

-УНИВЕРЗИТЕТ „СВЕТИ КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ –СКОПЈЕ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ



Докторска дисертација

**ЕКСПРЕСИЈА НА РЕЦЕПТОРИТЕ ЕР, ПР и ХЕР-2 КАЈ ПРИМАРЕН
КАРЦИНОМ НА ДОЈКА И КАЈ МЕТАСТАЗИ НА ЛИМФНИТЕ АКСИЛАРНИ
ЈАЗЛИ**

докторанд

Д-р Арљинда Јакупи

ментор

Проф. д-р Добрила Тосовска Лазарова

Скопје 2020 година

БЛАГОДАРНОСТ

Неизмерна благодарност и должам на мојата менторка Проф.д-р Добрила Тосовска Лазарова за нејзините корисни совети и поддршка во текот на оваа студија. Нејзината личност секогаш ќе биде инспирација за мене.

Исто така благодарам на Проф. д-р Гордана Петрушевска за нејзините предлози и стручната помош.

Благодарна сум на Проф.д-р Љумтурије Гаши Љуци за нејзината поддршка за време на мојот професионален и научен развој.

Од срце благодарам на моето семејство, за постојаната финансиска и морална поддршка.

СОДРЖИНА

ABSTRACT	7
1. ВОВЕД.....	9
1.1 Епидемиологија.....	9
1.2 Етиологија	10
1.3 Патофизиологија.....	12
1.4 Локализација	13
1.5 Мултицентричност на туморот	14
1.6 Билатералност на туморот	15
1.7 Ширење и метастази	15
1.8 Клинички карактеристики.....	16
1.9 Степен на диференцијација на инвазивниот карцином	16
1.10 Дуктален инвазивен карцином (неспецифициран).....	18
1.11 Имунохистохемијата во менаџирањето на карциномот на дојката (ИХХ)	24
2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА.....	32
3. ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА	33
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	34
4.1 Примероци на ткиво.....	34
4.2 Процедури и методи	34
4.3 Микроскопска евалуација	36
5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	38
6. РЕЗУЛТАТИ.....	39
7. ДИСКУСИЈА.....	77
8. ЗАКЛУЧОЦИ И ПРЕПОРАКИ.....	90
9. ЛИТЕРАТУРА.....	93

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

ADN - Deoxyribonucleic acid
AJCC - American Joint Commission on Cancer
ASCO - American Society of Clinical Oncology
BCT - Breast Conserving Treatment
BRCA1 - breast cancer type 1 susceptibility protein
BRCA2 - breast cancer type 2 susceptibility protein
Ca - Carcinom
CAP - College of American Pathologists
CISH - Chromogenic In situ Hybridization
DCIS - Ductal Carcinoma In Situ
ER - Estrogen Receptor
FISH - Fluorescent In situ Hybridization
H&E - Hematoxylin & Eosin
Her-2/neu - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IHC - Immunohistochemistry
Ki-67 - Antigen Ki-67
LCIS - Lobular Carcinoma in Situ
NCCN- National Comprehensive Cancer Network
NOS - Not otherwise specified
NPI - Nottingham Prognostic Index
NST - Non specific type
P53 - Protein 53
PR - Progesterone Receptor
pTNM - Pathological TNM(T-tumor, N-nodes, M-
metastasis)
TDLU - Terminal duct lobular unit
WHO - World Health Organization

Абстракт

Вовед: Карциномот на дојка се опишува како хетерогена променлива болест, како од клинички така и од патолошкиот аспект, но исто така и одговорот на терапијата и прогнозата се различни. Традиционалните биомаркери како што се Естроген (ЕР) и Прогестерон (ПР) не се само клинички прогностички фактори, туку исто така имат сигнификантна улога во селектирање на пациенти кои би имале бенифит од ендокрина терапија. Неодамна и Хер-2/неу е рапортиран за да биде не само прогностички фактор, туку и како одговорен индикатор во терапијата која е насочена кон Хер-2/неу. Ки-67 е биомаркер на клеточната пролиферација што е рапортиран за да биде не само прогностички фактор, туку и како еден важен маркер за апликација на адјувантна терапија. Важен одлучувачки фактор за терапевтската стратегија, е присуството на метастази, особено во регионалните лимфни јазли. Денес, особено важно е да се испита молекуларниот профил на метастази, бидејќи некои податоци укажуваат на нестабилност на рецепторите на туморските клетки во текот на метастатскиот процес.

Цел : Да се проучат хормонските рецептори (ЕР и ПР), Хер-2/неу и Ки-67 со имунохистохемијска метода кај инвазивниот рак на дојка, да се евалуира нивната врска со степенот на диференцијација на туморот и да се спореди експресијата на ЕР, ПР, Хер-2/неу и Ки-67 помеѓу примарниот тумор и метастатскиот тумор во аксиларните лимфни јазли.

Дизајн : Испитувањето е ретроспективно-проспективно.

Материјал и методи: Во истражувањето беа вклучени 64 испитанички, пациентки со инвазивен рак на дојка и со метастази во аксиларните лимфни јазли. Субјектите кои беа вклучени во истражувањето, беа подложни на радикална мастектомија и аксиларна дисекција. Сите пациенти кои беа избрани во студијата, не беа подложени на претходна терапија. Испитувањето беше одобрено од Комитетот за Етика на Медицинскиот Факултет на Универзитетската Клиника во Косово. Имунохистохемијата на мануален начин беше применета како метод, која се реализира на парафински блокови и примероци на нови пациентки. Имунохистохемијата за ЕР, ПР, Хер-2/неу и Ки-67 рецепторите беше изведена според препорачаните протоколи на производителот. (En vision+, DAKO Denmark).

Резултати: Повеќето тумори беа со градус 2 (64%), а остатокот од туморите (26%) вклучени во студијата беа градус 3. Нашите резултати покажуваат дека постои значителна корелација помеѓу експресијата на ER рецепторот и степенот на диференцијација на примарниот тумор, додека експресијата на ER рецепторот кај метастази на аксиларните лимфни јазли не покажаа сигнификантност со степенот на диференцијација на туморот. Врската помеѓу PR експресијата кај примарниот тумор со степенот на диференцијација на туморот не е прикажано сигнификантно, притоа умерено и лошо диференцираните тумори имаат слична експресија на PR во метастазираните лимфни аксиларни јазли. Експресијата на Хер-2/неу не покажа значителна разлика споредено со степенот на диференцијација на примарниот тумор и кај лимфните аксиларни јазли. Индексот на пролиферација мерена преку Ки-67 кај примарниот карцином на дојка и степенот на диференцијација на туморот покажа статистичка сигнификантност. Позитивна статистичка сигнификантност беше пронајдено помеѓу експресијата на Ки-67 и степенот на диференцијација на туморот кај аксиларните лимфни метастази. Степенот на совпаѓање за ER рецепторот помеѓу примарниот тумор и аксиларните метастази беше 70.3%, за PR рецепторот беше 64.1%, за Хер-2/неу маркерот беше 75%, и степенот на совпаѓање за Ки-67 експресијата во нашата студија беше 73.4%.

Заклучок : Во примарниот тумор експресијата на ER и PR се гледа со висока фреквенција кај градус 2 на туморот во споредба со прекумерна експресијата на Хер-2 /неу, каде што градус 2 и 3 на туморот беа подеднакво вклучени со по 50%. Хер-2/неу експресијата во примарните тумори и метастатските лимфни јазли се намалува со зголемување на експресијата на естрогенските и прогестеронските рецептори, и обратното. Ки-67 рецепторот во примарниот тумор е директно поврзана со степенот на диференцијација на туморот. Има правилно совпаѓање во експресијата на ER и PR рецепторот помеѓу примарниот карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли. Почестата експресија на Хер-2/неу прото-онкогенот во метастатските аксиларни лимфни јазли во однос на примарниот тумор и статистички се потврди како сигнификантна. Постои правилно совпаѓање во степенот на пролиферација на Ки-67 помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли.

Клучни зборови : естроген, прогестерон, Хер-2/неу, Ки-67, рецептор, карцином.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is described as heterogenic, changing, disease, from clinical and pathological point of view, as well as from different responses to treatment and prognosis. Traditional biomarkers as Estrogen receptors (ER) and Progesteron receptors (PR) are not only clinical prognostic factors, but they have also significant role in selection of patients who would benefit from endocrine treatment. Lately, HER2/neu has been reported not only as prognostic factor, but as well as responsible indicator for treatment targeting this receptor. Ki-67 is cell proliferation biomarker which has been reported not only as prognostic factor, but also as important marker for application of adjuvant treatment. Important factor for determination of treatment strategy is presence of metastasis, especially in regional lymph nodes. These days it is important to examine the molecular profile of metastasis, noticing that a number of data are showing instability of receptors in tumor cells during the metastatic process.

Aim: To review hormonal receptors (ER and PR), Her2/neu and Ki-67 with immunohistochemical methods at invasive breast cancer, to evaluate its relation with stage of tumor differentiation and to determine expression of ER, PR, Her-2/neu and Ki-67 between primary tumor and its metastasis in axillary lymph nodes.

Design: This is retrospective-prospective study.

Materials and methods: There were 64 subjects includes in the study, patients with invasive breast cancer and with metastasis in axillary lymph nodes. Subjects included in the study have undergone radical mastectomy and axillary dissection. None of patients selected for the study have undergone prior treatment. The study has been approved by the Ethical Committee of University and Clinical Centre of Kosovo. Immunohistochemistry has been implemented manually, which was conducted with paraffin blocs and samples from new patients. Immunohistochemistry for ER, PR, Her2/neu and Ki-67 receptors has been conducted based on producer's instructions (En vision+, DAKO Denmark).

Results: Majority of tumors were of grade 2 (64%), and the rest of tumors (26%) included in the study were of the grade 3. Our results showed that there is significant correlation between ER expression and grade of primary tumor differentiation, while ER expression in axillary lymph nodes didn't show significance with grade of tumor differentiation. Correlation between PR of primary tumor with grade of tumor differentiation was not shown to be significant, while moderate and low differentiated tumors had similar expression with of PR in metastatic axillary lymph nodes. Expression of Her2/neu did not show significant difference between grade of primary tumor differentiation and with axillary lymph nodes. Index of proliferation measured between Ki-67 from primary breast cancer and grade of tumor differentiation showed statistical significance. Positive statistical significance were found between Ki-67 marker and grade of tumor differentiation in axillary lymph nodes. The degree of matching of ER between primary tumor and axillary metastasis was 70.3%, for PR was 64.1%, for Her2/neu marker was 75% and degree of matching for Ki-67 expression in our study was 73.4%.

Conclusion: In the primary tumor ER and PR overexpression is seen at high frequency at grade 2 tumor compared to Her2/neu overexpression where tumor grade 2 and 3 are seen equally with 50%. Her2/neu expression in primary tumors and metastatic lymph nodes decreases with increasing expression of estrogenic and progesterone receptors and vice versa. The Ki-67 receptor in primary tumor is directly related to the degree tumor differentiation. There is direct concordance in expression of ER and PR between primary breast cancer and metastasis in axillary lymph nodes. Frequent expression of Her2/neu proto-oncogene in metastatic axillary lymph nodes in relation to the primary tumor has been confirmed as statistically significant. There is direct concordance in frequency of Ki-67 proliferation between primary invasive ductal carcinoma and metastasis in axillary lymph nodes.

Key words: estrogen, progesterone, Her-2/neu, Ki-67, receptor, carcinoma.

1. ВОВЕД

1.1 Епидемиологија

Најновите статистички податоци покажуваат дека бројот на нови случаи со рак брзо се зголемува и до 2030 година се очекува ова зголемување да достигне до 22 милиони годишно, при што повеќето случаи на рак се во земјите со ниски или средни приходи. (1, 2, 3) Од сите видови на рак, ракот на дојката е најчеста малигна болест кај жените во светски рамки. (4) Секоја година се дијагностицираат околу 1.67 милиони нови случаи на рак на дојка. При тоа, ракот на дојката е рангиран како втора причина на смртност по ракот на белите дробови. (5)

Се проценува дека во текот на 2018 година околу 627.000 жени починале од рак на дојка, што значи дека околу 15% од сите смртни случаи предизвикани од рак, припаѓаат на рак на дојка. Иако стапката на рак на дојка е поголема кај жените во поразвиените региони, стапките се во пораст во било кој друг регион на глобално ниво. (6)

Стапката на инциденца на рак на дојка се движи од 19,6 на 100.000 во Источна Африка до 89,7 на 100.000 во Западна Европа. (7) Треба да се напомене дека и покрај фактот што стапката на инциденца се зголемува во повеќето земји, стапката на смртност се зголемува само во земјите со ниски и средни приходи. Околу 70% од смртните случаи се појавуваат во земјите со ниски-средни приходи. (3) На глобално ниво, стапката на преживување на рак на дојка се разликува во голема мера. Во земјите со високи приходи, над 80% од случаите преживуваат до 5 години, додека во земјите со ниски приходи е под 40%. (8) И покрај големиот напредок во скринингот, раното откривање и адјувантен третман, кои се одговорни за намалување на смртноста, има многу нови случаи кои се регистрирани во земјите со ниски и средни приходи, каде што стапката на смртност од рак на дојка се зголемува. (9)

Меѓу шеесте региони на СЗО, највисоката стапка на инциденца за рак на дојка е регистрирана во Америчкиот континентот, според Пан-американската здравствена организација (PAZO), а најниската инциденца од 27,8%, е во регионот на Југоисточна Азија - SEARO. Меѓу различните држави, највисоката стапка на инциденца има Белгија,

Данска, Бахами, Холандија, додека најниска е во Монголија и Лесото. Според континентите, највисоката стапка на инциденца е во Северна Америка и Западна Европа, додека најниска стапка на инциденца е во Средна Африка и Источна Азија. Петте земји со највисока статистичка стапка на смртност (на 100.000) се Фиџи (28.4), Бахами (26.3), Нигерија (25.9), Македонија (25.6%) и Пакистан (25.2). (5)

1.2 Етиологија

Откривањето на факторите кои се поврзани со зголемен ризик за рак на дојка се важни во вкупниот скрининг на здравјето кај жените. (10, 11)

Факторите на ризик за појава на рак на дојка може да се поделат на неколку категории:

1.2.1 Возраст: Инциденцата на рак на дојка се зголемува со возраста на жената. Според проценките, во САД веројатноста дека жената ќе развие рак на дојка за време на животот е 1 од 8 жени, односно 1 од 202 од 0-39 години, 1 од 26 на возраст 40-59 години и 1 од 28 години на возраст 60-69 години. (12)

1.2.2 Пол : Појавата на рак на дојка е почеста кај жените.

1.2.3 Лична историја на рак на дојка: Историјата на рак во едната дојка, ја зголемува веројатноста од појава на рак во контралатералната дојка . Всушност, кај преживеаните од рак на дојката е честа појавата на контралатерален метакронски карцином. (13)

1.2.4 Хистолошки фактори на ризик: Некои хистолошки абнормалности кои се дијагностицирани преку биопсии претставуваат фактори на ризик за рак на дојка. Овие абнормалности вклучуваат лобуларен карцином *in situ* (LCIS) и пролиферативни атипични промени. Жените кои имаат атипични промени, ќе имаат приближно 4,3 пати поголем ризик за развој на рак на дојка во споредба со општата популација. (14, 15)

1.2.5 Фамилијарна историја на рак на дојка и генетски фактори на ризик: Роднините од прв ред (мајка, сестри) на пациенти со карцином на дојка имаат двојно до 4 пати

поголем ризик за развој на болеста. (16) Пет до 10% на ракот на дојката се должат на генетски фактори. Но, кај жени помлади од 30 години тие може да сочинуваат до 25% од случаите. БРЦА-1 и БРЦА -2 се двата најважни одговорни гени кои го зголемуваат ризикот од рак на дојка.

Ризикот од развој на рак на дојка во текот на животот се движи од 65% -81% за БРЦА-1 носители на мутации, како и 45% -85% за БРЦА-2 носители на мутации. (17-19)

1.2.6 Репродуктивни фактори на ризик: Се смета дека изложеноста на естроген во текот на животот на жените го зголемува ризикот од рак на дојка. Тие вклучуваат : Почетокот на менарха пред 13-та година од животот. Жените кои имале рана менарха (≤ 13 години) покажале речиси двојно поголем ризик од појава на тумори кои се позитивни во однос на хормонските рецептори. (20) Одолжувањето на менарха за две години е поврзано со намалување на ризикот од 10%. (21)

1.2.7 Нулипаричност и возраст на прво раѓање: Жените со нулипаритет имаат зголемен ризик за развој на рак на дојка, во споредба со жените кои веќе родиле. Младата возраст по првото породување има заштитна улога, додека првото породување кај повозрасните претставува повисок, релативен ризик, во споредба со жените неродилки. Во споредба со нулипарни жени, кумулативната инциденца на рак на дојка кај жени родилки за првпат на возраст од 20, 25 и 35 години била 20% пониска, 10% пониска и 5% повисока. (22)

1.2.8 Менопауза по 55-годишна возраст: Одложениот почеток на менопаузата е поврзан со зголемен ризик за рак на дојка. Секоја година од задоцнување на менопаузата доведува до зголемување на ризикот за 3% и на секои пет години од доцнењето, се променува на 17% зголемен ризик за рак на дојка. (21, 23)

1.2.9 Доењето и нивото на тестостерон: Податоците покажуваат дека доењето има заштитна улога во развојот на рак на дојка. Доењето може да го одолжи враќањето на редовните циклуси на овулација и да го намали нивото на ендогениот полов хормон. Се смета дека за 4% може да се намали ризикот од рак на дојка за секоја година на доење.

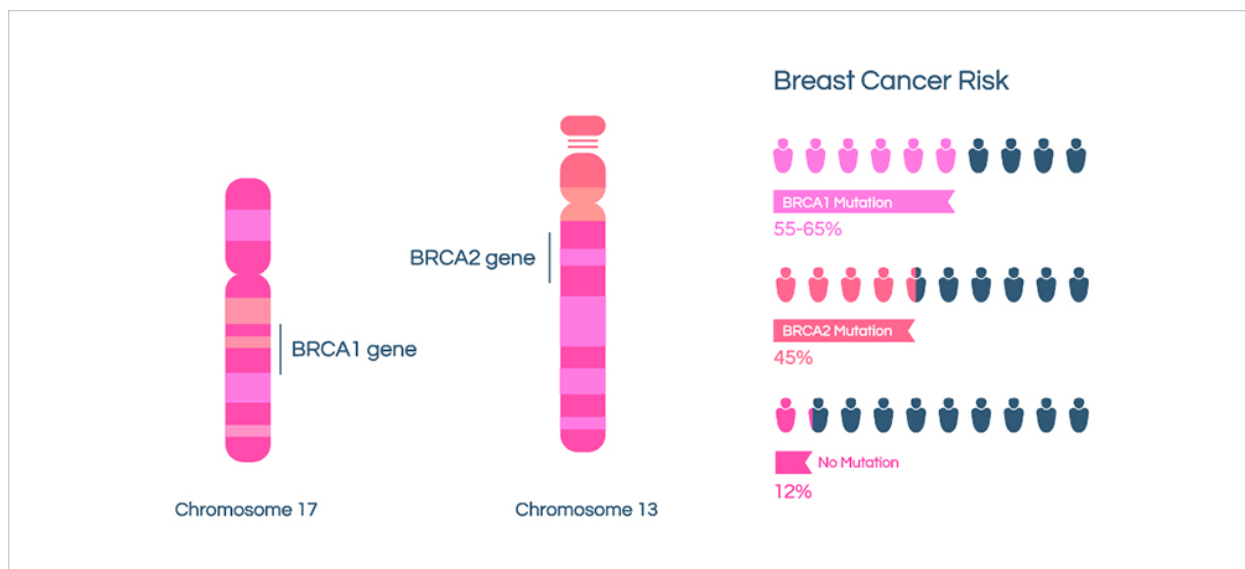
Од друга страна, високиот ендеген хормон го зголемува ризикот од рак на дојка кај жените во предменопауза и во постменопауза. Високите нивоа на тестостерон во циркулацијата кај жените во постменопауза се поврзани со зголемен ризик за развој на рак на дојка. (24, 25)

1.2.10 Користење на егзогени хормони: Естрогенот и Прогестеронот се користат како терапија или суплемент, кои се земаат при различни состојби, од кои две почести се : контрацепција кај жени во предменопауза, како и заменска хормонска терапија кај жените во постменопауза. (26, 27)

1.2.11 Факторите поврзани со животниот стил(начин), како што се зголемената употреба на алкохол, дебелината и физичката неактивност може да имаат влијание врз зголемувањето на ризикот од развој за рак на дојка. (26, 28, 29)

1.3 Патофизиологија

Ракот на дојката се развива поради оштетување на ДНК и генетски мутации кои можат да бидат под влијание од изложување на естроген. Понекогаш тоа може да биде наследено од дефекти на ДНК и генетски мутации, кои можат да бидат под влијание како последица на изложување на естроген. Понекогаш, ДНК-дефектите или про-канцерогените гени може да се наследат, како на пример БРЦА-1 и БРЦА-2 (Слика 1). Поради оваа причина семејната историјата на рак на јајниците или дојките го зголемува ризикот од развој на рак на дојка. Кај нормалните лица, имунолошкиот систем ги напаѓа клетките со абнормална ДНК или абнормален раст.



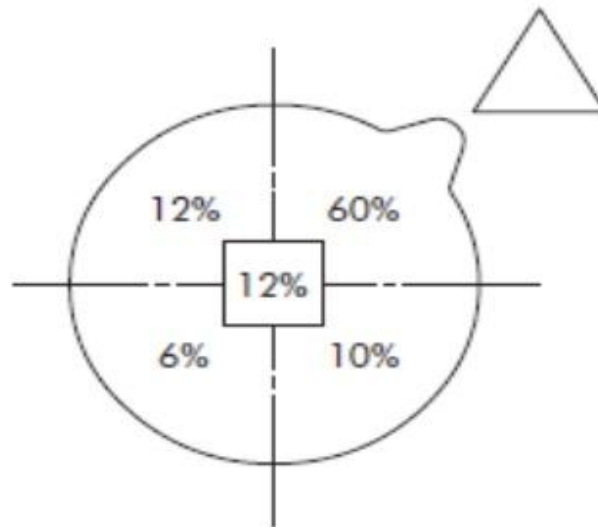
Слика 1. All areas of the BRCA1/2 gene, which is the representative cause of hereditary breast cancer, are analyzed to diagnose a person's risk of breast cancer. Mutations in the BRCA 1/2 gene greatly increase the risk of breast cancer https://www.macrogen.com/en/business/diagnosis_service1.php

1.4 Локализација

Ракот на дојка се развива од мамарниот епител и најчесто од епителната клетка на терминалната единица на лобуларниот дуктус. Во инвазивниот рак на дојка постои најчеста лесна поголема фреквенција во левата дојка, односно односот лево-десно е околу 1.07 со 1. Околу 40% до 60% од туморите се појавуваат во горниот надворешен квадрант на дојката. (30) Околу 12% се појавуваат во горниот внатрешен квадрант, околу 10% во долниот надворешен квадрант, 6% во долниот внатрешен квадрант, 12% во централниот регион (1цм во внатрешноста на ареола) и 3% се дифузни (масивни, мултофокални) (Слика 2). (31)

Слика 2.

The relationship of carcinoma of breast to the quadrants of the breast



1.5 Мултицентричност на туморот

Мултицентричност е дефинирано како присуство на карцином во повеќе од еден квадрант. Авторот Fisher и сор., во својот труд го детектира ова својства кај 121 пациенти од вкупно 904 случаи со карцимон на дојка. (32)

Мултицентричност е почеста кај лобуларниот карцином отколку кај тој дукталниот тип.

Теоретски, мултицентричниот карцином на дојка може да резултира од ширење на единствената интермамарната лезија или од некој независен настан. (33,34)

Унифокалните карциноми и тие мултицентрични се слични во однос на фреквенцијата при вклучување на регионалните лимфни јазли, кога се разгледува вкупниот волумен.(35)

Неодамнешната студија покажа дека мултицентричните тумори се поврзани со пониска стапка на преживување во споредба со унифокалните тумори од истиот тумор земајќи го предвид вкупниот волумен. (36)

1.6 Билатералност на туморот

Веројатноста дека пациентот со инвазивен карцином на дојка може да развива карцином и во контралатералната дојка е пет пати повеќе во споредба со општата популација, но повисок е ризикот ако има семејна историја на карцином на дојка. (37, 38, 39)

Употреба на адјувантна хемотерапија значително го намалува ризикот од контралатерален карцином на дојка. (40)

Биопсијата во случаи со билатерален тумор треба да биде ограничена, и да се направи само во случаи кога постои сомневање за абнормалност врз основа на клинички или мамографски податоци, или кај тие случаи со карцином за кои се знае дека имаат висока билатерална инциденца. (41)

Инвазивните синхрони билатерални карциноми имаат високо совпаѓање на хистолошките карактеристики, вклучувајќи и присуството на *in situ* компонента, карактеристика која е повеќе поврзана со независна природа отколку со метастатичката природа на туморот.(42)

1.7 Ширење и метастази

Карциномите на дојка се шират преку директна инвазија, преку лимфните садови и крвните садови. (43)

Некои од метастазите се присутни во моментот на дијагностицирање, додека другите се манифестираат клинички по неколку месеци, години или децении по почетната терапија.(44)

1.8 Клинички карактеристики

Повеќето жени со рак на дојка манифестираат симптоми, иако што со помош на скрининг програмите асимптоматските случаи може да се откријат преку мамографија. Ракот на дојката нема симптоми и посебни знаци, што ќе овозможат да се разликуваат различните форми на бенигни заболувања на дојката. Најчестиот наод кај жени со симптоми е палпација на маса, која може да биде со болка или без болка. Абнормалностите на брадавицата (ареола на дојка) (екскреција, ретракција, дисторозија и егзема) се ретки. Појавата на некои знаци за кои постои сомневање дека се малигни, бараат хоспитализација за детални прегледи. Абнормалностите на дојката треба да се оценат од страна на тројна егзаминација, која вклучува клинички преглед, обработка на мамографија и ултразвук, како и земање на примерок за биопсија или цитолошки преглед. Клиничкото испитување треба да биде систематско и да ја има во предвид природата на палпирна маса во случај на присуство и секоја појава на кожата или промена во обликот на градите и евалуација на аксилата.

1.9 Степен на диференцијација на инвазивниот карцином

Степенот на диференцијација на инвазивните дуктални карциноми како и другите инвазивни тумори се одредува врз основа на проценка на формирање на тубули, нуклеарен полиморфизам и митотични броеви. Многу студии покажуваат значајни врски помеѓу хистолошкиот степен и нивното преживување во случаи на инвазивен карцином на дојка. Степенот на диференцијација преставува моќен прогностички фактор и затоа треба да преставува главна компонента при хистолошкото испитување на рак на дојка. (45, 46) Евалуацијата на хистолошкиот степен стана пообјективна, со модификации на методот на Патли и Скар, кое е прво направено од Блум и Ричардсон, а подоцна од Елстон и Елис. (47, 48, 49, 50). **За одредување на степенот на диференцијација** се проценуваат три карактеристики на туморот : формирање на тубули, нуклеарен полиморфизам и митотичен број. Системот за нумеричко означување од 1 до 3 се користи за да се осигура дека секој фактор се оценува поединечно. Кога се проценуваат тубулите и грандуларниот ацинус, се

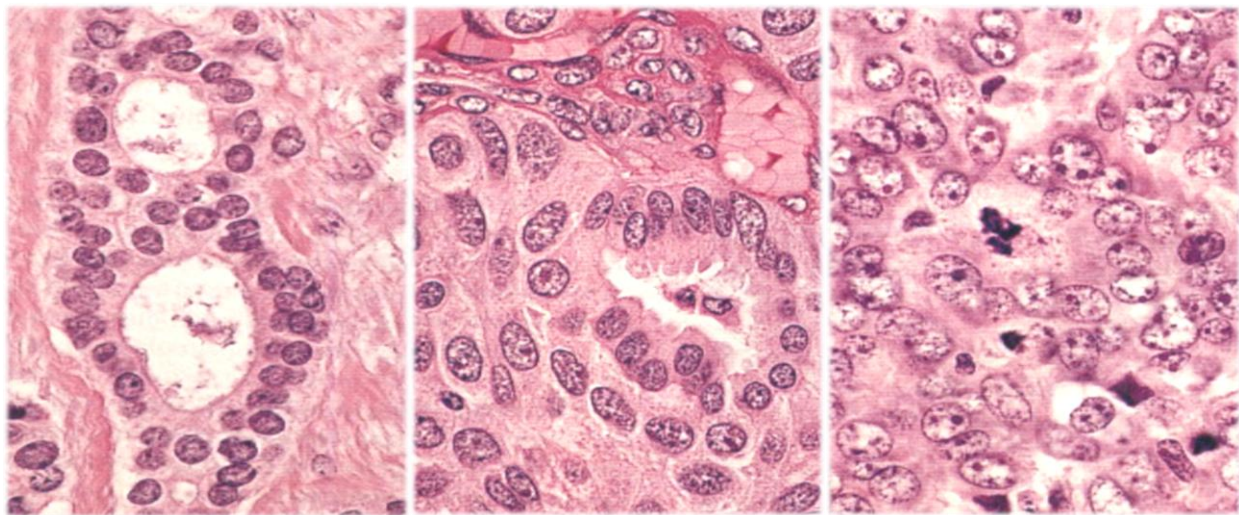
бројат само структурите кои се прикажуваат како просветлени, централни, јасни "лумени"; cut-off броевите (точките) 75% и 10% од glandулните простори, се користат за да се утврди степенот на малигнитет.

Нуклеарниот полиморфизам се проценува врз основа на регулирање на нуклеарната големина и обликот на епителните клетки во ткивото на дојката и околу неа. Зголемената нерегуларност на рабовите на јадрото, како и бројот и големината на нуклеусите се корисни податоци за одредување на степенот на полиморфизам. Евалуацијата на митотичните броеви бара внимание и набљудувачите треба да ги бројат само добро дефинираните митотични фигури, додека хиперхромните и пикнотичните јадра треба да се игнорираат, бидејќи најчесто можат да претставуваат апоптоза, а не полиморфизам. Митотичкото броење бара стандардизација со фиксно поле или со користење на "мрежа" систем. (51) Се чита вкупниот број на митози во поле со зголемување од 10 пати. Ако има присуство на хетерогеност треба да се избераат региони кои изразуваат повисока фреквенција на митоза. Треба да се евалуираат само полињата кои соодветно го претставуваат туморот. Сите три елементи се собираат заедно за да се добие вредност (степенот) од 3 до 9, преку кој се определува степенот на туморот на следниов начин:

Градус 1 - добро диференцирани : собраната вредност 3-5 поени

Градус 2 - умерено диференцирани : собраната вредност 6-7 поени

Градус 3 - слабо диференцирани : собраната вредност 8-9 поени (Слика 3)



Слика 3. Grades I, II and III of Invasive ductal breast cancer

1.10 Дуктален инвазивен карцином (неспецифициран)

Инвазивниот дуктален карцином, ја сочинува најголемата група на инвазивен рак на дојка. Тоа е хетерогена туморска група која не покажува доволно карактеристики за да се класифицира како специфичен хистолошки вид, како што е лобуларниот или тубуларниот карцином. Инвазивен дуктален карцином е неспецифичниот тип (ductal NST) или инфилтративен дуктален карцином. Многу називи се користат за оваа форма на рак на дојка, вклучувајќи “scirrhous carcinoma”, “carcinoma simplex” и “spheroidal cell carcinoma”. Терминот инвазивен дуктален карцином се користи од страна на Институтот за патологија на Вооружените Сили и е номенклатура усвоена во претходна класификацијата на СЗО. (52,53,54,55) Таа се придржува на традиционалниот концепт дека овие тумори потекнуваат од дуктален епител на дојката за разлика од лобуларен карцином кој се чини дека потекнува од лобулите за кои нема докази. Како прилог е прикажано дека терминаланата единица на лобуларен дуктус [terminal duct-lobular unit (TDLU)] се зема како место на потекло на мнозинството на карциноми на дојката. (56, 57) Некои групи го задржале поимот дуктални, но, се додава изразот “неспецифицирани” [‘not otherwise specified (NOS)], со цел да се нагласи разликата од типот специфични тумори. (58, 59, 60, 61) Овој последен израз се прифаќа повеќе на меѓународно ниво, бидејќи поимот “дуктален” се користи во поголема мера. Поимите инвазивен дуктален карцином, дуктален неодреден или неспецифични тип се преферирани терминологишки опции.

1.10.1 Епидемиологија

Инвазивните дуктални карциноми и сите други форми на рак на дојка ретко се појават на возраст под 40 години. (62) Карциноми кои се развиени како последица на дијагностицирана состојба, како атипична дуктална хиперплазија и лобуларна неоплазија, кои се поврзани со зголемен ризик, вклучуваат висок процент на тумори на специфичен тип и тоа класичен лобуларен карцином и тубуларен. (63) Семејни случаи на рак на дојка кои се поврзани со мутации на БРЦА-1, обично се од типот инвазивен дуктален, но имаат слични карактеристики со медуларен карцином, поради појавата на високиот митотичен

број, зголемен процент на раст на туморот поради континуираната екстензија на маргините, со повеќе лимфоцитна инфилтрација, во споредба со спорадични случаи на рак. (64) Ракот поврзан со БРЦА-2 мутација, исто така често е од дуктален инвазивен тип и се појавува со висок степен на диференциација, со намелен број на тубули и со поголем дел од периметарот на туморот со континуирано проширување на маргините и се со помал митотичен број во споредба со спорадични карциноми. (64)

1.10.2 Макроскопски карактеристики на карциномот на дојката

Карциномот на дојката се карактеризира со големи варијации во големината на туморот, кои се движат од <10 mm до над 100 mm. Тие може да имаат неправилна, свездеста или нодуларна конфигурација. Рабовите на туморот се слабо или умерено дефинирани и немаат остра дефиниција. Класично, неспецифицираните дуктални карциноми се фиксирани и тврди на палпација и може да дадат субјективно чувство на "гранулираност". На пресек површината е обично сиво-бела со жолти линии.

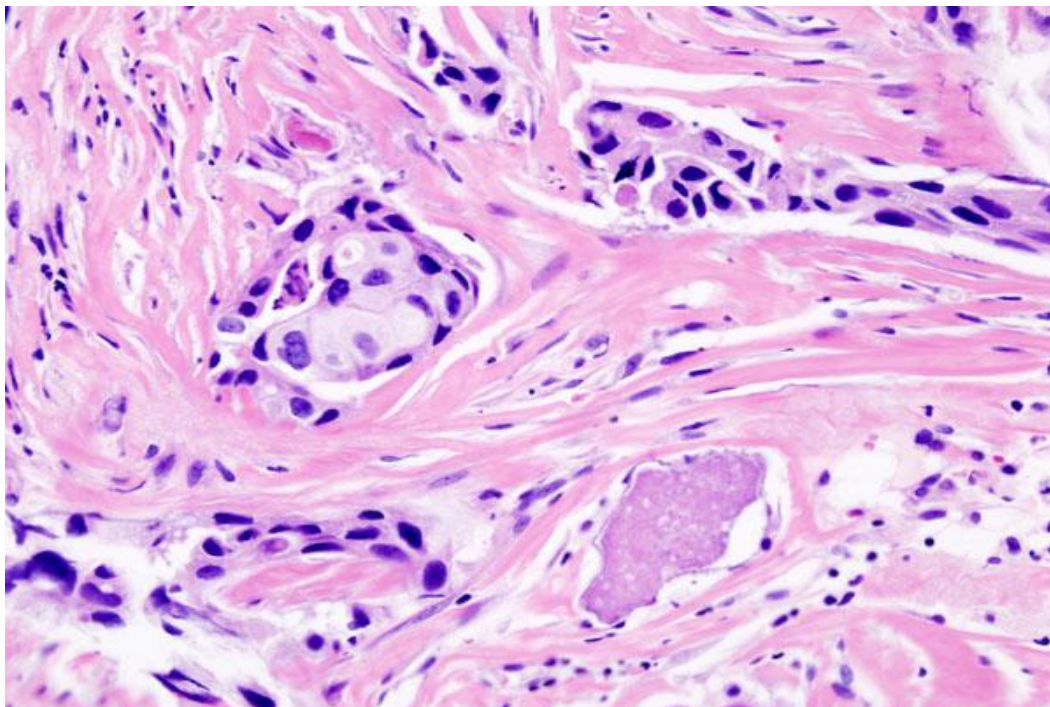


Слика 4. Typical macroscopic (gross) appearance of the cut surface of a mastectomy specimen containing an **invasive ductal carcinoma** of the breast (pale area at the center).

By Emmanuelm (talk) (Uploads) - Own work, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=82786040>

1.10.3 Хистопатолошки карактеристики на карциномот на дојката

Хистоморфолошките карактеристики значително се варијабилни од случај до случај. Често постои недостаток на правилото во однос на структурите поврзани со специфичниот тип на тумори. Од архитектонска гледна точка туморските клетки може да бидат подредени во форма на синцири, купови и трабекули, додека некои тумори се карактеризираат со доминација на цврсти, солидни или инфилтративни синцицијални форми, со малку строма меѓусебно поврзани. Во некои случаи може да биде изразена glandularна диференцијација како тубуларни структури со централно просветлување (*lumina*) во група на туморските клетки. Понекогаш се гледаат само како подрачја со единечна инфилтрација или таргетни својства, но кај нив недостасуваат цитоморфолошките својства на инвазивниот лобуларен карцином. Карциномните клетки, исто така, може да имаат варијабилен изглед. Цитоплазмата често е зголемена и еозинофилна. Јадрото може да биде уредно, униформно или многу полиморфно со проминентни нуклеолуси, а и често мултиплицирано, додека митотската активност може да биде отсутна или додадена. До 80% од случаите може да бидат присутни фокуси поврзани со дуктален карцином *in situ* (DCIS). (56, 65) DCIS е често поврзан со висок степен на тип на *comedo*, но може да се видат и сите други форми. Некои автори опишуваат еден подтип на дукталниот карцином НОС, инфилтративен дуктален карцином со екстензивна компонента *in situ*. Стромалната компонента е исклучително варијабилна. Може да има висока фибробластична пролиферација, ретки елементи на сврзното ткиво или нагласена хијалинизација. Еластичниот фокус може исто така да биде присутен во перидуктална или перивенозна дистрибуција. Фокалната некроза може да биде присутна и понекогаш е многу екстензивна. Во неколкуте случаи може да се идентификува специфична лимфоцитска инфилтрација.



Слика 5. Typical macroscopic (gross) appearance of the cut surface of a mastectomy specimen containing an **invasive ductal carcinoma** of the breast (pale area at the center).

By Emmanuelm (talk) (Uploads) - Own work, CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=82786040>

1.10.4 Локален раст и инвазија

Локалниот раст и инвазија може да се појави во паренхимот на дојка, ареолата, на кожата, на фасцијата, на пекторалниот мускул или на други структури на торакалниот ѕид.

Инвазија на стромата на дојка може да се појави преку интрамамарните лимфни садови и преку простори на ткивото наречени како „стромална псеудоангиоматозна хиперплазија“.(66)

Локалната инвазија е многу повисока кај лобуларниот инвазивен карцином и неговите варијанти, отколку кај другите видови на карциноми на дојка, и очигледно на ова му помага надостатокот на E-catherin во клетките на туморот. (67)

1.10.5 Локален рецидив по мастектомија

Локалниот рецидив се појавува како површински нодул, внатре или близу до линијата од хирушка ресекција, или се појавува како поткожен парастернален нодул. Нивната малигна природа мора секогаш да биде документирана, бидејќи жените со локален рецидив имаат зголемен ризик за далечни метастази. (68)

Овие локални рецидиви треба да претстават делумно независен настан, затоа што се јавуваат во различни периоди. (69)

1.10.6 Метастази на аксиларни лимфни јазли

Две локации на лимфните јазли кои се најпогодени во метастатскиот карцином на дојка се аксиларните лимфни јазли и лимфните јазли во внатрешната мамарна регија со делот од супраклавикуларниот регион.

Метастазите во аксиларни лимфни јазли се присутни кај 40-50% од случаите кои се клинички детектирани и се делат на нивоа во зависност од топографскиот однос на минорен пекторален мускул, и тоа како: ниско ниво (проксимал), среден и високо ниво (дистал).

Внимателната дисекција и испитување на лимфните јазли од страна на патологот е со многу големо значење.

Вклучувањето на супраклавикуларните јазли е присутен кај 20% од случаите кај оние пациенти кои имаат позитивни аксиларни лимфни јазли, но со 0% кај тие случаи кои се со негативни аксиларни лимфи јазли. (70)

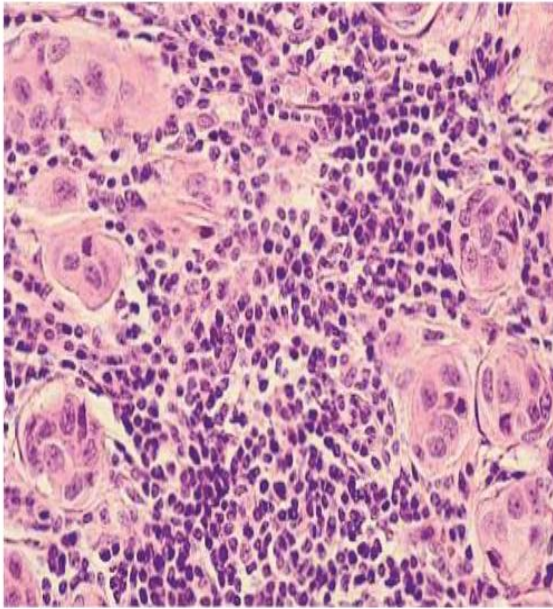
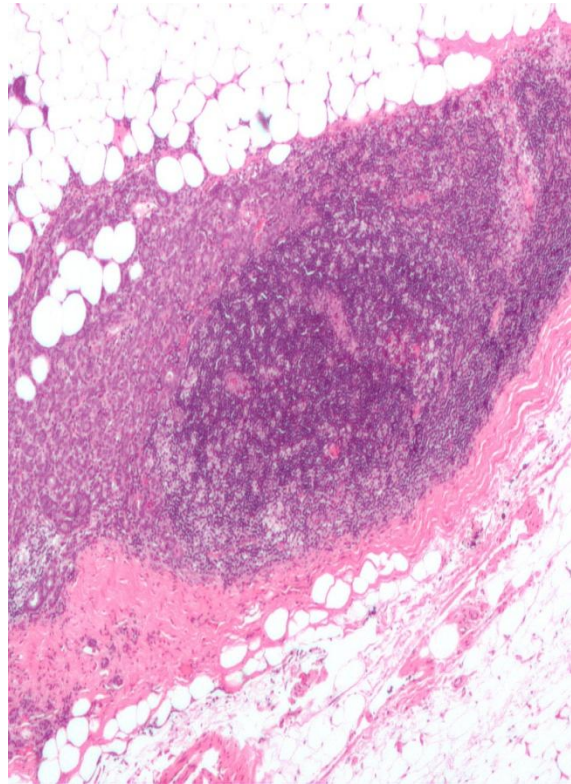


Figure 6 Sentinel lymph node metastasis: Breast duct carcinoma (Courtesy: Research gate).



Слика 6. Micrograph showing a lymph node invaded by ductal breast carcinoma and with extranodal extension of tumour.

The dark purple (center) is lymphocytes (part of a normal lymph node). Surrounding the lymphocytes and extending into the surrounding fat (top of image) is ductal breast carcinoma. H&E stain.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Breast_carcinoma_in_a_lymph_node.jpg

1.10.7 Далечни метастази

Далечните метастази најчесто се забележуваат во скелетниот систем, белите дробови и плеврит, црниот дроб, јажниците, надбубрежните жлезди и кај централниот нервен систем. (71, 72, 73)

Начинот на метастатското ширење на карцином на дојка спрема Fisher и сор., не покажува некоја редовна шема на ширење на туморот. Тој исто така дошол до заклучок дека регионалните лимфни јазли не се ефикасни во спречувањето на ширење на туморот, и дека кога јазлите се позитивни се индикатори за повеќе од едно специјално место за туморот, отколку да бидат (стимуланси) двигатели на далечни метастази. (74)

1.11 Имунохистохемијата во менаџирањето на карциномот на дојката (ИХХ)

Имунохистохемиската анализа претставува метода на користење на моноклонални и поликлонални антитела за детектирање на специфичните антигени во секциите на ткива, што претставува еден силен инструмент во рамките на патолошката дијагноза.

Оваа метода преку антитела овозможува детекција на антигени во внатрешноста на ткиво или клетката. ИХХ-та метода се користи пошироко за дијагноза на карциноми, бидејќи специфичните антигени кај туморот се со прекумерна експресија за определени карциноми. ИХХ-та метода се применува на биопсичен материјал, на процесирани пресеци од микротом, кои потоа подлежат на инкубација со адекватните антитела.

Принципот на имунохистохемијата е локализација на антигенот во секциите на ткивата со помош на маркираните антитела со специфични реагенси, преку реакцијата антиген/антитело, за да се визуализира на светлосен микроскоп или флуоресцентен микроскоп. Од друга страна антителата се гликопротеини кои се произведуваат од плазма клетки и се употребуваат од имуниот систем за идентификација и неутрализирање на странските трупци. (75) ИХХ-та метода била етаблирана уште од 1930 година, но дури во 1941 година беше објавена првата студија. (76) Coons и неговите колеги употребија fluorescein-isothiocyanate (FITC)- антитела етикетирано со флуоресцентна боја за да го локализираат антигенот на пнеумококот во инфицираните ткива. Со унапредување на технологијата кај ИХХ методите се ставени во употреба ензимите како: пероксидаза (77,78) и алкална фосфатаза (79). Исто така и колоидално злато е користено за идентификација на имунохистохемиските реакции (80), на електронски микроскоп.

Целта на ИХХ-та метода е да се изврши имунохистохемиските боења, предизвикување што помалку оштетување на ткивата и клетките, користејќи што е можно помалку количина на антитела за да ја пронајдеме патеката за типизација на туморот или туморалните маркери.

Од оваа причина ИХХ-та метода стана суштинска техника и се употребува кај голем број од медицинските лаборатории како за клиничка дијагностика така и за истражување. (81,82,83,84, 85, 86)

Имунохистохемиските методи се користат според генералниот протокол за имунохистохемија. Тие минуваат низ неколку фази:

Фаза 1 а) фиксација на ткиво

б) секција

в) рехидратација

Фаза 2 а) демаскирање на антигенот

б) инхибиција на ендогена пероксидаза на ткиво

в) блокирање на неспецифични локации

Фаза 3 а) селектирање врз основа на видот на примерокот примарно антители, степен на сензибилитет (чувствителност) и потребното време на постапката на боене.

1.12 Прогностички индикатори

1.12.1 Големина на тумор

Големината на туморот претставува максимален дијаметар на туморот, и е еден од важните прогностички фактори, каде што многу автори велат дека фреквенцијата на регионалните лимфни метастази е повисока а преживувањето е пониска кај туморот со поголем дијаметар. Пациентите со градус 2 на туморот и со позитивен нодален статус имаат подобра прогноза отколку пациентите со градус 3 и со негативен нодален статус (90, 91, 92, 93)

1.12.2 Степен на диференцијација на туморот

Хистолошкиот градус претставува степенот на диференцијација на туморот, базирано на три карактеристики како што се проценка на формирање на тубули, нуклеарен плеоморфизам и бројот на митози. Многу студии имат демонстрирано значајна поврзаност помеѓу хистолошкиот градус и преживување кај карцином на дојка.

Ова сега се препознава како силен прогностички фактор и треба да биде вклучен како составен компонент, за време на хистопатолошките извештаи кај карцином на дојка.

Методите за оценување станаа објективни според модифицираниот систем на авторите Patley и Scarff, но во последно време се користи методот според авторите Ellston и Elis, секогаш базирано на трите карактеристики на туморот споменати погоре. (6, 7)

1.12.3 Лимфоваскуларна инвазија

Лимфните метастази содржат серија на последователи процеси како што се: лимфоангиогенеза поврзано со тумор, лимфоваскуларна инвазија, имплантација на клетките на ракот во регионалните лимфни јазли, пролиферација на микрометастази во оддалечени органи.

Лимфоваскуларната инвазија, инфилтрација на туморалните клетки во лимфните садови, претставува карактеристика на голема инвазија со клетките на ракот на дојка. (94)

Лимфните садови порано се сметаа како пасивни учесници кај метастазите на туморот и повеќе се сметале како канали за транспорт на туморните клетки. Денес се чини дека лимфните садови обезбедуваат безбедни патишта за проширење на туморните клетки, поради прекината структура на базалната мембрана на лимфните садови и високата концентрација на хијалуронска киселина.

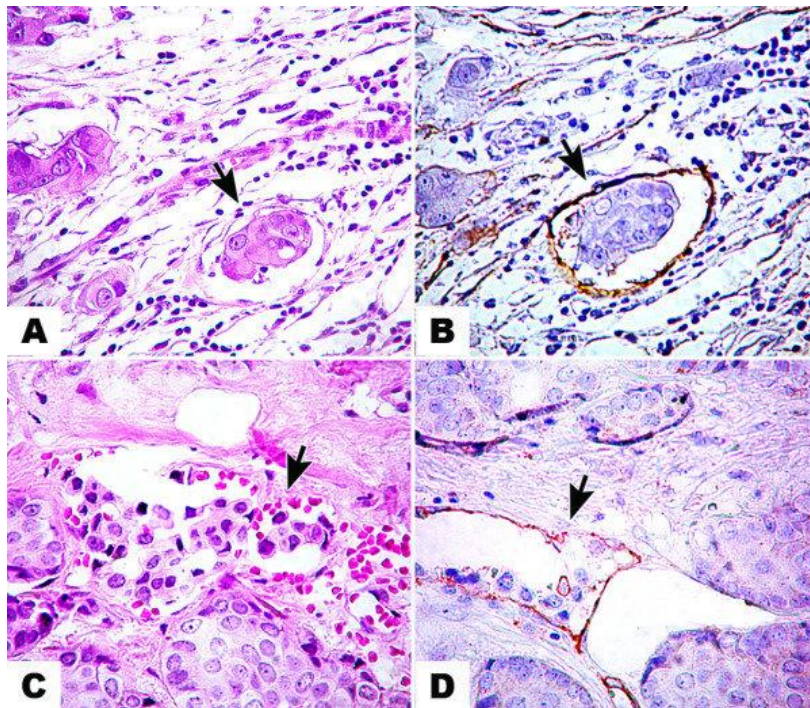
Покрај другите прогностички фактори потребно е да се земат предвид и други фактори како што се лимфоваскуларна инвазија, за да се утврди индивидуален ризик ка пациентите со карцином на дојка. (95) Клетките на туморот се присутни во васкуларните простории (лимфни или капилари), кај половина од инвазивни карциноми. Овој наод е силно корелиран со присуство на метастази во аксиларните лимфни јазли и е фактор на лоша прогноза на општо проживување кај жените со метастази во лимфните јазли и фактор на ризик за локално повторување на карцином. (96)

Хистолошки прогностички фактори како што е лимфната инвазија, може да биде од особено значење за пациенти со негативни јазли, затоа според Канадските упатства лимфната инвазија треба да се земе како важен прогностички фактор при адјувантен третман кај карцином на дојка со негативни јазли (97)

Големина на туморот како и инвазија на садови се подобри прогностички фактори за преживување кај стадиумот 1 на карцином на дојка. Многу други автори ги направиле истите судии во случаи со карцином на дојка со негативни јазли кои што се поврзани со општо преживување. (98, 99-106) Во студијата на Rosen и сор., прогнозата на пациенти со T1N0 и со инвазија на лимфните садови беше полошо во споредба со тие пациенти со

стадиумот T1N1, и затоа сугерираат дека овие пациенти треба да примат адјувантна системска терапија.(AST). (100)

Бројот на лимфните садови е поголем во перитуморалната строма отколку кај интратуморалната.(107,108,109) Присуството на метастази во аксиларните лимфни јазли обично е поврзано со перитуморална лимфна инвазија а не со интратуморалната инвазија. (110,111,112)



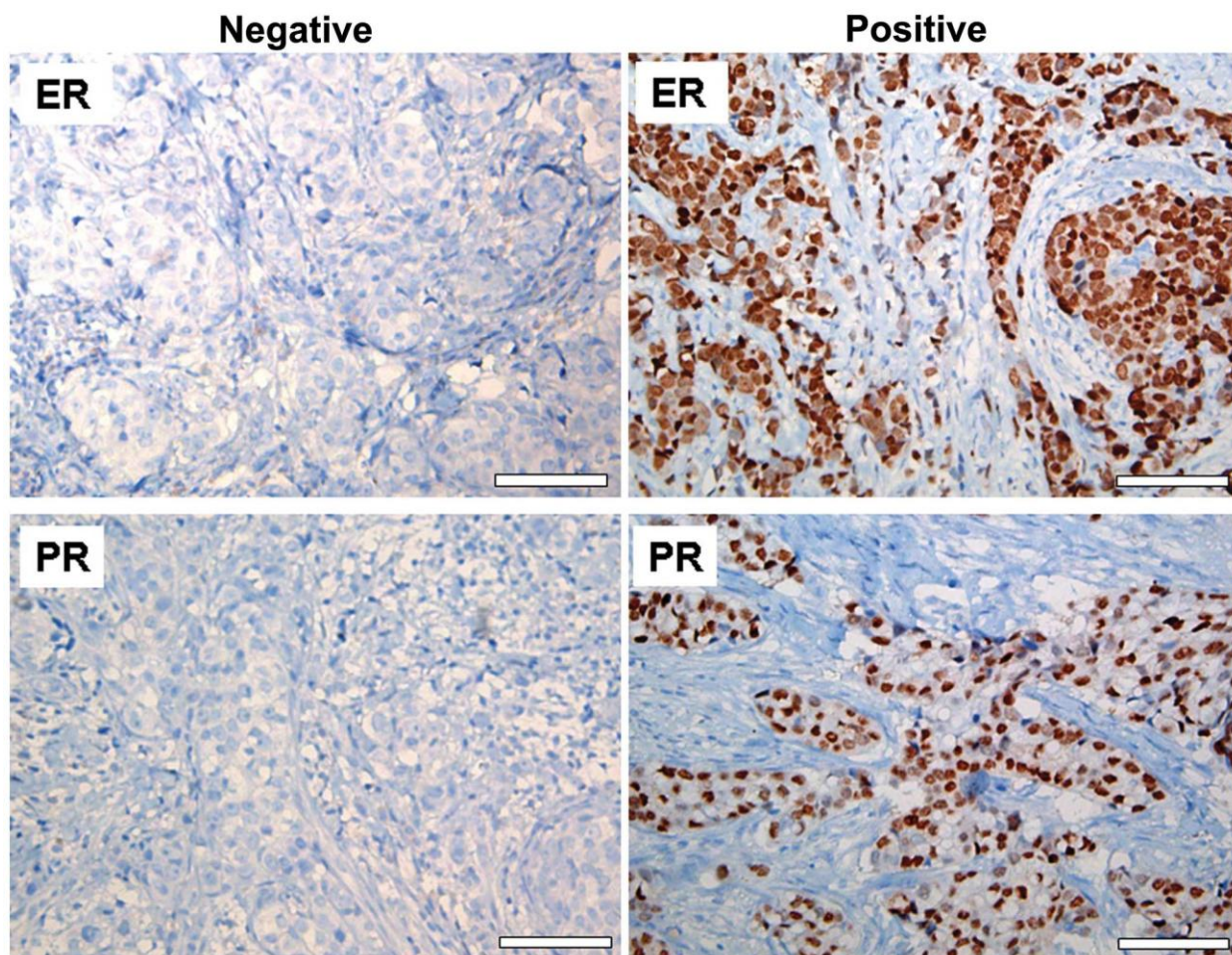
Слика 7. Lymphatic and blood vascular invasion in invasive breast cancer in H&E and immunostained slides. Lymphatic vascular invasion (arrow) seen in H&E (A) and D2-40 (B) stained sections of breast tumors from the same case; $\times 400$; Blood vessel invasion (arrow) seen in H&E (C) and CD31 (D) stained sections; $\times 400$.

Marinho, V.F., Metze, K., Sanches, F.S. *et al.* Lymph vascular invasion in invasive mammary carcinomas identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 is associated with other indicators of poor prognosis. *BMC Cancer* **8**, 64 (2008) doi:10.1186/1471-2407-8-64

1.12.4 Хормоналните Рецептори

1.12.4.1 Статус на естроген и прогестерон рецептори

Естроген рецептор (ЕР) и Прогестерон рецептор (ПР) преставуваат прогностички слаби фактори за пациентите со рак на дојка, но овие рецептори се најсилните предиктивни фактори за одговор на ендокрината терапија. ЕР и ПР-тестирање треба да се изведува кај сите видови на инвазивен карцином на дојка (113). ЕР и ПР рецепторите се оценуваат со методот на имунохистохемија (ИХХ) на парафински пресеци. ИХХ-та метода овозможува евалуација на експресијата, специфично како на инвазивен тип на рак, така и кај карцином *in situ*. Позитивната интерпретација на ЕР и ПР бара најмалку 1% од туморските клетки да покажат позитивно нуклеарно обојување со било кој интензитет (114). Границата од 1% е одредена бидејќи и позитивните ЕР и ПР со 1%, можат да имаат корист кај хормонската терапија. Околу 70% од рак на дојка се ЕР-позитивни, а 60% -65% од ракот на дојка се ПР позитивни. Студиите покажуваат дека туморите ЕР позитивни и ПР негативни имаат полоша прогноза во однос со тие што се ЕР позитивни и ПР позитивни (115, 116) Проценувањето според степенот на Allred се врши имајќи го во предвид процентот на позитивни клетки (означени од 0 до 5) и интензитетот на боење (означени од 0 до 3), а потоа овие две вредности се собираат за да се добие вкупната нумеричка вредност од 0 до 8 (117). Вредноста 0-2 е оценета како негативна, а 3-8 како позитивна. Експресијата на ЕР и ПР рецепторот е во обратна корелација со степенот на диференцијација на туморот, индекс на пролиферација, прекумерната експресија на Хер-2/неу, и со p53 (118,119)



Слика 8. - Immunohistochemical analysis of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) expression levels in breast cancer tissues. Using a limit of >10% nuclear staining to define positive ER and PR status, 64 patients were determined as ER-positive and 60 patients as PR-positive. Scale bar, 150 μm . (Li, X., Gao, S., Wang, P., Zhou, X., Li, Y., Yu, Y., Yan, Y., Zhang, H., Lv, C., Zhou, H., Xie, S. "Reduced expression levels of let-7c in human breast cancer patients". *Oncology Letters* 9, no. 3 (2015): 1207-1212. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2877>)

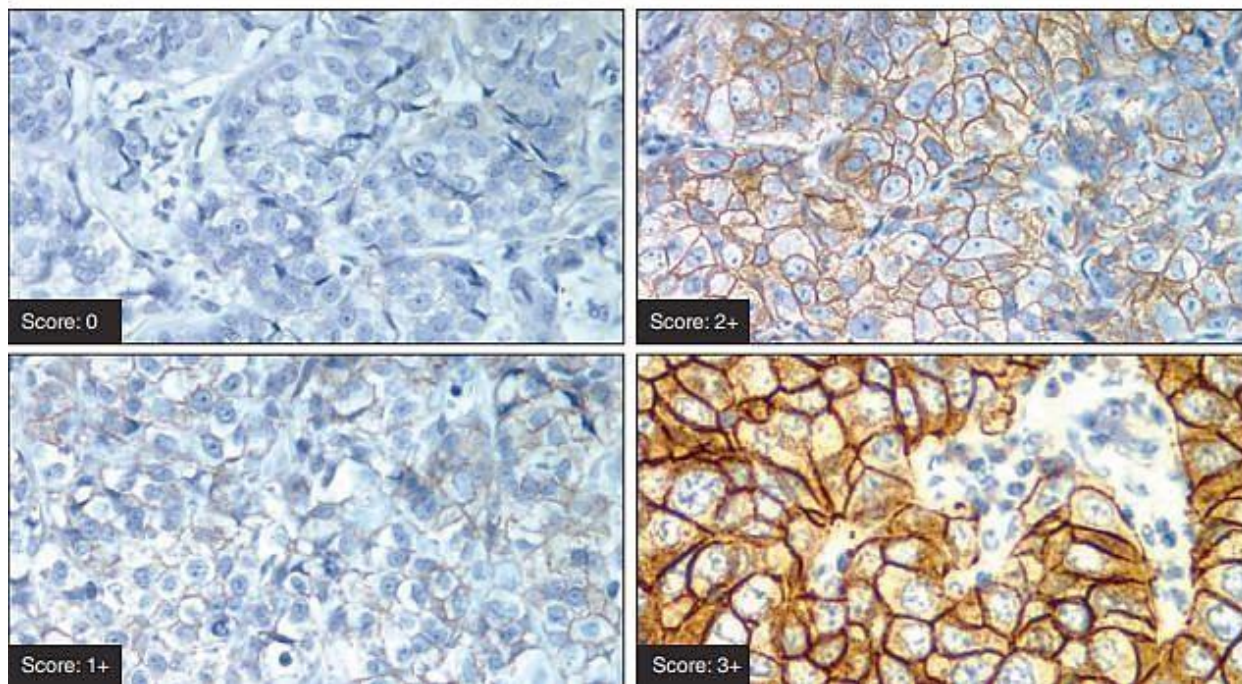
1.12.4.2 Експресија и амплификација на Хер-2/неу протеинот

Хер-2/неу е прото-онкоген кој го кодира факторот за раст на трансмембранската киназа, а исто така учествува во некои регулаторни процеси од родот, вклучувајќи пролиферација, опстанок, клеточна подвижност и инвазија. Хер-2 обично се оценува имунохистохемски. Тестот Флуоресцентна *in situ* хибридизација (FISH) обично се изведува кога ИХХ-ски Хер-2/неу е неопределен (2+). Хер-2 е прогностички фактор кај пациенти со негативни и позитивни јазли и е предиктивен фактор за терапијата која го таргетира Хер-2/неу, како што е трастузумаб (Херцепин), кој е моноклонално антитело насочено кон Хер-2

протеинот. Прекумерната експресија на Хер-2/неу изнесува 10% -34% од инвазивниот рак на дојка. Кај прекумерната експресија и амплификацијата на генот, како и експресијата на протеините на површинската мембрана се конзистентни во повеќе од 90% од случаите (120,121).

Прекумерната експресија на Хер-2/неу, е поврзано со степенот на диференцијација на туморот, и со степенот на агресивност на туморот (122, 123, 124)

Score to Report	HER2 Protein Overexpression Assessment	Staining Pattern
0	Negative	No staining is observed, or membrane staining is observed in <10% of the tumor cells.
1+	Negative	A faint/barely perceptible membrane staining is detected in >10% of tumor cells. The cells exhibit incomplete membrane staining.
2+	Weakly Positive*	A weak to moderate complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells.
3+	Positive	A strong complete membrane staining is observed in >10% of tumor cells.



Слика 9. <https://blog.ucdmc.ucdavis.edu/labbestpractice/index.php/2019/05/15/current-challenges-for-her2-immunohistochemistry-testing-in-diagnostic-pathology/>

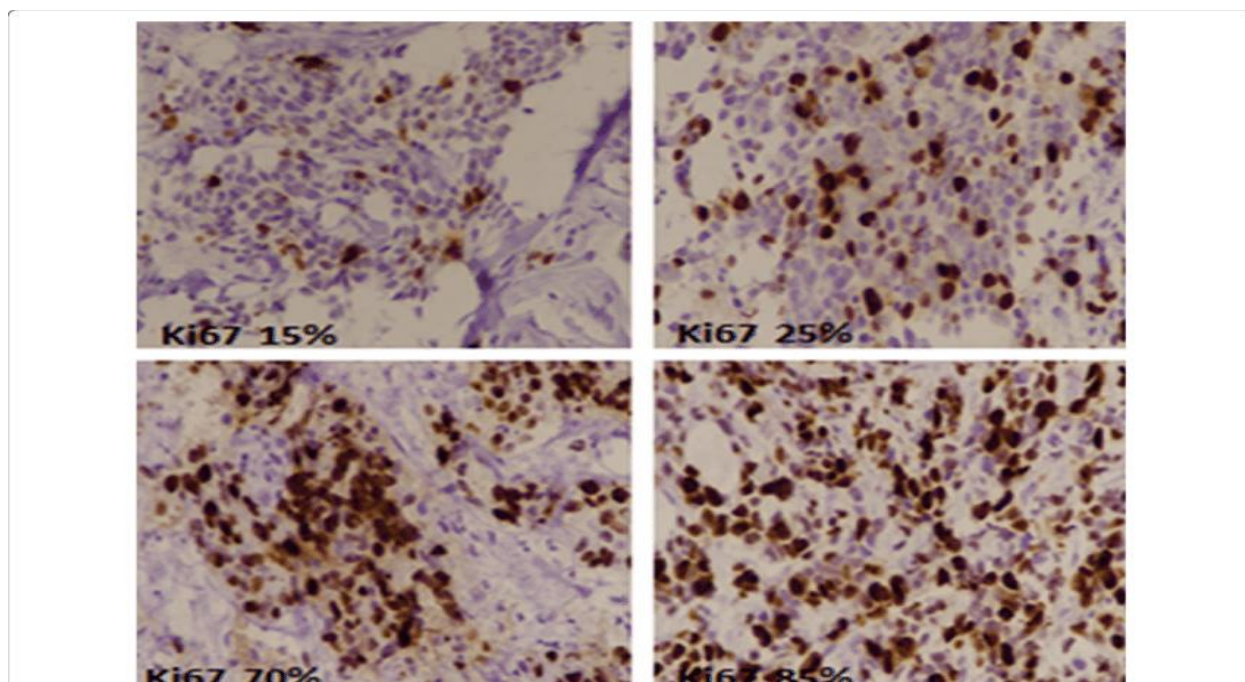
1.12.4.3 Индекс на пролиферација

Проценка на пролиферативна активност претпоставува важен прогностички фактор за карцином на дојка. Меѓу неколку фактори Ки-67 е еден маркер што се изразува во сите фази на клеточниот циклус освен на фазата Г0, и кој се смета за највреден. (125-129)

Високиот индекс на Ки-67 е поврзан со хистолошкиот градус на туморот, со големи димезии на туморот, со позитивен нодален статус и со недостаток на експресија на хормоналните рецептори.(122, 126, 130)

Индексот на пролиферација мерен со Ки-67, е значително поврзан со степен на диференцијација на туморот во повеќето случаи и е на високо ниво кај слабо диференцирани карциноми и кај инвазивен дуктален карцином со комедо карактеристики.(127, 128, 131, 132)

Туморите ЕР и ПР позитивни обично имаат висок пролиферативен индекс мерено преку Ки-67.(127, 129)



Слика 10. Ki67 expression in breast cancer by immunohistochemistry. Brown nuclear stain highlights ki67 positive tumor cells. Hashmi, A.A., Hashmi, K.A., Irfan, M. *et al.* Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes* **12**, 605 (2019) doi:10.1186/s13104-019-4653-

2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ракот на дојката е еден од најчестите видови на рак кај жените, претставувајќи голем здравствен проблем, како во нашата земја, така и во целиот свет.

Во последниве години постигнат е голем напредок со откривањето на рана дијагноза и нивниот третман. Кај пациентите со рак на дојка, оваа особено влијае на намалувањето на смртноста и компликациите поврзани со третманот. Во овој поглед, постои големо влијание на хормоналниот третман кај жени кои се Естроген и Прогестерон позитивни (ЕР+, ПР+), како и третман со трастозумаб моноклонални антитела кај Хер-2/неу позитивни случаи (Хер-2/неу 3+).

Големото влијание на ракот на дојката врз животот на луѓето погодени од оваа болест, како и обезбедувањето на сознанија за можностите за хормонален третман или третман со моноклонални антитела кај жени со инвазивен дуктален карцином со метастази во аксиларните лимфни јазли беше мојата главна мотивација за спроведување на оваа студија.

Имајќи го предвид фактот дека во Косово засега идентификацијата на ЕР, ПР, Хер-2/неу и Ки-67 рецепторите се врши рутински само во примероците од примарниот тумор на рак на дојка, додека тестирање за истите рецептори не се врши и кај метастазите во позитивните аксиларни лимфни јазли.

Се очекува оваа студија да обезбеди нови податоци за присуството на овие рецептори, што ќе помогне во унапредување на можностите за соодветен третман на рак на дојка во Косово.

3. ЦЕЛИ НА СТУДИЈАТА

Од главниот мотив на докторската дисертација произлегуваат следните цели на студијата:

1. Да се проучи експресијата на хормоналните рецептори (ЕР и ПР) , Хер-2 /неу и Ки-67 преку имунохистохемиско испитување на инвазивен карцином на дојка и да се процени нивната корелација со степенот на диференцијација на туморот.
2. Да се испита и спореди експресијата на ЕР, ПР, Хер-2 /неу и Ки-67 помеѓу примарниот и метастатскиот тумор во аксиларните лимфни јазли кај инвазивен карцином на дојка.
3. Да се утврди степенот на совпаѓање или несовпаѓање на експресијата на овие четири маркери, помеѓу примарниот инвазивен карцином на дојка и кај метастазите во аксиларните лимфни јазли.
4. Врз основа на добиените резултати да се даваат практични препораки во врска со рутинска апликација на имунохистохемиски индикатори за напредна прогностичка и терапевтска стратификација на пациенти со инвазивен дуктален карцином на дојка.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1 Примероци на ткиво

Во студијата се вклучени шеесет и четири пациенти, дијагностицирани со инвазивен карцином на дојка, преку хистопатолошко испитување извршено во Универзитетскиот Клинички Центар во Косово. Студијата е направена на примероци од ткива фиксирани на формалин 10% и вкалапени во парафин.

Сите пациенти кои беа вклучени во студијата имаа метастази во аксиларните лимфни јазли. Пациентите биле подложни на радикална мастектомија и аксиларна дисекција. Сите пациенти кои беа избрани во студијата, не беа подложени на претходна терапија.

Испитувањето е ретроспективно-проспективно, на парафински пресеци од примероци на ткиво со дијагностициран мамарен карцином. Пациентите кои беа испитувани беа на возраст од 31-75 години, а испитувањето беше одобрено од Комитетот за Етика на Медицинскиот Факултет на Универзитетската Клиника во Косово.

Имунохистохемијата на мануален начин беше применета како метод. Имунохистохемијата за ER, PR, Хер-2/неу и Ки-67 рецепторите беше применета според протоколите на производителот. (En vision+, DAKO Denmark).

4.2 Процедури и методи

Ткивните примероци од мастектомија и аксиларна дисекција се фиксирани на 10% формалин. Откако беа примени во Институтот за патологија, патологот ги направи мерењата и надворешното испитување за какво било евентуални знаци за некоја претходна хирушка интервенција. По макроскопското испитување, се прави сериска дисекција во интервали од 5-10мм. Во моментот на идентификување на туморалното ткиво беа направени сериски сечања во интервал од 3мм.

За хистопатолошко испитување беа земени примероци од сите области, вклучително и масно ткиво наоколу.

Земените примероци со димензии околу 10x10x3мм, се ставени на 10% формалин да се фиксират за 48 часа. Беше извршено и комплетна егзаминација на аксиларната дисекција заради идентификување на лимфните јазли за обработка и хистопатолошко испитување.

Примероците на ткивата се ставени на касети за ткива за понатамошна обработка. Обработката на ткивата започнува со ставање на 10% формалин (2 пати по 1 час), етанол 70% (1.5 часа), етанол 80% (1.5 часа), етанол 96% (1.5 часа), етанол 99.99% (3 пати по 1 час), ксилол (2 пати по 1.5 часа), после во течниот парафин на температура од 56°C (2 пати по 2 часа). По процесирање примероците се калупират на парафин, се сечат со микротом 3-5 микроми, и потоа тие беа обоени со Хематоксилин & Еозин (H & E). Во студијата се вклучени случаите со чист дуктален инвазивен карцином засновано врз критериумите утврдени во литературата. (135,136,137)

Хистолошкото оценување е направено според модифицирани критериуми на Elston & Elis, односно според системот на Nottingham (135,136) За време на хистопатолошко испитување беше проценета стапката на формирање на тубули, нуклеарната атипичност и митотична активност. После макроскопско и микроскопско оценување беше направена класификација според TNM системот.

По хистопатолошкото испитување беа селектирани парафинските блокови за имунохистохемиска анализа. Парафинските блокови беа сечени со микротом со дебелина од 3-5 микроми, и потоа се ставени на микроскопски стакла Superfrost ++(Menzai, Germany). По сушењето во наклон позиција, стаклата се поставени на термостат на температура 60°C околу 40 минути. После тоа се направи прочистување на ксилол (2 пати по 5 минути), рехидратација во етанол 99.99% (3 пати по 5 минути), етанол 95% (5 минути), етанол 70% (5 минути), и во дестилирана вода (5 минути). Имунохистохемското бојење е направено на мануален начин: после исплакнување за 5 минути со соодветниот пуфер, примероците се подложени на процесот за демаскирање на антигенот.. Секое антители се демаскира со соодветен пуфер и тоа на: EP (pH 9.0), PP (pH 9.0), Хер-2/ неу (pH 6.1) и Ki-67 (pH 9.0).

По ладењето примероците се испираат со пуфер за 5 минути, а потоа на примероците на ткивата се аплицира субстанца за блокирање на пероксидаза, која е оставена да дејствува 5 минути. По повторено исплакнување за 5 минути во соодветниот пуфер, се аплицира раствор на примарниот антителиа за 30 минути. По исплакнувањето два пати по 5 минути со пуфер за исплакнување, е аплицирано секундарното антителиа за 30 минути. После тоа е направено исплакнување три пати по 5 минути, со пуфер за исплакнување, и е аплицирано хромогената субстанца (DAB).

По исплакнување со дестилирана вода за 5 минути, примероците беа обоени со Хематоксилин според Harris, за една минута и по исплакнување со течна вода, се дехидрираат во алкохол (70%, 96%, 99.99%) за една минута.

Примероците се ставени на ксилол два пати по 5 минути, и потоа се покриваат со покривно стакло и се готови за микроскопско изгледување.

4.3 Микроскопска евалуација

Интерпретацијата на ER, PR и Хер-2 /неу имунохистохемија се изведува според упатствата на Американското Здружение за Клиничка Онкологија (ASCO) (138, 139).

Резултатите за ER и PR експресија се одредуваат како: 0, +, ++ и +++.

0 (негативно) нема нуклеарно боење

+ (позитивно) нуклеарното боење е 0-25%

++ (позитивно) нуклеарното боење е 26-50%

+++ (позитивно) нуклеарното боење е над 50%

Моделот на боење за Хер-2 /неу е вреднуван со резултат од 0 до 3+. Резултатот од 0 до 1+ е означен како негативен. Позитивниот резултат е означен со 3+ (139).

Неопределените случаи со 2+ (equivocal) се исклучени од нашето испитување. Рангирањето на резултатите од 0 до 3+ се базира на бојење на малигните клеточни мембрани според дефинициите на ASCO и CAP, на следниот начин :

- Резултатот 0 (негативен) е кога не се забележува бојење или имаме слабо бојење, слабо перцепирање на туморските клеточни мембрани.
- Резултатите како 1 + (негативни), се забележува кога постои слабо присуство на боја на туморските клеточни мембрани или слабо бојење на комплетната мембрана кај најмалку 10% од малигните клетки.
- Резултатите како 2 + (неодредени), се случаи кои се категоризирани помеѓу 2 + и 3+ како последица на неуспехот да се достигнат одредени критериуми (како што се : бојата не е многу дебела, не е многу интензивна, не е циркумферентна, не е присутна кај повеќе од 30% од малигните клетки). Во нашата студија овие случаи не се вклучени.
- Резултатите како 3 + (позитивни), се забележува кога повеќе од 30% од инвазивните туморски клетки покажуваат униформна боја, интензивно бојење и задебелување на циркумференцијалната мембрана.

Интерпретацијата на индекс на пролиферација се мери преку Ки-67, која се изведува од оценување на процентот на туморалните клетки, со бојење на јадрото во полињата со повисока митотична активност.(140) За маркерот Ки-67 го употребивме границата 14%, како лимит за дефинирање на случаите висока/ниска пролиферација.(141)

По имунохистохемиското бојење примероците биле испитувани под микроскоп, додека најрепрезентативните полиња се фотографирани.

5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

За статистичка обработка на податоците, добиени во текот на истражувањето беше направена база во статистичкиот програм SPSS for Windows 23,0.

Нумеричките, односно квантитативни белези со симетрична дистрибуција се прикажани со просек и стандардна девијација, а оние со асиметрична дистрибуција со медијана .

Квалитативните, односно атрибутивни белези се прикажани со дистрибуција на фреквенции.

За одредување на степенот на совпаѓање во експресијата на анализираните хормонски рецептори беше користен Карра тестот. Споредбата на статусот на овие маркери меѓу примарниот и метастатски инвазивен карцином на дојка беше анализирана со Chi-square test).

За статистички сигнификантни беа земени вредностите на $p < 0.05$.

6. РЕЗУЛТАТИ

Во истражувањето беа вклучени 64 испитанички, пациентки со инвазивен рак на дојка и со метастази во аксиларните лимфни јазли. Пациентките беа на просечна возраст од 53.1 ± 11.9 години, најмладата пациентка имаше 31 години, најстарата беше на 75 годишна возраст. (табела 1.)

Табела 1.

Варијабла	mean \pm SD	min-max
возраст	53.1 ± 11.9	31 – 75

Деснострани локализација на заболување имаа 46.9% (30 жени), со левострани локализација беа 53.1% (34 жени). (табела 2.)

Табела 2.

Страна на канцерот	n (%)
десна	30 (46.87)
лева	34 (53.13)

Тумор со градиус 2, односно умерено диференциран тумор доминираше кај 64.1% (41 жени). (табела 3.)

Табела 3.

Градус	n (%)
2	41 (64.06)
3	23 (35.94)

Големината на туморот беше во границите од 1.3 до 11.5 см, просечната големина беше 3.2 ± 1.6 см, половина пациентки имаа рак на дојка со големина поголема од 2.8 см. (табела 4.)

Табела 4.

Варијабла	mean \pm SD	min-max	median
големина на туморот (cm)	3.2 ± 1.6	1.3 – 11.5	2.8

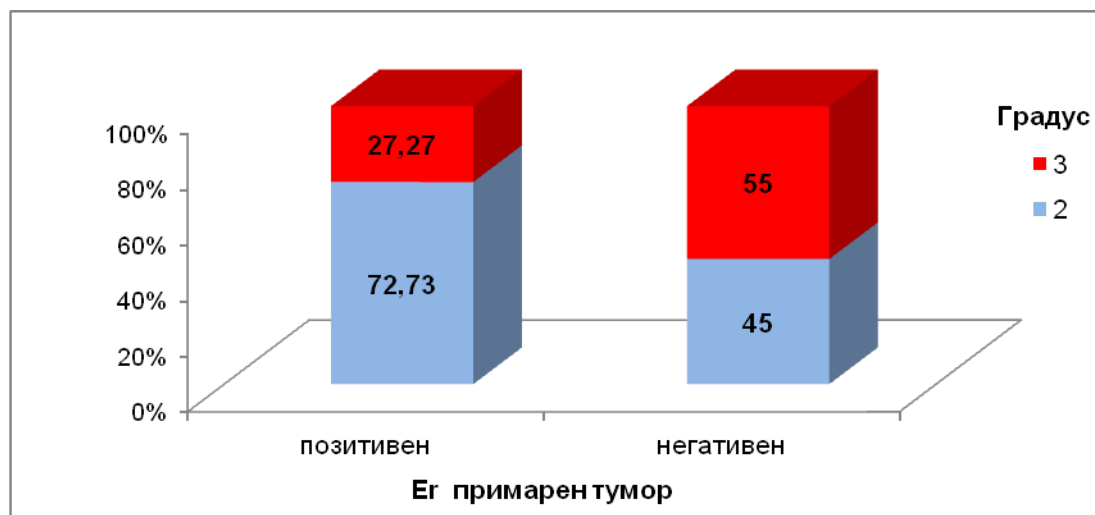
Резултатите од истражувањето покажаа постоење на сигнификантна асоцијација на експресијата на Ер хормоналните рецептори во примарниот карцином на дојка со степенот на диференцијација на туморот ($p=0.032$). Естроген позитивните примарни тумори значајно почесто од естроген негативните се подобро диференцирани. Во групата од 44 естроген позитивни примарни тумори 72.7% (32) беа умерено диференцирани, а 27.3% (12) беа лошо диференцирани, додека во групата од 20 естроген негативни примарни тумори 45% (9) беа умерено диференцирани, 55% (11) лошо диференцирани. (табела 5, слика12.)

Табела 5.

Ер	Градус			p value
	вкупно	2	3	
примарен тумор	n (%)	n (%)	n (%)	
позитивен	44 (68.75)	32 (72.73)	12 (27.27)	$X^2=4.59$ p=0.032
негативен	20 (31.25)	9 (45)	11 (55)	sig

p (Chi-square test)

Слика 12.



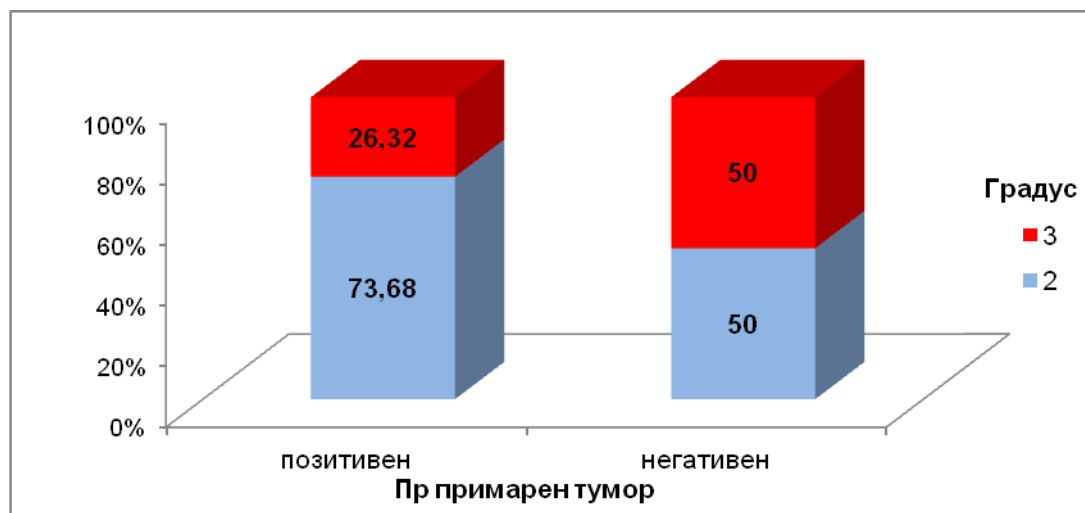
Прогестерон позитивните примарни тумори почесто од прогестерон негативните беа подобро диференцирани, односно умерено диференцирани беа 73.7% (28) прогестерон позитивни наспроти 50% (13) прогестерон негативни примарни тумори, додека лошо диференцирани беа 26.3% (10) прогестерон позитивни тумори наспроти 50% (13) прогестерон негативни тумори. Поврзаноста на експресијата на прогестеронските рецептори во примарниот тумор со степенот на диференција на туморот не се потврди како сигнификантна, односно значајна ($p=0.052$). (табела 6, слика 13.)

Табела 6.

Пр примарен тумор	Градус			p value
	вкупно n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
позитивен	38 (59.37)	28 (73.68)	10 (26.32)	$X^2=3.76$ $p=0.052$ ns
негативен	26 (40.63)	13 (50)	13 (50)	

p (Chi-square test)

Слика 13.



Согласно резултатите од табела 7, не се потврди сигнификантна асоцијација на експресијата на прото-онкогенот ХЕР-2/неу во примарниот тумор со степенот на диференцијата на туморот ($p=0.2$).

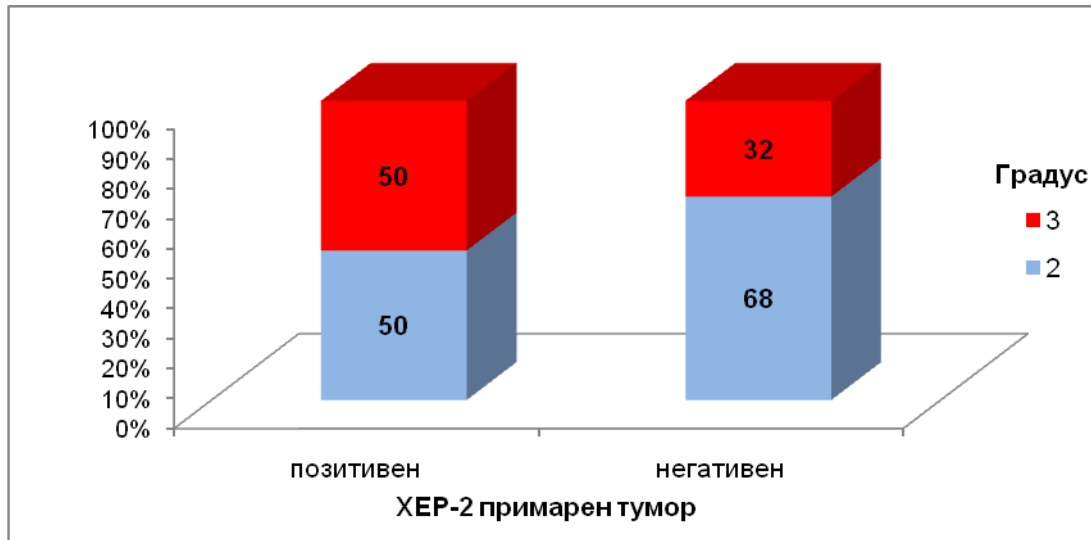
ХЕР-2/неу позитивните примарни тумори беа незначајно полошо диференцирани од ХЕР-2/неу негативните примарни тумори – 50% (7) наспроти 32% (16). (табела 7, слика 14.)

Табела 7.

ХЕР-2 примарен тумор	вкупно n (%)	Градус		p value
		2 n (%)	3 n (%)	
позитивен	14 (21.87)	7 (50)	7 (50)	$X^2=1.54$ $p=0.21$ ns
негативен	50 (78.13)	34 (68)	16 (32)	

p (Chi-square test)

Слика 14.



Во групата од 14 ХЕР-2/неу позитивни примарни тумори, 21.4% (3) беа естроген позитивни, 78.6% (11) беа естроген негативни. (табела 8.)

Табела 8

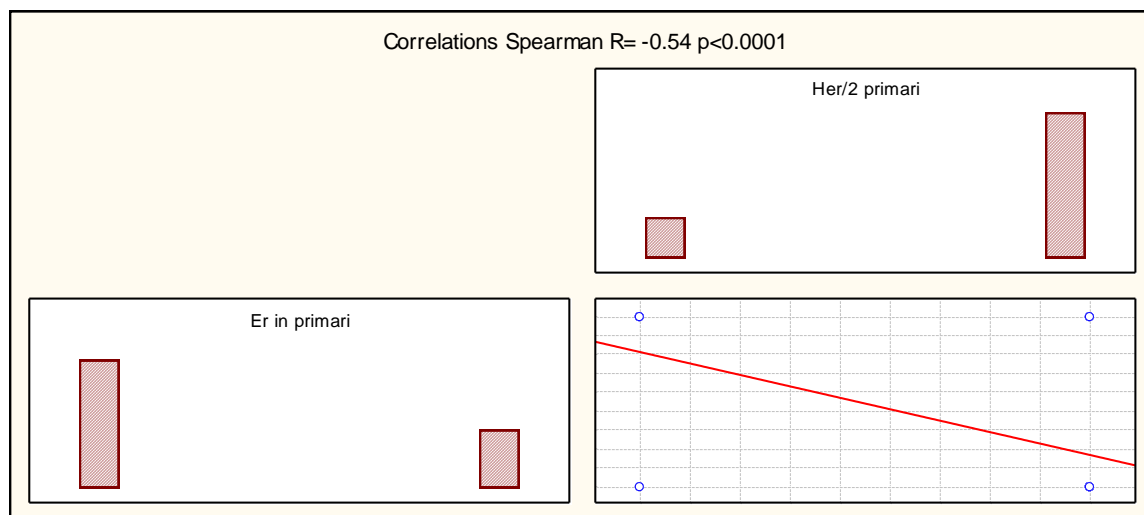
Ер примарен тумор	ХЕР-2 примарен тумор		
	позитивен	негативен	вкупно
	n (%)	n (%)	n
позитивен	3 (21.43)	41 (82)	44
негативен	11 (78.57)	9 (18)	20
вкупно	14	18	64

Испитуваната корелација помеѓу во ХЕР-2/неу и естрогенските рецептори во примарниот тумор беше статистички сигнификантна ($p=0.028$). Вредоста на Спермановиот коефициент од $R= -0.54$ покажува дека оваа корелација е негативна, односно индиректна, и покажува дека ХЕР-2/неу експресијата во примарните тумори се намалува со зголемување на експресијата на естрогенските рецептори, и обратното. (табела 9, слика 15.)

Табела 9

варијабла	Sperman - R	p-level
ХЕР-2/неу & Ер примарен тумор	- 0.54	0.00000 sig

Слика 15.



Во групата од 14 ХЕР-2/неу позитивни примарни тумори, прогестерон позитивни беа 14.3% (2), останатите 85.7% (12) ХЕР-2/неу позитивни примарни тумори беа прогестерон негативни. (табела 10)

Табела 10

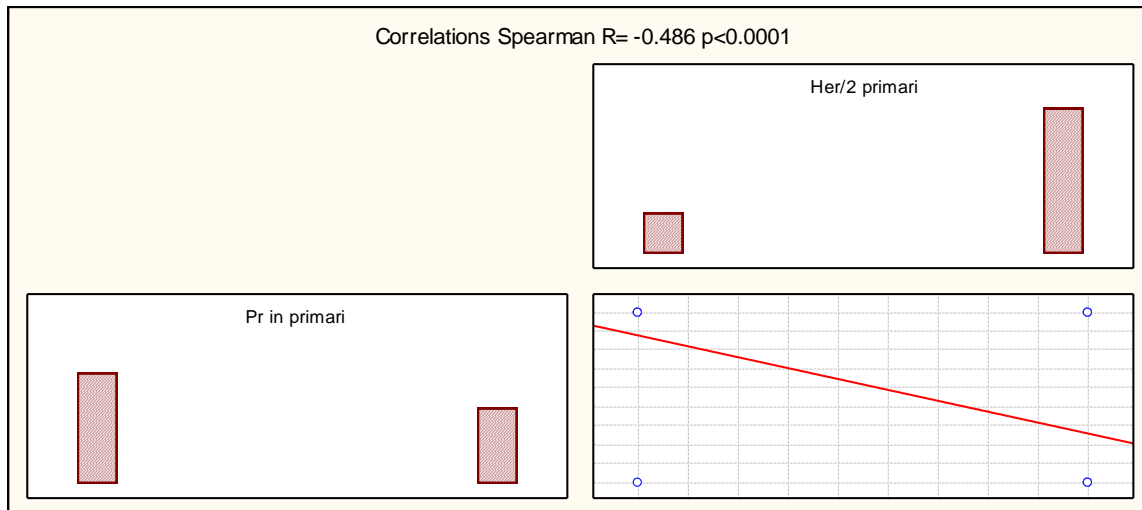
Пр примарен тумор	ХЕР-2 примарен тумор		
	позитивен	негативен	вкупно
	n (%)	n (%)	n
позитивен	2 (14.29)	36 (72)	38
негативен	12 (85.71)	14 (28)	26
вкупно	14	50	64

Статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација беше најдена помеѓу ХЕР-2/неу и прогестеронските рецептори во примарниот тумор ($R = -0.486$ $p = 0.00005$). Овој статистички коментар сугерира на заклучок дека со зголемување на експресијата на прогестеронските рецептори во примарните тумори, ХЕР-2/неу експресијата се намалува, и обратното. (табела 11, слика 16.)

Табела 11

варијабла	Sperman - R	p-level
ХЕР-2/неу & Пр примарен тумор	- 0.486	0.00005 sig

Слика 16.

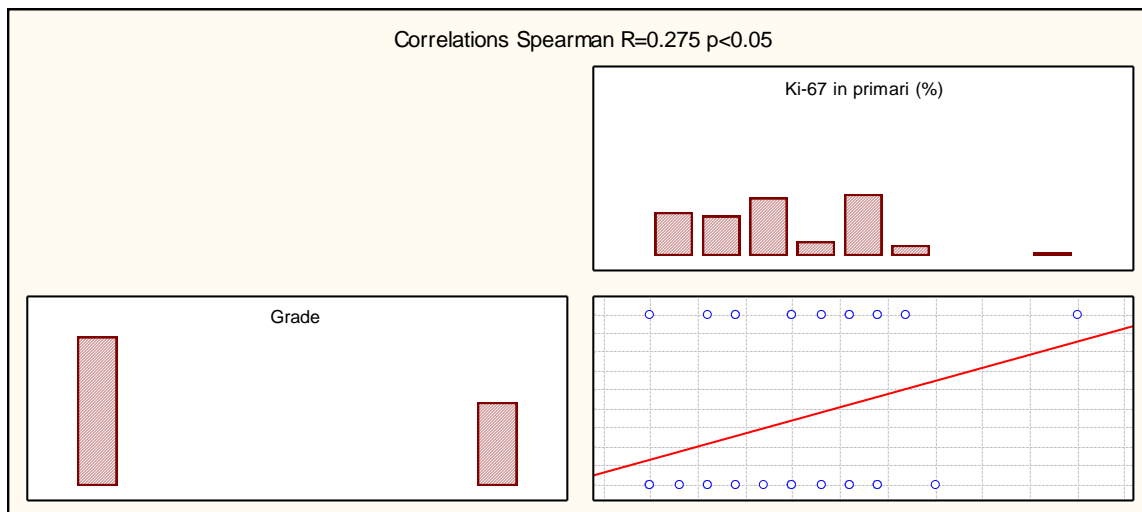


Испитуваната корелација помеѓу пролиферативниот маркер Ки-67 во примарниот тумор и степенот на диференција беше статистички сигнификантна ($p = 0.028$). Вредоста на Спермановиот коефициент од $R = 0.275$ покажува дека оваа корелација беше позитивна, односно директна, и дека примарните тумори со повисок процент на Ки-67 обоени клетки беа и полошо диференцирани, и обратното. (табела 12, слика 17.)

Табела 12

варијабла	Sperman - R	p-level
Градус & Ki-67 примарен тумор	0.275	0.028 sig

Слика 17.



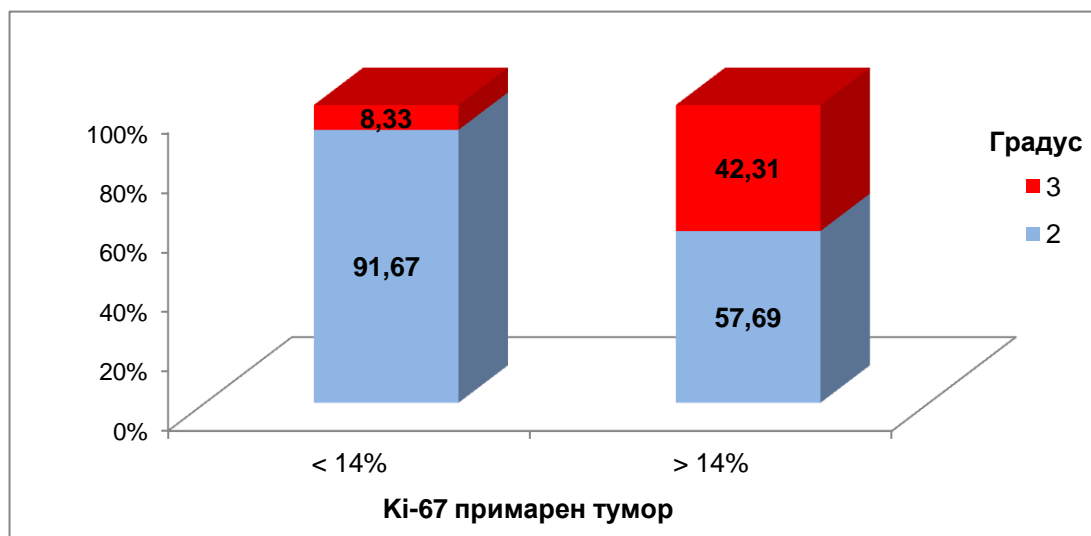
Примарните тумори со ниска и висока пролиферација сигнификантно се разликуваа во однос на степен на диференцијација ($p=0.027$). Туморите со висока пролиферација значајно почесто од туморите со ниска пролиферација беа полошо диференцирани. Во групата 12 тумори со ниска пролиферација само еден беше со градус 3, додека во групата од 52 тумори со висока пролиферација, 42.3% (22) беа лошо диференцирани. (табела 13, слика 18.)

Табела 13.

Ki-67	Градус			p value
	вкупно	2	3	
примарен тумор	n (%)	n (%)	n (%)	
< 14%	12 (18.75)	11 (91.67)	1 (8.33)	$X^2=4.9$
> 14%	52 (81.25)	30 (57.69)	22 (42.31)	p=0.027 sig

p (Chi-square)

Слика 18.



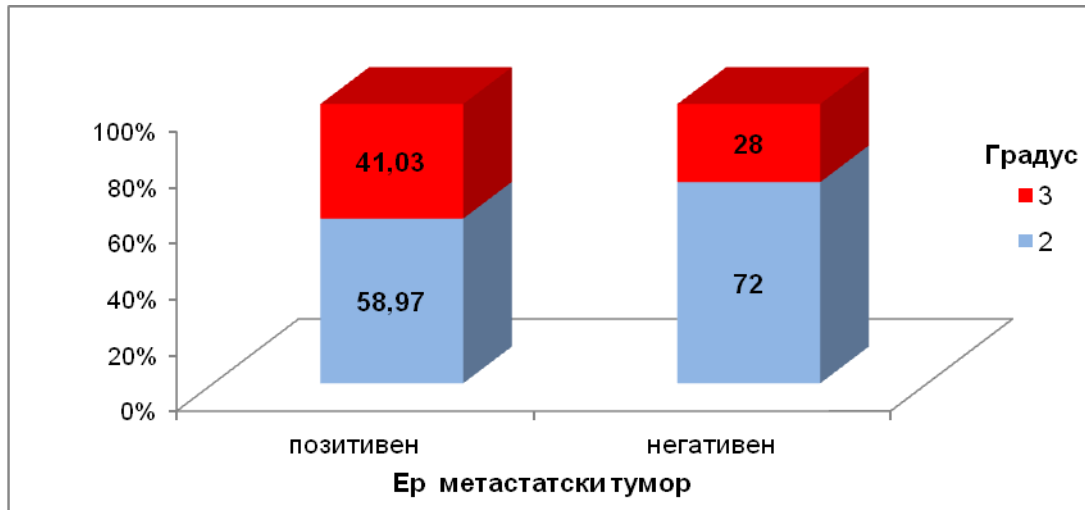
Експресијата на Ер хормоналните рецептори во метастатскиот тумор не беше сигнификантно асоцирана со степенот на диференцијација на туморот ($p=0.29$). Карциномите на дојка со метастази во лимфните аксиларни јазли и присутни естроген рецептори почесто од метастатските естроген негативни тумори беа полошо диференцирани, но без статистичка потврдена сигнификантност. Во групата од 39 естроген позитивни метастатски тумори 59% (23) беа умерено диференцирани, а 41% (16) беа лошо диференцирани, додека во групата од 25 естроген негативни метастатски тумори, умерено и лошо диференцираните тумори беа застапени со 72% (18), и 28% (7), консеквентно. (табела 14, слика 19.)

Табела 14.

Ер метастатски тумор	вкупно n (%)	Градус		p value
		2 n (%)	3 n (%)	
позитивен	39 (60.94)	23 (58.97)	16 (41.03)	$X^2=1.12$ $p=0.29$ ns
негативен	25 (39.06)	18 (72)	7 (28)	

p (Chi-square test)

Слика 19.



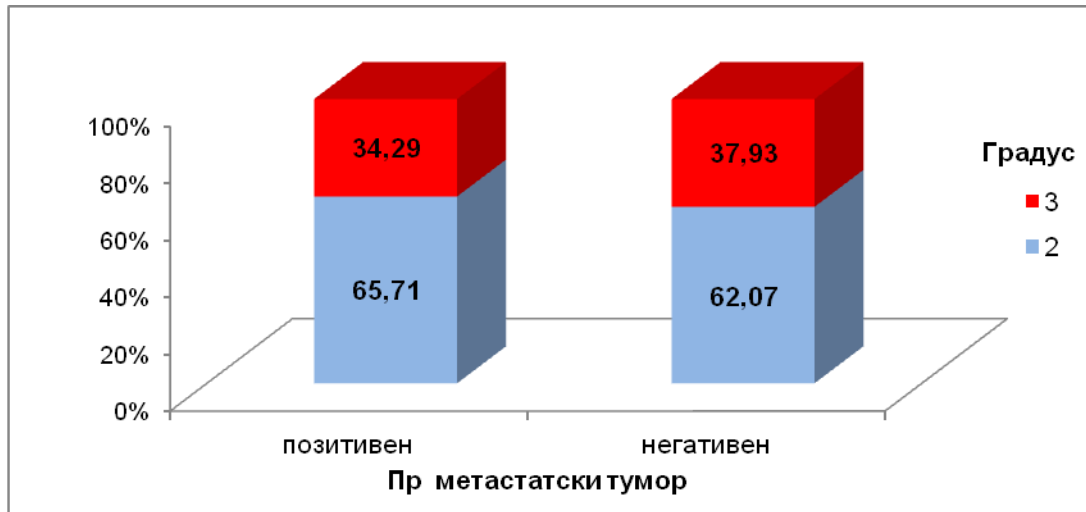
Согласно резултатите прикажани во табела 15 , умерено и лошо диференцираните тумори имаа слична експресија на ПР рецептори во метастазираните лимфни аксиларни јазли ($p=0.76$). Умерено диференцирани беа 65.7% (23) прогестерон позитивни и 62.1% (18) прогестерон негативни метастаски тумори, додека слабо диференцирани беа 34.3% (12) прогестерон позитивни и 37.9% (11) прогестерон негативни метастаски тумори. (табела 15, слика 20.)

Табела 15.

Пр метастатски тумор	вкупно n (%)	Градус		p value
		2 n (%)	3 n (%)	
позитивен	35 (54.69)	23 (65.71)	12 (34.29)	$X^2=0.09$ $p=0.76$ ns
негативен	29 (45.31)	18 (62.07)	11 (37.93)	

p (Chi-square test)

Слика 20.



Експресијата на прото-онкогенот ХЕР-2/неу во метастатскиот тумор не беше сигнификантно асоцирана со степенот на диференцијата ($p=0.2$).

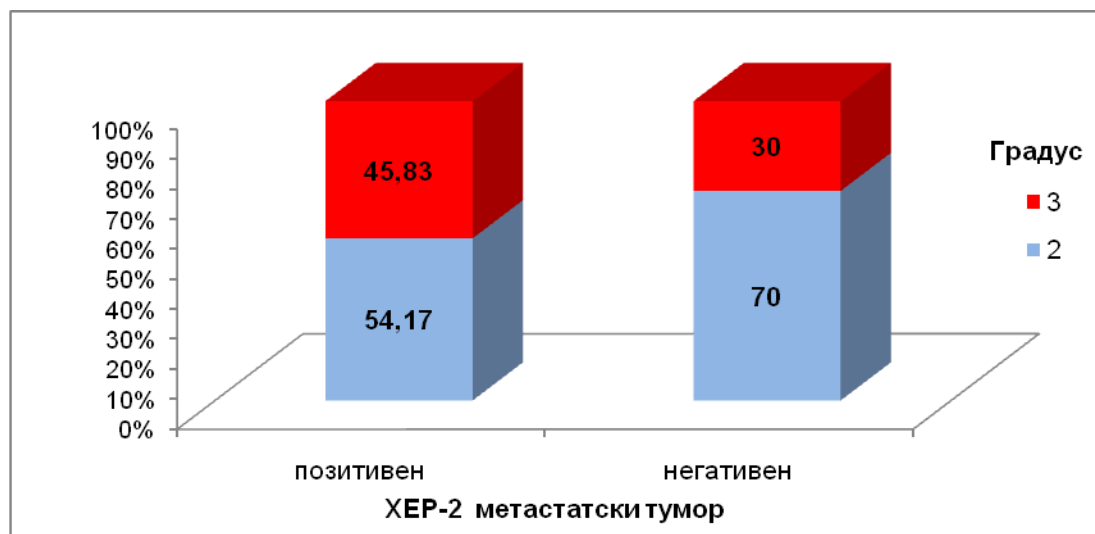
ХЕР-2/неу позитивните метастатски тумори беа незначајно полошо диференцирани од ХЕР-2/неу негативните метастатски тумори – 45.8% (11) наспроти 30% (12). (табела 16, слика 21.)

Табела 16.

ХЕР-2 метастатски тумор	Градус			p value
	вкупно	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	
позитивен	24 (37.5)	13 (54.17)	11 (45.83)	$X^2=1.63$ $p=0.2$ ns
негативен	40 (62.5)	28 (70)	12 (30)	

p (Chi-square test)

Слика 21.



Во групата од 24 ХЕР-2/неу позитивни метастатски тумори, 29.2% (7) беа естроген позитивни, 70.8% (17) беа естроген негативни. (табела 17.)

Табела 17

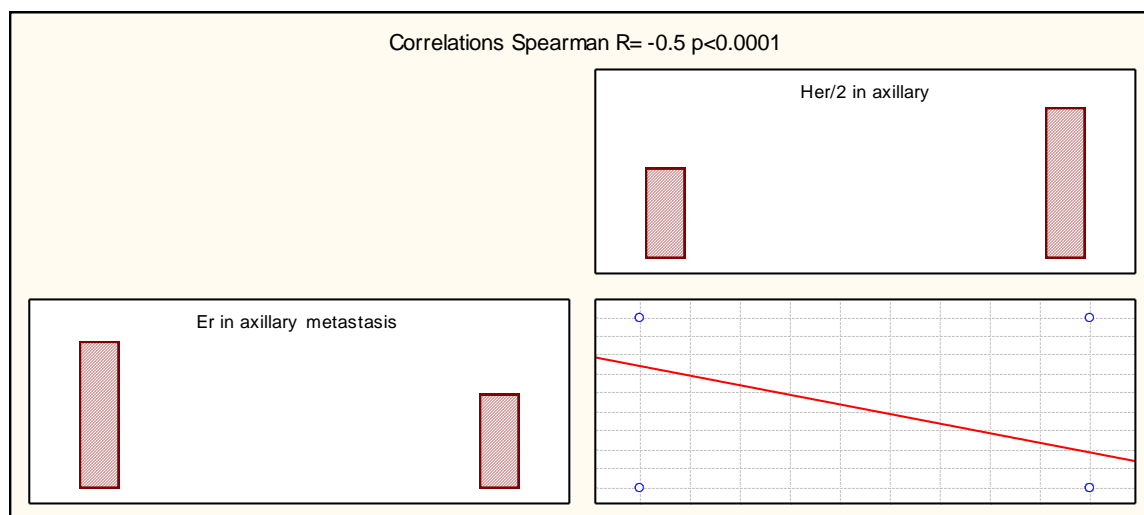
Ер метастатски тумор	ХЕР-2 метастатски тумор		
	позитивен	негативен	вкупно
	n (%)	n (%)	n
позитивен	7 (29.17)	32 (80)	39
негативен	17 (70.83)	8 (20)	25
вкупно	24	40	64

Помеѓу ХЕР-2/неу и Ер во метастатскиот тумор беше регистрирана статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација, односно поврзаност ($R = -0.5$ $p = 0.00002$). Оваа корелација покажува дека со зголемување на експресијата на естрогенските рецептори во метастатските лимфни јазли, ХЕР-2/неу експресијата се намалува, и обратното. (табела 18, слика 22.)

Табела 18

варијабла	Sperman - R	p-level
ХЕР-2/неу & Ер метастатски тумор	- 0.5	0.00002 sig

Слика 22.



Во групата од 24 ХЕР-2/неу позитивни метастатски тумори, прогестерон позитивни беа 37.5% (9), останатите 62.5% (15) ХЕР-2/неу позитивни метастатски тумори беа прогестерон негативни.(табела 19.)

Табела 19

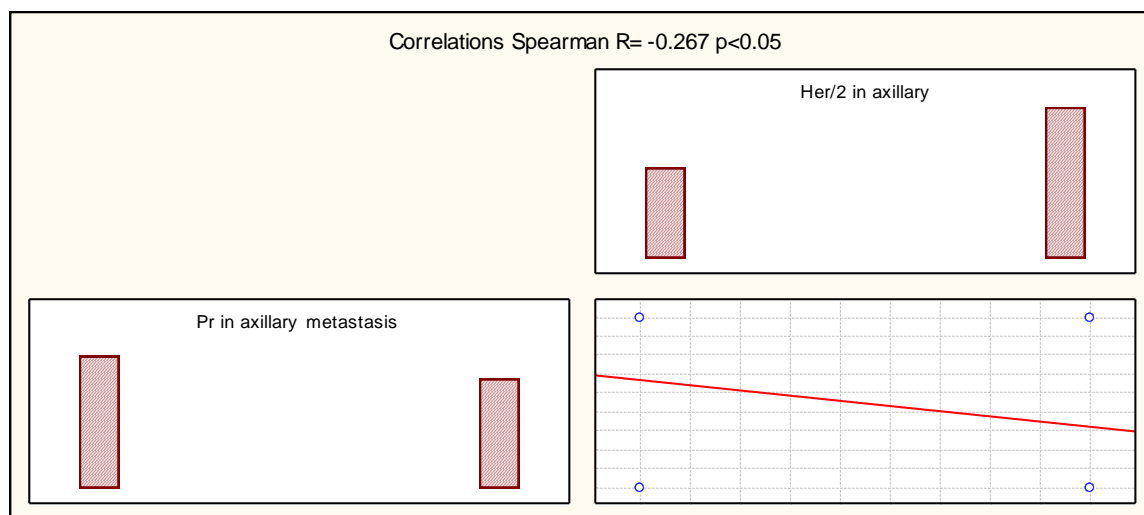
Пр метастатски тумор	ХЕР-2 метастатски тумор		
	позитивен n (%)	негативен n (%)	вкупно n
позитивен	9 (37.5)	26 (65)	35
негативен	15 (62.5)	14 (35)	29
вкупно	24	40	64

Статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација беше најдена помеѓу ХЕР-2/неу и прогестеронските рецептори во метастатскиот тумор ($R = -0.267$ $p = 0.032$). Овој статистички коментар сугерира на заклучок дека со зголемување на експресијата на прогестеронските рецептори во метастазираните аксиларни лимфни јазли, ХЕР-2/неу експресијата се намалува, и обратното. (табела 20, слика 23.)

Табела 20.

варијабла	Sperman - R	p-level
ХЕР-2/неу & Пр метастатски тумор	- 0.267	0.032 sig

Слика 23.

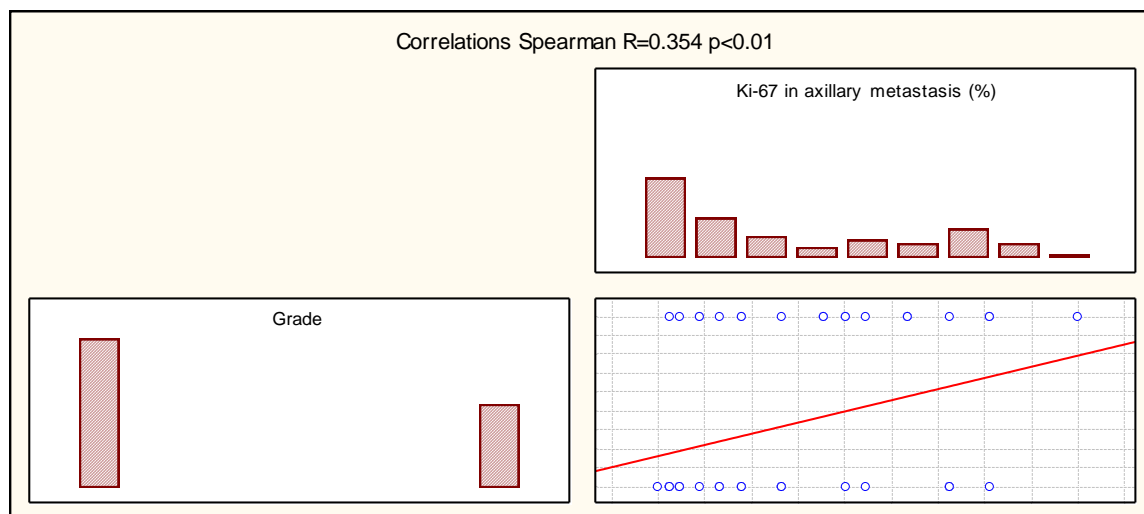


Статистичка сигнификантна позитивна, директна корелација беше најдена помеѓу пролиферативниот маркер Ки-67 во метастатскиот тумор и степенот на диференција ($R = 0.353$ $p = 0.004$). Овој статистички коментар сугерира на заклучок дека метастатските тумори со повисок процент на Ки-67 обоени клетки беа и полошо диференцирани, и обратното. (табела 21, слика 24.)

Табела 21.

варијабла	Sperman - R	p-level
Градус & Ki-67 метастатски тумор	0.354	0.004 sig

Слика 24.



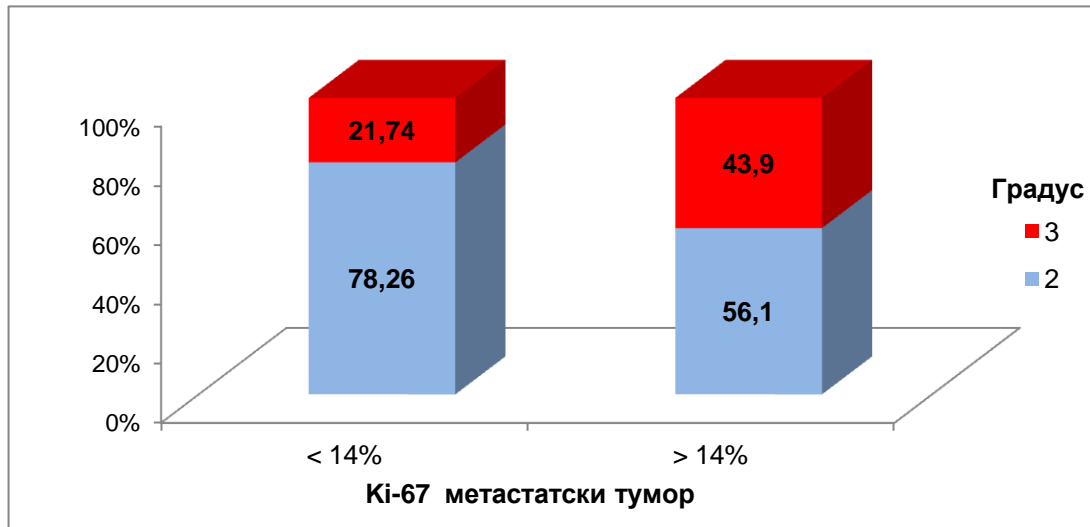
Метастатските тумори со ниска и висока пролиферација не се разликуваа сигнификантно во однос на степен на диференцијација ($p=0.07$). Туморите со висока пролиферација почесто од туморите со ниска пролиферација беа полошо диференцирани, но разликата не беше доволна за статистичка сигнификантност - 43.9% (18) наспроти 21.7% (5), консеквентно. (табела 22, слика 25.)

Табела 22.

Ki-67 метастатски тумор	вкупно n (%)	Градус		p value
		2 n (%)	3 n (%)	
< 14%	23 (35.94)	18 (78.26)	5 (21.74)	$X^2=3.1$
> 14%	41 (64.06)	23 (56.10)	18 (43.90)	$p=0.07$ ns

p (Chi-square)

Слика 25.

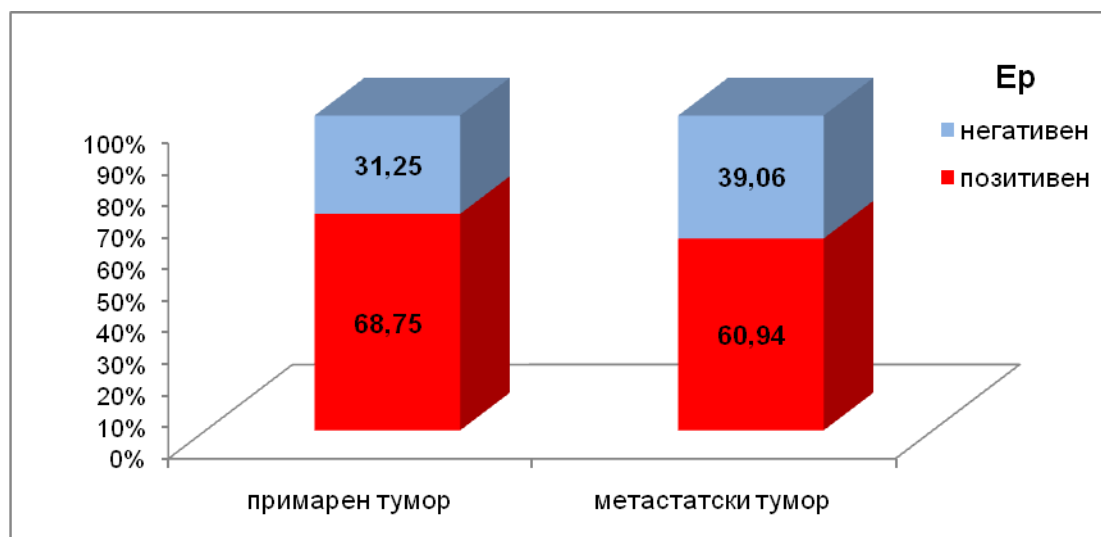


Анализата за компарација на експресијата на естроген биомаркерот кај примарниот и метастатскиот тумор покажа дека естроген позитивни беа 68.75% (44) примарни тумори и 60.9% (39) метастатски. Статистичката анализа не ја потврди како сигнификантна разликата во експресијата на Ег рецепторите помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли кај инвазивниот карцином на дојка ($p=0.31$). (табела 23, слика 26.)

Табела 23.

Ер	примарен тумор	метастатски тумор
	n (%)	n (%)
позитивен	44 (68.75)	39 (60.94)
негативен	20 (31.25)	25 (39.06)

Слика 26.



Z (Wilcoxon matched pairs test)=1.0 p=0.31 ns

Стапката на совпаѓање на експресијата на Ер рецепторите меѓу примарниот и метастатскиот тумор беше 70.3% (n=45), додека стапката на несовпаѓање беше 29.7% (n=19). Меѓу нив, 18.75% (n=12) пациентки имаа ER-позитивен примарен тумор, но ER-негативни метастатски, и, 10.9% (n=7) пациентки имаа ER-негативен примарен тумор, но ER-позитивни метастази.

Карра коефициентот имаше вредност од 0.353, што укажува на правилно совпаѓање во експресијата на ER рецепторот помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли. (табела 24.)

Табела 24.

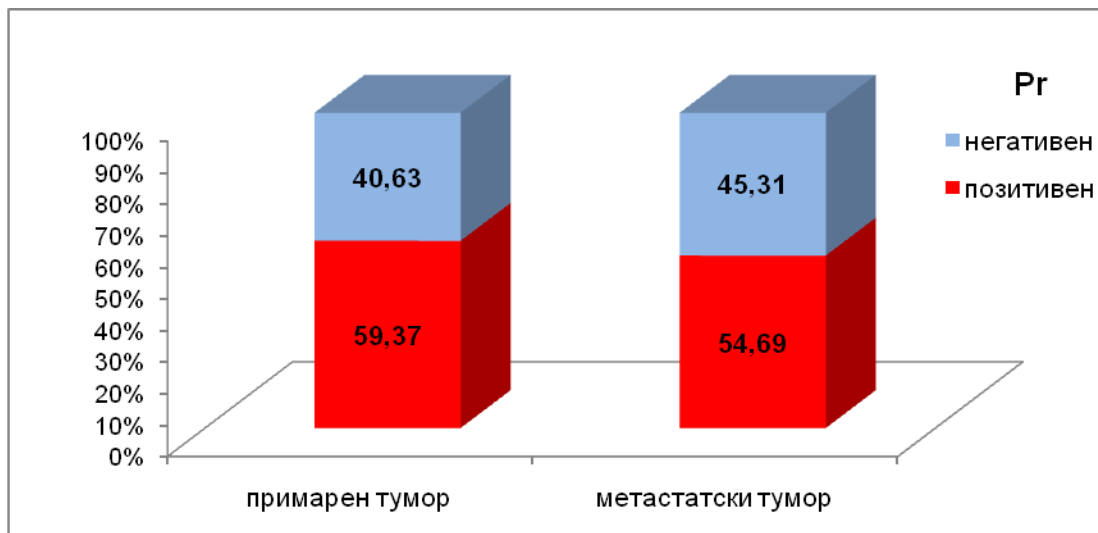
примарен ту	метастатски ту		N	Карра	T	p-level
	Er позитивен	Er негативен				
Er позитивен	32	12	44	0.353	2.87	0.004
Er негативен	7	13	20			
вкупно	39	25	64			

Експресија на рецептори за биомаркерот Пр беше потврдена кај 59.4% (38) примарни тумори, и кај 54.7% (35) метастатски тумори. Статистички несигнификантна беше разликата во експресијата на Пр рецепторите помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли кај инвазивниот карцином на дојка ($p=0.58$). (табела 25, слика 27.)

Табела 25.

Пр	примарен тумор	метастатски тумор
	n (%)	n (%)
позитивен	38 (59.37)	35 (54.69)
негативен	26 (40.63)	29 (45.31)

Слика 27.



Z (Wilcoxon matched pairs test) = 0.55 $p=0.58$ ns

Стапката на совпаѓање на експресијата на Пр рецепторите меѓу примарниот и метастатскиот тумор беше 64.1% (n=41), додека стапката на несовпаѓање беше 35.9% (n=23). Меѓу нив, 20.3% (n=13) пациентки имаа Пр-позитивен примарен тумор, но Пр-негативен метастатски тумор, и , 15,6% (n=10) пациентки имаа Пр-негативен примарен тумор, но Пр-позитивни метастази во аксиларни лимфни јазли..

Карра коефициентот имаше вредност од 0.268, што сугерира на заклучок дека постои правилно совпаѓање во експресијата на Пр рецепторот помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли. (табела 26.)

Табела 26.

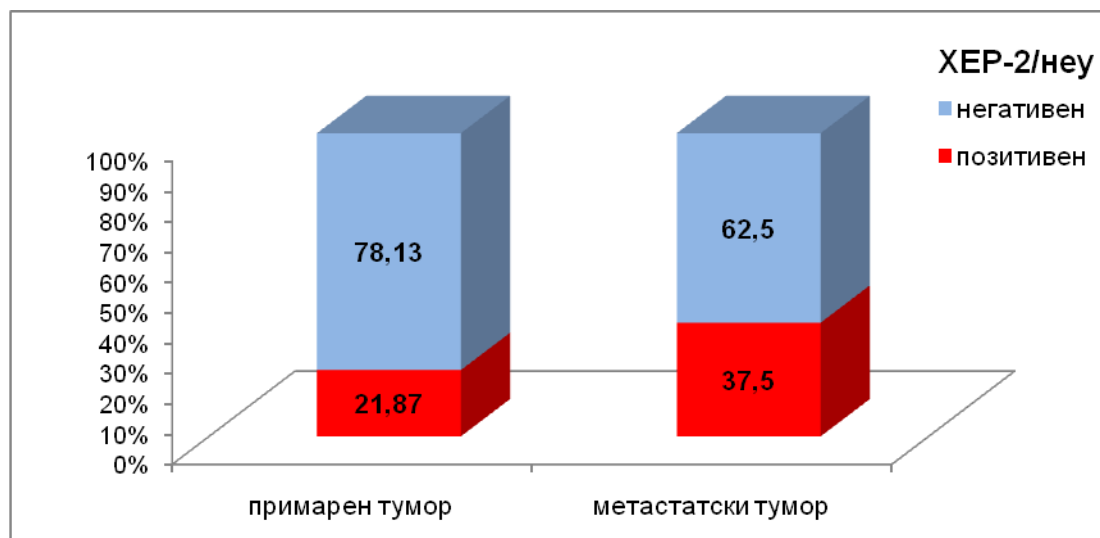
примарен ту	метастатски ту		N	Карра	T	p-level
	Пр позитивен	Пр негативен				
Пр позитивен	25	13	38	0.268	2.2	0.031 sig
Пр негативен	10	16	16			
вкупно	35	29	64			

Експресија на ХЕР-2/неу протеин презентираа 21.9% (14) примарни и 37.5% (24) метастатски тумори. Почестата експресија на овој прото-онкоген во метастатските аксиларни лимфни јазли во однос на примарниот тумор и статистички се потврди како сигнификантна, за вредност на $p=0.028$. (табела 27, слика 28.)

Табела 27.

ХЕР-2/неу	примарен тумор	метастатски тумор
	n (%)	n (%)
позитивен	14 (21.87)	24 (37.5)
негативен	50 (78.13)	40 (62.5)

Слика 28.



Z (Wilcoxon matched pairs test) =2.2 p=0.028 sig

Стапката на совпаѓање на експресијата на Хер-2/неу рецепторите меѓу примарниот и метастатскиот тумор беше 75% (n=48), додека стапката на несовпаѓање беше 25% (n=16). Меѓу нив, 4.7% (n=3) пациентки имаа Хер-2/неу позитивен примарен тумор, но Хер-2/неу негативен метастатски тумор, и , 20.3% (n=13) пациентки имаа Хер-2/неу негативен примарен тумор, но Хер-2/неу позитивни метастази во аксиларни лимфни јазли..

Карра коефициентот имаше вредност од 0.418, што укажува на средна, односно умерена јачина на совпаѓање во експресијата на Хер-2/неу рецепторите помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли. (табела 28.)

Табела 28.

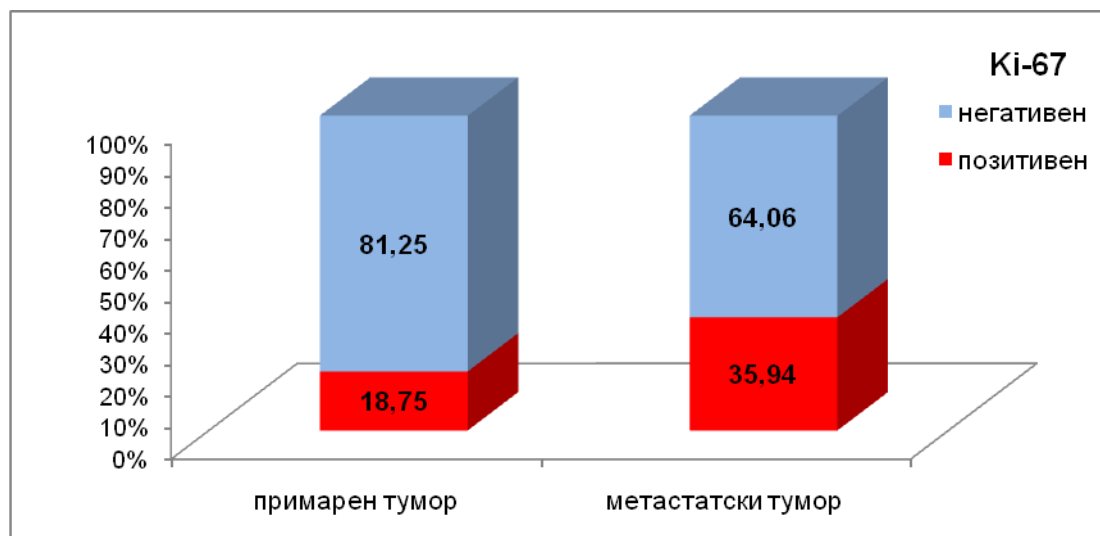
примарен ту	метастатски ту		N	Каппа	T	p-level
	ХЕР-2/неу позитивен	ХЕР-2/неу негативен				
ХЕР-2/неу позитивен	11	3	14	0.418	3.6	<0.001 sig
ХЕР-2/неу негативен	13	37	50			
вкупно	24	40	64			

Резултатите од статистичката анализа покажаа сигнификантно различна пролиферација на Ki-67 кај примарните и метастатски тумори ($p=0.019$). Во примарните тумори сигнификантно почесто од метастазите во аксиларните лимфни јазли беше детектиран повисок процент на Ki-67 обоени клетки, односно повисока пролиферација на Ki-67 маркерот – 81.25% (52) наспроти 64.1% (41). (табела 29, слика 29.)

Табела 29.

Ki-67	примарен тумор	метастатски тумор
	n (%)	n (%)
позитивен	12 (18.75)	23 (35.94)
негативен	52 (81.25)	41 (64.06)

Слика 29.



Z (Wilcoxon matched pairs test) =2.34 p=0.019 sig

Стапката на совпаѓање на Ки-67 пролиферација меѓу примарниот и метастатскиот тумор беше 73.4% (n=47), додека стапката на несовпаѓање беше 26.6% (n=17). Меѓу нив, 21.9% (n=14) пациентки имаа примарен тумор со висока пролиферација, но метастатски тумор со ниска Ки-67 пролиферација, и, 4.7% (n=3) пациентки имаа примарен тумор со ниска пролиферација, но метастатски тумор со висока пролиферација..

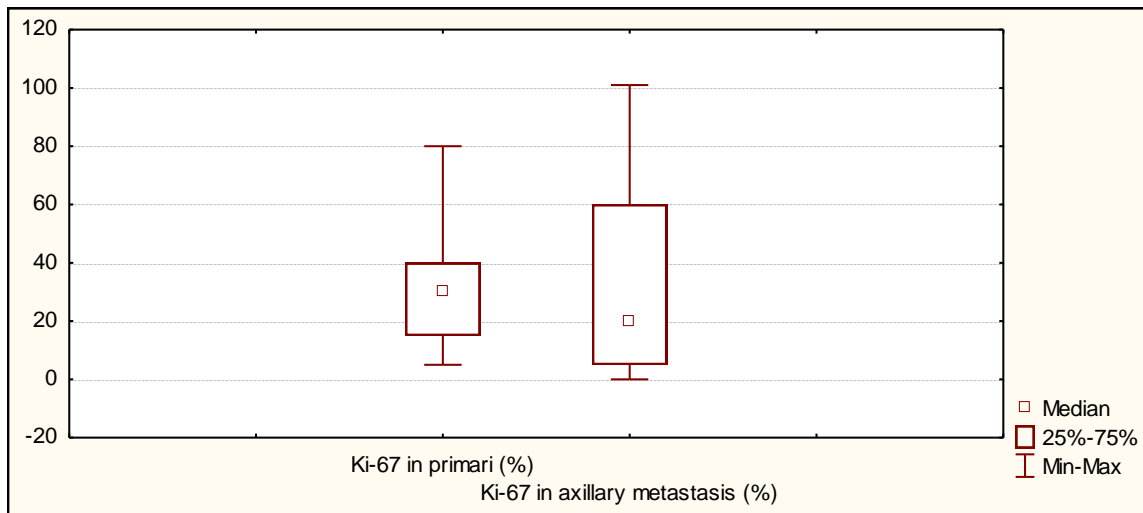
Карра коефициентот имаше вредност од 0.355, што сугерира на заклучок дека постои правилно совпаѓање во степенот на пролиферација на Ки-67 помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли. (табела 30.)

Табела 30.

примарен ту	метастатски ту		N	Каппа	T	p-level
	Ki-67	Ki-67				
	позитивен	негативен				
Ki-67 позитивен	38	14	52	0.355	3.13	0.002
Ki-67 негативен	3	9	12			
вкупно	41	23	64			

Пролиферациониот маркер Ки-67 анализиран како нумеричка варијабла презентираше асиметрична дистрибуција. Оттука, и разликата во процентот на обоени Ки-67 клетки меѓу примарниот и метастатски тумор на дојка ја тестиравме со Wilcoxon matched pairs tets, и истиот разликата ја потврди како несигнификантна ($p=0.46$). (слика 30.)

Слика 30.



Ki-67 примарен vs метастатски $Z=0.74$ $p=0.46$ ns

Пациентките со примарен и метастатски карцином ги поделивме во 6 групи според имунохистохемиските маркери, а потоа групите ги анализиравме според туморскиот градус.

Пациентките со примарен карцином според имунохистохемиските маркери најчесто беа Ер позитивни, Пр позитивни, и Хер2/ неу негативни – 56.25% (36), следено од Ер негативни, Пр негативни, и Хер2/ неу позитивни – 17.2% (11), Ер негативни, Пр негативни, и Хер2/ неу негативни – 14.1% (9), Ер позитивни, Пр негативни, и Хер2/ неу негативни – 7.8% (5), Ер позитивни, Пр позитивни, и Хер2/ неу позитивни – 3.1% (2), Ер позитивни, Пр негативни, и Хер2/ неу позитивни – 1.6% (1).

Анализата на овие 6 групи во однос на степенот на диференцијација покажа дека примарен карцином со градус 3, односно најлошо диференциран карцином имаа двете пациентки кај кои беа докажани сите три имунохистохемиски маркери, 66.7% (6/9) пациентки кај кои не беше докажан ниту еден маркер, 45.55% (5/11) пациентки со Ер.негативен, Пр.негативен и Хер2/ неу позитивен тумор, 40% (2/5) пациентки со Ер.позитивен, Пр.негативен и Хер2/ неу негативен тумор, и 22.2 % (8/36) пациентки со Ер.позитивен, Пр.позитивен и Хер2/ неу негативен примарен карцином.

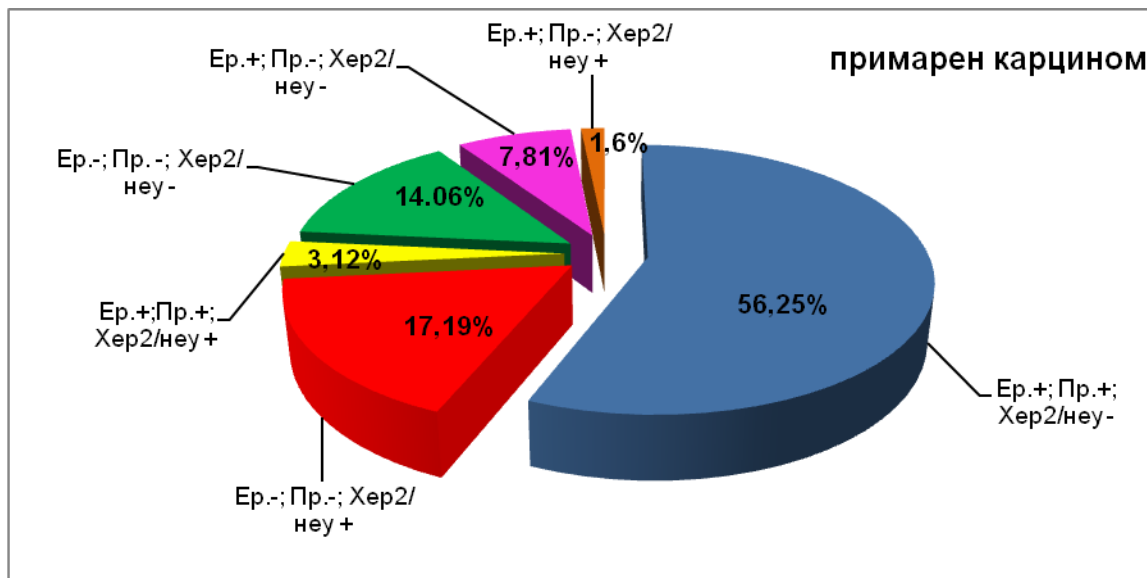
Тестираната разлика во дистрибуцијата на 6-те имунохистохемиски групи примарни карциноми на дојка во зависност од градусот на туморот статистички се потврди како сигнификантна, односно значајна ($p=0.023$). (табела 31, слика 31, 31a.)

Табела 31.

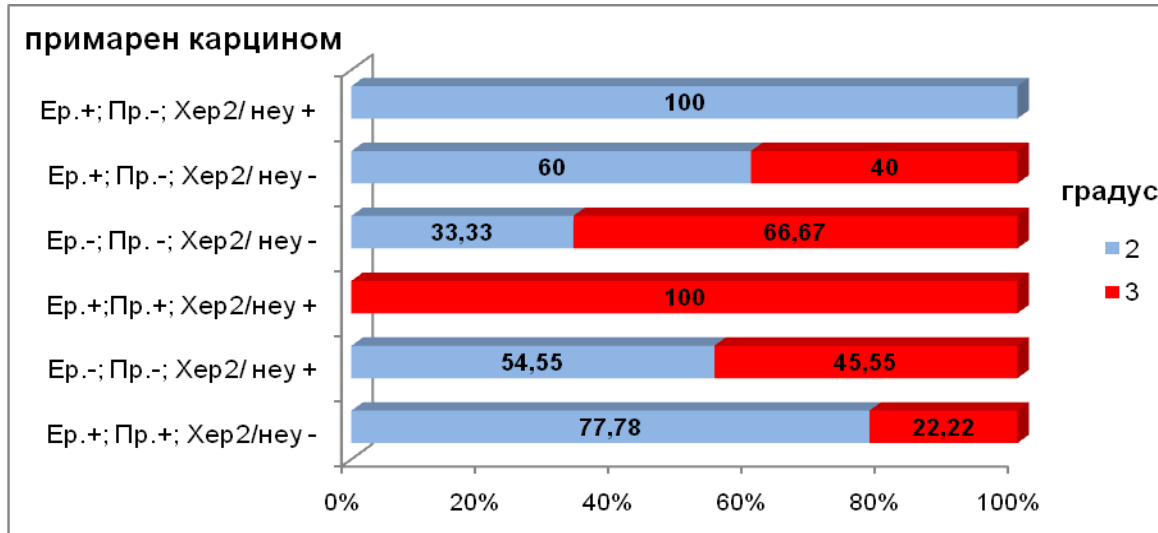
Споредба на групи, базирани на имунохистохемиски маркери и градус примарен карцином					
група	имунохистохемиски маркери	број на случаи	%	градус 2	градус 3
1	Ер.+; Пр.+; Хер2/неу -	36	56.25	28 (77.78)	8 (22.22)
2	Ер.-; Пр.-; Хер2/ неу +	11	17.19	6 (54.55)	5 (45.55)
3	Ер.+;Пр.+; Хер2/неу +	2	3.12	0	2 (100)
4	Ер.-; Пр. -; Хер2/ неу -	9	14.06	3 (33.33)	6 (66.67)
5	Ер.+; Пр.-; Хер2/ неу -	5	7.81	3 (60)	2 (40)
6	Ер.+; Пр.-; Хер2/ неу +	1	1.56	1 (100)	0

Fisher exact $p=0.023$ sig

Слика 31.



Слика 31а.



Дистрибуцијата на 6-те групи метастатски карциноми според имунохистохемиските маркери беше следната: Ер позитивни, Пр позитивни, и Хер2/неу негативни метастатски тумори беа застапени кај 40.6% (26) пациентки, Ер негативни, Пр негативни, и Хер2/неу позитивни кај 21.9% (14) пациентки, Ер негативни, Пр негативни, и Хер2/неу негативни кај 12.5% (8) пациентки, Ер позитивни, Пр позитивни, и Хер2/неу позитивни кај 9.4% (6), Ер позитивни, Пр негативни, и Хер2/неу негативни кај 9.4% (6) пациентки, Ер позитивни, Пр негативни, и Хер2/неу позитивни кај 6.25% (4) пациентки).

Анализата на овие 6 групи во однос на степенот на диференцијација покажа дека метастатски карцином со градус 3, односно најлошо диференциран карцином имаа 26.9% (7/26) пациентки со Ер.позитивен, Пр.позитивен и Хер2/неу негативен тумор, 35.7% (5/14) пациентки со Ер.негативен, Пр.негативен и Хер2/неу позитивен тумор, 83.3% (5/6) пациентки со Ер.позитивен, Пр.позитивен и Хер2/неу позитивен тумор, 25% (2/8) пациентки со Ер.негативен, Пр.негативен и Хер2/неу негативен тумор, 50% (3/6) пациентки со Ер.позитивен, Пр.негативен и Хер2/неу негативен тумор, и 1/4 пациентки со Ер.позитивен, Пр.негативен и Хер2/неу позитивен метастатски тумор.

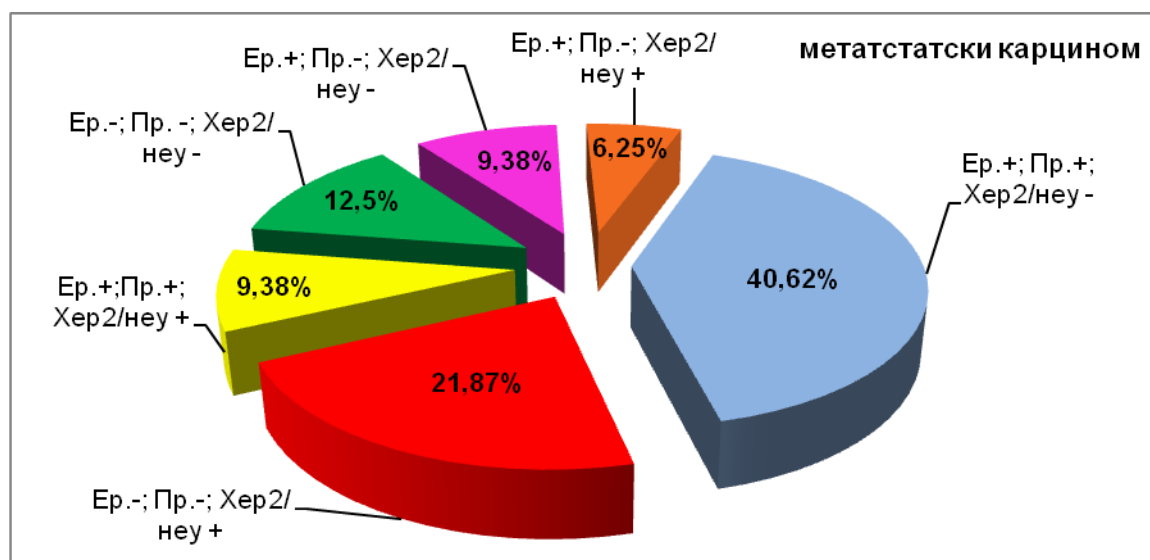
Не беше најдена статистичка сигнификантна разлика во дистрибуцијата на 6-те имунохистохемски групи карциноми на дојка со метастази во аксиларни лимфни јазли, а во зависност од степенот на диференцијација ($p=0.175$). (табела 32, слика 32, 32а.)

Табела 32.

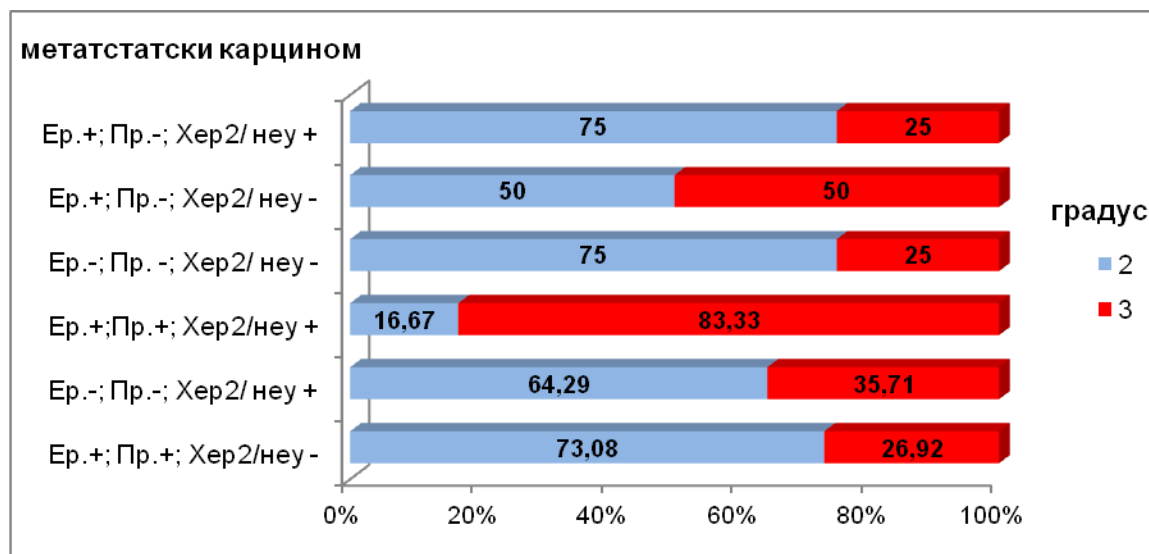
Споредба на групи, базирани на имунохистохемиски маркери и градус метатстатски карцином					
група	имунохистохемијски маркери	број на случаи	%	градус 2	градус 3
1	Ер.+; Пр.+; Хер2/неу -	26	40.62	19 (73.08)	7 (26.92)
2	Ер.-; Пр.-; Хер2/ неу +	14	21.87	9 (64.29)	5 (35.71)
5	Ер.+;Пр.+; Хер2/неу +	6	9.38	1 (16.67)	5 (83.33)
5	Ер.-; Пр. -; Хер2/ неу -	8	12.50	6 (75)	2 (25)
5	Ер.+; Пр.-; Хер2/ неу -	6	9.38	3 (50)	3 (50)
6	Ер.+; Пр.-; Хер2/ неу +	4	6.25	3 (75)	1 (25)

Fisher exact p=0.175 ns

Слика 32.

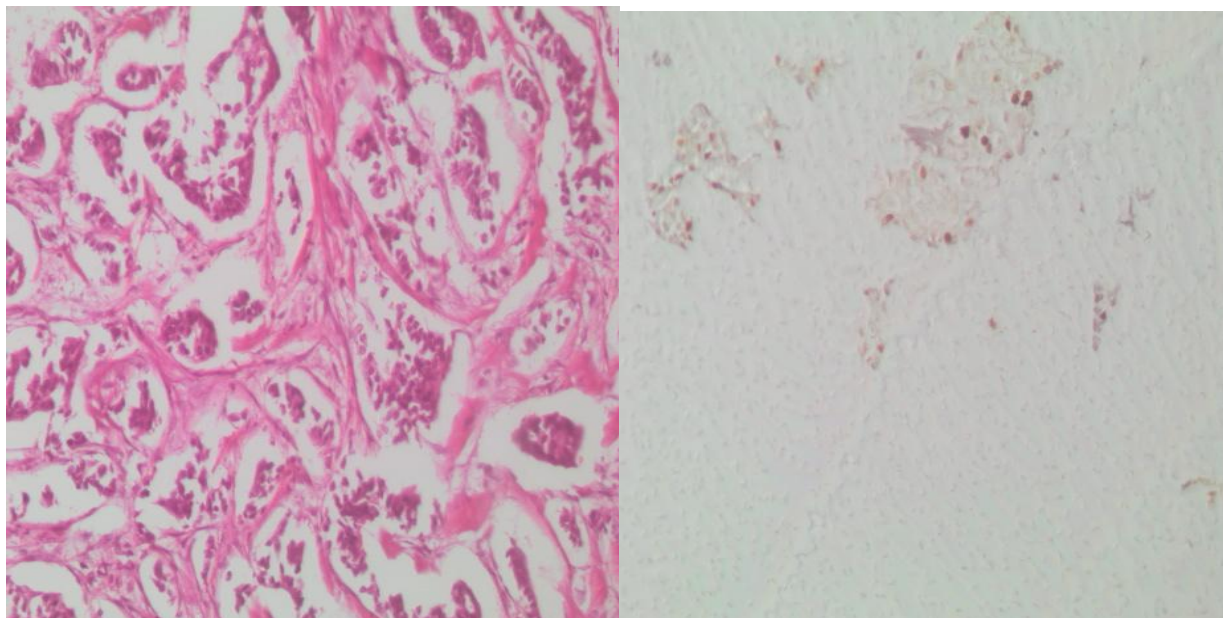


Слика 32а.



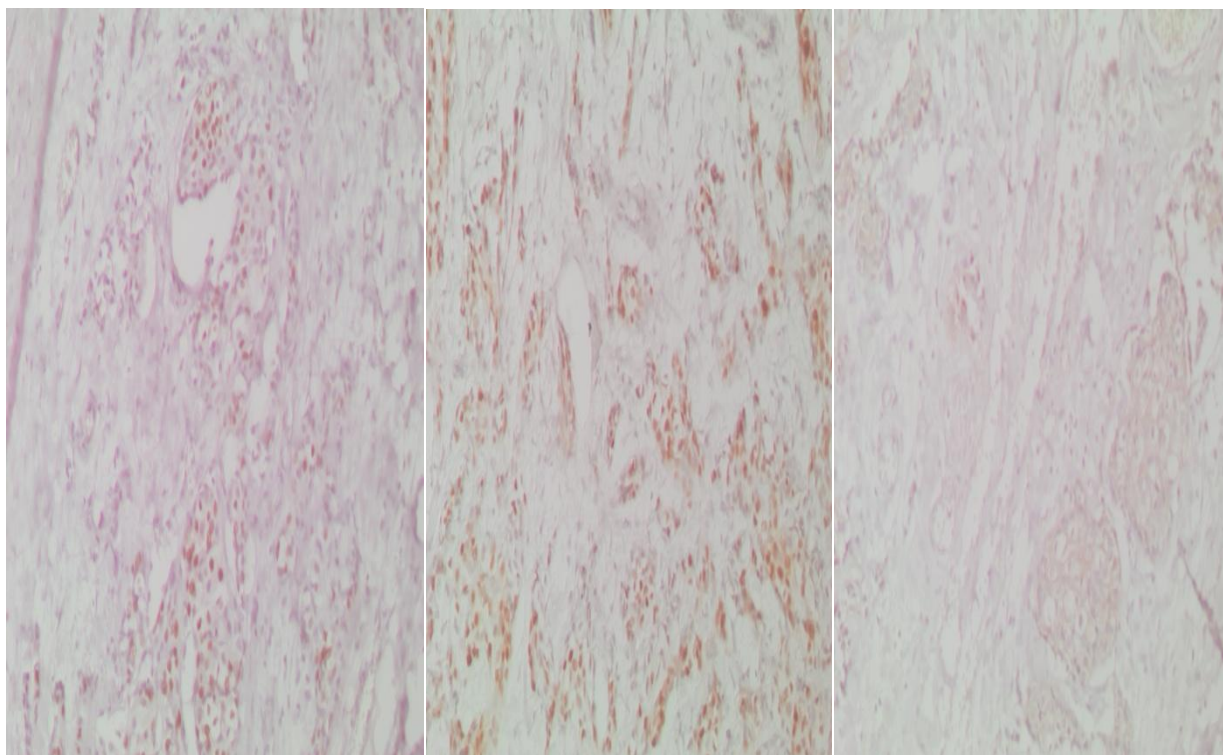
Подолу се наоѓаат неколку микрослики од случаите од нашата студија:

Слика 33. Примарен карцином



Карцином H&E

Ки-67 5%

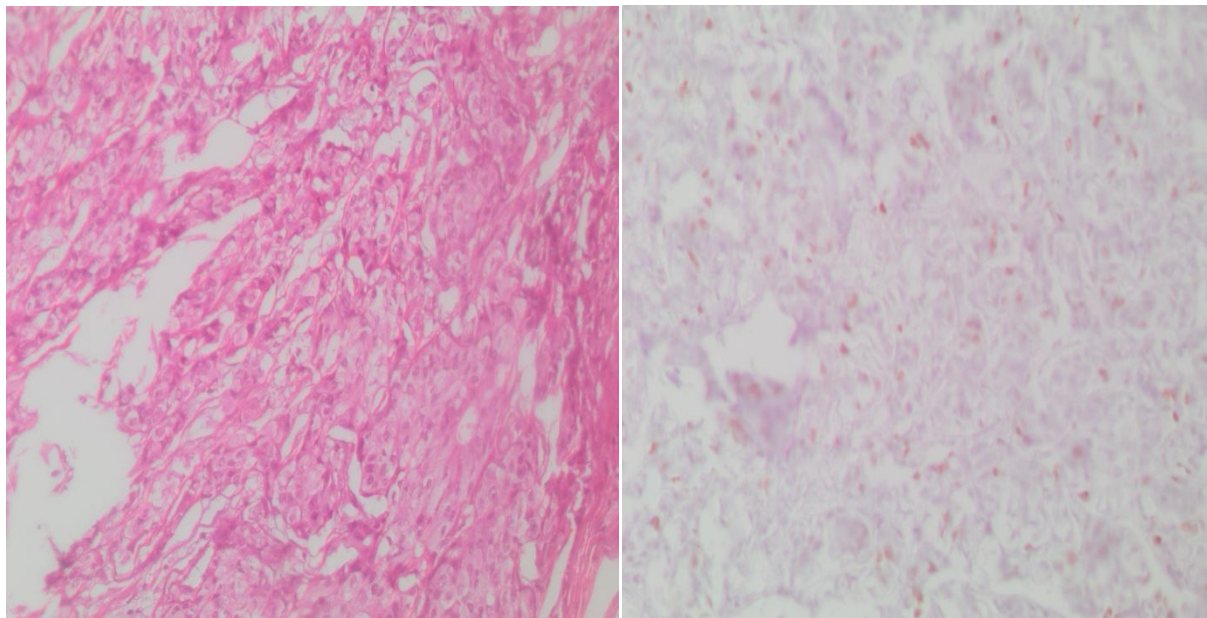


ЕР +

ПР +

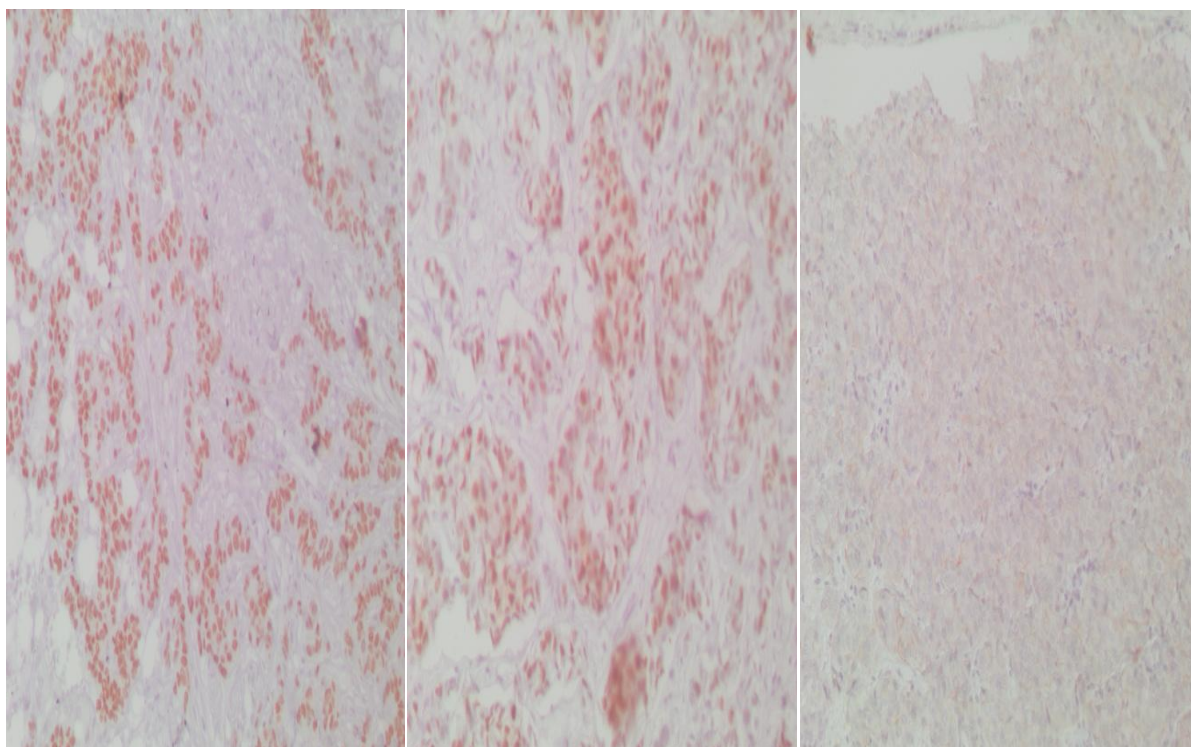
Хер-2/неу -

Слика 33а. Позитивен лимфен јазол



Лимфен јазол Н&Е

Ки-67 3-5%

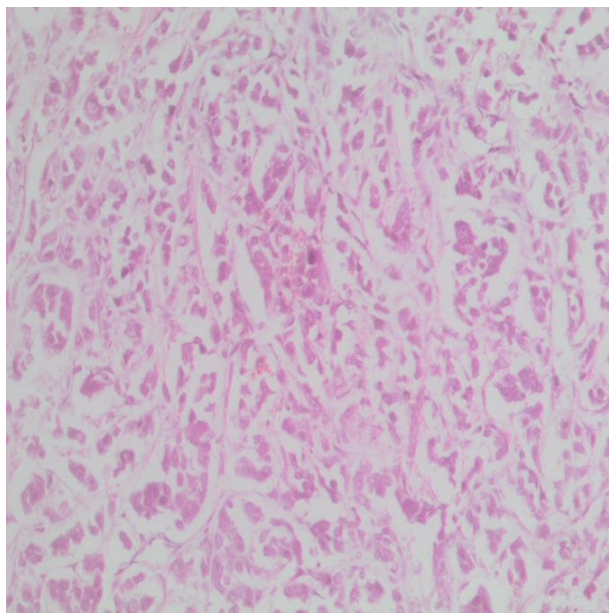


ЕР+

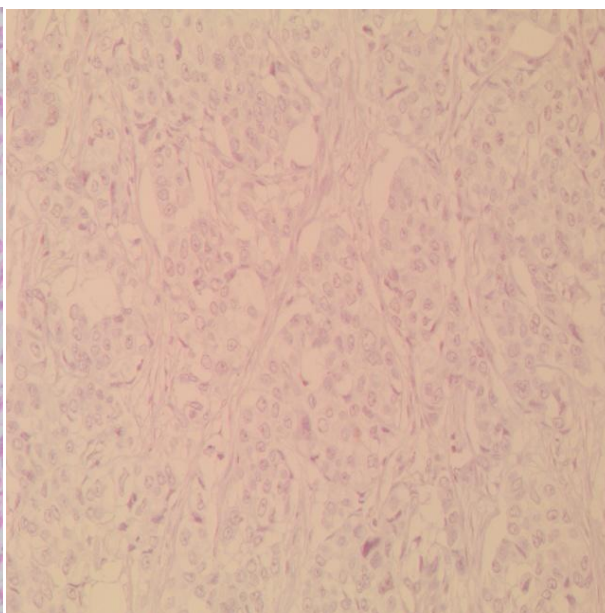
ПР +

Хер-2/неу -

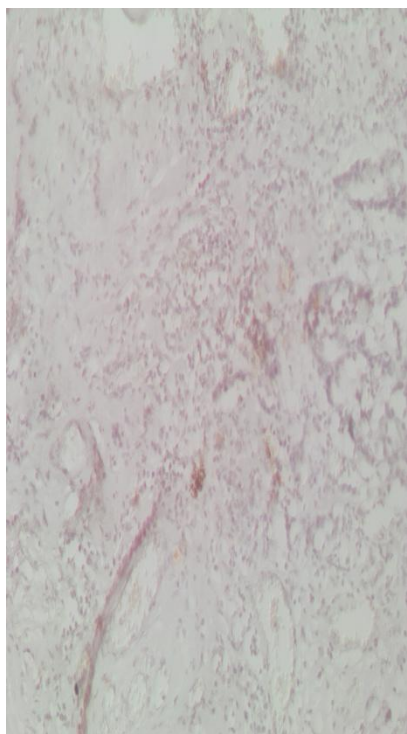
Слика 34. Примарен карцином



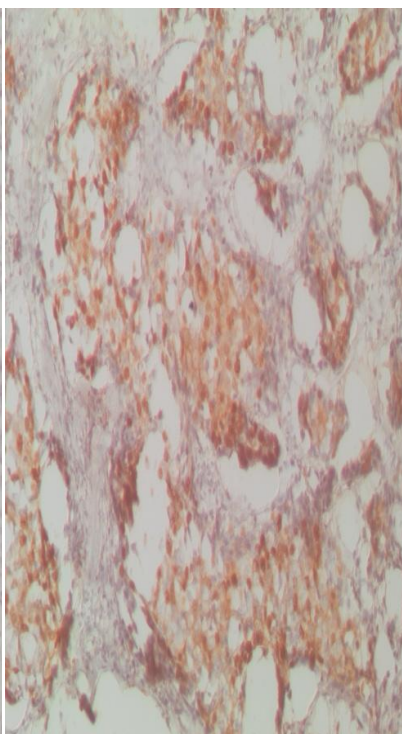
Карцином Н&Е



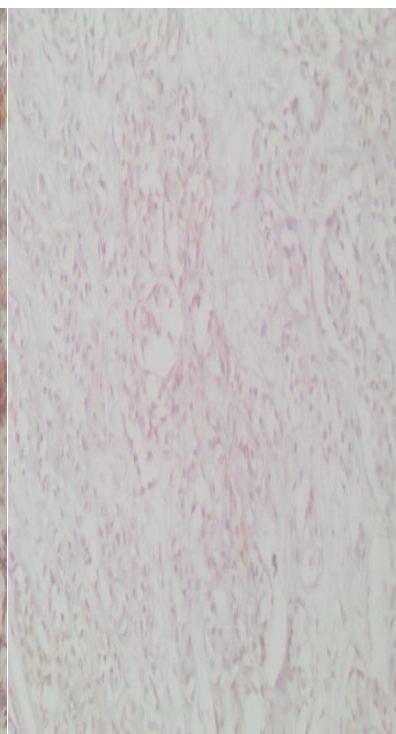
Ки-67 3-5%



ЕР +

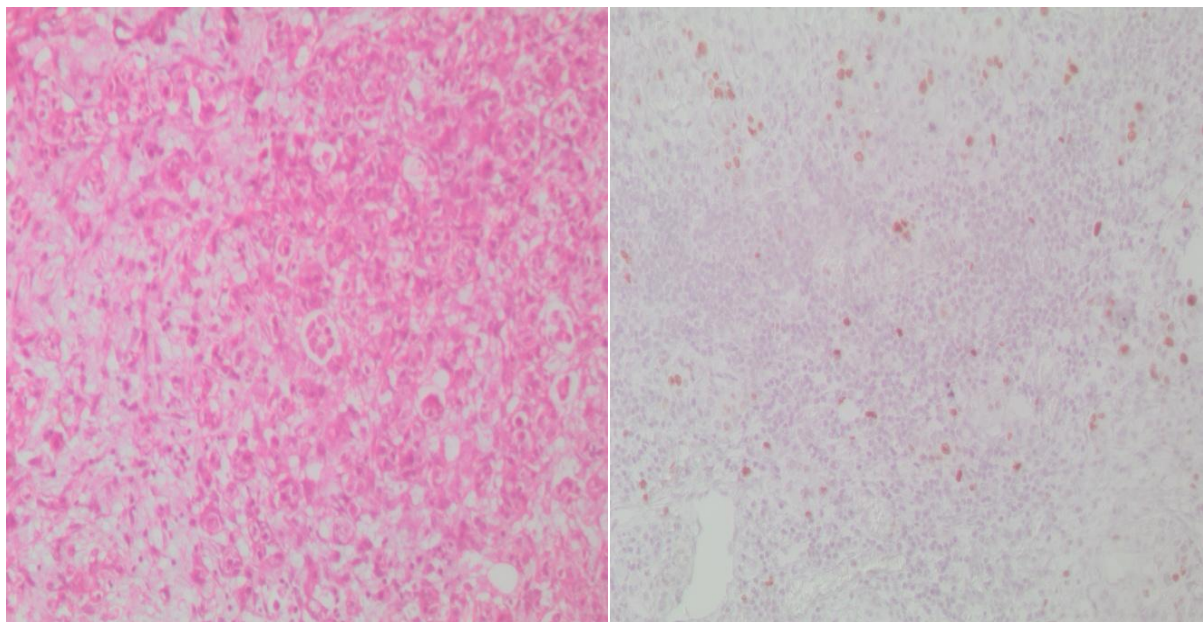


ПР+



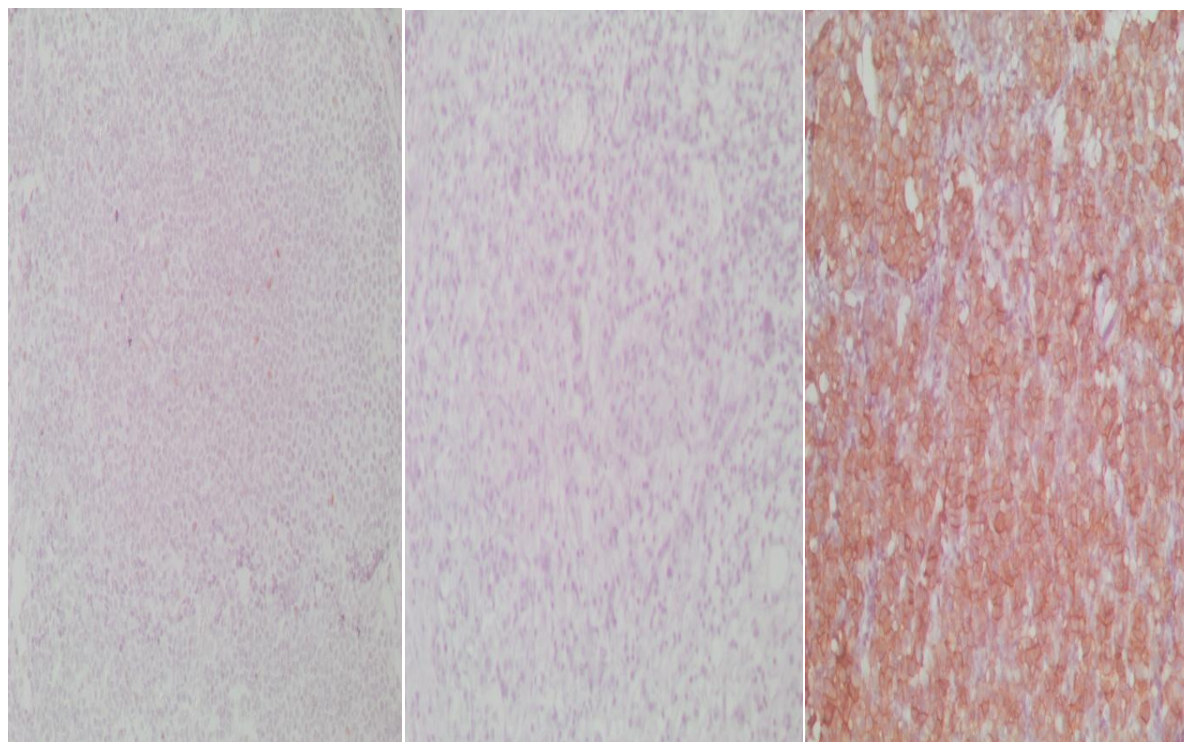
Хер-2/неу -

Слика 34а. Позитивен лимфен јазол



Лимфен јазол Н&Е

Ки-67 1-3%

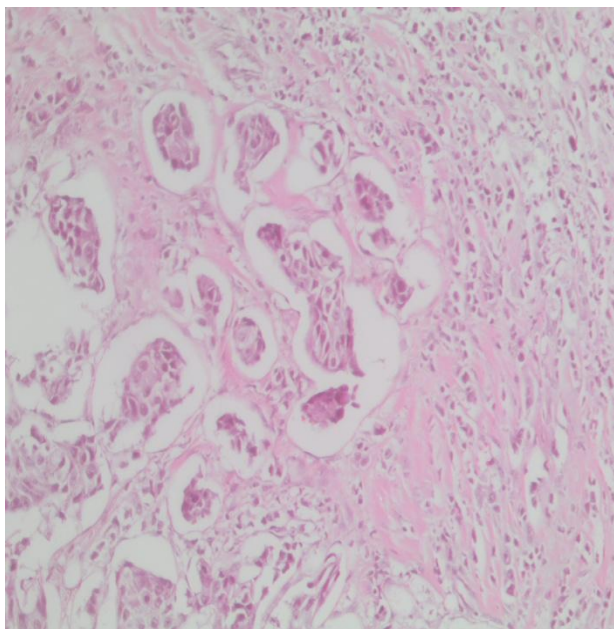


ЕР -

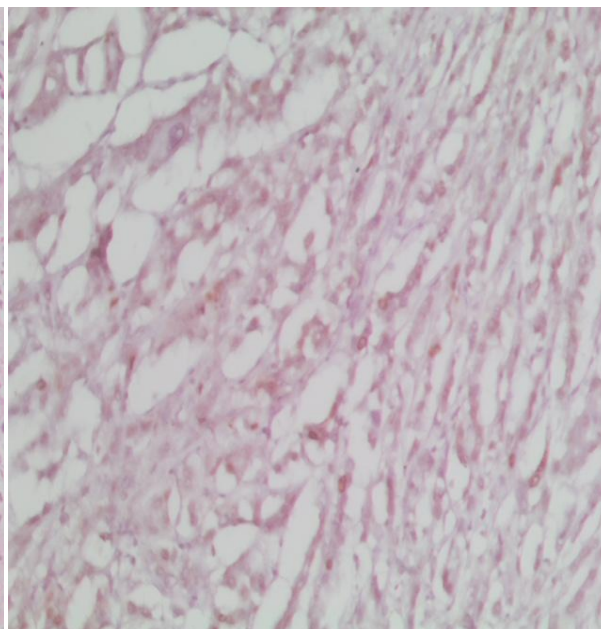
ПР -

Хер-2/неу +

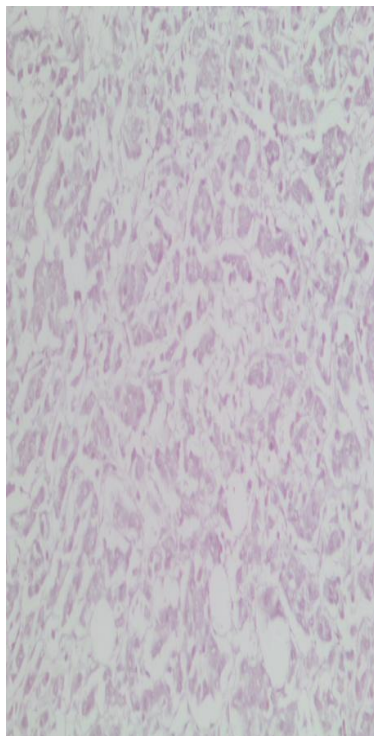
Слика 35. Примарен карцином



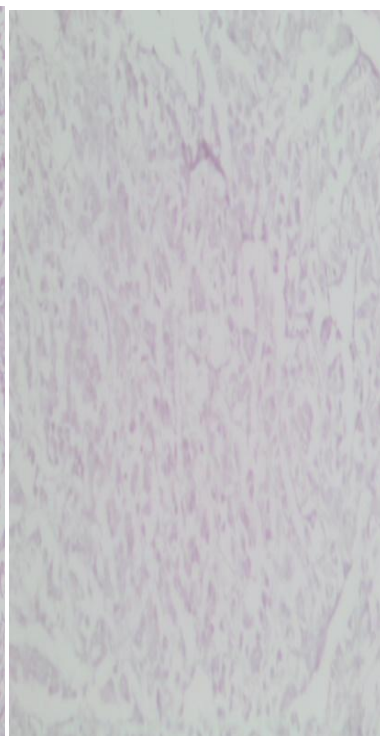
Карцином Н&Е



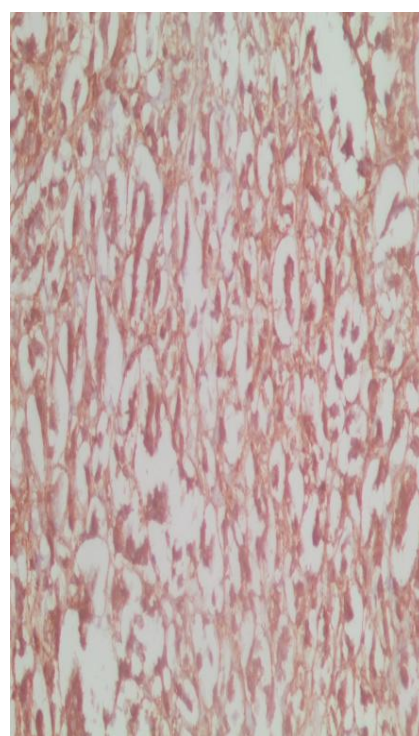
Ки-67 45%



ЕР -

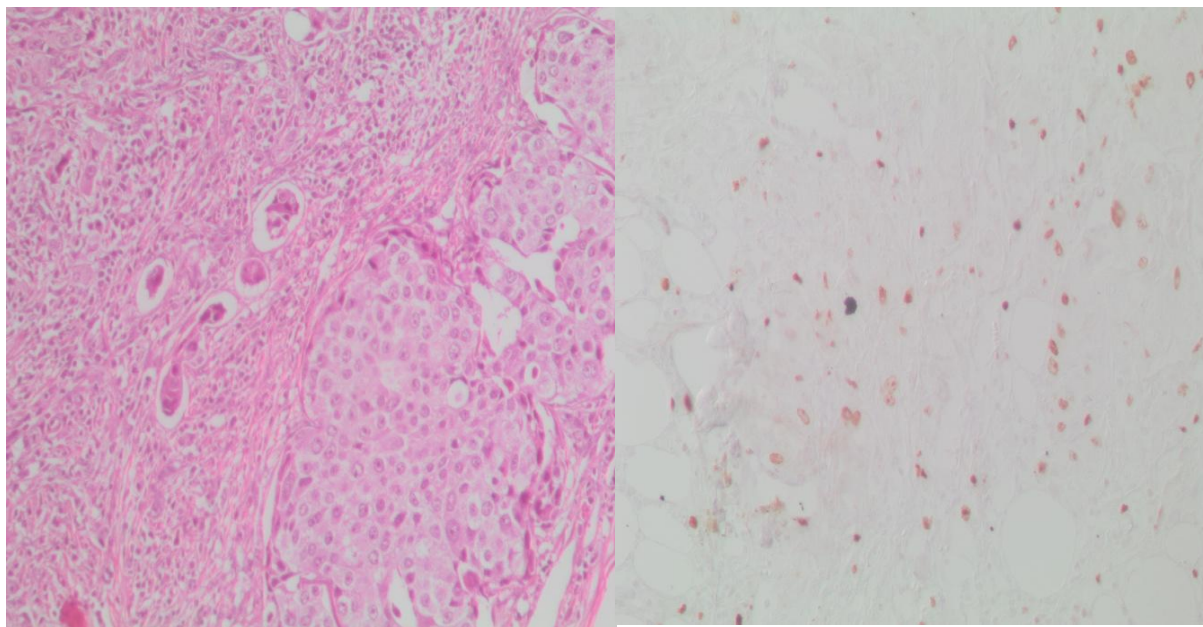


ПР -



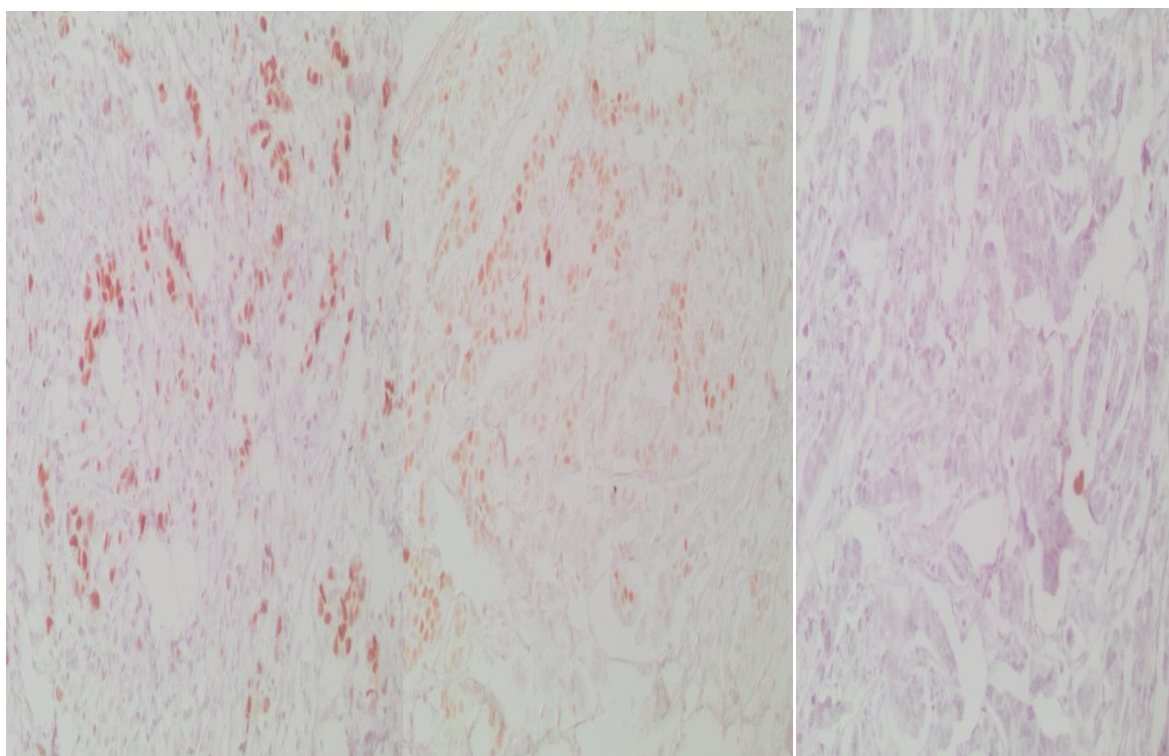
Хер-2/неу +

Слика 35а. Позитивен лимфен јазол



Лимфен јазол Н&Е

Ки-67 5%

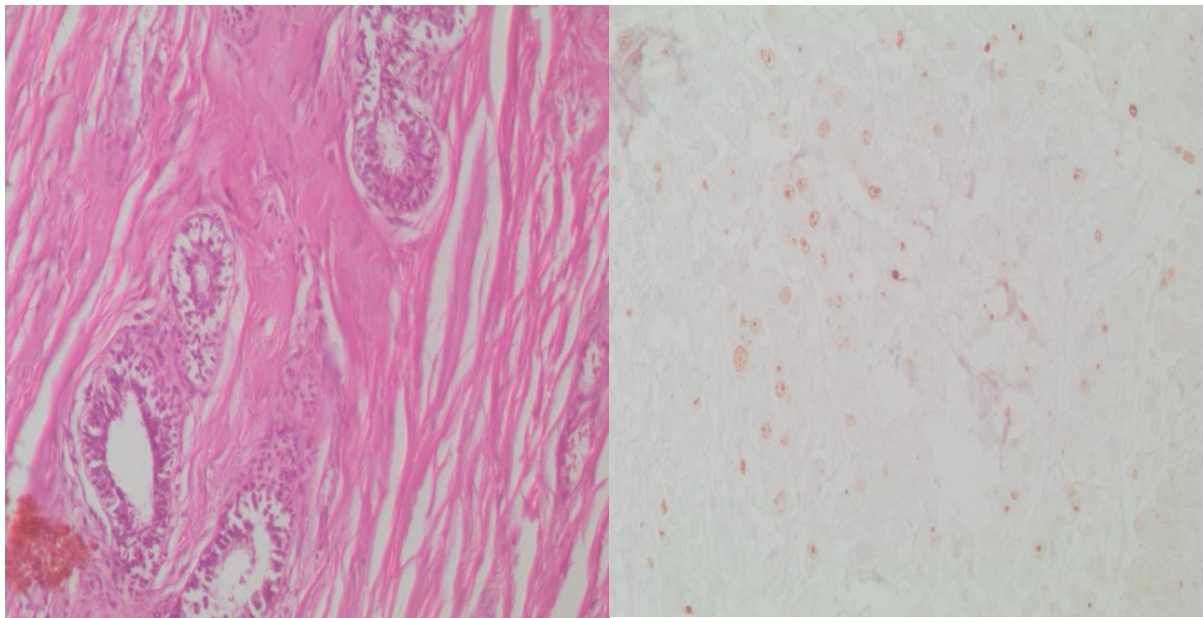


ЕР +

ПР +

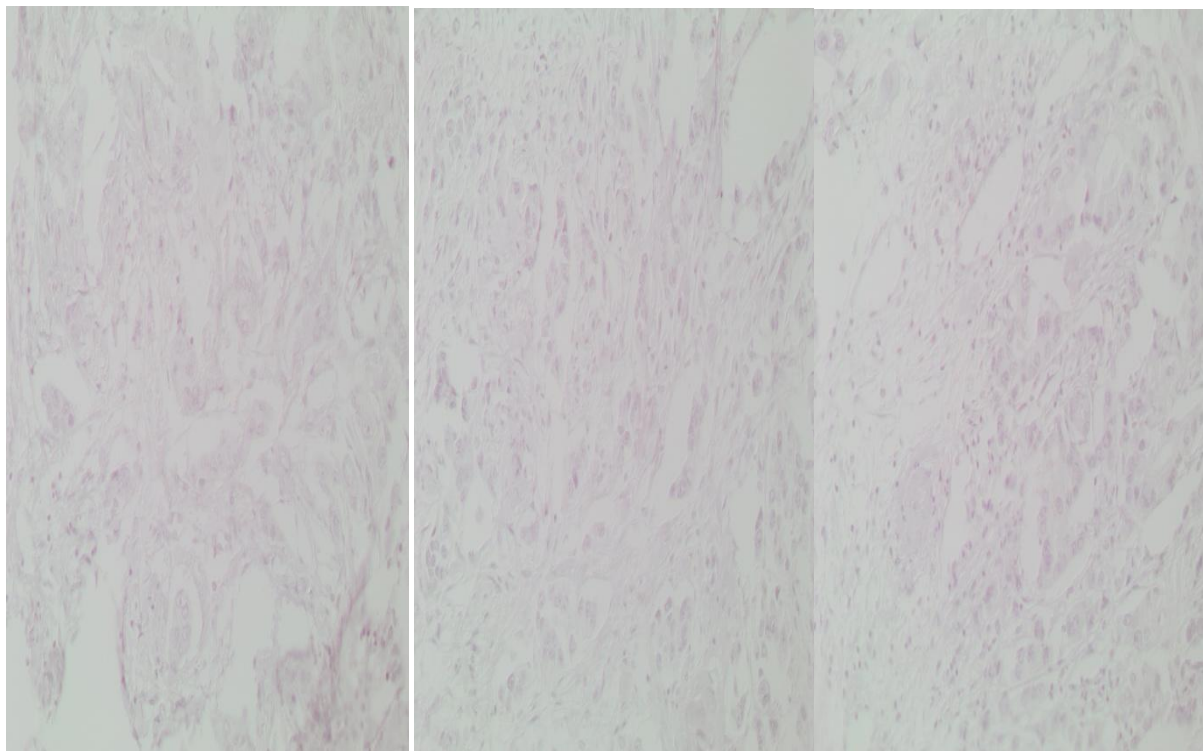
Хер-2/неу -

Слика 36. Примарен карцином



Карцином Н&Е

Ки-67 15-20%

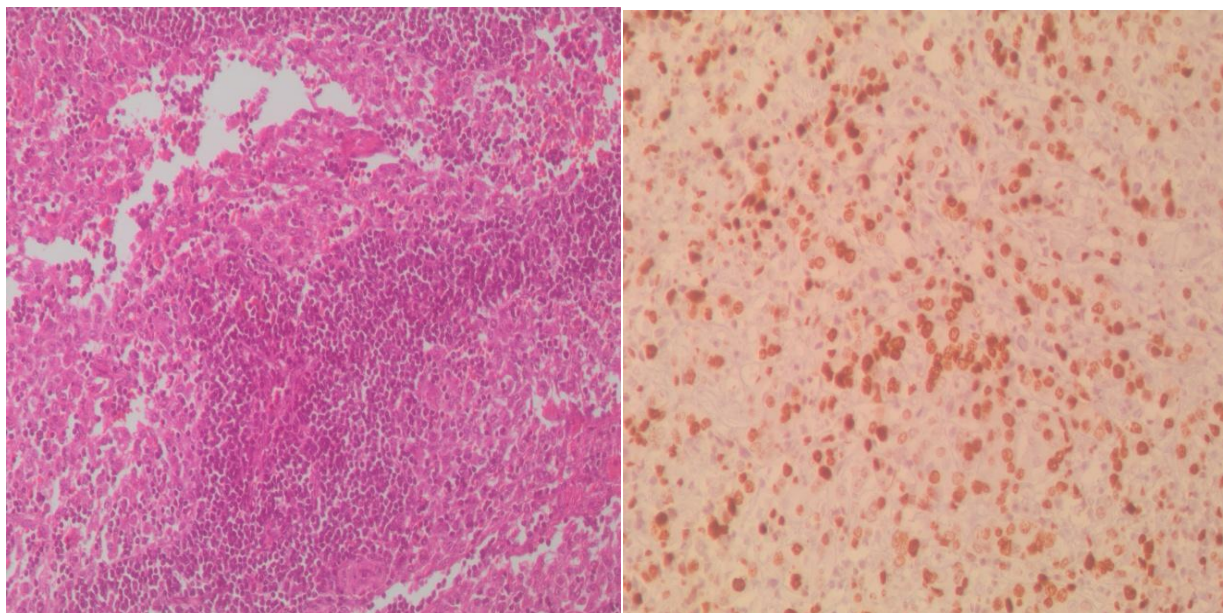


ЕР -

ПР -

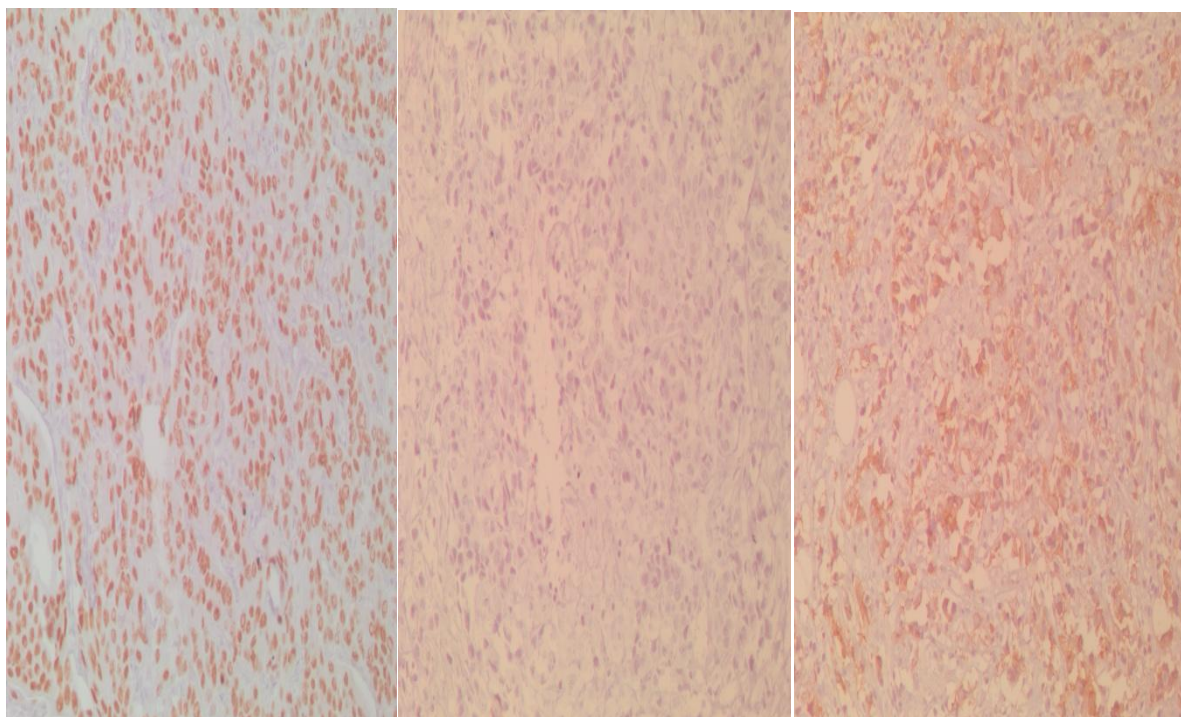
Хер-2/неу -

Слика 36а. Позитивен лимфен јазол



Лимфен јазол Н&Е

Ки-67 70%

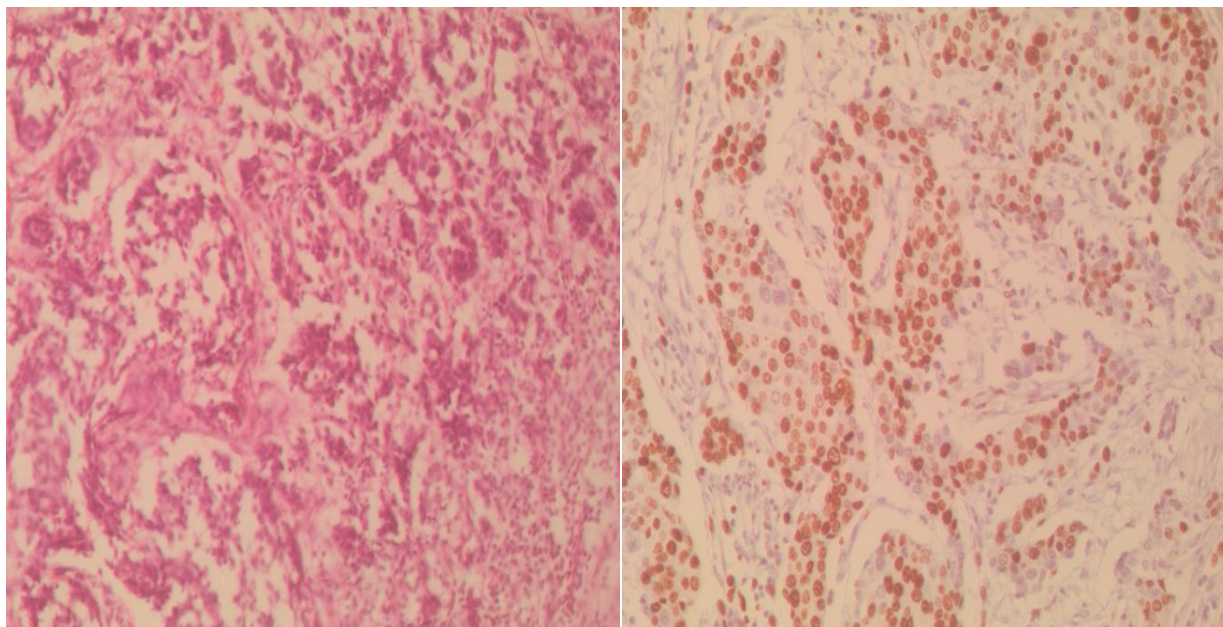


ЕР +

ПР -

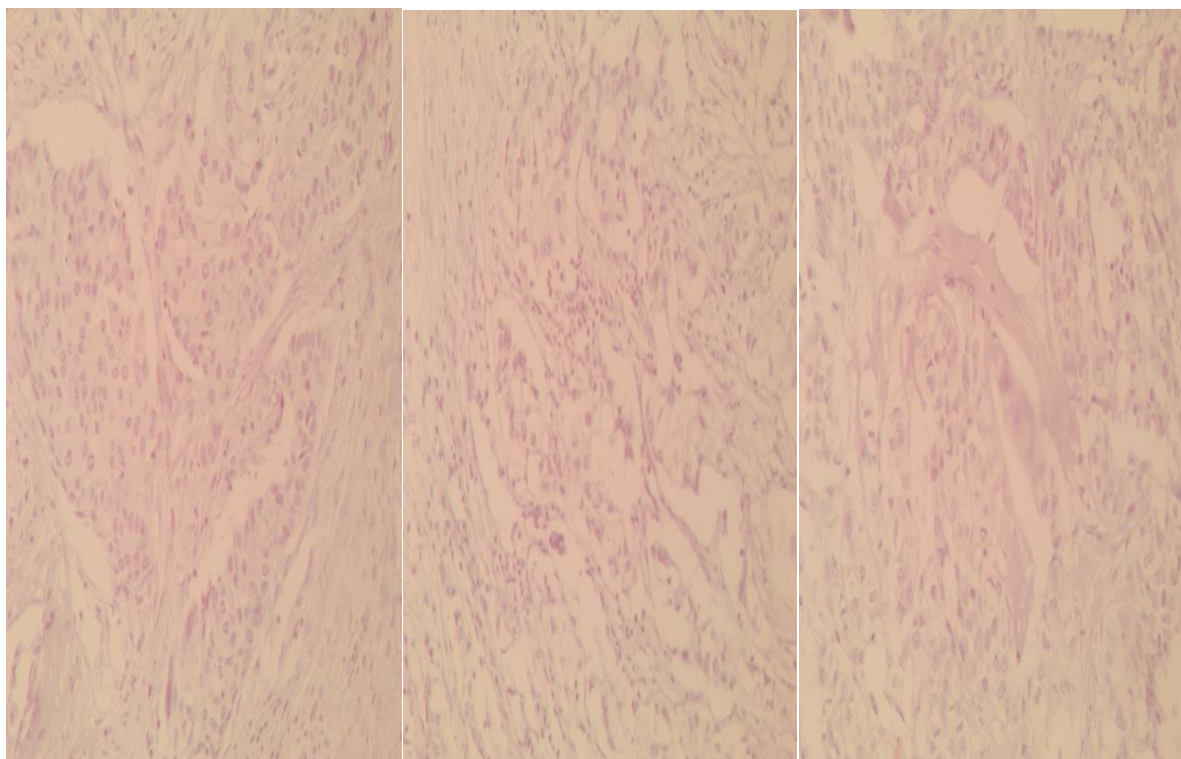
Хер-2/неу +

Слика 37. Примарен карцином



Карцином Н&Е

Ки-67 75%

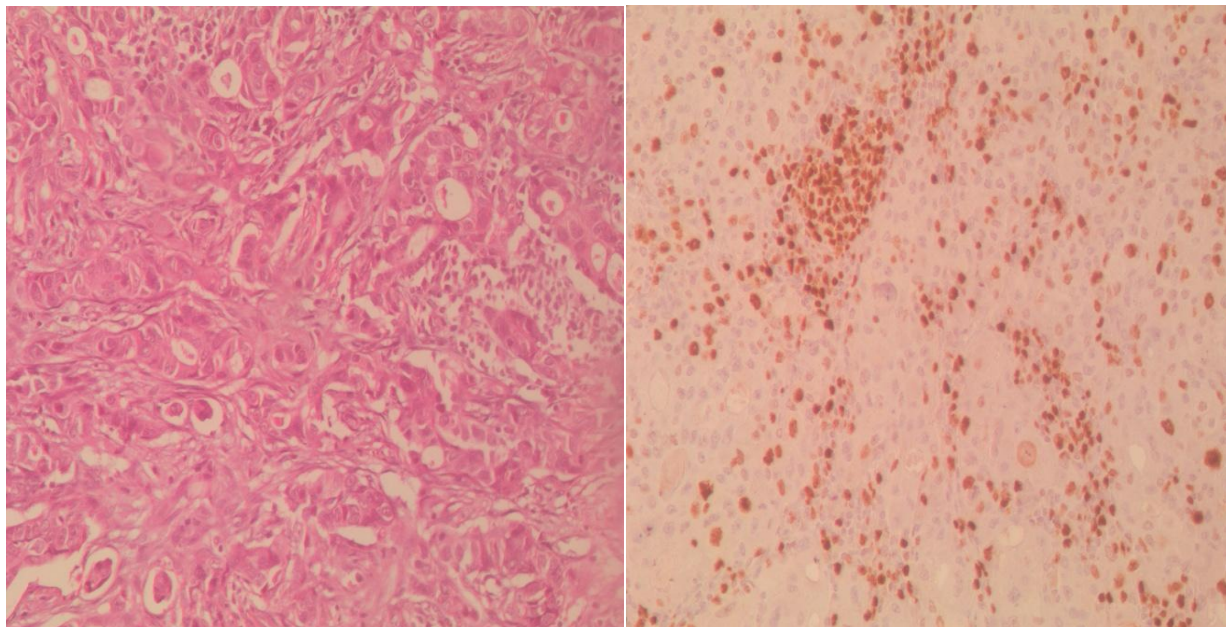


ЕР -

ПР -

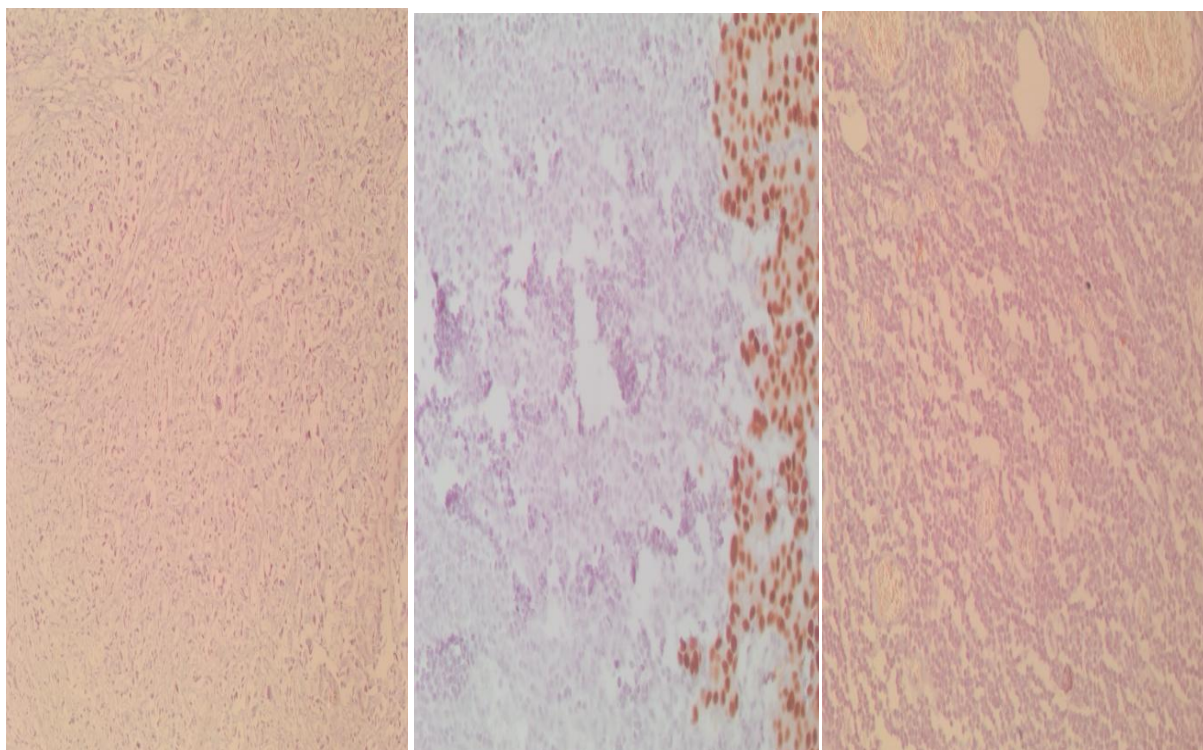
Хер-2/неу -

Слика 37а. Позитивен лимфен јазол



Лимфен јазол Н&Е

Ki-67 35%



ЕР +

ПР +

Хер-2/неу -

7. ДИСКУСИЈА

Ракот на дојката е најчестата неоплазма со висок степен на смртност. Многу податоци покажуваат дека карциномот на дојка се опишува како хетерогена променлива болест, од клинички и патолошкиот аспект, но исто така и од одговорот на терапијата и прогнозата. (142, 143, 144) Карциномот на дојката рутински се вреднува освен спрема степенот и стадиумот, и со статусот на хормонските рецептори (ЕР и ПР), експресија на Хер-2 /неу и експресија на Ки-67, детерминирани преку имунохистохемиски методи со цел да се дојде до точната дијагноза и за да се избере соодветна терапија. (141, 145, 146)

Како ризик фактори за појава на ракот на дојката се утврдени: репродуктивните фактори, хормоналната нерамнотежа, диета и како многу честа појава се покажува поврзаноста со семејството во споредба со другите неоплазми, каде што се идентификуваат два гена (БРЦА1 и БРЦА2), кои значително го зголемуваат ризикот од рак на дојка. (137)

Повеќе од 95% од сите карциноми на дојка припаѓаат на инвазивен дуктален карцином. Инвазивниот карцином на дојка е група на епителијални малигни тумори кои се карактеризираат со инвазија на околотото ткиво и е со изразена тенденција за метастази, каде почесто се сретнуваат аксиларни лимфни јазли, кои во исто време претставуваат значаен прогностички фактор. (137, 147, 148)

Класичниот хистопатолошки преглед што придонесува за прогноза и третман на пациентите вклучува: големина на туморот, хистолошки подтип, степен на диференцијација, метастази во лимфните јазли, лимфоваскуларна инвазија, експресија на ЕР и ПР рецептор, прекумерна експресија на Хер-2/неу и индекс на пролиферација преку Ки-67. Овие податоци се добиени преку внимателните патолошки студии во примероците од пациентите со карцином на дојка. (147, 149, 150, 151,152, 153, 154,155)

Преживување на карцином на дојка е поврзан со рано откривање, навремено и правилно лекување, како и генетска предиспозиција. (156)

Нашата цел беше со помош на имунохистохемијската метода да го идентификуваме статусот на хормонските рецептори (ЕР и ПР), експресијата на Хер-2/неу и експресијата на Ки-67 кај пациентки со карцином на дојката во Косово, сакајќи да ја евалуираме нивната поврзаност со степенот на диференцијација на туморот и да се детерминира присуство на совпаѓање или несовпаѓање на овие маркери помеѓу примарниот инвазивен карцином на дојка и метастатскиот депозит во аксиларните лимфни јазли.

Овој пристап рутински се изведува за секој случај со инвазивен карцином на дојка, бидејќи пациентите со позитивен ЕР и ПР статус подлежат на адјувантна хормонска терапија, обично Тамоксифен, а пациентите со прекумерна експресија на Хер-2 /неу, подлежат на терапија со Трастузумаб, кој е насочен кон рецепторот Хер-2. (157, 158) Ки-67 е еден важен маркер на апликацијата на адјувантна терапија. (140, 141, 159, 160)

Во нашата студија беа вклучени 64 испитанички, пациентки со инвазивен рак на дојка и со метастази во аксиларните лимфни јазли. Просечната возраст на пациентите беше 53 годишна возраст, (најмладата пациентка имаше 31 години, најстарата беше на 75 годишна возраст) што е приближно на средната возраст во контекст на студии на Azizun-Nisa и сор., Sharif MA и сор., и Ieni A и сор. каде што изнесува 48 години, т.е. 59 години. (156, 161, 162)

Левата дојка беше повеќе вклучена во споредба од десната дојка, односно 53% со 47%, споредено со податоците на студијата на Azizun-Nisa и сор. во кои исто така почесто е застапена левата дојка со 57%. (156)

Повеќето тумори беа со градус 2 (64%), а остатокот од туморите (26%) вклучени во студијата беа градус 3, што е во согласност со другите студии. (145, 161, 163, 164.) Во нашата студија не е забележан случај со градус 1 на туморот, исто како и во студијата на Atif N и сор. и Baswal P и сор. (145, 165)

Големина на туморот се движеше од 1.3 до 11.5 цм, со просечна големина од 3.2 цм, додека половина од случаите се со големина на тумор поголема од 2.8 цм. Слична големина на тумори е прикажана и во студијата на Sepideh S и сор., каде што големината на туморот се движи од 0.5 до 16 цм, со просечна големина од 3.15 цм. Исто така и во

студијата на Azizun-Nisa и сор. големината на туморот се движи од 0.3 до 15цм, односно во студијата на Sharif MA и сор. просечна големина на туморот е 4.4 цм. (164, 156, 161)

Анализата на експресијата на хормоналните рецептори во примарниот тумор, покажа дека ER беше експресиран кај 68.7% од случаите, од кои 72.7% беа со градус 2, додека 27.3% беа со градус 3 на туморот. Прогестерон рецепторот беше експресиран кај 59.4% на случаите, од кои 73.7% беа со градус 2, и 26.3% беа со градус 3 на туморот, податоци кои се совпаѓаат со резултатите од други студии. (145, 156, 159, 166, 167).

Во нашата студија фреквенција на Хер-2/неу реактивност е забележан кај 21.9% на случаите во примарниот тумор, од кои градус 2 и 3 на туморот беа подеднакво вклучени со по 50%. Нашите резултати се совпаѓаат со резултатите од студијата на Sharif MA и сор., каде што експресијата на Хер-2/неу била забележана кај 31% на случаите, во студијата на Geethamala K и сор. со 25%, како и во студијата на Azizun-Nisa и сор. со 37.4%. Во студиите на други автори, прекумерната експресија на Хер-2/неу рецепторот е на повисоко ниво од нашата студија, како на пример во студијата на Atif N и сор. и Ranatunga N и сор., каде што оваа експресија била најдена кај 45% на случаите. (161, 160, 156, 145, 159). Високиот процент на зголемена експресија за Хер2/неу може да се должи на лажно позитивни случаи или селектирана група на пациенти.

Во првиот дел од студијата направивме анализа на хормонални рецептори (ER и PR), Хер-2/неу прто-онкогенот и индекс на пролиферација преку Ки-67 маркерот во однос на степенот на диференцијација на туморот кај примарниот карцином на дојка и кај метастазите во аксиларните лимфни јазли.

Земајќи ги предвид градусот на туморот и хормоналните рецептори кај примарниот карцином на дојка, повеќето пациенти со градус 2 на туморот беа позитивни за хормоналните рецептори (ER и PR), која е во согласност со студиите на Atif N и сор. и Baswal P и сор. (145, 165). Во нашата студија случаите со градус 3 на туморот беа позитивни на хормоналните рецептори, шшто исто така беше во согласност со резултатите од голем број студии (163, 168, 169, 170, 171), но е спротивно со резултатите на Atif N и сор., каде не се пронајдени случаи со позитивни хормонални рецептори и со градус 3 на

туморот.(145) Нашите резултати покажуваат дека постои значителна корелација помеѓу експресијата на EP и степенот на диференцијација на примарниот тумор, при што позитивните EP тумори најчесто се со градус 2 на туморот. Во групата на EP негативни случаи на примарниот тумор, поголемиот број на случаи беа слабо диференцирани. Овие податоци се совпаѓаат со резултатите од студијата на Kurshumliu F и сор., Atif N и сор. (147, 145)

Експресијата на EP рецепторот кај метастази на аксиларните лимфни јазли не покажа сигнификантна поврзаност со степенот на диференцијација на туморот. Најголемиот број на случаите кај аксиларните метастази кои беа EP позитивни беа слабо диференцирани, и помал број беа EP негативни.

Исто така најдено е дека експресијата на EP и ПР беше помала кај Хер-2/неу позитивните тумори, во споредба со туморите Хер-2/неу негативни. Но, сепак значителен број на Хер-2/неу позитивни тумори експресират EP и ПР. Овие резултати се совпаѓаат со резултатите во студијата на авторот Azizun-Nisa и сор.(156)

Анализата на експресијата на ПР рецепторот кај случаи со примарен тумор, покажа дека случаите кои се ПР позитивни (59.37%) се подобро диференцирани во споредба со групата од ПР негативните случаи (40.63%). Треба да се напомене дека врската помеѓу ПР експресијата кај примарниот тумор со степенот на диференцијација на туморот не е статистички значајна. Резултатите за ПР експресијата во оваа студија се слични со резултатите од другите студии, соодветно на студијата на Sharif MA и сор.,(161) каде што оваа експресија е 62.2%, во студијата на Atif N и сор.(145) 43.9%, кај Desai SB и сор. (167) 46%, а во студијата на Ranatunga N и сор.(159) е 50%.

Во нашата студија умерено и лошо диференцираните тумори имаат слична експресија на ПР рецептори во метастазираните лимфни аксиларни јазли.

Спрема Zhao и сор. моделот на EP експресијата во примарниот тумор би можела да се користи за предикција на совпаѓањето на EP експресија меѓу примарниот и синхронит метастатски тумор. Висок степен на совпаѓање на EP статусот меѓу примарниот тумор и метастазата би требало да се очекува кај пациенти со униформна EP експресија

во примарниот тумор. Дискордантност во ER статус меѓу примарниот карцином и синхроната метастаза се должи на променлива експресија во примарниот тумор. Така несовпаѓањето на експресијата во примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли најверојатно се должи на туморската хетерогеност и на постоењето на клонови од малигни клетки со различен метастатски потенцијал и различен хормонален статус во примарниот тумор. Оттука и нашите резултати индицираат дека е несоодветно да се предвиди статусот на ER, PR и Хер2/неу во метастските депозити базирано на анализата на нивната експресија во примарниот тумор.

Хер-2/неу рецепторот е епидермален фактор на раст што се наоѓа во површината на клетката и пренесува сигнал за раст на јадрото на клетката. Прекумерната експресија на овој рецептор (Хер-2/неу) е поврзана со лоша прогноза, додека експресијата на ER и PR рецепторите е индикатор за одговор на хормонска терапија и на добра прогноза. (145, 147, 156)

Во нашата студија експресијата на Хер-2/неу не покажа значителна разлика споредено со степенот на диференцијација на примарниот тумор. Хер-2/неу позитивните случаи почесто се слабо диференцирани од групата на Хер-2/неу негативните тумори. Во нашата студија случаите со прекумерна експресија на Хер-2/неу кај примарниот тумор беа забележани кај 21.9% случаи, што е слично со резултатите од студијата на Sharif MA и сор., каде е забележано во 31% од случаите, во студијата на Azizun-Nisa и сор. е забележано во 24.7% од случаите, и кај студијата на Geethamala K и сор. во 25% од случаите. Прекумерната експресија на Хер-2/неу прото-онкогенот, кај лимфните аксиларни метастази не покажа значителна разлика споредено со хистолошкиот градус на туморот. Разликата помеѓу метастатските тумори кои се Хер-2/неу позитивни и лошо диференцирани, и оние кои се Хер-2/неу негативни не е статистички сигнификантна, што е слично со резултатите од некои други автори.(161, 165, 160)

Во групата од 14 Хер-2/неу позитивни примарни тумори, поголемиот број од случаи беа естроген негативни. Испитуваната корелација помеѓу Хер-2/неу и естрогенските рецептори во примарниот тумор беше статистички сигнификантна, што покажува дека оваа корелација е негативна, односно индиректна, и покажува дека Хер-2/неу експресијата

во примарните тумори се намалува со зголемување на експресијата на естрогенските рецептори и обратно. Овие податоци се исти како и податоците на авторот Sharif MA и сор.(161), кој забележал иста ситуација, како и кај студиите на некои други автори. (156, 147, 145, 172)

Во групата од 14 Хер-2/неу позитивни примарни тумори, 12 случаи беа прогестерон негативни. Статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација беше најдена помеѓу Хер-2/неу и прогестеронските рецептори во примарниот тумор. Овој статистички коментар кажува дека со зголемување на експресијата на прогестеронските рецептори во примарните тумори, Хер-2/неу експресијата се намалува и обратно. . Овие податоци се исти како и податоците на авторот Sharif MA и сор., кој забележал иста ситуација и кај студиите на некои други автори како што се: Azizun-Nisa и сор., Kurshumliu и сор., Atif N и сор., Zeillinger R и сор. (161, 156, 147, 145, 172)

Во групата од 24 Хер-2/неу позитивни метастатски тумори, поголемиот број од случаи 70.8% (17) беа естроген негативни. Помеѓу Хер-2/неу и ЕР во метастатскиот тумор имаше статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација, односно поврзаност. Оваа корелација покажува дека со зголемување на експресијата на естрогенските рецептори во метастатските лимфни јазли, Хер-2/неу експресијата се намалува и обратно. Нашите резултати се во спротивност со резултатите објавени од авторот Sharif MA и сор., кој пронашол позитивна поврзаност помеѓу ЕР рецепторот и Хер-2/неу во метастази на аксиларни јазли. (161)

Во групата од 24 Хер-2/неу позитивни метастатски тумори, поголемиот број од случаи беа прогестерон негативни отколку позитивни. Статистичка сигнификантна негативна, индиректна корелација беше најдена помеѓу Хер-2/неу и прогестеронските рецептори во метастатскиот тумор. Оваа корелација покажува дека со зголемување на експресијата на прогестеронските рецептори во метастазираните аксиларни лимфни јазли, Хер-2/неу експресијата се намалува, и обратно. Овој наод е во спротивност со студијата на авторот Sharif Ma и сор. (161)

Ки-67 маркерот е испитан како прогностички фактор во карциномот на дојка. Антигенот на Ки-67 се изразува во јадрото на клетките кои што се во циклус, и заради оваа причина

ја рефлектира (одразува) пролиферацијата на клетките.(173) Во нашата студија истражуваната корелација помеѓу индексот на пролиферација мерена преку Ки-67 кај примарниот карцином на дојка и степенот на диференцијација на туморот покажа статистичка сигнификантност. Примарните карциноми со висок процент на Ки-67 беа лошо диференцирани и обратно. Од 12 случаи со пролиферација пониска од 14%, 11 (92%) случаи беа со градус 2, додека од 52 случаи со пролиферација повисоко од 14%, 30 случаи (58%) беа со градус 2, а останатите со градус 3. Позитивна статистичка сигнификантност беше пронајдено помеѓу Ки-67 маркерот и степенот на диференцијација на туморот кај аксиларните лимфни метастази. Метастатските тумори со повисок процент на Ки-67 беа лошо диференцирани и обратно. Овие резултати се слични со податоците на авторот Zhao S и сор., Kurshumliu F и сор., Ryu DW и сор. (149, 147, 174)

Во вториот дел на студијата ги споредувавме експресијата на хормоналните рецептори (ЕР и ПР), прекумерната експресија на Хер-2/неу и процентот на пролиферација на туморските клетки преку маркерот Ки-67, помеѓу примарниот карцином на дојка и кај метастази во аксиларните лимфни јазли кај дуктален карцином на дојка.

Се претпоставува дека во повеќето случаи примарниот тумор на дојка го има истиот хормонален профил со метастазите во аксиларните јазли. Во последниве години, ова е ставено под знак прашање од некои автори, кои во своите резултати покажуваат за несовпаѓање во хормоналните рецептори помеѓу примарниот карцином и нивните аксиларни метастази. (175, 176, 177, 149)

Во студијата на Amir E и сор.(175), е рапортирано совпаѓање на ЕР и ПР рецепторите, помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларни јазли во само 46%.(27) Во ретроспективната студија на авторот Vroom RJ и сор.(176) каде што беа вклучени 80 случаи, има несовпаѓање од 21% за ЕР и 37% за ПР. Исто така во една друга ретроспективна студија степенот на несовпаѓање е 30% за ЕР, додека за ПР е 39%.(177)

Студијата на авторот Va JL и сор., покажува несовпаѓање на биомаркерите помеѓу примарниот и метастазите во аксиларните лимфни јазли со 25% за ЕР, 28,9% за ПР и 14% за Хер-2/неу. Според овој автор пациентите со ПР позитивни во примарниот тумор

и ПР позитивни во аксиларните метастази имаат значително подобро преживување во споредба со пациентите кои биле ЕР позитивни во примарниот тумор и ЕР негативни во аксиларните метастази. Пациентите кои биле третираны, а биле ПР негативни во примарниот тумор и ПР позитивни во аксиларните метастази покажале подобро преживување во споредба со тие пациенти кои не добиле ендокрина терапија. Овој автор исто така препорачува дека треба да се преиспитаат овие биомаркери и во метастазите во аксиларните лимфни јазли затоа што случаите со несовпаѓање на овие маркери покажуваат послабо преживување. (178)

Според авторот Ieni A и сор. тестирањето на Хер-2/неу кај примарен карцином на дојка и кај лимфните аксиларни метастази не е облигативно да се направи, но може да има моќно влијание врз терапевтското управување. Авторот демонстрира дека губење на експресијата на Хер-2/неу во аксиларните лимфни метастази резултира со влошено преживување на пациенти со карцином на дојка, а во другата страна освојување(добивање) на експресија на Хер-2/неу во аксиларните метастази овозможува насочен третман и затоа мислењето на овој автор е дека прогностичките сигнификантни информации можат да се добијат преку вредноста (евалуација) на Хер-2/неу статусот како во примарниот карцином, така и во метастазите во аксиларни лимфни јазли кај карцином на дојка. (162)

За време на анализата на ЕР рецепторот помеѓу примарниот тумор и метастазата во аксиларните лимфни јазли во нашата студија забележавме дека примарните ЕР позитивни тумори беа 62.5%, додека тие метастатските ЕР позитивни тумори беа 60.9%. Степенот на совпаѓање за ЕР рецепторот помеѓу примарниот тумор и аксиларната метастаза беше 70.3%, додека степенот на несовпаѓање беше 29.7%. Статистичката анализа не потврди сигнификантна разлика за ЕР рецепторот помеѓу овие две локации.

Овие резултати беа слични со голем број други студии, вклучувајќи студиите на авторот Ва ЈЛ и сор. со несовпаѓање за ЕР рецепторот за 25%, кај авторот Zhao S и сор. несовпаѓање на ЕР рецепторот помеѓу овие две локации беше 19.1%, авторот Nedergaard L и сор. забележил несовпаѓање на ЕР кај 21% на случаи, додека ова несовпаѓање кај

студијата на авторот Aitken SJ и сор. беше малку повисока која е пронајдена кај 28.4% од случаите. (178, 149, 179, 157)

Што се однесува за споредба на ПР рецепторот помеѓу примарниот тумор и метастазата во аксиларните лимфни јазли, беше забележано дека нема значителна разлика на овој рецептор помеѓу овие два локации. Експресијата на ПР рецепторот кај примарниот тумор беше забележано кај 54% на случаи, додека кај метастатските во 54,7% на случаи. Базирано на овие резултати ние најдовме совпаѓање за ПР рецепторот помеѓу примарниот и метастатскиот тумор со 64.1%, додека несовпаѓање кај 35.9% на случаи. Овие резултати се приближни со податоци од студии на Ва JL и сор. со несовпаѓање од 28.9% за ПР рецепторот, авторот Zhao S и сор. кој најде несовпаѓање кај 11.8% на случаи за овој маркер, авторот Aitken SJ и сор. забележал несовпаѓање кај 23.5% за ПР рецепторот. (178, 149, 157)

Од друга страна Rossi S и сор. забележале повисоко несовпаѓање помеѓу примарниот и метастатскиот тумор за хормоналните рецептори и тоа 10-30% за ER рецепторот и 20-50% за ПР рецепторот, и затоа сугерира да се направи преиспитување на биомолекуларната состојба во метастазите за подобрување на третманот и проценка на соодветната прогноза. (180)

Авторот Falck AK и сор., исто така забележал дека молекуларниот профил не е стабилен за време на прогресијата на туморот на карцином на дојка, и ја поддржува хипотезата дека малигниот фенотип и неговата молекуларна подлога не се предодредени и статични, но таа продолжува да се развива низ целата историја на животот на туморот. (181)

Исто така авторот Raica M и сор.(182), забележал голема разлика помеѓу фенотипот на примарниот тумор и кај аксиларната метастаза, и бара да се процени споредбата на овие маркери (ER, ПР и Хер-2/неу), кај примарни и метастатски нодални тумори пред каква било терапевтска одлука, со цел да се избегне повторување и за подобрување на прогнозата и преживување на пациентите. Истото мислење го делат и авторите Yao ZX, и Agarantoni –Dadioti P. (183, 184)

Во однос на прекумерната експресија на Хер-2/неу рецепторот, во нашата студија забележавме дека експресијата на овој маркер кај примарниот тумор беше забележано кај 21.9% на случаи, додека кај аксиларните метастази беше 37.5%. Степенот на совпаѓање за овој маркер помеѓу примарниот и метастатскиот тумор беше 75%, додека степенот на несовпаѓање беше 25%. Ова несовпаѓање е повисоко во споредба со резултатите на некои други автори како Zhao S., каде што несовпаѓање на експресија на Хер-2/неу рецепторот е 14.8%, додека во студијата на авторот Ba JL и сор. ова несовпаѓање е 14%. Исто така и авторот Rossi S и сор. пријавил висок степен на совпаѓање на овој маркер помеѓу овие две локации, додека авторот Aitken SJ и сор. пријавил за совпаѓање на овој маркер од 9.9%, покажувајќи дека експресијата на Хер-2/неу е два пати поголема во нодалните метастази отколку кај примарниот тумор. (149, 178, 180, 157)

Во табелата 33, имаме прикажано процентот на совпаѓање на хормоналните рецептори и Хер-2/неу прото-онкогенот на нашата студија и студиите на некои други автори.

Табела 33.

Процент на несовпаѓање на хормонални рецептори и Хер-2/неу помеѓу примарниот и метастатскиот карцином, на нашата студија и некои други автори					
Рецептор	Zhao S	Broom RJ	Ba JL	Young C	Нашата студија
EP	27.80	21.00	25.00	14.00	29.70
PP	11.10	37.00	28.90	21.00	35.90
Хер-2/неу	9.30	-	14.00	10.00	25.00

Ки-67 рецепторот се смета за пролиферативен маркер поврзан со инвазија на туморот и нејзино повторување. Многу студии имаат покажано дека експресијата на Ки-67 е поврзано со слаба диференцијација на туморот, како и со зголемена големина на туморот на карцином на дојка.(174, 185, 186) Овој маркер во последно време се појави како многу важен, поради бројните апликации со неoadјувантна терапија, освен умерената прогностичка вредност. Општо е прифатено дека овој прогностички фактор има тенденција да се намалува по терапијата, како и намалувањето на процентот на

Ки-67 маркер е поврзано со подобар одговор на хемотерапија. (149). Резултатите од нашата студија укажуваат на значителна разлика за експресијата на Ки-67 помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли, каде што експресијата кај примарниот тумор за овој маркер беше 18.75%, додека кај тој метастатичкиот беше 35.94%. Степенот на совпаѓање за експресијата на овој маркер помеѓу овие два локации во нашата студија беше 73.4%. Овие резултати се во спротивност со податоците на авторите Zhao S и сор. и Tawfik K и сор.(149, 187), кои не најдоа значителна разлика за Ки-67 рецепторот помеѓу овие две локации, но слично со студиите на други автори кои пронајдоа повисока експресија на Ки-67 рецепторот во метастатичкиот тумор во споредба со примарниот карцином. (188, 189, 190)

Во третиот дел од нашата студија, базирано на експресијата на ER, PR и Хер-2 /неу рецепторите и на градус на туморот пациентите ги поделивме во шест групи :

1. Ер.+, Пр.+, Хер-2/неу-
2. Ер. -, Пр. -, Хер-2/неу+
3. Ер.+, Пр. +,Хер-2/неу+
4. Ер. -, Пр. -, Хер-2/неу-
5. Ер.+, Пр. -, Хер-2/неу-
6. Ер.+, Пр. -, Хер-2/неу+

Првата група вклучуваше најголем број случаи 36 (56.25%), од кои поголемиот број имаше градус 2 на туморот 77.78%, а останатите беа со градус 3 на туморот. Оваа група на пациенти беше со повисок процент во нашата студија отколку во студијата на авторот Atif N и сор.(145), каде беше 30.4%, и сите беа градус 2, исто така повисок од студијата на Suvarchala SB и сор.(168), каде ова група беше 32.8%, и со студијата на Bhagat Vasudha M и сор.(191) со 36.20%. Со приближни проценти на нашите резултати се и резултатите од студијата на Gethamala K и сор.(160), каде ова група е со 52%. Во втората група имаме 11 (17.19%) случаи, што е со понизок процент од студијата на Atif N и сор. која беше 32.9%, на Bhagat Vasudha M и сор. со 27.85%, Gethamala K и сор. со 25%, додека оваа група не беше забележена во студијата на Suvarchala SB и сор. Тројно позитивните случаи беа 2 (3.12%) при што и двата беа со градус 3, слично со резултатите на Gethamala K и сор.,

каде беше забележан само еден случај, но во студијата на Atif N и сор. со ова група имаше 12.1% од случаите, од кои 9 случаи беа со градус 2, и само еден беше со градус 3 на туморот. Ваква група не е забележана во студијата на Suvarchala SB и сор. и Bhagat Vasudha M и сор.(168, 191) Во групата на тројно негативни случаи од нашата студија припаднаа 9 (14.06) случаи и тоа 3 со градус 2 и 6 со градус 3, која група е слична со резултатите на Atif N и сор., кој покажува дека кај истата група има 9.7% на случаи, и сите беа со градус 3 на туморот. Слични резултати од околу 20% се добиени и во студијата на Gethamala K и сор. Споредено со резултатите на Bhagat Vasudha M и сор. (25.86%), и Suvarchala SB и сор. (42.19%) во нашата студија оваа група е застапена со помал процент. Во групата 5 беа присутни пет случаи (7.81%), група која е со понизок процент од резултатите на Bhagat M и сор. (12.06%), Atif N и сор. (13%), и Suvarchala SB и сор. (14%), додека со повисок процент во споредба со резултатите од Gethemala K и сор. (2%). Во нашата студија 1 случај (1.56%) припаѓаше на шестата група, со градус 2, но оваа група (EP+,PP-,Her-2/neu+) не беше забележана од гореспоменатите автори. (табела 34.) Во студиите на Suvarchala и сор., Bhagat и сор. и Atif N и сор. беше забележано групата EP-, PP+, Her-2/neu-, со 10.94%, 1.72% и 1.2% респективно, што не беше случај со нашите резултатит при што оваа група во нашата студија не беше забележена.

Табела 34.

Споредба на групи, базирани на имунохистохемиски маркери и Хер-2/неу, во нашата студија и кај други автори					
Хормонални рецептори и Хер-2/неу	Suvarchala et al.	Bhagat et al.	Gethamala et al.	Atif et al.	Нашата студија
EP+/PP+/Her-2/neu -	32.80	36.20	52.00	30.00	56.25
EP-/PP-/Her-2/neu+	-	27.85	25.00	32.90	17.19
EP+/PP+/Her-2/neu+	-	-	1.00	12.00	3.12
EP-/PP-/Her-2/neu-	42.19	25.86	20.00	9.70	14.06
EP+/PP-/Her-2/neu-	14.00	12.06	2.00	13.00	7.81
EP+/PP-/ Her-2/neu+	-	-	-	-	1.56

Споредбата на групите од нашата студија и анализата според туморскиот градус, и групни разлики помеѓу примарниот карцином и метастазите во аксиларните лимфни јазли, покажа дека првата група вклучува најголем број случаи и кај примарниот и кај метастатскиот тумор, но со помал процент во метастазите. Истата состојба е забележана и во втората група. Од групата на тројно позитивни случаи поголем број имаше во метастазите отколку кај примарниот карцином и тоа 6/2. Во групата тројно позитивни имаше сличен број на пациенти на двете локации, но со повисок процент на градус 3 на туморот беше кај примарниот во споредба со метастазата. Во групата 5 исто така имаме сличен број на пациенти на двете локации. Шестата група имаше поголем број на пациенти во метастатскиот тумор отколку кај примарниот тумор и тоа 4/1.

Тестираната разлика во дистрибуцијата на 6-те имунохистохемиски групи примарни карциноми на дојка во зависност од градусот на туморот статистички се потврди како сигнификантна.

Не беше најдена сигнификантна разлика во дистрибуцијата на 6-те имунохистохемиски групи карциноми на дојка со метастази во аксиларни лимфни јазли во зависност од степенот на диференцијација на туморот.

8. ЗАКЛУЧОЦИ И ПРЕПОРАКИ

8.1. Заклучоци

1. Во студијата најдена е експресија на ER и PR во примарниот тумор во повеќе од половина од случаите. Експресијата на ER и PR е со повисока фреквенција кај случаи со градус 2 на туморот, за разлика од прекумерната експресија на Хер-2 /неу, каде што градус 2 и 3 на туморот беа подеднакво вклучени (50% подеднакво).
2. Најдена е сигнификантна асоцијација на експресијата на ER во примарниот карцином на дојка со степенот на диференцијација на туморот, додека во метастази не е најдена асоцирана сигнификантност на експресијата на ER со степенот на диференцијација на туморот.
3. Поврзаноста на експресијата на прогестеронските рецептори во примарниот тумор со степенот на диференција на туморот не се потврди како значајна, додека умерните и лошо диференцираните тумори имаа слична експресија на PR рецептори во метастазираните лимфни аксиларни јазли.
4. Експресијата на прото-онкогенот Хер-2/неу во примарниот тумор и метастатскиот тумор не беше сигнификантно асоцирана со степенот на диференцијата. При тоа Хер-2/неу позитивните примарни и метастатски тумори беа незначајно полошо диференцирани од Хер-2/неу негативните примарни и метастатски тумори.
5. Со зголемување на експресијата на естрогенските и прогестеронските рецептори во примарните и метастатичките тумори, Хер-2/неу експресијата се намалува, и обратното.

6. Најдена е статистичка сигнификантност на индексот на пролиферација мерена преку Ки-67 во примарниот и метастатичкиот тумор со степенот на туморот, како и примарните и метастатичките тумори со повисок процент на Ки-67 експресија беа полошо диференцирани, и обратното.
7. Разликата во експресијата на ER помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли кај инвазивниот карцином на дојка не се потврди како сигнификантна, но има правилно совпаѓање во експресијата на ER помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли.
8. Статистички несигнификантен беше разликата во експресијата на PR помеѓу примарниот тумор и метастазите во аксиларните лимфни јазли кај инвазивниот карцином на дојка, но постои правилно совпаѓање во експресијата на PR рецепторот помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли.
9. Забележена е средна, односно умерена јачина на совпаѓање во експресијата на Хер-2/неу рецепторите помеѓу примарниот инвазивен дуктален карцином на дојка и метастазите во лимфните аксиларни јазли.
10. Најдена е сигнификантна различна пролиферација на Ки-67 кај примарните и метастатски тумори.

8.2 Препораки

Нашите податоци иако не покажаа статистичко значење за хормоналните рецептори (ЕР и ПР) и Хер-2/неу рецепторот помеѓу примарниот карцином на дојка и метастазите во аксиларните лимфни јазли, сметаме дека може да има дополнителна корист со рутинското тестирање на овие маркери и во примарни и во метастатски тумори, со цел да се таргетира адекватната терапија.

Иако ова може да влијае на дополнителни финансиски трошоци за обработка на примероците, од другата страна може да има заштеда со избегнување на прекумерен третман, во случаи на карцином на дојка.

Повеќето случаи имаат ист статус на рецептори (ЕР, ПР и Хер-2/неу) и во примарни и во метастатски аксиларни тумори, но некои од случаите го менуваат статусот кога метастазираат. Кај овие случаи постоперативното терапевтско менаџирање треба да биде различно, за да се постигне најсоодветна терапија.

Степенот на совпаѓање за ЕР и ПР во овие две локации за рак на дојка не е премногу висока и недостаток на сигнификанца во овој аспект би можел да биде поради малиот број на примероци. Поради оваа причина, се препорачува да се зголеми бројот на примероци, со цел за да може да се дојде до поверодостојни заклучоци.

Високото присуство на несовпаѓање (иако несигнификантно во моментов) на ЕР и ПР рецептори помеѓу примарниот тумор на дојка и во аксиларните метастази, не дозволува можност да се сугерира дека експресијата на една локација за ЕР и ПР да важи подеднакво и на другата локација.

Комбинацијата на клиничките , морфолошките и имунохистохемијските податоци ќе даде попрецизно предвидување за текот на болеста, како во дијагнозата, терапијата и прогнозата, а ќе придонесе за унапредување на нашите практики во другите слични студии.

9. ЛІТЕРАТУРА

1. GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1459-1544. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
2. Stewart BW, Kleihues P. World cancer report: IARC press Lyon; 2003.
3. American Cancer Society. The Cancer Atlas, 2nd Ed. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014.
4. Clegg LX, Reichman ME, Miller BA, Hankey B, Singh G, et al. Impact of socioeconomic status on cancer incidence and stage at diagnosis: selected findings from the surveillance, epidemiology, and end results: National Longitudinal Mortality Study. *Cancer Causes Control*. 2009; 20:417-35.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit F, Eser S, Mathers C, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. doi: 10.1002/ijc.29210. Epub 2014 Oct 9.
6. World Health Organization, 2018. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>.
7. World Health Organization, 2015. Breast cancer: prevention and control [Online]. Available: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#4/1/2015>].
8. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008; 9: 730-756
9. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(10):1495-506.

10. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. National Cancer Institute (US); Bethesda (MD): Oct 8, 2018. Breast Cancer Screening (PDQ®): Health Professional Version.
11. Doren A, Vecchiola A, Aguirre B, Villaseca P. Gynecological-endocrinological aspects in women carriers of BRCA1/2 gene mutations. *Climacteric*. 2018; 21(6):529-535
12. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63: 11-30.
13. Curtis RE, Freedman DM, Ron E, Ries LAG, Hacker DG, Edwards BK, Tucker MA, Fraumeni JF Jr., editors. *New Malignancies among Cancer Survivors: SEER Cancer Registries, 1973-2000*. NIH: National Cancer Institute, 2006.
14. Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353: 229-237
15. Dupont WD, Parl FF, Hartmann WH, Brinton LA, Winfield AC, et al. Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* 1993; 71: 1258-1265.
16. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358: 1389-1399.
17. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 676-689.
18. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1117-1130.
19. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003; 302: 643-646

20. Ritte R, Lukanova A, Berrino F, Dossus L, Tjønneland A, et al. Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status: a large prospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2012; 14: R76.
21. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer.* 1990; 46: 796-800
22. Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1994; 139: 819-835.
23. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 36-47.
24. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360: 187-195.
25. Sieri S, Krogh V, Bolelli G, Abagnato CA, Grioni S, et al. Sex hormone levels, breast cancer risk, and cancer receptor status in postmenopausal women: the ORDET cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 169-176.
26. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2004; 111: 762-771.
27. Chlebowski RT, Manson JE, Anderson GL, Cauley JA, Aragaki AK, et al. Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Natl Cancer Inst.* 2013; 105: 526-535.
28. Chen WY, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. *JAMA* 2011; 306: 1884-1890.
29. Wu Y, Zhang D, Kang S. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 137: 869-882.
30. Haagensen CD (1986) *Disease of the breast.* 3rd ed. WB Saunders: Philadelphia.

31. Tulinius H, Sigvaldason H, Olafsdottir G: Left and right sided breast cancer. *Pathol Res Pract* 1990; 186:92-94.
32. Fisher ER, Gregorio R, Redmond C, Vellios F, Sommers SC, Fisher B: Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol no. 4). I. Observations concerning the multicentricity of mammary cancer. *Cancer* 1975; 35:247-254.
33. Dawson PJ: What is new in our understanding of multifocal breast cancer. *Pathol Res Pract* 1993; 189:111-116.
34. Dawson PJ, Baekey PA, Clark RA: Mechanisms of multifocal breast cancer. An immunocytochemical study. *Hum Pathol* 1995; 26:965-969.
35. Andea AA, Wallis T, Newman LA, Bouwman D, Dey J, Visscher DW: Pathologic analysis of tumor size and lymph node status in multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2002; 94:1383-1390.
36. Andea AA, Bouwman D, Wallis T, Visscher DW: Correlation of tumor volume and surface area with lymph node status in patients with multifocal/multicentric breast carcinoma. *Cancer* 2004; 100:20-27.
37. Anastassiades O, Iakovou E, Stavridou N, Gogas J, Karameris A: Multicentricity in breast cancer. A study of 366 cases. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:238-243.
38. Dawson PJ: What is new in our understanding of multifocal breast cancer. *Pathol Res Pract* 1993; 189:111-116.
39. Heron DE, Komarnicky LT, Hyslop T, Schwartz GF, Mansfield CM: Bilateral breast carcinoma: risk factors and outcomes for patients with synchronous and metachronous disease. *Cancer* 2000; 88:2739-2750.
40. Broët P, de la Rochefordière A, Scholl SM, Fourquet A, Massen V, Durand J-C, Pouillart P, Asselain B: Contralateral breast cancer. Annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 1995; 13:1578-1583.
41. King RE, Terz JJ, Lawrence Jr W: Experience with opposite breast biopsy in patients with operable breast cancer. *Cancer* 1976; 37:43-45.
42. Intra M, Rotmensz N, Viale G, Mariani L, Bonanni B, Mastropasqua MG, Galimberti V, Gennari R, Veronesi P, Colleoni M, Tousimis E, Galli A, Goldhirsch A, Veronesi

- U: Clinicopathologic characteristics of 143 patients with synchronous bilateral invasive breast carcinomas treated in a single institution. *Cancer* 2004; 101:905-912.
43. Price JE: The biology of metastatic breast cancer. *Cancer* 1990; 66:1313-1320.
 44. Brinkley D, Haybittle JL: The curability of breast cancer. *Lancet* 1975; 2:95-97.
 45. Elston CW, Ellis IO (1998). Systemic pathology 3E. In: *The Breast*. CW Elston and IO Ellis (Eds) Churchill Livingstone: Edinburgh.
 46. 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: 2141-2149.
 47. Patey DH, Scarff RW. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* (1928); 1: 801-804.
 48. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer*. 1957; 11:359-377.
 49. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19:403-410.
 50. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*. 1995; 26:873-879.
 51. National Co-ordinating Group for Breast Cancer Screening Pathology (1995), Pathology Reporting. In: *Breast Screening Pathology*. 2nd ed. ed. NHSBSP Publications.
 52. McDivott RW, Stewart FW, Berg JW. *Atlas of Tumour Pathology*. 2nd series ed. Washington. 1968.
 53. Rossen PP, Oberman HA. *Atlas of Tumour Pathology. Tumour of the Mammary Gland*. Washington, D.C. 1993.
 54. Scarff RW, Torloni H. *International Histological Classification of Tumours, n°2. Histological Typing of Breast Tumours*. World Health Organization: Geneva. 1968.
 55. World Health Organization. *International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Breast Tumours*. Geneva. 1981.

56. Azzopardi AG. Problems in Breast Pathology. Classification of Primary Breast Carcinoma. Ag Azzopardi (Ed.) WB Saunders: Philadelphia. 1979.
57. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1975; 55:231-273.
58. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B, Redmond C, Vellios F, et al. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from finding of the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol no. 4). *Cancer.* 1975; 36: 1-85.
59. Raju U, Shav V, Perveen N, Linden M. Evaluation of Breast Core Needle Biopsies with CK 5/6, E-cadherin and Calponin. *Mod Pathol.* 2001;14:34A.
60. Page DL, Anderson TJ, Sakamoto G. Infiltrating carcinoma: Major histological types. WB Saunders: London. 1987.
61. Elston CW, Ellis IO. Classification of malignant breast disease. In: *The Breast Systemic Pathology.* CW Elston and IO Ellis (Eds.) 3rd ed. Churcill Livingstone: Edinburgh pp. 239-247. 1998.
62. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Roberston JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer- histopathological and prognostic considerations. *Br J cancer.*1997; 75:1318-1323.
63. Page DL, Kidd TE Jr., Dupont WD, Simpson JF, Rogers LW. Lobular neoplasia of the breast: higher risk for subsequent invasive cancer predicted by more extensive disease. *Hum Pathol.* 1991; 22:1232-1239.
64. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancers Inst.* 1998; 90:1138-1145.
65. Tavasolli FA. *Pathology of the Breast.* Appleton and Lange: Stanford. 1999.
66. Damiani S, Peterse JL, Eusebi V: Malignant neoplasms infiltrating 'pseudoangiomatous' stromal hyperplasia of the breast: an unrecognised pathway of tumour spread. *Histopathology* 2002; 41:208-215.
67. Goldstein NS: Does the level of E-cadherin expression correlate with the primary breast carcinoma infiltration pattern and type of systemic metastases?. *Am J Clin Pathol* 2002; 118:425-434.

68. Gilliland MD, Barton RM, Copeland III EM: The implications of local recurrence of breast cancer as the first site of therapeutic failure. *Ann Surg* 1983; 197:284-287.
69. Veronesi U, Marubini E, DelVecchio M, Manzari A, Andreola S, Greco M, Luini A, Merson M, Saccozzi R, Rilke F, Salvadori B: Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: partly independent events. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:19-27.
70. Veronesi U, Cascinelli N, Bufalino R, Morabito A, Greco M, Galluzzo D, Delle Donne V, DeLellis R, Piotti P, Sacchini V, Conti R, Clemente C: Risk of internal mammary lymph node metastases and its relevance on prognosis of breast cancer patients. *Ann Surg* 1983; 198:681-684.
71. Cifuentes N, Pickren JW: Metastases from carcinoma of mammary gland. An autopsy study. *J Surg Oncol* 1979; 11:193-205.
72. Lamovec J, Zidar A: Association of leptomeningeal carcinomatosis in carcinoma of the breast with infiltrating lobular carcinoma. An autopsy study. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115:507-510.
73. Merrill CF, Kaufman DI, Dimitrov NV: Breast cancer metastatic to the eye is a common entity. *Cancer* 1991; 68:623-627.
74. Fisher B, Montague E, Redmond C, Barton B, Borland D, Fisher ER, Deutsch M, Schwarz G, Margolese R, Donegan W, Volk H, Honvolinka C, Gardner B, Cohn Jr I, Lesnick G, Cruz AB, Lawrence W, Nealon T, Butcher H, Lawton R: Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results from a prospective randomized clinical trial. *Cancer* 1977; 39:2827-2839.
75. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug; 4 (Suppl 2): S307–S309.
76. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol.* 1941;47:200–2.
77. Coons AH, Kalpan MH. Localization antigens in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med.* 1950;91:1–13.

78. Nakane PK, Pierce GB. Enzyme labeled anti-bodies: Preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem.* 1966;14:929–31.
79. Mason DY, Sammons R. alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labeling of cellular constituents. *J Clin Pathol.* 1978;31:454–60.
80. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope microscope. *Immunochemistry.* 1971;8:1081–83.
81. Rajendran . Shafer's textbook of oral pathology. 6th edition. India: Elsevier; 2009. p. 932.
82. Edgar MA, Rosenblum MK. The differential diagnosis of central nervous system tumors: A critical examination of some recent immunohistochemical applications. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:500–9.
83. Garcia CF, Swerdlow SH. Best practices in contemporary diagnostic immunohistochemistry: Panel approach to hematolymphoid proliferations. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:756–65.
84. Leong AS, Wright J. The contribution of immunohistochemical staining in tumor diagnosis. *Histopathology.* 1987;11:1295–305.
85. Bernardi FD, Saldiva PH, Mauad T. Histological examination has a major impact on macroscopic necropsy diagnoses. *J Clin Pathol.* 2005;58:1261–4.
86. Roulson J, Benbow EW, Hasleton PS. Discrepancies between clinical and autopsy diagnosis and the value of post mortem histology; A meta-analysis and review. *Histopathology.* 2005;47:551–9.
87. McCready T, Littlewood D, Jenkinson J. Breast self-examination and breast awareness: a literature review. *J Clin Nurs.* 2005; 14: 570-578.
88. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2013. Breast Cancer Screening and Diagnosis. Available from: URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf Accessed: December 8, 2013
89. Smetherman DH. Screening, imaging, and image-guided biopsy techniques for breast cancer. *Surg Clin North Am.* 2013; 93: 309-327.

90. Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF. Long-term followup of breast cancer patients: the 30-year report. *Cancer*. 1974 Apr; 33 (4):1145–1150.
91. Say CC, Donegan WL. Invasive carcinoma of the breast: prognostic significance of tumor size and involved axillary lymph nodes. *Cancer*. 1974 Aug;34(2):468-71.
92. Smart CR, Myers MH, Gloeckler LA. Implications from SEER data on breast cancer management. *Cancer*. 1978 Mar;41(3):787-9.
93. Stenkvist B, Bengtsson E, Dahlqvist B, Eklund G, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B. Predicting breast cancer recurrence. *Cancer*. 1982 Dec 15;50(12):2884-93.
94. Ji RC. Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(4):677–94.
95. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016. doi:10.1007/s13402-016-0281-9.
96. Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease*. Eight Edition (2010). Vinay Kumar.
97. Adjuvant systemic therapy for women with node-negative breast cancer. The steering committee on clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer. *Can Med Assoc J* 1998;158 (suppl 3):S43–51.
98. Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, et al. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1995;13:1144–51.
99. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW Jr, et al. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg* 1981;193:15–25.
100. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, et al. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol* 1989;7:1239–51.
101. Lee AK, Loda M, Mackarem G, et al. Lymph node negative invasive breast carcinoma 1 centimeter or less in size (T1a,bN0M0): clinicopathologic features and outcome. *Cancer* 1997;79:761–71.

102. Clayton F. Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas. Mitotic count is the best single predictor. *Cancer* 1991;68:1309–17.
103. Colpaert C, Vermeulen P, Jeuris W, et al. Early distant relapse in “nodenegative” breast cancer patients is not predicted by occult axillary lymph node metastases, but by the features of the primary tumour. *J Pathol* 2001;193:442–9.
104. Lee AK, DeLellis RA, Silverman ML, et al. Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *J Clin Oncol* 1990;8:1457-65.
105. de Mascarel I, Bonichon F, Durand M, et al. Obvious peritumoral emboli: an elusive prognostic factor reappraised. Multivariate analysis of 1320 nodenegative breast cancers. *Eur J Cancer* 1998;34:58–65.
106. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, et al. The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer* 1995;76:1772–8.
107. Agarwal B, Saxena R, Morimiya A, Mehrotra S, Badve S. Lymphangiogenesis does not occur in breast cancer. *Am J Surg Pathol*. 2005 Nov;29(11):1449-55.
108. Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol*. 2003 Jun;200(2):195-206.
109. Vleugel MM, Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Stel HV, van der Wall E, van Diest PJ. Lack of lymphangiogenesis during breast carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 2004 Jul;57(7):746-51.
110. Hanau CA, Machera H, Miettinen M. Immunohistochemical evaluation of vascular invasion in carcinomas with different markers. *Appl Immunohistochem*. 1993; 1:46-50.
111. Lee AK, DeLellis RA, Wolfe HJ. Intramammary lymphatic invasion in breast carcinomas. Evaluation using ABH isoantigens as endothelial markers. *Am J Surg Pathol*. 1985; 0:589-594.
112. Saigo PE, Rosen PP. The application of immunohistochemical stains to identify endothelial-lined channels in mammary carcinoma. *Cancer*. 1987 Jan 1;59(1):51-4.

113. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 966-978.
114. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, et al. American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med*. 2010; 134: e48-e72.
115. Mohsin SK, Weiss H, Havighurst T, Clark GM, Berardo M, Roanh le D, To TV, Qian Z, Love RR, Allred DC. Progesterone receptor by immunohistochemistry and clinical outcome in breast cancer: a validation study. *Mod Pathol*. 2004 Dec;17(12):1545-54.
116. Braun L, Mietzsch F, Seibold P, Schneeweiss A, Schirmacher P, Chang-Claude J, Peter Sinn H, Aulmann S. Intrinsic breast cancer subtypes defined by estrogen receptor signalling-prognostic relevance of progesterone receptor loss. *Mod Pathol*. 2013 Sep;26(9):1161-71. doi: 10.1038/modpathol.2013.60. Epub 2013 Apr 5.
117. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998; 11: 155-168.
118. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1474-81.
119. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ, Miller KD. Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries. *J Clin Pathol*. 2000 Apr;53(4):292-301.
120. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 118-145

121. Hicks DG, Kulkarni S. HER2+ breast cancer: review of biologic relevance and optimal use of diagnostic tools. *Am J Clin Pathol.* 2008; 129: 263-273.
122. Rosen PP, Rosen's Breast Pathology, 2008.
123. Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol.* 2001;12 Suppl 1:S9-13.
124. Carlson RW, Moench SJ, Hammond ME, Perez EA, Burstein HJ, Allred DC, Vogel CL, Goldstein LJ, Somlo G, Gradishar WJ, Hudis CA, Jahanzeb M, Stark A, Wolff AC, Press MF, Winer EP, Paik S, Ljung BM; NCCN HER2 Testing in Breast Cancer Task Force. HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw.* 2006 Jul;4 Suppl 3:S1-22; quiz S23-4.
125. Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Takahashi M. Relationship between labeling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer.* 1988 Sep 1;62(5):989-93.
126. Barbareschi M, Girlando S, Mauri FM, Forti S, Eccher C, Mauri FA, Togni R, Dalla Palma P, Doglioni C. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1994 Aug;102(2):171-5.
127. Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H, Heidenreich W, Schwarting R, Kurtsiefer L, Stauch G, Stein H. Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol.* 1986 Sep;39(9):977-80.
128. Kuenen-Boumeester V, Van Der Kwast TH, Van Laarhoven HA, Henzen-Logmans SC. Ki-67 staining in histological subtypes of breast carcinoma and fine needle aspiration smears. *J Clin Pathol.* 1991 Mar;44(3):208-10.
129. Veronese SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol.* 1991 Jan;95(1):30-4.
130. Sahin AA, Ro JY, el-Naggar AK, Wilson PL, Teague K, Blick M, Ayala AG. Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *Am J Clin Pathol.* 1991 Oct;96(4):512-9.

131. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi OP. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer*. 1990 Mar 1;65(5):1180-4.
132. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 1;23(28):7212-20.
133. NIH consensus conference. Treatment of early-stage breast cancer. *JAMA* 1991; 265: 391-395.
134. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrada S, Luini A, et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg*. 2010; 251: 595-600.
135. Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Tsukahara Y, Uchiyama A, Kuroki S, Tanaka M, Torisu M. Preoperative assessment of tumor angiogenesis by vascular endothelial growth factor mRNA expression in homogenate samples of breast carcinoma: fine-needle aspirates vs. resection samples. *J Surg Oncol*. 1997 Dec;66(4):257-63.
136. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer*. 1993;29A(8):1141-5.
137. WHO: Classification of Tumours: Pathology and Genetics. Lyon, France, IARC Press, 2003.
138. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist:Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;28(16):907-922.
139. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist, Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*.2013;31(31):3997-4013.
140. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of woman 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):2206-2223. Doi: 10.1093/annonc/mdt303.
141. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Sen HJ, et al. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol.* 2011; 22 (8): 1736-47. Doi:10.1093/annonc/mdr304
142. Huber KE, Carey LA, Wazer DE. Breast cancer molecular subtypes in patients with locally advanced disease: impact on prognosis, patterns of recurrence, and response to therapy. *Semin Radiat Oncol.* 2009; 19: 204-210. doi.org/10.1016/j.semradonc.2009.05.004.
143. Zaha DC, Lazăr E, Lăzureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51:85-89.
144. Fulga V, Rudi L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Raica M. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? *Pol J Pathol.* 2015 Mar;66(1):30-7.
145. Atif N, Khalid M, Chughtai O. Role of immunohistochemical markers in breast cancer and their correlation with grade of tumour, our experience. *Int Clin Pathol J.* 2018;6(3):141–145. doi: 10.15406/icpjl.2018.06.00175.
146. Payne SJ, Brown RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer—the present. *Histopathology.* 2008;52(1):82–90. doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x.
147. Kurshumliu F, Gashi-Luci L, Kadare Sh, Alimehmeti M, Gozalan U. Classification of patients with breast cancer according to Nottingham Prognostic Index highlights significant differences in immunohistochemical marker expression. *World J Surg Oncol.* 2014 Aug 1;12:243. doi: 10.1186/1477-7819-12-243.
148. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th Edition, Saunders Elsevier, 2009.
149. Zhao S, Xu L, Liu W, Lv C, Zhang K, Gao H, et al. Comparison of the expression of prognostic biomarkers between primary tumor and axillary lymph node metastases

- in breast cancer. Comparison of the expression of prognostic biomarkers between primary tumor and axillary lymph node metastases in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(5):5744-5748.
150. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17: R245-262.
151. Rakha EA, Soria D, Green AR, Lemetre C, Powe DG, Nolan CC, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *Br J Cancer.* 2014;110:1688–1697.
152. Green AR, Powe DG, Rakha EA, Soria D, Lemetre C, Nolan CC, et al. Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers. *Br J Cancer.* 2013; 109:1886–1894.
153. Soria D, Garibaldi JM, Ambrogi F, Green AR, Powe et al. A methodology to identify consensus classes from clustering algorithms applied to immunohistochemical data from breast cancer patients. *Comput Biol Med.* 2010; 40:318–330.
154. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* 2010;12:207. doi.org/10.1186/bcr2607.
155. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L, Nordenskjöld B. Applying the Nottingham Prognostic Index to a Swedish breast cancer population. South East Swedish Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;53(1):1–8. doi.org/10.1023/A:1006052115874.
156. Azizun-Nisa, Bhurgri Y, Raza F, Kayani N.; Comparison of ER, PR and HER-2/neu (C-erb B 2) reactivity pattern with histologic grade, tumor size and lymph node status in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008;9(4):553-6. See comment in PubMed Commons below
157. Aitken SJ, Thomas JS, Langdon SP, et al. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastasis. *Ann Oncol.* 2010;21(6):1254–1261.

158. Gown AM. Current issues in ER and Her2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15. doi: 10.1038/modpathol.2008.34.
159. Ranatunga N, Liyanapathirana LV. Hormone receptor expression and Her2 /neu amplification in breast carcinoma in a cohort of Srilankans. *Ceylon Med J.* 2007;52(4):133–136.
160. Geethamala K, Srinivasa MV, Vani BR, Rao S. Histopathological Grade versus hormone receptor status in breast carcinoma treasure the past. *Int J Biomed Res.* 2015;6(7):466–471.
161. Sharif MA, Mamoon N, Mushtaq S, Khadim MT. Morphological profile and association of Her–2 Neu with prognostic markers in breast carcinoma in Northern Pakistan. *J Coll Phy Surg Pak.* 2009;19(2):99–103.
162. Ieni A, Barresi V, Caltabiano R, Cascone AM, Del Sordo R, Cabibi D, et al. Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation. *Onco Targets Ther.* 2014 Jul 11;7:1267-72. doi:10.2147/OTT.S65294.
163. Nabi MG, Ahangar A, Kaneez S. Estrogen receptors, progesterone receptors and their correlation with respect to Her-2/neu status, histological grade, size of lesion, lymph node metastasis, lymphovascular involvement and age in breast cancer patients in a hospital in north india. *Asian Journal of Medical Sciences.* 2016;7(3):28-34.
164. Sepideh S, Majid Sh, Novin N, Naser Gh. Correlation of ER, PR and HER-2/Neu with other Prognostic Factors in Infiltrating Ductal Carcinoma of Breast. *Iranian Journal of Pathology* (2015) 10 (3), 221-226.
165. Baswal P, Behera S, Kar A, Pradhan D, Behera PK, Burma S, et al. Correlation of hormonal receptors estrogen receptor, progesterone receptor and Her2 Neu with tumor characteristics in breast carcinoma: Study of 100 consecutive
166. Fatima S, Faridi N, Gill S. Breast cancer. Steroid receptors and other prognostic indicators. *J Coll Phy Surg Pak.* 2004;15(4):230-233.
167. Desai SB, Moonim MT, Gill AK, et al. Hormone receptor status of braest cancer in India: A study of 798 tumours. *Breast.* 2000;9(5):267–270.

168. Suvarchala SB, Nageswararao R. Carcinoma breast–histopathological and hormone receptors correlation. *J Biosci Tech.* 2011;2:340–348.
169. Mujtaba S, Haroon S, Faridi N, et al. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2/neu) receptor status with hormone receptors Oestrogen receptor, progesterone receptor status and other prognostic markers in breast cancer: an experience at tertiary care hospital in Karachi. *JPMA.* 2013;63(7):854–858.
170. Yadav R, Sen R, Chauhan P. ER, PR, Her2/Neu status and relation to clinicopathological factors in breast carcinoma. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;8(4):287–290.
171. Amit M, Parasad C, Sreeramulu P. Histopathological grade versus Estrogen and progesterone receptor status in carcinoma breast–A single centre study. *Open Access J Surg.* 2017;4(3):555–639.
172. Zeillinger R, Kury F, Czerwenka K, et al (1989). HER-2 amplification, steroid receptors and epidermal growth factor receptor in primary breast cancer. *Oncogene.* 4, 109-14.
173. Ian S. Hagemann, (2016) *Molecular Testing in Breast Cancer: A Guide to Current Practices.* *Archives of Pathology & Laboratory Medicine:* August 2016, Vol.140, No.8, pp. 815-824.
174. Ryu DW, Lee CH(2012). Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without markers regulating cell cycle and cell death. *J Korean Surg Soc,* 83, 187-95.
175. Amir E, Ooi WS, Simmons C, Kahn H, Christakis M, Popovic S, Kalina M, et al. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20: 763-768.
176. Broom RJ, Tang PA, Simmons C, Bordeleau L, Mulligan AM, O’Malley FP, et al. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2/neu status with time: discordance rates between primary and metastatic breast cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 1557-1562.

177. Lower EE, Glass EL, Bradley DA, Blau R, Heffelfinger S. Impact of metastatic estrogen receptor and progesterone receptor status on survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 65-70.
178. Ba JL, Liu CG, Jin F. Alterations in Hormonal Receptor Expression and HER2 Status Between Primary Breast Tumors and Paired Nodal Metastases: Discordance Rates and Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (21), 9233-9, 2014, DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.21.9233.
179. Nedergaard L, Haerslev T, Jacobsen GK. Immunohistochemical study of estrogen receptors in primary breast carcinomas and their lymph node metastases including comparison of two monoclonal antibodies. *APMIS* 1995; 103: 20-24.
180. Rossi S, Basso M, Strippoli A, Dadduzio V, Cerchiaro E. Hormone Receptor Status and HER2 Expression in Primary Breast Cancer Compared With Synchronous Axillary Metastases or Recurrent Metastatic Disease. *Clin Breast Cancer*. 2015 oct; 15(5):307-12. doi: 10. 1016/j.clbc.2015.03.010. Epub 2015 Mar 25. Review.
181. Falck AK, Bendahl PO, Chebil G, Olsson H, Ferno M, Ryden L. Biomarker expression and St Gallen molecular subtype classification in primary tumours, synchronous lymph node metastases and asynchronous relapses in primary breast cancer patients with 10 years' follow-up. *Breast Cancer Res Treat*.2013;140(1):93-104. doi.org/10.1007/s10549-013-2617-8.
182. Raica M, Cimpean AM, Ceausu RA, Fulga V, Nica C. Hormone Receptors and HER2 Expression in Primary Breast Carcinoma and Corresponding Lymph Node Metastasis: Do We Need Both? *Anticancer Res*, 34 (3), 1435-40 Mar 2014.
183. Yao ZX, Lu LJ, Wang RJ, Jin LB, Liu Sh Ch. Discordance and Clinical Significance of ER, PR, and HER2 Status Between Primary Breast Cancer and Synchronous Axillary Lymph Node Metastasis. *Med Oncol*, 31 (1), 798 Jan 2014 DOI: 10. 1007/s12032-013-0798-y.
184. Arapantoni-Dadioti P, Valavanis C, Gavressea T, Tzaida O, Trihia H. Discordant Expression of Hormone Receptors and HER2 in Breast Cancer. A Retrospective Comparison of Primary Tumors With Paired Metachronous Recurrences or Metastases. *J BUON*, 17 (2), 277-83 Apr-Jun 2012.

185. Loehberg CR, Almstedt K, Jud SM, et al (2013). Prognostic relevance of Ki-67 in the primary tumor for survival After a diagnosis of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 138, 899-908.
186. Synnestvedt M, Borgen E, Russnes HG, et al (2013). Combined analysis of vascular invasion, grade, HER2 and Ki67 expression identifies early breast cancer patients with questionable benefit of systemic adjuvant therapy. *Acta Oncol*, 52, 91-101.
187. Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum Pathol.* 2013;44:39-46.
188. Park D, Karesen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch* 2007; 451: 11-18.
189. Buxant F, Anaf V, Simon P, Fayt I, Noel JC. Ki-67 immunostaining activity is higher in positive axillary lymph nodes than in the primary breast tumor. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75: 1-3.
190. Tokes AM, Szasz AM, Geszti F, Lukacs LV, Kenessey I, Turanyi E, et al. Expression of proliferation markers Ki67, cyclin A, geminin and aurora-kinase A in primary breast carcinomas and corresponding distant metastases. *J Clin Pathol* 2015; 68: 274-82.
191. Bhagat Vasudha M, Jha Bharti M, Patel Prashant R. Correlation of hormonal receptor and her2 neu expression in breast cancer: A study at tertiary care hospital in south Gujarat. *National Journal of medical research.* 2012;2(3):295–298.