacija. Biopsija LČČ je također indicirana i kod pacijentica nakon prethodnog operativnog zahvata na dojci ili aksili, kao i kod onih koje su liječene neoadjuvantnom sistemskom terapijom. Apsolutne kontraindikacije za biopsiju LČČ su inflamatorni karcinom dojke i klinički pozitivni aLČ, dok su relativne kontraindikacije citološki dokazani metastatski aLČ [46]. Obilježavanje LČČ može se učiniti pomoću boje ili radiofarmaka, pri čemu se najviša stopa identifikacije postiže kombinacijom objiju metoda, iznoseći 96-100%. Korištenjem samo jedne metode obilježavanja, stopa identifikacije LČČ je niža i iznosi 86-90%. Za obilježavanje LČČ koriste se različite vrste boja, poput limfazurina ili izosulfan plave, metilenskog plavog, indocijanskog zelenila ili indokarmina. Kod limfoscintigrafije se najčešće koristi ^{99m}Tc-nanokoloid, odnosno radioizotopom obilježene koloidne čestice albumina veličine 5-100 nm. Čestice putuju limfnim žilama od mjesta injiciranja u dojci, gdje je lokaliziran tumor, do LČČ, gdje ih fagocitiraju makrofagi (Slika 4).

A





Slika 4. Limfoscintigrafija limfnog čvora čuvara s ^{99m}Tc -nanokolloidom. Pacijentici s invazivnim karcinomom dojke, intradermalno je injicirano 29 MBq ^{99m}Tc -nanokoloidea, povrh palpabilne lezije u II. kvadrantu lijeve dojke. Ubrzo nakon injiciranja prikazao se fokus aktivnosti u lijevoj aksili koji odgovara limfnom čvoru čuvaru koji je označen na koži markerom. Snimljene su A) planarne snimke toraksa i aksila u anteriornoj i prednjoj lijevoj polukosoj projekciji pod kutem od 42° , s potisnutom dojkom te B) jednofotonska emisijska tomografija uz niskodozni CT (SPECT/niskodozni CT) toraksa. LČČ – limfni čvor čuvar.

Dokazano je kako su dob, veličina i lokalizacija tumora, histološki tip i limfovaskularna invazija nezavisni prediktori metastaza u LČČ. Kod pacijentica s pozitivnim LČČ, incidencija metastaza u nSLN kreće se u rasponu od 24-65,7%. U prisutnosti mikrometastaza u LČČ, vjerojatnost metastatskog zahvaćanja nSLN iznosi oko 15%, dok je kod nalaza izoliranih tumorskih stanica u LČČ oko 9%. Analiza podataka SEER baze (engl. *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) pokazala je da u pacijentica s primarnim tumorom dojke ≤ 2 cm (pT1) i tumorskim depozitom u limfnim čvorovima manjim od 2 mm, smanjenje preživljenja nakon 5 i 10 godina iznosi tek oko 1% u odnosu na pacijentice bez metastaza u limfnim čvorovima [47]. Poznato je da su rizični čimbenici poput veličine primarnog tumora, makrometastaza u LČČ (metastaza ≥ 2 mm u najvećem promjeru unutar LČČ), broj pozitivnih LČČ, omjer broja pozitivnih LČČ i broja kirurško odstranjenih LČČ (engl. *sentinel lymph node ratio*, sLNR), limfovaskularna invazija, mitotski proliferacijski indeks Ki-67, pozitivan HER2 status te proboj kapsule LČČ povezani s većom vjerojatnošću metastaza u nSLN.

Između ovih rizičnih čimbenika, posebno se izdvajaju proboj kapsule LČČ, limfovaskularna invazija i veličina tumora kao glavni prediktori metastaza u nSLN [48].

Za točniju prognozu karcinoma dojke predloženi su i brojnim znanstvenim studijama validirani različiti indeksi zahvaćenosti aLČ, uključujući pN sustav AJCC, ukupan broj pozitivnih (PLN) i negativnih limfnih čvorova (NLN), omjer broja pozitivnih i izvađenih limfnih čvorova (engl. *lymph node ratio*, LNR), modificirani LNR (mLNR) gdje se broju izvađenih limfnih čvorova standardnog LNR dodaje 2 te logaritam omjera pozitivnih i negativnih limfnih čvorova (engl. *log odds of positive lymph nodes*, LODDS) [49]. Osim u karcinomu dojke, prognostička vrijednost indeksa zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova potvrđena je brojnim znanstvenim istraživanjima i u karcinomima drugih sijela [50–53].

Za procjenu statusa aLČ najčešće se koristi pN stadij, koji je definiran brojem metastatski zahvaćenih aLČ, a za njegovo adekvatno određivanje preporučuje se odstranjenje najmanje 10 aLČ tijekom potpune aksilarne disekcije. Međutim, u eri kirurške deeskalacije u liječenju karcinoma dojke pa tako i manje invazivnog pristupa aksili, kod mnogih se bolesnica odstranjuje manje od preporučenih 10 aLČ, što može dovesti do podecjenjivanja pN stadija i smanjene prognostičke točnosti. Veći broj PLN odnosno viši pN stadij, povezani su s povećanim rizikom lokalnog i udaljenog recidiva bolesti te lošijim ukupnim preživljenjem u odnosu na pacijentice bez metastaza u aLČ. U usporedbi s pN stadijem, LNR daje cjelovitiju informaciju o statusu aLČ, analizirajući broj pozitivnih aLČ i ukupan broj izvađenih aLČ te se pokazao točnijim prognostičkim čimbenikom. Veći LNR povezan je s lošijim preživljenjem pacijentica s karcinomom dojke, dok je LODDS pokazao prognostičku superiornost kod pacijentica s manje od 10 izvađenih aLČ te se oba indeksa smatraju značajnim nadopunama PLN i pN stadiju u procjeni prognoze [54,55]. Istraživanja su potvrdila kako je i NLN nezavisan prediktor preživljenja u karcinomu dojke te su pacijentice s većim brojem NLN imale bolje preživljenje, osobito u pN2 i pN3 stadiju [56].

1.4.5. Limfovaskularna invazija

Limfovaskularna invazija (LVI) definira se kao prisutnost tumorskih embolusa u krvnim i/ili limfnim žilama te je ključan korak u procesu metastaziranja [57]. Rutinski se analizira na histološkim preparatima obojenim hematoksilin-eozinom, prema kriterijima koje su definirali Rosen i sur. Prema preporukama Udruženja američkih patologa (engl. *College of American Pathologists*, CAP), LVI se kvantificira kao odsutna, fokalna ili ekstenzivna [58]. Nalazi se u više od 50% invazivnih karcinoma te je u snažnoj korelaciji s prisutnošću metastaza u limfnim čvorovima. Nepovoljan je prognostički čimbenik ukupnog preživljenja i preživljenja bez recidiva bolesti, čak i kod pacijentica koje nemaju metastaze u limfnim čvorovima te je čimbenik rizika za nastanak lokalnog i udaljenog recidiva bolesti [57,59]. Također, korelira s većom veličinom tumora, višim histološkim gradusom i višim T stadijem

bolesti. Studije su pokazale da je LVI češće prisutan u hormonski neovisnim i HER2-pozitivnim tumorima s visokim mitotskim proliferacijskim indeksom Ki-67. Analizom skupina podijeljenih prema surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke, LVI je češće prisutan u HER2-obogaćenim i luminalnom B surogatu. Također, invazivni karcinomi NST češće pokazuju LVI u odnosu na druge histološke tipove karcinoma dojke [58].

1.4.6. Estrogenski i progesteronski receptori

Estrogenski receptori (ER) pripadaju obitelji nuklearnih receptora te imaju ključnu ulogu u diferencijaciji, progresiji i invaziji ER-pozitivnih karcinoma dojke, ali i drugih hormonski ovisnih karcinoma. Mogu biti aktivirani klasičnim putem, vezivanjem estrogena ili pak fosforilacijom preko staničnih kinaza. Tako aktivirani kompleksi premještaju se u jezgru gdje se direktno ili indirektno vežu na DNK, potičući aktivaciju različitih transkripcijskih čimbenika odgovornih za regulaciju stanične proliferacije i preživljenja [60,61]. Postoje dvije forme ER receptora, ER- α i ER- β , a svaki je kodiran različitim genom, ESR1 i ESR2. Utjecaj ER- α u karcinomu dojke je dobro istražen, no uloga i klinički značaj ER- β nisu u potpunosti razjašnjeni [62]. Prema literaturi, oko 80% svih karcinoma dojke su ER-pozitivni te su niskog histološkog gradusa, manje agresivni i s boljom prognozom u odnosu na ER-negativne karcinome dojke [63]. Ekspresija ER također ima prediktivnu vrijednost za učinkovitost hormonske terapije. Međutim, kod otprilike 20% pacijentica liječenih hormonskom terapijom s vremenom dolazi do gubitka ekspresije ER te inicijalno ER-pozitivni tumori prijeđu u ER-negativni fenotip [64].

Progesteronski receptori (PR) poput ER, pripadaju obitelji nuklearnih hormonskih receptora te se aktiviraju vezivanjem progesterona na specifična vezna mjesta. Međutim, njihova je sinteza pozitivno regulirana i estrogenima i ER. Pomoću koaktivatora i korepresora, aktivirani PR utječu na regulaciju transkripcije gena. U kliničkoj praksi, razina izražaja PR danas se koristi kao surogat marker aktivacije ER- α receptora te je prekomjerno eksprimiran u većine ER-pozitivnih karcinoma dojke [65]. PR postoji u dvije izoforme, PR-A i PR-B te iako su kodirani istim genom, pokazuju različitu transkripcijsku i biološku aktivnost. PR-A je funkcionalno dominantnija izoforma u odnosu na PR-B, iako je po strukturi zapravo skraćeni oblik PR-B izoforme kojoj nedostaju 164 aminokiseline na N-terminalnom kraju proteina [66]. Obje izoforme podjednako su izražene u zdravom tkivu dojki, no u atipičnim lezijama i karcinomima prevladava jedna izoforma te je u većine duktalnih karcinoma *in situ* i invazivnih karcinoma dojke prekomjerna ekspresija PR-A u odnosu na PR-B. Pojedine studije su pokazale kako je visoki omjer PR-A/PR-B povezan s lošijom prognozom i recidivom bolesti nakon terapije tamoksifenom. No postoje istraživanja koja su dobila oprečne rezultate prema kojima je visoki omjer PR-A/PR-B povezan s povoljnijim biomarkerima i luminalnim A surogatom molekularnog podtipa karcinoma dojke [67]. Ovisno o statusu ER i PR, hormonski ovisni karcinomi dojke dijele se u tri

podskupine: ER-pozitivni/PR-pozitivni, ER-pozitivni/PR-negativni i ER-negativni/PR-pozitivni. Najčešći su ER-pozitivni/PR-pozitivni tumori, koji čine oko 83% hormonski ovisnih karcinoma dojke, dok su ER-negativni/PR-pozitivni najrjeđi, s udjelom od svega 2%. Studije su pokazale kako ER-pozitivni/PR-negativni karcinomi dojke imaju lošije preživljenje u odnosu na ER-pozitivne/PR-pozitivne te da se češće javljaju u starijih, postmenopauzalnih žena. Također, češće razvijaju rezistenciju na hormonsku terapiju [66].

Ekspresija ER i PR određuje se IHC metodom pomoću monoklonskih protutijela. Granična vrijednost je 1%, tako da se tumori s ekspresijom ER i PR $\geq 1\%$ u jezgrama tumorskih stanica smatraju ER-pozitivnim odnosno PR-pozitivnim.

1.4.7. Receptor za humani epidermalni čimbenik rasta 2 (HER2)

Obitelji receptora ERBB pripadaju četiri transmembranska proteina s funkcijom tirozin kinaza, a to su receptor za humani epidermalni faktor rasta (HER)1, potom HER2, HER3 i HER4. Ovi proteini sudjeluju u regulaciji stanične diferencijacije, mitoze, preživljenja i stanične migracije te su ključni u karcinogenezi raka dojke [68]. Aktiviraju se vezivanjem različitih drugih faktora rasta poput epidermalnog faktora rasta (EGF), betacelulina (BTC) i transformirajućeg faktora rasta α (TGF- α). Zanimljivo je da još uvijek nije identificiran specifičan ligand za aktivaciju HER2 receptora, no poznato je da sudjeluje u unutarstaničnoj signalizaciji prvenstveno stvaranjem heterodimera s drugim članovima obitelji HER receptora [69]. Prekomjerna ekspresija HER2 receptora prisutna je u 15-25% karcinoma dojke te je odgovorna za prekomjernu aktivaciju pro-onkogenih signalnih puteva što dovodi do nekontroliranog staničnog rasta i posljedično lošijih kliničkih ishoda u HER2-pozitivnim karcinomima dojke. Također je dokazana povezanost s kraćim vremenom do progresije bolesti, kao i histološkim tipom karcinoma, višim histološkim gradusom, višim patološkim stadijem bolesti i većim brojem zahvaćenih aLČ.

Izražaj HER2 receptora može se odrediti dvjema metodama, a to su IHC analiza izražaja proteina ili analiza genske ekspresije *in situ* hibridizacijom [70,71].

1.4.8. Mitotski proliferacijski indeks Ki-67

Mitotski proliferacijski indeks Ki-67 je nuklearni protein koji je prisutan u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2 i M), ali ne i u fazi mirovanja (G0). U zdravom tkivu dojke njegova je ekspresija niska, obično manja od 3% i to gotovo isključivo u ER-negativnim stanicama. ER-pozitivne stanice normalnog tkiva dojki žena u premenopauzi ne proliferiraju, stoga nemaju izražen Ki-67, dok se u normalnom tkivu dojki žena u postmenopauzi može naći koekspresija ER i Ki-67. Međutim, u

približno 40% slučajeva DCIS-a nalazi se povišena ekspresija Ki-67, što je povezano s višim gradusom, prisutnošću komedo nekroze i mikroinvazijom. Zbog toga se Ki-67 smatra potencijalnim prediktorom recidiva kod DCIS-a [72]. Prema podacima meta-analize De Azambuje i sur., visoki Ki-67 povezan je s lošijim preživljenjem pacijentica s invazivnim karcinomom dojke [73]. Takvi tumori češće su većih dimenzija, višeg histološkog gradusa, hormonski neovisni i često imaju prekomjernu ekspresiju HER2 receptora [74]. Međutim, postoje studije s oprečnim rezultatima koje su pokazale da nema povezanosti Ki-67 s ekspresijom HER2 receptora [72].

Ki-67 određuje se imunohistokemijski pomoću monoklonskih protutijela te se izražava kao postotak pozitivnih jezgara tumorskih stanica uz graničnu vrijednost od 20% prema preporukama konferencije iz St. Gallena [26]. Niska proliferacijska aktivnost je manja od 20%, a visoka jednaka ili veća od 20%.

1.5. Liječenje karcinoma dojke

Liječenje karcinoma dojke zahtjeva multidisciplinarni pristup s ciljem izrade optimalnog terapijskog plana prilagođenog svakoj pacijentici, ovisno o biološkim karakteristikama karcinoma, stadiju bolesti i općem stanju pacijentice. Terapijski modaliteti uključuju kirurško liječenje, kemoterapiju, radioterapiju, endokrinu terapiju, ciljanu terapiju i imunoterapiju. Kombinacijom ovih metoda liječenja nastoji se postići optimalna kontrola bolesti i bolje preživljenje [2].

Kirurško liječenje predstavlja temeljni modalitet liječenja karcinoma dojke i uključuje poštenu operaciju ili mastektomiju, uz procjenu statusa aLČ, najčešće biopsijom LČČ ili aksilarnom disekcijom. Biopsija LČČ danas se smatra standardnim kirurškim pristupom u procjeni statusa aksile kod pacijentica s klinički negativnim limfnim čvorovima u trenutku postavljanja dijagnoze ili nakon neoadjuvantne kemoterapije. U usporedbi s aksilarnom disekcijom, biopsija LČČ povezana je sa značajno manjom učestalošću postoperativnih komplikacija poput limfedema, bolnosti i ograničene pokretljivosti ruke, što izravno doprinosi boljoj kvaliteti života pacijentica [75]. Nakon poštene operacije dojke slijedi radioterapija te je dokazano kako je kombinacijom ovih dvaju modaliteta liječenja postignuto značajno smanjenje lokoregionalnih recidiva bolesti [76,77]. U pacijentica kojima je učinjena mastektomija, radioterapija se preporučuje kao dio adjuvantnog liječenja u slučaju povišenog rizika za lokoregionalni recidiv bolesti. Odabir operativnog zahvata ovisi o veličini tumora, veličini tumora u odnosu na veličinu dojke, njegovoj lokalizaciji, biologiji tumora i želji pacijentice. Mlađa životna dob, lobularni karcinom dojke i agresivniji surogati molekularnih podtipova kao trostruko negativan i HER2-obogaćen surogat, nisu kontraindikacija za poštenu operaciju. No, poseban je oprez potreban kod odabira poštene operacije u pacijentica sa suspektnim difuznim mikrokalcfikatima, multicentričnim tumorima, kontraindikacijama za radioterapiju ili nemogućnošću dobivanja negativnih resekcijskih rubova [78]. Profilaktička mastektomija preporučuje se u pacijentica koje su nositeljice mutacija BRCA gena te se zahvatom smanjuje incidencija raka dojke za preko 90%

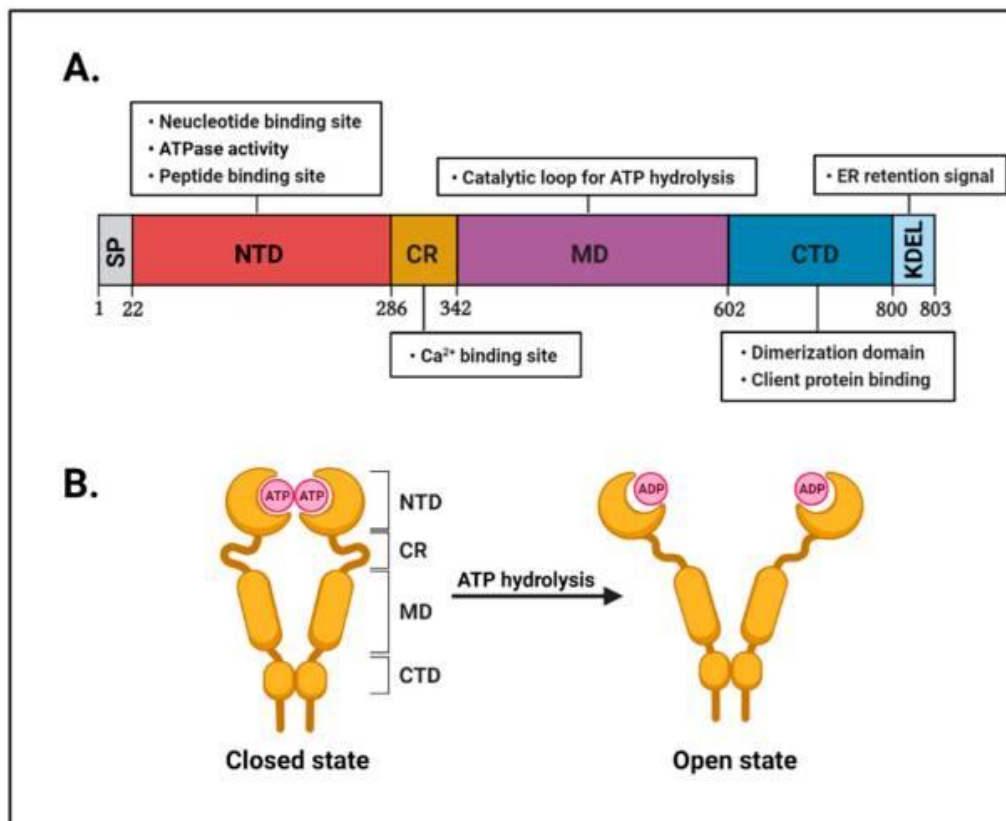
[79]. Kemoterapija se može primjenjivati adjuvantno ili neoadjuvantno, osobito kod karcinoma dojke visokog gradusa, trostruko negativnih i HER2-pozitivnih podtipova, čime se smanjuje rizik recidiva bolesti za oko 30% u određenih skupina pacijentica [80]. Primjena neoadjuvantne terapije može smanjiti stadij bolesti (engl. *down-staging*), smanjiti veličinu tumora tako da postane operabilan i ukloniti mikrometastatske lezije. Standardni režimi uključuju antracikline i taksane. Endokrina terapija primjenjuje se kod hormonski ovisnih tumora te uključuje tamoksifen ili inhibitore aromataze, ovisno o menopausalnom statusu pacijentice. Značajno smanjuje rizik od lokoregionalnog recidiva bolesti, udaljenih metastaza ili pojave invazivnog karcinoma u kontralateralnoj dojci. Standardno liječenje traje najmanje 5 godina, po potrebi i dulje prema preporuci onkologa. Uz endokrinu terapiju mogu se kombinirati i inhibitori kinaza ovisnih o ciklinima, palbociklib i ribociklib. Pojava anti-HER2 terapije značajno je promijenila liječenje i prognozu HER2-pozitivnih karcinoma dojke. Prvi od anti-HER2 lijekova bio je trastuzumab, humanizirano IgG1 monoklonsko protutijelo koje se veže na izvanstaničnu domenu HER2 receptora. Time se sprječava aktivacija HER2 receptora i inhibira proliferacija tumorskih stanica. Primjenjuje se u kombinaciji s kemoterapijom i/ili endokrinom terapijom te drugim anti-HER2 lijekovima (tzv. dualna anti-HER2 terapija) čime se značajno poboljšalo preživljenje u ranom stadiju i metastatskom HER2-pozitivnom karcinomu dojke [75,81,82]. Drugi anti-HER2 lijekovi koji se koriste u kliničkoj praksi su pertuzumab, lapatinib, neratinib, tukatinib te konjugati trastuzumab emtansin (T-DM1) i trastuzumab derukstekan (T-DXd)[75,80]. Posljednjih godina u liječenju karcinoma dojke sve veću ulogu ima i imunoterapija temeljena na inhibitorima kontrolnih točaka (engl. *immune checkpoint inhibitors*, ICI), osobito u trostruko negativnom surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke. ICI su monoklonska protutijela protiv CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), PD-1 (engl. *programmed cell death-1*) i PD-L1 (engl. *programmed death-ligand 1*), čime se omogućuje aktivacija i antitumorski odgovor limfocita T. Međutim, unatoč njihovom povoljnom terapijskom učinku, ICI mogu uzrokovati brojne nuspojave povezane s prekomjernom aktivacijom imunološkog sustava [83–85].

1.6. Bjelančevine toplinskog šoka – Glikoprotein 96 (GP96)

1.6.1. Građa i funkcija GP96

Proteini toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP) pripadaju obitelji molekularnih šaperona koji su prisutni u stanicama gotovo svih živih bića, od bakterija i kvasaca do ljudi. Njihova je ekspresija pojačana u uvjetima staničnog stresa poput povišene temperature, hipoksije, ishemije, maligne transformacije ili infekcije. Odgovorni su za održavanje homeostaze proteina, unutarstanični transport molekula, regulaciju staničnog ciklusa, apoptozu, prijenos signala, imunološki odgovor i brojne druge stanične funkcije. Prema svojoj molekularnoj masi, HSP se dijele u nekoliko skupina: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 i veliki HSP [86].

Glikoprotein 96 (GP96), poznat i kao glukozom regulirani protein 94 (GRP94), endoplazmin ili HSP90B1, glavni je šaperon obitelji HSP90 smješten u endoplazmatskom retikulumu. Relativna molekularna masa GP96 iznosi 94-100 kDa te ga kodira gen na kromosomu 12 (q24.2-q24.3). GP96 je po svojoj strukturi tipičan homodimer „V“ oblika koji ima četiri funkcionalne domene: N-terminalnu domenu (NTD), nabijenu poveznju regiju (CR), srednju domenu (MD) i C-terminalnu domenu (CTD) (Slika 5). NTD sadrži vezno mjesto za nukleotide, peptide i adenozin trifosfat (ATP), regiju za interakciju s dendritičkim stanicama, vezno mjesto za košaperona CNPY3 te transmembransku domenu. CR je kratka regija koja povezuje NTD i MD, a važna je u kontroli ATP hidrolize uz MD te vezivanju nukleotida i kalcija. MD ima katalitičku petlju koja je važna za hidrolizu ATP-a. CTD je važna za dimerizaciju GP96 i zadržavanje u endoplazmatskom retikulumu putem KDEL peptida te sadrži vezna mjesta za ligande [87].



Slika 5. A) Shematski prikaz funkcionalnih domena glikoproteina 96 (GP96): N-terminalna domena (NTD), nabijena poveznja regija (CR), srednja domena (MD) i C-terminalna domena (CTD). B) Shematski prikaz strukture GP96. Konformacijske promjene GP96 se događaju pri vezanju i hidrolizi ATP-a. Preuzeto iz reference [87].

Ekspresija GP96 u stanici značajno se povećava pod utjecajem staničnog stresa koji narušava funkciju endoplazmatskog retikuluma, uključujući oksidativni stres, acidozu, UV zračenje, upalu i infekciju, depleciju kalcija i glukoze te nakupljanje nepravilno savijenih proteina. GP96 izravno sudjeluje u

pravilnom slaganju i savijanju brojnih proteina unutar endoplazmatskog retikuluma. Također, ima važnu ulogu u regulaciji različitih staničnih procesa, poput rasta, adhezije i imunološkog odgovora. Među najvažnijim ciljnim proteinima GP96 nalaze se Toll-like receptori (TLR), koji su odgovorni za prepoznavanje patogena i pokretanje urođene imunosti. Ekspimirani su na različitim imunološkim stanicama (T i B limfociti, dendritičke stanice, makrofagi), kao i na neimunološkim stanicama poput fibroblasta i endotelnih stanica, a smješteni su intracitoplazmatski u endolizosomima ili na staničnoj površini. Drugi važni ciljni proteini GP96 su integrini, transmembranski glikoproteini koji djeluju kao receptori odgovorni za međustaničnu adheziju, prianjanje stanica na izvanstanični matriks te interakciju stanice s patogenima. Sudjeluju u aktivaciji signalnih puteva koji reguliraju staničnu migraciju, stanični ciklus, organizaciju citoskeleta i transport receptora na staničnu membranu. GP96 također sudjeluje u sazrijevanju i funkciji Wnt koreceptora, poput transmembranskog lipoproteinskog receptora LRP6, koji je ključan za staničnu proliferaciju, diferencijaciju, embrionalni razvoj te regulaciju metabolizma lipida i glukoze. Nadalje, GP96 stabilizira receptore tirozin kinaza kao što su HER2 i receptor za epidermalni faktor rasta, koji imaju važnu ulogu u rastu i progresiji tumorskih stanica. GP96 također je važan za sintezu i izlučivanje inzulinu sličnog faktora rasta (engl. *insulin like growth hormone*, IGF-I i IGF-II) te proinzulina, koji utječu na stanični rast, tkivnu diferencijaciju i metabolizam glukoze. Na mišjem modelu je dokazano da uvjetna delecija GP96 u poprečnoprugastim mišićima, smanjuje lokalnu produkciju IGF-a, što dovodi do smanjenog rasta mišića i tjelesne mase, uz očuvanu kontraktilnost mišića i relativnu održanu homeostazu glukoze. Osim toga, GP96 regulira i površinsku ekspresiju GARP proteina (engl. *glycoprotein A repetitions predominant*), koji ima ključnu ulogu u aktivaciji TGF- β i funkciji regulatornih T limfocita te aktiviranih trombocita. GP96 ima važnu ulogu i u hematopoezi, osobito u sazrijevanju megakariocita i aktivaciji trombocita, jer je ključan za pravilno savijanje glikoproteinskog kompleksa GPIIb-V-IX, receptora za von Willebrandov faktor [88–90].

1.6.2. Uloga GP96 u patogenezi karcinoma dojke

Stanice karcinoma dojke imaju povećanu ekspresiju GP96 u odnosu na zdravo žljezdano tkivo. Istraživanja su dodatno pokazala razlike i u razini ekspresije GP96 ovisno o histološkom tipu karcinoma dojke te je u invazivnom duktalnom karcinomu značajno viša ekspresija GP96 u usporedbi s invazivnim lobularnim karcinomom [91]. Njegova ekspresija ovisi i o ekspresiji ER, PR i HER2 statusu te Ki-67. Radolović i sur. dokazali su značajno višu ekspresiju GP96 u trostruko negativnom surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke u usporedbi s luminalnim A i luminalnim B HER2-negativnim surogatom. Njegova je visoka ekspresija dokazana i u pacijentica s HER2-pozitivnim karcinomima, osobito kod onih s lokalnim recidivom bolesti [92]. Patel i sur. u svojem su istraživanju pokazali da inhibicija GP96 pomoću paralog-selektivnih inhibitora HSP90 dovodi do apoptoze i smanjenja vijabilnosti stanica karcinoma dojke s povećanom ekspresijom HER2 receptora [93]. Prema literaturi, ekspresija GP96 na staničnoj membrani korelira s fosforilacijom HER2 receptora u primarnom

karcinomu dojke, pri čemu oba proteina tvore funkcionalni kompleks koji potiče dimerizaciju, fosforilaciju i pojačanu signalizaciju HER2 receptora. Inhibicija membranskog GP96 monoklonskim protutijelima dovodi do supresije stanične proliferacije vođene aktiviranim signalnim putevima HER2 i poticanja apoptoze. Dosadašnja istraživanja primjene anti-GP96 monoklonskih protutijela u liječenju HER2-pozitivnih karcinoma dojke pokazala su obećavajuće rezultate. U *in vitro* i *in vivo* modelima potvrđeno je smanjenje signalizacije posredovane HER2, delecija HER2 receptora na staničnoj membrani te ukupne stanične razine HER2, u konačnici dovodeći do smanjenja veličine tumora. Nije dokazano sinergističko djelovanje anti-GP96 protutijela i trastuzumaba [94]. Povišena ekspresija GP96 povezana je s invazivnošću stanica karcinoma dojke, agresivnijim molekularnim surogatima, recidivom bolesti, rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju, lošijim preživljenjem i pojavom moždanih metastaza [95–98]. Martínez-Aranda i sur. utvrdili su da FN14 i GP96 imaju značajnu prediktivnu vrijednost za ranu stratifikaciju rizika za razvoj moždanih metastaza u pacijentica s karcinomom dojke [99]. Dokazana je povezanost GP96 i pojave moždanih metastaza u trostruko negativnom molekularnom surogatu karcinoma dojke aktivacijom Wnt- β -katenin signalnog puta [100]. GP96 potiče preživljavanje metastatskih stanica u mozgu u uvjetima hipoglikemije aktivacijom anti-apoptotskih proteina i induciranjem autofagije. Njegovom delecijom smanjuje se stanična autofagija i reducira razvoj moždanih metastaza [101]. Buc Calderon i sur. pokazali su da visoka ekspresija GP96 pridonosi agresivnosti tumora i rezistenciji na doksorubicin, dok inhibicija njegove ekspresije pomoću siRNK, povećava osjetljivost stanica na kemoterapiju i smanjuje njihov invazivni potencijal. Utvrđeno je da ukupna ekspresija GP96 u staničnim linijama karcinoma dojke ostaje stabilna u uvjetima hipoksije, kemijski inducirane hipoksije i normalnim uvjetima, dok se značajno mijenja delecijom glukoze. Prekomjerna ekspresija GP96 potiče staničnu migraciju i proliferaciju te rezistenciju na oksidativni stres, potvrđujući njegovu ulogu u invazivnom procesu metastaziranja. Istraživanja su pokazala značajno višu razinu ekspresije GP96 u recidivnom karcinomu dojke u usporedbi s primarnim tumorom [95,96]. Liu i sur. potvrdili su negativnu korelaciju između ekspresije GP96 i PR, dok ostali kliničko-patološki parametri poput dobi, veličine tumora, statusa aLČ, kliničkog stadija bolesti i ekspresije ER nisu pokazali značajnu povezanost [97]. Suprotno ovim rezultatima, druge studije su pokazale povezanost izražaja GP96 i metastaza u aLČ, višeg stadija bolesti (III-IV) i većih tumora (≥ 5 cm) te rezistencije na paklitaksel [100,102]. GP96 ima ulogu i u međustaničnoj komunikaciji putem egzosoma za održavanje kemorezistencije stanica karcinoma dojke, degradaciji p53 odgovornog za staničnu smrt te supresiji vijabilnosti CD8⁺ limfocita T aktivacijom upalnog oblika programirane stanične smrti kako bi se izbjegao imunološki odgovor [102]. Visoka ekspresija GP96 povezana je s lošijim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez recidiva bolesti [97,103]. Osim toga, GP96 pozitivno regulira ekspresiju ER- α 36, koji ima ključnu ulogu u proliferaciji stanica karcinoma dojke i razvoju rezistencije na tamoksifen, a blokiranje njihove međusobne interakcije dovodi do supresije stanične proliferacije i invazije [104].

1.7. Androgeni receptori (AR)

1.7.1. Građa i funkcija androgenih receptora

Androgeni receptori (AR) su steroidni hormonski receptori koji pripadaju superobitelji nuklearnih receptora. U istu superobitelj ubrajaju se i ER, PR te glukokortikoidni i mineralokortikoidni receptori. Po svojoj strukturi su proteini relativne molekularne mase 98,8 kD, a sastoje se od 919 aminokiselina koje su kodirane na kromosomskom lokusu Xq11-12. AR ima četiri funkcionalne domene: N-terminalnu domenu (NTD), koja uključuje aktivacijske funkcijske regije i ključna je za transkripcijsku aktivnost, potom DNK-vezujuću domenu (DBD) i karboksil-terminalnu domenu (CTD), koja uključuje ligand-vezujuću domenu (LBD) te povezujuću regiju za nuklearnu lokalizaciju (H) (Slika 6). DBD domena omogućuje direktno vezanje AR-a na promotore i pojačivače gena reguliranih AR-om, čime se potiče ili suprimira transkripcija gena. U nedostatku liganda, AR se nalazi u citoplazmi vezan za HSP90 i HSP70. Endogeni androgeni kod žena i muškaraca su testosteron, 5 α -dihidrotestosteron (DHT), androstendion, dehidroepiandrosteron (DHEA) i njegov sulfatni derivat, dehidroepiandrosteron sulfat (DHEAS). Ovi hormoni se sintetiziraju u nadbubrežnim žlijezdama, jajnicima, testisima, posteljici, mozgu i koži. Najvažniji androgeni su testosteron i DHT. Testosteron se može konvertirati u biološki aktivniji DHT pomoću enzima 5 α -reduktaze, ili u estradiol putem aromataze. Iako se oba hormona vežu za isti AR, svaki od njih ima specifičnu ulogu, osobito u procesu muške spolne diferencijacije. U žena se dio testosterona sintetizira izravno u jajnicima i nadbubrežnim žlijezdama, a dio se dobiva enzimskom konverzijom iz androstendiona i DHEAS-a. U jajnicima se proizvodnja testosterona povećava tijekom folikularne faze, doseže maksimum u vrijeme ovulacije te ostaje povišena i u lutealnoj fazi. Manja količina testosterona se stvara u nadbubrežnim žlijezdama [105]. U muškaraca, testosteron se primarno sintetizira u Leydigovim stanicama testisa, pod utjecajem luteinizirajućeg hormona kojeg izlučuje hipofiza. U plazmi, testosteron cirkulira vezan za serumske vezujuće proteine i albumine [106]. Ulaskom androgena u stanicu i vezivanjem za AR nastaje aktivni kompleks koji se premješta u staničnu jezgru gdje se dimerizira i potom veže na specifična mjesta na DNK. U usporedbi s testosteronom, DHT se na AR veže s dvostruko većim afinitetom i od njega se disocira pet puta sporije. Aktivirani AR osim što djeluje kao aktivator transkripcije, također može smanjiti ekspresiju pojedinih gena, vezujući se i interferirajući s drugim transkripcijskim faktorima.



Slika 6. Funkcionalne domene androgenog receptora: N-terminalna domena (NTD), DNA-vezujuća domena (DBD), povezujuća regija (H) i ligand-vezujuća domena (LBD).

Osim klasične aktivacije vezivanjem liganda odnosno androgena, AR mogu se aktivirati i ne-klasičnim putem - fosforilacijom i/ili interakcijom s koaktivatorima različitih faktora rasta, što dovodi do nishodne aktivacije alternativnih signalnih puteva poput PI3K/AKT, RAS ili MAPK [107].

1.7.2. Biološka funkcija AR-a

Poznato je da AR sudjeluju u brojnim biološkim procesima, budući da su prisutni u gotovo svim stanicama tijela. Korištenjem ARKO mišjih modela (engl. *androgen receptor knockout*, ARKO), istražena je njihova uloga u koštanom metabolizmu, metabolizmu lipida i funkciji mozga te razvoju ženskog reproduktivnog sustava [108]. AR su ključni za razvoj muških spolnih organa i proces spermatogeneze, a također utječu i na obrasce ponašanja kod oba spola. U ARKO miševima, gubitak funkcionalnih AR rezultira značajnim smanjenjem trabekularne i kortikalne koštane mase, uz pojačanu koštanu resorpciju i razvoj osteopenije [109]. Također, istraživanja su pokazala da AR djeluju kao negativni regulator adipogeneze, pri čemu njihova odsutnost u ARKO muških miševa rezultira razvojem pretilosti zbog povećane diferencijacije adipocita i akumulacije masnog tkiva. Gubitak funkcije AR, povezan je i s pojavom inzulinske rezistencije i razvojem metaboličkog sindroma [110,111]. AR imaju utjecaj i na fiziologiju kože, cijeljenje rana te se povezuju s nastankom androgene alopecije, akni i hirzutizma [112]. AR imaju ulogu u regulaciji kognitivnih funkcija, raspoloženja, agresivnog ponašanja i neurogeneze te imaju antistres i antidepresivni učinak putem aktivacije MAPK-ERK2 kaskadnih signalnih puteva u hipokampusu [113]. Studije su pokazale kako AR sudjeluju i u regulaciji prirodene i stečene imunosti. Potrebni su za stvaranje, diferencijaciju i normalnu funkciju neutrofila, aktivaciju makrofaga i produkciju proinflammatoryh citokina te djeluju supresivno na razvoj i aktivaciju T i B limfocita [114]. Istraživanja su pokazala da AR imaju složenu ulogu i u razvoju različitih kardiovaskularnih poremećaja, uključujući hipertenziju, moždani udar, aterosklerozu, aneurizmu abdominalne aorte, hipertrofiju miokarda, zatajenje srca i kardiometabolički sindrom [115,116]. AR pokazuju različite razine ekspresije tijekom različitih stadija folikulogeneze u ovarijima te sudjeluju u nastanku sindroma policističnih jajnika [117,118]. U odsutnosti androgena ili funkcionalnih AR uslijed mutacija različitih gena, izostaje diferencijacija muškog spolnog fenotipa. Inaktivirajuće mutacije AR gena dovode do djelomične ili potpune neosjetljivosti stanica na androgene, što rezultira razvojem sindroma androgene neosjetljivosti. Do sada je identificirano više od 500 različitih mutacija AR gena povezanih s ovim sindromom, pri čemu je većina nasljedna, dok se približno 30% slučajeva odnosi na *de novo* mutacije. Većina ovih mutacija utječe na LBD domenu AR-a [119].

1.7.3. Uloga androgenih receptora u karcinomu dojke

Prema klasifikaciji temeljenoj na imunohistokemijskoj ekspresiji hormonskih i HER2 receptora, karcinomi dojke dijele se u tri glavne podskupine: hormonski ovisni (ER- i/ili PR-pozitivni), HER2-pozitivni i trostruko negativni karcinomi. Novija istraživanja potvrdila su povezanost AR-a i nastanka karcinoma dojke putem različitih mehanizama ovisnih upravo o koekspresiji hormonskih receptora i HER2 amplifikaciji. AR je prekomjerno eksprimiran u 70-90% svih karcinoma dojke te je njihov izražaj u tumorskom tkivu češći od ekspresije ER i PR [120]. U meta analizi koja je obuhvatila 19 studija i preko 7500 pacijenta, Vera-Badillo i sur. potvrdili su da je AR najčešće koeksprimiran u ER-pozitivnim karcinomima dojke i to u 74,8%, dok je u ER-negativnim tumorima AR izražen u 31,8% slučajeva [121]. Druge studije su pokazale značajnu varijabilnost ekspresije AR-a u ER-negativnim karcinomima dojke ovisno o HER2 statusu. Kod hormonski neovisnih, HER2-pozitivnih karcinoma, AR su izraženi u oko 50-60% slučajeva, dok je u trostruko negativnim karcinomima njihova ekspresija oko 20-40% [120]. Ovisno o razini ER ekspresije i surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke, AR mogu imati proliferativni ili antiproliferativni učinak. Collins i sur. su pokazali da su AR izraženi u 91% luminal A, 68% luminal B, 59% HER2-obogaćenih te 32% trostruko negativnih karcinoma dojke. AR su izraženi i u DCIS-u u otprilike 86% slučajeva, a kao kod invazivnih karcinoma dojke, raspodjela pojavnosti njihove pojačane ekspresije također ovisi o surogatu molekularnog podtipa. Ovisno o histološkim tipu invazivnog karcinoma dojke, AR pokazuju najvišu razinu ekspresije u specijalnim tipovima, osobito tubularnom, metaplastičnom, lobularnom i kribriformnom, dok je ekspresija u skvamoznom tipu uglavnom negativna [122]. AR su u korelaciji s ekspresijom α -ER i PR te zbog svojih strukturalnih sličnosti, AR i ER križno aktiviraju različite signalne puteve. Dokazano je da se kod ER-pozitivnih karcinoma dojke, AR natječe s α -ER za α -estrogen vezna mjesta u jezgri. Omjer ekspresije AR i ER, određuje utjecaj ovih receptora na regulaciju proliferacije stanica karcinoma dojke. Kada je viša razina ekspresije AR u odnosu na ER, aktivirani AR se veže na element odgovora na estrogen u jezgri, djelujući inhibitorno na stanični rast. Kad je razina ekspresije ER viša od ekspresije AR, tada se ER veže na element odgovora na androgene, dovodeći do stanične proliferacije. Kod HER2-pozitivnih tumora, AR aktivira složene signalne puteve koji potiču rast i dijeljenje tumorskih stanica. AR su u korelaciji s povoljnim kliničko-patološkim parametrima (manji tumori, niži histološki gradus, odsutnost nekroze, niži Ki-67) i boljim odgovorom na terapiju u ER-pozitivnim tumorima dojke [123]. Brojne studije ispitivale su prediktivnu, prognostičku i terapijsku ulogu AR-a, no rezultati su često oprečni zbog heterogenosti njegove ekspresije i signalnih puteva između pojedinih surogata molekularnih podtipova karcinoma dojke. Meta analiza Bozovic-Spasojevic i sur. koja je uključivala više od 10 000 pacijenata, utvrdila je da je pozitivna ekspresija AR-a povezana s boljim preživljenjem bez povrata bolesti i ukupnim preživljenjem u ER-pozitivnim karcinomima dojke [124]. Drugo istraživanje također je pokazalo da je ekspresija AR-a kod postmenopauzalnih žena s ER-pozitivnim karcinomom dojke povezana s boljim preživljenjem tijekom prvih 5-10 godina nakon postavljanja dijagnoze [125].

Suprotno tome, Kensler i sur. u svom istraživanju provedenom na 3021 ispitanici nisu dokazali statistički značajnu povezanost ekspresije AR-a s povoljnijim preživljenjem u ER-pozitivnim karcinomima, niti su potvrdili prediktivnu ulogu AR-a za odgovor na endokrinu terapiju letrozolom ili tamoksifenom [126]. Slični rezultati dobiveni su i u studiji Xu i sur., koja je obuhvatila 4914 ispitanica s trostruko negativnim karcinomom dojke [127].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja jest ispitati postoji li razlika u ekspresiji GP96 i AR-a između hormonski ovisnih i hormonski neovisnih karcinoma dojke te postoji li razlika u razini ekspresije GP96 i AR-a s obzirom na metastatski status nSLN-a.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. ispitati korelaciju ekspresije GP96 i AR-a u karcinomu dojke.
2. odrediti amplifikaciju gena za GP96 i ispitati njezinu povezanost sa surogatom molekularnog podtipa karcinoma dojke ovisno o hormonskom statusu.
3. ispitati postoji li razlika u petogodišnjem ukupnom preživljenju i preživljenju bez relapsa bolesti s obzirom na ekspresiju AR-a i GP96.
4. utvrditi postoji li razlika u patohistološkim karakteristikama karcinoma i aLČ u odnosu na prisutnost metastaza u nSLN.

Naša je hipoteza da je povećana ekspresija GP96 u stanicama karcinoma dojke u negativnoj korelaciji s ekspresijom AR te da je povećana ekspresija GP96 povezana s većom zahvaćenošću nSLN-a metastazama. Pretpostavljamo da su prisutnost LVI-a, ENE-a i makrometastaze u LČČ-u te veći tumori u skupini hormonski ovisnih karcinoma dojke češći kod nSLN-a zahvaćenih metastazama.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 107 žena s dijagnosticiranim invazivnim karcinomom dojke, kliničkog stadija cT1-T2N0, koje su u razdoblju od 2007. do 2016. godine operirane na Klinici za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. Prethodno operacijskom zahvatu na dojci, učinjena im je scintigrafija LČČ na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu, Kliničkog bolničkog centra Rijeka.

Uključni kriteriji za sudjelovanje u studiji bili su: novootkriven i patohistološki potvrđen invazivni karcinom dojke, veličine do 5 cm (po TNM klasifikaciji pT1-T2 stadij), bez kliničkih ili ultrazvučnih znakova zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova, u trenutku dijagnoze bez udaljenih metastaza bolesti, s nalazom biopsije LČČ pozitivnim na tumorsku invaziju, nakon kojeg je uslijedila aksilarna disekcija, da su pacijentice primile adjuvantnu terapiju sukladno imunofenotipu karcinoma dojke prema važećim smjernicama razdoblja u kojem su operirane te da su praćene najmanje 5 godina od dana kada je učinjen operacijski zahvat na dojci.

U studiju nisu bile uključene pacijentice koje su već imale učinjen operacijski zahvat na dojci, potom pacijentice s ranijim operacijskim zahvatima u aksilarnim regijama, obostranim ili rekurentnim karcinomom dojke, uznapredovalim stadijem karcinoma dojke (po TNM klasifikaciji pT3-T4), one koje boluju od druge maligne bolesti, pacijentice koje su primile bilo koji oblik neoadjuvantne terapije, kao i one za koje je utvrđeno da nisu onkološki redovito praćene u tijeku petogodišnjeg postoperativnog praćenja od dana kirurškog zahvata na dojci ili ako glavnom istraživaču nisu bili dostupni relevantni nalazi njihovog redovitog petogodišnjeg praćenja ili ako je nedostajao biopsijski materijal u arhivi Zavoda za opću patologiju i patološku anatomiju.

3.2. Metode

3.2.1. Bioptički materijal i patohistološke karakteristike karcinoma dojke

Pregledom arhive biopsija Zavoda za patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci izdvojeni su patohistološki materijali pacijentica koje su zadovoljavale uključne kriterije studije iz razdoblja od 2007. do 2016. godine. Arhivski patohistološki materijal fiksiran je standardnim postupkom i uklopljen u parafinske kocke, kojima su dodijeljeni bioptički brojevi prema godinama. Bioptički materijal uključivao je i histološke preparate obojene hematoksilin- eozinom (H-E) i imunohistokemijske preparate, a ovi preparati su izdvojeni iz staklene arhive Zavoda za patologiju i citologiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka. U dogovoru s patologom s višegodišnjim iskustvom iz užeg područja patologije dojke, za potrebe statističke analize, revidirani su imunohistokemijski

preparati za određivanje statusa ER i PR na tumorskim stanicama karcinoma dojke. Hormonski ovisni karcinomi dojke definirani su izražajem ER >1% i/ili izražajem PR >1% u jezgrama tumorskih stanica.

Izražaj receptora humanog epidermalnog čimbenika rasta 2 (HER2) analiziran je imunohistokemijskom (IHC) metodom (HerceptTest) ili metodama *in situ* hibridizacije (ISH) koje detektiraju povećan broj kopija gena HER2/neu u uzorcima tkiva prema važećim smjernicama [128]. U HerceptTestu koristi se poliklonsko protutijelo usmjereno na epitope intracitoplazmatske domene HER2 receptora, a interpretira se na temelju intenziteta i uzorka obojenosti membrana tumorskih stanica na sljedeći način: IHC 0 (negativan): nema membranskog bojenja ili inkompletno slabo membransko bojenje prisutno u $\leq 10\%$ tumorskih stanica;

IHC 1+ (negativan): slabo ili jedva vidljivo inkompletno membransko bojenje u $>10\%$ tumorskih stanica;

IHC 2+ (dvojben): inkompletno membransko bojenje i/ili slabog ili umjerenog intenziteta u $>10\%$ tumorskih stanica ili jako kompletno membransko bojenje u $\leq 10\%$ tumorskih stanica;

IHC 3+ (pozitivan): jako, kompletno membransko bojenje u $>10\%$ tumorskih stanica.

Izražaj HER2 receptora je određen kao prekomjeran odnosno pozitivan kod rezultata IHC 3+ ili negativan kod rezultata IHC 0 ili IHC 1+. Rezultat IHC bojenja 2+ smatra se dvojbenim te je konačni rezultat potvrđen SISH metodom (hibridizacija *in situ* srebrom) pomoću iNFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail - koktel duple DNK probe za *in situ* hibridizaciju za detekciju HER2 (Ventana Medical Systems, Tuscon, SAD). Učinjena je DNK hibridizacija s probama Red ISH (proba specifična za 17. kromosom) i SISH (proba specifična za HER2 gen). Evaluacija je izvršena na temelju brojenja signala Red ISH i SISH u 20 interfaznih jezgara u preparatu, prema preporuci proizvođača. Izračunat je omjer između broja signala specifičnih za HER2 gen i signala specifičnih za kromosom 17. Referentni omjeri su: < 1,8 nema amplifikacije HER2 gena

> 2,2 amplifikacija HER2 gena

1,8-2,2 granični rezultat

Mitotska proliferacijska aktivnost tumorskih stanica izražena je kao Ki-67 indeks, a određena je IHC metodom kao postotak pozitivnih jezgara tumorskih stanica uz graničnu vrijednost od 20%. Niska proliferacijska aktivnost je manja od 20%, a visoka veća ili jednaka 20% [26].

Surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke određeni su prema izražaju hormonskih receptora, HER2 statusu i mitotskom proliferacijskom indeksu Ki-67, sukladno preporukama konsenzusa iz St. Gallena [26]. Postoji pet skupina:

- 1) luminal A surogat definiran je pozitivnim izražajem ER i PR, negativnim statusom HER2 receptora i niskim Ki-67 odnosno $<20\%$.
- 2) luminal B HER2-negativan surogat definiran je pozitivnim izražajem ER, negativnim statusom HER2 receptora, negativnom ekspresijom PR ili ekspresijom $<20\%$ i/ili $Ki-67 \geq 20\%$.

- 3) luminal B HER2-pozitivan surogat definiran je pozitivnim izražajem ER, uz bilo koju razinu izražaja PR, pozitivnim statusom HER2 receptora i bilo kojom razinom Ki-67.
- 4) HER2-obogaćeni surogat definiran je negativnom ekspresijom ER i PR i pozitivnim statusom HER2 receptora.
- 5) trostruko negativan surogat definiran je negativnim izražajem ER i PR uz negativan status HER2 receptora.

Proboj tumora kroz čahuru LČČ (engl. *extranodal extension*; ENE) definiran je kao proboj tumorskih stanica kroz čahuru LČČ u masno tkivo oko limfnog čvora. ENE u LČČ je reevaluirana na histološkim H-E preparatima ili imunohistokemijskim preparatima obojenim na AE1/AE3, napravljenim prema standardnom protokolu za LČČ. Patolog je izmjerio ENE u dvije dimenzije, u najvišem i najširem promjeru, na način kako je opisano u istraživanju Xa i sur. [129]. Najviši promjer ENE u LČČ (nvENE) je izmjeren od točke gdje tumorsko tkivo probija kapsulu LČČ do najviše točke tumorskih stanica u masnom tkivu oko limfnog čvora. Najširi promjer ENE u LČČ (nšENE) je izmjeren duž kapsule LČČ, između točaka na perifernim rubovima područja s ENE. Ovisno o dimenziji promjera ENE u LČČ, ispitivana skupina je podijeljena u dvije podgrupe: nšENE>nvENE i nšENE≤nvENE.

Ekstenzivna intraduktalna komponenta (EIC) određena je prema smjernicama Američkog društva patologa [130], a definirana je na dva načina: 1. DCIS zauzima ≥25% unutar područja invazivnog karcinoma i prisutan je i u okolnom tkivu dojke, 2. opsežan DCIS s invazivnim karcinomom veličine ≤1 cm (npr. invazivna komponenta karcinoma je premala da bi duktalni karcinom *in situ* činio 25% ukupne površine).

LNR je izračunat kao omjer broja pozitivnih i broja ukupno izvađenih limfnih čvorova.

Opseg zahvaćenosti nSLN metastazama je kategoriziran kao visoki ako su ≥2 nSLN-a bila zahvaćena metastazama odnosno niski ako su <2 nSLN bila zahvaćena metastazama.

Pacijentice su prema dobi u trenutku postavljanja dijagnoze podijeljene u dvije dobne podskupine: ≤50 godina i >50 godina.

Indeks tjelesne mase (ITM) izračunat je prema izrazu:

$$ITM = \frac{m}{h^2}$$

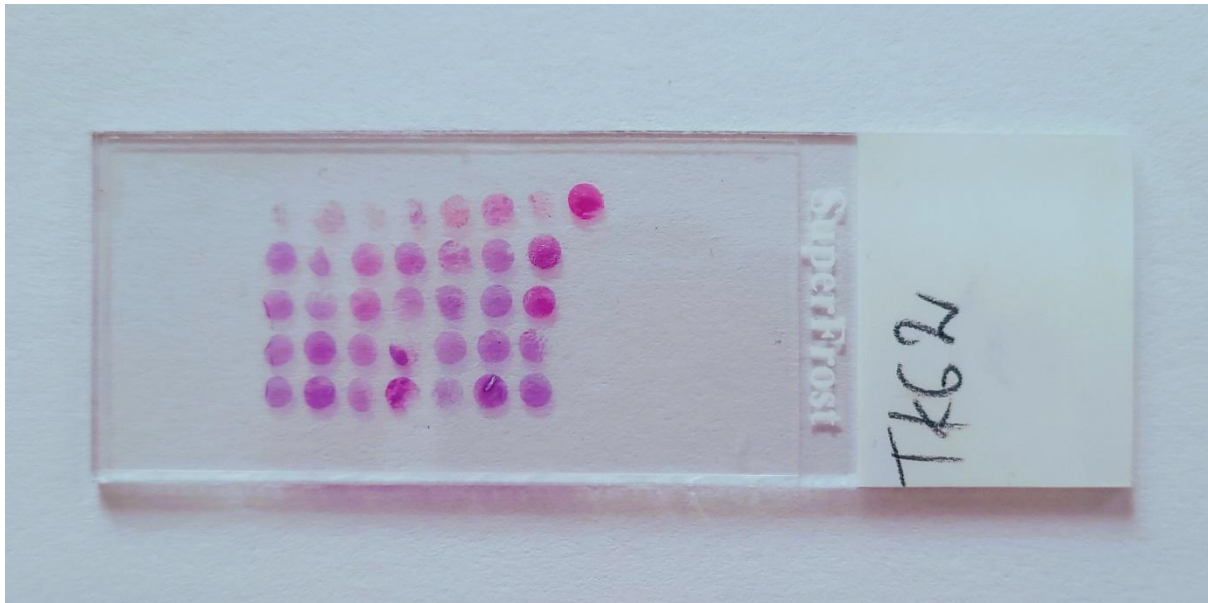
gdje su m tjelesna masa izražena u kilogramima (kg) i h visina izražena u metrima (m). Indeksi su potom kategorizirani prema odredbama Svjetske zdravstvene organizacije [131].

Recidiv bolesti je uključivao lokoregionalni i/ili udaljeni recidiv, koji god se pojavio prvi. Lokoregionalni recidiv bolesti definiran je kao recidiv u istostranoj torakalnoj stijenci ili dojci ili zahvaćenost istostranih aksilarnih, supraklavikularnih, infraklavikularnih i/ili internih mamarnih

limfnih čvorova. Recidiv na bilo kojem drugom mjestu smatrao se udaljenim recidivom bolesti. Ukupno preživljenje određeno je kao vrijeme od dana operacijskog zahvata na dojci do smrti od bilo kojeg uzroka. Preživljenje bez recidiva bolesti je definirano kao vrijeme od dana operacije do pojave recidiva bolesti, lokoregionalnog i/ili udaljenog.

3.2.2. Izrada tkivnih mikroareja (TMA)

Za IHC analizu uzoraka karcinoma dojke, korištena je metoda tkivnih mikroareja. Prvo su pregledani H-E patohistološki preparati cjelovitih biopsija te su na stakalcima flomasterom označena reprezentativna područja invazivnog karcinoma, bez krvarenja i nekroze. Zatim su obilježene i pripadajuće parafinske kocke (donorske kocke) sukladno oznakama na stakalcima. Koristeći ručni uređaj za izradu tkivnih mikroareja (MTA Booster OI, Alphelys, Plaisir, Francuska), uzeta su po dva cilindra tkiva iz donorske kocke promjera 2 mm, koja su potom prenesena u novopripremljenu parafinsku kocku. Isti postupak je ponovljen s biopsijama tkiva dojki pacijentica koje su operirane zbog mamografski verificiranih mikrokalcifikata, a za koje je patohistološkom analizom postavljena dijagnoza neproliferativnih promjena (mikrociste, ciste, fibroza i fibrocistične promjene). Uzet je po jedan cilindar promjera 2 mm koji je pripadao histološki nepromijenjenom žljezdanom tkivu dojke. Uzorci ovih pacijentica činili su kontrolnu skupinu. Za orijentaciju TMA korišten je cilindar normalnog tkiva jetre, smješten u sjecištu x i y osi prema kojem su cilindri tkiva montirani s razmakom od 1 mm. Na ovaj način napravljeno je sedam novih parafinskih kocki, koje su čuvane u termostatu na temperaturi od 45 °C preko noći radi uklapanja tkiva u kocku. Nakon hlađenja, parafinske kocke su pogodne za rezanje mikrotomom te su izrađeni parafinski rezovi debljine 4 µm. Jedan set parafinskih rezova obojen je H-E radi analize morfologije stanica, dok su dva seta pripremljena za IHC bojenja (Slika 7).



Slika 7. Tkivne mikroareje karcinoma dojke, bojanje hematoksilin-eozinom.

3.2.3. Imunohistokemijsko bojenje i analiza

3.2.3.1. Priprema za imunohistokemijsko bojenje

Rezovi parafinskih TMA kocaka debljine 4 μm postavljeni su na predmetna stakalca obložena silanom te su sušeni preko noći u sušioniku na 48 °C. Nakon toga su deparafinizirani supstitucijom ksilena tri puta tijekom 10 minuta (Tissue Clear, art.1426, Sakura, Nizozemska) i potom rehidrirani apsolutnim etilnim 100%-tnim alkoholom tijekom 5 minuta, zatim 96%-tnim alkoholom tijekom 5 minuta te 70%-tnim alkoholom tijekom 5 minuta. Nakon postupka rehidracije, rezovi su ispirani u destiliranoj vodi tijekom 10 minuta. Nakon sušenja rezova, slijedio je postupak otkrivanja antigenskih epitopa pomoću predtretmana induciranog toplinom. Predmetna stakalca namijenjena bojanju GP96 tretirana su Tris-EDTA puferom (pH 9,0) pri temperaturi od 97 °C tijekom 20 minuta u vodenoj kupelji, dok su rezovi namijenjeni bojanju AR-a inkubirani u Tris-EDTA puferu (pH 9,0) u uređaju PT link (Dako, Glostrup, Danska) pri 97 °C tijekom 20 minuta. Zatim je uslijedilo hlađenje na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta i ispiranje u destiliranoj vodi.

3.2.3.2. Imunohistokemijsko bojenje GP96

Za GP96, nespecifična vezna mjesta blokirana su 5%-tnim normalnim kozjim serumom (X0907, Dako) u 1%-tnoj otopini goveđeg serumskog albumina (BSA) tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, rezovi su inkubirani preko noći na temperaturi od +4 °C u ovlaženoj komori sa zečjim monoklonskim IgG protutijelom protiv GRP94 (klon D6X2Q, Cell Signalling Technology, Danvers,

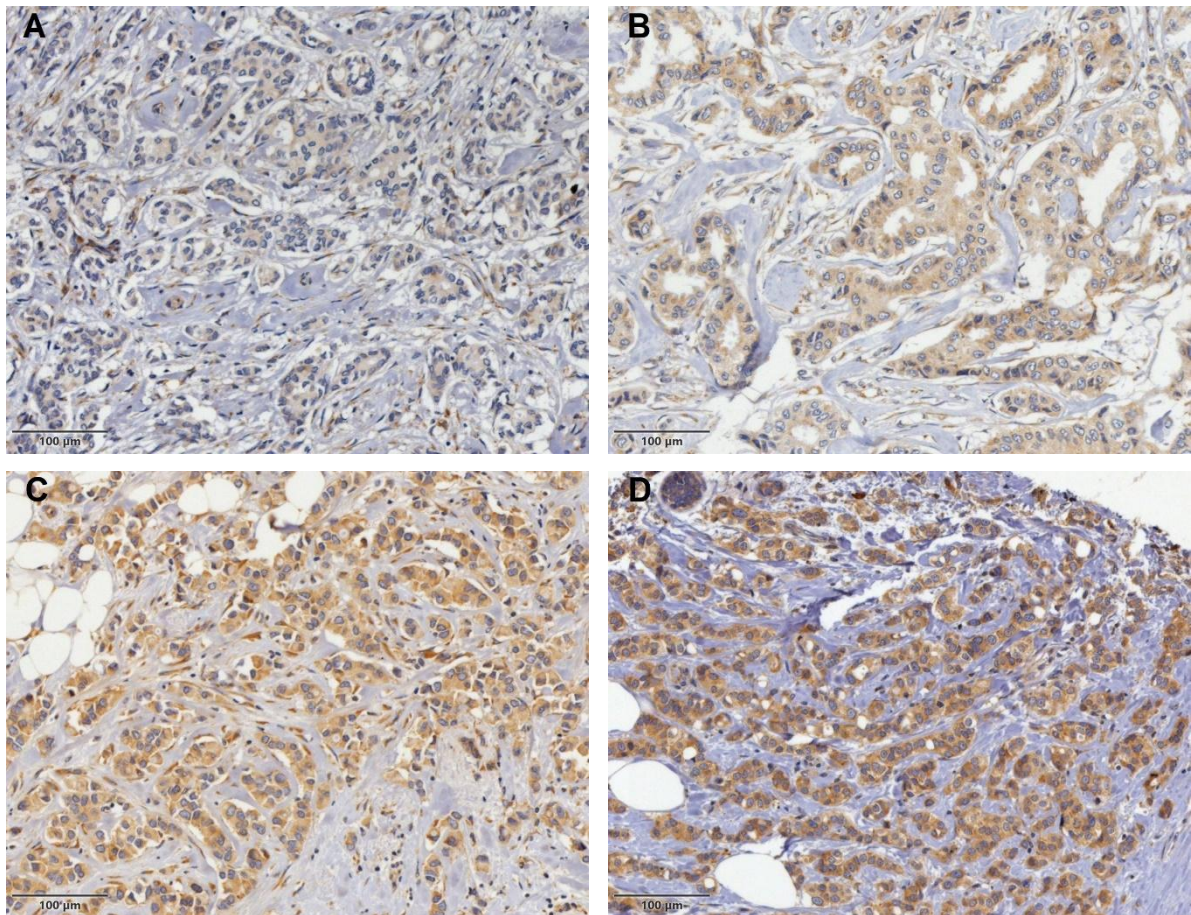
SAD) u razrjeđenju 1:800 u diluentu za protutijela. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je primjenom peroksidaza-blokirajuće otopine (S2023, Dako) tijekom 5 minuta. Zatim su rezovi inkubirani sa sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG protutijelom konjugiranim s hrenovom peroksidazom (H&L-HRP, ab6721, Abcam) u razrjeđenju 1:500 tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Imunohistokemijska vizualizacija provedena je pomoću EnVision Flex + sustava (K8000, Dako, Glostrup, Danska), korištenjem 3,3'-diaminobenzidina (DAB) kao smeđim kromogenom. Nakon toga, rezovi su isprani destiliranom vodom, kontrastirani hematoksilinom i dehidrirani kroz rastuće koncentracije etanola. Negativna kontrola imunohistokemijskog bojanja pripremljena je zamjenom primarnog protutijela diluentom.

3.2.3.3. Imunohistokemijsko bojenje AR-a

Za IHC bojanje AR-a korišteno je mišje monoklonalno IgG protutijelo protiv humanog AR (klon AR441, Dako Cytomation, Glostrup, Danska) u razrjeđenju 1:100 s DAKO Antibody Diluentom (S0809). Nakon pripreme i otkrivanja antigenskih epitopa kako je prethodno opisano, rezovi su stavljani u Dako automatski imunobojač (DakoCytomation Colorado Inc, Fort Collins, SAD), gdje su korištene odgovarajuće DakoREAL otopine (Dako, Glostrup, Danska), prema uputama proizvođača. Primarno protutijelo inkubirano je 30 minuta na sobnoj temperaturi. Za imunohistokemijsku vizualizaciju korišten je EnVision Flex + sustav (K8000, Dako, Glostrup, Danska) s DAB kromogenom. Potom su rezovi kontrastirani s hematoksilinom. Negativna kontrola imunohistokemijskog bojenja pripremljena je zamjenom primarnog protutijela fosfatnim puferom (PBS).

3.2.3.4. Procjena imunohistokemijskog bojenja za GP96 i AR

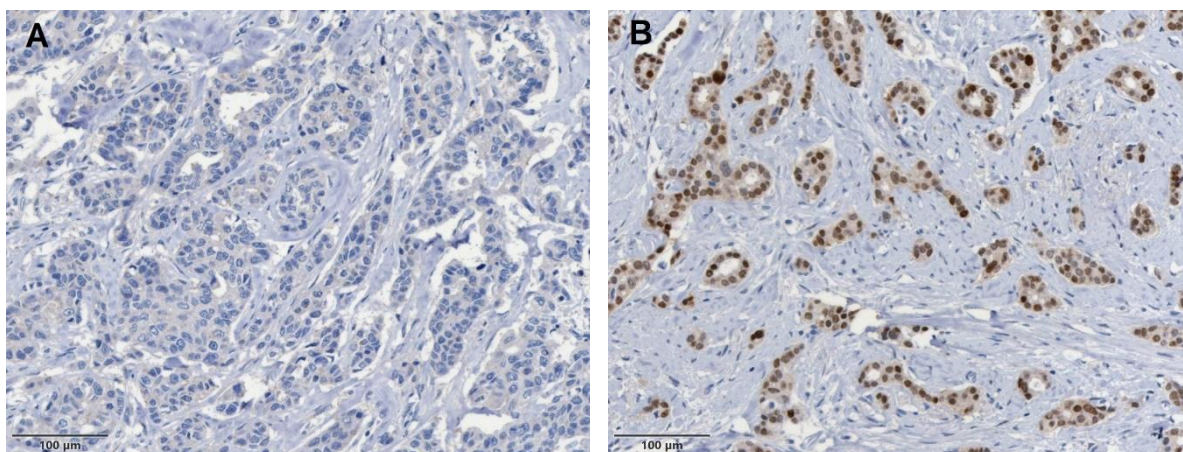
Analiza IHC bojenja GP96 na tumorskim stanicama, provedena je procjenom intenziteta bojenja i ukupnog postotka pozitivnih tumorskih stanica. Intenzitet bojenja procijenjen je semikvantitativno kako slijedi: 0 – negativno, 1 – slabo pozitivno, 2 – umjereno pozitivno i 3 – snažno pozitivno (Slika 8). Konačni rezultat izražen je kao histoskor (engl. *histoscore*, HS) koji predstavlja umnožak postotka pozitivnih stanica i intenziteta bojenja, s maksimalnom vrijednošću 300. Za potrebe statističke analize, vrijednosti HS ekspresije GP96 kategorizirane su u dvije skupine prema optimalnoj graničnoj vrijednosti određenom analizom krivulje osjetljivosti dijagnostičkog testa (engl. *Receiver Operating Characteristic Curves*, ROC). Tumori s HS većim od 200 smatrani su tumorima s povišenim izražajem GP96, dok su tumori s HS manjim ili jednakim 200, klasificirani kao tumori s niskim izražajem GP96.



Slika 8. Reprezentativne slike tkivnih mikroareja obojenih imunohistokemijskom metodom s protutijelima na glikoprotein 96 (GP96). A – negativno obojenje, B – slabo pozitivno obojenje, C – umjereno pozitivno obojenje i D – snažno pozitivno, citoplazmatsko obojenje. Skala 100 µm, povećanje 20x.

Izražaj AR-a određen je prema postotku tumorskih stanica s pozitivnim nuklearnim bojenjem (Slika 9). Za potrebe statističke analize, tumori s 10 ili više posto pozitivno obojenih jezgara tumorskih stanica klasificirani su kao AR-pozitivni, dok su tumori s manje od 10% pozitivnih jezgara klasificirani kao AR-negativni [132].

Sva očitavanja učinjena su bez uvida u kliničko-patološke karakteristike pacijentica i histološke karakteristike tumora.



Slika 9. Reprezentativne slike tkivnih mikroareja obojenih imunohistokemijskom metodom s protutijelima na androgene receptore (AR). (A) negativan izražaj AR-a u tumorskim stanicama i (B) pozitivan izražaj AR-a (nuklearno obojenje). Skala 100 µm, povećanje 20x.

3.2.4. Analiziranje aktivacije gena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Metodom kvantitativne analize aktivacije gena u stvarnom vremenu (RT-qPCR) ispitane su vrijednosti relativne ekspresije gena GP96 iz biopsijskih materijala luminal A, luminal B i trostruko negativnog molekularnog surugata karcinoma dojke, kao i iz uzoraka normalnog žljezdanog tkiva dojke (N=12 za svaku podskupinu). Ukupna RNK izolirana je pomoću TRIzol reagensa (Invitrogen, Carlsbad, SAD), prema uputama proizvođača uz korištenje kloroforma, izopropanola i etanola. Kvaliteta i koncentracija izolirane RNK procijenjene su elektroforezom na agaroznom gelu (jasno vidljive 18S i 28S ribosomalne RNK trake) te UV spektrofotometrijom (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD), na temelju omjera apsorbancije OD260/OD280. Za uklanjanje moguće kontaminacije genomskom DNK korišten je Turbo DNA-free kit (Ambion Inc., The RNA Company, Austin, SAD) prema uputama proizvođača. Visokokvalitetni RNK uzorci zatim su reverzno transkribirani u komplementarnu DNK (cDNK) pomoću High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, SAD), sukladno uputama proizvođača. Razina ekspresije gena GP96 kvantificirana je korištenjem ABI PRISM 7300 sustava (Applied Biosystems, Foster City, SAD), pri čemu je 18S rRNK korištena kao referentni kućepaziteljski (engl. *housekeeping*) gen. Količina glasničke RNK određena je pomoću komercijalno dostupnih TaqMan Assay proba za GP96 (Hs00427665_g1) i 18S rRNK (Hs99999901_s1), prema uputama proizvođača. Postupak umnažanja je proveden uz standardizirane uvjete prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Program reakcije korištene za kvantifikaciju ekspresije gena GP96

Program reakcije:		
Inkubacija	2 min	50 °C (1 ciklus)
Inicijalna denaturacija	10 min	95 °C (1 ciklus)
Denaturacija	15 sek	95 °C (40 ciklusa)
Sparivanje/elongacija	1 min	60 °C

Rezultati amplifikacije analizirani su pomoću računalne aplikacije 7300 System SDS Software v1.3. Reakcije svih uzoraka napravljene su u duplikatima, a rezultat se smatrao vjerodostojnim samo u slučaju kada nije bilo razlike između njihovih amplifikacijskih krivulja. Relativna razina ekspresije gena GP96 normalizirana je prema razini 18S rRNK te je izražena kao $2^{-\Delta\Delta Ct}$ vrijednost [133].

3.2.5. Etički aspekti istraživanja

Studija je provedena kao retrospektivna studija, u skladu sa svim primjenjivim smjericama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju poštujući Osnove dobre kliničke prakse. Istraživanjem je osigurano poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet (autonomnost), pravednost, dobročinstvo i neškodljivost, kao i onih iz njih izvedenih (privatnost, povjerenje) – u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije te ostalim mjerodavnim dokumentima.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Rijeka (broj 003-05/21-1/114, datum odobrenja 12. listopada 2021.).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka rađena je pomoću programa Stata 16.0. (StataCorp LLC, College Station, Texas, SAD) i MedCalc 18.2.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgija), uz postavljenu razinu statističke značajnosti $\alpha=0,05$.

Analizirane kategorijske varijable prikazane su apsolutnim i relativnim učestalostima, odnosno frekvencijama ili postotnim udjelima. Za kvantitativne varijable odabrane su odgovarajuće mjere prosjeka i odstupanja. Podatci s normalnom raspodjelom prikazani su aritmetičkom sredinom sa standardnom devijacijom, dok su u suprotnom prikazani medijanom s rasponom. Normalnost raspodjele varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnov testom. Razlike u pojavnosti između kategorijskih varijabli testirane su χ^2 -testom i t-testom za proporcije, dok su razlike kvantitativnih varijabli ispitane t-testom za nezavisne uzorke. Testom korelacije ispitana je povezanost ekspresije GP96 i AR-a, a razlika u

ekspresiji GP96 i AR-a u odnosu na status nSLN-a t-testom za nezavisne uzroke. Za utvrđivanje statističke značajnosti razlike između više međusobno ispitivanih skupina koristili su se Kruskal-Wallis test ili ANOVA, ovisno o tipu i raspodjeli podataka. Univarijatnom i multivarijatnom logističkom regresijskom analizom utvrđena je značajnost patohistoloških karakteristika karcinoma i aLČ te ekspresije GP96 i AR-a u predviđanju tumorske invazije u nSLN. Stopa petogodišnjeg ukupnog preživljenja i preživljenja bez recidiva bolesti između podgrupa prikazana je Kaplan-Meierovim krivuljama preživljenja, a razlika među njima testirana je log-rank testom. Univarijatni i multivarijatni Coxovi regresijski modeli korišteni su za analizu prognostičkog značaja ispitivanih varijabli za ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti, a rezultati su iskazani kao omjeri rizika s 95% intervalima pouzdanosti.

Od demografskih i kliničko-patoloških karakteristika, koji su razmatrani kao prediktori statusa nSLN-a i preživljenja u ispitivanoj skupini, analizirali smo: razinu izražaja GP96 i AR-a, dob u trenutku postavljanja dijagnoze (≤ 50 i > 50 godina), lokalizaciju tumora (lateralnost), histološki tip (duktalni, lobularni ili ostali podtipovi), histološki gradus, veličinu tumora, pN stadij, NLN, LNR, prisutnost nekroze, kalcifikata, LVI-a, perineuralne invazije, ENE-a u LČČ i EIC-a, status ER i PR, mitotski proliferacijski indeks Ki-67 ($< 20\%$ ili $\geq 20\%$), HER2 status, veličinu metastaze u LČČ (metastaza ≥ 2 mm u najvećem promjeru unutar LČ i metastaza < 2 mm u najvećem promjeru unutar LČ), broj pozitivnih LČČ, ITM, surogat molekularnog podtipa karcinoma dojke te status nSLN ovisno o postojanju metastaza.

4. REZULTATI

4.1. Kliničko-patološke karakteristike ispitivane skupine

U istraživanje je uključeno 107 pacijentica koje su operirane na Klinici za kirurgiju, Kliničkog bolničkog centra Rijeka, u periodu od 2007. do 2016. godine. Od ukupnog broja pacijentica, u njih 73 (68,22%) učinjena je poštedna operacija dojke, a u preostale 34 (31,78%) mastektomija. Medijan dobi pacijentica bio je 59 godina, s rasponom od 28 do 89 godina. Prema surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke, njih 34 (31,77%) imalo je luminal A surogat, 36 (33,64%) luminal B HER2-negativan surogat i 6 (5,61%) luminal B HER2-pozitivan surogat te 21 (19,63%) HER2-obogaćeni i 10 (9,35%) trostruko negativan surogat karcinoma dojke. Srednja veličina tumora iznosila je $2,57 \pm 1,16$ cm. Prema histološkom gradusu, 41 tumor (38,32%) klasificiran je kao dobro diferenciran (gradus 1), 50 (46,73%) kao umjereno diferenciran (gradus 2), a 16 (14,95%) kao loše diferenciran (gradus 3). Limfovaskularna invazija bila je prisutna u 91 (85%) pacijentice, nekroza u 34 (31,77%), a kalcifikati u njih 45 (42,05%). Kliničko-patološke karakteristike pacijentica prikazane su u Tablici 4.

Hormonski ovisni karcinomi dojke češće su bili histološkog gradusa G1 ($P < 0,001$), HER2-negativni ($P < 0,001$), prema histološkom tipu duktalni invazivni ($P = 0,003$), bez nekroze ($P = 0,002$), s niskim Ki-67 ($P = 0,002$) i makrometastazama u LČČ ($P = 0,002$). Kalcifikati u invazivnoj komponenti tumora najčešće su bili odsutni kod hormonski neovisnih tumora ($P = 0,009$). Nije bilo razlike u statusu nSLN ovisno o ekspresiji hormonskih receptora ($P = 0,238$).

Pacijentice u dobi 50 godina ili mlađe češće su imale karcinome veće od 2 cm ($P = 0,009$), bez kalcifikata u invazivnoj komponenti tumora ($P = 0,023$). U cijeloj ispitivanoj skupini EIC je u većine pacijentica bio odsutan, no u slučajevima kada je bio detektiran, njegova pojavnost je bila značajno učestalija u mlađih pacijentica ($P = 0,017$). Također, mlađe su pacijentice češće imale ITM ≤ 25 kg/m² ($P = 0,011$) u usporedbi s pacijenticama starijim od 50 godina.

Karcinomi s pozitivnim HER2 statusom češće su bili histološkog gradusa G3 ($P = 0,022$), ER-negativni ($P < 0,001$), PR-negativni ($P < 0,001$) i visokog Ki-67 ($P = 0,002$). Pacijentice koje su imale karcinome s visokim Ki-67 češće su imale prisutnu nekrozu u invazivnoj komponenti tumora ($P < 0,001$). Statistička analiza je pokazala da je prisutnost limfovaskularne invazije češće praćena perineuralnom invazijom ($P = 0,013$). Pacijentice koje su podvrgnute mastektomiji, češće su imale prisutan EIC ($P = 0,012$) i pozitivan status nSLN ($P = 0,036$). Kod karcinoma histološkog gradusa G3 u većini slučajeva bila je prisutna nekroza u invazivnoj komponenti tumora ($P < 0,001$).

Tablica 4. Kliničko-patološke karakteristike pacijentica

Karakteristike	No. (%)	<i>P</i> vrijednost
Dob, godine	medijan (raspon)	59 (28-89)

	≤ 50 godina	29 (27,1%)	<0,001
	> 50 godina	78 (72,9%)	
Lateralnost	lijeva	51 (47,66%)	0,629
	desna	56 (52,34%)	
Histološki tip	duktalni/NST	85 (79,44%)	<0,001
	lobularni	14 (13,08%)	
	ostali	8 (7,48%)	
Histološki gradus	G1	41 (38,32%)	<0,001
	G2	50 (46,73%)	
	G3	16 (14,95%)	
Veličina tumora, cm	ar.sred.± std.	2,57±1,16	
pT stadij	pT1	44 (41,12%)	0,066
	pT2	63 (58,88%)	
pN stadij	1	68 (63,55%)	0,005
	2	39 (36,45%)	
Nekroza	nema	73 (68,22%)	<0,001
	prisutna	34 (31,78%)	
Kalcifikati	nema	62 (57,94%)	0,100
	prisutni	45 (42,06%)	
EIC	nema	89 (83,18%)	<0,001
	prisutna	18 (16,82%)	
ER status	negativan	31 (28,97%)	<0,001
	pozitivan	76 (71,03%)	
PR status	negativan	39 (36,45%)	0,005
	pozitivan	68 (63,55%)	
HER2 status	negativan	80 (74,77%)	<0,001
	pozitivan	27 (25,23%)	
Ki-67 indeks	< 20%	56 (52,34%)	0,629
	≥ 20%	51 (47,66%)	
Limfovaskularna invazija	negativna	16 (14,95%)	<0,001
	pozitivna	91 (85,05%)	
Perineuralna invazija	negativna	30 (28,04%)	0,029
	pozitivna	49 (45,79%)	
	nije moguće odrediti	28 (26,17%)	
ENE u LČČ	negativna	69 (64,49%)	0,003
	pozitivna	38 (35,51%)	
Veličina metastaze u LČČ,mm	ar.sred. ± std.	9,19±6,75	
ITM, kg/m ²	≤ 25	48 (44,86%)	<0,001
	> 25	58 (54,21%)	
	nedostupan podatak	1 (0,93%)	

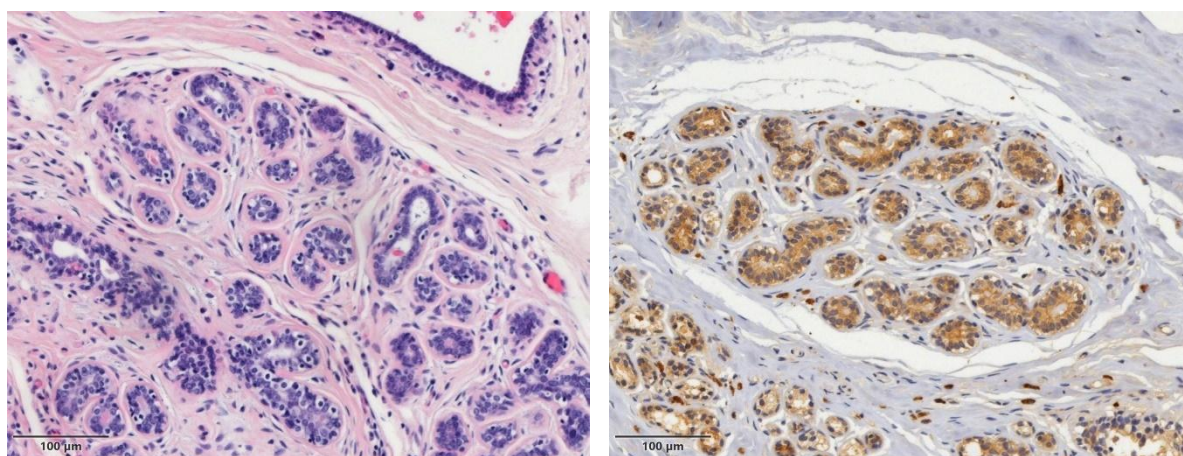
Tip kirurškog zahvata	mastektomija	34 (31,78%)	<0,001
	poštedna operacija	73 (68,22%)	
Surogat molekularnog podtipa	Luminal A	34 (31,77%)	<0,001
	Luminal B/HER2-	36 (33,64%)	
	Luminal B/HER2+	6 (5,61%)	
	HER2-obogaćen	21 (19,63%)	
	Trostruko negativan	10 (9,35%)	

NST – nije specijalni tip; EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; ER – estrogenski receptori; PR – progesteronski receptori; HER2 – humani epidermalni čimbenik rasta 2; ENE – ektranodalna ekstenzija; LČČ – limfni čvor čuvar; ITM – indeks tjelesne mase

4.2. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u normalnom tkivu dojke i karcinomu dojke

4.2.1. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u normalnom tkivu dojke

Ekspresija GP96 u normalnom tkivu dojke prisutna je u citoplazmi stanica žljezdanog tkiva, limfocitima i makrofazima. Limfociti i makrofazi su snažno pozitivni (Slika 10).



Slika 10. Histološki preparat zdravog žljezdanog tkiva dojke. A) Hematoksilin-eozinsko bojenje. B) Imunohistokemijsko bojenje monoklonskim protutijelom na GP96. Skala 100 µm, povećanje 20x.

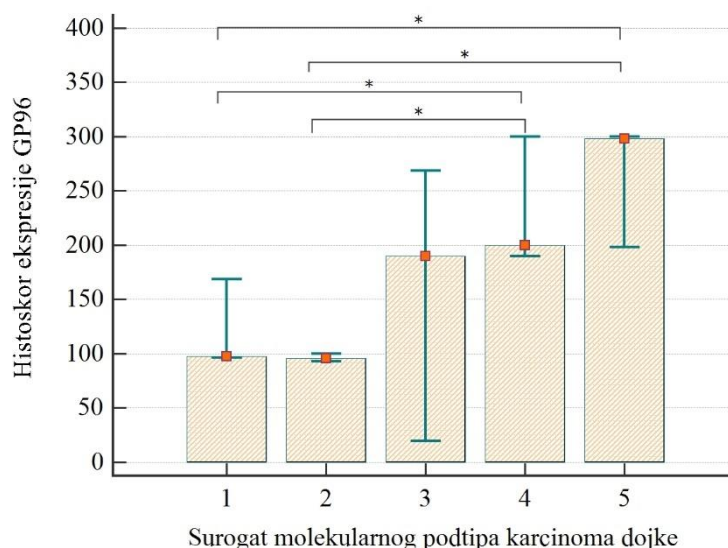
4.2.2. Imunohistokemijska analiza izražaja GP96 u karcinomu dojke

IHC analiza izražaja GP96 otkrila je dominantno citoplazmatsko i djelomično membransko bojenje tumorskih stanica, različitog intenziteta i ukupnog broja pozitivnih stanica. Obrazac IHC bojenja bio je od potpuno negativnog, blago pozitivnog do umjereno pozitivnog i snažno pozitivnog bojenja. Na temelju HS, niska ekspresija GP96 utvrđena je u 84 (78,5%) pacijentice, a visoka u njih 23 (21,5%). Medijan ekspresije GP96 u cijeloj ispitivanoj skupini bio je 165, s rasponom od 0 do 300. Prema

intenzitetu bojenja, izražaj GP96 bio je negativan u 5 (4,67%), slabo pozitivan u 48 (44,86%), umjereno pozitivan 31 (28,97%) i snažno pozitivan u 23 (21,5%) tumora.

4.2.3. Odnos ekspresije GP96 i kliničko-patoloških parametara

Tumori s niskim izražajem GP96 češće su bili ER i PR pozitivni (oba $P < 0,001$), HER2-negativni ($P = 0,005$) i s niskim Ki-67 ($P = 0,018$). Statistički značajne razlike u razini ekspresije GP96 utvrđene su između luminalnog A i HER2-obogaćenog te trostruko negativnog karcinoma, kao i između luminalnog B HER2-negativnog i HER2-obogaćenog te trostruko negativnog surogata molekularnog podtipa (Kruskal-Wallis test, $P < 0,001$). U skupini luminalnih B HER2-pozitivnih karcinoma dojke nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji GP96 u odnosu na ostale molekularne podtipove. Razlike u ekspresiji GP96 ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke prikazane su na Slici 11. Statistički značajna negativna povezanost utvrđena je između razine izražaja GP96 i statusa ER ($r = -0,468$, $P < 0,001$), kao i statusa PR ($r = -0,407$, $P < 0,001$). Međutim, nije utvrđena statistički značajna povezanost razine izražaja GP96 i AR-a ($r = -0,167$, $P = 0,085$). Od 76 (71,03%) ER-pozitivnih tumora, njih 7 (9,21%) imalo je visoku ekspresiju GP96, dok je od 31 (28,97%) ER-negativnih tumora, njih 16 (51,61%) imalo je visoku ekspresiju GP96. U skupini PR-pozitivnih tumora, od njih ukupno 68 (63,55%), 6 (8,82%) tumora imalo je visoku ekspresiju GP96, dok od 39 (36,45%) PR-negativnih tumora, 17 (43,59%) tumora je imalo visoku ekspresiju GP96. Izražaj GP96 ovisno o ER, PR i AR statusu prikazan je u Tablici 5.



Slika 11. Grafički prikaz i usporedba razine ekspresije GP96 izražene kao histoskor ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke (Kruskal-Wallis test, $*P < 0,001$). 1 - Luminalni A; 2 - Luminalni B HER2-negativan; 3 - Luminalni B HER2-pozitivan; 4 - HER2-obogaćeni; 5 - Trostruko negativan. Vrijednosti su prikazane kao medijan s 95% intervalima pouzdanosti.

Tablica 5. Ekspresija GP96 ovisno o ER, PR i AR statusu.

	Ekspresija GP96		P vrijednost
	niska (HS \leq 200) N (%)	visoka (HS $>$ 200) N (%)	
ER status			<0,001
pozitivan	69	7	
negativan	15	16	
PR status			<0,001
pozitivan	62	6	
negativan	22	17	
AR status			0,085
pozitivan	63	13	
negativan	21	10	

ER – estrogenski receptori; PR – progesteronski receptori; AR – androgeni receptori, GP96 – glikoprotein 96; HS – histoskor.

Nije bilo statistički značajne razlike između podskupina s visokom i niskom ekspresijom GP96 u odnosu na histološki gradus ($P=0,226$). Analiza je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju ekspresije GP96 i veličine tumorskog infiltrata u nSLN ($r=0,349$, $P=0,017$). Nije utvrđena značajna povezanost između ekspresije GP96 i veličine tumorskog infiltrata u LČČ ($r=0,035$, $P=0,725$) niti veličine tumora ($r=0,017$, $P=0,866$). U univarijatnoj logističkoj regresijskoj analizi negativan hormonski status ($P<0,001$), pozitivan HER2 status ($P=0,007$) i Ki-67 $\geq 20\%$ ($P=0,021$) pokazali su se statistički značajnim prediktorima visoke ekspresije GP96. U multivarijatnoj analizi jedino je negativan hormonski status (OR 10,514; 95% CI 3,683–30,020; $P<0,001$) ostao nezavisan prediktor visoke ekspresije GP96.

4.3. Imunohistokemijska analiza izražaja AR-a u karcinomu dojke

IHC analiza AR-a pokazala je njihov izražaj u jezgrama tumorskih stanica što se smatralo znakom androgene aktivacije. Pozitivna ekspresija AR-a utvrđena je u 76 (71,03%) pacijentica, dok je negativna AR ekspresija utvrđena u 31 (28,97%). Medijan izražaja AR-a u cijeloj ispitivanoj skupini bio je 77, s rasponom od 0 do 100%.

4.3.1. Odnos ekspresije AR-a i kliničko-patoloških parametara

Od 76 (71,03%) pacijentica koje su imale hormonski ovisne karcinome dojke, njih 62 (81,58%) imalo je i pozitivnu ekspresiju AR-a. Od 31 (28,97%) hormonski neovisnih karcinoma dojke, u njih 17 (54,84%) utvrđena je negativna ekspresija AR-a. Ekspresija AR-a ovisno o surogatu molekularnog

podtipa karcinoma dojke prikazana je na Slici 12. Nije utvrđena statistički značajna razlika između AR- pozitivne i AR-negativne podgrupe u odnosu na HER2 status ($P=0,288$) i Ki-67 ($P=0,603$). Tablica 6. prikazuje povezanost kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije GP96 i AR-a.

Tablica 6. Povezanost kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije GP96 i AR-a

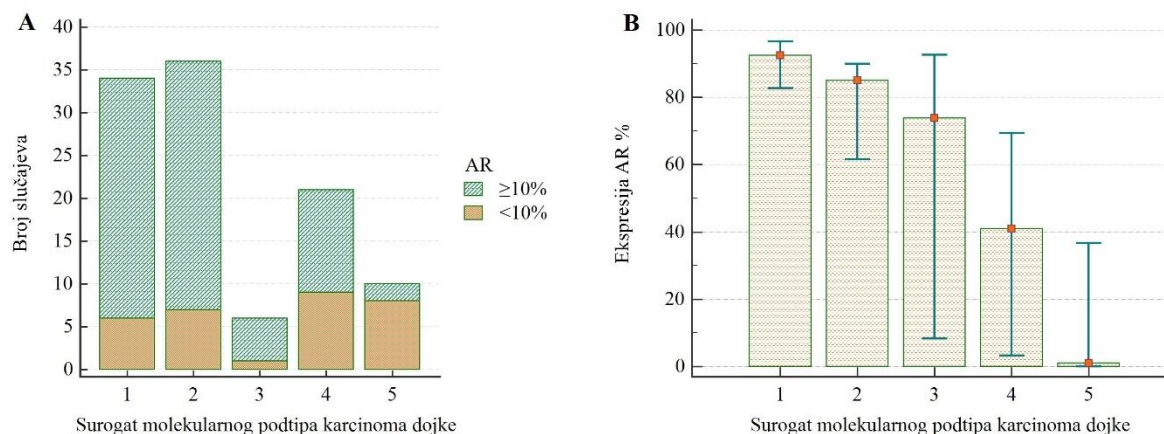
Karakteristike	AR		<i>P</i> vrijednost	GP96		<i>P</i> vrijednost
	negativan N (%)	pozitivan N (%)		niski N (%)	visoki N (%)	
Dob, godine						
≤ 50 godine	9 (8,41%)	20 (18,69%)	0,775	22 (20,56%)	7 (6,54%)	0,686
> 50 godine	22 (20,56%)	56 (52,34%)		62 (57,95%)	16 (14,95%)	
Lateralnost						
lijevo	12 (11,21%)	39 (36,45%)	0,239	39 (36,45%)	12 (11,21%)	0,627
desno	19 (17,76%)	37 (34,58%)		45 (42,06%)	11 (10,28%)	
Histološki tip						
duktalni/NST	23 (21,50%)	62 (57,95%)	0,086	65 (60,75%)	20 (18,69%)	0,372
lobularni	3 (2,80%)	11 (10,28%)		13 (12,15%)	1 (0,93%)	
ostali	5 (4,67%)	3 (2,80%)		6 (5,61%)	2 (1,87%)	
Histološki gradus						
G1	12 (11,21%)	29 (27,1%)	0,676	34 (31,77%)	7 (6,54%)	0,227
G2	13 (12,15%)	37 (34,58%)		40 (37,38%)	10 (9,35%)	
G3	6 (5,61%)	10 (9,35%)		10 (9,35%)	6 (5,61%)	
pT stadij						
pT1	11 (10,28%)	33 (30,84%)	0,451	34 (31,77%)	10 (9,35%)	0,796
pT2	20 (18,69%)	43 (40,19%)		50 (46,73%)	13 (12,15%)	
pN stadij						
pN1	22 (20,56%)	46 (42,99%)	0,311	52 (48,60%)	16 (14,95%)	0,501
pN2	9 (8,41%)	30 (28,04%)		32 (29,91%)	7 (6,54%)	
Nekroza						
nema	19 (17,76%)	54 (50,47%)	0,328	59 (55,14%)	14 (13,08%)	0,395
prisutna	12 (11,21%)	22 (20,56%)		25 (23,37%)	9 (8,41%)	
Kalcifikati						
nema	22 (20,56%)	40 (37,38%)	0,083	45 (42,05%)	17 (15,89%)	0,081
prisutni	9 (8,41%)	36 (33,65%)		39 (36,45%)	6 (5,61%)	
EIC						
negativan	27 (25,24%)	62 (57,94%)	0,491	72 (67,29%)	17 (15,89%)	0,182
pozitivan	4 (3,74%)	14 (13,08%)		12 (11,21%)	6 (5,61%)	
ER status						

negativan	17 (15,89%)	14 (13,08%)	<0,001	15 (14,02%)	16 (14,95%)	<0,001
pozitivan	14 (13,08%)	62 (57,95%)		69 (64,49%)	7 (6,54%)	
PR status						
negativan	19 (17,76%)	20 (18,69%)	<0,001	22 (20,56%)	17 (15,89%)	<0,001
pozitivan	12 (11,21%)	56 (52,34%)		62 (57,94%)	6 (5,61%)	
HER2 status						
negativan	21 (19,62%)	59 (55,14%)	0,288	68 (63,55%)	12 (11,21%)	0,005
pozitivan	10 (9,35%)	17 (15,89%)		16 (14,96%)	11 (10,28%)	
Ki-67 indeks						
< 20%	15 (14,02%)	41 (38,32%)	0,603	49 (45,8%)	7 (6,54%)	0,018
≥ 20%	16 (14,95%)	35 (32,71%)		35 (32,71%)	16 (14,95%)	
LVI						
negativan	4 (3,74%)	12 (11,22%)	0,705	13 (12,15%)	3 (2,8%)	0,773
pozitivan	27 (25,23%)	64 (59,81%)		71 (66,36%)	20 (18,69%)	
Perineuralna invazija						
negativna	11 (10,28%)	19 (17,76%)	0,083	22 (20,56%)	8 (7,48%)	0,483
pozitivna	9 (8,41%)	40 (37,38%)		41 (38,32%)	8 (7,48%)	
NSO*	11 (10,28%)	17 (15,89%)		21 (19,62%)	7 (6,54%)	
ENE u LČČ						
negativan	21 (19,63%)	48 (44,86%)	0,655	51 (47,67%)	18 (16,82%)	0,121
pozitivan	10 (9,34%)	28 (26,17%)		33 (30,84%)	5 (4,67%)	
nSLN status						
negativan	14 (13,08%)	37 (34,58%)	0,742	37 (34,58%)	14 (13,08%)	0,154
pozitivan	17 (15,89%)	39 (36,45%)		47 (43,93%)	9 (8,41%)	
ITM, kg/m ²						
≤ 25	14 (13,08%)	34 (31,78%)	0,858	35 (32,71%)	13 (12,15%)	0,223
> 25	16 (14,96%)	42 (39,25%)		48 (44,86%)	10 (9,35%)	
N/D	1 (0,93%)	-		1 (0,93%)	-	
Molekularni surogat						
Luminal A	6 (5,61%)	28 (26,18%)	<0,001	32 (29,91%)	2 (1,87%)	<0,001
Luminal B/HER2-	7 (6,54%)	29 (27,1%)		32 (29,91%)	4 (3,74%)	
Luminal B/HER2+	1 (0,93%)	5 (4,67%)		5 (4,67%)	1 (0,93%)	
HER2-obogaćeni	9 (8,41%)	12 (11,21%)		11 (10,28%)	10 (9,34%)	
Trostruko neg.	8 (7,48%)	2 (1,87%)		4 (3,74%)	6 (5,61%)	

EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; ER – estrogenski receptori; PR – progesteronski receptori; HER2 – humani epidermalni čimbenik rasta 2; ENE – ektranodalna ekstenzija; LČČ – limfni čvor čuvar; AR – androgeni receptori; GP96 – glikoprotein 96; ITM – indeks tjelesne mase; NST – ne specijalni tip; nSLN – limfni čvorovi ne čuvari; N/D – nije dostupno.

* ne može se odrediti

Logistička regresijska analiza pokazala je da je hormonski status (OR 5,378; 95% CI 2,154–13,423; $P < 0,001$) jedini nezavisni prediktor AR ekspresije u ranom stadiju karcinoma dojke s pozitivnim LČČ, dok ostali kliničko-patološki čimbenici nisu imali značajan utjecaj.



Slika 12. Grafički prikaz ekspresije androgenih receptora ovisno o surogatu molekularnog podtipa. A) Frekvencije AR-positivnih i AR-negativnih karcinoma unutar pojedinog surogata molekularnog podtipa. B) Razina ekspresije androgenih receptora ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke. Vrijednosti su izražene kao medijan s 95% intervalima pouzdanosti. 1 - Luminalni A; 2 - Luminalni B HER2-negativan; 3 - Luminalni B HER2-positivan; 4 - HER2-obogaćeni; 5 - Trostruko negativan karcinom dojke. AR – androgeni receptori; HER2 - humani epidermalni čimbenik rasta 2.

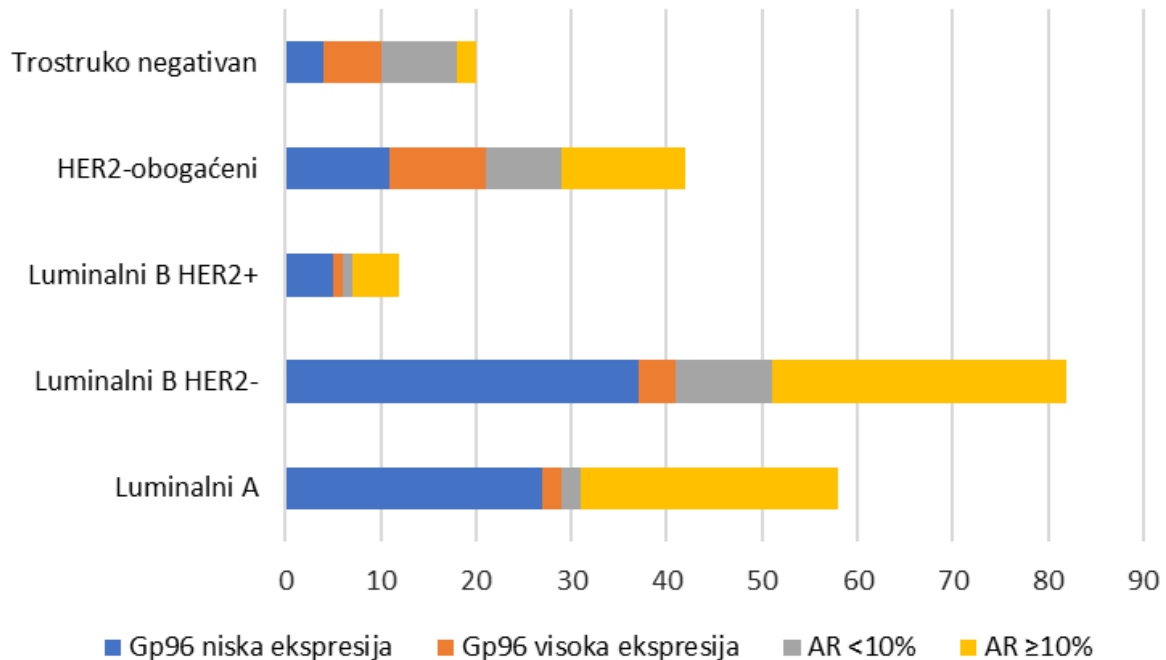
Statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između razine ekspresije AR i dobi ($r=0,221$, $P=0,022$), ER ($r=0,419$, $P < 0,001$), PR ($r=0,402$, $P < 0,001$) te prisutnosti kalcifikata u invazivnoj komponenti ($r=0,194$, $P=0,046$), dok je negativna korelacija utvrđena između ekspresije AR i broja metastatskih sjela ($r=-0,210$, $P=0,03$) i HER2 statusa ($r=-0,219$, $P=0,024$). Nije utvrđena statistički značajna povezanost s ostalim kliničko-patološkim čimbenicima, uključujući veličinu tumora ($r=-0,045$, $P=0,645$) i mitotski proliferacijski indeks Ki-67 ($r=-0,141$, $P=0,146$).

4.3.2. Odnos koekspresije GP96 i AR-a s ostalim kliničko-patološkim karakteristikama

Ispitivana skupina podijeljena je u četiri podgrupe ovisno o koekspresiji GP96 i AR-a. Analizirane podgrupe su kako slijedi: GP96_{niski}AR^{pozitivan}, GP96_{niski}AR^{negativan}, GP96_{visoki}AR^{pozitivan} i GP96_{visoki}AR^{negativan}. U 63 (58,88%) pacijentice utvrđen je GP96_{niski}AR^{pozitivan} izražaj te u 21 (19,62%) GP96_{niski}AR^{negativan} izražaj. Deset (9,35%) pacijentica imalo je GP96_{visoki}AR^{negativan} izražaj te njih 13 (12,15%) GP96_{visoki}AR^{pozitivan} izražaj. Većina hormonski ovisnih karcinoma (75%) pokazivala je nisku ekspresiju GP96 i pozitivnu AR ekspresiju, dok je u 8 (25,8%) pacijentica s hormonski neovisnim

karcinomom utvrđena visoka ekspresija GP96 i negativna ekspresija AR-a. Analizom podgrupa ovisno o koekspresiji GP96 i AR-a utvrđena je povezanost s HER2 statusom ($P < 0,001$), statusom ER i PR (oba $P < 0,001$), brojem metastatskih sijela ($P = 0,03$) te surogatom molekularnog podtipa ($P < 0,001$). Zastupljenost ekspresije GP96 i AR-a ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke prikazana je na Slici 13. Karcinomi s niskom ekspresijom GP96 i pozitivnom AR ekspresijom češće su bili HER2 negativni, dok su oni s visokom ekspresijom GP96 i pozitivnom AR ekspresijom češće bili HER2 pozitivni. U skupini ER-pozitivnih karcinoma dojke, 57 (75%) tumora pokazivalo je koekspresiju GP96_{niski}AR^{pozitivan}, 12 (15,79%) GP96_{niski}AR^{negativan}, 2 (2,63%) GP96_{visoki}AR^{negativan} te 5 (6,58%) GP96_{visoki}AR^{pozitivan}. Kod ER-negativnih karcinoma, GP96_{niski}AR^{pozitivan} fenotip zabilježen je u 6 (19,35%) tumora, GP96_{niski}AR^{negativan} u 9 (29,03%), GP96_{visoki}AR^{negativan} u 8 (25,81%) te GP96_{visoki}AR^{pozitivan} u 8 (25,81%) slučajeva.

U analizi podskupina ovisno o koekspresiji GP96 i AR te drugih kliničko-patoloških karakteristika, nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na dob ($P = 0,786$), prisutnost EIC-a ($P = 0,167$) i ENE ($P = 0,165$), histološki gradus ($P = 0,746$) i tip ($P = 0,236$), Ki-67 ($P = 0,083$), prisutnost LVI ($P = 0,674$), nekroze u invazivnoj komponenti karcinoma ($P = 0,602$) i perineuralne invazije ($P = 0,445$), veličinu tumora ($P = 0,862$) niti tip operacije ($P = 0,271$). Statistički granična značajnost utvrđena je kod prisutnosti mikrometastaza i makrometastaza u LČČ ($P = 0,059$).



Slika 13. Raspodjela koekspresije GP96 i AR-a ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke; Kruskal-Wallis, $P < 0,001$. Kod luminalnog A, luminalnog B HER2-negativnog i luminalnog B HER2-pozitivnog surogata najzastupljenija je niska ekspresija GP96 i pozitivna AR ekspresija, kod HER2-obogaćenog visoka ekspresija GP96 i pozitivna AR ekspresija te kod trostruko negativnog visoka ekspresija GP96 i negativna AR ekspresija.

4.4. Usporedbe na temelju podjele ispitanica ovisno o statusu limfnih čvorova nečuvara

U cijeloj ispitivanoj skupini, 56 (52,33%) pacijentica imalo je pozitivan status nSLN. ENE u LČČ bio je prisutan u 38 (35,51%) slučajeva, od kojih je 28 (73,68%) imalo metastaze u nSLN. U 69 (64,48%) pacijentica bez ENE u LČČ, 28 (40,58%) ih je imalo metastaze u nSLN. U Tablici 7. prikazane su kliničko-patološke karakteristike pacijentica ovisno o statusu nSLN. Prisutnost ENE u LČČ bila je u pozitivnoj korelaciji s brojem pozitivnih nSLN ($r=0,401$, $P<0,001$), ukupnim brojem pozitivnih aLČ ($r=0,442$, $P<0,001$) te većim opsegom tumorskog opterećenja u nSLN ($r=0,349$, $P<0,001$).

Tablica 7. Kliničko-patološke karakteristike pacijentica ovisno o statusu nSLN

Karakteristike		Status nSLN		P vrijednost
		pozitivan	negativan	
Cijela skupina		56 (52,34%)	51 (47,66%)	0,630
Dob, godine	medijan (raspon)	57 (34-89)	60 (28-85)	
	≤ 50 godina	15 (14,02%)	14 (13,08%)	0,939
	> 50 godina	41 (38,32%)	37 (34,58%)	
Lateralnost	lijeva	24 (22,43%)	27 (25,23%)	0,299
	desna	32 (29,91%)	24 (22,43%)	
Histološki tip	duktalni/NST	43 (40,19%)	42 (39,25%)	0,754
	lobularni	8 (7,48%)	6 (5,61%)	
	ostali	5 (4,67%)	3 (2,8%)	
Histološki gradus	G1	19 (17,76%)	22 (20,56%)	0,042
	G2	24 (22,43%)	26 (24,3%)	
	G3	13 (12,15%)	3 (2,8%)	
Veličina tumora, cm	ar.sred. ± std.	2,75±1,31	2,37±0,94	0,087
pT stadij	pT1	21 (19,63%)	23 (21,49%)	0,427
	pT2	35 (32,71%)	28 (26,17%)	
pN stadij	1	19 (17,76%)	49 (45,79%)	<0,001
	2	37 (34,58%)	2 (1,87%)	
Nekroza	nema	36 (33,65%)	37 (34,58%)	0,361
	prisutna	20 (18,69%)	14 (13,08%)	
Kalcifikati	nema	33 (30,84%)	29 (27,1%)	0,83
	prisutni	23 (21,5%)	22 (20,56%)	
EIC	nema	47 (43,93%)	42 (39,25%)	0,829
	prisutan	9 (8,41%)	9 (8,41%)	
ER status	negativan	19 (17,76%)	12 (11,21%)	0,239
	pozitivan	37 (34,58%)	39 (36,45%)	
PR status	negativan	22 (20,56%)	17 (15,88%)	0,525

	pozitivan	34 (31,78%)	34 (31,78%)	
HER2 status	negativan	40 (37,38%)	40 (37,38%)	0,407
	pozitivan	16 (14,95%)	11 (10,29%)	
Ki-67 indeks	< 20%	28 (26,17%)	28 (26,17%)	0,614
	≥ 20%	28 (26,17%)	23 (21,49%)	
Limfovaskularna invazija	negativna	6 (5,61%)	10 (9,34%)	0,2
	pozitivna	50 (46,73%)	41 (38,32%)	
Perineuralna invazija	negativna	15 (14,02%)	15 (14,02%)	0,836
	pozitivna	25 (23,36%)	24 (22,43%)	
	nije moguće odrediti*	16 (14,95%)	12 (11,22%)	
ENE u LČČ	negativna	28 (26,17%)	41 (38,32%)	0,001
	pozitivna	28 (26,17%)	10 (9,34%)	
Veličina metastaze u LČČ,mm	ar.sred. ± std.	11,40±6,68	6,80±6,04	<0,001
AR	< 10 %	17 (15,89%)	14 (13,08%)	0,742
	≥ 10 %	39 (36,45%)	37 (34,58%)	
GP96	niski	47 (43,93%)	37 (34,58%)	0,154
	visoki	9 (8,41%)	14 (13,08%)	
ITM, kg/m ²	≤ 25	23 (21,49%)	25 (23,36%)	0,459
	> 25	32 (29,91%)	26 (24,3%)	
	N/D (1)			
Tip kirurškog zahvata	mastektomija	24 (22,43%)	10 (9,34%)	0,01
	poštedna operacija	32 (29,91%)	41 (38,32%)	
Surogat molekularnog podtipa	Luminal A	18 (16,82%)	16 (14,95%)	0,75
	Luminal B/HER2-	16 (14,95%)	20 (18,69%)	
	Luminal B/HER2+	3 (2,8%)	3 (2,8%)	
	HER2-obogaćeni	13 (12,15%)	8 (7,48%)	
	Trostruko negativan	6 (5,61%)	4 (3,74%)	

NST – nije specijalni tip; EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; ER – estrogenski receptori; PR – progesteronski receptori; HER2 – humani epidermalni čimbenik rasta 2; ENE – ektranodalna ekstenzija; LČČ – limfni čvor čuvar; AR – androgeni receptori; GP96 – glikoprotein 96; ITM – indeks tjelesne mase; N/D – nije dostupan podatak.

ENE u LČČ nije u statistički značajnoj korelaciji s veličinom tumorskog infiltrata u nSLN ($r=0,220$, $P=0,141$). Međutim, veličina metastaze u nSLN u statistički je značajnoj pozitivnoj korelaciji s ukupnim brojem pozitivnih nSLN ($r=0,378$, $P=0,009$) te većim opsegom tumorske zahvaćenosti nSLN ($r=0,385$, $P=0,008$). Od 56 (52,33%) pacijentica koje su imale metastaze u nSLN, 16 (28,57%) ih je imalo prisutan ENE u nSLN. Iako je u pacijentica s prisutnim ENE u nSLN, njih 11 (68,75%) imalo i pozitivan ENE u LČČ, nije dokazana statistički značajna korelacija između ova dva parametra ($r=0,237$, $P=0,078$). Kod 5 (31,25%) pacijentica s prisutnim ENE u nSLN, nije bio prisutan ENE u LČČ. Status nSLN nije

bio statistički značajno povezan niti sa statusom ER ($r=-0,114$, $P=0,240$), PR ($r=-0,062$, $P=0,527$), HER2 statusom ($r=0,081$, $P=0,409$), Ki-67 ($r=0,049$, $P=0,616$) i veličinom tumora ($r=0,122$, $P=0,209$). U skupini hormonski ovisnih karcinoma, analiziranih prema statusu nSLN, nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini tumora ($P=0,477$), prisutnosti LVI ($P=0,38$) ni veličini metastaza u LČČ ($P=0,603$), dok je odsutnost ENE u LČČ bila statistički značajno češća u bolesnicima s negativnim nSLN ($P=0,021$). Ekspresija GP96 nije pokazala statistički značajnu povezanost sa statusom nSLN ($r=-0,138$, $P=0,155$), kao niti većim tumorskim opterećenjem u nSLN ($r=-0,099$, $P=0,309$). Nasuprot tome, za ekspresiju AR-a utvrdili smo slabu, ali statistički značajnu negativnu korelaciju sa statusom nSLN ($r=-0,195$, $P=0,044$). Međutim, nije bilo značajne povezanosti između ekspresije AR-a i opsega tumorske zahvaćenosti nSLN ($r=-0,170$, $P=0,08$). Također, nije bilo značajne povezanosti između koekspresije GP96 i AR-a i statusa nSLN ($r=-0,039$, $P=0,988$) i opsega tumorske zahvaćenosti nSLN ($r=-0,011$, $P=0,911$).

4.5. Logistička regresijska analiza prediktora statusa limfnih čvorova nečuvara

U univarijantnoj logističkoj regresijskoj analizi, histološki gradus 3 ($P=0,019$), broj pozitivnih LČČ ($P=0,039$), veličina metastaze u LČČ ($P=0,001$) te prisutnost ENE u LČČ ($P=0,001$) bili su statistički značajno povezani s metastazama u nSLN. Multivarijantna analiza je utvrdila kako su prisutnost ENE u LČČ (OR 2,696; 95% CI 1,051-6,914; $P=0,039$) i veličina metastaze u LČČ (OR 1,103; 95% CI 1,021-1,193; $P=0,013$) nezavisni prediktori statusa nSLN. Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresijske analize kliničko-patoloških karakteristika i statusa nSLN prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Rezultati univarijantne i multivarijantne logističke regresije kliničko-patoloških karakteristika i statusa nSLN

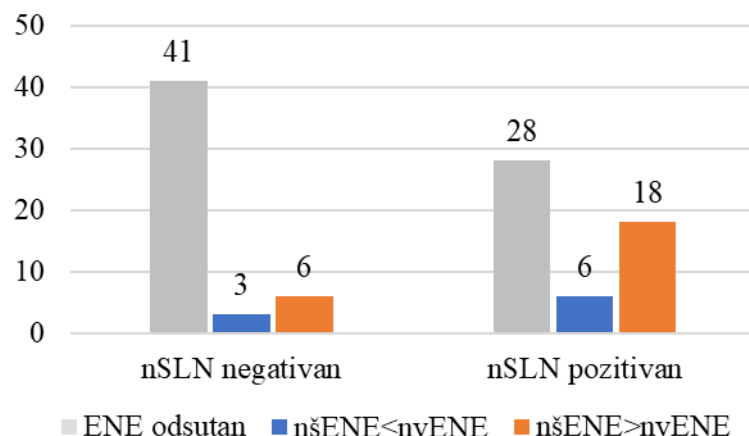
Karakteristike	Univarijantna analiza		Multivarijantna analiza	
	OR (95% CI)	<i>P</i>	OR (95% CI)	<i>P</i>
Dob (kontinuirana)	0,999 (0,972–1,029)	0,978		
Histološki tip, specijalni vs. duktalni	1,411 (0,545–3,649)	0,478		
Histološki gradus, G3 vs. G1, G2	4,837 (1,291–18,128)	0,019	3,050 (0,706–13,168)	0,135
pT stadij, pT2 vs. pT1	1,369 (0,632–2,965)	0,426		
Nekroza, prisutna vs. odsutna	1,468 (0,645–3,343)	0,360		
Kalcifikati, prisutni vs. odsutni	0,919 (0,426–1,981)	0,829		
EIC, pozitivan vs. negativan	0,894 (0,324–2,462)	0,828		
HR status, pozitivan vs. negativan	0,599 (0,256–1,404)	0,238		
HER2 status, pozitivan vs. negativan	1,455 (0,601–3,521)	0,406		
Ki-67 indeks, $\geq 20\%$ vs. $< 20\%$	1,217 (0,569–2,605)	0,612		

LVI, pozitivan vs. negativan	2,033 (0,681–6,064)	0,204		
PNI, pozitivna vs. negativna	1,042 (0,420–2,585)	0,930		
ENE u LČČ, pozitivna vs. negativna	4,100 (1,722–9,760)	0,001	2,696 (1,051–6,914)	0,039
Veličina metastaze u LČČ, mm	1,135 (1,052–1,225)	0,001	1,103 (1,021–1,193)	0,013
Broj pozitivnih LČČ	1,734 (1,029–2,921)	0,039	1,496 (0,865–2,588)	0,150
AR, $\geq 10\%$ vs. $< 10\%$	0,868 (0,375–2,007)	0,741		
GP96, visoki vs. niski	0,506 (0,197–1,298)	0,156		
ITM (kg/m^2), > 25 vs. ≤ 25	1,338 (0,621–2,881)	0,457		

EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; HR status- status hormonskih receptora; HER2 – humani epidermalni čimbenik rasta 2; LVI – limfovaskularna invazija; PNI – perineuralna invazija; ENE – ektranodalna ekstenzija; LČČ – limfni čvor čuvar; AR – androgeni receptori; GP96 – glikoprotein 96; ITM – indeks tjelesne mase; OR – omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

4.6. Usporedbe na temelju podjele ispitanica ovisno o orijentaciji ENE u limfnom čvoru čuvaru

Ispitivana skupina podijeljena je u dvije podgrupe ovisno o dimenziji i orijentaciji ENE u LČČ: $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ i $n_{\text{šENE} \leq \text{nvENE}}$. U podskupini $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ bilo je 24 (63,16%) slučajeva, dok je u podskupini $n_{\text{šENE} \leq \text{nvENE}}$ bilo 9 (23,68%) slučajeva. Za pet pacijentica (13,16%) nisu bili dostupni arhivski biopsijski materijali za reevaluaciju ENE u LČČ. Srednja veličina ENE u LČČ iznosila je $1,79 \pm 1,25$ mm. U usporedbi podskupina pacijentica s $n_{\text{šENE} \leq \text{nvENE}}$ i onih koje nisu imale ENE u LČČ, pacijentice koje su imale $n_{\text{šENE} \leq \text{nvENE}}$ češće su imale veći opseg tumorske zahvaćenosti nSLN ($P=0,038$). Međutim, između ovih dviju podskupina nije bilo statistički značajnih razlika u ostalim kliničko-patološkim parametrima. Pacijentice s $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ češće su imale kalcifikate u invazivnoj komponenti tumora ($P=0,002$), pozitivan status nSLN ($P=0,003$), veći opseg tumorske zahvaćenosti nSLN ($P=0,012$) i viši pN stadij ($P=0,008$) u odnosu na one koje nisu imale ENE u LČČ. Također, pojavnost $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ bila je značajno češća u skupini pacijentica starijih od 50 godina ($P=0,041$). Analizom podskupina prema orijentaciji ENE u LČČ, $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ i $n_{\text{šENE} \leq \text{nvENE}}$, ispitali smo povezanost s rizikom pojavnosti metastaza u nSLN. Usporedba podskupina pokazala je da pacijentice s $n_{\text{šENE} > \text{nvENE}}$ imaju značajno veći rizik od metastaza u nSLN (OR 3,882; 95% CI 1,391-10,838; $P=0,009$) (Slika 14).



Slika 14. Grafički prikaz pojave i orijentacije ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru (ENE u LČČ) ovisno o statusu limfnih čvorova nečuvara (nSLN); χ^2 test, $P=0.009$.

nšENE-najširi promjer ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru; nvENE-najviši promjer ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru.

4.7. Analiza petogodišnjeg preživljenja ispitanica (Kaplan-Meierove krivulje i Cox regresijski model)

Medijan vremena praćenja u cijeloj ispitivanoj skupini iznosio je 61 mjesec, s rasponom od 15 do 71 mjesec za ukupno preživljenje, dok je za preživljenje bez recidiva bolesti medijan vremena praćenja iznosio 60 mjeseci, s rasponom od 10 do 71 mjesec. Tijekom praćenja 28 (26,17%) pacijentica je umrlo, dok je kod 22 (20,56%) pacijentice došlo do recidiva bolesti. Od tih recidiva, 4 (18,18%) su bila lokoregionalna, 13 (59,09%) udaljena, a 5 (22,73%) kombinirana (lokoregionalna i udaljena). Dvanaest (54,55%) pacijentica imalo je jedno metastatsko sijelo, 2 (9,09%) dva, 4 (18,18%) tri i 4 (18,18%) četiri ili više metastatskih sijela. Najčešća metastatska sijela bila su kosti i pluća, dok su preostala sijela uključivala dojku, kožu, aksilu, torakalnu stijenku, jetru, nadbubrežnu žlijezdu, mozak te maligni pleuralni izljev. Zbirno gledajući lokalizacije metastatskih sijela, 11 pacijentica razvilo je metastaze u kostima, 7 u plućima, 6 u dojci, 2 u koži, 3 u aksili, 2 u torakalnoj stijenci, 6 u jetri, 1 u nadbubrežnoj žlijezdi, 3 u mozgu i 4 su imale maligni pleuralni izljev. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između broja metastatskih sijela i ekspresije GP96 ($r=0,188$, $P=0,052$) ni AR-a ($r=-0,184$, $P=0,058$). Statistički značajna povezanost s većim brojem metastatskih sijela utvrđena je kod prisutnosti ENE u LČČ ($P=0,013$), negativnog ER statusa ($P=0,010$), višeg histološkog gradusa ($P=0,008$), Ki-67 $\geq 20\%$ ($P=0,017$), većeg broja pozitivnih nSLN ($P=0,020$), višeg pN stadija ($P=0,045$) i većeg tumorskog infiltrata u LČČ ($P=0,011$) i nSLN ($P=0,009$). Prisustvo EIC-a pokazalo je statistički granično značajnu povezanost s većim brojem metastatskih sijela ($P=0,050$).

Univarijatna Coxova regresijska analiza rizika pokazala je da su dob, histološki gradus, pN stadij, EIC, LNR i status nSLN značajno povezani s ukupnim preživljenjem. Multivarijatna analiza je potvrdila da

su dob, histološki gradus G3, prisutnost EIC i LNR nezavisni prediktori ukupnog preživljenja. Za preživljenje bez recidiva bolesti, univarijatna analiza je utvrdila da su histološki gradus, pN stadij, EIC, status hormonskih receptora, ENE, LNR, Ki-67, status nSLN i ekspresija AR-a statistički značajni prognostički čimbenici. Multivarijatna analiza je pokazala da su samo histološki gradus, EIC, LNR i ekspresija AR-a nezavisni čimbenici povezani s preživljenjem bez recidiva bolesti. Rezultati univarijatne i multivarijatne Coxove regresijske analize rizika prikazani su u Tablici 9. za ukupno preživljenje i Tablici 10. za preživljenje bez recidiva bolesti. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti prema ekspresiji GP96 i AR-a te prisutnosti ENE u LČČ, prikazane su na Slici 15.

Također je ispitan utjecaj ekspresije GP96 i AR-a na relativni rizik za lokoregionalni i udaljeni recidiv bolesti. Relativni rizik za lokoregionalni recidiv bio je veći u skupini s visokom ekspresijom GP96 u usporedbi sa skupinom s niskom ekspresijom GP96 (RR 4,565; 95% CI 1,333–15,638; P=0,016). Međutim, nije utvrđena značajna razlika u relativnom riziku među skupinama s obzirom na ekspresiju GP96 za udaljeni recidiv bolesti (RR 1,044; 95% CI 0,380–2,868; P=0,934). Skupina s negativnom ekspresijom AR-a imala je veći relativni rizik za lokoregionalni recidiv bolesti u odnosu na skupinu s pozitivnom ekspresijom AR-a (RR 4,903; 95% CI 1,308–18,382; P=0,018). Također, u istoj skupini utvrđen je i veći relativni rizik za udaljeni recidiv bolesti (RR 2,451; 95% CI 1,075–5,589; P=0,033).

Ispitivanjem utjecaja drugih kliničko-patoloških karakteristika na relativan rizik pojave lokoregionalnog recidiva bolesti, utvrđeno je da pacijentice s histološkim gradus G3 (RR 4,550; 95% CI 1,3667–15,147; P=0,014), prisutnim EIC-om (RR 3,956; 95% CI 1,176–13,309; P=0,026), negativnim HR statusom (RR 8,581; 95% CI 1,886–39,036; P=0,005) i pozitivnim statusom HER2 (RR 3,704; 95% CI 1,071–12,803; P=0,039) imaju povećan relativni rizik za lokoregionalni recidiv bolesti.

Tablica 9. Univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza rizika za ukupno preživljenje

Karakteristike	Ukupno preživljenje			
	Univarijatna analiza		Multivarijatna analiza	
	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>
Dob	1,035 (1,004–1,066)	0,028	1,052 (1,020–1,085)	0,001
Histološki tip, specijalni vs. duktalni	1,927 (0,871–4,263)	0,105		
Histološki gradus, G3 vs. G1, G2	3,287 (1,483–7,286)	0,003	3,235 (1,257–8,330)	0,015
pT stadij, pT2 vs. pT1	1,852 (0,815–4,205)	0,141		
pN stadij, pN2 vs. pN1	2,705 (1,279–5,720)	0,009	0,720 (0,164–3,165)	0,664
Nekroza, prisutna vs. odsutna	1,698 (0,803–3,590)	0,166		
Kalcifikati, prisutni vs. odsutni	0,433 (0,184–1,019)	0,055		
EIC, pozitivan vs. negativan	2,383 (1,046–5,429)	0,039	2,806 (1,165–6,758)	0,021

HR status, negativan vs. pozitivan	0,522 (0,246–1,104)	0,089		
HER2 status, pozitivan vs. negativan	1,146 (0,504–2,608)	0,745		
Ki-67 indeks, $\geq 20\%$ vs. $< 20\%$	1,849 (0,865–3,951)	0,113		
LVI, pozitivan vs. negativan	0,804 (0,305–2,120)	0,659		
PNI, pozitivan vs. negativan	0,528 (0,233–1,196)	0,126		
ENE, pozitivan vs. negativan	2,087 (0,987–4,414)	0,054		
nSLN status, pozitivan vs. negativan	3,339 (1,418–7,860)	0,005	1,689 (0,517–5,520)	0,386
AR, $< 10\%$ vs. $\geq 10\%$	0,537 (0,254–1,136)	0,104		
GP96, visoki vs. niski	1,247 (0,530–2,934)	0,614		
LNR	1,032 (1,011–1,053)	0,002	1,031 (1,001–1,063)	0,044
NLN	0,956 (0,883–1,036)	0,275		
ITM (kg/m ²), > 25 vs. ≤ 25	0,762 (0,358–1,621)	0,480		

EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; HR status – status hormonskih receptora; HER2 - humani epidermalni faktor rasta 2; LVI – limfovaskularna invazija; NLN – broj negativnih limfnih čvorova; PNI – perineuralna invazija; ENE – ektranodalna ekstenzija; nSLN status – status limfnih čvorova nečuvara; AR – androgeni receptori; GP96 – glikoprotein 96; ITM – indeks tjelesne mase; HR – omjer rizika (engl. *hazard ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

Nadalje, analiziran je utjecaj drugih kliničko-patoloških karakteristika ispitivane skupine na rizik pojave udaljenog recidiva bolesti te je utvrđeno da su pacijentice s prisutnom ENE u LČČ imale veći relativni rizik za pojavu udaljenog recidiva bolesti u odnosu na one bez ENE u LČČ (RR 2,853; 95% CI 1,206–6,750; P=0,017). Usporedbom podskupina prema orijentaciji ENE u LČČ utvrdili smo da su pacijentice s nšENE>nvENE imale veći relativni rizik za pojavu udaljenog recidiva bolesti u odnosu na pacijentice bez ENE u LČČ (RR 2,875; 95% CI 1,124–7,353; P=0,028). Za pacijentice s nšENE \leq nvENE nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na one koje nisu imale ENE u LČČ (RR 1,095; 95% CI 0,152–7,908; P=0,928).

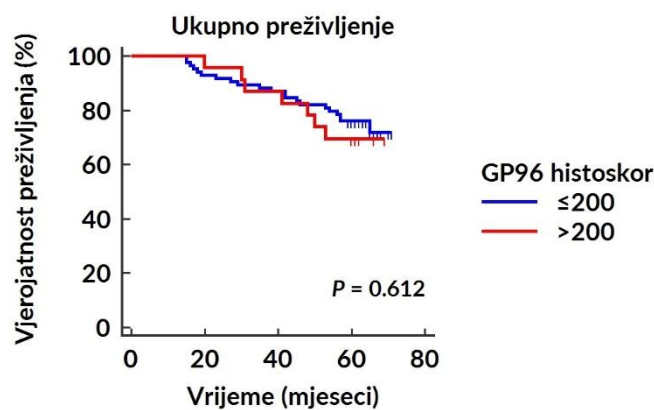
Tablica 10. Univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza rizika za preživljenje bez povrata bolesti

Karakteristike	Preživljenje bez recidiva bolesti			
	Univarijatna analiza		Multivarijatna analiza	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Dob	1,002 (0,969–1,035)	0,928		
Histološki tip, specijalni vs. duktalni	1,890 (0,769–4,645)	0,165		
Histološki gradus, G3 vs. G1, G2	2,899 (1,130–7,435)	0,027	3,280 (1,218–8,837)	0,019
pT stadij, pT2 vs. pT1	1,576 (0,642–3,867)	0,321		
pN stadij, pN2 vs. pN1	2,546 (1,098–5,903)	0,029	1,311 (0,225–7,640)	0,763
Nekroza, prisutna vs. odsutna	1,067 (0,435–2,620)	0,887		

Kalcifikati, prisutni vs. odsutni	0,745 (0,312–1,776)	0,506		
EIC, prisutan vs. odsutan	2,743 (1,112–6,765)	0,028	2,920 (1,138–7,493)	0,026
HR status, negativan vs. pozitivan	0,384 (0,166–0,888)	0,025	0,776 (0,285–2,114)	0,620
HER2 status, pozitivan vs. negativan	1,673 (0,700–4,001)	0,247		
Ki-67 indeks, $\geq 20\%$ vs. $< 20\%$	2,720 (1,108–6,681)	0,029	1,786 (0,659–4,842)	0,254
LVI, prisutna vs. odsutna	1,183 (0,349–4,009)	0,787		
PNI, prisutna vs. odsutna	0,806 (0,324–2,005)	0,642		
ENE, prisutna vs. odsutna	2,478 (1,058–5,806)	0,037	2,585 (0,876–7,627)	0,085
nSLN status, pozitivan vs. negativan	2,479 (1,009–6,091)	0,048	0,748 (0,213–2,621)	0,650
AR, $< 10\%$ vs. $\geq 10\%$	0,397 (0,172–0,916)	0,030	0,304 (0,129–0,714)	0,006
GP96, visoki vs. niski	1,454 (0,569–3,718)	0,435		
LNR	1,033 (1,010–1,056)	0,005	1,043 (1,016–1,070)	0,001
NLN	0,946 (0,862–1,038)	0,240		
ITM (kg/m^2), > 25 vs. ≤ 25	0,830 (0,360–1,914)	0,662		

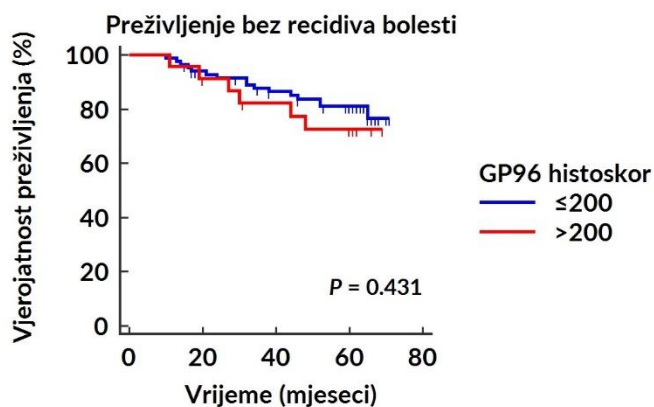
EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta; HR status – status hormonskih receptora; HER2 - humani epidermalni faktor rasta 2; LVI – limfovaskularna invazija; PNI – perineuralna invazija; ENE – ektranodalna ekstenzija; nSLN status – status limfnih čvorova nečuvara; AR – androgeni receptori; GP96 – glikoprotein 96; ITM – indeks tjelesne mase; HR – omjer rizika (engl. *hazard ratio*); CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*).

A



Broj slučajeva u riziku

Grupa: ≤ 200	84	78	73	44	0
Grupa: > 200	23	22	20	10	0

B

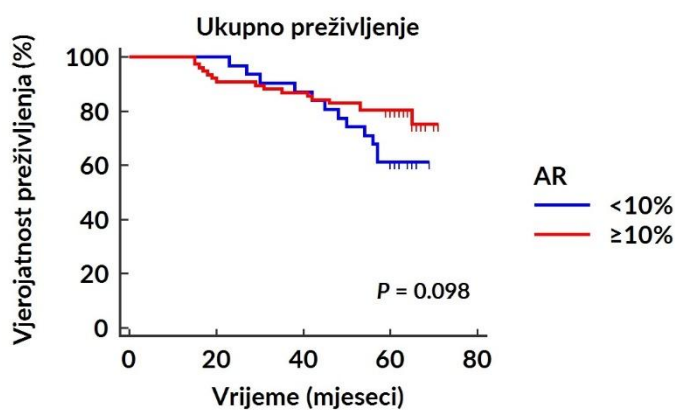
Broj slučajeva u riziku

Grupa: ≤200

84	75	66	43	0
----	----	----	----	---

Grupa: >200

23	20	17	10	0
----	----	----	----	---

C

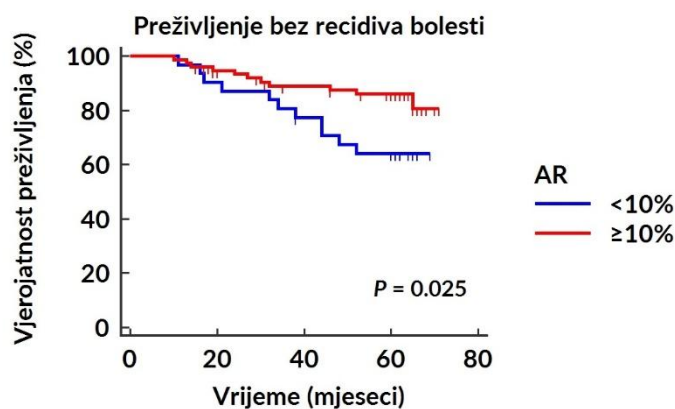
Broj slučajeva u riziku

Grupa: <10%

31	31	27	14	0
----	----	----	----	---

Grupa: ≥10%

76	69	66	40	0
----	----	----	----	---

D

Broj slučajeva u riziku

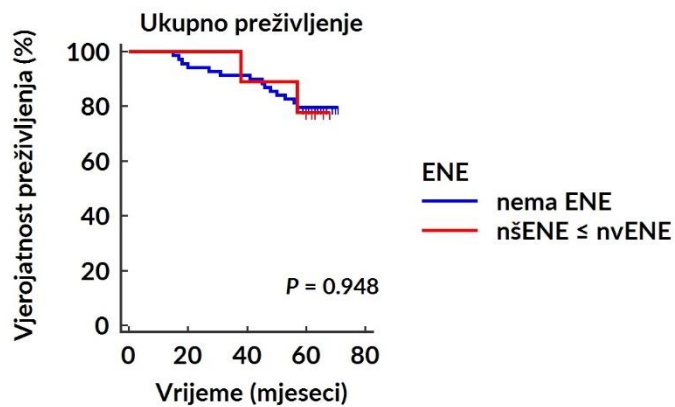
Grupa: <10%

31	28	23	14	0
----	----	----	----	---

Grupa: ≥10%

76	67	60	39	0
----	----	----	----	---

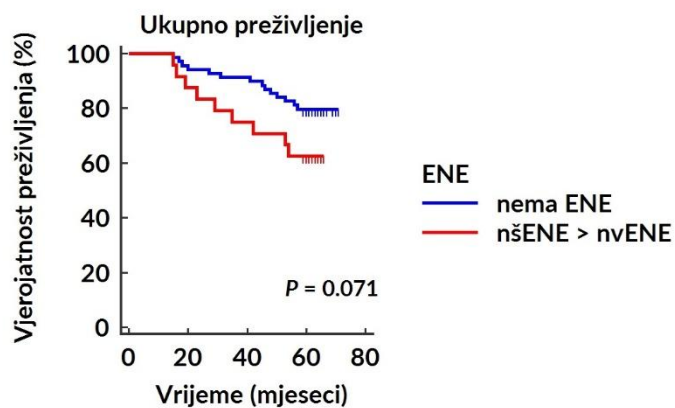
E



Broj slučajeva u riziku

Grupa: nema ENE	69	65	63	35	0
Grupa: nšENE ≤ nvENE	9	9	8	5	0

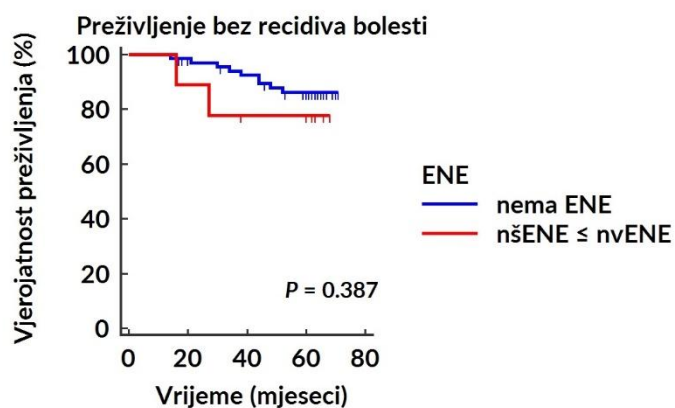
F



Broj slučajeva u riziku

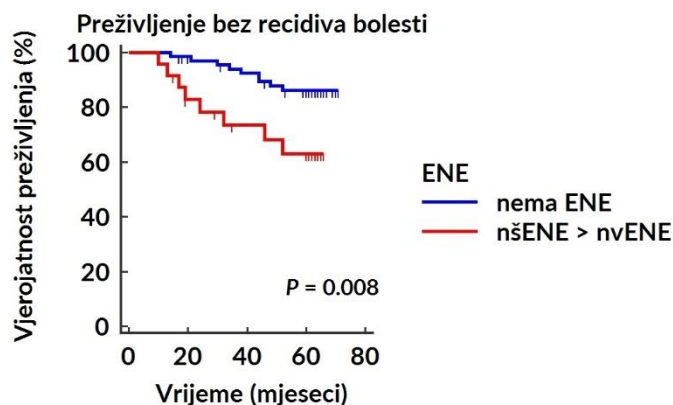
Grupa: nema ENE	69	65	63	35	0
Grupa: nšENE > nvENE	24	21	18	11	0

G



Broj slučajeva u riziku

Grupa: nema ENE	69	65	60	35	0
Grupa: nšENE ≤ nvENE	9	8	6	5	0

H

Broj slučajeva u riziku

Grupa: nema ENE

69 65 60 35 0

Grupa: nšENE > nvENE

24 18 14 10 0

Slika 15. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti prema ekspresiji glikoproteina 96 (GP96) i androgenih receptora (AR) te prisutnosti ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru (ENE u LČČ). Usporedba ukupnog preživljenja **A**) i preživljenja bez recidiva bolesti **B**) prema GP96 histoskoru >200 vs. GP96 histoskor ≤200. Usporedba ukupnog preživljenja **C**) i preživljenja bez recidiva bolesti **D**) prema AR ≥10% vs. AR <10%. Usporedba ukupnog preživljenja prema nšENE ≤ nvENE u LČČ vs. nema ENE **E**) i nšENE > nvENE u LČČ vs. nema ENE **F**). Usporedba preživljenja bez recidiva bolesti prema nšENE ≤ nvENE u LČČ vs. nema ENE **G**) i nšENE > nvENE u LČČ vs. nema ENE **H**).

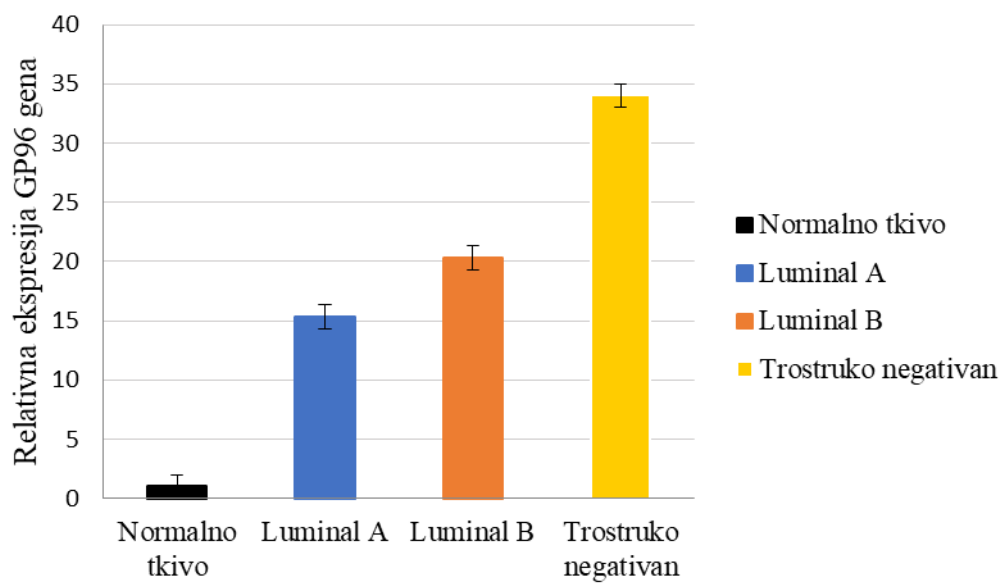
nšENE – najširi promjer ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru; nvENE – najviši promjer ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru.

*Statistička značajnost log rank testa $P < 0,05$

4.8. Rezultati analize aktivacije gena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Metodom kvantitativne analize aktivacije gena u stvarnom vremenu (RT-qPCR) ispitan je izražaj gRNK GP96 iz biopsijskih materijala luminal A, luminal B i trostruko negativnog surogata molekularnog podtipa karcinoma dojke, kao i iz uzoraka normalnog žljezdanog tkiva dojke.

Razine gRNK GP96 bile su statistički značajno više u luminalnom A, luminalnom B i trostruko negativnom surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke u usporedbi s normalnim žljezdanim tkivom dojke (sve $P < 0,001$). Najviša razina gRNK GP96 zabilježena je u trostruko negativnom podtipu, uz statistički značajnu razliku u usporedbi s luminalnim A i luminalnim B molekularnim surogatom (oba $P < 0,001$) (Slika 16).



Slika 16. Grafički prikaz relativnog izražaja gena metodom RT-qPCR za GP96 (n=12) u tumorskom tkivu i normalnom žljezdano tkivu dojke. Rezultati su prikazani kao relativna promjena izražaja gena u tumorskom tkivu u odnosu na normalno žljezdano tkivo (broj puta promjene izražaja ili FC; engl. *Fold-change*). Sve usporedbe među skupinama statistički su značajne ($P < 0,05$).

5. RASPRAVA

Status aLČ smatra se vodećim prognostičkim čimbenikom preživljenja pacijentica s karcinomom dojke te je preživljenje lošije, ukoliko su aLČ zahvaćeni metastazama [134]. Čimbenici koji su povezani s pojavom metastaza u aLČ su dob, multifokalnost tumora, lokalizacija tumora, histološki gradus, veličina tumora, prisutnost LVI i status hormonskih receptora [33]. Istraživanja su pokazala da 30-40% pacijentica s karcinomom dojke ima metastaze u aLČ [44,135], stoga je točna procjena njihovog statusa ključan čimbenik u određivanju stadija karcinoma dojke, koji izravno utječe na liječenje. Povijesno, aksilarna limfadenektomija smatrana je zlatnim standardom za lokoregionalnu kontrolu invazivnog karcinoma dojke i preciznu procjenu statusa aLČ. Međutim, od 1990-ih godina prošlog stoljeća, biopsija LČČ postala je opće prihvaćeni standard kirurškog liječenja pacijentica s ranim stadijem karcinoma dojke i klinički negativnim limfnim čvorovima te je u velikoj mjeri zamijenila aksilarnu limfadenektomiju [136,137]. NSABP (The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) B-32 bila je velika randomizirana kontrolirana studija s preko 5000 žena, koja je uspoređivala biopsiju LČČ i aksilarnu limfadenektomiju u pacijentica s karcinomom dojke, s ciljem utvrđivanja postojanja razlika u stopama preživljenja, lokoregionalnoj kontroli bolesti i morbiditetima između ovih dviju metoda liječenja. Pacijentice uključene u studiju bile su razvrstane u dvije skupine. Jednoj skupini je rađena biopsija LČČ i aksilarna disekcija, a drugoj samo biopsija LČČ te aksilarna disekcija ukoliko bi LČČ bio zahvaćen metastazama. Studija je potvrdila da nema statistički značajnih razlika između dviju ispitivanih skupina u smislu preživljenja i lokoregionalne kontrole bolesti te da, kada je LČČ negativan, sama biopsija LČČ, bez dodatne aksilarne limfadenektomije, predstavlja sigurnu, preciznu i učinkovitu metodu optimalnog kirurškog rješavanja aLČ i procjene njihovog statusa, bez negativnog utjecaja na preživljenje [138].

Julian i sur. prezentirali su rezultate 10-godišnjeg praćenja pacijentica uključenih u NSABP B-32 te su potvrdili da nema statistički značajnih razlika u ukupnom preživljenju i preživljenju bez recidiva bolesti između pacijentica koje su imale negativne LČČ, a imale su samo biopsiju LČČ ili biopsiju LČČ s aksilarnom disekcijom. Također, u pacijentica koje su imale okultne metastaze u LČČ, nije utvrđeno povećanje relativnog rizika za lošije ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti [139].

Daljnijim istraživanjima nastojalo se utvrditi može li se aksilarna disekcija izostaviti kod odabranih pacijentica s ograničenim brojem pozitivnih aLČ. To je dovelo do niza kliničkih ispitivanja koja su promijenila dotadašnju kliničku praksu, podupirući sigurno izostavljanje izvođenja aksilarne limfadenektomije kod odabranih skupina pacijentica [140–145]. Međutim, optimalan terapijski pristup pacijenticama s karcinomom dojke i ograničenim brojem pozitivnih LČČ i dalje je predmet rasprava, s obzirom na to da njih 34,3-77,3% ima pozitivne nSLN nakon aksilarne disekcije [146]. Brojne studije ispitivale su kliničko-patološke karakteristike i različite molekularne biljege u svrhu predviđanja statusa

nSLN, osobito u kontekstu deeskalacije kirurškog pristupa aksili i smanjenja morbiditeta povezanih s izvođenjem aksilarne disekcije [47,48].

U ovoj studiji ispitana je povezanost ENE-a u LČČ, izražaja AR-a i GP96 s kliničko-patološkim karakteristikama, statusom nSLN, recidivom bolesti i preživljenjem pacijentica s ranim stadijem karcinoma dojke i pozitivnim LČČ.

U prethodnim istraživanjima potvrđena je povezanost prisutnosti ENE-a u LČČ i značajno povišenog rizika za prisutnost metastaza u nSLN u pacijentica s karcinomom dojke. Ma i sur. proveli su retrospektivno istraživanje koje je uključivalo 402 pacijentice s invazivnim karcinomom dojke i pozitivnim aLČ. Otkrili su da su pacijentice s pozitivnim ENE imale veći broj nSLN zahvaćenih metastazama i viši pN stadij bolesti. Također su ispitali ulogu ENE u pacijentica s različitim nodalnim stadijem bolesti te su utvrdili da su pacijentice s N3 stadijem bolesti i pozitivnim ENE imale lošije preživljenje bez recidiva bolesti u usporedbi s onima koje nisu imale ENE. Međutim, nisu pronašli statistički značajnu korelaciju između ENE-a i preživljenja pacijentica s N1 i N2 stadijem bolesti [129]. Choi i sur. su zaključili kako su pacijenti s ENE imali značajno veći broj ukupno pozitivnih aLČ i nSLN, kao i veću učestalost N2 stadija bolesti [147]. Druga studija je također potvrdila da pacijentice s ENE češće imaju ≥ 4 pozitivna aLČ, potvrđujući ENE kao nezavisan prediktor opsežnije zahvaćenosti aLČ [148]. U skladu s prethodnim istraživanjima, i u ovoj studiji prisutnost ENE u LČČ bila je povezana s većim brojem pozitivnih nSLN, većim ukupnim brojem zahvaćenih aLČ te većim opsegom tumorskog opterećenja u nSLN. Drugi faktori, kao što su mlađa životna dob, viši histološki gradus, prisutnost LVI, veći tumori, makrometastaze u LČČ, broj pozitivnih i negativnih LČČ te HER2 status, također dokazano utječu na povećani rizik metastaza u nSLN [146,149]. U ovom istraživanju, 38 (35,51%) pacijentica imalo je ENE u LČČ, što je slično rezultatima u drugim istraživanjima [129,150]. Utvrdili smo da su histološki gradus, broj pozitivnih LČČ, veličina metastaze u LČČ i ENE u LČČ statistički značajno povezani s prisutnošću metastaza u nSLN. Multivarijatna analiza je potvrdila da su ENE u LČČ i veličina metastaze u LČČ, nezavisni prediktori statusa nSLN, što je u skladu s prethodnim istraživanjima [151]. Analiza je također pokazala statistički značajnu pozitivnu korelaciju između veličine metastaze u nSLN i ukupnog broja pozitivnih nSLN te većeg opsega tumorske zahvaćenosti nSLN. O'Keeffe i sur. utvrdili su da u odsutnosti ENE u LČČ značajno opada rizik od pojave ENE u nSLN, kao i obrnuto [151]. U našem istraživanju, nije dokazana statistički značajna korelacija između prisutnosti ENE u LČČ i ENE u nSLN, iako je većina pacijentica s ENE u nSLN imala i ENE u LČČ. Takav rezultat može biti posljedica manjeg broja ispitanica s potvrđenim ENE u nSLN. U okviru ovog istraživanja, nije utvrđena značajna povezanost statusa nSLN s veličinom primarnog tumora, LVI, histološkim gradusom, statusom ER i PR, HER2 statusom niti Ki-67. Meta-analiza Nottegar i sur., potvrdila je da je ENE u LČČ jedan od najvažnijih prediktora statusa nSLN [152]. Meretoja i sur. proveli su multicentričnu studiju koja je uključivala 675 pacijentica s karcinomom dojke i makrometastazom u LČČ. Cilj im je bio razviti prediktivni model za točnu procjenu i stratifikaciju pacijentica prema riziku

zahvaćenosti aLČ, a koje bi imale koristi od provođenja aksilarne disekcije, zračenja aksile ili kombinacije obiju terapijskih postupaka [153]. Rezultati njihovog istraživanja su u skladu s rezultatima meta-analize koji su učinili van la Parra i sur. [154]. Dosadašnja istraživanja pokazala su oprečne rezultate u svezi utjecaja ENE-a na preživljenje pacijentica s karcinomom dojke. Aziz i sur. su dokazali kako je $ENE > 3$ mm, mjeren okomito na kapsulu LČČ, povezan s lošijim specifičnim preživljenjem i preživljenjem bez recidiva bolesti [155]. Ma i sur. istražili su prediktivnu i prognostičku vrijednost ENE-a ovisno o njegovom najvišem i najširem promjeru te su ispitali granične vrijednosti veličine ENE-a ovisno o izmjerenoj dimenziji. Dokazali su da je ENE povezan s lošijim preživljenjem bez recidiva bolesti, ali ne i s ukupnim preživljenjem. Daljnjom analizom podskupina dobivenih kategorizacijom prema graničnim vrijednostima, za najviši ENE 2 mm i najširi ENE 3 mm, autori nisu potvrdili njihovu prognostičku vrijednost [129]. Nottegar i sur. dokazali su kako je prisutnost ENE u LČČ snažno povezana s lošijom prognozom i većim rizikom za povrat bolesti [152]. Slične rezultate dobili su Bucci i sur. u svom istraživanju u kojem su pokazali lošije preživljenje u pacijenata s ENE u usporedbi s onim bez ENE [156]. Oprečni rezultati dobiveni u ranijim studijama, djelomično se mogu objasniti različitim metodama procjene ENE. Nedostatak standardizacije metodologije procjene i opisivanja ENE u patohistološkim nalazima, kao i različite granične vrijednosti s rasponom od 1 mm do 3 mm, također doprinose različitosti dobivenih rezultata, što su Tang i sur. prezentirali u svojem internacionalnom istraživanju [157]. Slično kao u studiji Ma i sur. [129], i u ovom istraživanju također je provedena analiza podskupina ovisno o promjeru ENE, $nvENE$ i $nšENE$. Međutim, umjesto kategorizacije podskupina prema graničnim vrijednostima, ispitivana skupina podijeljena je u dvije podskupine: $nšENE > nvENE$ i $nšENE \leq nvENE$. Statistička analiza je pokazala da su pacijentice u podskupini s $nšENE > nvENE$ u LČČ imale veći rizik za pozitivan status nSLN na metastaze, kao i lošije preživljenje bez recidiva bolesti, ali ne i lošije ukupno preživljenje. Također, ove su pacijentice češće imale veći opseg tumorske zahvaćenosti nSLN i viši pN stadij.

Izražaj GP96 nije povezan sa statusom nSLN, kao niti većim brojem metastazama zahvaćenih nSLN. Suprotno tome, izražaj AR-a je negativno povezan sa zahvaćenošću nSLN, ali nije povezan s većim brojem zahvaćenih nSLN. Također, nije dokazana povezanost koekspresije GP96 i AR-a sa statusom nSLN niti brojem pozitivnih nSLN.

GP96 je član obitelji HSP90 te je najprisutniji u endoplazmatskom retikulumu stanice, gdje održava homeostazu proteina. Hodorova i sur. su u istraživanju IHC metodom utvrdili izražaj GP96 te su dokazali kako je GP96 značajno više eksprimiran u stanicama karcinoma dojke nego u normalnom žljezdanom tkivu dojke [91]. Potvrđena je i visoka ekspresija GP96 u hepatocelularnom karcinomu u usporedbi sa zdravim tkivom jetre [158]. U posljednje vrijeme posebna se pozornost u istraživanjima posvećuje tumorskom mikrookolišu, koji se pokazao značajnim prognostičkim čimbenikom preživljenja, te imunomodulaciji, kao posljedici interakcije tumorskih stanica i različitih tumor-infiltrirajućih upalnih stanica. Prethodne studije su pokazale kako je GP96 važan za aktivaciju urođenog

i stečenog imunološkog odgovora te da je ključan za aktivaciju Toll-like receptora i pripremu snažnog T-staničnog odgovora [89,159]. U našem istraživanju, 84 (78,50%) pacijentice imalo je nisku ekspresiju GP96. Ova je podskupina također češće imala ER-pozitivne, PR-pozitivne, HER2-negativne tumore, s niskim mitotskim proliferacijskim indeksom Ki-67 (<20%). Naši rezultati pokazali su negativnu povezanost izražaja GP96 s ekspresijom ER i PR. Radolović i sur. također su dokazali razliku u ekspresiji GP96 ovisno o hormonskom statusu [92]. Međutim, u našoj ispitivanoj skupini nije utvrđena statistički značajna korelacija između izražaja GP96 i AR-a. Za razliku od toga, Wang i sur. pokazali su statistički značajnu pozitivnu korelaciju između visoke razine GP96 i AR-a. Nadalje, utvrdili su povezanost visoke razine GP96 s pozitivnim PR statusom i niskom ekspresijom EGFR-a, dok povezanost s ER i HER2 statusom, p53, Ki-67, dobi, kliničkim stadijem, histološkim gradusom, statusom aLČ i histološkim tipom tumora nije potvrđena. Rezultati studije sugeriraju potencijalnu ulogu GP96 u biološkim procesima hormonski ovisnih karcinoma dojke te mogući doprinos GP96 inhibiciji proliferacije tumorskih stanica [160]. IHC analizom u ovom istraživanju uspoređene su razine ekspresije GP96 između različitih surogata molekularnih podtipova karcinoma dojke, pri čemu je utvrđena značajna razlika između luminalnog A i luminalnog B u odnosu na HER2-obogaćeni i trostruko negativni podtip. Više razine ekspresije GP96 utvrđene su u HER2-obogaćenom i trostruko negativnom molekularnom podtipu karcinoma dojke u odnosu na luminalne podtipove. Ove rezultate dodatno smo potvrdili metodom RT-qPCR, pri čemu je utvrđeno da su razine gRNK GP96 bile značajno više u tumorskom tkivu u usporedbi sa zdravim žljezdanim tkivom dojke, uz najviše vrijednosti u trostruko negativnom podtipu u odnosu na luminalne A i B podtipove. Slične rezultate dobili su i Liu i sur. u istraživanju koje je obuhvatilo IHC i gensko testiranje na uzorcima karcinoma dojke [97]. Povišene razine gRNK GP96 zabilježene su i u tumorima drugih sijela poput hepatocelularnog karcinoma, glioma, karcinoma pluća te adenokarcinoma jednjaka, pri čemu je ekspresija gRNK GP96 bila značajno viša u tumorskim nego u normalnim tkivima [97]. Ova studija je pokazala pozitivnu korelaciju između ekspresije GP96 i veličine tumorskog infiltrata u nSLN, što može upućivati na indirektnu povezanost ekspresije GP96 s opsegom tumorske zahvaćenosti nSLN, kao što smo već prikazali. Ranija istraživanja nisu pokazala značajnu povezanost veličine tumora i ekspresije GP96, što je u skladu i s našim rezultatima [97,160].

AR pripadaju skupini steroidnih receptora koji djeluju kao klasični hormonima regulirani transkripcijski čimbenici te su ključan čimbenik u razvoju karcinoma prostate. Međutim, sve se više istražuje njihova uloga i u karcinomu dojke, gdje su ekspimirani u približno 70-90% slučajeva, što ih čini češće prisutnima od klasičnih hormonskih receptora ER ili PR [120]. Naše istraživanje pokazuje slične rezultate, pri čemu je u 71% pacijentica bila prisutna ekspresija AR-a. Do sada je poznato da AR pokazuje različite funkcije, ali i razinu ekspresije ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke. Prethodne studije ustanovile su da se u ER-pozitivnom karcinomu dojke AR vežu s ER α te da ova interakcija može dovesti do međusobne inhibicije oba receptora. Osim toga, AR mogu izravno

aktivirati tumor-suprimirajuće gene ili povećati ekspresiju tumor-suprimirajućih proteina, čime pridonose supresiji rasta tumorskih stanica. U skladu s time, ER-pozitivni i AR-pozitivni karcinomi dojke imaju povoljnije patohistološke karakteristike i bolje preživljenje bez recidiva bolesti [124,125,161]. Prethodno objavljena istraživanja pokazala su da je pozitivna AR ekspresija povezana s nižim pT stadijem, negativnim statusom limfnih čvorova, sciroznim tipom invazivnog dukalnog karcinoma, nižim histološkim gradusom i negativnom ekspresijom p53 te je češće prisutna kod postmenopausalnih žena. Također, utvrđena je pozitivna korelacija s ekspresijom ER i PR, što je u skladu s rezultatima istraživanja u sklopu ovog rada [162]. Nadalje, utvrdili smo da su upravo hormonski receptori jedini nezavisni prediktor ekspresije AR-a u odnosu na ostale kliničko-patološke čimbenike. Prema našim rezultatima, osim s hormonskim receptorima, AR su bili povezani i s dobi pacijentica te prisutnošću kalcifikata u invazivnoj komponenti tumora. Suprotno nekim ranijim istraživanjima [162,163], naša je studija potvrdila statistički značajnu negativnu povezanost između ekspresije AR i HER2 statusa. Rezultati istraživanja He i sur. pokazali su da AR sudjeluje u aktivaciji HER2 signalnih puteva *in vivo* i *in vitro*, potičući proliferaciju HER2-pozitivnih staničnih linija karcinoma dojke. Inhibicija AR-a dovodi do smanjenja rasta tumorskih stanica, bez utjecaja na ekspresiju HER2 i HER3 proteina. Suprotno ovim rezultatima, druga studija pokazala je drukčiju ulogu AR-a u luminalnom AR-pozitivnom trostruko negativnom karcinomu dojke, gdje AR pojačava fosforilaciju i signalizaciju povećanjem transkripcije gena za HER3, što posljedično dovodi do veće ekspresije HER3 proteina [164]. Razlike u ovim nalazima mogu se djelomično objasniti heterogenošću biološkog ponašanja AR-a među pojedinim surogatima molekularnih podtipova karcinoma dojke, koji se međusobno razlikuju i prema razinama ekspresije AR-a. Zhang i sur. dokazali su da je pozitivna ekspresija AR-a češća u luminalnom A, luminalnom B i HER2-obogaćenom surogatu u odnosu na trostruko negativan surogat, u kojem je ekspresija AR-a češće negativna [165]. Sukladno dosadašnjim spoznajama, i u našoj ispitivanoj skupini najveći udio AR-pozitivnih tumora te najviše razine AR ekspresije zabilježene su u luminalnom A i luminalnom B podtipu, dok su u trostruko negativnom podtipu pretežno bili AR-negativni tumori s vrlo niskim postotkom AR ekspresije. Slične rezultate prikazali su i Collins i sur. u svojem velikom istraživanju, koje je obuhvatilo preko 3000 uzoraka karcinoma dojke, u kojem su analizirali ekspresiju AR-a u odnosu na stadij bolesti, patološke karakteristike i surogat molekularnog podtipa karcinoma. Također su utvrdili povezanost pozitivne ekspresije AR-a s manjim tumorima, nižim histološkim gradusom te češće negativnim statusom aLČ u usporedbi s pacijenticama koje su imale tumore s negativnom ekspresijom AR-a [122]. Međutim, suprotno rezultatima nekih prethodnih istraživanja [126,132,162,165], naši rezultati nisu pokazali povezanost ekspresije AR-a s veličinom tumora niti mitotskim proliferacijskim indeksom Ki-67.

U ovom istraživanju po prvi puta je analiziran odnos koekspresije GP96 i AR-a s kliničko-patološkim karakteristikama karcinoma dojke. Analizom podskupina utvrđena je statistički značajna povezanost koekspresije GP96 i AR-a s HER2 statusom, statusom ER i PR, brojem metastatskih sjela te surogatom

molekularnog podtipa karcinoma dojke. Većina hormonski ovisnih karcinoma dojke pokazivala je nisku ekspresiju GP96 uz pozitivnu ekspresiju AR-a, dok je u skupini hormonski neovisnih karcinoma najzastupljeniji fenotip bio visoka ekspresija GP96 uz negativnu ekspresiju AR-a. Ovakvi rezultati mogu upućivati na povezanost GP96 s agresivnijim molekularnim surogatima karcinoma dojke, vjerojatno posredovanu signalnim putevima ER i PR. Naši podaci su pokazali kako su karcinomi s niskom ekspresijom GP96 i pozitivnom ekspresijom AR češće bili HER2 negativni, dok su oni s visokom ekspresijom GP96 i pozitivnom AR ekspresijom češće bili HER2 pozitivni. Analizom podskupina definiranih prema koekspresiji GP96 i AR-a nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na dob, histološki gradus i tip, Ki-67, veličinu tumora i tip operacije te prisutnost EIC-a, ENE-a, LVI-a, nekroze u invazivnoj komponenti karcinoma i perineuralne invazije. Kod luminalnog A, luminalnog B HER2-negativnog i luminalnog B HER2-pozitivnog surogata najzastupljenija je bila niska ekspresija GP96 uz pozitivnu AR ekspresiju, kod HER2-obogaćenog visoka ekspresija GP96 i pozitivna AR ekspresija, a kod trostruko negativnog visoka ekspresija GP96 i negativna AR ekspresija.

U analizi preživljenja s praćenjem od pet i više godina u ovom istraživanju, ekspresija GP96 nije imala utjecaj niti na ukupno preživljenje niti na preživljenje bez recidiva bolesti kod bolesnica s ranim stadijem karcinoma dojke. Međutim, Wang i sur. u sveobuhvatnoj analizi pacijentica s karcinomom dojke, utvrdili su da skupina s visokom ekspresijom GP96 ima lošije ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti [160]. Slični rezultati dobiveni su i u studiji Liu i sur., koji su također utvrdili povezanost visoke ekspresije GP96 s lošijom ishodom bolesti [97]. U istraživanju Kim i sur. rasvijetljena je uloga GP96 u procesu epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) tumorskih stanica, ključnom koraku procesa metastaziranja. EMT uključuje promjenu morfologije i fenotipa stanica te reorganizaciju citoskeleta, omogućujući tumorskim stanicama invaziju okolnog tkiva i širenje na udaljena mjesta. Koristeći različite stanične linije karcinoma dojke, dokazali su da povišena ekspresija GP96 korelira s višim metastatskim potencijalom i lošijim kliničkim ishodom, uključujući lošije preživljenje bez recidiva bolesti i kraće preživljenje bez udaljenog recidiva bolesti. Ključna za ovu funkciju GP96 jest njegova fosforilacija posredovana kazein kinazom 2 α (CK2 α), koja ga stabilizira te optimizira njegovu interakciju s LRP6. Rezultat je CK2 α inducirana invazija i migracija stanica, osobito u linijama trostruko negativnog karcinoma dojke [166].

Prema dostupnoj literaturi, visoka ekspresija GP96 povezana je i s lošijim ukupnim preživljenjem kod karcinoma mokraćnog mjehura, kao i kod karcinoma želuca i jednjaka [160,167]. Nasuprot tome, Ji i sur. pokazali su da je niska ekspresija GP96 povezana s lošijim ukupnim preživljenjem kod bolesnika s hepatocelularnim karcinomom [158]. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Lee i sur., koji su analizirali ekspresiju GP96 u skupini pacijenata s kolorektalnim karcinomom [167].

U literaturi postoje kontradiktorni rezultati o prognostičkoj ulozi AR-a u karcinomu dojke, pri čemu pojedini autori povezuju pozitivnu ekspresiju AR-a s boljim preživljenjem, dok drugi nisu uočili

značajan utjecaj na klinički ishod. U dosad jednoj od najvećih provedenih meta-analiza, Bozovic-Spasojevic i sur. pokazali su da je pozitivna ekspresija AR-a povezana s boljim preživljenjem bez recidiva bolesti i duljim ukupnim preživljenjem [124]. Slične rezultate izvijestili su Vera-Badillo i sur., koji su u svojoj meta-analizi potvrdili povezanost ekspresije AR-a s boljim trogodišnjim i petogodišnjim ukupnim preživljenjem neovisno o koekspresiji ER-a [121]. U retrospektivnoj studiji Aleskandarany i sur., pozitivna ekspresija AR-a u pacijentica s ranim stadijem karcinoma dojke bila je povezana s dužim specifičnim preživljenjem, neovisno o veličini tumora, histološkom gradusu i stadiju bolesti. Kod trostruko negativnog surogata molekularnog podtipa karcinoma dojke, neke studije su pokazale da je ekspresija AR-a povoljan prognostički čimbenik, vjerojatno zbog negativne korelacije s Ki-67, kao markerom stanične proliferacije. Nasuprot tome, druga istraživanja nisu pokazala značajan utjecaj AR-a na preživljenje u ovom podtipu karcinoma dojke. Slični kontradiktorni rezultati dobiveni su i kod HER2-obogaćenog surogata. Razlike među rezultatima istraživanja mogu se djelomično objasniti time što je biološki učinak AR-a ovisan o njegovoj koekspresiji s ER-om i HER2, kao što su predstavili Jahan i sur. u svom preglednom radu koji je obuhvatio dosadašnje spoznaje o ekspresiji AR-a, njegovim signalnim putevima te prognostičkoj, prediktivnoj i terapijskoj ulozi u karcinomu dojke [168].

U ovom istraživanju analiza petogodišnjeg ukupnog preživljenja pokazala je da su dob bolesnica, histološki gradus, EIC i LNR značajni nezavisni prediktori ukupnog preživljenja. Iako je u univarijantnoj analizi statistički značajan bio i status nSLN, njegov utjecaj nije potvrđen u multivarijantnom modelu. Ipak, pojedine studije su pokazale da pozitivan status nSLN može biti povezan s lošijim preživljenjem [169]. U analizi preživljenja bez recidiva bolesti, značajni kliničko-patološki faktori bili su histološki gradus, EIC, LNR i ekspresija AR-a.

Rezultati ranijih studija nisu konzistentni u pogledu utjecaja dobi na preživljenje. Istraživanja su pokazala da je životna dob pacijentica u trenutku postavljanja dijagnoze značajan prognostički faktor, dok druga nisu potvrdila takve zaključke. Smatra se da su i mlađa i starija životna dob u vrijeme postavljanja dijagnoze nezavisni negativni čimbenici preživljenja te da pacijentice srednje životne dobi imaju bolje ukupno preživljenje u odnosu na ostale dobne skupine. Dosadašnje spoznaje upućuju na to da odnos između dobi i preživljenja nije linearan, no on je uvelike uvjetovan i samim molekularnim podtipom karcinoma dojke [49,170]. Naši rezultati su u skladu s literaturom i upućuju na to da starija životna dob predstavlja čimbenik lošijeg ukupnog preživljenja.

Histološki gradus prihvaćen je kao surogat biološkog ponašanja tumora te je u karcinomu dojke prepoznat kao značajan prognostički čimbenik, zajedno sa statusom aLČ i veličinom tumora. Viši histološki gradus povezan je s kraćim preživljenjem i ranijom pojavom recidiva bolesti, neovisno o veličini tumora, hormonskom statusu ili statusu aLČ, zbog čega je danas uključen u AJCC sustav klasifikacije procjene proširenosti bolesti. Osim toga, prepoznat je i kao prediktor odgovora na neoadjuvantnu terapiju u trostruko negativnim i HER2-pozitivnim karcinomima dojke [40,165].

Sukladno rezultatima prijašnjih studija [49,124,150,155,163], i u našem istraživanju histološki gradus G3 pokazao je nepovoljan utjecaj na ukupno preživljenje, preživljenje bez recidiva bolesti te povećan relativni rizik za pojavu lokoregionalnog recidiva bolesti.

Utjecaj EIC-a na preživljenje u karcinomu dojke još uvijek nije u potpunosti razjašnjen zbog nepodudarnosti ranijih istraživanja. Dok pojedini autori nisu uočili značajan utjecaj EIC-a na preživljenje, drugi su neočekivano utvrdili da njegova prisutnost može biti povezana s povoljnijim kliničkim ishodima, vjerojatno zbog biološki manje agresivne DCIS komponente. U svom istraživanju, Corsi i sur. pokazali su da je EIC povoljan čimbenik preživljenja bez recidiva bolesti kod pacijentica s T1 stadijem tumora u usporedbi s T2 stadijem, što se može objasniti većim relativnim udjelom invazivne komponente u T2 tumorima. Nadalje, EIC se pokazao povoljnim prognostičkim čimbenikom u karcinomima histološkog gradusa G2 i G3, ali ne i u gradusu G1. Prisutnost EIC-a nije značajno utjecala na preživljenje ovisno o molekularnom podtipu tumora niti pN0 stadiju bolesti, iako je zabilježen trend prema povoljnijem preživljenju kod viših pN stadija [171]. S druge strane, više studija je potvrdilo da je prisutnost EIC-a povezana s povišenim rizikom za lokoregionalni recidiv bolesti, osobito kod pacijentica koje su imale poštediti operativni zahvat [172–174]. Prema rezultatima istraživanja Ha i sur. prisutnost EIC-a nije imala utjecaj na ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti [175]. Međutim, u našem istraživanju EIC se pokazao negativnim prognostičkim čimbenikom za oba preživljenja te čimbenikom povišenog relativnog rizika za lokoregionalni recidiv bolesti.

Prema literaturi, ukupan broj pozitivnih aLČ, izražen kao PLN ili pN stadij te omjer broja pozitivnih i ukupno izvađenih limfnih čvorova, odnosno LNR, korisni su prediktivni čimbenici kliničkog ishoda pacijentica s karcinomom dojke [49,54]. U nekim studijama LNR je pokazao čak i precizniju prognostičku vrijednost u odnosu na pN stadij. Pojedini autori ističu da su od aksilarnih indeksa, LNR i LODDS bolji za stratifikaciju rizika pacijenata kod kojih je aksilarnom disekcijom odstranjeno manje od 10 limfnih čvorova, dok je kod onih s 10 i više odstranjenih limfnih čvorova bolji pN sustav. Viši LNR povezan je s lošijim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez recidiva bolesti, što je u skladu i s rezultatima našeg istraživanja [54,55,90].

U ovom smo istraživanju, u analizi relativnog rizika za lokoregionalni recidiv bolesti, osim već spomenutog utjecaja histološkog gradusa G3 i prisutnosti EIC-a, utvrdili i značajan utjecaj visoke ekspresije GP96, negativne ekspresije AR-a, negativnog statusa hormonskih receptora te pozitivnog HER2 statusa. Slično tome, u analizi relativnog rizika za udaljene metastaze, značajan su utjecaj pokazali negativna ekspresija AR-a te prisutnost ENE u LČČ, u odnosu na one pacijentice bez prisutne ENE. Ovakvi su rezultati usporedivi s onima koje su ranije objavili Nottegar i sur. [152].

U našoj ispitivanoj skupini, pacijentice s visokom ekspresijom GP96 imale su 4,5 puta veći rizik za lokoregionalni recidiv bolesti u usporedbi s pacijenticama s niskom ekspresijom GP96, što je u skladu

i s prethodnim istraživanjima [92,160]. U analizi podskupina prema pojavi udaljenog recidiva bolesti, nije utvrđena statistički značajna povezanost s razinom ekspresije GP96. Skupina s negativnom ekspresijom AR-a imala je gotovo pet puta veći relativni rizik za lokoregionalni recidiv te 2,5 puta veći rizik za razvoj udaljenih metastaza u odnosu na skupinu s pozitivnom ekspresijom AR-a, što je u skladu s rezultatima prijašnjih studija [124,163,168].

Dosadašnja istraživanja pokazala su da povišen rizik za lokoregionalni recidiv bolesti nije povezan isključivo sa stadijem bolesti i statusom aLČ, već su i status hormonskih receptora i prekomjerna ekspresija HER2 receptora identificirani kao značajni prediktori kliničkog ishoda, uključujući lokoregionalni recidiv bolesti, udaljene metastaze i preživljenje [124,168]. U pacijentica s karcinomom dojke koji su ER-negativni, PR-negativni i/ili HER2 pozitivni, rizik za lokoregionalni recidiv bolesti je značajno viši, što je u skladu i s rezultatima ovog rada [176]. Također, danas su poznati obrasci incidencije lokoregionalnog recidiva ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke što izravno utječe na plan i način praćenja pacijentica.

6. ZAKLJUČCI

- Ekspresija GP96 nije u korelaciji s ekspresijom AR-a, ali je negativno povezana s ekspresijom ER-a i PR-a.
- Najviše razine GP96 zabilježene su u hormonski neovisnim karcinomima u usporedbi s hormonski ovisnima.
- Ekspresija GP96 nije pokazala značajnu povezanost sa statusom nSLN niti većim opsegom tumorskog opterećenja u nSLN.
- Ekspresija AR-a u pozitivnoj je korelaciji s ekspresijom ER-a i PR-a.
- Najviše razine AR-a utvrđene su u luminalnom A i luminalnom B surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke.
- Ekspresija AR-a u negativnoj je korelaciji sa statusom nSLN, ali nije povezana s opsegom tumorske zahvaćenosti nSLN.
- ENE u LČČ i veličina metastaze u LČČ glavni su prediktori nSLN statusa.
- Pacijentice s nšENE > nvENE imaju značajno veći rizik metastaza u nSLN i lošije preživljenje bez recidiva bolesti.
- Nema razlike u stopama ukupnog preživljenja i preživljenja bez recidiva bolesti ovisno o ekspresiji GP96.
- Nema razlike u stopama ukupnog preživljenja ovisno o ekspresiji AR-a, dok pacijentice s negativnom ekspresijom AR-a imaju lošije preživljenje bez recidiva bolesti.
- Prognostički čimbenici ukupnog preživljenja su dob, histološki gradus G3, prisutnost EIC-a i LNR.
- Prognostički čimbenici preživljenja bez recidiva bolesti su histološki gradus G3, prisutnost EIC-a, LNR i negativna ekspresija AR-a.
- Visoka ekspresija GP96 povezana je s povećanim rizikom za lokoregionalni recidiv bolesti, ali ne i udaljeni recidiv bolesti.
- Negativna ekspresija AR-a povezana je s povećanim rizikom za lokoregionalni i udaljeni recidiv bolesti.
- Razine gRNK GP96 značajno su više u luminalnom A, luminalnom B i trostruko negativnom surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke u usporedbi s normalnim žljezdanim tkivom dojke.
- Najviše razine gRNK GP96 zabilježene su u trostruko negativnom podtipu u odnosu na luminalne.

7. LITERATURA

1. Guo L, Kong D, Liu J i sur. Breast cancer heterogeneity and its implication in personalized precision therapy. *Exp Hematol Oncol* 2023;12(1):1-27.
2. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J i sur. Breast cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2019;5(1):66.
3. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: Burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26(4):444-57.
4. Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C, Curigliano G. Breast cancer. *Lancet* 2021;397(10286):1750-69.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Rano otkrivanje raka dojke [Internet]. Zagreb: HZJZ; 2025. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/nacionalni-programi/rano-otkrivanje-raka-dojke/>.
6. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN i sur. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017;13:1387-97.
7. Lima SM, Kehm RD, Terry MB. Global breast cancer incidence and mortality trends by region, age-groups, and fertility patterns. *EClinicalMedicine* 2021;38:100985.
8. Kudela E, Samec M, Kubatka P i sur. Breast cancer in young women: Status quo and advanced disease management by a predictive, preventive, and personalized approach. *Cancers (Basel)* 2019;11(11):1-20.
9. Smolarz B, Zadrożna Nowak A, Romanowicz H. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)* 2022;14(10):1-27.
10. Łukasiewicz S, Czeczelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4287.
11. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1291-9.
12. Lubinski J, Kotsopoulos J, Moller P i sur. MRI Surveillance and Breast Cancer Mortality in Women with BRCA1 and BRCA2 Sequence Variations. *JAMA Oncol* 2024;10(4):493-9.
13. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR i sur. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Jama* 2017;317(23):2402-16.
14. Li S, Silvestri V, Leslie G i sur. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol* 2022;40(14):1529-41.
15. Nielsen FC, Van Overeem Hansen T, Sørensen CS. Hereditary breast and ovarian cancer: New genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):599-612.
16. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC i sur. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med* 2015;372(23):2243-57.
17. Angeli D, Salvi S, Tedaldi G. Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: How many and which genes to test? *Int J Mol Sci* 2020;21(3):1128.
18. Cserni G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica* 2020;112(1):25-41.

19. Zubair M, Wang S, Ali N. Advanced approaches to breast cancer classification and diagnosis. *Front Pharmacol* 2021;11:632079.
20. Erber R, Hartmann A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2020;15(4):327-336.
21. Teichgraber DC, Guirguis MS, Whitman GJ. Breast Cancer Staging: Updates in the AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition, and Current Challenges for Radiologists, From the AJR Special Series on Cancer Staging. *AJR Am J Roentgenol* 2021;217(2):278-290.
22. Giuliano AE, Edge SB, Hortobagyi GN. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 2018;25(7):1783-5.
23. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Byrd DR, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge From a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67(2):93-9.
24. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB i sur. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747-52.
25. Gaudet MM, Gierach GL, Carter BD i sur. Pooled analysis of nine cohorts reveals breast cancer risk factors by tumor molecular subtype. *Cancer Res* 2018;78(20):6011-21.
26. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS i sur. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24(9):2206-23.
27. Xu C, Wei Q, Guo J i sur. FOXA1 Expression Significantly Predict Response to Chemotherapy in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol* 2015;22(6):2034-9.
28. Zhu K, Yang X, Tai H, Zhong X, Luo T, Zheng H. HER2-targeted therapies in cancer: a systematic review. *Biomark Res* 2024;12:1-17.
29. Greenup R, Buchanan A, Lorizio W i sur. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann Surg Oncol* 2013;20(10):3254-8.
30. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE i sur. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2016;18:33.
31. Sopik V, Narod SA. The relationship between tumour size, nodal status and distant metastases: on the origins of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2018;170(3):647-656.
32. Provencher L, Diorio C, Hogue JC, Doyle C, Jacob S. Does breast cancer tumor size really matter that much? *Breast* 2012;21(5):682-5.
33. Abdulla HA, Salman AZ, Alaraibi SJ i sur. Risk Factors Associated With Sentinel Lymph Node Metastasis in Clinically Node-Negative Breast Cancer. *Eur J Breast Heal* 2023;19(3):229-34.
34. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6(4):375-92.
35. Zhang H, Zhang N, Moran MS i sur. Special subtypes with favorable prognosis in breast cancer: a registry-based cohort study and network meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2020;91:102108.

36. Pan B, Yao R, Shi J i sur. Prognosis of subtypes of the mucinous breast carcinoma in Chinese women: a population-based study of 32-year experience (1983-2014). *Oncotarget* 2016;7:38864-38875.
37. Rechsteiner A, Dietrich D, Varga Z. Prognostic relevance of mixed histological subtypes in invasive breast carcinoma: a retrospective analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023;149(8):4967-78.
38. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F i sur. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010;12(4):207.
39. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22(3):207-19.
40. Takahashi H, Oshi M, Asaoka M, Yan L, Endo I, Takabe K. Molecular biological features of Nottingham histological grade 3 breast cancers. *Ann Surg Oncol* 2020;27(11):4475-85.
41. Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer: the basis for a prognostic index. *Cancer* 1991;68(10):2142-9.
42. Gass P, Lux MP, Rauh C i sur. Prediction of pathological complete response and prognosis in patients with neoadjuvant treatment for triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2018;18(1):1051.
43. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20(8):1319-29.
44. Chang JM, Leung JWT, Moy L, Ha SM, Moon WK. Axillary nodal evaluation in breast cancer: state of the art. *Radiology* 2020;295(3):500-15.
45. Wu T, Long Q, Zeng L i sur. Axillary lymph node metastasis in breast cancer: from historical axillary surgery to updated advances in the preoperative diagnosis and axillary management. *BMC Surg* 2025;25:81.
46. Chatterjee A, Serniak N, Czerniecki BJ. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a work in progress. *Cancer J* 2015;21(1):7-10.
47. Chen JY, Chen JJ, Yang BL i sur. Predicting sentinel lymph node metastasis in a Chinese breast cancer population: assessment of an existing nomogram and a new predictive nomogram. *Breast Cancer Res Treat* 2012;135(3):839-48.
48. Öz B, Akcan A, Doğan S i sur. Prediction of nonsentinel lymph node metastasis in breast cancer patients with one or two positive sentinel lymph nodes. *Asian J Surg* 2018;41(1):12-19.
49. Kustić D, Klarica Gembić T, Grebić D, Petretić Majnarić S, Nekić J. The role of different lymph node staging systems in predicting prognosis and determining indications for postmastectomy radiotherapy in patients with T1-T2pN1 breast carcinoma. *Strahlenther Onkol* 2020;196(11):1044-54.
50. Elshaer M, Gravante G, Kosmin M, Riaz A, Al-Bahrani A. A systematic review of the prognostic value of lymph node ratio, number of positive nodes and total nodes examined in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann R Coll Surg Engl* 2017;99(2):101-6.
51. Mansour J, Sagiv D, Alon E, Talmi Y. Prognostic value of lymph node ratio in metastatic papillary thyroid carcinoma. *J Laryngol Otol* 2018;132(1):8-13.

52. Zhao Y, Li G, Zheng D i sur. The prognostic value of lymph node ratio and log odds of positive lymph nodes in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2017;153(3):702-9.e1.
53. Zheng J, Zhong H, Quan E, Gao Z, Ying S. Prognostic value of lymph node ratio in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol* 2025;15:1601575.
54. Tonello F, Bergmann A, de Souza Abrahão K, de Aguiar SS, Bello MA, Thuler LCS. Impact of number of positive lymph nodes and lymph node ratio on survival of women with node-positive breast cancer. *Eur J Breast Health* 2019;15(2):76-84.
55. Huang X, Xu X, Xu A i sur. Exploring the most appropriate lymph node staging system for node-positive breast cancer patients and constructing corresponding survival nomograms. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023;149(16):14721-30.
56. Zhao X, Wei J, Li X, Yang H, Wang P, Cao S. Increasing negative lymph node count predicts favorable OS and DSS in breast cancer with different lymph node-positive subgroups. *PLoS One* 2018;13(3):e0193784.
57. Rakha EA, Martin S, Lee AH i sur. The prognostic significance of lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer* 2012;118(15):3670-80.
58. Kuhn E, Gambini D, Despini L, Asnaghi D, Runza L, Ferrero S. Updates on lymphovascular invasion in breast cancer. *Biomedicines* 2023;11(3):968.
59. Lee SJ, Go J, Ahn BS i sur. Lymphovascular invasion is an independent prognostic factor in breast cancer irrespective of axillary node metastasis and molecular subtypes. *Front Oncol* 2023;13:1269971.
60. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A basic review on estrogen receptor signaling pathways in breast cancer. *Int J Mol Sci* 2023;24(7):6834.
61. Miziak P, Baran M, Błaszczak E i sur. Estrogen receptor signaling in breast cancer. *Cancers (Basel)* 2023;15(19):4689.
62. Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future Oncol* 2014;10(14):2293-301.
63. Nasrazadani A, Thomas RA, Oesterreich S, Lee AV. Precision medicine in hormone receptor-positive breast cancer. *Front Oncol* 2018;8:144.
64. Belachew EB, Sewasew DT. Molecular mechanisms of endocrine resistance in estrogen-positive breast cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:599586.
65. Fei F, Siegal GP, Wei S. Characterization of estrogen receptor-low-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2021;188(1):225-35.
66. Li Z, Wei H, Li S, Wu P, Mao X. The role of progesterone receptors in breast cancer. *Drug Des Devel Ther* 2022;16:305-14.
67. Rojas PA, May M, Sequeira GR i sur. Progesterone receptor isoform ratio: a breast cancer prognostic and predictive factor for antiprogesterin responsiveness. *J Natl Cancer Inst* 2017;109(7):djw317.
68. Arteaga CL. ERBB receptors in cancer: signaling from the inside. *Breast Cancer Res* 2011;13:304.
69. Kemmer S, Reinz E, Sonntag J i sur. Disentangling ERBB signaling in breast cancer subtypes—a model-based analysis. *Cancers* 2021;14(10):2379.
70. Dean-Colomb W, Esteva FJ. HER2-positive breast cancer: Herceptin and beyond. *Eur J Cancer*. 2008;44(18):2806-12.

71. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(1):16-32.
72. Dedić Plavetić N, Jakić-Razumović J, Kulić A, Sirotković-Skerlev M, Barić M, Vrbaneć D. Prognostic value of Ki-67 in breast carcinoma: tissue microarray method versus whole section analysis – potentials and pitfalls. *Pathol Oncol Res* 2015;21(2):315-24.
73. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr i sur. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96(10):1504-13.
74. Choi SB, Park JM, Ahn JH i sur. Ki-67 and breast cancer prognosis: does it matter if Ki-67 level is examined using preoperative biopsy or postoperative specimen? *Breast Cancer Res Treat* 2022;192(2):343-52.
75. Loibl S, André F, Bachelot T i sur. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2024;35(2):159-82.
76. Zumsteg ZS, Morrow M, Arnold B i sur. Breast-conserving therapy achieves locoregional outcomes comparable to mastectomy in women with T1-2N0 triple-negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2013;20(11):3469-76.
77. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L i sur. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(16):1227-32.
78. Wang J, Wu SG. Breast cancer: an overview of current therapeutic strategies, challenge, and perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2023;15:721-30.
79. Alaofi RK, Nassif MO, Al-Hajeili MR. Prophylactic mastectomy for the prevention of breast cancer: review of the literature. *Avicenna J Med* 2018;8(3):67-77.
80. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG); Peto R, Davies C, Godwin J i sur. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012;379(9814):432-44.
81. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Trastuzumab for early-stage, HER2-positive breast cancer: a meta-analysis of 13,864 women in seven randomised trials. *Lancet Oncol* 2021;22(8):1139-50.
82. Swain SM, Baselga J, Kim SB i sur.; CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015;372(8):724-34.
83. Nunes Filho P, Albuquerque C, Pilon Capella M, Debiassi M. Immune Checkpoint Inhibitors in Breast Cancer: A Narrative Review. *Oncol Ther* 2023;11(2):171-83.
84. Wong RS, Ong RJ, Lim JS. Immune checkpoint inhibitors in breast cancer: development, mechanisms of resistance and potential management strategies. *Cancer Drug Resist* 2023;6(4):768-87.
85. Dvir K, Giordano S, Leone JP. Immunotherapy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2024;25(14):7517.
86. Hu C, Yang J, Qi Z i sur. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm (2020)* 2022;3(3):e161.
87. Kim JW, Cho YB, Lee S. Cell Surface GRP94 as a Novel Emerging Therapeutic Target for Monoclonal Antibody Cancer Therapy. *Cells* 2021;10(3):670.
88. Wang Y, Wang X, Ferrone CR, Schwab JH, Ferrone S. Intracellular antigens as targets for antibody based immunotherapy of malignant diseases. *Mol Oncol* 2015;9(10):1982-93.

89. Ansa-Addo EA, Thaxton J, Hong F i sur. Clients and Oncogenic Roles of Molecular Chaperone gp96/grp94. *Curr Top Med Chem* 2016;16(25):2765-78.
90. Klarica Gembić T, Grebić D, Gulić T, Golemac M, Avirović M. Predictive and prognostic values of glycoprotein 96, androgen receptors, and extranodal extension in sentinel lymph node-positive breast cancer: an immunohistochemical retrospective study. *J Clin Med* 2024;13(24):7665.
91. Hodorova I, Rybarova S, Solar P i sur. Gp96 and its different expression in breast carcinomas. *Neoplasma* 2008;55(1):31-5.
92. Radolovic P, Grebic D, Mustac E, Sebaher I, Mamic J, Miletic WM. Heat shock protein gp96 and CD4+ and CD8+ T-lymphocytes expression as prognostic factors in various molecular types of invasive breast carcinoma. *Neoplasma* 2020;67(2):421-9.
93. Patel PD, Yan P, Seidler PM i sur. Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. *Nat Chem Biol* 2013;9(11):677-84.
94. Li X, Sun L, Hou J i sur. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *Int J Cancer* 2015;137(3):512-24.
95. Buc Calderon P, Sennesael AL, Glorieux C. Glucose-regulated protein of 94 kDa contributes to the development of an aggressive phenotype in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2018;105:115-20.
96. Dejeans N, Glorieux C, Guenin S i sur. Overexpression of GRP94 in breast cancer cells resistant to oxidative stress promotes high levels of cancer cell proliferation and migration: implications for tumor recurrence. *Free Radic Biol Med* 2012;52(6):993-1002.
97. Liu S, Li R, Zuo S, Luo R, Fang W, Xie Y. GRP94 overexpression as an indicator of unfavorable outcomes in breast cancer patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(6):3061-7.
98. Cheng Q, Chang JT, Geradts J i sur. Amplification and high-level expression of heat shock protein 90 marks aggressive phenotypes of human epidermal growth factor receptor 2 negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012;14(2):R62.
99. Martínez-Aranda A, Hernández V, Moreno F i sur. Predictive and Prognostic Brain Metastases Assessment in Luminal Breast Cancer Patients: FN14 and GRP94 from Diagnosis to Prophylaxis. *Front Oncol* 2017;7:283.
100. Duan X, Iwanowycz S, Ngoi S, Hill M, Zhao Q, Liu B. Molecular chaperone GRP94/GP96 in cancers: Oncogenesis and therapeutic target. *Front Oncol* 2021;11:629846.
101. Santana-Codina N, Muixí L, Foj R i sur. GRP94 promotes brain metastasis by engaging pro-survival autophagy. *Neuro Oncol* 2020;22(5):652-64.
102. Tian T, Han J, Huang J, Li S, Pang H. Hypoxia-Induced Intracellular and Extracellular Heat Shock Protein gp96 Increases Paclitaxel-Resistance and Facilitates Immune Evasion in Breast Cancer. *Front Oncol* 2021;11:784777.
103. Cawthorn TR, Moreno JC, Dharsee M i sur. Proteomic analyses reveal high expression of decorin and endoplasmic reticulum chaperone (HSP90B1) are associated with breast cancer metastasis and decreased survival. *PLoS One* 2012;7(2):e30992.
104. Hou J, Deng M, Li X i sur. Chaperone gp96 mediates ER- α 36 cell membrane expression. *Oncotarget* 2015;6(31):31857-67.

105. Bianchi VE, Bresciani E, Meanti R, Rizzi L, Omeljaniuk RJ, Torsello A. The role of androgens in women's health and wellbeing. *Pharmacol Res* 2021;171:105758.
106. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2015;36(1):3-23.
107. Davey RA, Grossmann M. Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside. *Clin Biochem Rev* 2016;37(1):3-15.
108. Matsumoto T, Shiina H, Kawano H, Sato T, Kato S. Androgen receptor functions in male and female physiology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109(3-5):236-41.
109. Kawano H, Sato T, Yamada T i sur. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9416-21.
110. Yu IC, Lin HY, Liu NC i sur. Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 2008;149(5):2361-8.
111. Fan W, Yanase T, Nomura M i sur. Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes* 2005;54(4):1000-8.
112. Lai JJ, Chang P, Lai KP, Chen L, Chang C. The role of androgen and androgen receptor in skin-related disorders. *Arch Dermatol Res* 2012;304(7):499-510.
113. Hauger RL, Saelzler UG, Pagadala MS, Panizzon MS. The role of testosterone, the androgen receptor, and hypothalamic-pituitary-gonadal axis in depression in ageing men. *Rev Endocr Metab Disord* 2022;23(6):1259-73.
114. Lai JJ, Lai KP, Zeng W i sur. Androgen receptor influences on body defense system via modulation of innate and adaptive immune systems: lessons from conditional AR knockout mice. *Am J Pathol* 2012;181(5):1504-12.
115. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Role of androgens in cardiovascular pathology. *Vasc Health Risk Manag* 2018;14:283-90.
116. Huang CK, Lee SO, Chang E, Pang H, Chang C. Androgen receptor (AR) in cardiovascular diseases. *J Endocrinol* 2016;229(1):R1-R16.
117. Lim JJ, Lima PDA, Salehi R, Lee DR, Tsang BK. Regulation of androgen receptor signaling by ubiquitination during folliculogenesis and its possible dysregulation in polycystic ovarian syndrome. *Sci Rep* 2017;7:10272.
118. Ramadhan RS, Algefari RN, Jarallah AL. Investigating pathogenic SNPs in androgen receptor with direct influence on polycystic ovary syndrome (PCOS) in women. *Egypt J Med Hum Genet* 2022;23:77.
119. Ttyutyusheva N, Mancini I, Baroncelli GI i sur. Complete Androgen Insensitivity Syndrome: From Bench to Bed. *Int J Mol Sci* 2021;22(3):1264.
120. Rahim B, O'Regan R. AR signaling in breast cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(3):21.
121. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, de Gouveia P i sur. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(1):djt319.
122. Collins LC, Cole KS, Marotti JD, Hu R, Schnitt SJ, Tamimi RM. Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 2011;24(7):924-31.

123. Chen M, Yang Y, Xu K, Li L, Huang J, Qiu F. Androgen receptor in breast cancer: from bench to bedside. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:573.
124. Bozovic-Spasojevic I, Zardavas D, Brohée S i sur. The prognostic role of androgen receptor in patients with early-stage breast cancer: a meta-analysis of clinical and gene expression data. *Clin Cancer Res* 2017;23(11):2702-12.
125. Kensler KH, Poole EM, Heng YJ i sur. Androgen receptor expression and breast cancer survival: results from the Nurses' Health Studies. *J Natl Cancer Inst* 2019;111(7):700-8.
126. Kensler KH, Regan MM, Heng YJ i sur. Prognostic and predictive value of androgen receptor expression in postmenopausal women with estrogen receptor-positive breast cancer: results from the Breast International Group Trial 1-98. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):30.
127. Xu M, Yuan Y, Yan P i sur. Prognostic significance of androgen receptor expression in triple negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Breast Cancer* 2020;20(4):e385-e396.
128. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG i sur.; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(2):241-56.
129. Ma X, Yang X, Yang W, Shui R. Prognostic value of extranodal extension in axillary lymph node-positive breast cancer. *Sci Rep* 2021;11:9534.
130. Lester SC, Bose S, Chen YY i sur. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(10):1515-38.
131. Cai Y, Zhaoxiong Y, Zhu W, Wang H. Association between sleep duration, depression and breast cancer in the United States: a national health and nutrition examination survey analysis 2009-2018. *Ann Med* 2024;56(1):2314235.
132. Xiang G, Liu F, Liu J, Meng Q, Li N, Niu Y. Prognostic role of Amphiregulin and the correlation with androgen receptor in invasive breast cancer. *Pathol Res Pract* 2019;215(6):152414.
133. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
134. de Meric de Bellefon M, Lemanski C, Ducteil A i sur. Management of the axilla in the era of breast cancer heterogeneity. *Front Oncol* 2018;8:84.
135. Li Y, Han D, Shen C. Prediction of the axillary lymph-node metastatic burden of breast cancer by 18F-FDG PET/CT-based radiomics. *BMC Cancer* 2024;24:704.
136. Magnoni F, Galimberti V, Corso G, Intra M, Sacchini V, Veronesi P. Axillary surgery in breast cancer: an updated historical perspective. *Semin Oncol* 2020;47(6):341-52.
137. Harrison B. Update on sentinel node pathology in breast cancer. *Semin Diagn Pathol* 2022;39(5):355-66.
138. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB i sur. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11(10):927-33.
139. Julian TB, Anderson SJ, Krag DN i sur. 10-yr follow-up results of NSABP B-32, a randomized phase III clinical trial to compare sentinel node resection (SNR) to conventional axillary dissection (AD) in

- clinically node-negative breast cancer patients [Internet]. *J Clin Oncol*. 2013;31(15_suppl):1000-0. Dostupno na: https://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.1000.
140. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S i sur. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013;14(4):297-305.
 141. Galimberti V, Cole BF, Viale G i sur. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with breast cancer and sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): 10-year follow-up of a randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2018;19(10):1385-93.
 142. Solá M, Alberro JA, Fraile M i sur. Complete axillary lymph node dissection versus clinical follow-up in breast cancer patients with sentinel node micrometastasis: final results from the multicenter clinical trial AATRM 048/13/2000. *Ann Surg Oncol* 2013;20(1):120-7.
 143. Giuliano AE, Ballman KV, McCall L i sur. Effect of Axillary Dissection vs No Axillary Dissection on 10-Year Overall Survival Among Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis: The ACOSOG Z0011 (Alliance) Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;318(10):918-26.
 144. Donker M, van Tienhoven G, Straver ME i sur. Radiotherapy or surgery of the axilla after a positive sentinel node in breast cancer (EORTC 10981–22023 AMAROS): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2014;15(12):1303-10.
 145. Sávolt Á, Péley G, Polgár C i sur. Eight-year follow up result of the OTOASOR trial: The Optimal Treatment Of the Axilla - Surgery Or Radiotherapy after positive sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer: A randomized, single centre, phase III, non-inferiority trial. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(4):672-9.
 146. Huang Z, Wu Z, Zou QQ i sur. Risk factors of non-sentinel lymph node metastasis in breast cancer with 1-2 sentinel lymph node macrometastases underwent total mastectomy: a case-control study. *World J Surg Oncol* 2023;21(1):125.
 147. Choi AH, Blount S, Perez MN i sur. Size of Extranodal Extension on Sentinel Lymph Node Dissection in the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 Trial Era. *JAMA Surg* 2015;150(12):1141-8.
 148. Gooch J, King TA, Eaton A i sur. The extent of extracapsular extension may influence the need for axillary lymph node dissection in patients with T1-T2 breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2014;21(9):2897-903.
 149. Zheng J, Cai S, Song H i sur. Positive non-sentinel axillary lymph nodes in breast cancer with 1-2 sentinel lymph node metastases. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(44):e13015.
 150. Yang X, Ma X, Yang W, Shui R. Clinical significance of extranodal extension in sentinel lymph node positive breast cancer. *Sci Rep* 2020;10(1):14684.
 151. O'Keeffe NA, O'Neill C, Zahere A i sur. A quantitative analysis of tumour characteristics in breast cancer patients with extranodal extension in non-sentinel nodes. *Breast* 2018;38:171-4.
 152. Nottegar A, Veronese N, Senthil M i sur. Extra-nodal extension of sentinel lymph node metastasis is a marker of poor prognosis in breast cancer patients: A systematic review and an exploratory meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2016;42(7):919-25.
 153. Meretoja TJ, Audisio RA, Heikkilä PS i sur. International multicenter tool to predict the risk of four or more tumor-positive axillary lymph nodes in breast cancer patients with sentinel node macrometastases. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138(3):817-27.

154. van la Parra RF, Peer PG, Ernst MF, Bosscha K. Meta-analysis of predictive factors for non-sentinel lymph node metastases in breast cancer patients with a positive SLN. *Eur J Surg Oncol* 2011;37(4):290-9.
155. Aziz S, Wik E, Knutsvik G i sur. Extra-nodal extension is a significant prognostic factor in lymph node positive breast cancer. *PLoS One* 2017;12(2):e0171853.
156. Bucci JA, Kennedy CW, Burn J i sur. Implications of extranodal spread in node positive breast cancer: a review of survival and local recurrence. *Breast* 2001;10(3):213-9.
157. Tang P, Moravek M, Oprea-Ilie G, Mon KS, Pambuccian SE. Extranodal extension, an international survey on its evaluation and reporting in breast cancer patients. *Pathol Res Pract* 2022;237:154070.
158. Ji F, Zhang Y, Zhu ZB i sur. Low levels of glycoprotein 96 indicate a worse prognosis in early-stage hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. *Hum Pathol* 2019;86:193-202.
159. Albakova Z. HSP90 multi-functionality in cancer. *Front Immunol* 2024;15:1436973.
160. Wang T, Yang L, Li C i sur. Comprehensive analysis reveals GRP94 is associated with worse prognosis of breast cancer. *Transl Cancer Res* 2021;10(1):298-309.
161. You CP, Tsoi H, Man EPS, Leung MH, Khoo US. Modulating the Activity of Androgen Receptor for Treating Breast Cancer. *Int J Mol Sci* 2022;23(23):15342.
162. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K i sur. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol* 2008;13(5):431-5.
163. Yu Q, Niu Y, Liu N i sur. Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor. *Ann Oncol* 2011;22(6):1288-94.
164. He L, Du Z, Xiong X i sur. Targeting Androgen Receptor in Treating HER2 Positive Breast Cancer. *Sci Rep* 2017;7(1):14584.
165. Zhang X, Cui H, Hu N i sur. Correlation of androgen receptor with ultrasound, clinicopathological features and clinical outcomes in breast cancer. *Insights Imaging* 2023;14(1):46.
166. Kim HY, Kim YM, Hong S. CK2 α -mediated phosphorylation of GRP94 facilitates the metastatic cascade in triple-negative breast cancer. *Cell Death Discov* 2024;10:185.
167. Lee JS, Roh MS, Lee HW i sur. Prognostic significance of glucose-related protein 94 in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2020;216(7):153013.
168. Jahan N, Jones C, Rahman RL. Androgen receptor expression in breast cancer: Implications on prognosis and treatment, a brief review. *Mol Cell Endocrinol* 2021;531:111324.
169. Si P, Zhang P, Chen T i sur. Positive nonsentinel lymph nodes are associated with poor survival in breast cancer: results from a retrospective study. *Clin Transl Oncol* 2019;21(8):1085-92.
170. Jackson EB, Gondara L, Speers C i sur. Does age affect outcome with breast cancer? *Breast* 2023;70:25-31.
171. Corsi F, Albasini S, Ciciriello S i sur. Extensive Intraductal Component in Breast Cancer: What Role in Disease-Free Survival? *J Surg Res* 2023;283:233-40.
172. Imamura H, Haga S, Shimizu T i sur. Relationship between the morphological and biological characteristics of intraductal components accompanying invasive ductal breast carcinoma and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62(3):177-84.

173. Yiu CC, Loo WT, Lam CK, Chow LW. Presence of extensive intraductal component in patients undergoing breast conservative surgery predicts presence of residual disease in subsequent completion mastectomy. *Chin Med J (Engl)* 2009;122(8):900-5.
174. Polchai N, Thongvitokomarn S. Extensive intraductal component as a factor determining local recurrence of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gland Surg* 2023;12(10):1336-47.
175. Ha SM, Cha JH, Shin HJ, Chae EY, Choi WJ, Kim HH. Mammography, US, and MRI to Assess Outcomes of Invasive Breast Cancer with Extensive Intraductal Component: A Matched Cohort Study. *Radiology* 2019;292(2):299-308.
176. Panoff JE, Hurley J, Takita C i sur. Risk of locoregional recurrence by receptor status in breast cancer patients receiving modern systemic therapy and post-mastectomy radiation. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128(3):899-906.

ILUSTRACIJE

POPIS SLIKA

Slika 1. Dobno standardizirana stopa incidencije karcinoma dojke na 100.000 žena u različitim dijelovima svijeta.

Slika 2. Incidencija luminalnog (ER-pozitivan/HER2-negativan), HER2-obogaćenog i trostruko negativnog (ER-negativan/HER2-negativan) karcinoma dojke prema dobnim skupinama na 100.000 žena.

Slika 3. Histološki gradus invazivnog karcinoma dojke procijenjen Nottinghamskom metodom.

Slika 4. Limfoscintigrafija limfnog čvora čuvara s ^{99m}Tc -nanokoloidom.

Slika 5. A) Shematski prikaz funkcionalnih domena glikoproteina 96 (GP96): N-terminalna domena (NTD), nabijena povezna regija (CR), srednja domena (MD) i C-terminalna domena (CTD). B) Shematski prikaz strukture GP96.

Slika 6. Funkcionalne domene androgenog receptora: N-terminalna domena (NTD), DNA-vezujuća domena (DBD), povezna regija (H) i ligand-vezujuća domena (LBD).

Slika 7. Tkivne mikroareje karcinoma dojke, bojenje hematoksilin-eozinom.

Slika 8. Reprezentativne slike tkivnih mikroareja obojenih imunohistokemijskom metodom s protutijelima na glikoprotein 96 (GP96).

Slika 9. Reprezentativne slike tkivnih mikroareja obojenih imunohistokemijskom metodom s protutijelima na androgene receptore (AR).

Slika 10. Histološki preparat zdravog žljezdanog tkiva dojke.

Slika 11. Grafički prikaz i usporedba razine ekspresije GP96 izražene kao histoskor ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke.

Slika 12. Grafički prikaz ekspresije androgenih receptora ovisno o surogatu molekularnog podtipa.

Slika 13. Raspodjela koekspresije GP96 i AR-a ovisno o surogatu molekularnog podtipa karcinoma dojke.

Slika 14. Grafički prikaz pojave i orijentacije ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru (ENE u LČČ) ovisno o statusu limfnih čvorova nečuvara (nSLN).

Slika 15. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za ukupno preživljenje i preživljenje bez recidiva bolesti prema ekspresiji glikoproteina 96 (GP96) i androgenih receptora (AR) te prisutnosti ektranodalne ekstenzije u limfnom čvoru čuvaru (ENE u LČČ).

Slika 16. Grafički prikaz relativnog izražaja gena metodom RT-qPCR za GP96 (n=12) u tumorskom tkivu i normalnom žljezdanom tkivu dojke.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Patološka klasifikacija karcinoma dojke (pTNM)

Tablica 2. Surogati molekularnih podtipova karcinoma dojke prema preporukama konferencije iz St. Gallena iz 2013. godine

Tablica 3. Program reakcije korištene za kvantifikaciju ekspresije gena GP96

Tablica 4. Kliničko-patološke karakteristike pacijentica

Tablica 5. Ekspresija GP96 ovisno o ER, PR i AR statusu

Tablica 6. Povezanost kliničko-patoloških karakteristika i ekspresije GP96 i AR-a

Tablica 7. Kliničko-patološke karakteristike pacijentica ovisno o statusu nSLN

Tablica 8. Rezultati univarijatne i multivarijatne logističke regresije kliničko-patoloških karakteristika i statusa nSLN

Tablica 9. Univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza rizika za ukupno preživljenje

Tablica 10. Univarijatna i multivarijatna Coxova regresijska analiza rizika za preživljenje bez povrata bolesti

POPIS POKRATA

AJCC – Američko zajedničko povjerenstvo za rak (engl. American Joint Committee on Cancer)

aLČ – aksilarni limfni čvorovi

AR – androgeni receptori

ARKO – isključenje androgenih receptora (engl. androgen receptor knockout)

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

ATP – adenzin trifosfat

BRCA – gen za rak dojke (engl. breast cancer gene)

BTC – betacelulin

CAP – Udruženje američkih patologa (engl. College of American Pathologists)

cDNK – komplementarna DNK

CK2 α – kazein kinaza 2 α

CR – povezna regija

CTD – C-terminalna domena

CTLA-4 – citotoksični T-limfocitni antigen 4 (engl. cytotoxic T lymphocyte antigen 4)

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DCIS – duktalni karcinom in situ

DBD – DNK-vezujuća domena

DHEA – dehidroepiandrosteron

DHEAS – dehidroepiandrosteron sulfat

DHT – 5 α -dihidrottestosteron

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EGF – epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor)

EIC – ekstenzivna intraduktalna komponenta

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

ENE – proboj tumora kroz čahuru limfnog čvora (engl. extranodal extension)

ER – estrogenski receptori

FC – fold promjena (engl. fold-change)

GP96 – glikoprotein 96

GRP94 – glukozom regulirani protein 94

HER2 – humani epidermalni čimbenik rasta 2

H-E – hematoksilin-eozin

HS – histoskor (engl. histoscore)

HSP – proteini toplinskog šoka (engl. heat shock proteins)

IARC – Internacionalna agencija za istraživanje raka (engl. International Agency for Research on Cancer)

ICI – inhibitori kontrolnih točaka (engl. immune checkpoint inhibitors)

IGF – inzulinu sličan faktor rasta (engl. insulin like growth factor)

IHC – imunohistokemijski

ISH – in situ hibridizacija

ITC – izolirane tumorske stanice (engl. isolated tumour cells)

ITM – indeks tjelesne mase

LBD – ligand-vezujuća domena

LČČ – limfni čvor čuvar

LNR – omjer broja pozitivnih i izvađenih limfnih čvorova (eng. lymph node ratio)

LCIS – lobularni karcinom in situ

LODDS – logaritam omjera pozitivnih i negativnih limfnih čvorova (engl. log odds of positive lymph nodes)

LVI – limfovaskularna invazija

NCCN – Nacionalna sveobuhvatna mreža za rak (engl. National Comprehensive Cancer Network)

NLN – negativni limfni čvorovi

nSLN – limfni čvorovi nečuvani (engl. non-sentinel lymph nodes)

NST – invazivni karcinom ne specijalni tip (engl. no special type)

NTD – N-terminalna domena

MD – srednja domena (engl. middle domain)

mLNR – modificirani LNR

PBS – fosfatni pufer

PD-1 – antigen programirane stanične smrti 1 (engl. programmed cell death-1)

PD-L1 – ligand programirane stanične smrti 1 (engl. programmed death-ligand-1)

PLN – pozitivni limfni čvorovi

PR – progesteronski receptori

RNK – ribonukleinska kiselina

ROC – ROC krivulja (engl. Receiver Operating Characteristic Curves)

RT-qPCR – metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

SEER – Surveillance, Epidemiology, and End Results

SISH – hibridizacija in situ srebrom

sLNR – omjer broja pozitivnih LČČ i broja kirurško odstranjenih LČČ (engl. sentinel lymph node ratio)

TGF- α – transformirajući faktor rasta- α

TLR – Toll-like receptori

TMA – tkivne mikroareje

UICC – Međunarodna unija protiv raka (engl. Union for International Cancer Control)

ŽIVOTOPIS

OSOBNNE INFORMACIJE

Ime i prezime: Tihana Klarica Gembić

Ustanova: Klinički zavod za nuklearnu medicinu, Klinički bolnički centar Rijeka

E-mail: tihana.klarica.gembic@kbc-rijeka.hr

Datum rođenja: 17.10.1983.

Državljanstvo: hrvatsko

RADNO ISKUSTVO

Datum: 13.4.2021. – trenutno

Ustanova zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik specijalist nuklearne medicine

Datum: 12.3.2024.-13.3.2025.

Ustanova zaposlenja: Thalassotherapia Opatija, Specijalna bolnica za medicinsku rehabilitaciju bolesti srca, pluća i reumatizma, Ul. Maršala Tita 188, 51410 Opatija, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik specijalist nuklearne medicine

Datum: 1.9.2014. – 13.4.2021.

Ustanova zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik specijalizant nuklearne medicine

Datum: 1.11.2011.-31.8.2014.

Ustanova zaposlenja: Zavod za hitnu medicinu Primorsko-goranske županije, Franje Čandeka 6/A, 51 000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik u hitnoj medicinskoj pomoći

Datum: 10.11.2008.-10.4.2011.

Ustanova zaposlenja: Klinički bolnički centar Rijeka, Krešimirova 42, 51 000 Rijeka, Hrvatska

Radno mjesto: liječnik pripravnik

OBRAZOVANJE

Datum: ak.god. 2020./2021.-2025./2026.

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska

Studij: Doktorska škola iz znanstvenog područja biomedicina i zdravstvo

Studijski program: Klinička medicina

Datum: 2017./2018.

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Studij: Sveučilišni specijalistički studij Nuklearna medicina

Datum: 2002.-2008.

Ustanova: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće Branchetta 20, 51 000 Rijeka, Hrvatska

Studij: Medicina

Titula: doktor medicine

Datum: 1998.-2002.

Ustanova: Prva sušačka hrvatska gimnazija, Gajeva 1, 51 000 Rijeka, Hrvatska

Smjer: prirodoslovno-matematički

USAVRŠAVANJA

AD-LEARN mini-course for Residents: How to Start Reading Brain Scans in Neurocognitive Disorders, 19.-20.5.2025., Beč

Dopunska izobrazba i obnova znanja za izložene radnike: Otvoreni radioaktivni izvori u nuklearnoj medicini, 2020.

ESMIT Autumn School Cardiovascular Track (Basic and Advanced) - 20.-22.9.2019., Zagreb

Advanced Life Support (ALS) – 28.-30.06.2019., Rijeka

Poslijediplomski tečaj "Ultrazvuk vratnih organa", KBC Zagreb, 2015.

Advanced Life Support (ALS) – 14.-16.6.2013., Koprivnica

Dopunska izobrazba o zaštiti od ionizirajućeg zračenja, Rijeka, 2014.

ZNANSTVENI PROJEKTI

Doktorand na projektu: „Glikoprotein 96 i androgen receptori kao novi prognostički i prediktivni čimbenici karcinoma dojke“. Projekt Sveučilišta u Rijeci; šifra projekta: uniri-iz-25-45; nositelj: izv.prof.prim.dr.sc. Damir Grebić, dr.med.

SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA

1. 2nd Biomedicine and Health PhD Students Congress “Science and Us”, 2024. – poster prezentacija
2. Međunarodni kongres Hrvatskog društva za nuklearnu medicinu, 2024. – usmena prezentacija i 4 poster prezentacije

3. 15th Congress of the Croatian Society for Medical Oncology with International Participation, Split, 2023. (2 poster prezentacije)
4. 7th International Conference Ljubljana – Graz – Rijeka, Sustainability in Research/Science and Doctoral Education, Rijeka, 2023. (poster prezentacija)

PUBLIKACIJE

1. Klarica Gembić T, Grebić D, Gulić T, Golemac M, Avirović M. Predictive and Prognostic Values of Glycoprotein 96, Androgen Receptors, and Extranodal Extension in Sentinel Lymph Node-Positive Breast Cancer: An Immunohistochemical Retrospective Study. *J Clin Med*. 2024 Dec 16;13(24):7665.
2. Klarica Gembić T, Grebić D, Gulić T, Kustić D. The role of glycoprotein 96 in breast cancer. *Medicina Fluminensis*. 2024;60(1):94-98.
3. Gašparini D, Raljević D, Pehar-Pejčinović V, Klarica Gembić T, Peršić V, Turk Wensveen T. When amiodarone-induced thyroiditis meets cardiomyopathy with excessive trabeculation: a case report. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Jul 21;10:1212965.
4. Maršić M, Klarica Gembić T, Giroto N, Pribanić I, Bogović Crnčić T, Grbac-Ivanković S. Hibridna jednofotonska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija (SPECT/CT) somatostatinskih receptora u dijagnostici neuroendokrinih tumora. *Medicina Fluminensis*. 2021;57(1):73-80.
5. Grebić D, Pirjavec A, Kustić D, Klarica Gembić T. Surgical treatment for breast cancer and axillary metastases: historical perspective. *Acta Med Hist Adriat*. 2021 Jun 17;19(1):125-36.
6. Klarica Gembić T, Grbac-Ivanković S, Štimac D. Dijagnostičko značenje metoda nuklearne medicine u gastroenterologiji. *Acta Med Croatica*. 2020;74(3):237-44.
7. Kustić D, Klarica Gembić T, Grebić D, Petretić Majnarić S, Nekić J. The role of different lymph node staging systems in predicting prognosis and determining indications for postmastectomy radiotherapy in patients with T1-T2pN1 breast carcinoma. *Strahlenther Onkol*. 2020 Nov;196(11):1044-1054.
8. Klarica Gembić T, Kustić D, Vukšić J, Huić D. Can inflammatory markers and clinical indices serve as useful referral criteria for leukocyte scan in patients with inflammatory bowel disease? *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2020;23(1):15-20.

ČLANSTVO U STRUČNIM/ZNANSTVENIM DRUŠTVIMA:

1. Hrvatska liječnička komora (od 2007.)
2. Hrvatsko društvo za nuklearnu medicinu (od 2014.)