

**УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ**

**КОРЕЛАЦИЈА НА КЛАСИЧНИТЕ ХИСТОМОРФОЛОШКИ
ПАРАМЕТРИ СО ПАРАМЕТРИТЕ ОД МОЛЕКУЛАРНАТА
КЛАСИФИКАЦИЈА НА КАРЦИНОМ НА ДОЈКА**

-ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА-

Автор: д-р м-р сци. Џенгис Јашар

Ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска

Скопје, 2016

СОДРЖИНА

СОДРЖИНА.....	3
Предговор	5
АПСТРАКТ	7
SUMMARY.....	8
1. ВОВЕД.....	9
1.1 ЕТИОПАТОГЕНЕЗА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА	9
1.2 ОНКОГЕНЕЗА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКАТА	11
1.2.1 Онкогени и тумор супресорски гени	11
1.2.2 Улога на Естрогениот рецептор (ER)	12
1.2.3 Улога на хуманиот епидермален фактор на раст-2 (HER-2/neu).....	12
1.2.4 Улога на протеините кои го регулираат клеточниот циклус	13
1.2.5 p53 тумор супресорски ген и апоптоза.....	13
1.3 ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОРИ КАЈ КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКАТА	14
1.4 МОЛЕКУЛАРНО-БИОЛОШКИ И ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ	15
1.5 ХИСТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА КАРЦИНОМ НА ДОЈКА.....	16
1.6 МОЛЕКУЛАРНА КЛАСИФИКАЦИЈА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА	17
1.6.1 Нова таксономија на карциномот на дојка: внатрешни подтипови.....	17
1.6.2 Имунофенотипизација (молекуларна класификација)	18
1.6.3 Луминални карциноми на дојка	19
1.6.4 HER2 позитивен карцином на дојка.....	20
1.6.5 „Тројно негативни“ (Базални) карциноми на дојка	20
1.7 ПОСТОПЕРАТИВНА ХИСТОПАТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА ДОЈКА (pTNM КЛАСИФИКАЦИЈА СПОРЕД АЈСС, 2010 ГОДИНА)	22
2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ	24
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	25
3.1 ИЗБОР НА МАТЕРИЈАЛОТ И СЕЛЕКЦИЈА НА ПАЦИЕНТИ.....	25
3.2 МЕТОДИ.....	25
3.2.1 Имунохистохемиско испитување на интермедиерните филаменти од класата на цитокератини (CK5/6, CK34BE12, CK8, CK17, CK18).....	26
3.2.2 Дополнителни имунохистохемиски испитувања (Vcl-2, EGFR, CD117, Vimentin, E-cadherin).....	26
3.2.3 Имунохистохемиско испитување на хормонските рецептори.....	26
3.2.4 Имунохистохемиско испитување на HER-2 рецепторот	27
3.2.5 Конвенционална ин ситу хибридизација	27
3.2.6 Имунохистохемиско испитување на p53 протеинскиот продукт и на пролиферативниот маркер Ki-67	28
3.2.7 Следење на пациентите	29
3.2.8 Статистичка обработка на добиените резултати.....	30
4. РЕЗУЛТАТИ	43
4.1 ДЕСКРИПТИВНА АНАЛИЗА НА КЛИНИЧКИ И МОРФОХИСТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ	43
4.2 МОЛЕКУЛАРНИ ПОДТИПОВИ – КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКИТЕ И МОРФОХИСТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ	47
4.3 ПРОГНОСТИЧКО ВЛИЈАНИЕ НА ИСПИТУВАНИТЕ ПАРАМЕТРИ ВРЗ ПРЕЖИВУВАЊЕТО БЕЗ БОЛЕСТ – DISEASE-FREE SURVIVAL (DFS)	72

4.3.1 Преживувањето без болест во однос на молекуларните подтипови на карцином на дојка	72
4.3.2 Преживување без болест во однос на клинички параметри	74
4.3.3 Преживување без болест во однос на морфолошките и хистолошките параметри.....	77
4.3.4 Преживување без болест во однос на имунохистохемиските параметри	94
4.3.5 Анализа на резултати од униваријанта и мултиваријанта Сох-ова анализа на DFS	100
4.3.6 Прогностички параметри во Сох-ова мултиваријантна анализа во однос на молекуларните подтипови на карцином на дојка во однос на појава на релапси	104
5. ДИСКУСИЈА	112
5.1 ДИЗАЈНА НА СЕРИЈАТА	112
5.2 УЛОГА НА КЛИНИЧКИ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ЗА ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ.....	113
5.2.1 Возраст.....	113
5.2.2 Тип на интервенција.....	114
5.3 ПАРАМЕТРИ ОД ПОСТОПЕРАТИВНА (pTNM) ХИСТОПАТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА ДОЈКА.....	114
5.3.1 Туморски дијаметар (pT).....	114
5.3.2 Лимфонодален статус и лимфонодален индекс	115
5.3.3 Влијанието на стадиумот на болеста врз преживувањето без болест (DFS).....	116
5.4 УЛОГА НА ХИСТОМОРФОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ВО ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ	117
5.4.1 Формирање на тубули во примарен тумор	117
5.4.2 Нуклеарен градус (NG)	117
5.4.3 Митотски индекс (MI).....	118
5.4.4 Степен на хистолошка диференцијација (G).....	118
5.4.5 Нотингемски прогностички индекс (NPI).....	119
5.4.6 Ресекциони маргини	120
5.4.7 Лимфоваскуларна инвазија	120
5.4.8 Лимфоцитен инфилтрат	121
5.4.9 Некроза.....	122
5.4.10 Дезмоплазија	122
5.4.11 Еластоза	123
5.4.12 Калцификации	123
5.5 ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ВО ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ.....	124
5.5.1 Протеински дериват на тумор супресорски ген – p53	124
5.5.2 Пролиферативен индекс Ki67 како маркер на биолошка агресивност ..	125
5.5.3 Vcl2 онкопротеин	126
5.6 ИМПЛИКАЦИИ ОД РЕЗУЛТАТИТЕ ОД МУЛТИВАРИЈАНТНА АНАЛИЗА	126
6. ЗАКЛУЧОЦИ.....	128
7. ЛИТЕРАТУРА.....	130

ПРЕДГОВОР

Оваа докторска студија е изработена во Лабораторијата за хистопатологија и цитологија во Клиничката болница Аџибадем – Систина во Скопје. Предмет на студијата се оперативните материјали од пациентки со карцином на дојка, оперирани на Одделот за Торако-васкуларна хирургија во Клиничката болница Аџибадем – Систина.

Идејата за овој труд беше поставена уште во 1999 година кога за прв пат во Македонија беше воведен Hercept test за осетливост на пациентките со карцином на дојка за лекот Herceptin (Trastuzumab). Со помош на Проф. д-р Снежана Смичковска и на почитуваниот, за жал покоен, Проф д-р Ѓорѓи Зографски, за првпат во рамките на Институтот за радиотерапија и онкологија при Клиничкиот центар во Скопје, беше воведен протокол на тестирање и одредување на осетливоста на овој лек кај поедини пациентки со карцином на дојка.

Првата студија беше објавена во 2002 година (Her-2/neu expression in breast cancer patients – correlation with estrogen and progesterone receptor status, p53 and Ki-67 immunoreactivity and clinico-pathological parameters, Arch Oncol 2002; 10 (Suppl 1):32), паралелно со студиите кои беа работени во поголемите светски центри и со кои всушност почна молекуларната ера во третманот на карцином на дојка. Неизмерно сум им благодарен за укажаната доверба и за сиот ентузијазам кој го пренесоа на мене, поради кој чувствував должност да го напишам овој труд во знак на почит и благодарност. Истовремено, Проф. д-р Снежана Смичковска го овозможи и следењето на оваа група пациентки кои се предмет на анализа во оваа студија, а без кое не би се постигнале и целите на испитувањето.

Благодарен сум на менторот на овој труд, Проф. д-р Гордана Петрушевска, за постојаниот интерес, советите и дискусиите кои ме поттикнаа поефикасно и детално да се посветам на задачата. Без нејзината поддршка, и покрај обостраните рутински ангажмани, овој труд не би ја имал формата на обемна студија од ваков тип во нашата земја.

Искрено се заблагодарувам на Проф. д-р Бети Зафировска за интересот и ангажманот за овој труд и која во целост ја реализираше статистичката анализа на податоците.

Целокупната техничка подготовка и хистопатолошка анализа на материјалот е извршена во Лабораторијата за хистопатологија и цитологија во Клиничката болница Аџибадем – Систина. Им се заблагодарувам на сите лаборанти за соработката и стручната помош, особено на Мила Спиркоска која со својата дисциплинираност и свесност како и беспрекорниот ангажман во однос на имунохистохемијата овозможи одличен квалитет на препарати со што ја олеснува евалуацијата на испитуваните параметри.

Истовремено, најголемата поддршка и поттик во реализацијата на овој проект им ја должам на моите верни колеги, д-р Катерина Кубелка – Сабит и д-р Вања Филиповски. Нивниот несебичен и визионерски ангажман е уште една силна алка потребна за реализација на проекти од овој тип.

Благодарен сум им на сите колеги за поддршката во текот на изработката на оваа студија, како во Клиничката болница Аџибадем – Систина, така и на колегите од Институтот за Патологија. Исто така, благодарен сум и на Извршниот директор на

Клиничката болница Аџибадем – Систина, г-дин Јордан Камчев за постојаниот интерес и поттик како и за извонредните услови за работа кои во голема мерка го олеснуваат реализирањето на нашите идеи.

Техничката обработка на докторската дисертација е заслуга на моите пријатели Наташа и Атила Саид кои несебично се ангажираа во графичката обработка на текстот и фотографиите во студијата како и во печатењето на примероците.

Најголемата благодарност сепак останува за оние кои ме создадоа чесен, вреден и упорен, за моите починати родители кои ме научија како треба да се вреднува трудот, пријателството, колегијалноста и соработката.

На крај, реализацијата на оваа студија ќе беше невозможна без поддршката и разбирањето на мојата сопруга Катарина, која имаше доволно верба, трпение и љубов да ме следи во текот на овие години и да ме поттикнува во реализацијата на моите цели.

Скопје, 2016

Џенгис Јашар

АПСТРАКТ

ЦЕЛИ: Карциномот на дојка е најчесто дијагностициран карцином кај жените ширум светот и се карактеризира со молекуларна и клиничка хетерогеност која резултира со бројни внатрешни туморски подтипови. Целта на оваа студија е да се евалуира појавата на релапси кај различни имунофенотипови на карцином на дојка во корелација со различните хистолошки параметри.

МЕТОДИ: Во оваа ретроспективна студија вклучени се 192 пациентки со карцином на дојка дијагностицирани во периодот од 2007 до 2010 година во нашата болница. Молекуларната класификација е изведена врз основа на имунохистохемиските анализи на естрогениот (ER) и прогестеронскиот рецептор (PR), како и врз основа на пролиферативниот индекс на туморот и експресијата на рецепторот на Хуманиот епидермален фактор на раст (HER-2/neu) според препораките на St. Gallen International Expert Consensus од 2013 година. Во периодот на следење (min.12,2, max. 75,3, просек 46,6±16,6 месеци), кој вклучува 173 пациентки, релапси на болеста се забележани кај 35 пациентки (20,2%). Корелациите на имунофенотиповите на карциномот на дојка и хистоморфолошките односно клиничките параметри се анализирани во однос на периодот без болест (disease free survival - DFS) со мултиваријантната анализа според Соx-овиот регресионен модел.

РЕЗУЛТАТИ: Односот на имунофенотиповите покажа застапеност на Luminal A кај 26,56% пациентки; Luminal B-41.67%; HER2+ 18,75% и тројно негативните кај 13,02%. Во униваријантната анализа, постои сигнификантна разлика во дистрибуцијата на имунофенотиповите според возраста, туморскиот дијаметар, митотскиот индекс, лимфо-нодалниот однос, Нотингемскиот прогностички индекс, стадиумот на болеста, пролиферативниот индекс Ki67 и експресијата на bcl-2 онкопротеинот, кај четирите подтипови на карцином на дојка. Во мултиваријантната анализа, возраста, туморскиот дијаметар и стадиумот на болеста се покажаа како независни прогностички фактори за појавата на релапси кај различните имунофенотипови на карцином на дојка.

ЗАКЛУЧОК: Прогностичката вредност на имунофенотипизацијата на карциномот на дојка е важна кога ќе се земат во предвид возраста, туморскиот дијаметар и стадиумот на болеста. Овој “морфолошко-молекуларен“ модел иако груб, дава појасна стратификација во предикцијата на рекурентната болест согласно на традиционалните (класични) прогностички параметри.

Клучни зборови: карцином на дојка, имунофенотипови, молекуларна класификација, релапси

SUMMARY

OBJECTIVE: Breast cancer (BC) is the most commonly diagnosed cancer in women worldwide characterized by molecular and clinical heterogeneity that results with multiple intrinsic tumor subtypes. The aim of this study was to evaluate the occurrence of relapses in the different immunophenotypes of BC associated with different histological parameters.

METHODS: The retrospective population study included 192 BC patients diagnosed between 2007 and 2010 in our hospital. Molecular subtype classification was performed on immunohistochemical surrogates for estrogen (ER) and progesterone receptor (PR), as well as for proliferation index (Ki-67) and Human Epidermal Growth Factor receptor-2 (HER-2), according to St. Gallen International Expert Consensus recommendations from 2013. During the follow-up period (min.12,2, max. 75,3, mean 46,6±16,6 months), that includes 173 patients, recurrences were observed in 35 patients (20,2%). BC immunophenotypes and histomorphological/clinical parameters were analyzed in terms of disease free survival (DFS) in a multivariate fashion using a Cox regression model.

RESULTS: Proportions of BC immunophenotypes were: Luminal A-26,56%; Luminal B-41.67%; HER2+ 18,75% and Triple-negative-13,02%. In the Univariate analyses there was a significant difference in the distribution of age, tumor diameter, mitotic index, lympho-nodal ratio, Nottingham Prognostic Index (NPI), stage of the disease, Ki67 PI and the bcl-2 overexpression among the four BC immunophenotypes. In the multivariate analyses, the age, tumor diameter and the stage of the disease were represented as independent prognostic factors of recurrent disease in different BC immunophenotypes.

CONCLUSION: The prognostic value of BC immunophenotypes persists when adjusting the age, the tumor diameter and the stage of the disease and this “morphologic-molecular” model was robust in relapse prediction and recurrence risk stratified by traditional prognostic parameters.

Key words: breast cancer, immunophenotypes, molecular classification, relapses

1. ВОВЕД

Карциномот на дојката е едно од најиспитуваните неоплазми во хуманата популација. И покрај тоа што дојката е орган кој е достапен за сите типови на конвенционални односно клинички, радиолошки и лабораториски испитувања, високиот процент на застапеност на карциномот во овој дел од телото го наметнува заклучокот дека ова заболување има непредвидлив тек (1).

Конвенционалните клиничко-патолошки параметри како што се возраста на пациентот, степенот на хистолошка диференцијација, нуклеарниот градус, големината на примарниот тумор, статусот на аксиларните лимфни јазли како и во поновата ера на имунохистохемијата, одредувањето на хормонскиот статус, пролиферативниот индекс, изразеноста, односно амплификацијата на Her-2/neu онкогенот и мутациите на p53 гените се покажале успешни како прогностички фактори во однос на текот и исходот на болеста (2-4). Сепак овие прогностички фактори и понатаму не обезбедуваат доволни информации (5), особено од аспект во одредувањето на групите на пациенти кои би имале корист од адјувантната хемотерапија во споредба со оние на кои не им е потребен дополнителен третман. Во неколку споредбени студии е нагласено дека околу 70% од пациентите кои примале антихормонална или хемотерапија, би имале скоро ист ефект во однос на преживувањето без ваков третман (6).

Хетерогеноста на оваа болест на молекуларно ниво се објаснува со постоењето на бројни гени кои се инволвирани во процесот на клеточната пролиферација, диференцијација и апоптоза (7). Согласно на тоа и потребата од истражување и откривање на бројните генетски промени кои се јавуваат кај фенотипски различните карциноми на дојка (8).

Укажувајќи на фенотипската различност на карциномот на дојката која е резултат на соодветна дивергентност на генската експресија, успеано е да се издвојат неколку субтипови на карцином на дојка односно неколку генетски профили формирајќи го т.н. “молекуларен портрет”.

Токму овие генетски профили изразени преку имунофенотипизацијата на карциномот на дојка е и основниот мотив за изработка на оваа студија во нашата популација.

1.1. ЕТИОПАТОГЕНЕЗА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА

Карциномот на дојката е најчеста дијагностицирана неоплазма кај жените со проценети 1.380.000 нови случаи кои се дијагностицирани во 2008 година, односно 1.677.000 во 2012 година (23% односно 25% од сите случаеви на карцином)(9).

Стапката на **инциденција** во Македонија за 2012 година изнесува 76,2 на 100.000 жени и се наоѓа на 44 место на листата од 50 земји со најголема инциденција во светот и е на водечко, прво место во однос на земјите од регионот (Босна и Херцеговина 37,4, Грција 43,8, Албанија 53,9, Бугарија 58,5 Црна Гора со стапка 59,7, Хрватска 60,9, Словенија 66,5 и Србија со стапка од 69,0 на 100.000 жени) (9).

Стапката на **морталитет** во Македонија за 2012 година изнесува 25,6 на 100.000 жени и се наоѓа на прво место на листата од земјите на регионот (Босна и Херцеговина со стапка на морталитет од 12, Грција 14, Словенија 15,6, Албанија 16, Хрватска 16,7, Бугарија 17,2, Црна Гора 20,2 и Србија со стапка на морталитет од 22 на 100.000 жени) (9).

Инциденцијата за инвазивен карцином на дојка силно се зголемува со **возраста**. Сепак, инциденцијата варира во голема мера во согласност со **расата** или етничката група како и во однос на условите на животната средина (јонизирачко зрачење, алкохол, употреба на хормонски препарати и тн. (10-13).

Табела 1. Ризик фактори на карциним на дојка– сумарно, според анализите на Hulka BS, Moorman PG. Maturitas 2001; 38:103-113 (14).

Релативен ризик	Фактор
>4.0	Женски пол Возраст (65+ vs. <65 год. иако ризикот се зголемува се до возраст од 80) Наследни генетски мутации за карцином на дојка (BRCA1и/или BRCA2) Две или три роднини од прво колено со претходно дијагностициран карцином на дојка во рана возраст Претходна лична историја на карцином на дојка Густина на мамарен паренхим над 75%
2.1-4.0	Хистолошки потврдена атипична хиперплазија Роднина од прво колено со претходно дијагностициран карцином на дојка Висока доза на радио- терапија во пределот на градниот кош Постменопаузална зголемена густина на коска
1.1-2.0 Фактори поврзани со циркулирачките хормони	Подоцнежна возраст на прва износена бременост (>30 години) Рана менарха (<12 години) Доцна менопауза (>55 years) Ниедна износена бременост Нема доено Употреба на орални контрацептиви Долготрајна употреба на хормон-заместителна терапија Постменопаузална обезност (дебелина) Лична историја на претходно третиран ендометријален или оваријален карцином
1.1 -2.0 Други фактори	Употреба на алкохол Висина Висок социо-економски статус

Еден од добро познатите фактори на ризик во настанување на карциномот на дојката е **фамилијарната историја** на болеста. Првото прашање кое се наметнува е, во колкав процент карциномот на дојка е со наследно потекло? Во една голема студија на монозиготни и дизиготните близначки парови се проценува дека наследноста изнесува 27 %, (15). Од друга страна, карциномот на дојката кој се јавува на возраст од 60 до 80 години, само 3 % до 5% од пациентите имаат фамилијарна компонента на болеста (16). Забележително е да се спомене дека кај околу една третина од фамилијарно оптеретените пациенти со карцином на дојка не е најдена BRCA1 или BRCA2 мутација. Сепак, жена со семејна историја на карцином на дојка е поверојатно да развие билатерален карцином на дојка, отколку една со негативни семејната историја (17).

Улогите на различни **хормони** кај карциномот на дојката се спроведени во поголем број студии во кои се објавени релациите помеѓу нивото на циркулирачкиот естроген и андроген кај жените во постменопауза и ризикот од последователниот карцином на дојка. Збирната анализа на оригиналните податоци од овие студии покажаа дека и двата хормона (естроген и андроген хормон) беа силно поврзани со ризик од развој на болеста (18). Слични резултати биле забележани и за други хормони како на пример естрон, естрон сулфат, андростенедион, тестостерон, дехидроепиандростерон, и дехидроепиандростерон сулфат. Како што и се очекуваше, најсилната поврзаност била најдена кај слободниот естрадиол и естрадиолот неврзан за половиот хормон-врзувачки глобулин (Sex hormone binding globulin-SHBG), чие ниво било покачено од 5 до 13 години пред дијагнозата на карцином на дојка во споредба со контролната група пациенти (19). Факторите на ризик за карцином на дојка се сумарно прикажани на Табела 1.

1.2. ОНКОГЕНЕЗА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКАТА

Причината за карциномот на дојка не може да се објасни со еден етиолошкиот агенс. Наместо тоа, генезата на карциномот на дојката може да се разгледува како резултат на акумулација на штетни агенси во текот на повеќе години. Генерално, два типови на производи се случуваат на молекуларна основа во генезата на карциномот на дојка: мутација на дезоксирибонуклеинската киселина (DNK) и индукција на пролиферацијата (20). Мутација на DNK се случува во рамките на критични гени кои се одговорни за регулирање на клеточниот раст, апоптозата, диференцијација и хромозомска репликација. Мутациите или ги активираат или ги деактивираат погодените гени. Пролиферацијата, од друга страна, ја врши својата функција преку два механизми. Митогените агенси директно предизвикаат клеточната делба и пролиферацијата, додека токсичните агенси предизвикаат ширење во преживеаните клетки кои го населуваат повреденото ткиво (21).

Генетскиот модел на развој на карциномот се базира на теорија дека трансформацијата на нормалните клетки на дојката, во тумор на дојка, зависи од промена на гените кои се наоѓаат во нормалната клетка. Овие генетски промени се предизвикани од страна на внатрешни или надворешни фактори. Според оваа теорија (22), сите нарушувања кои можат да доведат до карцином на дојка, кои во себе вклучуваат мутации, индукција на размножување, и индукција на клеточната смрт, односно апоптозата, во крајна линија водат кон промена на гени кои го контролираат растот на клетката. Иако стимулираната пролиферација не резултира директно со мутација на гени кои го контролираат растот, тоа обезбедува услови за мутираните клетки да се размножуваат, да се здобијат со дополнителни мутации, и да го надминат бројот на соседните, нормални клетки.

1.2.1 Онкогени и тумор супресорски гени

Онкогени се класа на гени кои предизвикуваат раст на туморот кога се активирани (23). Овие гени се однесуваат доминантно, бидејќи тие го промовираат проширувањето на туморот. Гени активирани на овој начин кај карциномот на дојката ги вклучуваат рецепторот на епидермалниот фактор на раст (EGFR), erbB-2/HER-2/neu, b-тус, и Cyclin D1, кои ја стимулираат клеточната делба (24). Секој од овие гени е

амплифициран кај карциномот на дојка, па оттука, амплификацијата е главен механизам на онкогено активирање кај оваа неоплазма.

Теоријата на тумор супресорските гени беше развиена од страна на Knudson за објаснување на механизмот на наследување според моделот на предиспозиција за ретинобластом (25). Овој модел се базира на концептот дека со исклучок на половите хромозоми, луѓето вообичаено имаат два функционални алели (копии) на секој ген. За да се развие еден тумор, и двете алели на специфичниот ген мора да се инактивирани. Најчест мутиран тумор супресорски ген кај карциномот на дојката е p53 (26). Иако наследна мутација на p53 е ретка причина за карцином, p53 е мутиран во речиси половина од сите инвазивни карциноми на дојка. Имунохистохемиските анализи на p53 во дукталниот *in situ* карцином на дојка, исто така, укажува на ваквата промена во дел од туморите (27, 28). Се разбира, BRCA1 и BRCA2 се мутирани во тумори на пациенти кои наследиле неисправни копии на еден од овие гени, но овие два гена не се мутирани во спорадичниот карцином на дојка (29).

1.2.2 Улога на Естрогениот рецептор (ER)

Улогата на естрогенот во развојот на карциномот на дојка за првпат беше забележана кога оофоректомија кај пременопаузална жени резултираше со туморска регресија (30). Улогата на естроген е дополнително поддржана со почетокот на менархата, доцната прва бременост, доцна менопауза, или употребата на орални контрацептиви. Ова се толкува како резултат на зголемената изложеност на естрогениот хормон во текот на животот (31). Биолошките активности на естрогенот се посредувани преку естрогениот рецептор (ER). Во нормалните гради, ER ретко се поврзани со маркерите на пролиферација. Се смета дека естрогенот го исполнува својот митоген ефект од стимулација на паракрини сигнали (32). Кај карциномот на дојката, ER и пролиферативните маркери се преклопуваат. Околу 70% од карциномите на дојка изразуваат ER, а клетките на ER-позитивните карциноми на дојка се размножуваат како одговор на присутниот естроген (32). Стекнувањето на пролиферативниот капацитет на ER-позитивните клетки се јавува уште во најраните фази на туморогенезата и затоа се појавува како фактор во формирањето на туморската формација во дојката (32). Во отсуство на естроген, туморогенезата е комбинирана со активација на врзувачките протеини (Hsp90, P23, CYP-40 и FKBP52) кои ги модулираат ER-DNK врзувачките способности.

1.2.3 Улога на хуманиот епидермален фактор на раст-2 (HER-2/neu)

Сите четири членови на семејството на хуманиот епидермален фактор на раст (HER-1-4) на генот HER/erbB/EGFR се изразени кај карциномот на дојка (33). Овие гени ги кодираат трансмембранските рецептори на кои се врзуваат факторите за раст и иницираат внатрешна трансдукција на митогени сигнални патеки преку нивните тирозин киназа домени. Иако, тие се моќни митогени, тие исто така може да ја стимулираат апоптозата кога пројавуваат прекумерна експресија (34). HER-1 го врзува епидермалниот фактор на раст (EGF), трансформирачкиот фактор на раст-алфа (TGF-алфа), и amphiregulin-от. HER-1 и HER-4 го врзуваат betacellulin-от, epiregulin-от и хуманиот (бета) епидермален фактор на раст-HBEGF. HER-3 и HER-4 ги врзуваат neuregulin-ите 1-4 (35). HER-2 и HER-3 се необични по тоа што досега не е идентификуван HER-2 лиганд а HER-3 нема внатрешна тирозин киназа активност (33).

При врзувањето со лигандите, членовите на HER рецептор семејството димеризираат и ги фосфорилираат специфичните тирозин остатоци во рамките на нивните цитоплазматски домени. Секој рецептор содржи специфични точки на фосфорилација, кои ги формираат врзувачките места за различни сигнални молекули. Фосфорилација може да доведе до интеграција на Src-хомологни протеини (SH2) и фосфотирозин - врзувачкиот домен протеини (PTBs), како што се Src, PLC γ и PI3K, и да ги адаптира протеините, како што Shc, Grb2, Grb7 и Nck (33). Високо ниво на фосфорилираната HER-3 често се наоѓаат кај тумори кои покажуваат прекумерна експресија на HER-2, и овој хетеродимер се појавува како најпотентен (36). Експресијата на HER-2, исто така, промовира инвазија и метастаза која може да се постигне или со инхибиција на транскрипција на E-cadherin-от или со разложување на бета-катенинот (37). HER-2 може исто така, да доведе до зголемување на инвазивноста доколку настане асоцијација со ASGP2, на трансмембранската компонента на MUC4, протеин кој просторно ја попречува атхезијата на E-cadherin-от (38).

1.2.4 Улога на протеините кои го регулираат клеточниот циклус

Алтернативен став е дека карциномот на дојка е болест на абнормална или неконтролирана пролиферација на клетки кои произлегуваат од неконтролирана сигнализација на факторот на раст или отстапувања на контролната машинерија на клеточниот циклус (39). Прогресијата преку овој циклус е промовиран од страна на циклин-зависни кинази (CDK), кои се позитивно регулирани со циклини и негативно регулирани со CDK инхибитори. Циклини се синтетизираат во различни временски циклуси (G1 фаза-мирување, S-фаза, синтеза на DNK, G2-фаза и M-фаза, фаза на митози односно на активна делба) и брзо се деградирани од страна на протеински комплекси кои за цел го имаат уништавањето на протеозомите.

Cyclin D1 е најстариот проучуван протеин во клеточниот циклус на карциномот на дојка. Cyclin D1 игра важна улога во алвеологенезата, што е докажано на експериментален модел на глупци со несоодветна развиеност на алвеолите, односно мамарните жлезди, на крајот од бременост (39). Експресијата на Cyclin D1 генот е засилена кај 10 % карциноми на дојка, а Cyclin D1 протеините се покачени за уште 40% (40).

1.2.5 p53 тумор супресорски ген и апоптоза

По одвикнувањето од доење, епителот на мамарните жлезди се подложува на апоптоза, предизвикувајќи понатамошна еволуција на жлездите, чиј изглед станува сличен на оној на пубертетскиот разгранет систем на канали (41). Утврдено е дека протеините кои играат нормално физиолошка улога како врз епителот на дојката за време на доењето било како апоптотички или адипогенични сигнали, во текот на инволуција играат значајна улога во појавата на карцином на дојка. Инактивираните мутации на p53 генот се најчестите мутации кај спорадичниот карцином на дојка, која е присутна во околу 60 % од туморите (42). Мутација на p53 на герминативните клетки се најде кај помалку од 1 % од карциноми на дојка и не се придружени со губиток на хетерозиготноста (42). Така, недостатокот на p53 промовира развој на тумор, при што и губење на еден алел е доволен за да се зголеми ризикот. Гаметните мутации во p53 се присутни кај Li-Fraumeni синдром, кој се карактеризира со зголемен ризик за многу видови на карциноми, вклучувајќи 18 пати поголем ризик за развој на карцином на дојка пред возраст од 45 години (43). Покрај тоа, p53 формира тетрамеричен

транскрипционен фактор кој игра важна улоги како тумор супресорен чувар на интегритет на геномот. Нивото на p53 е строго регулирано по принцип на негативна повратна спрега од страна на Mdm2, кој се врзува со p53 и ја олеснува неговата присутност при протеолиза. Иако преку овој механизам нивото на p53 се одржува на ниски граници, p53 се стабилизира и се активира како одговор при стресни стимулации, како што се оштетување на DNK или хипоксијата (42).

1.3. ПРОГНОСТИЧКИ ФАКТОРИ КАЈ КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКАТА

Големина на примарен тумор - Големината на инвазивната компонента на туморот е веројатно најважниот предиктивен фактор утврден со хистопатолошка евалуација на карциномот на дојка (44). Класичната студија на Rosen и соработниците (45) покажала дека пациенти со негативни лимфни јазли и инвазивни тумори поголеми од 1 см имале значително помала ниска стапка на преживување во споредба со оние кои имале тумори помали од 1 см.

Лимфни јазли - Дисекцијата на аксиларните лимфни јазли е важна компонента при хируршкиот третман на пациентите со карцином на дојка. Иако аксиларната дисекција на лимфните јазли нема докажана терапевтска корист, таа обезбедува важни прогностички информации (46).

Степен на хистолошка диференцијација (G) - Степенот на хистолошка диференцијација е суштински аспект на секое рутинско микроскопско испитување на инвазивниот карцином на дојка. Прогностичките вредности на проценувањето се бројни и повеќекратно опишани во литературата (47). Како што може да се очекува, добро диференцираните инвазивни карциноми на дојка имаат поповолна прогноза од оние кои се умерено диференцирани, а овие пак, имаат подобра прогноза во однос на оние кои се класифицирани како лошо диференцирани. На сличен начин, пациентите со лошо диференцирани инвазивни карциноми на дојка се со далеку поголема веројатност да имаат метастази во аксиларните лимфни јазли отколку оние со подобро диференцирани карциноми дури и да станува збор за тумори со иста големина. Оценувањето на степенот на хистолошка диференцијација се базира на анализите од Bloom и Richardson (48).

Нотингемски прогностички индекс – NPI - Нотингемски прогностички индекс (NPI - The Nottingham Prognostic Index) претставува параметар во кој се инкорпорирани лимфонодалниот статус (L во опсег од 1–3 каде 1 = негативни, 2 = 1–3 позитивни и 3 = над 4 позитивни јазли), степенот на хистолошката диференција (G, ранг од 1-3) и големината на примарниот тумор (TD)(49). Се пресметува според следната формула:

$$NPI = L + G + (TD/см \times 0,2)$$

Оваа формула ја рефлектира природата на туморот односно неговиот метастатски потенцијал, генетската нестабилност и степенот на раст односно инвазивност (50, 51). Многу поважно е што овој индекс како континуирана варијабла, нуди можност и специфично значење во поглед на следењето на пациентите со карцином на дојка и нивниот исход (52). Според NPI може да се дефинираат 3 ризични групи на пациенти: ниско ризична или добра (индексот е ≤ 3.4), средно ризична или умерена група (индексот е во граница 3.41 - 5.4), и високо ризична односно неповолна прогностичка група (индексот е > 5.4) (52). Трите фактори кои се независно асоцирани со преживувањето се споени во овој единствен алгоритам.

Лимфоваскуларна инвазија – лимфоваскуларната инвазија, не е реткост и зависи од препознавањето на интралуминалните групи на туморски клетки обично во согласност со формата на обработениот лимфатичен простор со ендотелни клетки. Ваков простор може, но не мора нужно да содржи црвени крвни зрнца, но обично малите артериски или венски структури се секогаш во непосредна близина на лимфните садови. Повеќето студии покажале пониска стапка на преживувањето без болест кај пациентите со лимфоваскуларна инвазија, претежно кај оние со негативни лимфни јазли (53-58). Иако постојат далеку помалку достапни податоци, се чини дека лимфоваскуларната инвазија е фактор на ризик за локорегионални рецидиви особено кај пациенти третирани со туморектомија и зрачење, особено кога лимфоваскуларната инвазија е присутна во близина на линијата на оперативен рез (58). Во повеќето студии е утврдено дека васкуларната инвазија сама по себе е негативен индикатор на болеста и на општото преживување кај пациентите (53, 57, 59).

Други прогностички фактори - Опишани се бројни други хистопатолошки карактеристики кои се проценуваат како можни показатели на поволни или неповолни прогностички фактори кај карциномот на дојката. Меѓу нив се вбројуваат: присуството на воспалителен инфилтрат, стромалната фиброза, односно дезмоплазијата, присутната еластоза, туморскиот раст односно зракасти наспроти циркумскриптни маргини на туморот, туморската некроза, туморските маргини и периневралната инвазија (53, 59, 60).

1.4. МОЛЕКУЛАРНО-БИОЛОШКИ И ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ

Степен на пролиферативна активност (Ki-67) - Постојат бројни студии кои се однесуваат на важноста на пролиферативниот индекс на карциномот на дојка детерминирана преку проточната цитометрија или преку имунохистохемиската експресија на моноклоналното антителио Ki-67 (61, 62). Во студиите кои се базираат на пролиферативниот индекс детерминиран со моноклоналното антителио Ki-67, се забележува дека истиот се јавува како неповолен прогностички фактор (63, 64). Студиите кои ја обработуваат пресечната точка на евалуација дали неоплазмата е со низок или висок степен на пролиферативна активност се бројни, па од тој аспект гледано постои несогласување во униформната евалуација на овој маркер. Така на пример, Colozza и соработниците (65) ревидирале околу 132 труда во која биле вклучени 159.516 пациенти во кои се опишува прогностичката вредност на Ki-67 заедно со уште некои маркери (cyclin D, cyclin E, p27, p21, TK, и топоизомераза II-алфа). При тоа утврдиле дека не постои консензус во однос на интерпретацијата на вредноста на позитивниот сигнал како и отсутна стандардизација на процедурата на боене или скорирањето. Во секој случај овој маркер дава насоки во однос на импликациите за посебен третман и покрај лимитираноста на тестот и неговите резултати.

Рецептор на епидермалниот фактор на раст (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR) - Овој рецептор, (*EGFR, HER-1, c-erbB-1*) е еден од 4-те трансмембрански рецептори кои го регулираат растот на клетката. Слично на имунохистохемиските критериуми за експресијата на *HER2* рецепторот, и експресијата на EGFR кај карциномот на дојката е забележан кај помалку од 10% (66). Експресијата на EGFR скоро секогаш е присутна кај тројно негативните, односно базалните карциноми на дојка а е отсутна кај хормон позитивните тумори. Од тој аспект гледано, (67)EGFR заедно со експресијата на цитокератинот 5/6 (CK5/6), е добар маркер во евалуација на

базлните карциноми на дојка (68). Но, за разлика од карциномот на белите дробови и кај некои дебелоцревни аденокарциноми каде со помош на инхибитори на EGFR, може да се очекува некаков позитивен ефект, истиот изостанува кај карциномот на дојка (69, 70). Се додека не се направат опсежни анализи на молекуларно ниво, улогата на овој маркер останува лимитирана во дијагностичката пракса.

BCL2 - *BCL2* е антиапоптоген ген кој е присутен кај околу 75% карциноми на дојка и неговата експресија е во корелација со ER + неоплазми (71-74). Од неодамна, утврдена е и дополнителната улога на *BCL2* од страна на Abdel-Fateh и соработниците кои предлагаат модифициран систем на одредување на степенот на хистолошка диференцијација со комбинирање на митотскиот индекс и реактивноста на *BCL2* што може да се примени и кај ER + и кај ER- тумори, и би помогнал во редукција на бројните средно диференцирани тумори според Nottingham-ската класификација, каде клиничките дилеми се најчести (75). Овие испитувања наведуваат дека ER+/HER2- тумори може да се класифицираат како луминални А (прогностички добри) ако се добро и средно диференцирани и позитивни за *BCL2*, а сите други ER+/HER2- тумори треба да се сметаат како луминални Б (прогностички неповолни тумори).

Други испитувани фактори кои имаат улога во прогнозата на карциномот на дојката не се предмет на испитување во оваа студија се: Урокиназа плазминоген активатор (uPA), Инхибитор на плазминогениот активатор-1 (PAI-1), Рецептор на Инсулин-сличен фактор на раст (Insulin-like Growth Factor Receptor-1, IGF-1R), FOXA1 и GATA3.

1.5. ХИСТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА КАРЦИНОМ НА ДОЈКА

Според најновото издание на Класификацијата на тумори на дојка од Светската здравствена организација (67) како и според некои автори кои ја обработуваат оваа проблематика (76) постојат неколку хистолошки типови на инвазивни карциноми на дојка и тоа:

1. Инвазивен лобуларен карцином
2. Дуктален карцином на дојка
3. Интрацистичен и солиден папиларен карцином на дојка
4. Метапластичен карцином на дојка
5. Апокрин карцином на дојка
6. Тубуларен карцином на дојка
7. Муцинозен карцином
8. Крибриформен карцином
9. Микропапиларен карцином
10. Медуларен карцином на дојка
11. Аденоиден цистичен карцином
12. Неуроендокрин карцином
13. Секреторен карцином на дојка
14. Карцином на дојка со остеокластни клетки
15. Карцином на дојка – богат со масти (Lipid rich карцином)
16. Карцином на дојка – богат со гликоген (Glycogen-rich карцином)

Врз основа на хистолошката класификација на дојка може да се утврди биолошката агресивност на поедини тумори според нивниот класичен, хистолошки тип. Така на пример, неуроендокрините и некои подтипови на дуктален и на микропапиларен карцином имаат поагресивен ток во споредба со секреторниот или аденоидниот цистичен карцином (67).

1.6. МОЛЕКУЛАРНА КЛАСИФИКАЦИЈА НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА

1.6.1. Нова таксономија на карциномот на дојка: внатрешни подтипови

Со децении, се мислеше дека конвенционалната хистопатолошка дијагноза ќе биде "златен стандард" во однос на микроскопскиот подтип и проценката на однесувањето на карциномот на дојка. Од друга страна, долгорочните следења на пациентите со карцином на дојка покажале дека одреден подтип на карцином или одреден степен на хистолошката диференцијација, имаат многу мало влијание на прогнозата и не носат речиси никакви информации за терапевтската стратегија. Веројатно најдобрата потврда доаѓа од клиничките испитувања, а ние може само да напомене дека конвенционалните патолошки подтипови не се вклучени во Нотингемскиот прогностички индекс (NPI). Исто така, добро е познато дека пациентите со иста патолошки подтип на карцином на дојка и со ист степен на диференцијација, дури и со ист стадиум на болеста, имаат различни исход (77).

Објаснувањето за овој феномен може да дојде од хистологијата и биологијата на туморот. Пред повеќе од 25 години, утврдено е дека нормалното ткиво на дојката, се карактеризира со постоење на различни типови на епителни клетки (на пример, базалните, луминални клетки од тип А, Б и тн.). Терминот "базалните" се однесува на клетки кои изразуваат базални својства на интермедиерните филаменти од класата на цитокератини како што се cytokeratin 5 (CK5) или CK14 и луминални клетки кои изразуваат само цитокератини од класата CK8/18, како што е прикажано во дел од студиите (78). CK5+ клетки се зрели прогениторски клетки кои доведуваат до посредна диференцијација во двојно етикетираните клетки (CK5+/CK8/18+, CK+/мазно мускулен актин α -SMA+) за да конечно се произведат комплетно диференцирани зрели клетки на мамарниот дуктален и алвеоларен систем (79). Ова укажува на постоење на прогениторска односно "стем" клетка која е предок на базалните односно на луминалните клетки, регулирани со BRCA1, како што е претпоставено од страна на Foulkes (80). Секоја нормална клетка може да биде претставена како фенотип на инвазивен карцином, со посебна хистологија и со карактеристична експресија на хормонските рецептори.

Значително подобрување во теоријата беше постигната во последната деценија од страна на некои маркери истражувани во насока на фармако-дијагнозата (Естроген рецептор-ER, Прогестеронски рецептор PR, пролиферативен индекс, Ki67 и HER2). Се покажа дека пациентите со карцином на дојка може да бидат групирани врз основа на експресијата на овие маркери, докажани било имунохистохемиски или со помош на генетски анализи (81, 82). Постојат многу докази дека експресијата на хормонските рецептори и на HER2 имаат директно влијание врз терапијата и дека нема значајно совпаѓање со конвенционалните подтипови на карциноми на дојка (83). Тоа е многу веројатно бидејќи оваа разлика, од молекуларно различни болести се групирани во клинички подтипови, врз основа на нивните морфолошки односно хистолошки карактеристики.

Во обид да се реши овој проблем, карциномот на дојката е класифициран врз основа на експресијата на нивниот генетски профил кој има директна рефлексивност во имунохистохемиската експресија на цитокератините (5/6 и 8/18), хормонските рецептори, епидермалниот фактор на раст - EGFR и HER2 генот. Оваа класификација,

која ги признава луминалните, базалните, и HER2 подтиповите, имаше силно влијание врз терапевтските стратегии и се покажа дека молекуларна подтипови реагираат различно на предоперативна хемотерапија и на адјувантна постоперативна терапија. Овие податоци донесоа нов увид во природната еволуција и биологијата на карциномот на дојка, но молекуларниот профил е далеку од негова кристализација. Концептот на “една болест со многу лица” се појави пред четири децении од конвенционалните хистопатолошки студии (84, 85) и беше поддржан од генетските и имунохистохемиските анализи (85).

Perou и Sorlie (7) со соработниците, се пионери во новата таксономија на карциномот на дојка, изразена преку моделот на генска експресија преку DNK микроареи. Тие укажале на тоа дека карциномот на дојка може да се групира во молекуларни подтипови кои се разликуваат според нивната уникатна генска експресија. Нивната првична класификација ги вклучува луминалните А и Б подтипови (ER позитивни), HER2 подтип (HER2-позитивни), и базални типови (ER-/PR-/HER2- или “тројно негативни”).

Овие подтипови се разликуваат по текот и исходот на болеста и одговорот на третманот (8, 86). Од сите четири подтипови најконтроверзни се двата ER позитивни тумори кои имаат различен исход. Луминалните А подтипови покажуваат висока експресија на ER, GATA3, X-box фактор 3 врзувачки протеин, хепатоцитен јадрен фактор 3 алфа (познат како FOXA1) и LIV-1. Луминалните Б подтипови покажуваат умерена експресија на гените на луминалните клетки и обично повисока клеточна пролиферативна активност и низок степен на прогестеронска експресија. Базалните карциноми пројавуваат експресија на цитокератините 5 и 17, ламинин и врзувачкиот протеин 7 на масните киселини. Подгрупата на HER2 позитивни карциноми покажуваат висока експресија на гените на рецепторот на хуманиот епидермален фактор на раст.

Овие подтипови се карактеризираат со значителна разлика во текот и исходот на болеста. Според испитувањата на van't Veer и соработниците (87) пациентите со луминален А подтип имаат подолг временски интервал без болест, пред да развијат локо-регионални рецидиви или далечни метастази, за разлика од групата на базални и HER2 позитивни тумори кои имаат пократко време без болест. Луминалните и базалните подтипови се различни биолошки ентитети бидејќи нивната генска експресија се базира на сетови од тотално различни гени (24).

Молекуларниот профил на карциномот на дојка треба да одговори на три главни прашања (77, 88): (i) дали биолошки туморите се разликуваат меѓу себе или не, (ii) може ли точно да се предвиди клиничкиот исход на пациентите со морфолошки слични тумори? (iii) може ли да се предвиди одговор на специфична терапија во поединечни случаи?

1.6.2 Имунофенотипизација (молекуларна класификација)

Според некои автори (88) постојат 4 типа на карциноми на дојка врз основа на генетско и молекуларно-биолошко ниво, а според некои, најдени се пет различни молекуларни поткласи на карциноми на дојка идентификувани со помош на генетски анализи: естроген рецептор позитивни, која вклучува тумори од луминален А и В тип, и естроген рецептор негативни, која вклучува тумори од HER2 тип и “тројно негативни” односно базалните тумори (89, 90). Сеуште не е јасно дали петтата група на т.н. “некласифицирани” карциноми е навистина поединечна класа на тумори, или тука спаѓаат подтипови кои сеуште не се јасно карактеризирани (86).

Резултатите добиени со генетски анализи се совпаѓаат со имунохистохемиските наоди базирани на експресијата на хормонските рецептори, HER2, EGFR, цитокератините, протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 и Bcl2. Иако помалку сензитивна, имунохистохемијата, во клиничката пракса се покажа како корисен сурогат на анализата на генската експресија (2).

При имунохистохемиската анализа, основната појдовна точка во користење на овие маркери е да се утврди која е позитивната односно пресечната точка која ќе ни каже дека туморот е со “позитивна” реакција. Многу автори се согласуваат дека за да еден тумор се смета позитивен за хормонските рецептори, треба да пројави нуклеарна реактивност во над 10% од неопластични клетки, во било каков интензитет. HER2 активност обично се оценува со помош на скорирачки систем кој се применува за Herceptin-скиот тест, а тумори скорирани како 2 + треба да се анализираат за HER2 амплификација со методи на различна *in situ* хибридизација. За цитокератините од било која класа, било каква цитоплазматска или мембранска експресија во туморските клетки се смета за позитивна (2, 86, 90).

1.6.3 Луминални карциноми на дојка

Луминалните карциноми на дојка се карактеризираат со експресија на хормонските рецептори односно со позитивен сигнал за естрогениот (ER) и прогестеронскиот рецептор (PR), како и со експресија на интермедиерните филаменти од класата на цитокератини CK8/18 и со BCL-2. Дополнителниот маркер, GATA3, покажува изразена експресија во луминалните карциноми особено од подтипот А кој е со поповолна прогноза. Оваа дефиниција на луминалниот тип карцином е независна од експресијата на CK5/6 и EGFR, но истите може да се најдат и во поедини случаи. Помалку од 9% од случаите на луминалните карциноми на дојка се со низок степен на хистолошка диференцијација (G3) (91).

Луминален тип А - Луминалниот тип А (56-61%) се карактеризира со високо ниво на експресија ER и е поврзано со релативно добра прогноза (92). Многу од гените асоцирани со експресијата на естрогенскиот рецептор (PR, FOXA1, GATA3, BCL2) се најдени во луминалниот тип А карцином на дојката и обично се изразени во луминалната епител кој ги обложува мамарните канали. Овие карциноми се карактеризираат со висок степен на хистолошка диференцијација и низок степен на пролиферативна активност изразена преку Ki67 пролиферативниот индекс. Типичен имунохистохемиски профил на луминалниот тип на карцином на дојка е ER позитивен и/или PR позитивен, и HER2 негативен. Врз основа на молекуларниот профил, сите случаи со чист *in situ* лобуларен карцином на дојка се од луминален тип А (93). Последователно на тоа, голем дел од инвазивните лобуларни карцином на дојка, имаат профил карактеристичен за луминален тип А.

Луминален тип Б - Луминален тип Б (9-16%) карцином на дојка, претставува поагресивен фенотип, кој во себе вклучува и понизок степен на хистолошка диференцијација на туморот и изразен степен на пролиферативна активност (7). Кај овие тумори, покрај позитивната експресија на ER и/или PR, се случува и експресија на EGFR - 1, HER2, и циклин E1 (94, 95). Молекуларната класификација беше дополнително пречистена врз основа на имунохистохемиските податоци. Така на пример Laakso и соработниците во својата студија (94) утврдиле дека речиси половина од базалните карциноми на дојка се состојат од мешавина на CK5/14 позитивни и негативни

туморски клетки па предложиле нов ентитет, така наречен базолуминален карцином кои би можел да ја рефлектира диференцијацијата на базалниот во луминален фенотип и негова малигна трансформација. Значајни разлики беа забележани меѓу базалните и базолуминалните тумори во однос на онкогениот профил, преживување на пациентите како и во однос на клеточната пролиферација детерминирана со моноклоналното антителио Ki67, чиј индекс изнесувал 33% кај луминалните, наспроти 58%, кај базолуминалните карциноми соодветно).

1.6.4 HER2 позитивен карцином на дојка

HER2 позитивните карциноми на дојка вклучуваат два различни подтипови врз основа на експресијата на естрогениот рецептор ER и тоа: ER негативни, кој имунофенотипски е поблизок до групата на базалните карциноми (HER2 позитивен, ER негативен подтип), и скоро позитивни, кој е поблизок до групата луминалниот Б подтип (овие тумори можат да изразат и позитивите⁺ за PR). Некои случаи со HER2 тип, исто така можат да изразат и позитивен сигнал за EGFR (95). Во поголемиот дел од случаевите, нема изразена експресија на туморските клетки за протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53, а изразувањето на CK8/18 е хетероген и умерен. Доколку EGFR се покаже позитивен, истиот е фокален и ограничен на мал број клетки (помалку од 5% туморската клеточна популација). HER2 типот често е поврзани со DCIS, обично се лошо диференцирани тумори и се карактеризираат со лоша прогноза (96).

1.6.5 "Тројно негативни" (Базални) карциноми на дојка

Базалните карциноми на дојка (8-20% од случаевите) се почести кај помладата популација(97), и се карактеризираат со отсутна експресија на хормонските рецептори, како и со HER2 експресијата и покажува позитивен имунохистохемиски мембрански сигнал за цитокератинот CK5/6 и за EGFR (98). Иако овие тумори имаат некои заеднички морфолошки карактеристики, не постојат некои посебни односно карактеристични белези кои би биле корисни за да се идентификуваат на рутинските препарати. Овие тумори се викаат исто така "тројно негативни" бидејќи тие немаат позитивитет за ER, PR и HER2. Базалните карцином покажуваат висока стапка на p53 мутации и обично е присутен кај носители на BRCA1 мутации. Во студијата на Bidard и соработниците (99), 150 од 823 тумори биле од тројно негативен, односно базален имунофенотип (18,22%). Од овие, било очекувано дека базални тумори се присутни во 66% од случаевите, базирани на експресијата на EGFR⁺ и CK5/6⁺. EGFR е изразен кај околу 6% од сите тумори на дојка, но инциденцата подигне кај базалните карциноми изнесува 25% (100, 101). "Вистинските" базални карциноми често се лошо диференцирани, солидна хистоархитектоника, имаат избуткувачки начин на раст, силно изразена лимфоцитна инфилтрација, оскудна строма, висок нуклеарно/цитоплазматски однос, висок митотски индекс, изразена некроза и висок резултат на Нотингемскиот прогностички индекс (91, 102). Голем дел од базалните тумори покажуваат метапластични карактеристики (90,8%), и исто така, поголемиот дел од случаевите со медуларен карцином спаѓаат во овој тип (103-105). Метапластичните карциноми покажува позитивна реакција за EGFR, CK5/6, CK14, CK17 и p63 во повеќето случаи. Со вклучувањето на p63 и цитокератинот CK14 во имунохистохемискиот панел на метапластичните карциноми, 93,8% метапластични карциноми на дојка може да се класифицираат како базални тумори. Базалните карциноми поретко метастазираат во аксиларни лимфните јазли, црниот дроб и

коските, а покажуваат афинитет на хематогена дистрибуција со развивање метастатски депозити во мозокот и белите дробови (106). Врз основа на генетските и имунохистохемиските анализи, медуларен карцином се чини дека е подтип на базалните карциноми, врз основа на тројно негативниот карактер и експресијата на CK5/6 (107). Голем дел од тројно негативни тумори изразуваат експресија и на цитокератинот CK18, и може погрешно да се класифицираат во луминален Б тип карциноми на дојка. Прелиминарните резултати покажаа дека тројно негативниот карактер не е доволен да се дефинираат базални тумори како карциноми на дојка. Покрај тоа, базалните карциноми изразуваат експресија на интермедиерните филаменти, цитокератини CK14, CK17, виментин (94%) и HER1, но нивното дијагностичко значење сеуште не е јасно дефинирано (108). Многу, но не сите базални карциноми покажуваат позитивен сигнал и за двата базални цитокератини CK5/6 и CK8/18. Се чини дека најчестиот имунофенотип на базалните карциноми е ER негативен, HER2 негативен, виментин позитивен, EGFR позитивен, CK5 позитивен и CK8/18 позитивен. Од нив, силната експресија на виментинот и на CK5 се покажа како најповолен специфичен маркер за базалните тумори на дојка (91). Во овие случаи, експресијата на виментинот има исто така прогностичка вредност, а во корелација со негативниот статус за ER упатува на неповолна прогноза (108). Специфичните маркери на миоепителните клетки не се изразени во повеќето случаи. И покрај фактот дека базалните карциноми се сега јасно дефинирани, прекурсорната лезија за овие тумори е речиси непозната. Дукталниот ин ситу карцином (DCIS) поврзан со инвазивниот базален карцином го покажува истиот имунофенотип како и инвазивната компонента на туморот, и ова обезбедува доказ за каква-таква прекурсорна лезија на овие тумори (82). Изолиран DCIS со базален фенотип беше пронајден во 6-10 % од случаите и имунофенотип со целосно негативен сигнал за сите карактеристични маркери сеуште не е објавен (109, 110). Во овие случаи, P- кадхеринот беше изразен кај 75% од случаите, и се чини дека истиот може да биде добар дополнителен маркер за базалните DCIS. DCIS во овие тумори обично е од солиден тип, со рамен или микро-папиларен епител, со висок нуклеарен градус (изразен јадрен плеоморфизам) и со присутна некроза. Отсуството на атипична дуктална хиперплазија и мали количини на DCIS сугерира дека ваквиот тумор има брз раст. Изразување на базалните или миоепителните маркери е присутен во 2-18 % од случаите со дуктален инвазивен карцином, и во 25 % од лошо диференцираните карциноми на дојка (111, 112). Некои студии покажале дека базалниот карцином е поврзан со повисока стапка на повторување и за смрт, независно од туморската големина и статусот на лимфните јазли (113-115). Прелиминарните резултати покажаа дека адјувантната хемотерапија базирана на антрациклини, е помалку ефикасна за оваа група пациенти и потребни се други терапевтски модалитети кои треба да бидат основна стратегија при идентификација на овие карциноми. Врз основа на дисфункционалниот карактер на BRCA1 и мутацијата на генот p53, (92) со помош на генетски инженеринг беа направени испитувања на клон од глвци каде BRCA1 генот беше инактивиран, со што сите клетки покажале експресија на β -лактоглобулинот (изразувајќи го карактерот на клетки од луминален тип), со експресија на само еден алел од див тип на p53. Туморите на дојка развиени кај овие “условени” глвци покажале базален фенотип во 78% од случаите (116). Тоа за првпат покажало дека базалните карциноми се посебен и специфичен ентитет (104).

Резиме на некои важни аспекти на различните молекуларни типови на карцином на дојка, се прикажани во Табела 2.

Табела 2 – Преглед на општите карактеристики на молекуларните типови на карцином на дојка - модифицирано според *Rakha EA и сор., 2008 (117)*

Тип на неоплазма	Фреквенција	Основни карактеристики
Луминален тип А	56-61%	Изразен позитивитет за ER и со многу добра прогноза
Луминален тип Б	9-16%	Послаба експресија на ER и висок индекс на пролиферација (Ki67), понеповолна прогноза
HER2 позитивни	8-16%	Висок степен на p53 мутации, агресивен ток на болеста, не одговара на хормонска терапија, лоша прогноза
“Тројно негативен“ тип	8-20%	Експресија на CK5, CK17, CD117, EGFR, P-cadherin, мутации на гените p53 и BRCA1

1.7 ПОСТОПЕРАТИВНА ХИСТОПАТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА ДОЈКА (pTNM КЛАСИФИКАЦИЈА СПОРЕД АЈСС, 2010 ГОДИНА)

Целта на постоперативната хистопатолошка класификација на дојка е утврдување на стадиумот на болеста и обезбедување на адекватен третман на пациентот (118). Од тие причини, класификациониот аспект мора да биде валиден и да ги содржи во себе било вистинските *прогностички* фактори со кои се проценува исходот на болеста во текот на периодот без болест или општото преживување – во отсуство на терапија, или вистинските *предиктивни* фактори кои го проценуваат одговорот на специфичниот третман или отсуство на ефект од истиот.

Како и за останатите локализации така и за карциномот на дојка се дефинирани две класификации:

- Клиничка (предтераписка) TNM класификација (cTNM), која се базира на наодите на клиничкиот преглед и другите клинички испитувања (биохемиски, радиолошки и сл.) кои имаат за цел поставување на дијагнозата која треба хистолошки да се верифицира и оценување на проширеноста на неоплазмата.

- Хистопатолошка (постоперативна) TNM класификација (pTNM) која се базира на патохистолошкиот наод од оперативниот материјал со што се овозможува точна проценка на туморската проширеност, како и хистолошки да се верифицира зафатеноста односно статусот на лимфните јазли и присуството или отсуството на далечни метастази.

Најголемата промена на постоперативната хистопатолошка класификација на дојка на АЈСС од 2010 година, се состои во воведувањето на имунохистохемиските и молекуларните испитувања во категоризацијата на лимфонодалниот статус по однос на микрометастазите или на изолираните туморски клетки во лимфатичното ткиво.

Параметрите на постоперативната хистопатолошка класификација се :

- (T) - големина на примарен тумор
- (N) - отсуство или присуство на метастази во регионални лимфни јазли (лимфонодален статус)
- (M) - отсуство или присуство на оддалечени метастази

Категориите на големината на примарниот тумор (pT), лимфонодалниот статус (pN) и присуството или отсуството на далечни метастази (pM) се детално опишани во водичот за одредување на стадиумот на болеста на малигните неоплазми (118).

Согласно на овие параметри и комбинацијата на истите се добива хистолошки потврден стадиум на болеста во моментот на хируршкиот третман.

Врз основа на овие согледувања, може да се заклучи дека постоперативниот стадиум одреден според параметрите на постоперативната pTNM класификација, заради својата точност овозможува адекватно планирање на постоперативниот третман, проценка на прогнозата како и валидно оценување и споредување на терапевтските резултати. Од овие причини, неопходно е истиот да се применува редовно, систематски и универзално, иако денес не е случај во сите средини.

2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

При поставување на целите земени се во предвид неколку фактори кои го детерминираат понатамошниот ток на болеста. Различниот степен на диференцираноста на туморот, типот на постоперативниот третман, различната етиопатогенеза на неоплазмата, појавата на локорегионални или далечни метастази се само некои од прогностичките импликации кај пациентите со карцином на дојка, од кои произлегуваат следните прашања:

- Зошто некои пациенти со поволни клиничко-патолошки или имунофенотипски карактеристики имаат неповолен ток на болеста;
- Зошто некои пациенти со неповолни параметри, како што се степенот на хистолошката диференцијација или негативна експресија на хормонските рецептори имаат поповолен ток на болеста во однос на останатите;
- Зошто пациенти во ист стадиум на болеста со ист постоперативен третман покажуваат различен временски интервал на појава на релапси (disease free survival –DFS).

Основниот мотив на оваа студија е класификацијата на имунофенотипските карактеристики на карциномот на дојка и проценка на нивните клиничко-патолошки и биолошки параметри, како и појавата на релапси кај секоја група поодделно. Врз основа на оваа молекуларно-биолошка класификација се дефинираат карактеристиките на пациентите кај кои постои поголем ризик од тераписки неуспех и појава на релапси. Од друга страна, со самата класификација се овозможува селекција на пациентите со неповолни прогностички параметри кај кои постои потреба од модифицирана терапија и индивидуализиран пристап во планирањето на терапијата.

Основни цели на студијата се:

1. Да се одредат имунофенотипските карактеристики на карциномот на дојка преку експресијата на хормонските рецептори, експресијата на HER2 онкогенот и пролиферативниот индекс на туморот детерминиран со маркерот на клеточна пролиферација Ki67 а нивната класификација да се потврди преку експресијата на одредени имунохистохемиски маркери;
2. Да се евалуираат клиничките и морфо-хистолошките параметри во секоја имунофенотипска класа поодделно со одредување на Нотингемскиот прогностички индекс со кој би се добил степенот на ризик кај секоја група на пациенти;
3. Да се одреди улогата и прогностичката вредност на онкопротеинот bcl2 и на протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 во секоја имунофенотипска класа поодделно;
4. Да се издвојат кои се неповолните фактори кои доведуваат до појавата на релапси во секоја имунофенотипска група посебно.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1. ИЗБОР НА МАТЕРИЈАЛОТ И СЕЛЕКЦИЈА НА ПАЦИЕНТИ

Предмет на испитување на оваа студија се оперативни материјали од 193 пациенти со карцином на дојка добиени со радикална мастектомија или со квадрант ресекција на дојка и со регионална лимфаденектомија. Оперативните материјали беа анализирани во Лабораторијата за хистопатологија и цитологија на Клиничката болница Мала Богородица/Систина односно Аџибадем/Систина во периодот од јуни 2007 до јуни 2010 година. Сите пациенти се оперирани во истата болница.

Во испитувањата се вклучени пациенти во прв, втор и трет стадиум на болеста (одреден според модифицираната постоперативната хистопатолошка класификација на тумори од 2007 година и адаптирана на критериумите на постоперативната pTNM-класификација од 2010 година на AJCC-American Joint Cancer Committee (118). Постоперативно, кај сите пациенти беше спроведен соодветен онколошки третман, во зависност од типот на хируршката интервенција и анализираниите хистолошки и имунохистохемиски параметри.

Од испитувањето беа исклучени оперативните материјали со дијагноза на “in situ” карцином на дојка односно пациенти во “нулти” стадиум на болеста, како и пациенти во понапредната фаза на болеста со наод на оддалечени метастази (M1). Исто така, во студијата не беа анализирани случаевите каде регионалните лимфни јазли не биле достапни за хистопатолошка анализа (симплекс мастектомија), односно истите не биле дисецирани (Nx). Во делот од студијата каде се анализира следењето на пациентите, при евалуацијата на релапси не се обработени случаевите кај кои не беше можно да се обезбеди адекватно следење.

3.2 МЕТОДИ

Главни постапки во испитувањето на доставениот оперативен примерок кои се внесени и во хистопатолошкиот извештај се макроскопскиот и микроскопскиот наод:

- Во макроскопски опис на оперативниот материјал беше анализиран типот на хируршкиот третман, големината на примарниот тумор, оддалеченоста на истиот од ресекционите линии, мултицентричноста, присуство на друга промена во дојка, претходна аспирациона или “core” биопсија, опис на аксиларното масно ткиво, ресекција на сите лимфни јазли во доставениот примерок, нивниот број и макроскопската суспектност за секундарни депозити.
- Во микроскопскиот опис беа вклучени: најголем дијаметар на инвазивна компонента, хистолошки тип според класификацијата на СЗО (67), степен на хистолошка диференцијација, микроскопска евалуација на ресекциони маргини, присуство на емболуси во лимфоваскуларните простори, инфламаторен инфилтрат во туморот, дезмопластична реакција, еластоза, некроза, перинеурална инфилтрација, придружни промени во околината на дојката (дуктална или лобуларна хиперплазија, “in situ” карцином), број на позитивни во однос на вкупниот број на ресецирани лимфни јазли (лимфонодален индекс).

3.2.1 Имунохистохемиско испитување на интермедиерните филаменти од класата на цитокератини (CK5/6, CK34βE12, CK8, CK17, CK18)

Имунохистохемиската анализа на интермедиерните филаменти е изведена со цел да се потврди имунофенотипската карактеристика на луминалните и тројно негативните, односно базалните карциноми на дојка. За таа цел е користена техника на авидин-биотин комплекс. За имунохистохемиската анализа на базалните цитокератини (CK5/6, CK34βE12, CK17), како и за луминалните (CK8, CK18) користени се готови моноклонални глувчешки антитела (DAKO, Glostrup, Denmark) како и визуелизирачки систем (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse) со разредување од 1:100. За демаскирање на епитопите на сите цитокератини е користен цитратен буфер во микробранова печка од 700W. При евалуацијата на цитокератините како позитивен наод е сметан било кој интензитет на целосен мембрански сигнал на малигните клетки.

3.2.2 Дополнителни имунохистохемиски испитувања (Bcl-2, EGFR, CD117, Vimentin, E-cadherin)

Кај сите карциноми на дојка е испитувана и експресијата на bcl-2 како главен анти-апоптотичен маркер со цел да се утврди прогностичката вредност. Кај пациентите со тројно негативен карцином на дојка, направени се и дополнителни имунохистохемиски испитувања во кои се вклучени рецепторот за епидермален фактор на раст (EGFR), маркерот за стромална диференцијација (C-kit).

Контролата на квалитетот на имунохистохемиското боене е утврдена со користење на мезенхимниот маркер Vimentin а истовремено е анализиран сигналот присутен кај лошо диференцираните неоплазми како и кај карциномите со тројно негативен фенотип. Исто така, детерминирањето на типот на неоплазмата со дуктално потекло е утврдена со моноклоналното глувчешко антитело E-cadherin.

3.2.3 Имунохистохемиско испитување на хормонските рецептори

Примарното антитело за детекција на естрогениот рецептор е глувчешко моноклонално антитело (клон 1D5, DAKO, Glostrup, Denmark) со разредување од 1:50, а за прогестеронскиот рецептор исто така е глувчешко моноклонално антитело (клон PgR636, DAKO, Glostrup, Denmark), со истото разредување. За визуелизација на врзаните антитела е користен визуелизирачки систем DAKO REAL™ En Vision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse. Хормонските рецептори се евалуирани со позитивна и негативна контрола на исто предметно стакло како и анализираниот примерок. Евалуацијата на хормонските рецептори се состои во одредување на процентот и јачината на јадрениот сигнал кај малигните клетки. Постојат три начини на евалуација на хормонскиот сигнал при имунохистохемиската анализа на нулеарниот сигнал кај карциномот на дојка и тоа: X-скор (119), Alred скорот (120) и “quickscore” или IHC score (121). Во оваа студија е користен Alred скорот.

3.2.4 Имунохистохемиско испитување на HER-2 рецепторот

За одредување на HER-2 рецепторот е користен готов, HercepTest кит од истиот производител (DAKO, Glostrup, Denmark). На препаратите со HER-2 се додадени позитивна и негативна контрола за точна евалуација и контрола на боењето. Како позитивна контрола беше користено претходно евалуирано ткиво со скор 3+, а како негативна контрола ткиво евалуирано со скор 0. За откривање на епитопите на HER-2 рецепторот е користена водена бања на температура од 96⁰C.

После извршените чекори на имунохистохемиското боење, препаратите се обоени со хематоксилин како контра обојување. Евалуацијата на мембранскиот сигнал за HER-2 рецепторот се извршува според имунохистохемискиот скоринг систем на Американското здружение на клинички онколози како што е прикажано на следната табела:

Табела 3. Имунохистохемиски скоринг систем при евалуација на HER2 рецепторот кај карциномот на дојка (според ASCO/CAP)

Score	Мембрански сигнал
Score 0	Нема мембранско обојување или мембранскиот сигнал е присутен кај помалку од 10% туморски клетки.
Score 1+	Слабо изразено мембранско обојување кај повеќе од 10% туморски клетки. Сигналот е присутен само во дел од нивните мембрани.
Score 2+	Слабо до умерено мембранско обојување кај повеќе од 10% туморски клетки
Score 3+	Силно мембранско обојување кај повеќе од 30% туморски клетки.

Кај пациентки со имунохистохемиска евалуација на сигналот изразена како 2+ се направени дополнителни молекуларно-биолошки испитувања со методата на конвенционална ин ситу хибридизација (CISH).

3.2.5 Конвенционална ин ситу хибридизација

Ткивните пресеци со дебелина од 2,5 микрони се депарафинизираат во два последователни садови со ксилол по 5 минути, а потоа се рехидрираат во серија од два сада со десцендентни алкохоли од 96% и 70% по 2 минути. На крај подготвените примероци се потопуваат во пуфер за испирање. Предтретманот на примероците е направен во водена бања на 99 степени во тек на 10 минути. После извршената инкубација примероците се ладат 15 минути на собна температура, а потоа се испираат во свеж пуфер.

Следи дигестија со 250µl ладен пепсин. Примероците се инкубираат 2-3 минути во апарат за хибридизација (DAKO, Hybridizer), со отворен капак на температура од 37⁰C.. Потоа се отстранува вишокот од пепсин, а препаратите се потопуваат во пуфер за испирање во траење од 3 минути. Следи дехидратација во серија на градуирани алкохоли: 70%, 80%, 96% алкохол, за секој чекор по две минути. Откако ќе се исушат примероците, во средината на примерокот се нанесува 10 микролитри од пробната смеса и се покрива со покривно стакло.

Следниот чекор е автоматска денатурација и хибридизација: денатурација во траење од 5 минути на 82 степени и хибридизација од 14-20 часа (преку ноќ) на 45

степен. После завршената хибридизација, се отстранува покровното стакло и примероците се ставаат во воден пуфер 10 минути, а потоа се измиваат со обичен пуфер 3 минути. Овие постапки се изведуваат на собна температура.

Следи постапката на боење со хромоген. Се отстранува вишокот од пуфер и на примерокот се нанесува 400 микролитри пероксидазен блокирачки агенс. После инкубација од 5 минути, следи плакнење со пуфер а потоа се нанесуваат 400 микролитри CISH antibody mix (HER2 CISH pharmaDx kit, DAKO). После инкубација од 30 минути во влажна комора, примероците се потопуваат во пуфер во траење од 3 минути.

Се отстранува вишокот од пуфер и се нанесуваат 400 микролитри црвен хромоген. Се инкубира 10 минути во влажна комора, а потоа повторно се испира со пуфер во траење од 3 минути. Откако ќе се отстрани вишокот од пуфер се нанесуваат 400 микролитри од сино обоен хромоген и се инкубираат 10 минути во влажна комора. Реагенсите треба да бидат подготвени најмалку 30 минути пред нивното користење. Откако ќе се исперат примероците во пуфер и се исушат, се нанесуваат 400 микролитри хематоксилин или се потопуваат примероците во сад со дилуиран хематоксилин во траење од 5 минути. После завршената инкубација примероците се испираат со дилуиран пуфер и со дестилирана односно дејонизирана вода. Се сушат во хибридизерот 30 минути, на 37 степени а после нивното ладење се прекриваат со медиум и со покровно стакло.

Со оваа метода се овозможува двојно обоена хромогена визуелизација на целните елементи – HER2 генот и центромерот на 17-тиот хромозом. Сигналот мора да биде чист и јасен, а како квалитет на контролата на обојувањето, се нормалните клетки кои мора да имаат сигнал од 1-2 црвени точки (за HER2 генот) и 1-2 сини точки (за центромерот на 17-тиот хромозом). Нумеричката евалуација на црвениот и синиот сигнал во нормална диплоидна клетка треба да биде 1:1.

Се селектираат различни делови од инвазивната зона на туморот со цел да се најде евентуална хетерогеност и се одбираат 20 јадра кои ќе треба да влезат во пресметка при финалната анализа. Доколку црвениот сигнал се преклопува се брои како 2,3 или повеќе сигнални точки. Ако во јадрото се најде само на еден (црвен или син) сигнал тоа не се брои.

Детерминирањето на односот помеѓу црвениот сигнал (HER2 генот) и синиот сигнал (центромерот) се изразува како однос HER2/CEN-17. Доколку резултатот од овој однос изнесува 1,8 се смета дека нема амплификација на HER2 генот. Ако односот е поголем од 2,2 постои амплификација на генот. Во граничните случаи (однос меѓу 1,8 и 2,2), се избираат и се бројат повторно 20 јадра и завршната пресметка се калкулира со 40 јадра.

3.2.6 Имунохистохемиско испитување на p53 протеинскиот продукт и на пролиферативниот маркер Ki-67

Примарното анитело за детекција на p53 протеинскиот продукт е глувчешко моноклонално анитело clone DO-7, Dako, Glostrup Denmark, во разредување 1:50, а кое реагира со мутантниот и со дивиот тип. Антигеното прочистување се правиво микробранова печка. За пролиферативниот маркер Ki-67, примарното анитело (clone MIB-1, Dako, Glostrup Denmark) се аплицира во разредување 1:50 за 60 минути на собна температура.

Табела 4. Тип на антитело, клон, разредување, и производител.

Антитело	Клон	Разредување	Производител
Естроген рецептор (ER)	1D5	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
Прогестерон рецептор (PR)	PgR636	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
Ki-67	MIB1	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
p53	DO7	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
HER-2	HER2 kit	-	DAKO, Glostrup, Denmark
Цитокератин 34BE12	K903	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark
Цитокератин CK5/6	D5/16B4	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark
Цитокератин CK8	EP17	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark
Цитокератин CK17	E3	1:20	DAKO, Glostrup, Denmark
Цитокератин CK18	DC10	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
Bcl-2	124	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark
EGFR	E30	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
CD117	c-kit	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark
Vimentin	3B4	1:200	DAKO, Glostrup, Denmark
E-cadherin	MNH38	1:100	DAKO, Glostrup, Denmark

После инкубацијата од 30 минути со примарното антитело на собна температура, се применува детектирачкиот систем (Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse), на кои после извршената инкубација од 30 минути, се додава хромоген (DAB) во траење од 10 минути на 37⁰C. Препаратите понатаму се исплакнуваат во дејонизирана вода и се бојат со хематоксилин како контра-обојување.

Вредноста на p53 протеинскиот продукт, се одредува на семиквантитативен начин при што како негативни случаи се сметаат оние каде бројот на позитивните клетки е под 10%. Вредности над 10% (11-100%) се позитивни. Според тоа точката на пресек (cut-off point) за p53 протеинскиот продукт изнесува 10% (122).

Исто како и за p53 протеинскиот продукт, вредноста на пролиферативниот маркер Ki-67, се одредува на семиквантитативен начин при што како негативни случаи се сметаат оние каде бројот на позитивните клетки е под 14%. Вредности над 14%, (15-100%) се позитивни. Според тоа точката на пресек (cut-off point) за пролиферативниот маркер Ki-67 изнесува 14% (122).

Типот на антителото, клонот, работната концентрација и производителот се дадени на Табела 2.

3.2.7 Следење на пациентите

Следењето на пациентите е обезбедено преку податоците од редовните контроли на пациентите на Универзитетската клиника за радиотерапија и онкологија.

За сите пациенти во периодот од јуни 2007 до јуни 2010 година е формирана база на податоци во кои се внесени клиничките и хистолошките параметри, а истата е надолполнета со резултатите од имунохистохемиските испитувања и со податоците од следењето.

Како период до релапсот е пресметано времето од датумот на операцијата до датумот на клинички верифицираната локо регионална или оддалечена метастаза (disease-free interval).

Последен датум на следење е 30 јуни 2014 кога е затворена и серијата на пациентки. За верификација на податоците е користена историјата на болеста на Универзитетската клиника за радиотерапија и онкологија. Исто така, на дел од пациентите кои третманот го продолжиле во друга институција анализирани се податоците од компјутерската датотека на прегледи и контроли на пациентките во клиничката болница Аџибадем/Систина.

3.2.8 Статистичка обработка на добиените резултати

За евалуација на резултатите е користена современа информатичка метода на статистичка обработка со користење на компјутерска техника.

Податоците се анализирани со дескриптивни методи (средна вредност, стандардна девијација и медијана) како и со графичко и табеларно прикажување на податоците.

Анализата на атрибутивните статистички серии е обработена со пропорции односно проценти.

За анализата на односите меѓу атрибутивните белези односно за одредување на корелациите меѓу испитуваните параметри користен е χ -квадрат тестот, Pearson-овиот тест на рангови, Yates-овиот корективен тест и Fisher-овиот егзактен тест.

Разликите во варијаблите се анализирани со помош на ANOVA тест како и со помош на Kruskal-Wallis-овиот и Mann-Whitney-овиот тест.

Значењето на корелациите меѓу испитуваните параметри е оценето со пресметување на релативниот ризик за релапс детерминиран со Mantel-Haenszel-овиот тест.

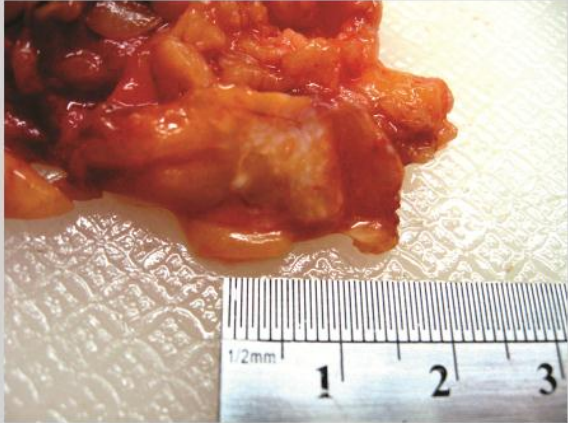
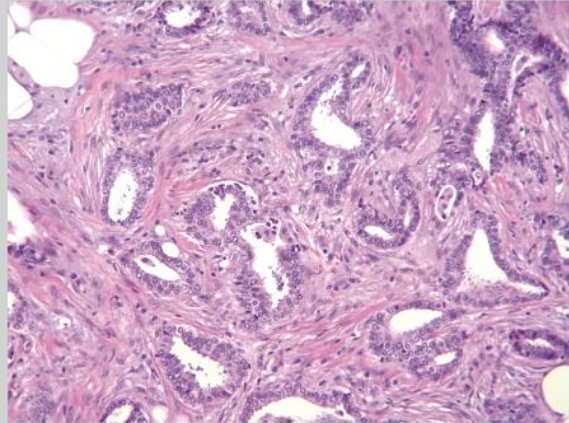
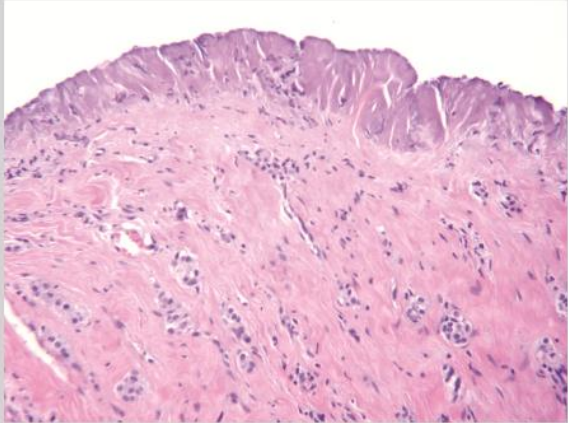
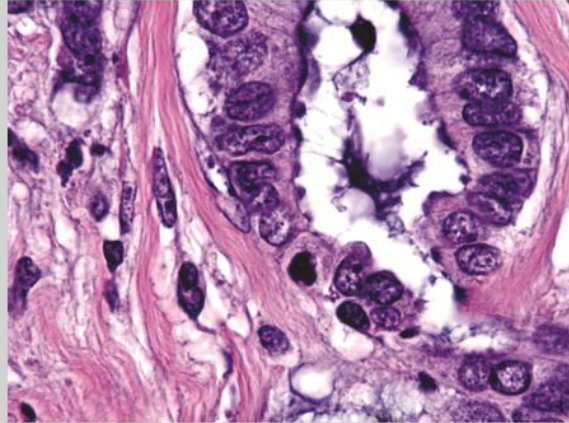
Анализата на 5-годишното преживување без појава на болест (DFS-disease free survival) е прикажана со Kaplan-Meier-овите криви а за проценка на релативната важност на испитуваните параметри за одредување на индивидуалниот ризик за релапс е употребена log-rank Mantel-Cox-овата мултиваријантна анализа.

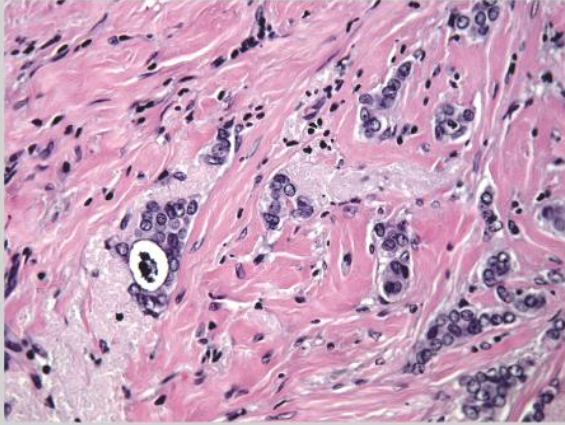
При статистичката интерпретација за сигнификантно значајна е земена p вредност помала од 0.05 ($p < 0.05$).

Имунофенотипските категории на карциноми на дојка се претставени на панели со слики од случаи со карактеристични макроскопски, микроскопски и имунофенотипски параметри (Панел 1-4).

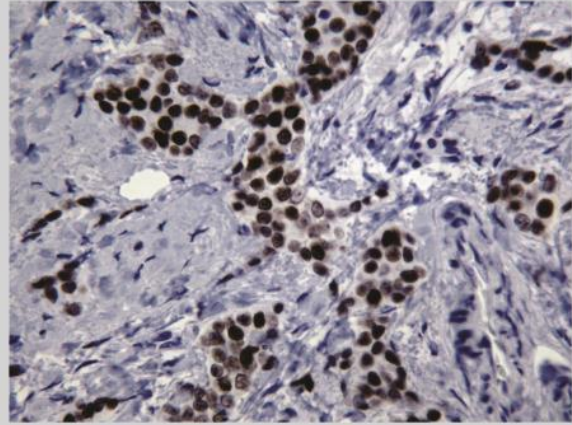
ПАНЕЛ 1.

Приказ на карцином на дојка со имунофенотипски карактеристики на Luminal A карцином

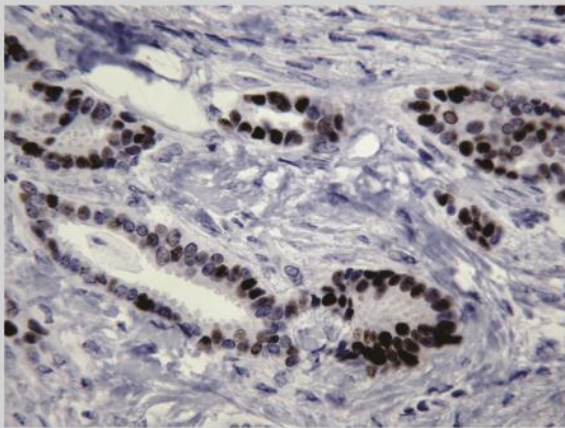
 Макроскопски изглед на тумор. Туморот е жолт-оранџаст, со неправилна форма и јасно ограничена беличеста зона. Додека е прикажан на бел текстилен плат, е поставен и метален мерач со скала во милиметри (1, 2, 3) и половина милиметар (1/2mm).	 Микроскопски изглед на тумор со H&E боја, x200. Туморот е сочинет од добро диференцирани тубуларни формации обложени со еден ред на малигни клетки со униформен изглед.
<p>Слика 1. Макроскопски изглед на тумор – релативно јасно ограничена беличеста зона со вкупни димензии 0,9 x 0,8 x 0,7 cm.</p>	<p>Слика 2. Туморот е сочинет од добро диференцирани тубуларни формации обложени со еден ред на малигни клетки со униформен изглед (H&E, x200).</p>
 Ресекициона маргина на туморот со зафатен дел од туморски ткиво. Изгледот е со H&E боја, x100.	 Неоплазмата е со морфологија на тубуларен карцином на дојка со низок митотски индекс. Изгледот е со H&E боја, x400.
<p>Слика 3. Ресекициона маргина на туморот со зафатен дел од туморски ткиво (H&E, x100).</p>	<p>Слика 4. Неоплазмата е со морфологија на тубуларен карцином на дојка со низок митотски индекс (H&E, x400).</p>



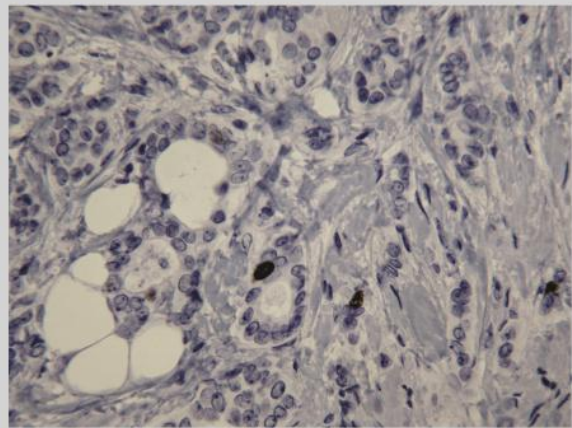
Слика 5. Изразена дезмопластична реакција низ целиот тумор (H&E, x200).



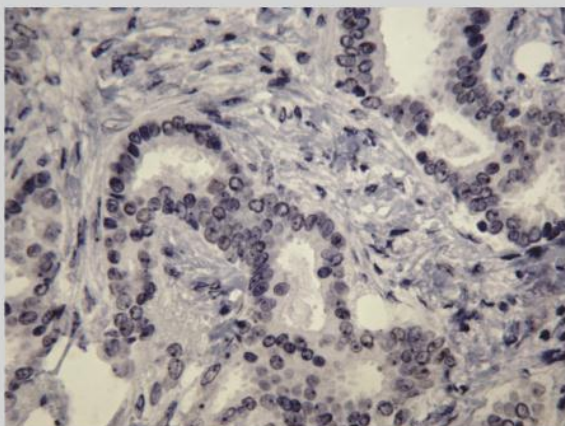
Слика 6. Малигните клетки се со позитивен сигнал за Естрогениот рецептор (ER=3+, 93%, x400).



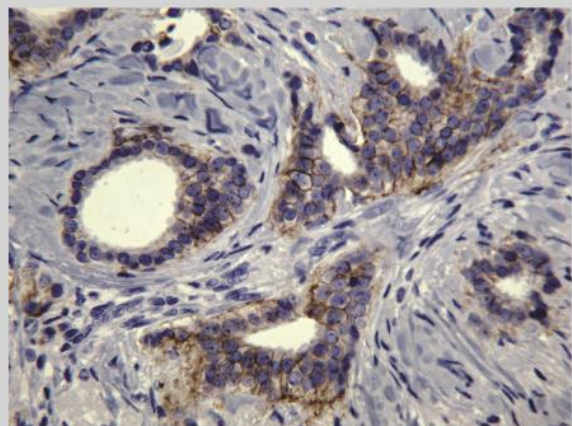
Слика 7. Малигните клетки се со позитивен сигнал за Прогестеронскиот рецептор (PgR=3+, 76%, x400).



Слика 8. Малигните клетки имаат низок степен на пролиферативна активност (Ki67=3% x400).



Слика 9. Малигните клетки се со негативен сигнал за протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53 (p53=0, x400).



Слика 10. Туморот е негативен за Херцептинскиот тест (HER-2/neu = 1+, x400).

ПАНЕЛ 2.

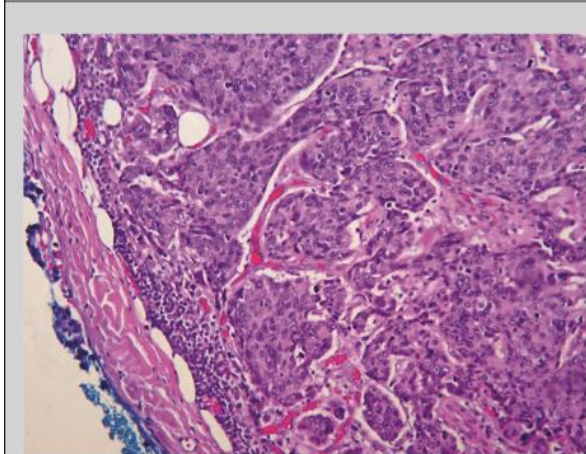
Приказ на карцином на дојка со имунофенотипски карактеристики на Luminal B карцином



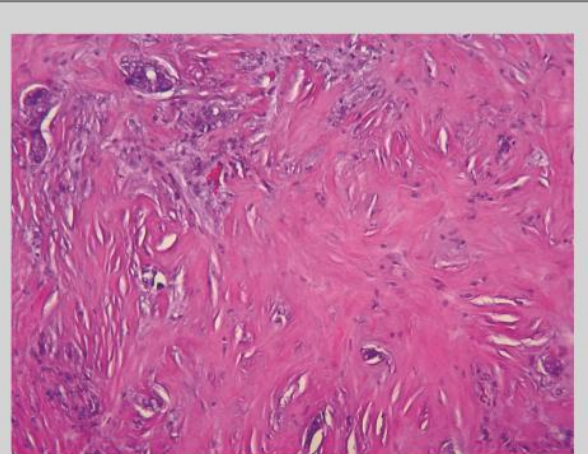
Слика 1. Макроскопски изглед на оперативен материјал. Дојка со кожа со димензии 22 x 15 x 4 cm, со аксиларно масно ткиво со димензии 11 x 5 x 2 cm, и 8 помали фрагменти со промер од 1 x 1 x 0,5 cm до 7,5 x 3 x 1 cm.



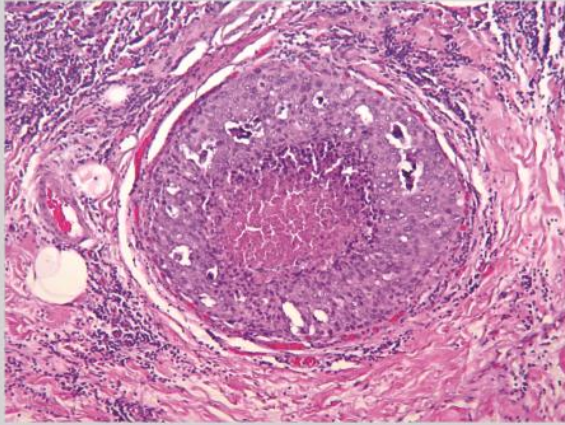
Слика 2. Резна површина на оперативен материјал. Макроскопски изглед на тумор со димензии 3,2 x 3 x 3 cm оддалечен 0,1 cm од најблиската ресекциона линија.



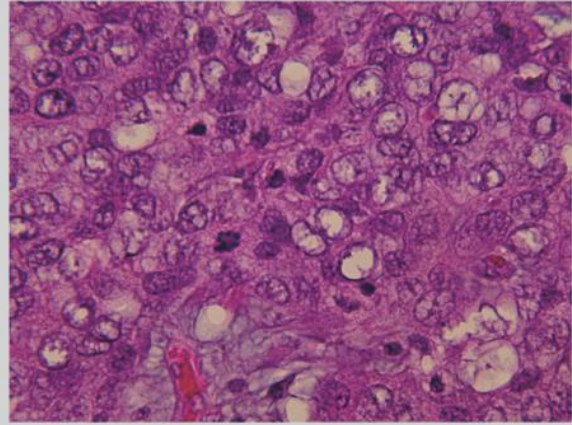
Слика 3. Микроскопски изглед на тумор со карактеристики на дуктален карцином на дојка со приказ на ресекциониот раб на туморот (H&E, x100).



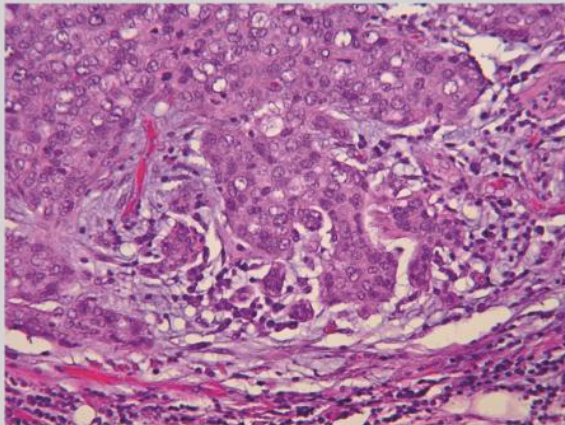
Слика 4. Назначена стромална дезмоплазија во централниот дел на туморот (H&E, x100).



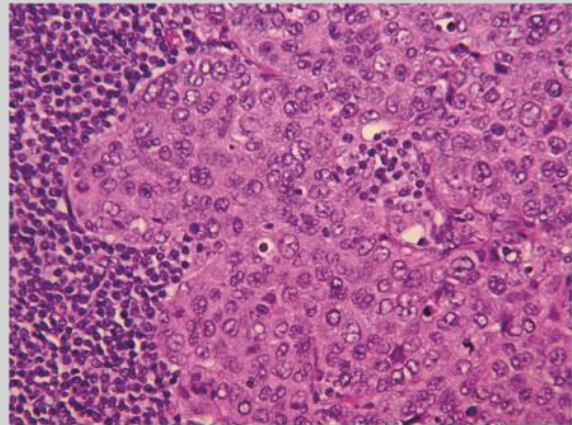
Слика 5. Фокуси на дуктален in situ карцином на дел од периферијата на туморот (H&E, x100).



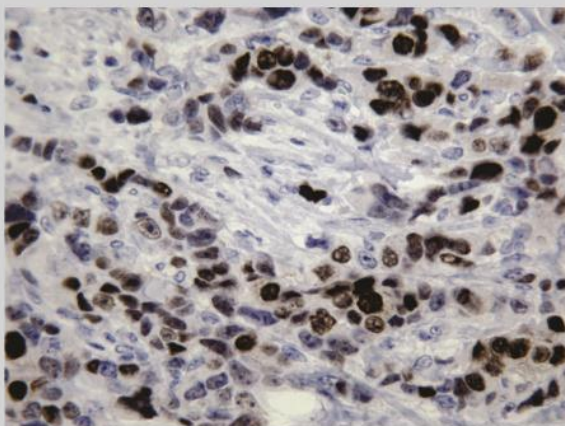
Слика 6. Изразен нуклеарен плеоморфизам на малигните клетки со митотски индекс од 20 митози/10HPF, (H&E, x400).



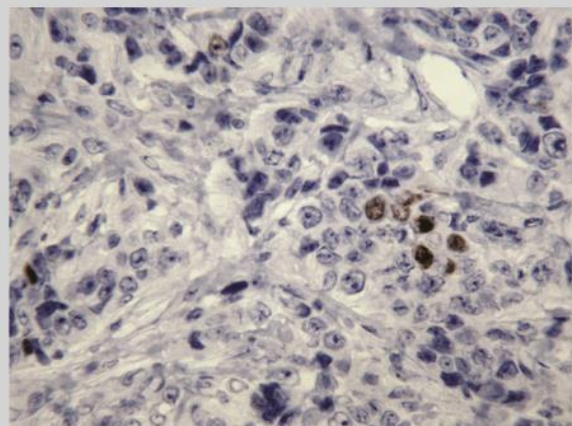
Слика 7. Умерено изразен лимфоцитарен инфилтрат во инвазивниот фронт на туморот (H&E, x200).



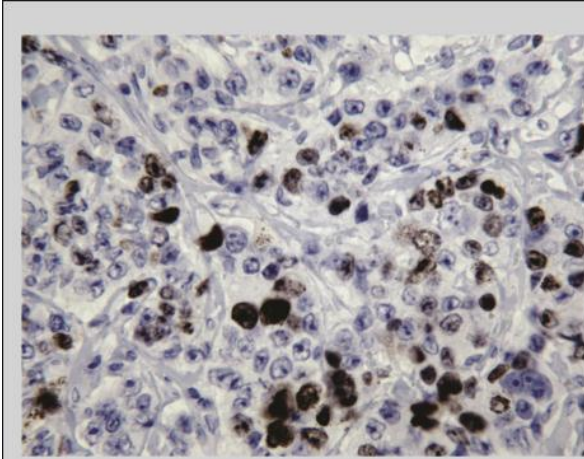
Слика 8. Метастатски депозити присутни во 12 од 22 лимфни јазли (H&E, x200).



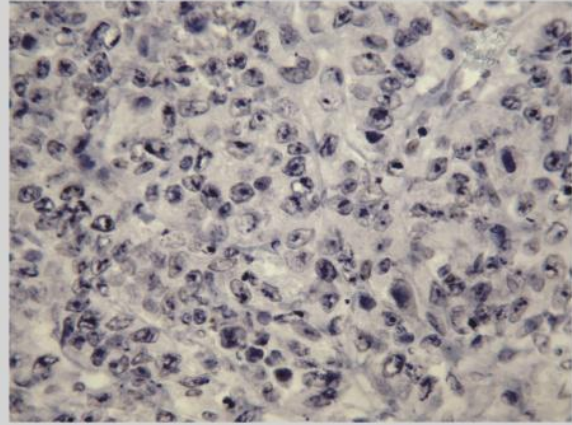
Слика 9. Туморот покажа изразен нуклеарен сигнал за естрогениот рецептор (ER=3+, 75%, x400).



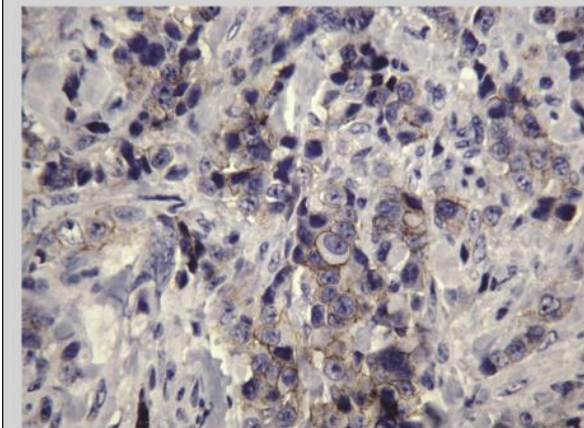
Слика 10. Прогестеронскиот рецептор е слабо позитивен и присутен само кај 5% малигни клетки (PgR, x400).



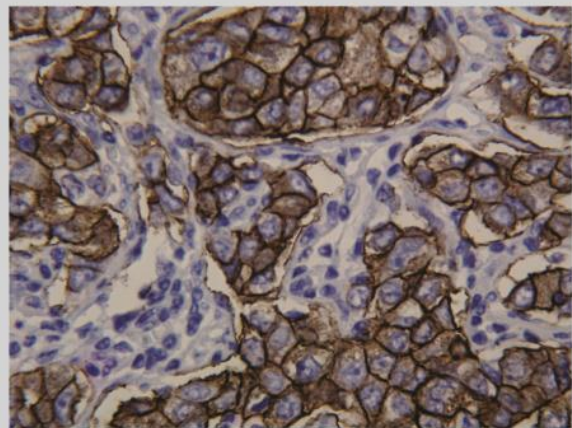
Слика 11. Висок пролиферативен индекс на туморот детерминиран со моноклонално антителио (Ki67= 35%, x400).



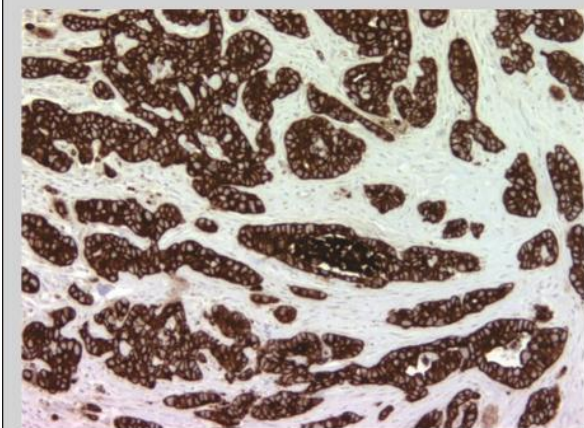
Слика 12. Протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53 е негативен (p53=0, x400).



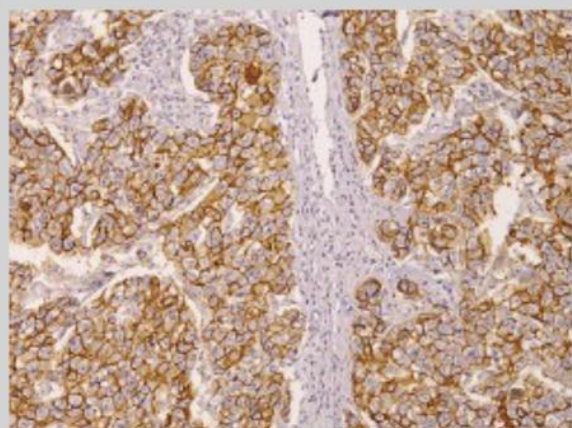
Слика 13. Херцептинскиот тест е негативен (HER-2/neu=1+, x400).



Слика 14. Мембранска експресија на E-cadherin-от (E-cadherin, x400).




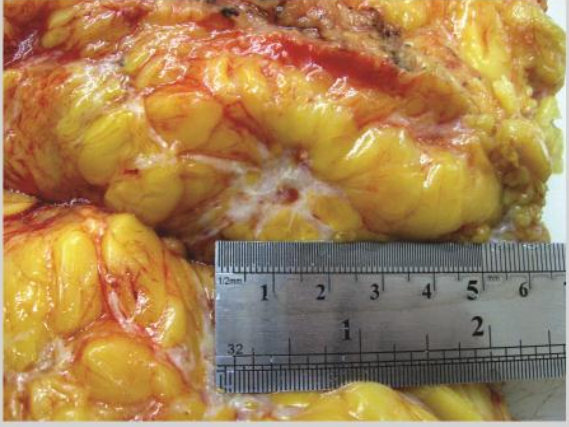
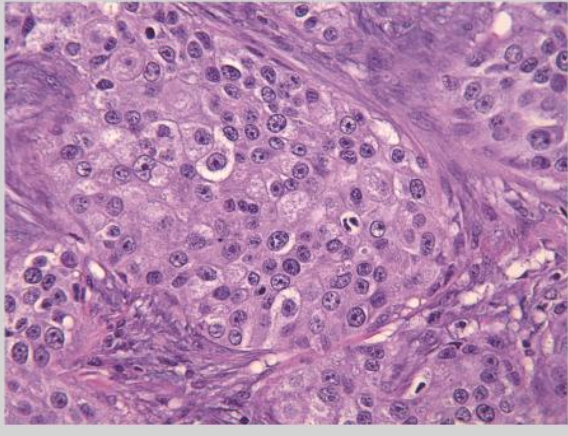
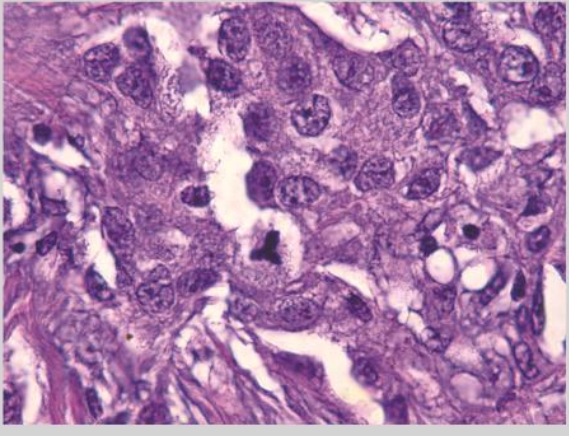
Слика 15. Мембранска експресија на антителото Cytokeratin 8 (CK8, x100).

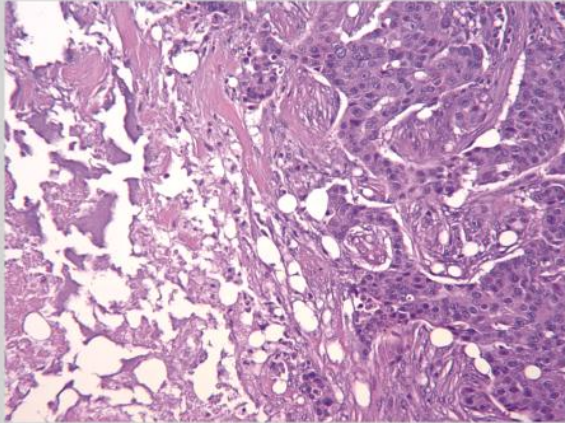


Слика 16. Мембранска експресија на антителото Cytokeratin 18 (CK18, x100).

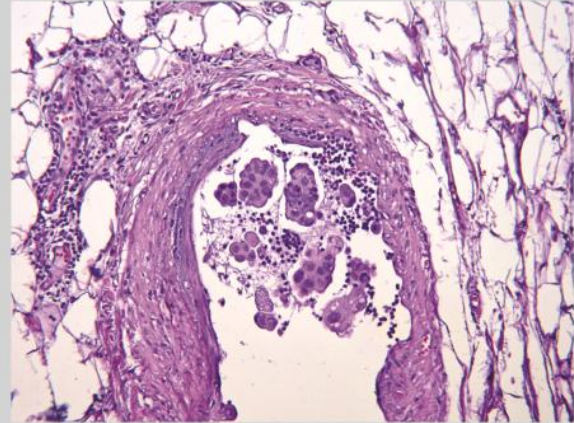
ПАНЕЛ 3.

Приказ на карцином на дојка со имунофенотип на HER-2/неу позитивен карцином

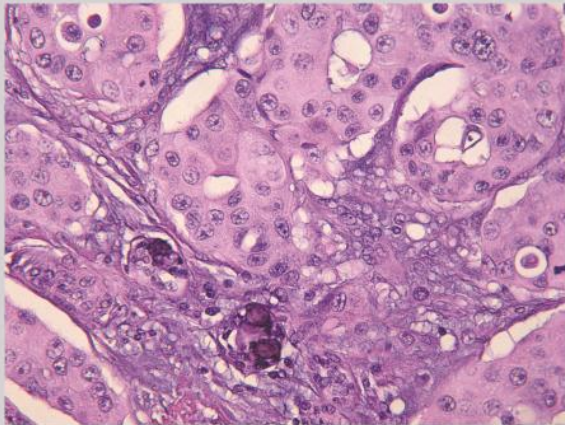
	
<p>Слика 1. Макроскопски изглед на оперативен материјал: Дојка со кожа со димензии 18 x 17 x 5,5 cm, и 14 фрагменти од аксиларно масно ткиво со промер од 1 - 3,5 cm.</p>	<p>Слика 2. Резна површина на примарен тумор со радијарни мارجини и димензии 2,2 x 2 x 1,7 cm, на растојание од 2 cm од најблиската ресекциона мارجина.</p>
	
<p>Слика 3. Туморот се состои од агрегати на малигни клетки аранжирани во солидни гнезда инкорпорирани во оскудна дезмопластична строма (H&E, x200).</p>	<p>Слика 4. Малигните клетки од кои е граден туморот имаат изразен јадрен плеоморфизам и висок митотски индекс = 13 митози/10HPF (H&E, x 400).</p>



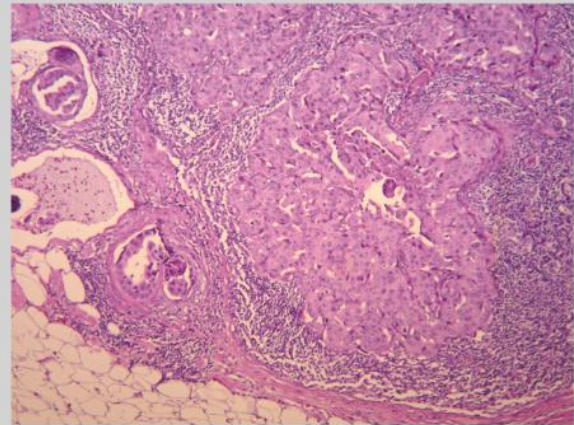
Слика 5. Големи подрачја на коагулациона некроза во централните делови од туморот (H&E, x100).



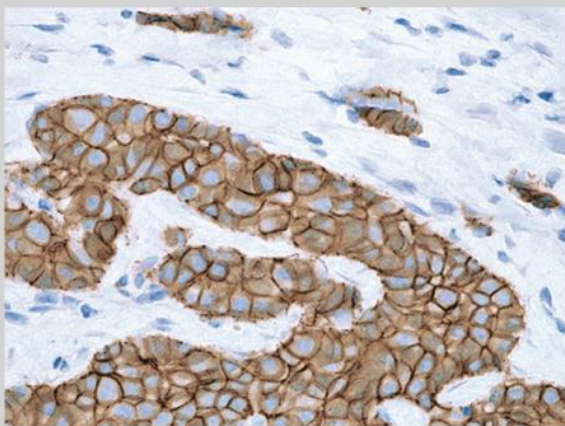
Слика 6. Инвазивна зона на туморот со бројни емболуси од малигни клетки во венски крвен сад со оскуден инфламаторен инфилтрат (H&E, x100).



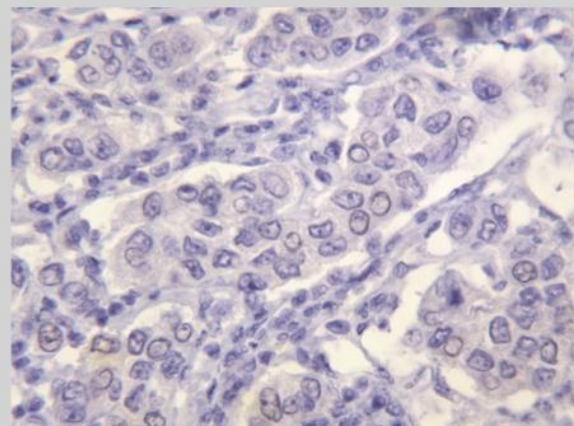
Слика 7. Делови од туморот покажуваат екстензивна целуларност со присутни депозити од калциумови соли (H&E, x400).



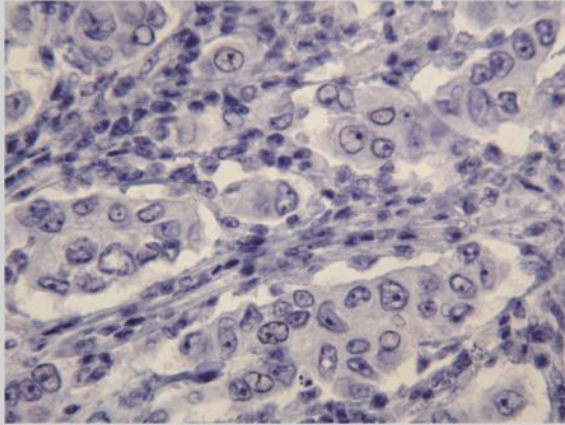
Слика 8. Метастази се најдени во 6 од 14 регионални лимфни јазли со емболуси во аферентните лимфоваскуларни простори (H&E, x100).



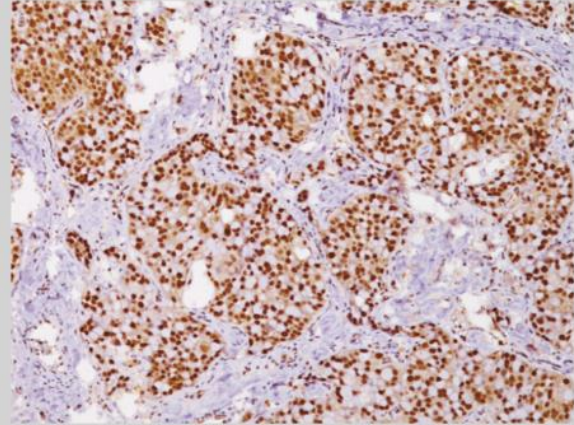
Слика 9. Позитивен мембрански сигнал за E-cadherin - от (E-cadherin, x100).



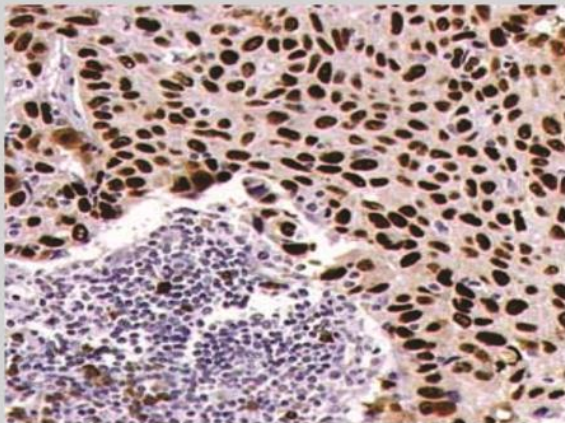
Слика 10. Негативен сигнал за Естрогениот рецептор (ER=0, x400).



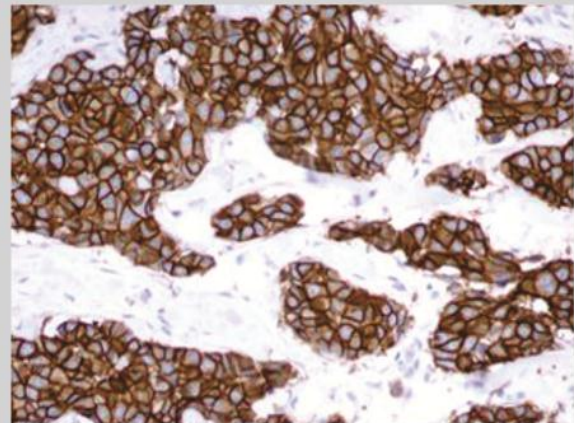
Слика 11. Негативен сигнал за Прогестеронскиот рецептор (PgR=0, x400).



Слика 12. Висок степен на пролиферативна активност (Ki67=85%, x100).



Слика 13. Изразена експресија на протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 (p53=95%, x200).



Слика 14. Малигните клетки се со изразен мембрански сигнал за HER-2/neu (HER-2/neu =3+, x200).

ПАНЕЛ 4.

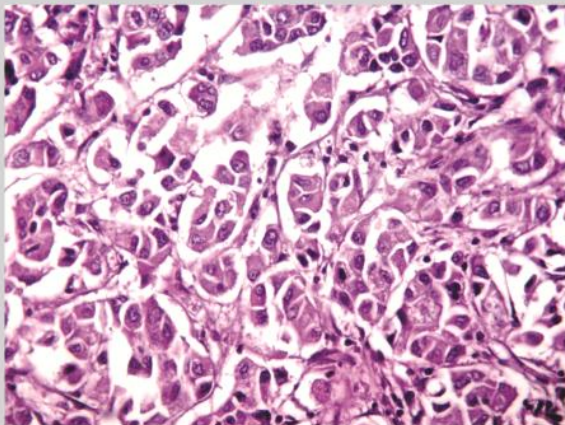
Приказ на карцином на дојка со имунофенотипски карактеристики на “тројно негативен” (“triple negative”) карцином на дојка



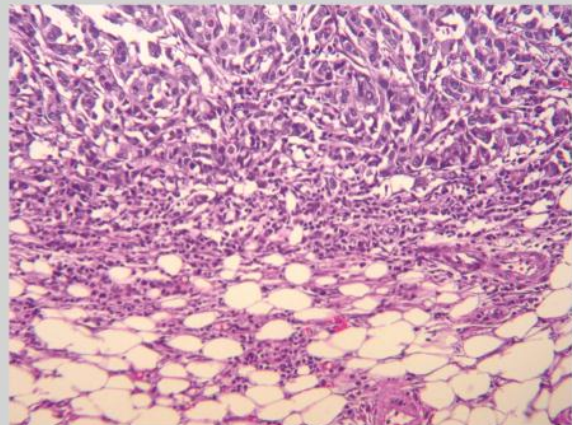
Слика 1. Макроскопски изглед на оперативен материјал: Дојка со кожа со димензии 17x8x6 и 6 фрагменти од аксиларно масно ткиво со промер од 0,5 до димензии 13x6x5 cm.



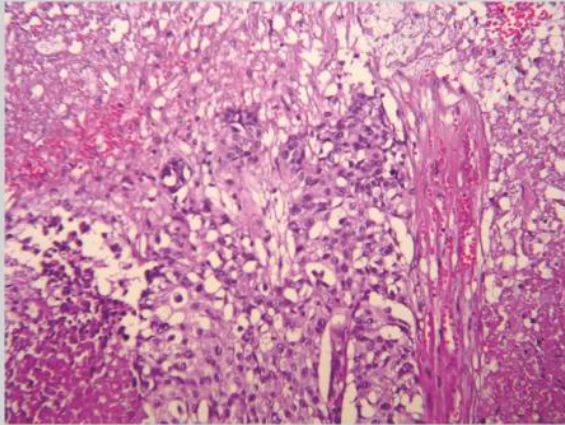
Слика 2. Макроскопски изглед на примарен тумор со димензии 10x7x7cm. Туморот инфилтрира во кожа а најблиската ресекциона маргина е на оддалеченост од 1cm.



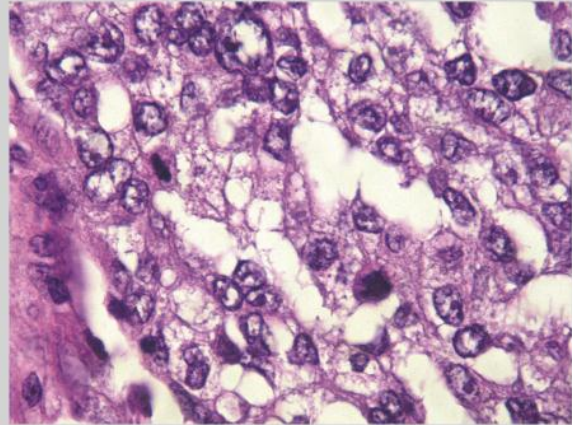
Слика 3. Микроскопскиот изглед на туморот покажа неоплазма со морфологија на лошо диференциран дуктален тип на карцином на дојка (H&E, x200).



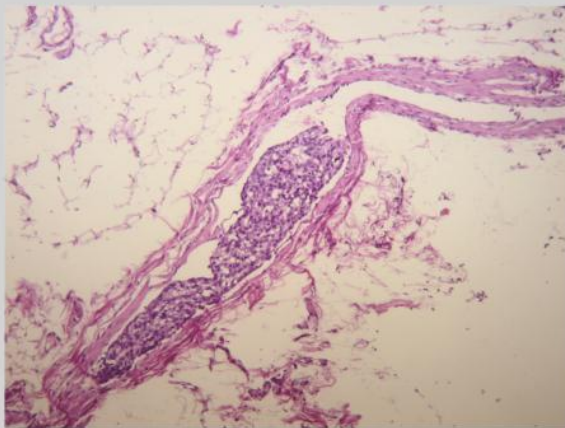
Слика 4. Периферијата на туморот покажа назначен лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат (H&E, x100).



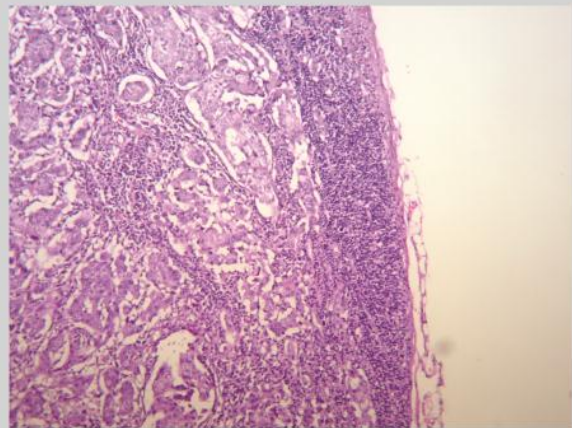
Слика 5. Некрозата е силно изразена во сите делови на примарниот тумор (H&E, x200).



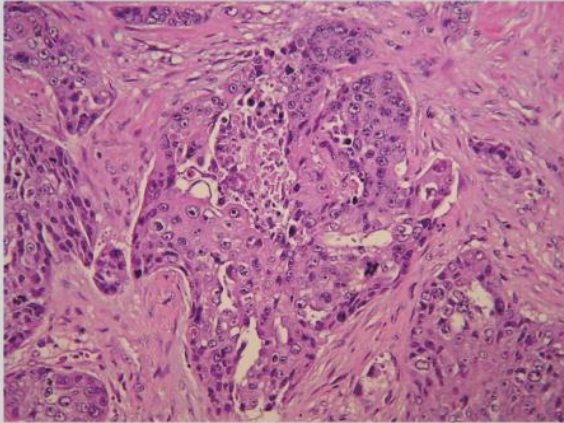
Слика 6. Туморот се состои од агрегати на плеоморфни малигни клетки со изразен митотски индекс (18 митози/10HPF, H&E, x400).



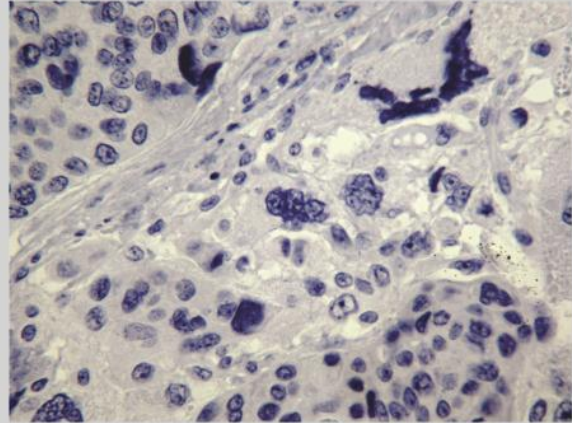
Слика 7. Емболус од малигни клетки во венски крвен сад (H&E, x200).



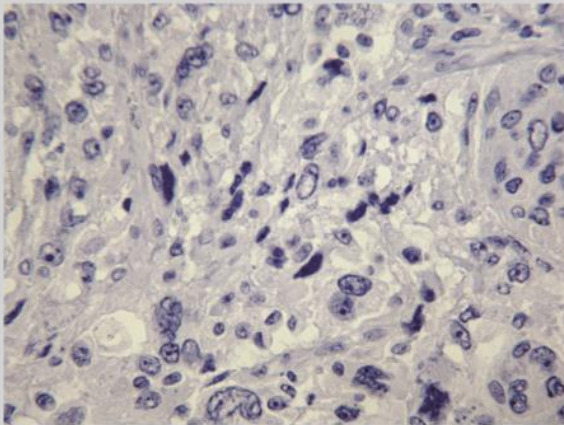
Слика 8. Присуство на метастази во 13 од 23 екстирпирани лимфни јазли во аксиларното масно ткиво (H&E, x100).



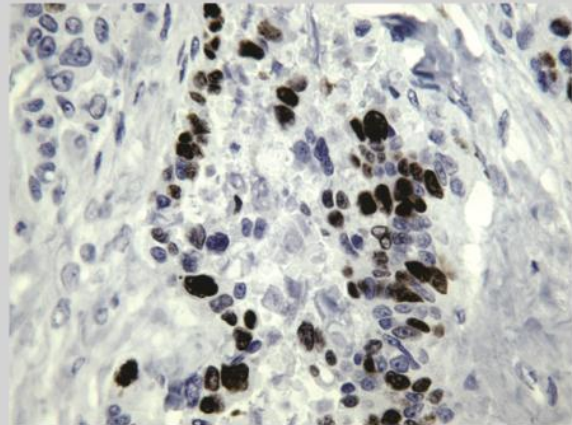
Слика 9. Умерено изразена дезмопластична реакција, и бизарни клетки со сквамозна диференцијација (H&E, x100).



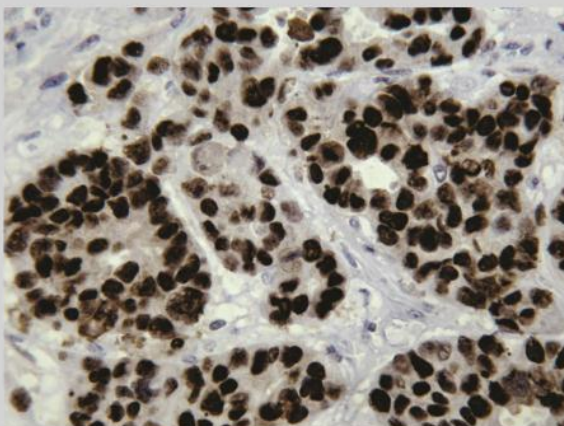
Слика 10. Малигните клетки се со негативен јадрен сигнал за Естрогениот рецептор (ER=0, x400).



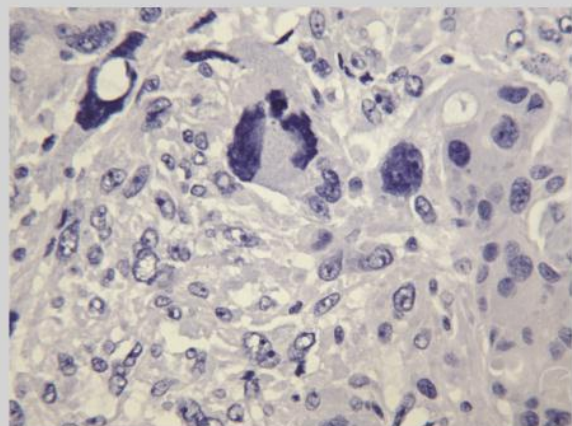
Слика 11. Малигни клетки со отсуство на сигнал за Прогестеронскиот рецептор (PgR=0, x400).



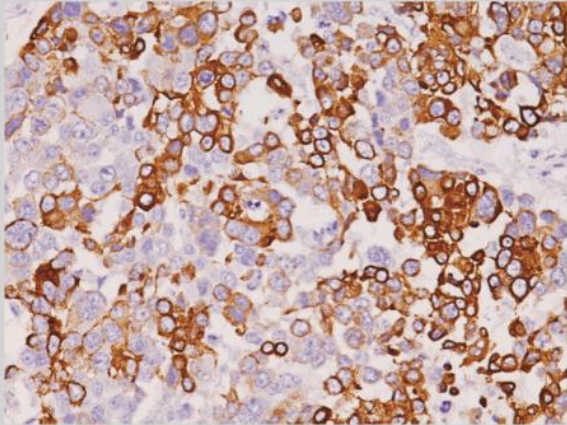
Слика 12. Проллиферативниот индекс е застапен кај 38% малигни клетки (Ki67, x400).



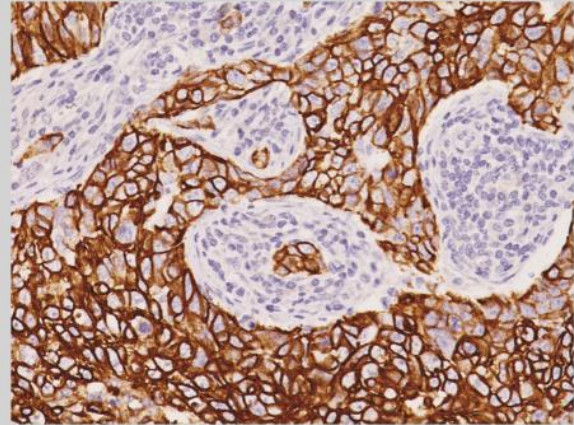
Слика 13. Позитивен јадрен сигнал кај 90% малигни клетки за протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53 (p53, x400).



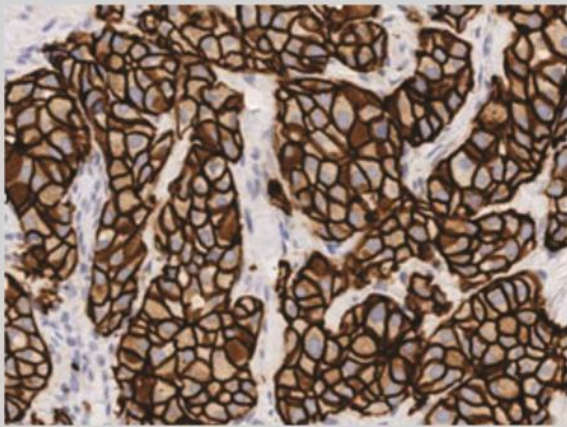
Слика 14. Неоплазмата е негативна за Херцептинскиот тест (HER-2/neu = 0, x400).



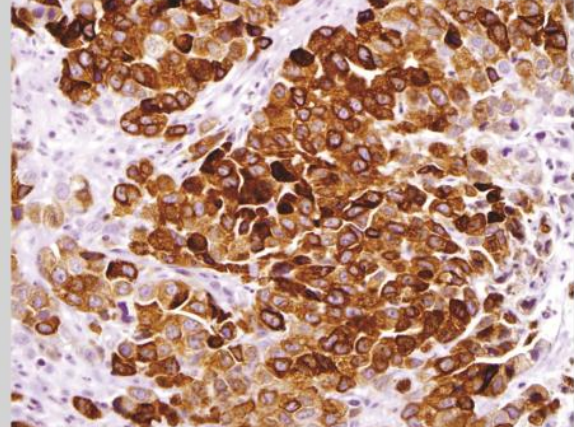
Слика 15. Неоплазмата е позитивна за Цитокератин 5/6 (CK5/6, x100).



Слика 16. Позитивен мембрански сигнал за Цитокератин 17 (CK17 x100).



Слика 17. Неоплазмата е позитивна за Епидермалниот фактор на раст (EGFR, x200).



Слика 18. Фокус на неоплазмата со позитивни клетки на маркерот CD117 (CD117, x200).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 ДЕСКРИПТИВНА АНАЛИЗА НА КЛИНИЧКИ И МОРФОХИСТОЛОШКИ ПАРАМЕТРИ

Пациентките во серијата имаат просечната возраст од $54,7 \pm 10,1$ години (медијана 55 години). Најмладата пациентка има 28 години, а најстарата е на возраст од 83 години (табела 5).

Табела 5. Возраст на пациентките – дескриптивна анализа

Descriptive Statistics – возраст (години)

N = 192 mean = $54,7 \pm SD 10,1$ min = 28 max = 83

Тотална мастектомија е изборот на хируршка техника кај доминантни 72,4% пациентки, додека кај помал процент – 27,6% пациентки, отстранувањето на карциномот на дојка е направено со квадрант ресекција (табела 6).

Табела 6. Дистрибуција во однос на тип на оперативна техника

варијабла	N=192
Тип на интервенција	
квадрант ресекција	53(27,6%)
тотална мастектомија	139(72,4%)

Во оваа група пациентки со рак на дојка, најмалиот туморски дијаметар е 0,2 см, максимално измерениот пак дијаметар изнесува 16 см. Просечниот дијаметар изнесува $2,7 \pm 1,9$ см. Кај половина пациентки измерена е должина на дијаметарот на туморот поголема од 2,3 см (табела 7).

Табела 7. Туморски дијаметар – дескриптивна анализа

Descriptive Statistics – туморски дијаметар (см)

N = 192 mean = $2,7 \pm SD 1,9$ min = 0,2 max = 16 median = 2,3

Во анализираната група од 196 пациентки со карцином на дојка, ресецирани се вкупно 2032 лимфни јазли (распон 4-48, просек $17,2 SD \pm 7,2$).

Табела 8. Дистрибуција во однос на лимфонодален статус

Варијабла N	N=192
Лимфонодален статус	
0	80(41,67%)
1mi	4(2,08%)
1a	45(23,44%)
1c	1(0,52%)
2a	30(15,62%)
3a	32(16,67%)

Бројот на позитивни лимфни јазли изнесува 789 (38% од вкупниот број ресецирани лимфни јазли). Кај мнозинството на пациентки, 80 од 196 (41,67%), лимфонодалниот статус е негативен (табела 8).

Дистрибуцијата на пациентките во однос на лимфонодалниот однос, односно бројот на извадени лимфни јазли со бројот на позитивни лимфни јазли, покажува дека кај мнозинството од нив – 66,67%, овој однос е до 0,2, што е еквивалент на добар лимфонодален однос (табела 9).

Табела 9. Дистрибуција во однос на лимфонодален однос

варијабла	N=192
Лимфонодален однос – однос меѓу извадени и позитивни лимфни јазли	
добар статус - до 0,2	128(66,67%)
умерен - 0,21 до 0,5	24(12,5%)
лош - 0,51 до 0,8	20(10,42%)
многу лош - 0,81 до 1	20(10,42%)

Во однос на стадиумот во кој е откриена болеста, кај најголем процент – 28,12%, карциномот на дојка е дијагностициран во стадиум II-а, а потоа следат 26,04% пациентки со карцином на дојка во стадиум I, односно земена во целост, во серијата од 192 пациентки 104 од нив (54,16%) се во ран стадиум на болеста (табела 10).

Табела 10. Дистрибуција во однос на стадиум на болест

варијабла	N=192
Стадиум на болест	
I	50(26,04%)
II-а	54(28,12%)
II-б	26(13,54%)
III-а	26(13,54%)
III-б	4(2,08%)
III-с	32(16,67%)

Во табела 11 прикажана е дистрибуцијата на пациентките со карцином на дојка, во однос на хистолошките параметри кои го одредуваат Nottingham-скиот модифициран скоринг систем на Bloom-Richardson во однос на степенот на хистолошка диференцијација а тоа се процентот на формирање тубуларни формации, нуклеарниот градус и митотскиот индекс.

Кај повеќе од половина пациентки, поточно кај 112 (58,33%), процентот на формирани тубули изнесува 10%.

Нуклеарниот градус е презентираан кај 16,4% карциноми со униформни јадра, кај 57,29% со умерен плеоморфизам, и кај 26,56% со изразен анапластицитет. Митотскиот индекс најчесто е изразен со повеќе од 10 митози – 47,4%.

Анализата пак на карциномите во однос на степенот на хистолошка диференцијација, покажува дека 38 (19,79%) се добро диференцирани, 76 (39,58%) се средно диференцирани, и најголем број и процент – 78 (40,63%) се лошо диференцирани карциноми.

Табела 11. Дистрибуција на хистолошките параметри кои го одредуваат степенот на хистолошка диференцијација на туморот.

варијабла	N=192 (100%)
Формирање на тубули	
тубули над 75%	23(11.98%)
тубули 10 - 75%	57(29.69%)
тубули под 10%	112(58.33%)
Нуклеарен градус	
униформни јадра	31(16.14%)
умерен плеоморфизам	110(57.29%)
изразен анапластичитет	51(26.56%)
Митотски индекс	
0 – 5 на 1 видно поле (x40)	53(27,6%)
6 – 10	48(25%)
над 10	91(47,4%)
Степен на хистолошка диференцијација	
G1 - добро диференцирани	38(19,79%)
G2 – средно диференцирани	76(39,58%)
G3 – лошо диференцирани	78(40,63%)

Нотингемскиот прогностички индекс е помал од 2,4, односно добар кај 10,42% пациентки, умерен кај 16,67%, неповолен кај 38,02% и кај 34,89% пациентки вредноста на овој индекс е над 5,41, односно тој припаѓа во групата на исклучително неповолен Нотингемски прогностички индекс (табела 12).

Табела 12. Дистрибуција во однос на Нотингемскиот прогностички индекс

варијабла	N=192
Нотингемски прогностички индекс	
добар - до 2,4	20(10,42%)
умерен - 2,41 до 3,4	32(16,67%)
лош - 3,41 до 5,4	73(38,02%)
многу лош - 5,41 >	67(34,89%)

Табела 13. Дистрибуција во однос на ресекциони маргини, лимфатична и васкуларна емболизација

варијабла	N=192 (100%)
Ресекциони маргини	
во здраво	153(79,69%)
зафатени	39(20,31%)
Емболизација во лимфатици	
нема	50(26,04%)
има	142(73,96%)
Емболизација во крвни садови	
нема	127(66,15%)
има	65(33,85%)

Ресекционите маргини кај мнозинството пациентки - 79,69% се во здраво, емболизација во лимфатици постои кај 73,96% карциноми, додека емболизација во крвни садови кај 33,85% карциноми (табела 13).

Во табела 14 прикажана е и дистрибуцијата на пациентките во однос на присуството и обемот на лимфоцитниот инфламаторен инфилтрат. Кај мнозинството на пациентки од оваа серија тој е отсутен или слаб – 70,83%.

Табела 14. Дистрибуција во однос на лимфоцитен инфламаторен инфилтрат

варијабла	N=192
Лимфоцитен инфламаторен инфилтрат	
слаб до отсутен	136(70,83%)
средно обемен	39(20,31%)
обемен	17(8,85%)

Анализата на некои хистолошки параметри на туморот ги покажа следниве резултати: со туморска некроза се 62 (32,29%) карциноми, дезмопластична стромална реакција на карциномот е регистрирана кај 132 (68,75%) случаи, еластоза е најдена кај 72 (37,5%), додека калцификати кај 83 (43,23%) карциноми на дојка (табела 15).

Табела 15. Дистрибуција во однос на туморска некроза, дезмопластична реакција на строма, еластоза и калцификати

варијабла	N=192
Туморска некроза	
нема	130(67,71%)
има	62(32,29%)
Дезмопластична реакција на строма	
нема	60(31,25%)
има	132(68,75%)
Еластоза	
нема	120(62,5%)
има	72(37,5%)
Калцификати	
нема	109(56,77%)
има	83(43,23%)

Во однос на статусот на естрогениот рецептор, карциномите на дојка кај 142(73,96%) пациентки се естроген позитивни, додека во однос на статусот на прогестеронскиот рецептор, позитивни се 119 (61,98%) карциноми.

Пролиферативната активност, односно биолошка агресивност на карциномот на дојка, детерминирана преку имунохистохемиската експресија на моноклоналното антитело Ki-67 е позитивна кај 119 (61,98%) пациентки .

Позитивна експресија на тумор супресорски ген p53 е регистрирана кај 56 (29,17%) карциноми на дојка, експресија на херцептинот (HER2+) е детектирана кај 36 (18,75%) пациентки, додека експресија на онкопротеинот bcl-2 кај 67 (34,89%) пациентки (табела 16).

Табела 16. Дистрибуција во однос на статус на естрогенски рецептор, прогестеронски рецептор, степен на пролиферативна активност на туморот, експресија на p53, на HER2+ и на онкопротеинот bcl-2

варијабла	N=192
Естроген рецептор - ER	
негативен	47(24,48%)
позитивен	145(75,52%)
Прогестерон рецептор - PR	
негативен	73(38,02%)
позитивен	119(61,98%)
Степен на пролиферативна активност (Ki-67)	
негативен	68(35,42%)
позитивен	124(64,58%)
Експресија на тумор супресорски ген p53	
негативен	136(70,83%)
позитивен	56(29,17%)
HER-2	
негативен	156(81,25%)
позитивен	36(18,75%)
Bcl-2	
нема	125(65,1%)
има	67(34,89%)

Експресијата на HER2 евалуирана со имунохистохемиски методи покажа негативен сигнал кај 156 (81,25%) пациентки од кои со скор 0, 47,9% од пациентките а со скор 1, 30,2%. Со скор 2 се детектирани 12 пациентки (6,3) од кои со метода на CISH (конвенционална ин ситу хибридизација) е утврдено дека 6 се со негативен сигнал (помал од 2,2) и припаѓаат на HER2 негативни карциноми а останатите 6 се со изразен сигнал (од 2,3-5,7) и се префрлени во категоријата на HER-2 позитивни карциноми на дојка (табела 16а).

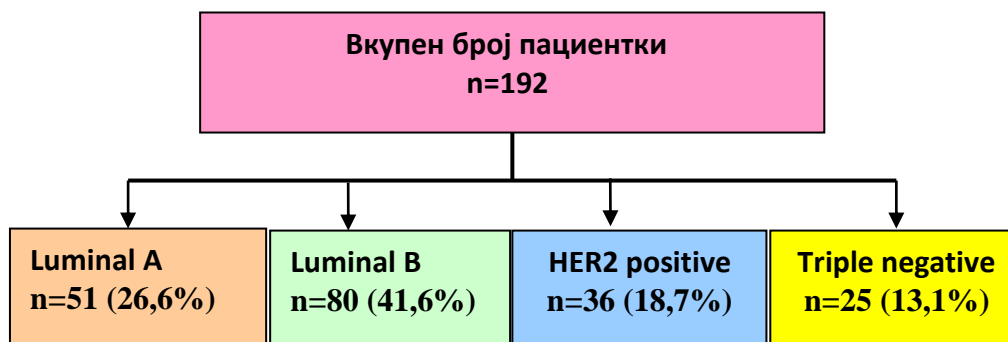
Табела 16а. Дистрибуција во однос на експресија на HER-2 со CISH

варијабла	N=192
HER-2	
HER-2=0	92(47,9%)
HER-2=1+	58(30,2%)
HER-2=2+	12(6,3%)
Score<2,2	6(3,15%)
Score>2,2	6(3,15%)
HER-2=3+	30(15,6%)

4.2. МОЛЕКУЛАРНИ ПОДТИПОВИ – КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКИТЕ И МОРФОХИСТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ

Врз основа на анализираниите имунохистохемиски параметри, (експресијата на естроген рецептор - ER, прогестеронски рецептор - PR, експресијата на хуманиот епидермален фактор на раст – HER2 и пролиферативниот маркер - Ki67), пациентките

со карцином на дојка во оваа студија се поделени во 4 имунофенотипски групи: група од 51 пациентки со тип Luminal A, група од 80 пациентки со тип Luminal B, група од 36 пациентки со тип HER-2 positive и 25 пациентки со тип Triple- negative (тројно негативен) карцином на дојка (слика 1).



За потврда на имунофенотипот на табела 17 е дадена дистрибуција на имунохистохемиската експресија на одредени маркери.

Табела 17. Дистрибуција во однос на имунохистохемиската експресија на одредени антитела

антитело	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple-- N=25	Вкупно
CK5/6	0	0	3(8,33%)	19(76%)	22
CK8	48(94%)	70(87,5%)	6(16,6%)	1(4%)	125
CK17	0	0	4(11%)	25(100%)	29
CK18	51(100%)	40(50%)	5(14%)	2(8%)	98
CK34BE12	0	0	8(22%)	25(100%)	33
CD117 (c-kit)	0	0	0	3(12%)	3
EGFR-1	0	0	0	5(20%)	5
Vimentin	0	3(3,75%)	26(72,2%)	19(76%)	48
E-cadherin	41(80,39%)	48(61,12%)	36(100%)	25(100%)	150

Од табелата може да се види дека базалните маркери CK5/6, CK17 и CK34BE12 имаат поизразена експресија кај Тројно негативниот фенотип и кај некои HER2+ карциноми. Од друга страна луминалните маркери CK8 и CK18 како и што е очекувано имаат силно изразена експресија кај луминалните типови.

Експресијата на CD117(c-kit) и EGFR-1 во нашата анализирана серија е слабо изразена дури и кај Тројно негативните карциноми. Потврдата за дукталната диференција на карцином на дојка е претставена со изразената експресија на E-cadherin во сите 4 имунофенотипски групи освен со помал процент кај луминалните типови кај кои се најдени и карциноми со лобуларна диференцијација (80,39% Luminal A и 61,12% кај Luminal B).

Експресијата на мезенхимниот маркер Vimentin е отсутна кај Luminal A што е и очекувано поради добрата диференцираност на овие типови карциноми а кај

останатите типови е поизразена заради поголемиот процент на недиференцирани неоплазми (3,75%, 72,2% и 76% кај Luminal B, HER2+ и Тројно негативни, соодветно).

Во табела 18 прикажана е просечната возраст, како и минималната и максималната возраст на пациентките, во зависност од имунофенотипот на карцином на дојка.

Просечната возраст на пациентките е $57,57 \pm 11,2$ години во групата со Luminal A тип на карцином, $54,62 \pm 9,1$ години во групата со Luminal B, $54,17 \pm 8,5$ години во групата со HER2++ тип на карцином, и $50,24 \pm 11,7$ години во групата пациентки со Triple-- тип на карцином.

Тестираната разлика во просечната возраст на пациентките меѓу четирите анализирани групи статистички е сигнификантна за $p < 0,05$ (Analysis of Variance $F=3,12$ $p=0,027$). Post hoc анализата направена со Tukey HSD тестот покажа дека оваа разлика се должи на значајно повисока просечна возраст во групата Luminal A споредено со групата Triple-- ($p=0,013$) (слика 2).

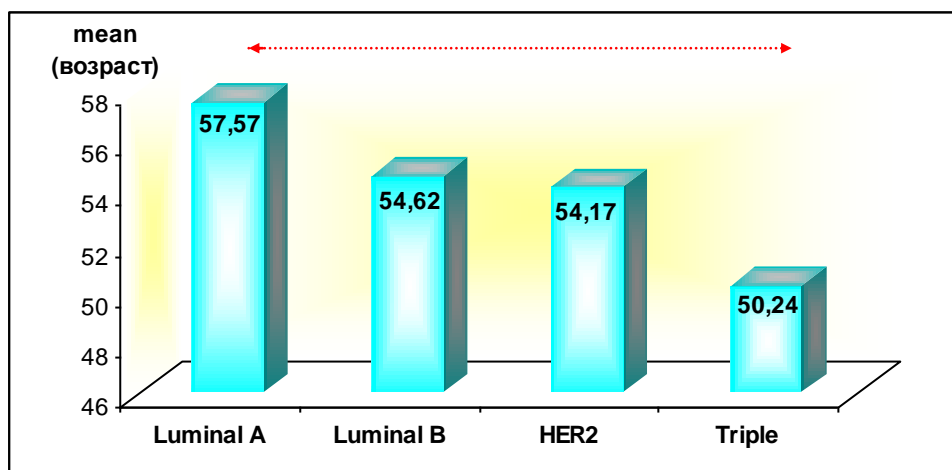
Табела 18. Дескриптивна анализа на возраста – тип на карцином

групи	N	Descriptive Statistics - возраст	
		mean \pm SD	min-max
Luminal A	51	57,57 \pm 11,2	36 - 79
Luminal B	80	54,62 \pm 9,1	37 - 83
HER2++	36	54,17 \pm 8,5	33 - 69
Triple--	25	50,24 \pm 11,7	28 - 73

тестирани разлики Analysis of Variance $F=3,12$ $p=0,027^*$
Post-hoc анализа Tukey HSD test
Luminal A vs Triple- $p=0,013^*$

* $p < 0,05$

Слика 2. Просечна возраст кај имунофенотиповите на карцином на дојка

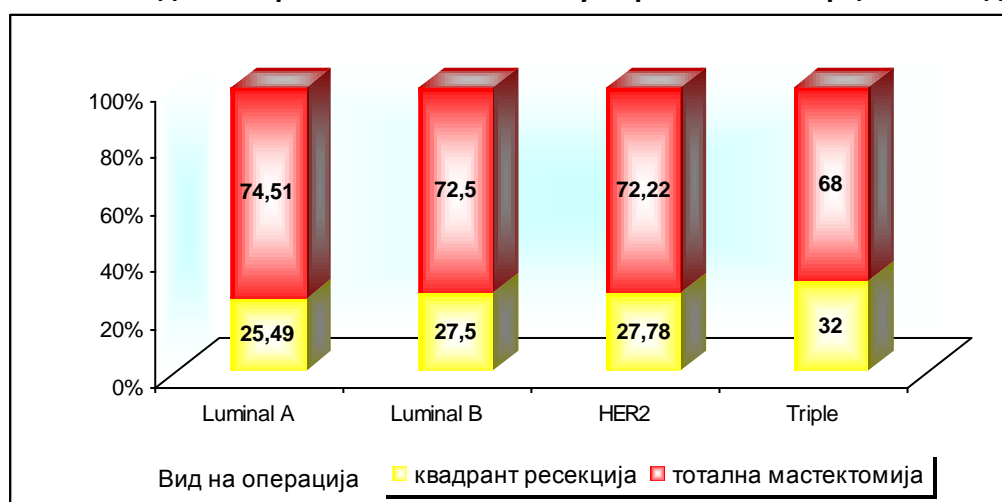


Видот на оперативна техника извршена кај пациентките не зависи значајно од типот на карциномот. Мнозинството пациентки од сите групи се подвргнати на тотална мастектомија (74,51%, 72,5%, 72,22% и 68% консеквентно), (табела 19, слика3).

Табела 19. Дистрибуција во однос на вид на оперативна техника

Вид на операција	на	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
квадрант ресекција		13(25,49%)	22(27,5%)	10(27,78%)	8(32%)	53
тотална мастектомија		38(74,51%)	58(72,5%)	26(72,22%)	17(68%)	139
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =0,06 df=1 p=0,8				
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =0,06 df=1 p=0,8				
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =0,36 df=1 p=0,55				
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =0,00 df=1 p=0,97				
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =0,19 df=1 p=0,66				
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =0,13 df=1 p=0,72				

Слика 3. Вид на оперативна техника и имунофенотип на карцином на дојка



Табела 20. Дескриптивна анализа на туморскиот дијаметар во однос на имунофенотипот.

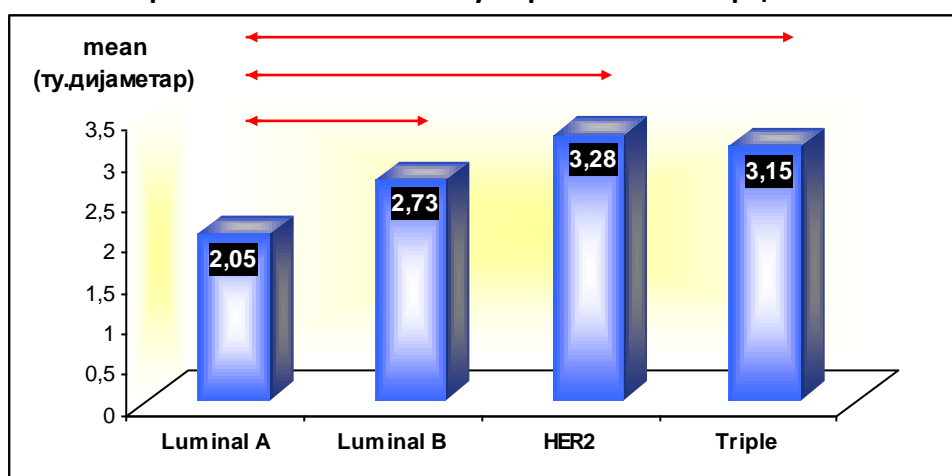
групи	N	Descriptive Statistics – туморски дијаметар(см)		
		mean±SD	min-max	median
Luminal A	51	2,05±1,19	0,5 – 8	1,8
Luminal B	80	2,73±1,63	0,2 - 8	2,3
HER2++	36	3,28±2,18	0,4 - 10	2,5
Triple--	25	3,15±2,81	0,9 - 16	2,6
тестирани разлики		Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; H =14,27 p = 0,0026*		
		Luminal A vs B Mann-Whitney Z = 2,5 p = 0,01*		
		Luminal A vs HER2+ Mann-Whitney Z = 3,2 p = 0,001**		
		Luminal A vs Triple- Mann-Whitney Z = 3,17 p = 0,0015**		
		Luminal B vs HER2+ vs Triple- NS		
		HER2+ vs Triple- NS		

*p<0,05 **p<0,01

Резултатите од истражувањето покажаа дека големината на карциномот на дојка, анализиран преку туморскиот дијаметар, зависи високо сигнификантно од имунофенотипскиот тип на карциномот (Kruskal-Wallis $H = 14,27$ $p = 0,0026$). Притоа, статистички сигнификантна разлика во туморскиот дијаметар е потврдена меѓу групите Luminal A и Luminal B (Mann-Whitney $Z = 2,5$ $p = 0,01$), меѓу Luminal A и HER2++ (Mann-Whitney $Z = 3,2$ $p = 0,001$), и меѓу групите Luminal A и Triple-- (Mann-Whitney $Z = 3,17$ $p = 0,0015$).

Дескриптивната анализа на дијаметарот на туморот покажува дека средниот туморски дијаметар, односно медијаната на туморскиот дијаметар е најмала во групата Luminal A и изнесува 1,8 см, најголема средна вредност туморскиот дијаметар има во Triple- групата од 2,6 см (табела 20, слика 4).

Слика 4. Просечна големина на туморот – тип на карцином



Табела 21. Дистрибуција во однос на туморскиот статус (pT) – тип на карцином

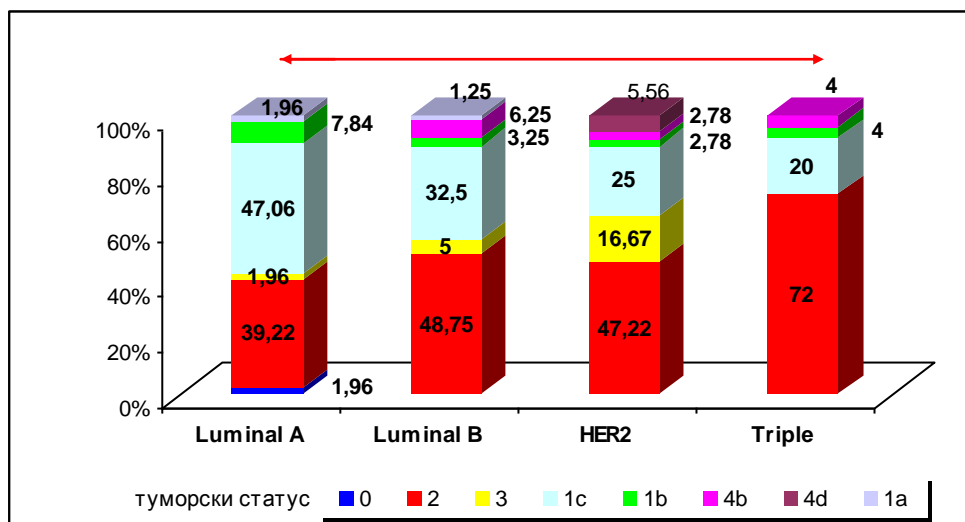
Туморски статус (pT)	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
1a	1(1,96%)	1(1,25%)	0	0	2
1b	4(7,84%)	5(3,25%)	1(2,78%)	1(4%)	11
1c	24(47,06%)	26(32,5%)	9(25%)	5(20%)	64
2	20(39,22%)	39(48,75%)	17(47,22%)	18(72%)	94
3	1(1,96%)	4(5%)	6(16,67%)	0	11
4b	0	5(6,25%)	1(2,78%)	1(4%)	7
4d	0	0	2(5,56%)	0	2
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Z = 0,47 p=0,64		
	Luminal A vs HER2+		Z = 0,84 p=0,4		
	Luminal A vs Triple-		Z = 2,09 p=0,036*		
	Luminal B vs HER2+		Z = 0,3 p=0,75		
	Luminal B vs Triple-		Z = 1,66 p=0,096		
	HER2+ vs Triple-		Z = 1,37 p=0,17		

* $p < 0,05$

Ако големината на туморскиот дијаметар ја разложиме како параметар на туморска големина во постоперативната хистопатолошка класификација (pT), тогаш

статистички сигнификантна разлика во туморскиот статус се потврдува единствено меѓу групите Luminal A и Triple- ($Z = 2,09$ $p=0,036$), (табела 21, слика 5).

Слика 5. Дистрибуција во однос на туморскиот статус – тип на карцином



Во табела 22 и слика 6 прикажана е дистрибуцијата на пациентките од анализираниите групи карциноми на дојка, во зависност од лимфонодалниот статус.

Табела 22. Дистрибуција во однос на лимфонодален статус – тип на карцином

Лимфонодален статус	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
0	29(56,86%)	30(37,5%)	8(22,22%)	13(52%)	80
1mi	1(1,96%)	2(2,5%)	1(2,78%)	0	4
1a	12(23,53%)	18(22,5%)	8(22,22%)	7(28%)	45
1c	1(1,96%)	0	0	0	1
2a	4(7,84%)	16(20%)	8(22,22%)	2(8%)	30
3a	4(7,84%)	14(17,5%)	11(30,56%)	3(12%)	32
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Z = 2,49 p=0,008**		
	Luminal A vs HER2+		Z = 3,67 p=0,0002**		
	Luminal A vs Triple-		Z = 0,34 p=0,73		
	Luminal B vs HER2+		Z = 1,4 p=0,16		
	Luminal B vs Triple-		Z = 1,7 p=0,088		
	HER2+ vs Triple-		Z = 2,75 p=0,006**		

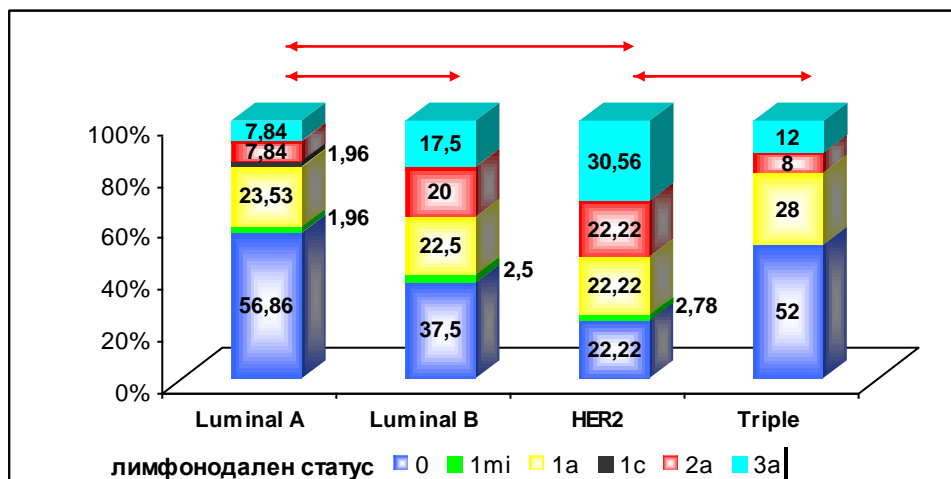
** $p < 0,01$

Без хистолошки детектирани метастази се 56,86% пациентки од групата Luminal A, 37,5% од групата Luminal B, 22,22% пациентки со HER2+ карциноми, и 52% пациентки со Triple- тип на карцином.

Со метастази во 10 или повеќе аксиларни лимфни јазли од кои барем една поголема од 2 мм или инфраклавикуларни лимфни јазли ($pN3a$) се 7,8% Luminal A карциноми, 17,5% Luminal B карциноми, најголем процент -30,56% се HER2+ карциноми, и 12% Triple- карциноми.

Статистичката анализа потврди дека лимфонодалниот статус високо сигнификантно се разликува меѓу групите Luminal A и B карциноми ($Z = 2,49$ $p=0,008$), меѓу групите Luminal A и HER2+ ($Z = 3,67$ $p=0,0002$), меѓу групите HER2+ и Triple- ($Z = 2,75$ $p=0,006$).

Слика 6. Дистрибуција во однос на лимфонодален статус – тип на карцином



Анализата на статусот на лимфонодалниот однос покажува дека, со добар статус се карактеризираат 78,43% карциноми од групата Luminal A, 63,75% карциноми од групата Luminal B, 50% од групата HER2+ и 76% Triple- карциноми. Со многу лош статус се 9,8% карциноми од групата Luminal A, 5% од групата Luminal B, 25% карциноми од групата HER2+, и 8% Triple- карциноми.

Табела 23. Дистрибуција во однос на лимфонодален однос – тип на карцином

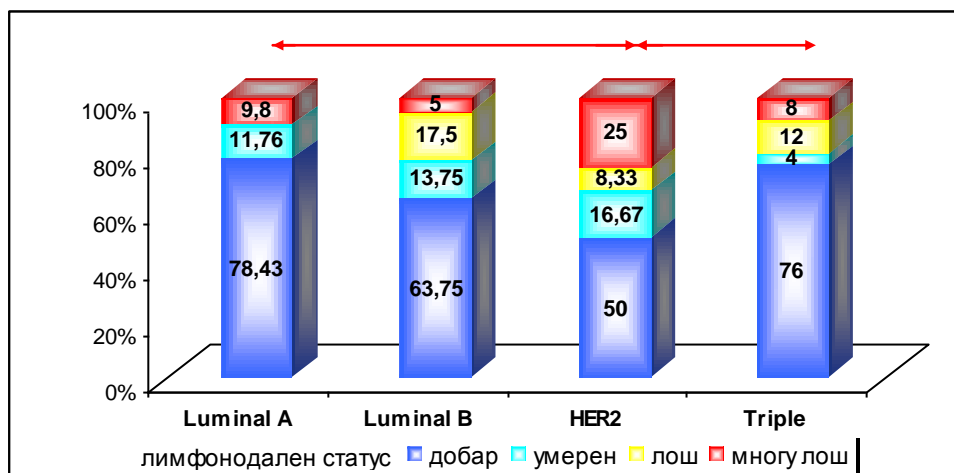
Лимфонодален однос	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
добар (<0,2)	40(78,43%)	51(63,75%)	18(50%)	19(76%)	128
умерен (0,2-0,5)	6(11,76%)	11(13,75%)	6(16,67%)	1(4%)	24
лош (0,5-0,8)	0	14(17,5%)	3(8,33%)	3(12%)	20
многу лош (>0,8)	5(9,8%)	4(5%)	9(25%)	2(8%)	20
тестирани разлики	Luminal A vs B	Mann-Whitney $Z = 1,37$ $p = 0,17$			
	Luminal A vs HER2+	Mann-Whitney $Z = 2,36$ $p = 0,018^*$			
	Luminal A vs Triple-	Mann-Whitney $Z = 0,22$ $p = 0,8$			
	Luminal B vs HER2+	Mann-Whitney $Z = 1,6$ $p = 0,1$			
	Luminal B vs Triple	Mann-Whitney $Z = 0,7$ $p = 0,47$			
	HER2+ vs Triple-	Mann-Whitney $Z = 1,98$ $p = 0,047^*$			

* $p < 0,05$

Лимфонодалниот однос значајно се разликува само во две тестирани релации, меѓу групата Luminal A карциноми и HER2+ карциномите (Mann-Whitney $Z = 2,36$ $p = 0,018$), и меѓу HER2+ и Triple- карциномите (Mann-Whitney $Z = 1,98$ $p = 0,047$). Карциномите од групата HER2+ значајно поретко од Luminal A и од Triple- карциномите

имаат добар лимфонодален однос, но почесто се карактеризираат со многу лош лимфонодален однос (табела 23, слика 7).

Слика 7. Дистрибуција во однос на лимфонодален однос – тип на карцином



Во табела 24 и слика 8 прикажана е дистрибуцијата на анализираниите типови карцином на дојка, а во зависност од стадиумот на болеста во кој е дијагностициран.

Табела 24. Дистрибуција во однос на стадиум на болест – тип на карцином

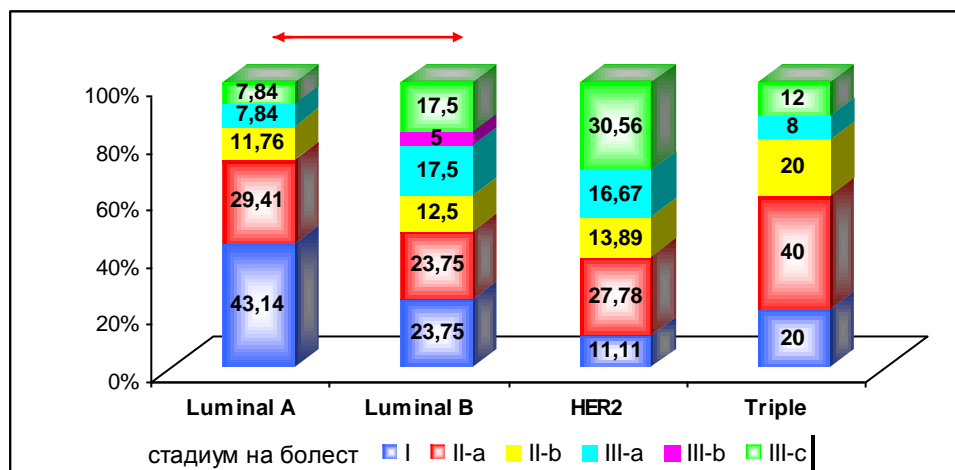
Стадиум на болест	на	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
I		22(43,14%)	19(23,75%)	4(11,11%)	5(20%)	50
II-a		15(29,41%)	19(23,75%)	10(27,78%)	10(40%)	54
II-b		6(11,76%)	10(12,5%)	5(13,89%)	5(20%)	26
III-a		4(7,84%)	14(17,5%)	6(16,67%)	2(8%)	26
III-b		0	4(5%)	0	0	4
III-c		4(7,84%)	14(17,5%)	11(30,56%)	3(12%)	32
тестирани разлики		Luminal A vs B	Mann-Whitney Z = 2,23 p = 0,026*			
		Luminal A vs HER2+	Mann-Whitney Z = 1,76 p = 0,079			
		Luminal A vs Triple-	Mann-Whitney Z = 0,028 p = 0,98			
		Luminal B vs HER2+	Mann-Whitney Z = 0,22 p = 0,83			
		Luminal B vs Triple	Mann-Whitney Z = 1,54 p = 0,12			
		HER2+ vs Triple-	Mann-Whitney Z = 1,14 p = 0,25			

*p<0,05

Стадиумот на болеста значајно се разликува само во една тестирана релација, и тоа меѓу групата Luminal A и Luminal B карциноми на дојка (Mann-Whitney Z = 2,23 p = 0,026).

Карциноми на дојка од тип Luminal B се во значително поодминат стадиум во однос на карциноми од тип Luminal A. Постои само слаб, несигнификантен тренд на асоцијација на стадиумот на болеста меѓу карциноми од тип Luminal A и HER2+ карциноми.

Слика 8. Дистрибуција во однос на стадиум на болест – тип на карцином



Статистичката анализа покажа дека формирањето на тубули кај карциномот на дојка, сигнификантно се разликува меѓу групите Luminal A и Luminal B (Chi-square =22,14 p=0,000016), меѓу Luminal A и HER2++ групата (Chi-square =7,46 p=0,02), и меѓу групите Luminal A и Triple-- (Chi-square=10,97 p=0,004).

Тубули над 75% од туморската маса високо сигнификантно, почесто се формираат кај карциномите од група Luminal A во споредба со карциномите од другите групи.

Табела 25. Дистрибуција во однос на процент на формирани тубули – тип на карцином

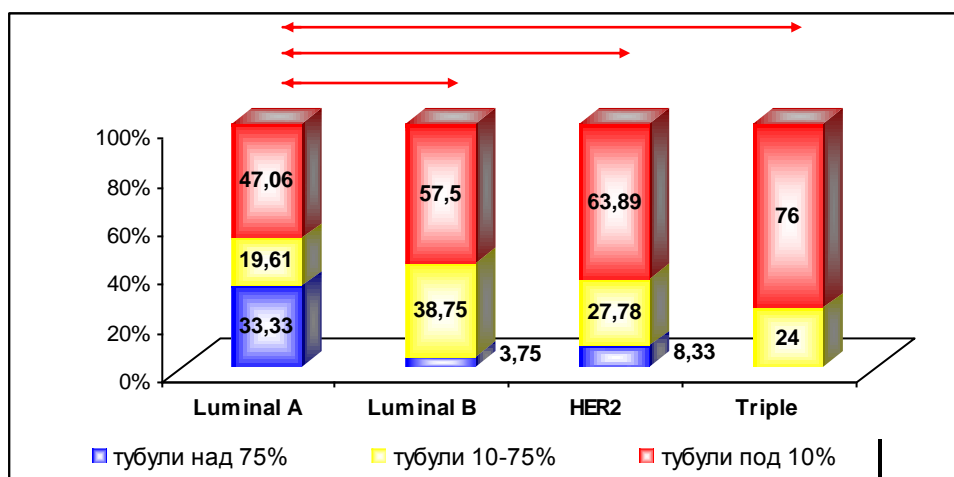
Формирање на тубули	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2++ N=36	Triple-- N=25	Вкупно
тубули над 75%	17(33,33%)	3(3,75%)	3(8,33%)	0	23
тубули 10-75%	10(19,61%)	31(38,75%)	10(27,78%)	6(24%)	57
тубули под 10%	24(47,06%)	46(57,5%)	23(63,89%)	19(76%)	112
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =22,14	df=2 p=0,00002**	
	Luminal A vs HER2++		Chi-square =7,46	df=2 p=0,02*	
	Luminal A vs Triple--		Chi-square =10,97	df=2 p=0,004**	
	Luminal B vs HER2++		Chi-square =2,02	df=2 p=0,36 NS	
	Luminal B vs Triple--		Chi-square =3,17	df=2 p=0,2 NS	
	HER2++ vs Triple--		Chi-square =2,48	df=2 p=0,29 NS	

*p<0,05 **p<0,01

Во дистрибуцијата прикажана во табела 25 и слика 4, се регистрираат 33,33% карциноми од групата Luminal A со тубули над 75%, наспроти 3,75% во групата Luminal B, 8,33% во групата HER2++, и ниту еден од групата Triple-.

Процент на тубули пак под 10% од туморската маса се регистрираат кај 47,06% Luminal A карциноми, кај 57,5% Luminal B карциноми, кај 63,89% HER2++ карциноми, и кај 76% карциноми од групата Triple-- (табела 25, слика 9).

Слика 9. Процент на формирани тубули – тип на карцином



Нуклеарниот градус се презентира со униформни јадра кај 33,3% карциноми од групата Luminal A, кај 12,5% од групата Luminal B, кај 5,56% од групата HER2++, и кај 8% карциноми од групата Triple-- . Умерен јадрен плеоморфизам најчесто манифестираат карциномите од групата Luminal B – 67,5% и од групата Luminal A – 64,71%, а најретко карциномите од групата Triple—, само 24%. Изразен анапластицитет пак, најчесто се регистрира кај Triple-- карциномите на дојка – 68%, додека најретко во групата Luminal A, во која што група изразен анапластицитет е детектиран само кај една испитаничка.

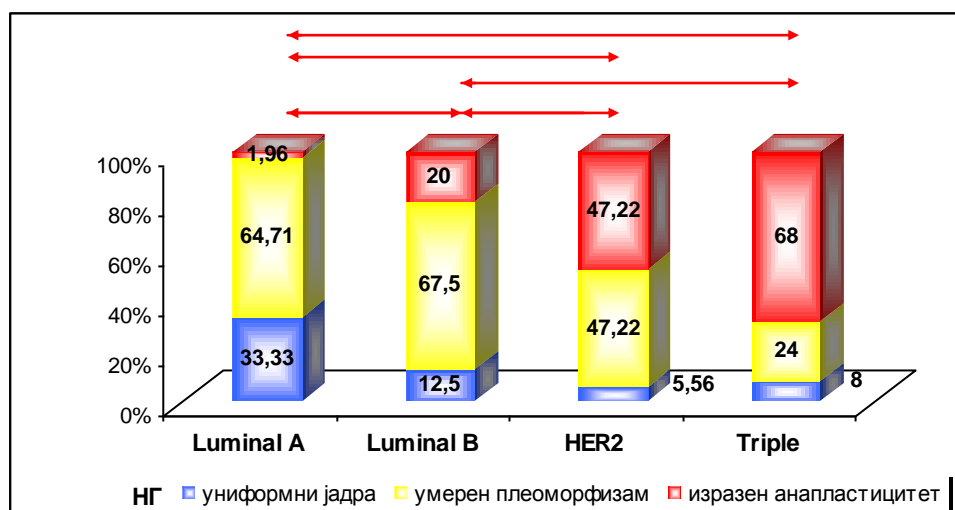
Табела 26. Дистрибуција во однос на нуклеарниот градус – тип на карцином

Нуклеарен градус	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
униформни јадра	17(33,33%)	10(12,5%)	2(5,56%)	2(8%)	31
умерен плеоморфизам	33(64,71%)	54(67,5%)	17(47,22%)	6(24%)	110
изразен анапластицитет	1(1,96%)	16(20%)	17(47,22%)	17(68%)	51
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =14,41	df=2	p=0,0007**
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =29,47	df=2	p=0,0000004**
	Luminal A vs Triple-		Chi-square = 40,62	df=2	p=0,000**
	Luminal B vs HER2+		Chi-square = 9,29	df=2	p=0,00095**
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =20,67	df=2	p=0,00003**
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =3,39	df=2	p=0,18

**p<0,01

Овие опишани разлики во дистрибуцијата на модалитетите на нуклеарниот градус, и статистички се потврдуваат како високо сигнификантни меѓу групата Luminal A во однос на Luminal B (Chi-square =14,41 p=0,0007), во однос на HER2+ (Chi-square =29,47 p=0,0000004), и во однос на Triple- карциноми (Chi-square = 40,62 p=0,000), како и меѓу групата Luminal B во однос на HER2+ (Chi-square= 9,29 p=0,00095) и во однос на Triple- карциномите (Chi-square=20,67 p=0,00003), (табела 26, слика 10).

Слика 10. Дистрибуција во однос на нуклеарниот градус – тип на карцином



Во однос на митотскиот индекс, односно бројот на патолошки митози на 4 сета од по 10 видни полоња на најголемо зголемување (x40), кај мнозинството пациентки со Luminal A карциноми, митотскиот индекс е изразен со 0 до 5 митози – 64,71%, во групата Luminal B карциноми, над 10 митози се детектираат кај најголем процент на пациентки - 48,75%, а помал процент – 30% е со 6 до 10 митози, во групите HER2+ и Triple- доминираат пациентки со над 10 митози (75% и 72% консеквентно), додека процентот на пациентки со митотски индекс до 5 митози во групата HER2+ е само 2,78%, и 8% во групата Triple-.

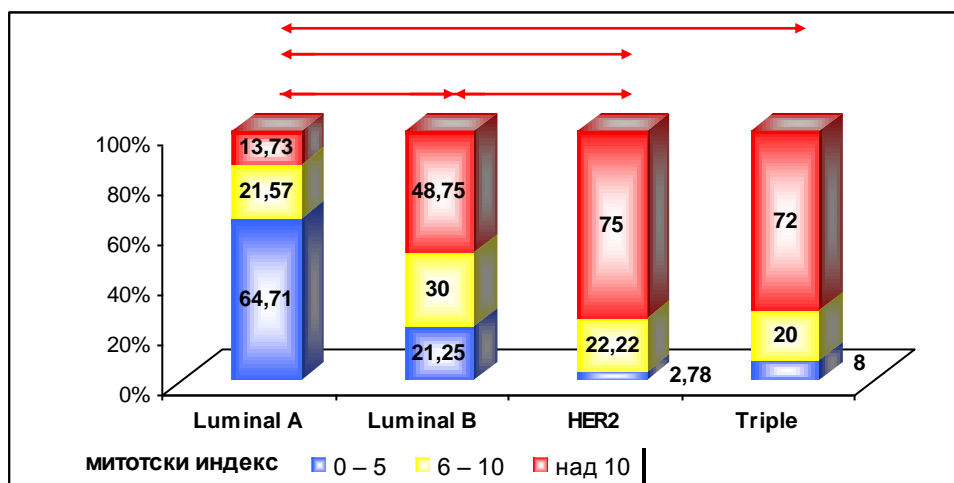
Табела 27. Дистрибуција во однос на митотски индекс – тип на карцином

Митотски индекс	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
0 – 5	33(64,71%)	17(21,25%)	1(2,78%)	2(8%)	53
6 – 10	11(21,57%)	24(30%)	8(22,22%)	5(20%)	48
над 10	7(13,73%)	39(48,75%)	27(75%)	18(72%)	91
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =22,17	df=2	p=0,0000013**
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =40,99	df=2	p=0,0000**
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =29,05	df=2	p=0,0000005**
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =9,01	df=2	p=0,01*
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =4,43	df=2	p=0,1
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =0,87	df=2	p=0,65

*p<0,05 **p<0,01

Статистичката анализа како високо сигнификантна ја потврди разликата во митотскиот индекс меѓу сите анализирани групи, со исклучок на разликата меѓу Triple-групата во однос на Luminal B и HER2+ групите, која е несигнификантна. Број на митози од 0 до 5 почесто, а број на митози над 10 поретко се регистрираат во групата Luminal A наспроти останатите три групи карциноми (p=0,0000013, p=0,0000 и p=0,0000005 консеквентно). Исто така, број на митози од 0 до 5 почесто, а број на митози над 10 поретко се регистрираат во групата Luminal B наспроти HER2+ (p=0,01), (табела 27, слика 11).

Слика 11. Дистрибуција во однос на митотски индекс – тип на карцином



Во однос на степенот на хистолошка диференцијација, резултатите од истражувањето покажуваат дека карциномите од групата Luminal A високо сигнификантно ($p < 0,01$) и почесто од останатите три групи припаѓаат на групата G1, односно се добро диференцирани. И карциномите од групата Luminal B сигнификантно ($p < 0,05$) почесто се добро диференцирани во споредба со карциномите од групата HER2+ и Triple-. Карциномите од групата HER2+ и Triple- несигнификантно се разликуваат во однос на степенот на хистолошка диференцијација ($p = 0,64$).

Табела 28. Дистрибуција во однос на степен на хистолошка диференцираност – тип на карцином

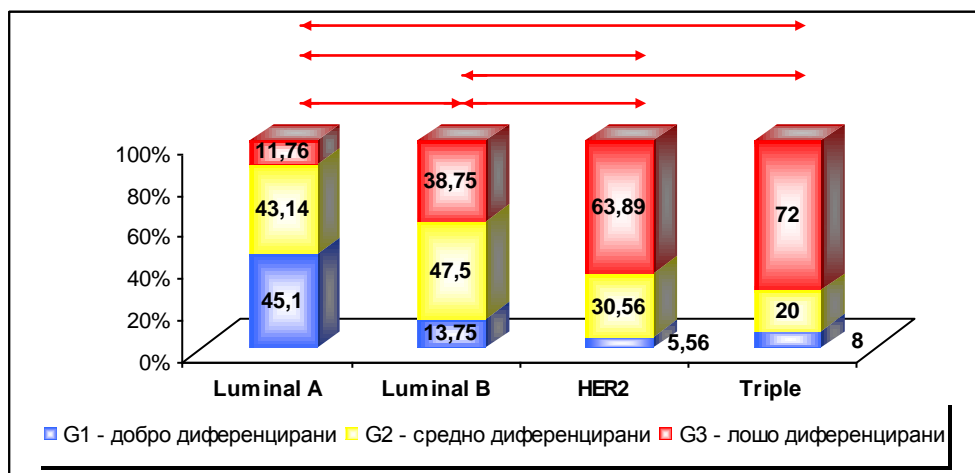
Степен на хистолошка диференцијација	на	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
G1 - добро диференцирани		23(45,1%)	11(13,75%)	2(5,56%)	2(8%)	38
G2 - средно диференцирани		22(43,14%)	38(47,5%)	11(30,56%)	5(20%)	76
G3 - лошо диференцирани		6(11,76%)	31(38,75%)	23(63,89%)	18(72%)	78
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =19,95		df=2	p=0,00005**	
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =29,56		df=2	p=0,0000004**	
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =28,82		df=2	p=0,0000005**	
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =6,55		df=2	p=0,038*	
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =8,54		df=2	p=0,014*	
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =0,91		df=2	p=0,64	

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Во групата Luminal A највисок процент на пациентки – 45,1% , имаат карцином со G1 хистолошка диференцираност, а најнизок процент – 11,76%, имаат лошо диференциран карцином на дојка. Во групата Luminal B, највисок процент на пациентки – 47,5% имаат карцином со G2 хистолошка диференцираност, најголем процент на

карциноми во групата HER2+ – 63,89% се лошо диференцирани, а само 5,56% се добро диференцирани, како и во групата Triple- карциноми, во која дури 72% се G3, односно лошо диференцирани, 8% се карактеризираат со добар степен на хистолошка диференцираност (табела 28, слика 12).

Слика 12. Дистрибуција во однос на степен на хистолошка диференцираност – тип на карцином



Табела 29. Дистрибуција во однос на нотингемски индекс – тип на карцином

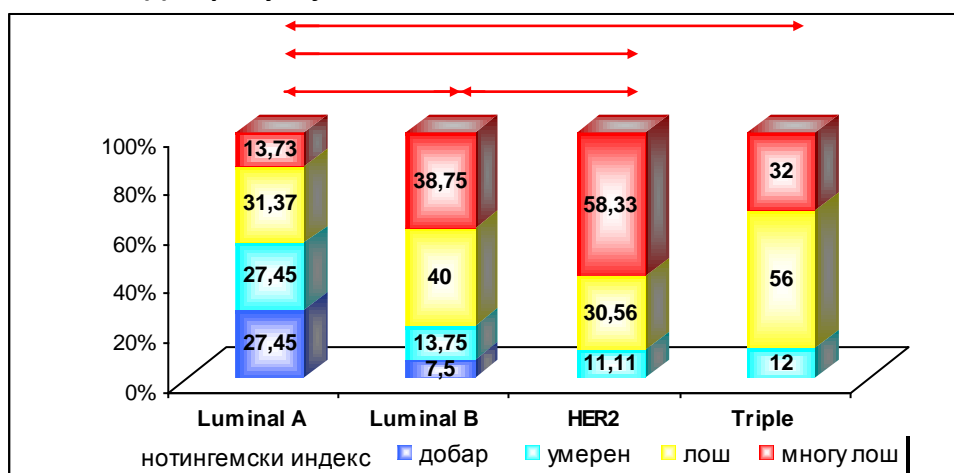
Нотингемски прогностички индекс	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
Добар (< 2,4)	14(27,45%)	6(7,5%)	0	0	20
Умерен(2,41-3,4)	14(27,45%)	11(13,75%)	4(11,11%)	3(12%)	32
Лош (3,41-5,4)	16(31,37%)	32(40%)	11(30,56%)	14(56%)	73
многу лош (>5,41)	7(13,73%)	31(38,75%)	21(58,33%)	8(32%)	67
тестирани разлики	Luminal A vs B	Mann-Whitney Z = 4,05	p = 0,00005**		
	Luminal A vs HER2+	Mann-Whitney Z = 4,82	p = 0,000001**		
	Luminal A vs Triple-	Mann-Whitney Z = 3,42	p = 0,0006**		
	Luminal B vs HER2+	Mann-Whitney Z = 2,08	p = 0,037*		
	Luminal B vs Triple	Mann-Whitney Z = 0,09	p = 0,9		
	HER2+ vs Triple-	Mann-Whitney Z = 1,57	p = 0,12		

Кај 27,45% пациентки со Luminal A карциноми и 7,5% со Luminal B карцином, Нотингемскиот прогностички индекс е добар, со вредност до 2,4. Во групите HER2+ и Triple- карциноми нема пациентки со добар нотингемски прогностички индекс. Умерен индекс, или индекс од 2,41 до 3,4 најчесто е регистриран во групата Luminal A карциноми – 27,45%, а лош статус, или индекс од 3,41 до 5,4 има кај повеќе од половина пациентки со Triple- карциноми, односно кај 14 (56%), додека многу лош нотингемски прогностички индекс, со вредност поголема од 5,41, имаат најчесто пациентките со HER2+ карциноми – 58,33%, а најретко пациентките со Luminal A карцином – 13,73%.

Разликите во модалитетите на нотингемскиот прогностички индекс статистички се потврдија како високо сигнификантни меѓу групата Luminal A наспроти Luminal B (Mann-Whitney $Z = 4,05$ $p = 0,00005$), наспроти HER2+ (Mann-Whitney $Z = 4,82$ $p = 0,000001$) и наспроти Triple- карциномите (Mann-Whitney $Z = 4,82$ $p = 0,000001$), како резултат на значајно подобар индекс во Luminal A групата споредено со останатите три групи карциноми.

Статистички сигнификантна разлика во модалитетите на нотингемскиот прогностички индекс се потврдува и меѓу Luminal B и HER2+ групата (Mann-Whitney $Z = 2,08$ $p = 0,037$), што се должи на значајно подобар индекс во Luminal B групата (табела 29, слика 13).

Слика 13. Дистрибуција во однос на нотингемски индекс – тип на карцином



Анализираните групи карциноми на дојка несигнификантно се разликуваат во однос на ресекционите маргини.

Табела 30. Дистрибуција во однос на тип на ресекциони маргини – тип на карцином

Ресекциони маргини	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
во здраво	44(86,27%)	59(73,75%)	28(77,78%)	22(88%)	153
зафатени	7(13,73%)	21(26,25%)	8(22,22%)	3(12%)	39
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =2,91 df=1 p=0,09		
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =1,07 df=1 p=0,3		
	Luminal A vs Triple-		Yates corrected =0,02 df=1 p=0,88		
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =0,21 df=1 p=0,64		
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =2,19 df=1 p=0,14		
	HER2+ vs Triple-		Fisher exact twotailed p=0,5		

Во сите групи, кај доминантен дел пациентки, ресекционите маргини се во здраво, и тој процент изнесува 86,27% во групата Luminal A, 73,75% во групата Luminal B, 77,78% во групата HER2+, и 88% во групата Triple- карциноми (табела 30, слика 10).

Во оваа група на пациентки, емболизација во лимфатици најчесто е регистрирана во групата HER2+ карциноми – 88,89%, а најретко во Triple- карциномите – 60%. Статистичката анализа потврди дека емболизација во лимфатици високо

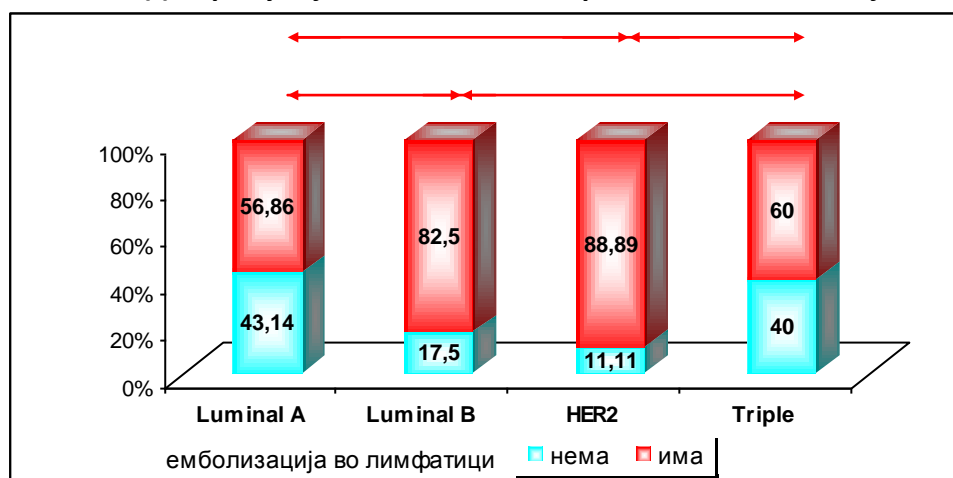
сигнификантно почесто е асоцирана со Luminal B во споредба со Luminal A карциноми (Chi-square=10,27 p=0,0014) и значајно почесто со Luminal B во споредба со Triple- (Chi-square=5,47 p=0,019). Емболизација во лимфатици исто така високо сигнификантно почесто е асоцирана со HER2+ карциноми во споредба со Luminal A (Chi-square=10,33 p=0,001) и во споредба со Triple- карциномите (Chi-square=6,96 p=0,008), (табела 31, слика 14).

Табела 31. Дистрибуција во однос на лимфатична емболизација – тип на карцином

Емболизација во лимфатици	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	22(43,14%)	14(17,5%)	4(11,11%)	10(40%)	50
има	29(56,86%)	66(82,5%)	32(88,89%)	15(60%)	142
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =10,27	df=1	p=0,0014**	
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =10,33	df=1	p=0,001**	
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =0,01	df=1	p=0,9	
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =0,77	df=1	p=0,38	
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =5,47	df=1	p=0,019*	
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =6,96	df=1	p=0,008**	

*p<0,05 **p<0,01

Слика 14. Дистрибуција во однос на лимфатична емболизација – тип на карцином



Емболизација во крвни садови е детектирана кај 19,61% карциноми од групата Luminal A, 35% од групата Luminal B, 55,56% карциноми од групата HER2+ и кај 28% карциноми од групата Triple-.

Резултатите од статистичката анализа потврдуваат високо сигнификантна поретка асоцираност на васкуларна инвазија со Luminal A карциномите во споредба со HER2+ (Chi-square=12,07 df=1 p=0,0005) и сигнификантно поретка асоцираност на васкуларната инвазија со Luminal A карциномите во споредба со Triple- карциноми (Chi-square=0,68 df=1 p=0,04).

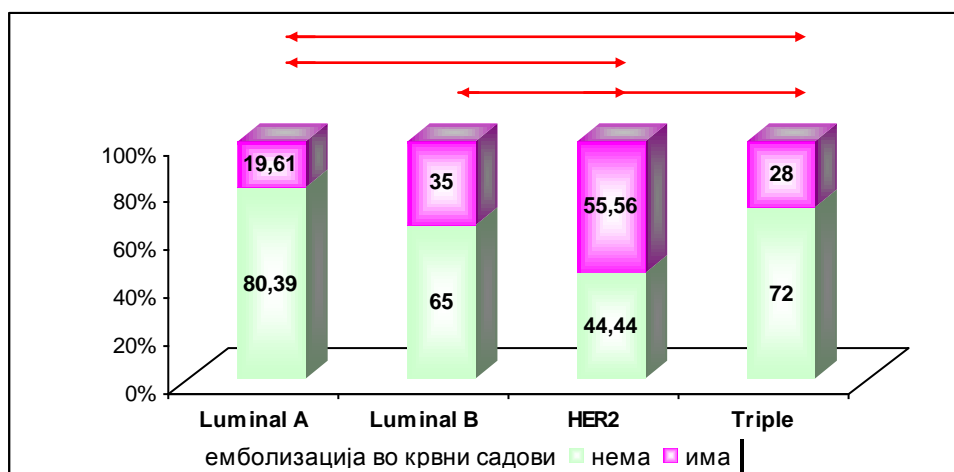
Исто така, појава на васкуларна инвазија значајно поретко се јавува кај Luminal B во споредба со HER2+ карциномите (Chi-square=4,32 df=1 p=0,038) и кај Triple- карциномите во однос на HER2+ карциномите (Chi-square=4,54 df=1 p=0,03), (табела 32, слика 15).

Табела 32. Дистрибуција во однос на васкуларна емболизација – тип на карцином

Емболизација во крвни садови	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	41(80,39%)	52(65%)	16(44,44%)	18(72%)	127
има	10(19,61%)	28(35%)	20(55,56%)	7(28%)	65
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =3,58	df=1	p=0,058	
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =12,07	df=1	p=0,0005**	
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =0,68	df=1	p=0,04*	
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =4,32	df=1	p=0,038*	
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =0,42	df=1	p=0,52	
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =4,54	df=1	p=0,03*	

*p<0,05 **p<0,01

Слика 15. Дистрибуција во однос на васкуларна емболизација – тип на карцином



Лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат е отсутен или се манифестира како слаб најчесто кај Luminal A карциномите – 45 (88,24%), а најретко кај Triple-карциномите – 48%.

Обемен лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат се детектира кај само 3,92% карциноми од групата Luminal A, 5% карциноми од групата Luminal B, а кај најголем процент – 19,44% карциноми од групата HER2+, и кај 16% Triple- карциноми.

И статистички се потврдува дека Luminal A карциномите почесто имаат отсутен до слаб лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат, а поретко обемен, во споредба со HER2+ (Chi-square =13,73 df=2 p=0,001) и Triple- карциномите (Fisher exact, two tailed, p=0,001).

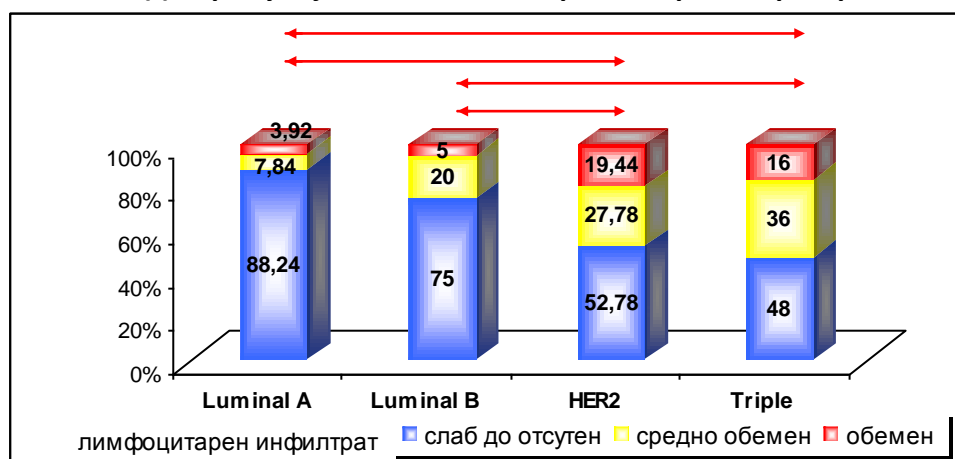
И Luminal B карциномите почесто имаат отсутен до слаб лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат, а поретко обемен, во споредба со HER2+ (Chi-square =14,5 df=2 p=0,0007) и Triple- карциномите (Chi-square = 7,1 df=2 p=0,02), (табела 33, слика 16).

Табела 33. Дистрибуција во однос на инфламаторен инфилтрат – тип на карцином

Лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
слаб до отсутен	45(88,24%)	60(75%)	19(52,78%)	12(48%)	136
средно обемен	4(7,84%)	16(20%)	10(27,78%)	9(36%)	39
обемен	2(3,92%)	4(5%)	7(19,44%)	4(16%)	17
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B Luminal A vs HER2+ Luminal A vs Triple- Luminal B vs HER2+ Luminal B vs Triple- HER2+ vs Triple-		Fisher exact, two tailed, p=0,16 Chi-square =13,73 df=2 p=0,001** Fisher exact, two tailed, p=0,001** Chi-square =14,5 df=2 p=0,0007** Chi-square = 7,1 df=2 p=0,02* Chi-square =0,48 df=2 p=0,78		

*p<0,05 **p<0,01

Слика 16. Дистрибуција во однос на инфламаторен инфилтрат – тип на карцином



Туморска некроза, се регистрира кај 17,65% карциноми од групата Luminal A, 28,75% карциноми од групата Luminal B, кај 36,11% од групата HER2+ и 68% од групата Triple- карциноми.

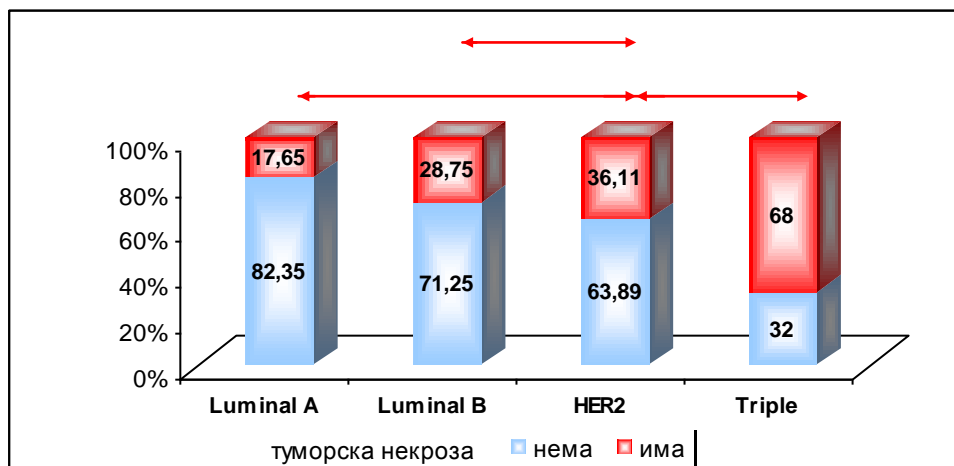
Табела 34. Дистрибуција во однос на туморска некроза – тип на карцином

Туморска некроза	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	42(82,35%)	57(71,25%)	23(63,89%)	8(32%)	130
има	9(17,65%)	23(28,75%)	13(36,11%)	17(68%)	62
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B Luminal A vs HER2+ Luminal A vs Triple- Luminal B vs HER2+ Luminal B vs Triple- HER2+ vs Triple-		Chi-square =3,58 df=1 p=0,058 Chi-square =12,07 df=1 p=0,0005** Chi-square =0,68 df=1 p=0,4 Chi-square =4,32 df=1 p=0,038* Chi-square =0,42 df=1 p=0,52 Chi-square =4,54 df=1 p=0,03*		

*p<0,05 **p<0,01

Овие опишани разлики се потврдија статистички како високо сигнификантни меѓу групите Luminal A и HER2+ (Chi-square=12,07 df=1 p=0,0005), а како сигнификантни меѓу групите Luminal B и HER2+ (Chi-square=4,32 df=1 p=0,038) и меѓу HER2+ и Triple-карциноми (Chi-square=4,54 df=1 p=0,03), (табела 34, слика 17).

Слика 17. Дистрибуција во однос на туморска некроза – тип на карцином



Резултатите од истражувањето презентираат почеста застапеност на дезмопластичната стромална реакција кај луминалните типови на карциноми, односно, 80,39% кај Luminal A карциноми, 71,25% кај Luminal B карциноми, 61,11% кај HER2+ и 48% кај Triple- карциноми се карактеризираат со процес на дезмопластична стромална реакција.

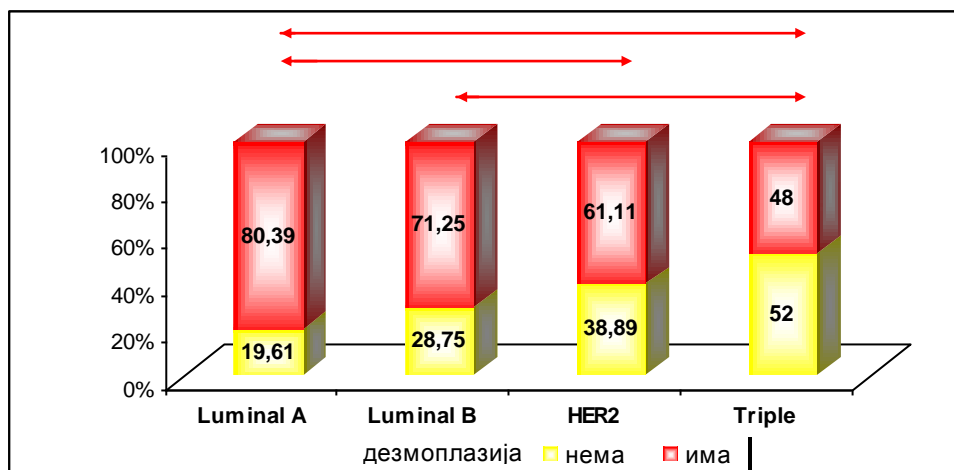
Статистички сигнификантно почест е наодот на дезмопластична стромална реакција во групата Luminal A во споредба со HER2+ (Chi-square=3,93 df=1 p=0,047) и високо сигнификантно почест во споредба со Triple- карциноми (Chi-square=8,34 df=1 p=0,0039). Исто така и Luminal B карциномите презентираат значајно почесто дезмопластична стромална реакција во споредба со Triple- карциноми (Chi-square=4,57 df=1 p=0,032), (табела 35, слика 18).

Табела 35. Дистрибуција во однос на дезмопластичната стромална реакција – тип на карцином

Дезмоплазија	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	10(19,61%)	23(28,75%)	14(38,89%)	13(52%)	60
има	41(80,39%)	57(71,25%)	22(61,11%)	12(48%)	132
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =1,38	df=1	p=0,24	
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =3,93	df=1	p=0,047*	
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =8,34	df=1	p=0,0039**	
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =1,17	df=1	p=0,28	
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =4,57	df=1	p=0,032*	
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =1,03	df=1	p=0,31	

*p<0,05 **p<0,01

Слика 18. Дистрибуција во однос на дезмопластична реакција – тип на карцином

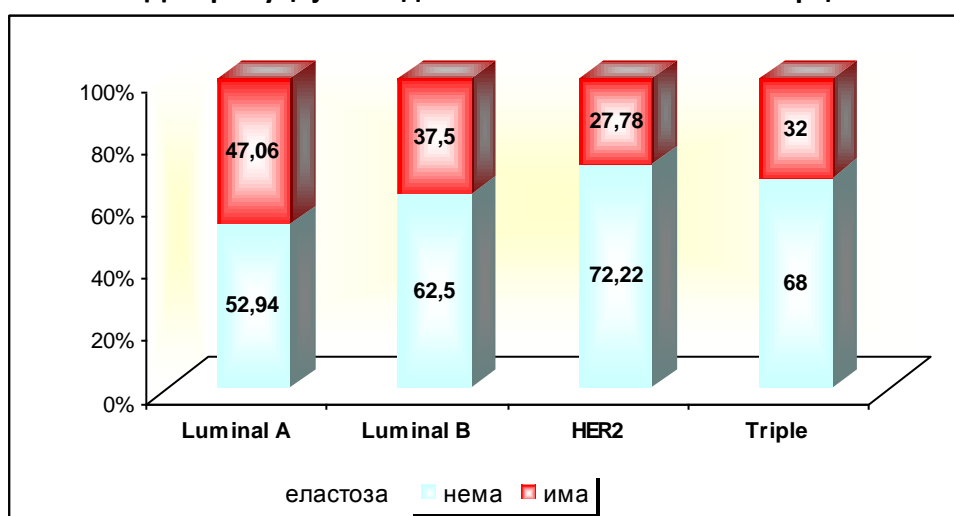


Процентот на карциноми со присутна еластоза е 47,06% во групата Luminal A, 37,5% во групата Luminal B, 27,78% во групата HER2+, и 32% во групата Triple-карциноми.

Табела 36. Дистрибуција во однос на еластоза – тип на карцином

Еластоза	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	27(52,94%)	50(62,5%)	26(72,22%)	17(68%)	120
има	24(47,06%)	30(37,5%)	10(27,78%)	8(32%)	72
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =1,17 df=1 p=0,28			
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =3,3 df=1 p=0,07			
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =1,56 df=1 p=0,2			
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =1,04 df=1 p=0,3			
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =0,25 df=1 p=0,62			
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =0,13 df=1 p=0,72			

Слика 19. Дистрибуција во однос на еластоза – тип на карцином



Дистрибуцијата на карциноми без и со еластоза, а во зависност од имунофенотипот (молекуларен тип) статистички е несигнификантна (табела 36, слика 19).

Статистички сигнификантна разлика во присуство и отсуство на калцификати се потврдува меѓу Luminal A наспроти Triple- карциноми (Chi-square=4,82 df=1 p=0,028), меѓу Luminal B наспроти Triple- карциноми (Chi-square=10,31 df=1 p=0,001), и меѓу HER2+ и Triple- карциноми.

Разликите меѓу другите типови карциноми се недоволни за статистичка сигнификантност.

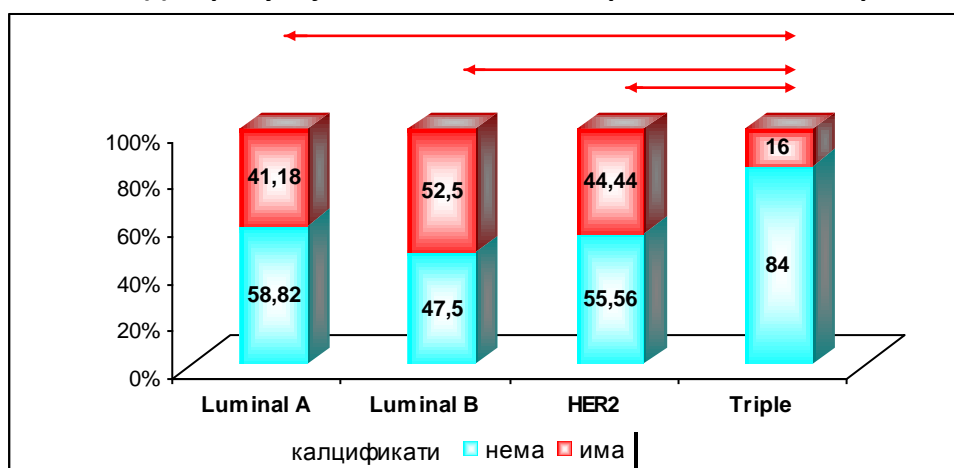
Табела 37. Дистрибуција во однос на калцификати – тип на карцином

Калцификати	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	30(58,82%)	38(47,5%)	20(55,56%)	21(84%)	109
има	21(41,18%)	42(52,5%)	16(44,44%)	4(16%)	83
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B	Chi-square =1,6	df=1	p=0,2	
	Luminal A vs HER2+	Chi-square =0,09	df=1	p=0,76	
	Luminal A vs Triple-	Chi-square =4,82	df=1	p=0,028*	
	Luminal B vs HER2+	Chi-square =0,64	df=1	p=0,42	
	Luminal B vs Triple-	Chi-square =10,31	df=1	p=0,001**	
	HER2+ vs Triple-	Chi-square =5,42	df=1	p=0,02*	

*p<0,05 **p<0,01

Во оваа група пациентки со карцином на дојка, кај 41,18% со Luminal A тип на карцином, 52,5% со Luminal B тип, 44,44% со HER2+, и само 16% со Triple- тип на карцином се детектираат калцификати (табела 37, слика 20).

Слика 20. Дистрибуција во однос на калцификати – тип на карцином



Во однос на хормонската естрогена активност, резултатите од истражувањето покажуваат дека луминалните карциноми на дојка се секогаш естроген позитивни, во групата HER2+ естроген позитивни се 38,89% карциноми, додека Triple- карциноми се естроген негативни.

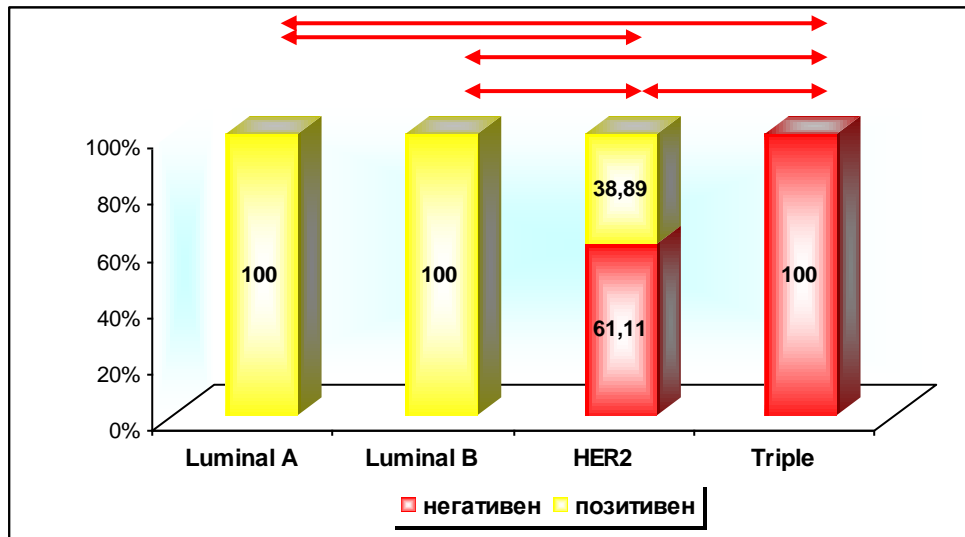
Табела 38. Дистрибуција во однос на статус на естрогенски рецептор – тип на карцином

ER	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
негативен	0	0	22(61,11%)	25(100%)	47
позитивен	51(100%)	80(100%)	14(38,89%)	0	145
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		не се пресметува		
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =41,72 df=1 p<0,001		
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =76,0 df=1 p<0,001		
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =60,3 df=1 p<0,001		
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =105,0 df=1 p<0,001		
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =12,6 df=1 p=0,0004**		

** p<0,01

Овие опишани разлики во естрогенската активност меѓу 4-те групи карциноми на дојка и статистички се потврдија како сигнификантни, односно, за $p<0,001$ се потврдува сигнификантна разлика во естрогенската активност меѓу Luminal A наспроти HER2+ и Triple- карциноми на дојка, како и меѓу Luminal B наспроти HER2+ и Triple- карциноми на дојка. И HER2+ карциномите се сигнификантно почесто естроген позитивни споредено со Triple- карциноми на дојка ($p=0,0004$), (табела 38, слика 21).

Слика 21. Дистрибуција во однос на естроген рецептор – тип на карцином



Во однос на прогестеронската активност, резултатите од истражувањето покажуваат дека луминалните карциноми на дојка од типот А се секогаш прогестероген позитивни, Triple- карциномите се секогаш прогестерон негативни, додека во оваа серија испитанички со малигна болест на дојка, прогестерон позитивни се 75% карциноми од групата Luminal B и 22,22% од групата HER2+.

И статистички се потврдува како сигнификантна разликата во прогестеронската активност меѓу Luminal A наспроти Luminal B карциномите ($p=0,0001$), наспроти HER2+ ($p<0,001$) и наспроти карциномите од групата Triple- ($p<0,001$).

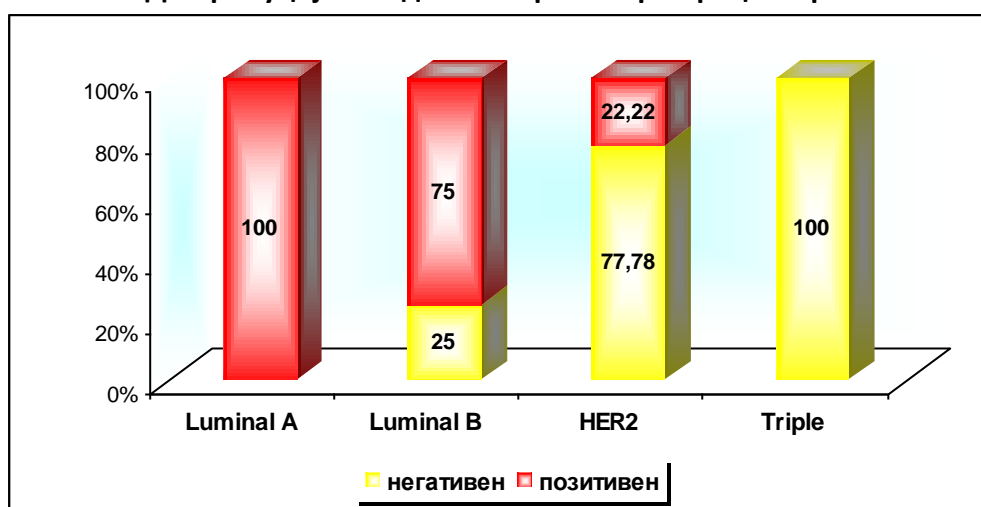
Статистички сигнификантна е разликата меѓу Luminal B карциномите наспроти HER2+($p=0,000001$) и наспроти Triple- карциномите ($p<0,001$). И HER2+ карциномите се сигнификантно почесто прогестерон позитивни споредено со Triple- карциномите ($p=0,0004$), (табела 39, слика 22).

Табела 39. Дистрибуција во однос на статус на прогестеронски рецептор – тип на карцином

PR	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
негативен	0	20(25%)	28(77,78%)	25(100%)	73
позитивен	51(100%)	60(75%)	8(22,22%)	0	119
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =51,05	df=1	$p=0,0001^{**}$
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =58,49	df=1	$p<0,001$
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =76	df=1	$p<0,001$
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =28,5	df=1	$p=0,000001^{**}$
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =43,75	df=1	$p<0,001$
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =6,39	df=1	$p=0,012^*$

* $p<0,05$ ** $p<0,01$

Слика 22. Дистрибуција во однос на прогестерон рецептор – тип на карцином



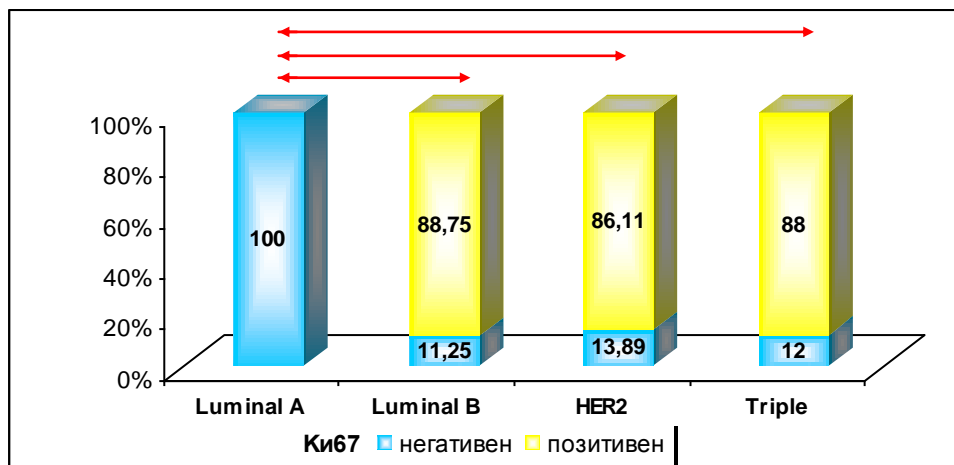
Табела 40. Дистрибуција во однос на пролиферативен индекс – тип на карцином

Пролиферативен индекс (Ki-67)	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
негативен	51(100%)	9(11,25%)	5(13,89%)	3(12%)	68
позитивен	0	71(88,75%)	31(86,11%)	22(88%)	124
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =98,82	df=1	$p=0,000^{**}$
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =68,44	df=1	$p=0,000^{**}$
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =63,16	df=1	$p=0,000^{**}$
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =0,16	df=1	$p=0,69$
	Luminal B vs Triple-		Yates corrected=0,07	df=1	$p=0,78$
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =0,03	df=1	$p=0,86$

** $p<0,001$

Анализата на степенот на пролиферативна активност, детерминирана преку имунохистохемиската експресија на моноклоналното антитело Ki-67, покажува дека нема Ki-67 позитивни карциноми во групата Luminal A, додека тој процент во останатите три групи карциноми на дојка е многу сличен – 88,75% во групата Luminal B, 86,11% во HER2+ групата, и 88% во групата Triple- карциноми.

Слика 23. Дистрибуција во однос на пролиферативен индекс – тип на карцином



И статистички се потврдува дека Luminal B, HER2+ и Triple- карциномите имаат високо сигнификантно поголема биолошка агресивност во споредба со Luminal A карциномите ($p < 0,001$), (табела 40, слика 23).

Експресија на протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 е изразена кај 7,84% Luminal A карциноми, кај 26,25% Luminal B карциноми, кај 44,44% HER2+ карциноми, и кај најголем процент - 60% Triple- карциноми.

Експресијата на p53 е високо сигнификантно, поретко асоцирана со Luminal A карциномите во однос на Luminal B (Chi-square=6,83 df=1 $p=0,009$), во однос на HER2+ карциноми (Chi-square=15,97 df=1 $p=0,00007$) и во однос на Triple- карциноми (Chi-square =24,34 df=1 $p=0,000$).

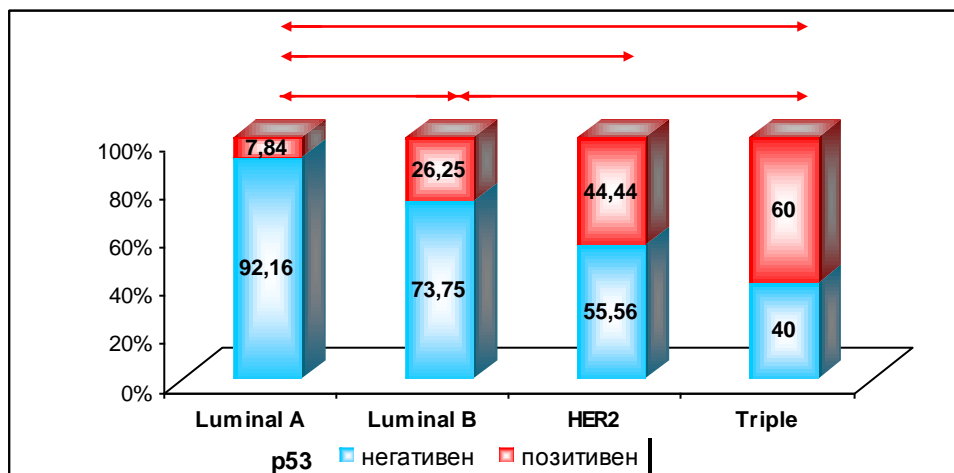
Табела 41. Дистрибуција во однос на степен на експресија на тумор супресорски ген – тип на карцином

Експресија на p53 супресорски ген	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
негативен	47(92,16%)	59(73,75%)	20(55,56%)	10(40%)	136
позитивен	4(7,84%)	21(26,25%)	16(44,44%)	15(60%)	56
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =6,83	df=1	$p=0,009^{**}$
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =15,97	df=1	$p=0,00007^{**}$
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =24,34	df=1	$p=0,000^{**}$
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =3,78	df=1	$p=0,05$
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =9,63	df=1	$p=0,002^{**}$
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =1,43	df=1	$p=0,23$

$^{**}p < 0,01$

Исто така, позитивна експресија на овој ген високо сигнификантно поретко е асоцирана со Luminal B карциноми во однос на Triple- карциномите (Chi-square=9,63 df=1 p=0,002), (табела 41, слика 24).

Слика 24. Дистрибуција во однос на степен на експресија на тумор супресорски ген – тип на карцином



Експресија на bcl2 онкопротеинот, со висока сигнификантност почесто се регистрира кај пациентките со Luminal A карцином, во однос на Luminal B (60,78% vs 30%, Chi-square =12,12 df=1, p=0,0005), во однос на пациентките со HER2+ (60,78% vs 22,22% Chi-square =12,69, df=1, p=0,0004), и во однос на пациентките со Triple- карцином (60,78% vs 16%, Chi-square =13,54 df=1, p=0,0002).

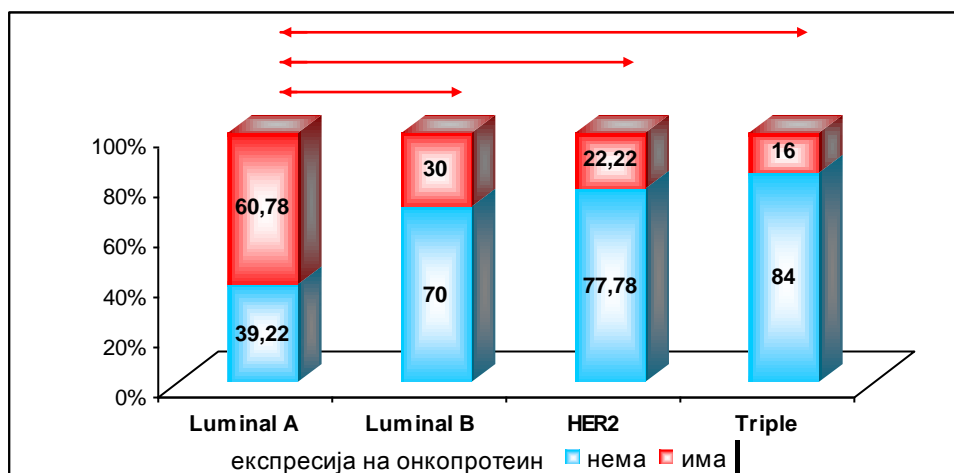
Разликите во експресија на bcl2 онкопротеин се несигнификантни меѓу пациентките со Luminal B и HER2+ (30% vs 22,22% p=0,39), меѓу пациентките со Luminal B и Triple- карцином (30% vs 16% p=0,17), како и меѓу пациентките со HER2+ и Triple- карцином (22,22% vs 16% p=0,55), (табела 42, слика 25).

Табела 42. Дистрибуција во однос на експресија на bcl2 онкопротеин – тип на карцином

Експресија на bcl2 онкопротеин	на Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
нема	20(39,22%)	56(70%)	28(77,78%)	21(84%)	125
има	31(60,78%)	24(30%)	8(22,22%)	4(16%)	67
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =12,12 df=1 p=0,0005**		
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =12,69 df=1 p=0,0004**		
	Luminal A vs Triple-		Chi-square =13,54 df=1 p=0,0002**		
	Luminal B vs HER2+		Chi-square = 0,75 df=1 p=0,39		
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =1,91 df=1 p=0,17		
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =0,36 df=1 p=0,55		

**p<0,01

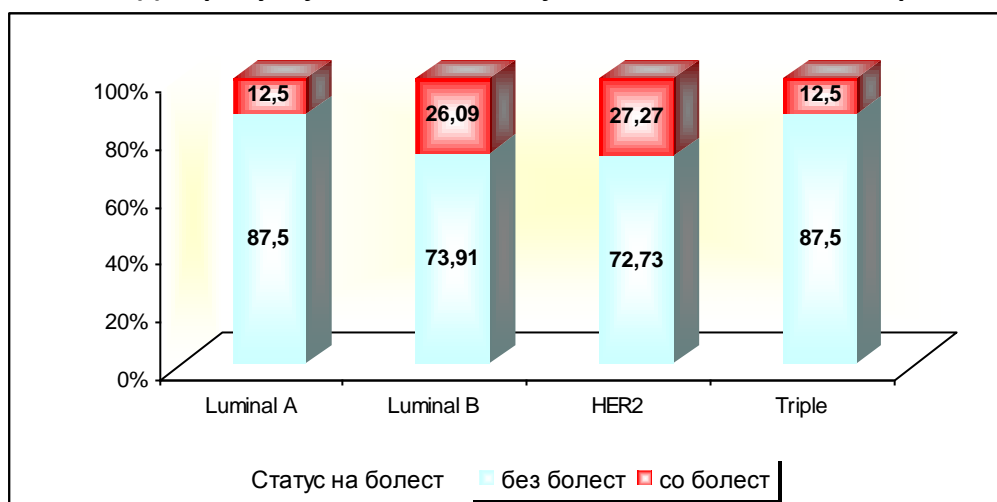
Слика 25. Дистрибуција во однос на експресија на bcl2 онкопротеин – тип на карцином



Табела 43. Дистрибуција во однос на појава на болест – тип на карцином

Статус на болест	Luminal A N=51	Luminal B N=80	HER2+ N=36	Triple- N=25	Вкупно
без болест	42(87,5%)	51(73,91%)	24(72,73%)	21(87,5%)	138
со болест	6(12,5%)	18(26,09%)	9(27,27%)	3(12,5%)	36
тестирани разлики	Luminal A vs Luminal B		Chi-square =3,2 df=1 p=0,07		
	Luminal A vs HER2+		Chi-square =2,83 df=1 p=0,09		
	Luminal A vs Triple-		Yates corrected =0,14 df=1 p=0,07		
	Luminal B vs HER2+		Chi-square =0,02 df=1 p=0,9		
	Luminal B vs Triple-		Chi-square =1,88 df=1 p=0,17		
	HER2+ vs Triple-		Chi-square =1,82 df=1 p=0,18		

Слика 26. Дистрибуција во однос на појава на болест – тип на карцином



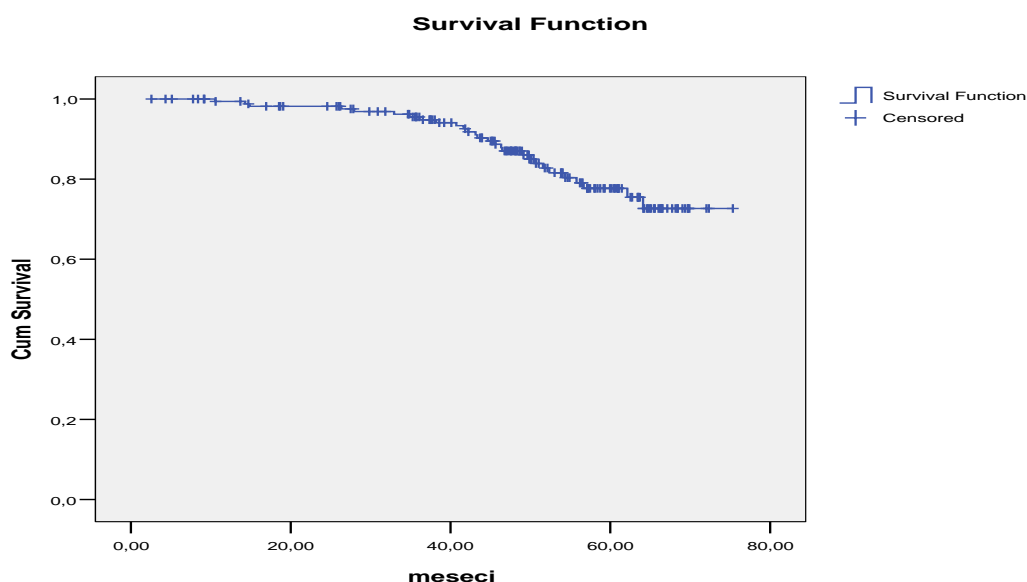
Во табела 43 прикажана е дистрибуцијата на пациентките без и со релапс на болеста, а во зависност од типот на карцином. Рецидив се јавил кај 12,5% пациентки со Luminal A карцином, 26,09% со Luminal B, 27,27% со HER2+, и кај 12,5% пациентки со карцином од групата Triple-.

Разликите меѓу анализираниите типови карциноми на дојка, во однос на појава на рецидив на болеста се недоволни за да се потврдат и статистички како сигнификантни (слика 26).

4.3. ПРОГНОСТИЧКО ВЛИЈАНИЕ НА ИСПИТУВАНИТЕ ПАРАМЕТРИ ВРЗ ПРЕЖИВУВАЊЕТО БЕЗ БОЛЕСТ - DISEASE-FREE SURVIVAL (DFS)

Во овој дел од истражувањето прикажани се резултатите од 5-годишно disease free survival (DFS), односно преживување без болест. Како период до рецидив, односно релапс на болеста, сметано е времето од датумот на операцијата до датумот на клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза (disease free interval).

Слика 27. Kaplan-Meier за вкупен DFS (disease – free survival)



Просечното време на следење е $46,6 \pm 16,6$ месеци, најкраткото време на следење е 12,6 месеци, најдолгото е 75,3 месеци. Медијаната, односно средното време на следење е 48,5 месеци со 25 до 75 перцентили од 36,7 до 59,6 месеци.

Во анализата се вклучени 173 пациентки, и добиените резултати покажуваат дека кај 35 (20,2%) од нив, болеста рецидивирала во период од 5 години по извршената оперативна интервенција, додека кај 138 (79,8%) пациентки, во овој период не е регистриран релапс на болеста.

Резултатите од нашето истражување покажаа дека 5-годишно DFS, односно 5-годишно преживување без болест за оваа група на заболени од карцином на дојка изнесува 72,7% (SE = 0,05.) (слика 27)

4.3.1. Преживување без болест во однос на молекуларните подтипови на карцином на дојка

Во табела 44 прикажана е дистрибуцијата на одделните типови карцином на дојка, во однос на зачестеноста на јавување на рецидиви во период од 5 години по

хируршката интервенција. Болеста рецидивирала кај 12,5% пациентки со Luminal A тип на карцином, кај 23,19% со Luminal B, кај 28,12% со HER2+, и кај 16,67% пациентки со Triple- тип на карцином на дојка.

Табела 44. Дистрибуција рецидив / без рецидив – тип на карцином

групи	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
Luminal A	48	6	12,5	42	87,5
Luminal B	69	16	23,19	53	76,8
HER2+	32	9	28,12	23	71,87
Triple-	24	4	16,67	20	83,33

Стапката на 5-годишно преживување без болест за Luminal A, Luminal B, HER2+ и Triple- изнесува 84,3% , 72,5%, 61% и 76,2%, консеквентно.

Разликите во времето на преживување меѓу одделните типови рак на дојка се недоволни за да се потврдат и статистички како сигнификантни, односно значајни ($p = 0,22$). Пациентките со Luminal A тип карцином на дојка имаат незначајно подолго време на преживување без болест компарирано со другите типови карциноми на дојка (табела 44а, слика 28).

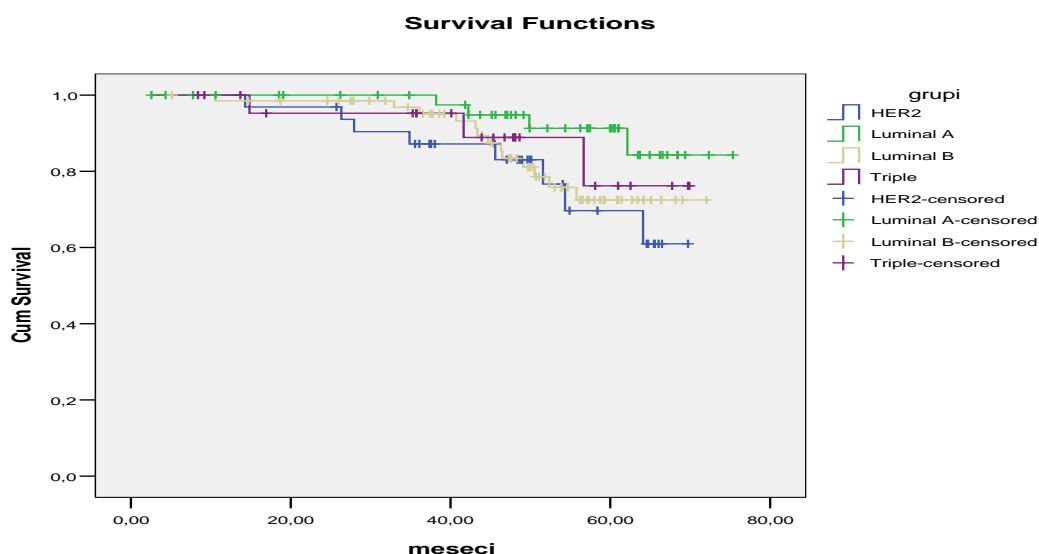
Табела 44а. DFS – тип на карцином

групи	DFS	(SE)
Luminal A	84,3%	0,08
Luminal B	72,5%	0,068
HER2+	61%	0,12
Triple-	76,2%	0,13

тестирани разлики

Log Rank (Mantel-Cox) Chi square = 4,398 df=3 $p = 0,22$

Слика 28. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / Luminal A vs Luminal B vs HER2+ vs Triple-



4.3.2. Преживување без болест во однос на клинички параметри

Возраста во анализата за DSF ја анализираме во две возрастни групи, пациентки помлади и до 40 години, и постари од 40 години. Процентот на пациентки со метастазирање на болеста во период од 5 години постоперативно изнесува 33,33% во возрастната категорија до 40 години, и 18,99% во постарата возрастна категорија (табела 45).

Табела 45. Дистрибуција рецидив / без рецидив – возраст

возрасни групи (години)	N	Рецидиви		Без рецидив	
		N	%	N	%
<= 40	15	5	33,33	10	66,67
> 40	158	30	18,99	128	81,01

Кумулативната стапка на 5-годишно DFS изнесува 45,3% во групата пациентки на возраст од 40 години и помлади, додека во групата над 40-годишна возраст добиена е стапка од 83,4%.

Двете возрастни групи пациентки имаат сигнификантно различно време на 5-годишно преживување без болест ($p = 0,041$), значајно подолго преживуваат пациентките од постарата возрастна група (табела 45а, слика 29).

Табела 45а. DFS - возраст

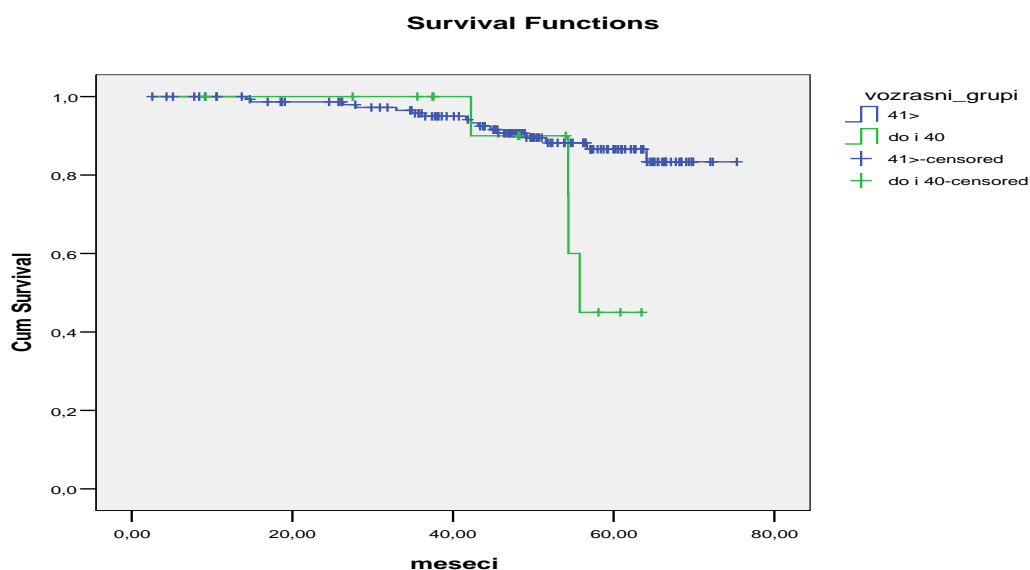
возрасни групи (години)	DFS	(SE)
<= 40	45,3%	0,19
41 и >	83,4%	0,045

тестирани разлики

Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 4,16 df=1 $p = 0,041^*$

* $p < 0,05$

Слика 29. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / возраст



Со цел да се евидентира поголема сигнификантност во однос на возраста, во анализата за DSF анализираме и група пациентки помлади и до 50 години, и постари од 50 години. Процентот на испитанички со метастазирање на болеста во период од 5 години постоперативно изнесува 20,75% во возрастната категорија до 50 години, и 20% во постарата возрастна категорија (табела 45б).

Табела 45б. Дистрибуција рецидив / без рецидив – возраст

возрасни групи (години)	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
<= 50	53	11	20,75	42	79,25
> 50	120	24	20	96	80

Кумулативната стапка на 5-годишно DFS изнесува 40,9% во групата испитанички на возраст до 50 години и помлади, додека во групата над 50-годишна возраст добиена е стапка од 69,7%.

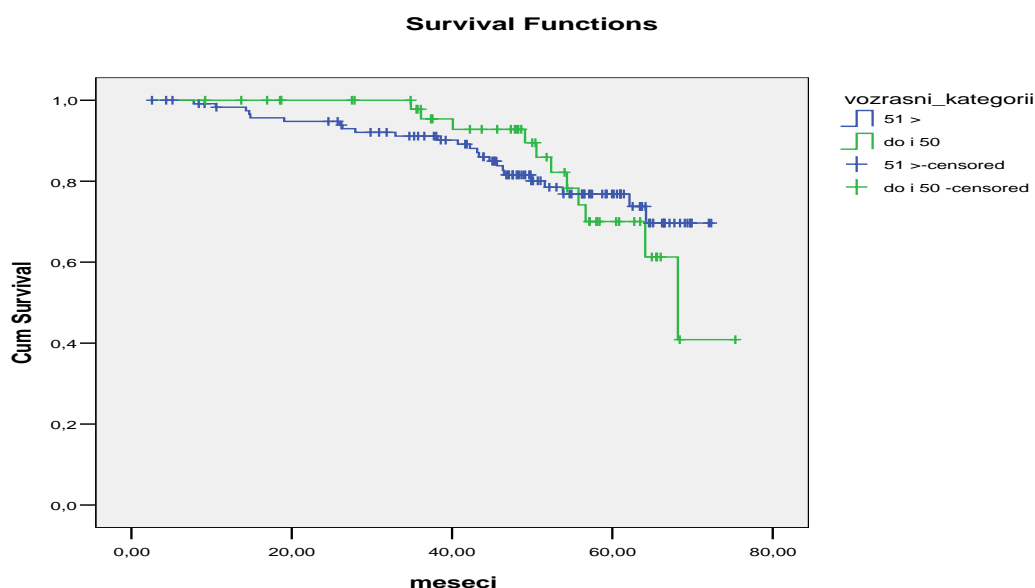
Двете возрастни групи испитанички при поделбата над и под 50 годишна возраст, имаат несигнификантно различно време на 5-годишно преживување без болест ($p = 0,09$), незначајно подолго преживуваат испитаничките од постарата возрастна група (табела 45в, слика 29а).

Табела 45в. DFS - возраст

возрасни групи (години)	DFS	(SE)
<= 50	40,9%	0,18
51 и >	69,7%	0,06

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,01 df=1 p = 0,9 ns

Слика 29а. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / возраст



Табела 46 ја прикажува дистрибуцијата на зачестеноста на јавување на метастази, во зависност од видот на хируршка интервенција. Во групата испитанички кај кои е извршена квадрант ресекција, во период од 5 години по интервенцијата, рецидив се јавил кај 10,2%, додека во групата со тотална мастектомија, процентот на повторна појава на болест е 18,5%.

Табела 46. Дистрибуција рецидив / без рецидив – тип на оперативна техника

Оперативна техника	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
квадрант ресекција	49	5	10,2	44	89,8
тотална мастектомија	124	23	18,5	101	81,5

Кумулативното 5-годишно преживување без болест во групата со квадрант ресекција и со тотална мастектомија е 80,3% и 69,6% консеквентно.

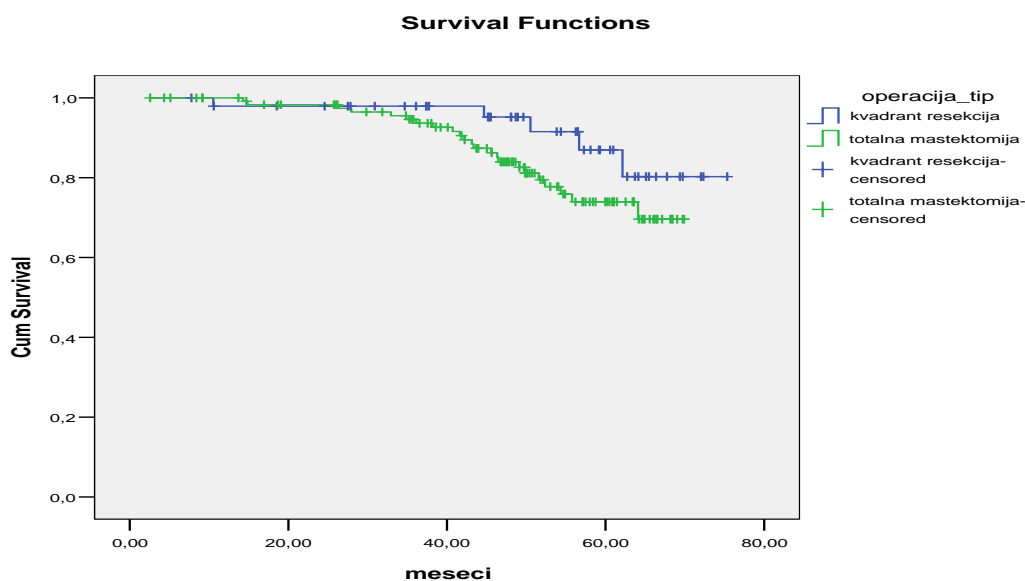
Резултатите од Log Rank тестот и вредноста на $p = 0,13$ покажуваат дека 5-годишното преживување без болест не зависи сигнификантно од видот на оперативна интервенција (табела 46а, слика 30).

Табела 46а. DFS – тип на оперативна техника

Оперативна техника	DFS	(SE)
квадрант ресекција	80,3 %	0,087
тотална мастектомија	69,6 %	0,06

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 2,28 df=1 p = 0,13 NS

Слика 30 Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / тип на оперативна техника



4.3.3. Преживување без болест во однос на морфолошките и хистолошките параметри

Анализата за DSF во однос на големината на туморот беше направена за карциноми со дијаметар до 2 cm и помали, и карциноми со дијаметар поголем од 2 cm. Рецидивирале 13,23% карциноми со дијаметар 2 cm и помали, и 24,76% карциноми поголеми од 2 cm (табела 47).

Табела 47. Дистрибуција рецидив / без рецидив – Ту дијаметар

Ту дијаметар (cm)	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
<=2	68	9	13,23	59	86,76
>2	105	26	24,76	79	75,24

Анализата пак на Kaplan-Meier-овата крива на преживување покажува дека големината на карциномот на дојка има сигнификантно влијание на должината на преживување без болест ($p = 0,034$), како резултат на значајно подолго 5-годишно преживување без болест во групата пациентки со помала големина на карциномот. 5-годишната DFS стапка за карциноми со големина од 2 сантиметри и помали, и за карциноми поголеми од 2 сантиметри изнесува 86,3% и 63,9% консеквентно (табела 47а, слика 31).

Табела 47а. DFS – Ту дијаметар

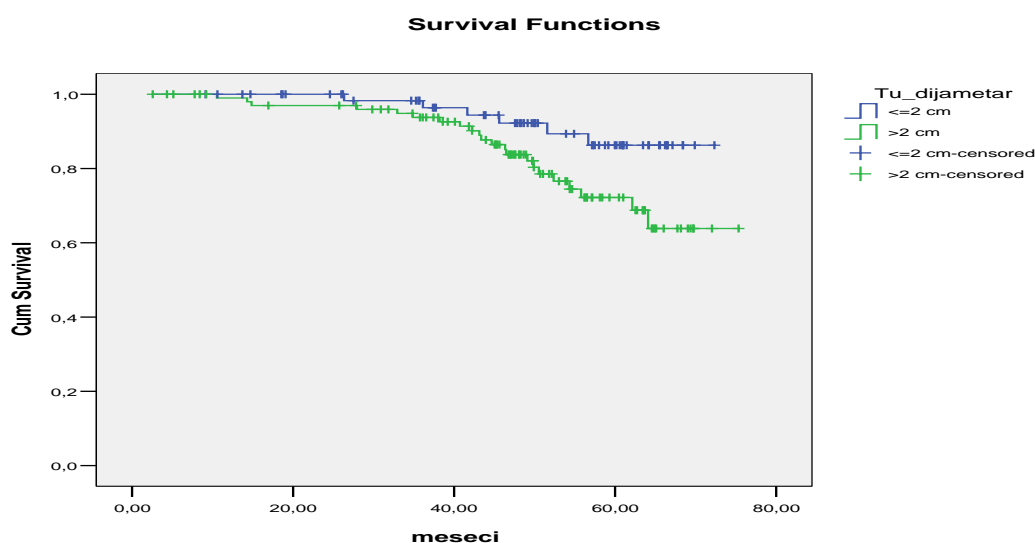
Ту дијаметар (cm)	DFS	(SE)
<=2	86,3%	0,054
>2	63,9%	0,075

тестирани разлики

Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 4,47 df=1 $p = 0,034^*$

* $p < 0,05$

Слика 31. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / Ту дијаметар



Во анализата за преживување без болест, туморскиот статус го поделивме во 2 групи, односно во првата група беа земени туморите кои според параметрите на постоперативната класификација спаѓаат во група I и II, и во оваа група процентот на рецидиви е 17,5%, додека во втората група се вклучени туморите со статус III и IV, со процент на рецидиви од 42,1% (табела 47б).

Табела 47б. Дистрибуција рецидив / без рецидив – Ту статус

Ту статус	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
I и II	154	27	17,5	127	82,5
III и IV	19	8	42,1	11	57,9

Kaplan-Meier - овата анализа покажува дека за $p = 0,007$, пациентките со туморски статус I и II имаат сигнификантно подолго време на преживување во споредба со пациентките со туморски статус III и IV (табела 47в, слика 31а)

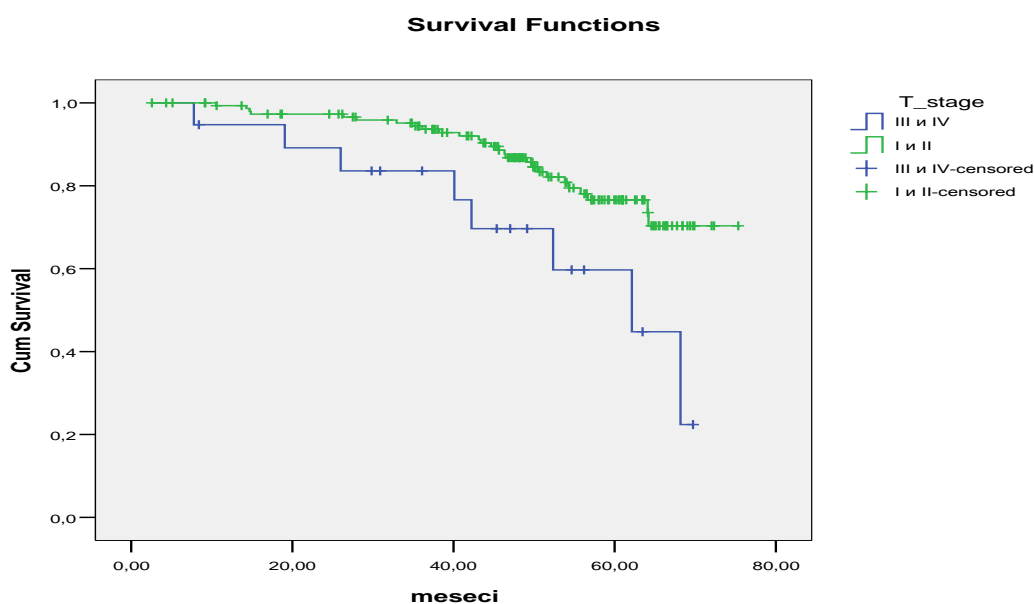
Табела 47в. DFS – Ту статус

Ту статус	DFS	(SE)
I и II	70,6 %	0,058
III и IV	22,4 %	0,178

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) $\chi^2 = 7,314$ $df=1$ $p = 0,007^{**}$

* $p < 0,01$

Слика 31а. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / туморски статус



Кај 16,7% пациентки со негативен лимфонодален статус и кај 22,8% со позитивен лимфонодален статус, во анализираниот постоперативен период од 5 години детектирана е појава на локални или оддалечени метастази (табела 48).

Табела 48. Дистрибуција рецидив / без рецидив – N0 vs N1, N2, N3

Лимфонодален статус	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
негативен	72	12	16,7	60	83,3
позитивен	101	23	22,8	78	77,2

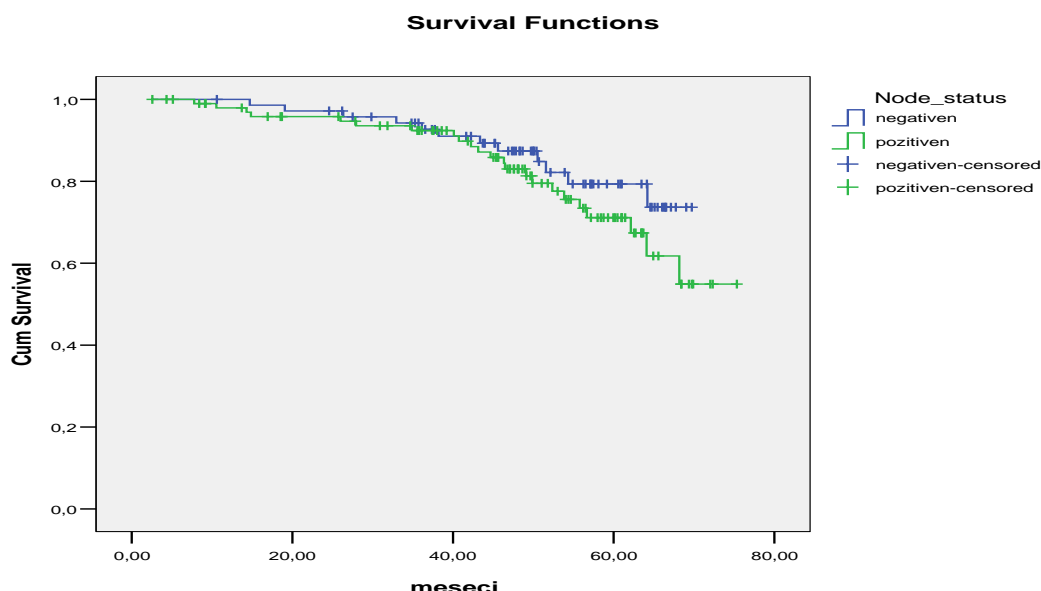
Проценката за 5-годишно DFS изнесува 73,7% во групата со негативен лимфонодален статус и 54,9% во групата со позитивен лимфонодален статус. Двете групи не се разликуваат сигнификантно во времето на преживување ($p = 0,257$) (табела 48а, слика 32).

Табела 48а. DFS – лимфонодален статус

Лимфонодален статус	DFS	(SE)
негативен	73,7 %	0,077
позитивен	54,9 %	0,097

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 1,287 df=1 p = 0,26 NS

Слика 32. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / лимфонодален статус



Статусот на лимфонодалниот однос го анализиравме во 4 групи, како добар со процент на метастатска болест од 13,7%, умерен со процент од 29,2%, лош со процент од 26,7%, и многу лош со висок процент на појава на метастази од 47,1% (табела 49).

Табела 49. Дистрибуција рецидив / без рецидив – лимфонодален однос

Лимфонодален однос	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
Добар(0-0,25)	117	13,7	101	86,3
Умерен(0,25-0,5)	24	29,2	17	70,8
Лош(0,5-0,75)	15	26,7	11	73,3
многу лош(0,75-1)	17	47,1	9	52,9

Кумулативното 5-годишно преживување без болест изнесува 71,4% во групата со добар лимфонодален статус, 62,5% во групата со умерен лимфонодален статус, 49% во групата со лош лимфонодален статус, додека во групата со многу лош лимфонодален статус стапката на ова преживување е 0%.

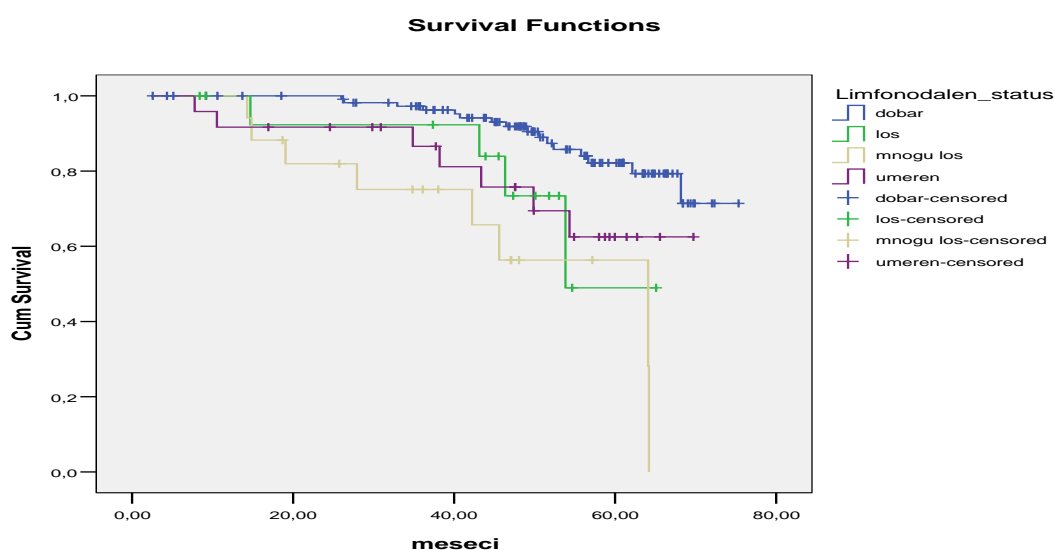
Табела 49а. DFS – лимфонодален однос

Лимфонодален однос	DFS	(SE)
добар	71,4 %	0,088
умерен	62,5 %	0,116
лош	49 %	0,219
многу лош	0 %	

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 22,064 df=3 p = 0,000** p<0,01

Групите на пациентки, поделени врз основа на статусот на лимфонодалниот однос, или односот меѓу извадени и позитивни лимфни јазли, високо сигнификантно се разликуваат во однос на времето на преживување (Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 22,064 df=3 p<0,01). Високо значајно подобро 5-годишно преживување без болест имаат пациентките со добар лимфонодален однос (табела 49а, слика 33).

Слика 33. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / лимфонодален однос



Во истражувањето се вклучени пациентки со рак на дојка во прв, втор и трет стадиум на болест, во кои процентот на релапси изнесува 8,5%, 18,7% и 33,3% консеквентно (табела 50).

Табела 50. Дистрибуција рецидив / без рецидив – стадиум

Стадиум	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
I	47	4	8,5	43	91,5
II	75	14	18,7	61	81,3
III	51	17	33,3	34	66,7

Стапката на 5-годишно преживување без болест е највисока во групата со стадиум I – 87,9% , пониска е во групата со стадиум II – 56,2%, и најниска стапка се регистрира во групата во која болеста е дијагностицирана во стадиум III – 35,7%.

Табела 50а. DFS – стадиум

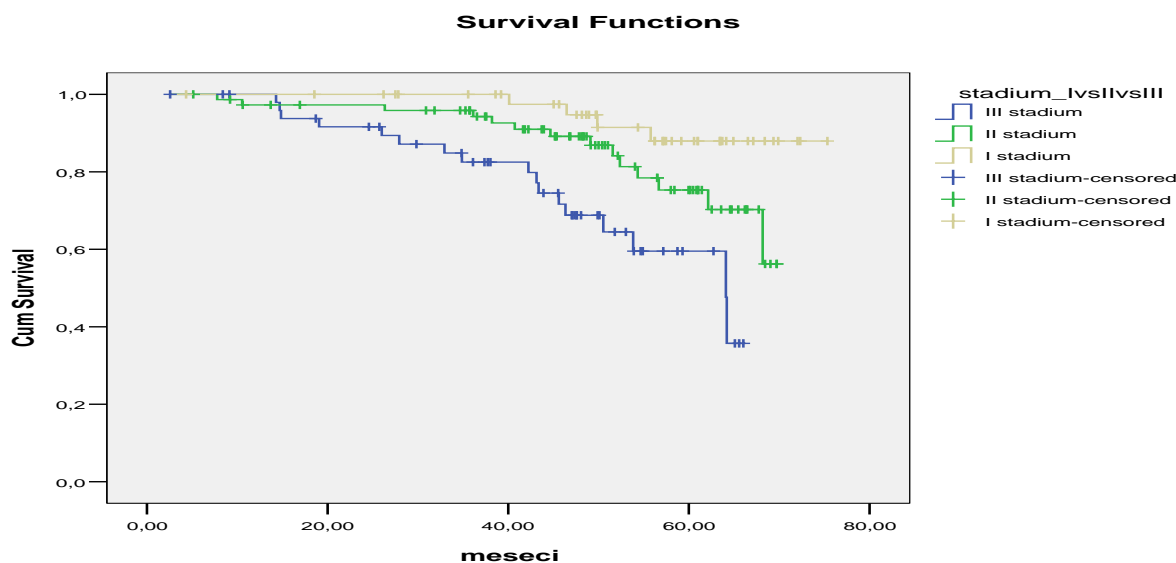
Стадиум	DFS	(SE)
I	87,9 %	0,057
II	56,2 %	0,14
III	35,7 %	0,14

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 16,023 df=2 p = 0,000**

**p<0,01

Статистичката анализа, базирана на Kaplan-Meier анализата, разликите во 5-годишно DFS меѓу пациентките со прв, втор и трет стадиум, ги потврди како високо сигнификантни (Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 16,023 df=2 p < 0,001). Стадиумот на болест има високо сигнификантно влијание на ова преживување, кое е најдолго кога болеста е откриена во прв стадиум (табела 50а, слика 34)

Слика 34. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / стадиум на болест



Дистрибуцијата прикажана во табела 51 покажува дека најмал процент на рецидиви – 13,05% е регистриран во групата карциноми во која процентот на тубули е над 75%.

Табела 51. Дистрибуција рецидив / без рецидив – тубули

Тубули	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
под 10%	93	20	21,51	73	78,49%
10 – 75%	57	12	21,06	45	78,94%
над 75%	23	3	13,05	20	86,95%

Табела 51а. DFS – тубули

Тубули	DFS	(SE)
под 10%	90 %	0,057
10 – 75%	71,4 %	0,081
над 75%	67,5 %	0,085

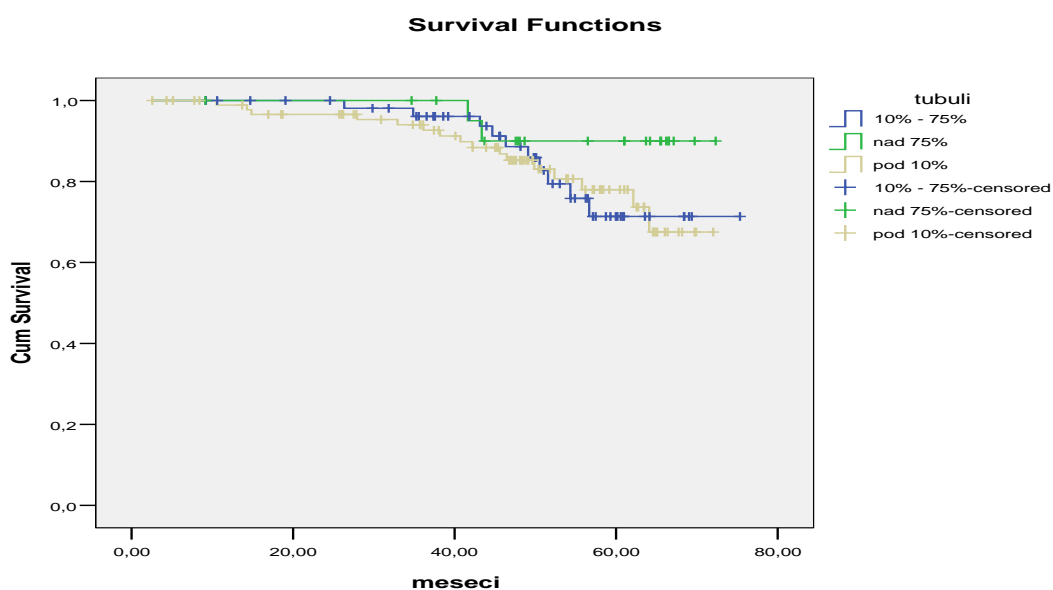
тестирани разлики

Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 1,99 df=2 p = 0,37 NS

Стапката на кумулативно преживување без болест е повисока во групата со процент на формирани тубули под 10% во однос на другите две групи во кои процент на формирани тубули е поголем.

Трите формирани групи пациентки со различен процент на тубули имаат несигнификантно различно преживување без појава на метастази (табела 51а, слика 35).

Слика 35. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / процент на тубули



Во групата пациентки кај кои нуклеарниот градус се манифестира со униформни јадра, по 5 години од оперативната интервенција кај 16,67% се јавил

рецидив, во групата пациентки со умерен плеоморфизам процентот на рецидиви е 18,9%, додека во групата со изразен анапластицитет процентот на пациентки со рецидив е највисок – 27,08% (табела 52).

Табела 52. Дистрибуција рецидив / без рецидив – нуклеарен градус

Нуклеарен градус	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
униформни јадра	30	5	16,67	25	83,33
умерен плеоморф.	95	17	18,9	78	81,1
анапластицитет	48	13	27,08	35	72,92

Кумулативната стапка на преживување без болест, за период од 5 години по оперативната интервенција изнесува 84,3% во групата со униформни јадра, 72,6% во групата со умерен плеоморфизам, и најниска е во групата со изразен анапластицитет од 60,7%.

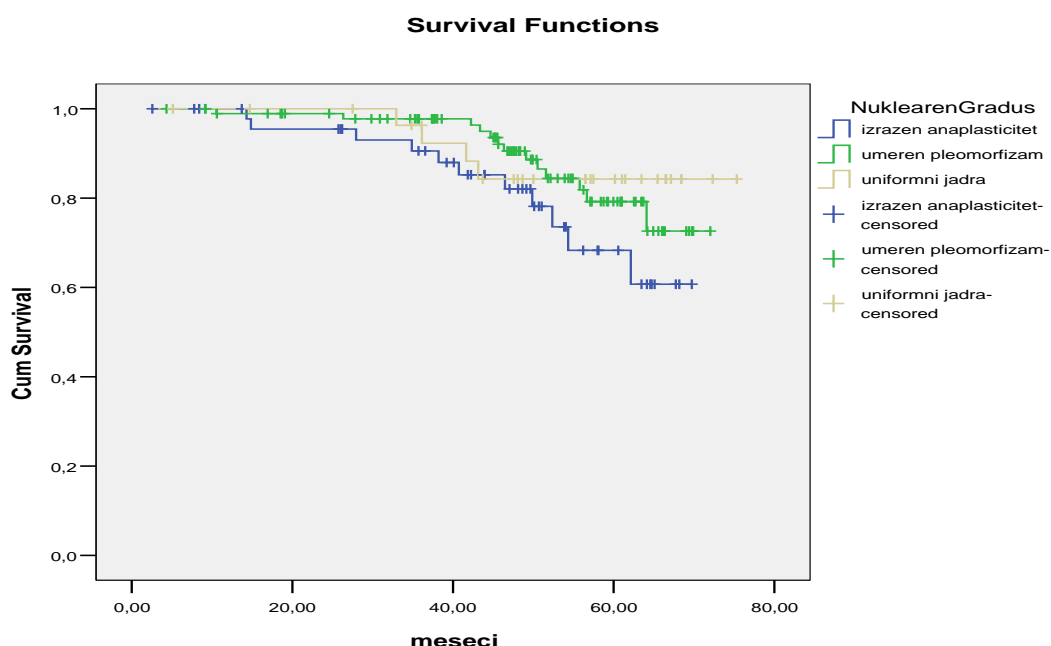
Разликата во 5-годишно DFS, во зависност од видот на нуклеарен градус (униформни јадра, умерен плеоморфизам, изразен анапластицитет) статистички е несигнификантна, односно незначајна ($p = 0,21$), (табела 52а, слика 36).

Табела 52а. DFS – нуклеарен градус

Нуклеарен градус	DFS	(SE)
униформни јадра	84,3 %	0,057
умерен плеоморф.	72,6 %	0,082
анапластицитет	60,7 %	0,1

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 3,13 df=2 p = 0,21 NS

Слика 36. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / нуклеарен градус



Табела 53 ја прикажува дистрибуцијата на зачестеноста на јавување на рецидив, во зависност од митотскиот индекс. Најмал процент на повторна појава на болест во период од 5 години по интервенцијата – 10,3%, се регистрира во групата во која митотскиот индекс се манифестира со број на митози до 5.

Табела 53. Дистрибуција рецидив / без рецидив – митотски индекс

Митотски индекс	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
до 5 митози	39	4	10,3	35	89,7%
6 – 10 митози	51	8	15,7	43	84,3%
над 10 митози	83	23	27,7	60	72,3%

Кумулативното 5-годишно преживување без болест изнесува во трите групи 83,3%, 64,9% и 47,4% консеквентно.

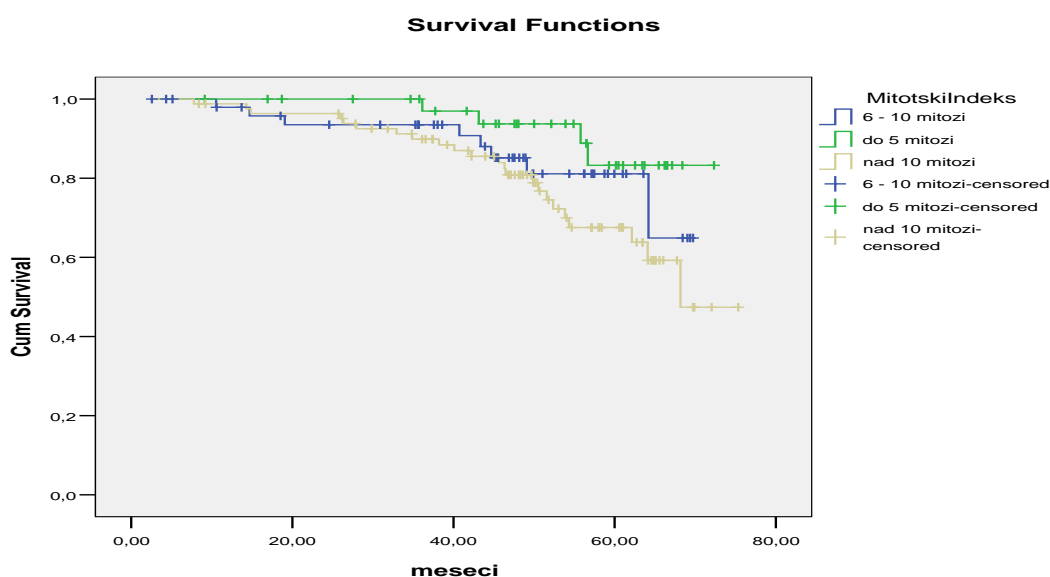
Резултатите од Log Rank тестот и вредноста на $p = 0,078$ покажуваат дека во групата со митотски индекс до 5 митози времето на преживување е несигнификантно подолго (табела 53а, слика 37).

Табела 42а. DFS – митотски индекс

Митотски индекс	DFS	(SE)
до 5 митози	83,3 %	0,08
6 – 10 митози	64,9 %	0,155
над 10 митози	47,4 %	0,123

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 5,09 df=2 $p = 0,08$

Слика 37. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / митотски индекс



Процентот на регистрирани локални или оддалечени метастази, во период од 5 години по хируршката интервенција е најмал во групата со G1 степен на хистолошка

диференцијација – 15,2%, а најголем е во групата со G3 степен на хистолошка диференцијација – 25,7% (табела 54).

Табела 54. Дистрибуција рецидив / без рецидив – хистолошка диференцијација

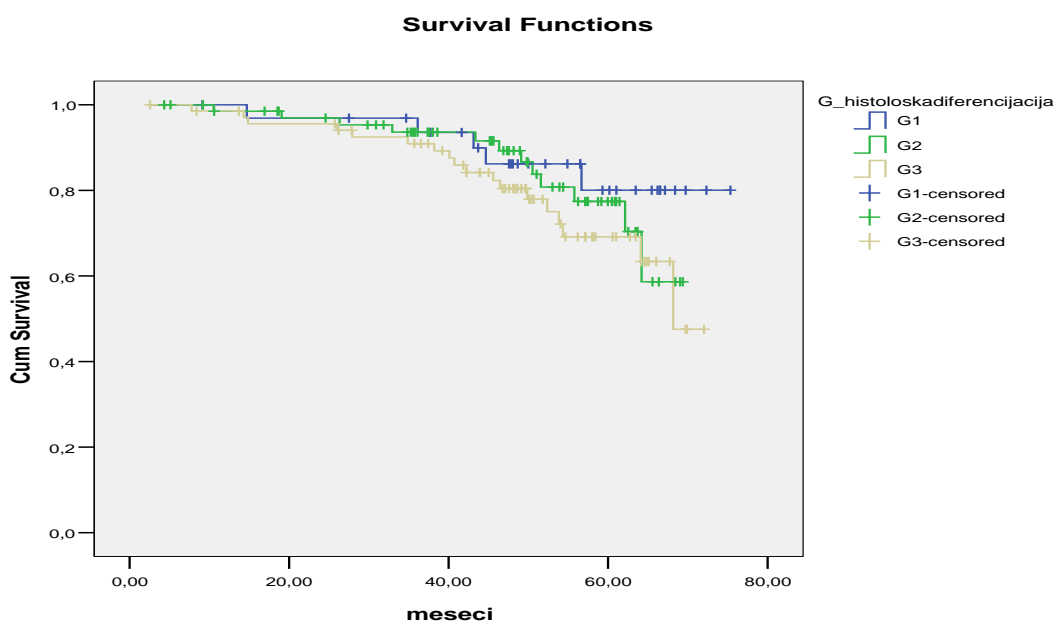
Хистолошка диференцијација	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
G1	33	5	15,2	28	84,8
G2	70	12	17,1	58	82,9
G3	70	18	25,7	52	74,3

Табела 54а DFS – хистолошка диференцијација

Хистолошка диференцијација	DFS	(SE)
G1	80 %	0,08
G2	58,6 %	0,13
G3	47,5 %	0,15

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 2,385 df=2 p = 0,3

Слика 38. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / хистолошка диференцијација



Во табела 54а и слика 38, прикажан е процентот на кумулативното 5-годишно преживување без болест и вредноста на стандардната грешка, во зависност од степенот на хистолошка диференцијација на карциномот.

Статистичката анализа разликата во времето на преживување ја потврди како несигнификантна, односно незначајна ($p = 0,3$).

Пациентките со карцином на дојка кои се вклучени во истражувањето, беа поделени во 4 групи во однос на вредноста на нотингемскиот прогностички индекс, и за секоја група во табела 54 прикажан е бројот и процент на пациентки кај кои болеста

повторно се јавила во период од 5 години по операцијата. Како што се забележува од прикажаните резултати, во групата со добар нотингемски индекс 10,0% пациентки имале рецидив, додека во групата со многу лош индекс, тој процент е највисок и изнесува 29% (табела 55).

Табела 55. Дистрибуција рецидив / без рецидив – нотингемски индекс

Нотингемски индекс	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
добар	20	2	10,0	18	90,0
умерен	32	6	18,7	26	81,3
лош	59	9	15,3	50	84,7
многу лош	62	18	29,0	44	71,0

Kaplan-Meier анализата презентира преживување без болест за анализираниот период од 87,4% во групата со добар нотингемски индекс, 67,4% во групата со умерен, 61,6% во групата со лош, и 45,6% во групата со многу лош нотингемски индекс.

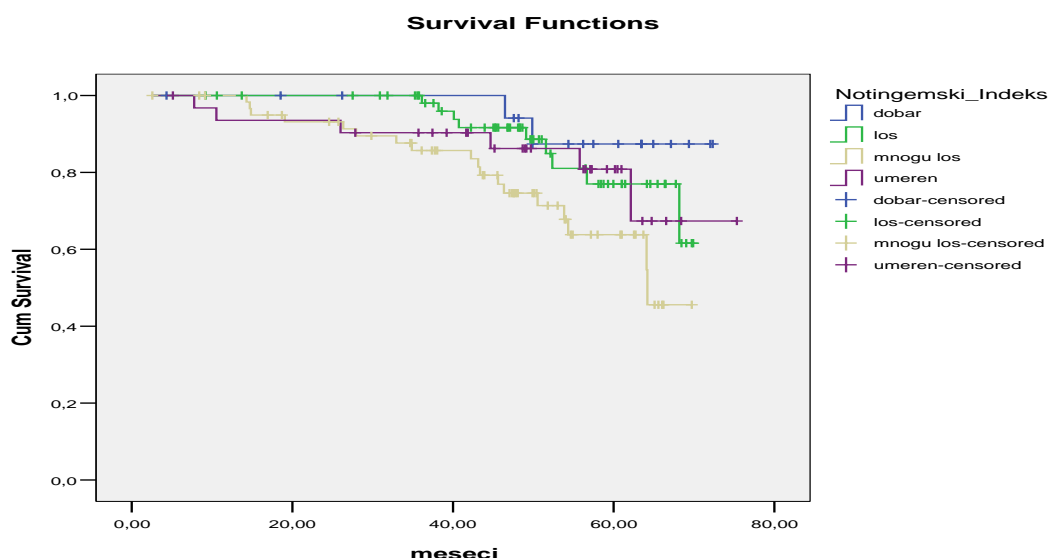
Вредноста на Log Rank тестот и $p = 0,042$, потврдуваат дека нотингемскиот индекс има сигнификантно влијание на 5-годишното преживување без болест. Пациентките со добар, умерен, лош и многу лош нотингемски индекс имаат значајно различно 5-годишно преживување без болест (табела 55a, слика 39).

Табела 55a. DFS – нотингемски индекс

Нотингемски индекс	DFS	(SE)
добар	87,4 %	0,084
умерен	67,4 %	0,14
лош	61,6 %	0,15
многу лош	45,6 %	0,123

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) $\chi^2 = 8,222$ $df=3$ $p = 0,042^*$

Слика 39. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / нотингемски индекс



Во групата пациентки со ресекциони маргини во здраво, релапс на болеста е регистриран кај 18,2%, додека во групата во која се зафатени ресекционите маргини, процентот на релапси изнесува 27,8% (табела 56).

Табела 56. Дистрибуција рецидив / без рецидив – ресекциони маргини

Ресекциони маргини	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
во здраво	137	25	18,2	112	81,8
зафатени	36	10	27,8	26	72,2

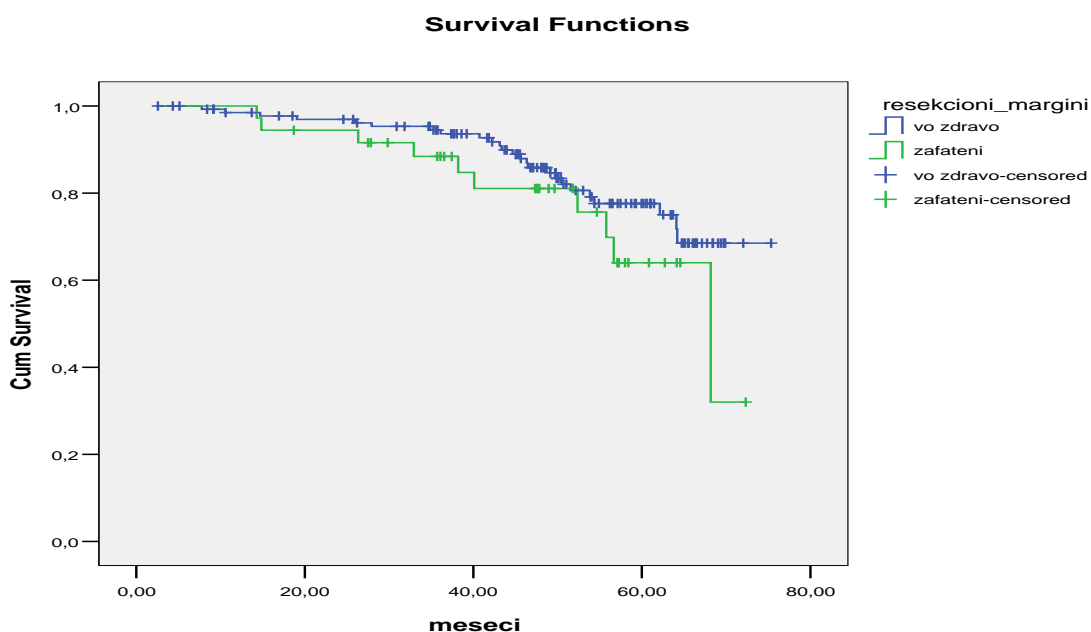
Пациентките со карцином на дојка и ресекциони маргини во здраво или зафатени имаат несигнификантно различно 5-годишно DFS ($p = 0,18$), (табела 56а, слика 40).

Табела 56а. DFS – ресекциони маргини

Ресекциони маргини	DFS	(SE)
во здраво	68,5 %	0,063
зафатени	32,0 %	0,232

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 1,789 df=1 p = 0,18

Слика 40. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / ресекциони маргини



Емболизацијата во лимфатици е поврзана со рецидив кај 22,8% пациентки со рак на дојка, и со стапка на 5-годишно преживување без болест од 47,4% со стандардна грешка од 0,059 (табела 57).

Табела 57. Дистрибуција рецидив / без рецидив – емболизација во лимфатици

Емболизација лимфатици	во N	Рецидиви		Без рецидив	
		N	%	N	%
нема	50	7	14	43	86,0
има	123	28	22,8	95	77,2

Табела 57а. DFS – емболизација во лимфатици

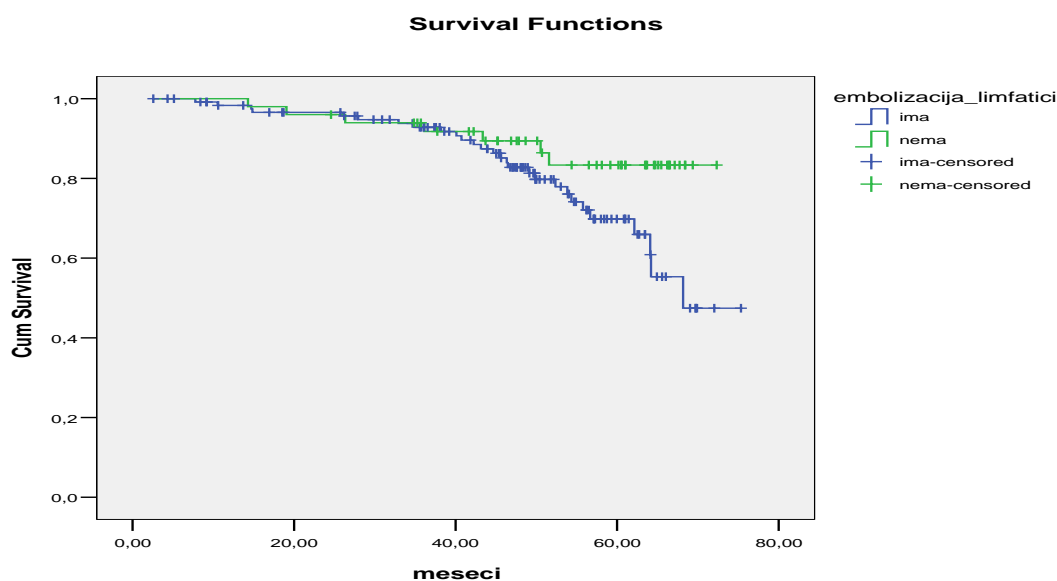
Емболизација лимфатици	во DFS	(SE)
нема	83,4 %	0,059
има	47,4 %	0,1

тестирани разлики

Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 3,715 df=1 p = 0,054

Пациентките со лимфна емболизација имаат несигнификантно пократко време на преживување без болест, 5 години по оперативната интервенција, споредено со пациентките без лимфна емболизација (p = 0,054), (табела 57а, слика 41).

Слика 41. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / емболизација во лимфатици



Емболизацијата пак во крвни садови е поврзана со рецидив кај 26,2% пациентки со рак на дојка, и со стапка на 5-годишно преживување без болест од 38,9% со стандардна грешка од 0,17 (табела 58).

Табела 58. Дистрибуција рецидив / без рецидив – емболизација во крвни садови

Емболизација крвни садови	во N	Рецидиви		Без рецидив	
		N	%	N	%
нема	131	24	18,3	107	81,7
има	42	11	26,2	31	73,8

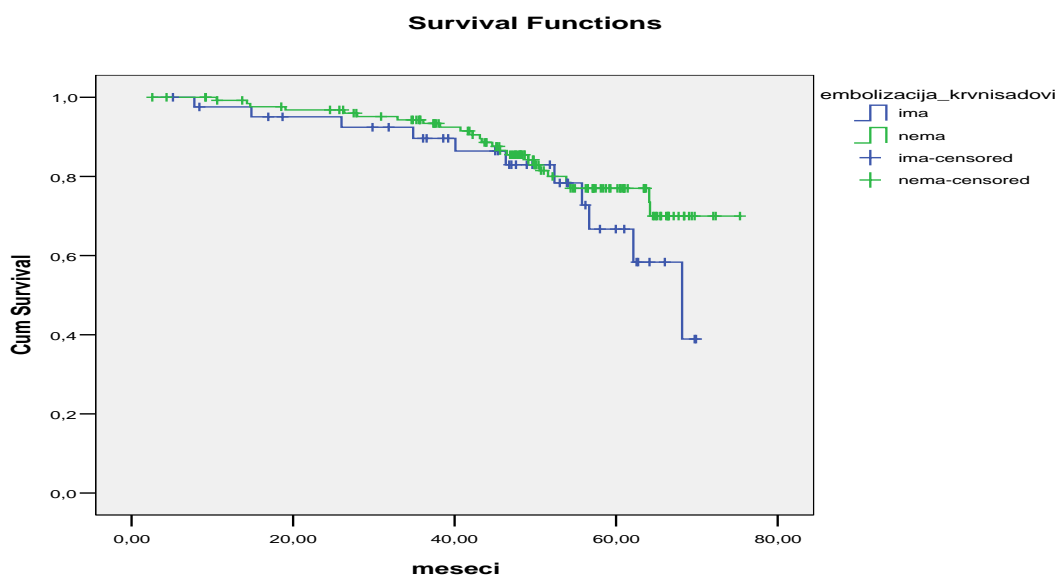
Пациентките со васкуларна емболизација имаат несигнификантно пократко време на преживување без болест, 5 години по оперативната интервенција, споредено со пациентките без емболизација во крвни садови ($p = 0,231$), (табела 58а, слика 42)

Табела 58а. DFS – емболизација во крвни садови

Емболизација на крвни садови	DFS	(SE)
нема	70 %	0,06
има	38,9 %	0,17

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 1,436 df=1 p = 0,23 NS

Слика 42. Kaplan-Meier за DSF (disease – free survival) / емболизација во крвни садови



Процентот на рецидиви во зависност од инфламаторниот инфилтрат изнесува 19,5% во групата со слаб, односно оскуден лимфоцитарен инфилтрат, 25,6% во групата со умерен, до 12,5% во групата со обемен инфилтрат (табела 59).

Табела 59. Дистрибуција рецидив / без рецидив – Лимфоцитарен инфилтрат

Лимфоцитарен инфилтрат	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
слаб	118	23	19,5	95	80,5
умерен	39	10	25,6	29	74,4
обемен	16	2	12,5	14	87,5

Проценките за 5-годишно DFS во групата со слаб, умерен и обемен лимфоцитарен инфилтрат изнесуваат 62,9%, 56,7% и 42,9% консеквентно.

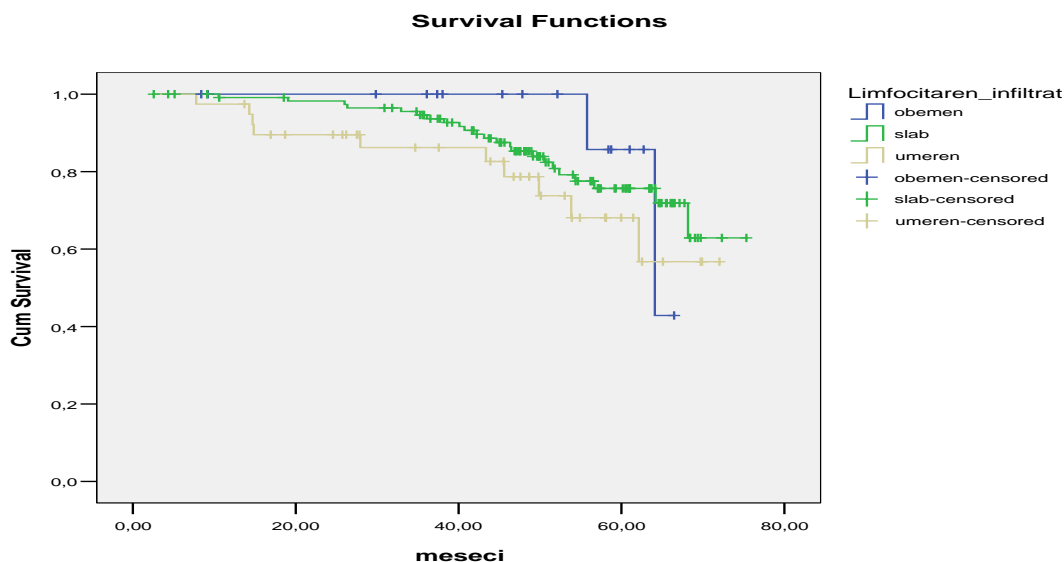
Во анализата за 5-годишно DFS, лимфоцитарниот инфламаторен инфилтрат се покажа како несигнификантен фактор за преживување ($p = 0,349$), (табела 59а, слика 43).

Табела 59а. DFS – лимфоцитарен инфилтрат

Лимфоцитарен инфилтрат	DFS	(SE)
слаб	62,9 %	0,099
умерен	56,7 %	0,13
обемен	42,9 %	0,31

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 2,103 df=2 p = 0,35 NS

Слика 43. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / лимфоцитарен инфилтрат



Во анализираниот период од 5 години постоперативно, кај 15,6% карциноми без некроза и 33,3% со некроза дошло до повторно јавување на болеста (табела 60).

Табела 60. Дистрибуција рецидив / без рецидив – туморска некроза

Туморска некроза	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
нема	128	15,6	108	84,4
има	45	33,3	30	66,7

Резултатите од истражувањето презентираат стапка на 5-годишно DFS, за карциномите без некроза и карциномите со некроза од 63,5% и 57,7% консеквентно.

Тестираната разлика во 5-годишно преживување без болест, меѓу групата без некроза и со некроза, статистички е сигнификантна ($p = 0,031$). Во групата без туморска некроза

се регистрира значајно подолго време на DFS компарирано со групата со некроза (табела 60а, слика 44).

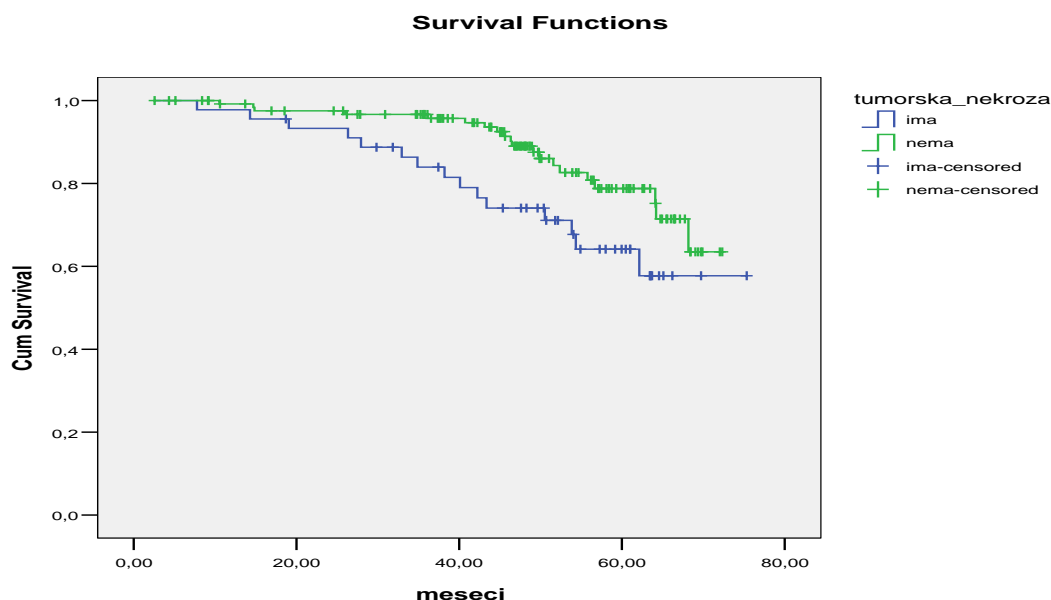
Табела 60а. DFS – туморска некроза

Туморска некроза	DFS	(SE)
нема	63,5 %	0,095
има	57,7 %	0,094

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 4,635 df=1 p = 0,031*

*p<0,05

Слика 44. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / туморска некроза



Во оваа група на пациентки со карцином на дојка, процентот на рецидиви е речиси идентичен во групата без и со дезмопластична реакција на строма (20%, 20,4%), (табела 61).

Табела 61. Дистрибуција рецидив / без рецидив – дезмопластична реакција на строма

Дезмопластична реакција на строма	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
нема	60	20	48	80,0
има	113	20,4	90	79,6

Анализата на Kaplan-Meier покажува дека присуството на дезмопластична реакција на строма, резултира со несигнификантно полошо преживување, односно пократко 5-годишно преживување без болест (p = 0,798).

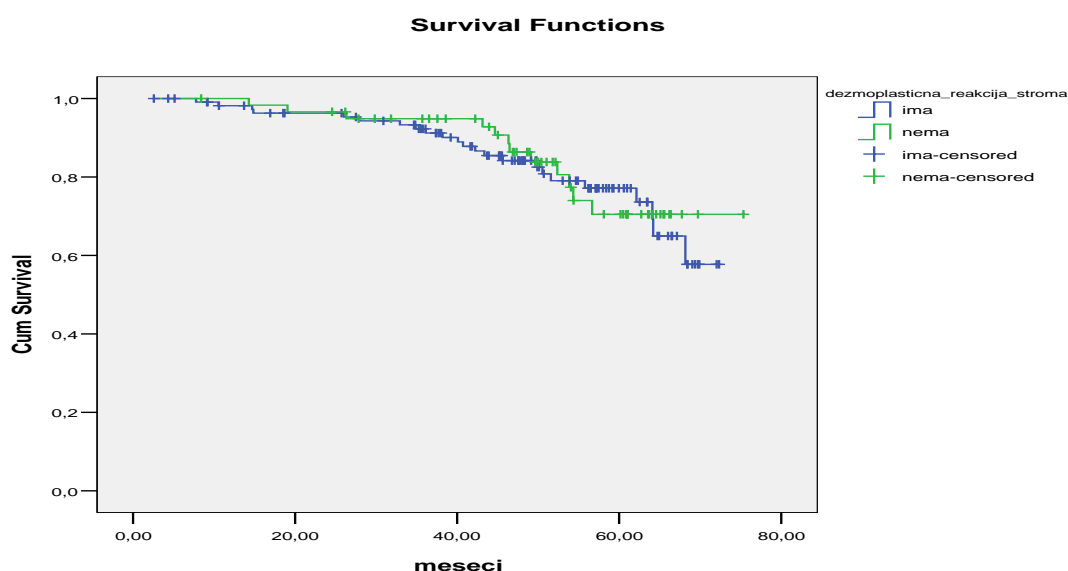
Стапката на DFS за групата пациентки без дезмопластична реакција на строма и со ваква реакција изнесува 70,5% и 57,7% консеквентно (табела 61а, слика 45).

Табела 61а. DFS – дезмопластична реакција на строма

Дезмопластична реакција на строма	DFS	(SE)
нема	70,5 %	0,076
има	57,7 %	0,096

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,066 df=1 p = 0,798 NS

Слика 45. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / дезмопластична реакција на строма



Присуството на еластоза е асоцирана со рецидив кај 20,8 % пациентки со рак на дојка, и со стапка на 5-годишно преживување без болест од 55,9% со стандардна грешка од 0,09 (табела 62).

Табела 62. Дистрибуција рецидив / без рецидив – еластоза

Еластоза	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
нема	120	20	96	80,0
има	53	20,8	42	79,2

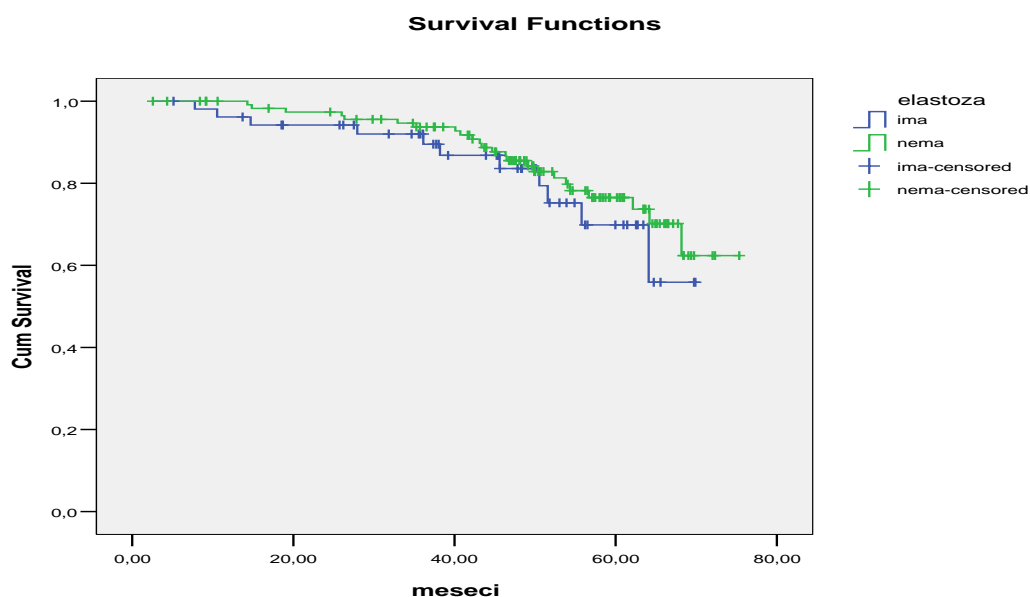
Пациентките со карцином на дојка со еластоза во туморското ткиво, имаат несигнификантно пократко време на преживување без болест, 5 години по оперативната интервенција, споредено со пациентките без еластоза (p = 0,418). (табела 62а, слика 46).

Табела 62а. DFS – еластоза

Еластоза	DFS	(SE)
нема	62,4 %	0,091
има	55,9 %	0,14

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,656 df=1 p = 0,42 NS

Слика 46. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / еластоза



Калцификати се детектирани кај 64 пациентки , при што кај 14 од нив, односно кај 21,9% болеста повторно се јавила, во анализираниот период од 5 години постоперативно. Во групата од 109 пациентки без калцификати, рецидив се јавил кај 21, односно кај 19,3% (табела 63)

Табела 63. Дистрибуција рецидив / без рецидив – калцификати

Калцификати	Рецидиви			Без рецидив	
	N	N	%	N	%
нема	109	21	19,3	88	80,7
има	64	14	21,9	50	78,1

Процентата 5-годишна DFS стапка, во групата без калцификати е 67,2% со стандардна грешка од 0,07, додека во групата со калцификати е 50,7% со стандардна грешка од 0,16.

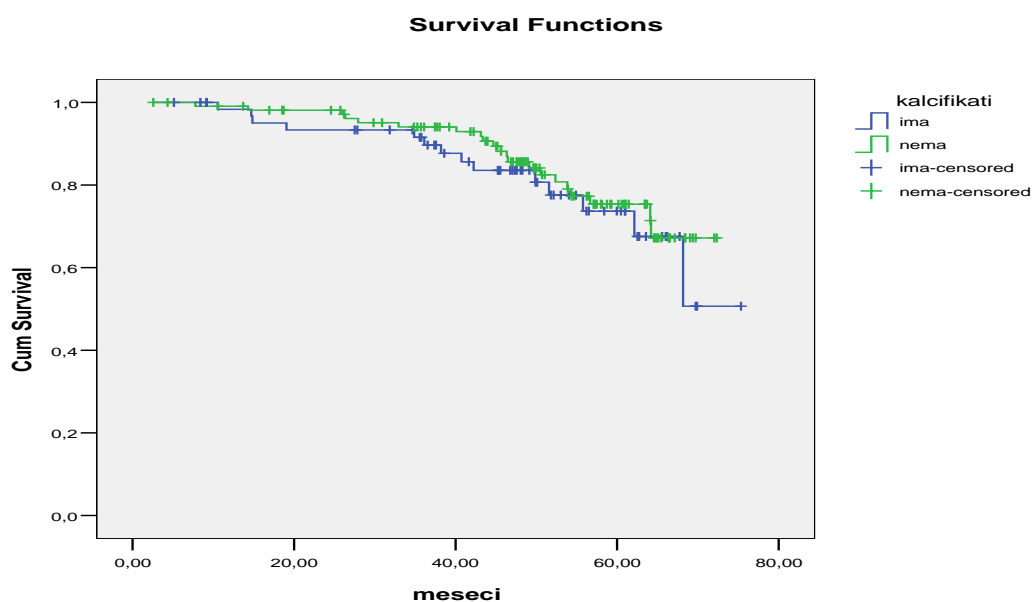
Присуството на калцификати, кај пациентките со карцином на дојка, дава незначајно пократко време на преживување без болест за период од 5 години (p = 0,496), (табела 63а, слика 47).

Табела 63а. DFS – калцификати

Калцификати	DFS	(SE)
нема	67,2 %	0,071
има	50,7 %	0,16

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,464 df=1 p = 0,496 NS

Слика 47. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / калцификати



4.3.4. Преживување без болест во однос на имунохистохемиските параметри

Процентуалниот дел на регистрирани рецидиви во групите со негативен и позитивен статус на естроген рецептор е подеднаков, и изнесува 20% (табела 64).

Табела 64. Дистрибуција рецидив / без рецидив – ER

ER	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
негативен	45	20	36	80,0
позитивен	125	20	100	80,0

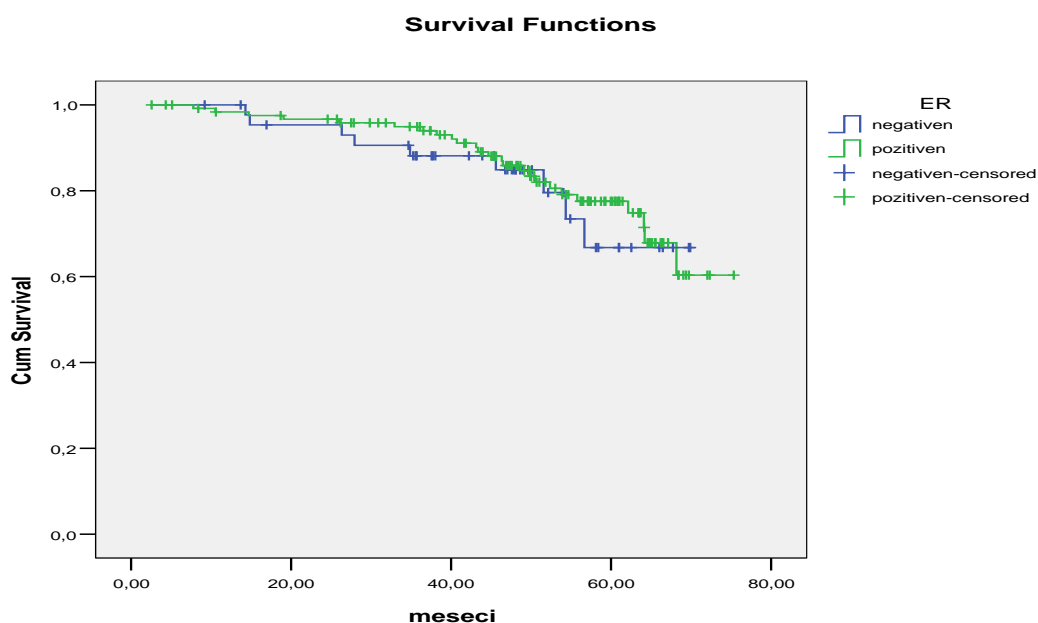
Групите пациентки со негативен и позитивен естроген рецептор имаат незначајно различно 5-годишно преживување без болест ($p = 0,645$), (табела 64а, слика 48).

Табела 64а. DFS – ER

ER	DFS	(SE)
негативен	66,8 %	0,1
позитивен	60,3 %	0,09

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,213 df=1 p = 0,645 NS

Слика 48. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / ER



Процентот на појавени релапси на болест, во првите 5 години по оперативната интервенција, во групата со негативен прогестеронски рецептор е 20%, додека во групата со позитивен статус на овој рецептор изнесува 20,4% (табела 65).

Табела 65. Дистрибуција рецидив / без рецидив – PR

PR	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
негативен	60	20,0	48	80,0
позитивен	113	20,4	90	79,6

Прогестеронскиот рецептор во ова истражување не се докажа како сигнификантен фактор за 5-годишно преживување без болест (p = 0,65).

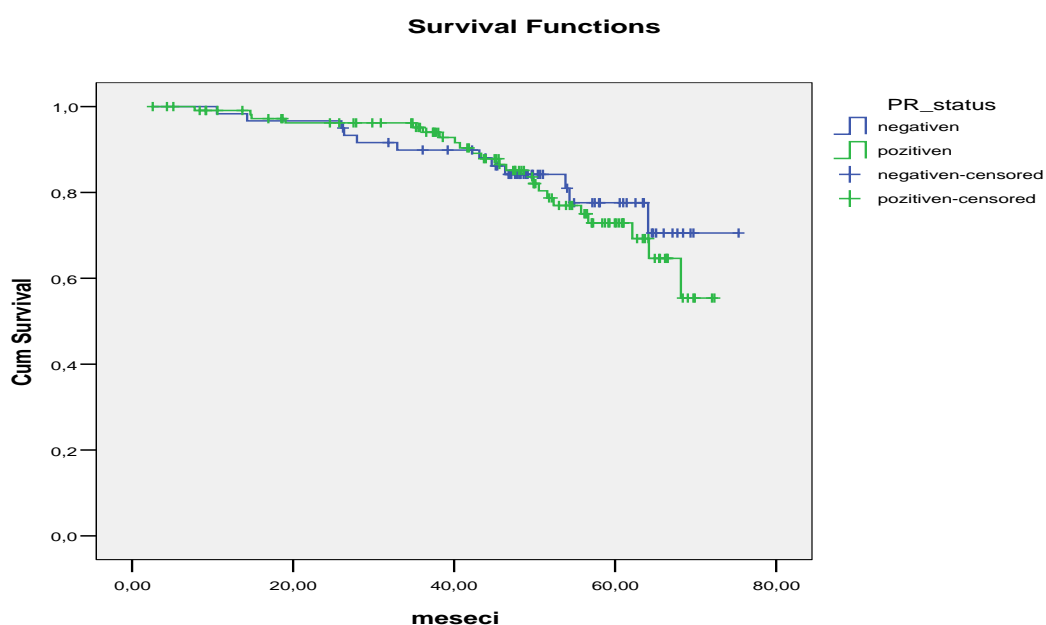
Групите со негативен и позитивен прогестеронски рецептор, имаат незначајно различно време на DFS за анализираниот период од 5 години (p = 0,65),(табела 65а, слика 49).

Табела 65а. DFS – PR

PR	DFS	(SE)
негативен	70,5 %	0,089
позитивен	55,4 %	0,1

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 0,206 df=1 p = 0,65 NS

Слика 49. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / PR



Во табела 66 прикажана е зачестеноста на релапси на рак на дојка кај пациентките со негативен и позитивен Ki-67. Во групата од 63 пациентки со Ki-67 понизок од 14%, кај 7 (11,1%) болеста рецидивирала во период од 5 години постоперативно. Во групата од 110 пациентки со Ki-67 повисок од 14%, рецидив се јавил кај 28 (25,5%).

Табела 66. Дистрибуција рецидив / без рецидив – Ki-67

Ki-67	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
негативен	63	7, 11,1	56	88,9
позитивен	110	28, 25,5	82	74,5

Процентата за 5-годишно преживување без болест во групата со негативен Ki-67 е 70,5%, додека во групата со позитивен Ki-67 изнесува 56,2%.

Анализата со методот на Kaplan-Meier го потврди степенот на пролиферативна активност на туморот, изразена преку Ki-67, како сигнификантен фактор за DFS за анализираниот период (p = 0,011). Пациентките со карцином на дојка со позитивна

биолошка агресивност на туморот, имаат значајно полошо, односно пократко 5-годишно преживување без болест, компарирано со пациентките со негативна биолошка туморска агресивност, (табела 66а, слика 50).

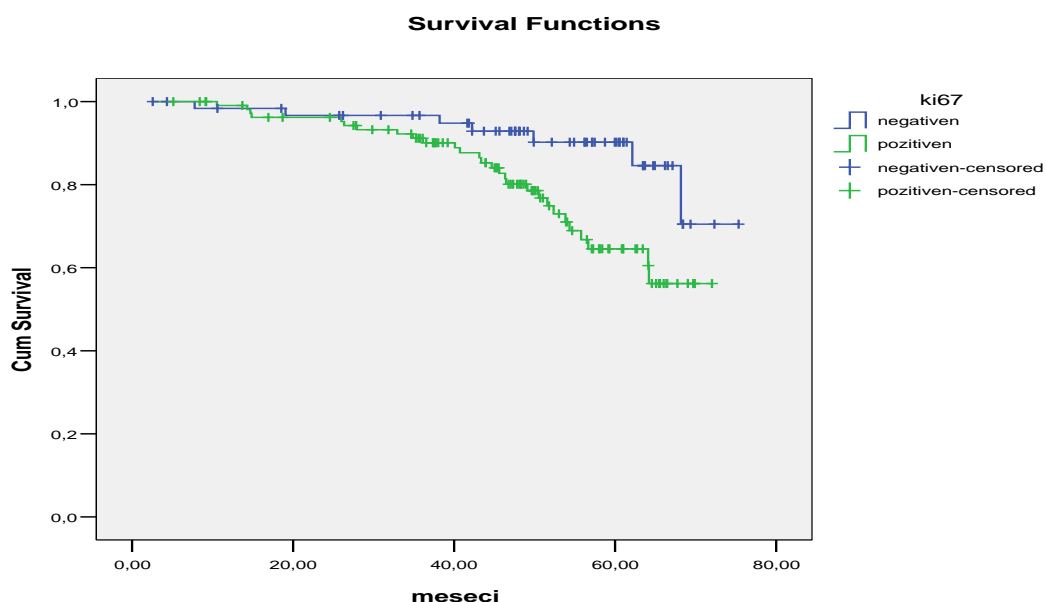
Табела 66а. DFS – Ki-67

Ki-67	DFS	(SE)
негативен	70,5 %	0,14
позитивен	56,2 %	0,076

тестирани разлики Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 6,448 df=1 p = 0,011*

*p<0,05

Слика 50. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / Ki-67



Позитивната експресија на тумор супресорски ген p53 е асоцирана со рецидив кај 27,7 % пациентки со рак на дојка, и со стапка на 5-годишно преживување без болест од 53,1% со стандардна грешка од 0,1 (табела 67)

Табела 67. Дистрибуција рецидив / без рецидив – p53

p53	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
негативен	126	17,5	104	82,5
позитивен	47	27,7	34	72,3

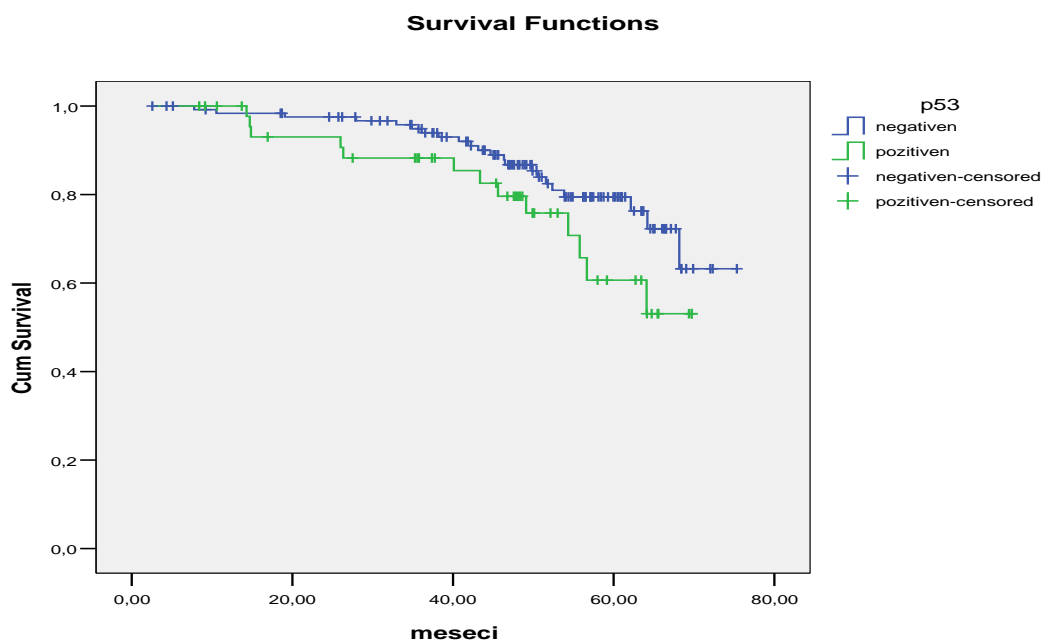
Пациентките со карцином на дојка со позитивен p53, имаат несигнификантно пократко време на преживување без болест, 5 години по оперативната интервенција, споредено со пациентките без експресија на овој ген (p = 0,093), (табела 67а, слика 51).

Табела 67а. DFS – p53

p53	DFS	(SE)
негативен	63,2 %	0,101
позитивен	53,1 %	0,111

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 2,830 df=1 p = 0,093 NS

Слика 51. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / P53



Табела 68 ја прикажува дистрибуцијата на зачестеноста на јавување на метастази, во зависност од експресија на херцептин. Во групата со негативен HER2+, процентот на повторна појава на болест во период од 5 години по интервенцијата е 17,4%, додека во групата со позитивен HER2+, процентот на повторна појава е 31,4%.

Табела 68. Дистрибуција рецидив / без рецидив – HER2+

HER2+	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
негативен	138	17,4	114	82,6
позитивен	35	31,4	24	68,6

Кумулативното 5-годишно преживување без болест изнесува во групата без и со експресија на херцептин 63,8% и 54,3% консеквентно.

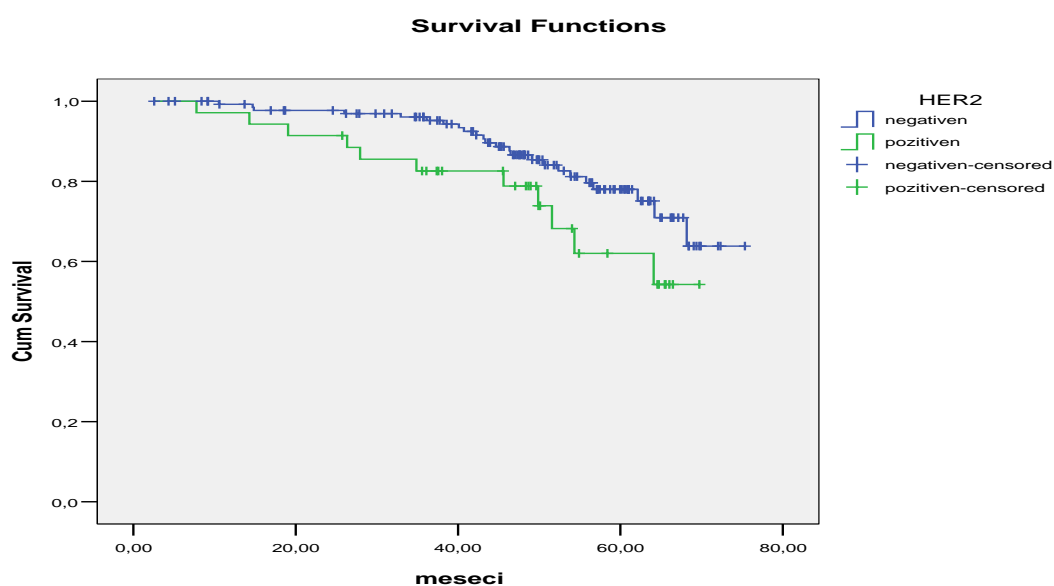
Резултатите од Log Rank тестот и вредноста на $p = 0,071$ покажуваат дека експресијата на херцептин, односно позитивниот HER2+ е асоцирана со несигнификантно подолго 5-годишно DFS, (табела 68а, слика 52).

Табела 68а. DFS – HER2+

HER2+	DFS	(SE)
негативен	63,8 %	0,088
позитивен	54,3 %	0,116

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 3,255 df=1 p = 0,071 NS

Слика 52. Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / HER2+



Табела 69 ја прикажува дистрибуцијата на зачестеноста на јавување на метастази, во зависност од експресија на онкопротеин bcl2. Во групата без експресија, процентот на повторна појава на болест во период од 5 години по интервенцијата е 20,7%, додека во групата со експресија на bcl2, процентот на повторна појава е 8,1%.

Табела 69. Дистрибуција рецидив / без рецидив – онкопротеин bcl2

bcl2	Рецидиви		Без рецидив	
	N	%	N	%
нема експресија	111	20,7	88	79,3
има експресија	62	8,1	57	91,9

Кумулативното 5-годишно преживување без болест во групата без експресија на bcl2 е 63,7%, додека во групата со експресија изнесува 54,3% консеквентно.

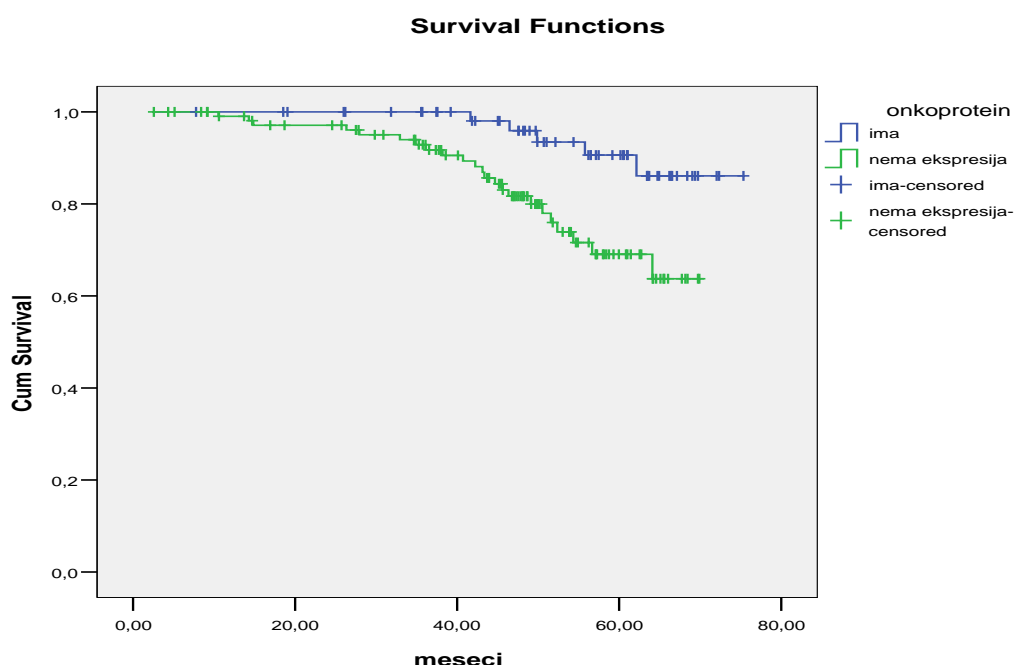
Резултатите од Log Rank тестот и вредноста на $p = 0,006$ покажуваат дека експресијата на онкопротеин bcl2 е асоцирана со сигнификантно подолго 5-годишно DFS (табела 69а, слика 53).

Табела 69а. DFS – HER2+

HER2+	DFS	(SE)
негативен	63,7 %	0,06
позитивен	86,7 %	0,06

тестирани разлики
Log Rank (Mantel-Cox) Chi = 7,601 df=1 p = 0,006** sig.

Слика 53 Kaplan-Meier за DFS (disease – free survival) / bcl2



4.3.5 Анализа на резултати од униваријантна и мултиваријантна Сох – ова анализа за DFS

Во табела 70 прикажани се резултатите од униваријантната Сох-ова регресиона анализа, за одредување на предиктивното влијание на анализираниите клинички патохистолошки параметри за disease-free survival (DFS).

Во оваа анализа, возраста на пациентките, големината на туморот, митотскиот индекс, туморскиот статус, туморската некроза, лимфонодалниот статус, Нотингемскиот прогностички индекс, стадиумот на болеста, пролиферативниот индекс Ki-67, и експресијата на онкопротеин bcl2 се потврдија како сигнификантни предиктори за DFS, односно предиктори за преживување без болест. Врз основа на вредноста на хазардниот однос (HR) и 95% Confidence Interval, може да се квантифицира ризикот од појава на рецидиви, односно локорегионални или далечни метастази за овие сигнификантни фактори, односно предиктори.

Пациентките на возраст постари од 40 години, имаат за 0,335 95% CI (0,111 – 0,989) пати значајно помал ризик од оние помлади од 40 години да го доживеат настанот, односно клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза.

Рак на дојка со дијаметар од 2 см и повеќе, за 2,563 95% CI (1,038 – 6,331) пати значајно го зголемува ризикот за појава на метастази.

Табела 70. Испитувани параметри во Соx-ова униваријантна анализа на време на преживување без болест (DFS)

варијабла	Disease-free survival			
	HR	95% CI	p-value	
возраст(години) <=40 vs >40	0,335	0,111 – 0,989	0,048*	
оперативна техника тот мас vs квад.рес.	2,076	0,788 – 5,469	0,139	
Ту дијаметар <=2 vs >2	2,563	1,038 – 6,331	0,041*	
Лимфонодален статус нег. vs поз.	1,497	0,742 – 3,018	0,260	
Лимфонодален однос	добар vs умерен	2,609	1,070 – 6,360	0,035*
	добар vs лош	2,898	0,957 – 8,774	0,060
	добар vs многу лош	6,151	2,596 – 14,574	0,000*
Стадиум	I vs II	2,742	0,901 – 8,348	0,076
	I vs III	3,678	2.212 – 10,164	0,001**
Тубули 10% vs 10 – 75%		2,655	0,578 – 12,198	0,209
	10% vs над75%	2,747	0,629 – 11,997	0,179
Нуклеарен градус – NG1 vs NG2		1,183	0,385 – 3,64	0,769
	NG1,2 vs NG3	2,206	0,7 – 6,945	0,176
Митотски индекс				
до 5 митози vs 6-10 митози	1,990	0,598 – 6,624	0,262	
до 5 митози vs > 10 митози	3,063	1,058 – 8,866	0,039*	
Хистолошка диференцијација G1 vs G2		1,495	0,524 – 4,264	0,452
	G1 vs G3	2,078	0,769 – 5,610	0,149
Нотингемски индекс	добар vs умерен	2,369	0,477 – 11,769	0,292
	добар vs лош	1,938	0,418 – 8,989	0,398
	добар vs многу лош	4,564	1,051 – 19,820	0,043*
Ресекциони маргини зафатени VS слободни	1,792	0,544 – 4,326	0,183	
Емболизација во лимфатици не vs да	2,225	0,966 – 5,124	0,060	
Емболизација на крвни садови не vs да	1,53	1,12 – 2,32	0,063	
Лимфоцитарен инфилтрат слаб vs умерен		1,625	0,772 – 3,42	0,201
	слаб vs обемен	0,724	0,17 – 3,078	0,662
Туморска некроза не vs да	2,059	1,052 – 4,030	0,035*	
Дезмопластична реакција не vs да	1,096	0,544 – 2,206	0,798	
Еластоза нема vs има	1,343	0,656 – 2,750	0,42	
Калцификати нема vs има	1,265	0,643 – 2,488	0,497	
ER нег. vs поз.	0,836	0,389 – 1,794	0,645	
PR нег. vs поз.	1,176	0,585 – 2,364	0,650	
Ki-67 нег. vs поз.	2,803	1,222 – 6,432	0,015*	
P53 нег. vs поз.	1,788	0,900 – 3,551	0,097	
HER2+ нег. vs поз.	1,913	0,934 – 3,919	0,076	
Bcl2 нег. vs поз.	0,278	0,105-0,735	0,01*	

*p<0,05 **p<0,01

Митотски индекс, со повеќе од 10 митози, дава 3,063 95% CI (1,058 – 8,866) пати сигнификантно поголем ризик за метастазирање на болеста, компарирано со митотски индекс со број на митози до 5, додека туморскиот статус од категориите T3 и T4 споредено со T1 и T2 го зголемува ризикот за 2,842 95% CI (1,288 – 6,273) пати.

Ракот на дојка со присутна некроза има за 2,059 95% CI (1,052 – 4,03) пати сигнификантно поголем ризик да даде регионална или оддалечена метастаза.

Лимфонодалниот индекс со умерен статус го зголемува ризикот за 2,609 95% CI (1,070 – 6,36) пати, а со многу лош статус за 6,151 95% CI (3,596 – 14,574) пати за метастазирање, споредено со добар статус на лимфонодален индекс. Многу лош Нотингемски прогностички индекс дава 4,564 95% CI (1,051 – 6,273) пати значајно поголем ризик за метастазирање на карцином на дојка, споредено со добар Нотингемски прогностички индекс.

Пациентките со карцином на дојка дијагностициран во стадиум III имаат за 3,678 95% CI (2,212 – 10,164) пати сигнификантно поголем ризик да добијат регионална или оддалечена метастаза во однос на пациентките со карцином на дојка во стадиум I.

Рак на дојка со пролиферативен индекс Ki-67 повисок од 14%, за 2,803 95% CI (1,222 – 6,432) пати сигнификантно го зголемува ризикот за метастазирање споредено со Ki-67 понизок од 14%.

Пациентките со експресија на bcl2, имаат за 0,278 95% CI (0,105 – 0,735) пати значајно помал ризик од оние без експресија да го доживеат настанот, односно клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза.

Сите клинички пато-хистолошки варијабли, кои во Униваријантната Сох-ова регресиона анализа се потврдија како сигнификантни предиктори за disease-free survival (DFS), ги ставивме во модел на Мултиваријантна Сох-ова регресиона анализа, за детерминирање на оние предиктори кои имаат независно сигнификантно влијание.

Резултатите презентирани во табела 71, покажуваат дека помала возраст, поголем туморски дијаметар, многу лош лимфонодален однос, стадиум III и позитивен Ki-67 статус претставуваат независни сигнификантни предиктори за DFS. Нотингемскиот прогностички индекс, односно неговиот модалитет многу лош, покажува тренд на независен сигнификантен предиктор за DFS.

Табела 71. Испитувани параметри во Сох-ова мултиваријантна анализа

варијабла	Disease-free survival			
	HR	95% CI	p-value	
возраст(години) <=40 vs >40	0,36	0,138 – 0,936	0,036*	
Ту дијаметар <=2cm vs >2cm	1,190	0,496 – 2,858	0,046*	
Лимфонодален однос добар vs умерен	0,118	0,756 – 2,067	0,118	
	добар vs лош	0,502	0,286 – 2,869	0,502
	добар vs многу лош	0,046	1,035 – 3,264	0,046*
Нотингемски индекс добар vs умерен	0,685	0,090 – 5,234	0,716	
	добар vs лош	0,190	0,018 – 1,983	0,165
	добар vs многу лош	0,067	0,004 – 1,021	0,052
Стадиум	I vs II	2,238	0,766 – 3,451	0,098
	I vs III	4,035	2,272 – 5,156	0,029*
Ki-67	нег. vs поз.	4,413	1,551 – 7,552	0,005**

*p<0,05 **p<0,01

За возраста, туморскиот дијаметар, и стадиумот во кој е дијагностицирана малигната болест на дојка, направена е Мултиваријантна Сох-ова регресиона анализа, за нивната независна предикторна улога во 5 годишно преживување без болест (DFS), во групата Luminal A, Luminal B и HER2+. Во моделот не е ставена Triple- групата карциноми на дојка, од причини што во оваа група повторна болест беше дијагностицирана само кај 4 испитанички. Од друга страна и покрај тоа што се работи за мала група од 24 пациентки кај кои е обезбедно следење, дури 2 параметри (возраст и туморски дијаметар) се сигнификантни предиктори за појава на релапси кај овој молекуларен подтип, а со цел да се издвои евентуалната сигнификантност во останатите три групи. Резултатите презентирани во табела 64 покажуваат дека возраста претставува сигнификантен предиктор за DFS во сите три анализирани групи, туморскиот дијаметар е независен сигнификантен предиктор за DFS во групата Luminal A и групата HER2+, додека стадиумот на болеста се потврди како независен сигнификантен предиктор за DFS во групата Luminal A и Luminal B.

Испитаничките од групата Luminal A на возраст постари од 40 години, имаат за 0,54 95% CI (0,44 – 0,61) пати значајно помал ризик од оние помлади од 40 години да го имаат настанот, додека пациентките од групата Luminal B постари од 40 години имаат за 0,699 95% CI (0,358 – 0,86) пати значајно помал ризик од оние помлади од 40 години да го доживеат настанот, клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза.

Испитаничките со Luminal A карцином на дојка со дијаметар 2см или повеќе од 2 см се во 2,198 95% CI (1,8 – 4,2) пати значајно поголем ризик од оние со карцином помал од 2 см да добијат регионална или оддалечена метастаза во период од 5 години, додека тој ризик за испитаничките од групата HER2+ е значаен за 1,756 95% CI (1,435 – 3,092) пати.

Luminal A карциномите на дојка во стадиум III даваат 4,843 95% CI (3,443 – 7,364) пати сигнификантно поголем ризик, споредено со карциномите од оваа група со стадиум I и II за појава на клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза, додека ризикот за Luminal B карциномите во стадиум III споредено со стадиум I и II е сигнификантен за 1,332 95% CI (1,11 – 2,01) пати.

Табела 72. Прогностички параметри во Сох-ова мултиваријантна анализа во однос на молекуларните подтипови на карцином на дојка

	Luminal A HR (95% CI)	Luminal B HR (95% CI)	HER2+ HR (95% CI)
возраст(години) <=40 vs >40	0,54 (0,44-0,61)*	0,699 (0,358 – 0,86)*	0,485 (0,39-1,032)
Ту дијаметар <=2 vs >2	2,198 (1,8-4,2)**	1,553 (0,497 – 1,732)	1,756 (1,435-3,092)*
стадиум I/II vs III	4,843 (3,443-7,364)**	1,332 (1,11-2,01)*	1,19 (0,79-1,46)

*p<0,05 **p<0,01

4.3.6 Разлики во клинички и морфохистолошки параметри кај молекуларни подтипови на карцином на дојка во однос на појава на релапси

Во табела 73 прикажана е дистрибуцијата на пациентките со карцином на дојка без болест и со болест, односно со клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза, а во зависност од типот на карцином.

Во период од 5 години по оперативната интервенција, метастатски тумори се детектирани кај 12,5% карциноми од групата Luminal A, 26,09% од групата Luminal B, 27,27% HER2+ карциноми и 12,5% Triple- карциноми.

Статистичката анализа како несигнификантна ја потврди разликата во дистрибуцијата на карциноми без и со болест, а во зависност од типот на карцином.

Табела 73. Дистрибуција на пациентки со карцином на дојка без и со појава на релапси

Статус	Luminal A	Luminal B	HER2+	Triple-
без болест	42 (87,5%)	51 (73,91%)	24 (72,73%)	21 (87,5%)
со болест	6 (12,5%)	18 (26,09%)	9 (27,27%)	3 (12,5%)
вкупно	48	51	33	24
тестирани раз.	Pearson Chi-square: 5,04, df=3, p=0,17 NS			

Просечната возраст на пациентките во сите анализирани групи карциноми е пониска кај пациентките со релапс на болеста, но статистички сигнификантна разлика ($p = 0,037$) се потврдува само во групата со Triple- карцином, односно, пациентките со рак на дојка со Triple- тип на карцином, кај кои во период од 5 години постоперативно повторно се јавила болеста се значајно помлади во споредба со пациентките со овој тип на карцином без релапс на болеста ($49,11 \pm 8,9$ vs $55,87 \pm 7,5$), (табела 74).

Табела 74. Дистрибуција без болест / со болест – возраст

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
возраст								
mean	57,93	56,0	54,78	52,67	53,33	49,52	55,87	49,11
\pm SD	11,6	9,3	8,5	11,1	3,8	12,6	7,5	8,9
	p = 0,699		p = 0,41		p = 0,61		p = 0,037*	

Б- (без болест) Б+ (со болест) *p (Fisher exact test)

Просечната големина на туморот е поголема кај пациентките со релапс на болеста во сите групи карциноми, но статистички сигнификантна е разликата меѓу пациентките со и без релапс само во групата Triple- карциноми ($p = 0,016$). Во оваа група, просечната вредност на туморскиот дијаметар е $6,77 \pm 8,0$ см за пациентките со релапс и $2,67 \pm 0,9$ без локална или оддалечена метастаза.

Табела 75. Дистрибуција без болест / со болест – големина на тумор

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Ту дијаметар (cm)								
mean	1,96	2,20	2,35	3,06	3,15	3,47	2,67	6,77
±SD	1,2	0,9	1,3	1,6	2,2	1,7	0,9	8,0
	p = 0,65		p = 0,073		p = 0,7		p = 0,016*	

Б- (без болест) Б+ (со болест) *p (Fisher exact test)

Во сите анализирани типови карциноми, пациентките без и со локални или регионални метастази несигнификантно се разликуваат во однос на процентот на формирани тубули, нуклеарен градус и митотски индекс, (табела 76).

Табела 76. Дистрибуција без болест / со болест – тубули, нуклеарен градус, митотски индекс

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Формирање на тубули								
под 10%	15 35,71	1 16,67	3 5,88	0	3 12,5	0	0	0
10 – 75%	9 21,43	0	23 45,1	4 22,22	6 25,0	3 33,33	5 23,81	0
над 75%	18 42,86	5 83,33	25 49,02	14 77,78	15 62,5	6 66,67	16 76,19	3 100
	p = 0,297* NS		p = 0,11* NS		p = 0,715* NS			
Нуклеарен градус								
униформни јадра	16 38,1	1 16,67	8 15,69	2 11,11	2 8,33	0	2 9,52	0
умерен плеоморфизам	25 59,52	5 83,33	33 64,71	13 72,22	13 54,17	2 22,22	6 28,57	0
изразен анапластицитет	1 2,38	0	10 19,61	3 16,67	9 37,5	7 77,78	13 61,9	3 100
	p = 0,47* NS		p = 0,92* NS		p = 0,174* NS			
Митотски индекс								
до 5 митози	26 61,9	4 66,67	12 23,53	5 27,78	1 4,17	0	2 9,52	0
6 – 10 митози	10 23,81	1 16,67	14 27,45	5 27,78	8 33,33	0	4 19,05	1 33,33
над 10 митози	6 14,29	1 16,67	25 49,02	8 44,44	15 62,5	9 100	15 71,43	2 66,67
	p = 1,0* NS		p = 0,93** NS				p = 1,0* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Процентот на пациентки со под 10% формирани тубули, во групите без и со рецидив изнесува 35,71% vs 16,67% во Luminal A, додека во Luminal B, HER2+ и Triple- групите не се регистрираат пациентки со релапс на болеста и формирани тубули под 10%. Во групата Luminal A карциноми, изразен анапластичитет како модалитет на нуклеарниот градус имаат 2,38% пациентки без редиви, а ниту една со рецидив, додека процентот на митози над 10 е несигнификантно повисок во групата со релапс на болеста (16,67% vs 14,29%). Во групата Luminal B карциноми, изразен анапластичитет имаат 19,61% пациентки без и 16,67% со рецидив, додека процентот на пациентки со митотски индекс со над 10 митози изнесува во групата без и со рецидив 49,2% и 44,44% консеквентно. Во групата HER2+ карциноми, се регистрираат 37,5% пациентки без и 77,78% со рецидив со изразен анапластичитет, и 62,5% пациентки без и сите 6 со рецидив, со митотски индекс изразен со повеќе од 10 митози. Во групата Triple- карциноми, нуклеарниот градус кај сите 3 пациентки со повторна појава на болест се манифестира со изразен анапластичитет.

Табела 77. Дистрибуција без болест / со болест – хистолошка диференцијација, Ту статус, лимфонодален однос

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Хистолошка диференцијација								
G1	21 50,0	1 16,67	10 19,61	1 5,56	2 8,33	0	2 9,52	0
G2	16 38,1	4 66,67	21 41,18	10 55,56	10 41,67	0	5 23,81	0
G3	5 11,9	1 16,67	20 39,22	7 38,89	12 50,0	9 100	14 66,67	3 100
	p = 0,255* NS		p = 0,32** NS					
Ту статус								
pT1	28 66,67	2 33,33	24 47,06	5 27,78	6 25,0	2 22,22	5 23,81	1 33,33
pT2	13 30,95	4 66,67	24 47,06	11 61,11	12 50,0	5 55,55	16 76,19	1 33,33
pT3	1 2,38	0	2 3,92	1 5,56	3 12,50	2 22,22	0	0
pT4	0	0	1 1,96	1 5,56	3 12,5	0	0	1 33,33
	p = 0,28*** NS		p = 0,87*** NS		p = 0,52*** NS		p = 0,17*** NS	
Лимфонодален статус								
pN0	26 61,9	2 33,33	24 47,06	4 22,22	5 20,83	1 11,11	12 57,14	1 33,33
pN1,2,3	16 38,1	4 66,67	27 52,94	14 77,78	19 79,17	8 88,89	9 42,86	2 66,67
	p = 0,22* NS		p = 0,046** Sig		p = 1,0* NS		p = 0,58* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Резултатите од истражувањето покажуваат дека во однос на степенот на хистолошка диференцијација, процентот на пациентки со G3 или лошо диференциран карцином изнесува во групата без и со релапс, 11,9% vs 16,67% во Luminal A, 39,22% vs 38,89% во Luminal B, 50% vs 100% во HER2+, и 66,67% vs 100% во Triple- (табела 77).

Туморскиот статус изразен како параметар на постоперативната хистопатолошка класификација не е асоциран со појавата на локални или оддалечени метастази.

Лимфонодалниот статус сигнификантно е асоциран со појава на локални или оддалечени метастази во групата Luminal B ($p = 0,046$). Во оваа група карциноми, позитивен лимфонодален статус имаат значајно поголем процент на пациентки со рецидив споредено со оние без рецидив (77,78% vs 52,94%).

Табела 78. Дистрибуција без болест / со болест – ресекциони маргини, лимфна и васкуларна емболизација

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Ресекциони маргини								
во здраво	36 85,71	5 83,33	39 76,47	11 61,11	19 79,17	8 88,89	18 85,71	3 100
зафатени	6 14,29	1 16,67	12 23,53	7 38,89	5 20,83	1 11,11	3 14,29	0
	p = 1,0* NS		p = 0,21** NS		p = 1,0* NS		p = 1,0* NS	
Емболизација во лимфатици								
нема	19 45,24	1 16,67	11 21,57	2 11,11	3 12,5	0	9 42,86	1 33,33
има	23 54,76	5 83,33	40 78,43	16 88,89	21 87,5	9 100	12 57,14	2 66,67
	p = 0,38* NS		p = 0,49* NS		p = 0,55* NS		p = 1,0* NS	
Емболизација на крвни садови								
нема	35 83,33	4 66,67	37 72,55	9 50	13 54,17	1 11,11	16 76,19	2 66,67
има	7 16,67	2 33,33	14 27,45	9 50	11 45,83	8 88,89	5 23,81	1 33,33
	p = 0,38* NS		p = 0,08** NS		p = 0,046* Sig		p = 1,0* NS	
Туморска некроза								
нема	35 83,33	5 83,33	37 72,55	13 72,22	17 70,83	4 44,44	7 33,33	1 33,33
има	7 16,67	1 16,67	14 27,45	5 27,78	7 29,17	5 55,56	14 66,67	2 66,67
	p = 0,23* NS							

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Тестираната разлика во дистрибуцијата на карциноми со ресекциони маргини во здраво и зафатени, а во зависност од метастазирањето на болеста, статистички е несигнификантна во сите групи на карциноми.

Не се регистрира сигнификантна асоцираност на емболзација на лимфни садови со релапс на болеста во ниту една група карциноми.

Васкуларната пак емболизација има сигнификантно влијание во појавата на локални или оддалечени метастази во групата HER2+ ($p = 0,046$). Во неа, 88,89% со рецидив наспроти 45,83% без рецидив имаат емболизација на крвни садови.

Во групите Luminal A, Luminal B и Triple- подеднаков процент на карциноми кои не дале и кои дале метастази имаат некроза, додека во групата HER2+ некроза е регистрирана кај 55,56% метастатски тумори и 29,17% тумори без метастаза. (табела 78)

Дезмопластичната реакција на строма, еластоза и присуство на калцификати во туморското ткиво немаат сигнификантно влијание на метастазирање на болеста во сите групи карциноми.

Процентот на карциноми со дезмопластична реакција на строма е повисок во сите групи кај пациентките со релапс, но разликите во однос на пациентките без релапс се недоволни за статистичка сигнификантност.

И еластоза имаат несигнификантно поголем дел на карциноми кои метастазирале во однос на оние кои не метастазирале во Luminal A (66,67% vs 42,86%), во Luminal B (50% vs 31,37%), во HER2+ (55,56% vs 20,83%) и во Triple- (66,67% vs 23,81%), (табела 79).

Табела 79. Дистрибуција без болест / со болест – дезмопластична реакција на строма, еластоза, калцификати

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Дезмопластична реакција на строма								
нема	9 21,43	1 16,67	16 31,37	3 16,67	11 45,83	2 22,22	13 61,9	0
има	33 78,57	5 83,33	35 68,63	15 83,33	13 54,17	7 77,78	8 38,1	3 100
	p = 1,0* NS		p = 0,36* NS		p = 0,26* NS		p = 0,08* NS	
Еластоза								
нема	24 57,14	2 33,33	35 68,63	9 50	19 79,17	4 44,44	16 76,19	1 33,33
има	18 42,86	4 66,67	16 31,37	9 50	5 20,83	5 55,56	5 23,81	2 66,67
	p = 0,39* NS		p = 0,16** NS		p = 0,08* NS		p = 0,19* NS	
Калцификати								
нема	24 57,14	4 66,67	27 52,94	6 33,33	11 45,83	7 77,78	17 80,95	3 100
има	18 42,86	2 33,33	24 47,06	12 66,67	13 54,17	2 22,22	4 19,05	0
	p = 1,0* NS		p = 0,15** NS		p = 0,13* NS		p = 1,0* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Во сите анализирани групи карциноми, многу лош статус на лимфонодален однос и многу лош нотингемски индекс почесто се регистрира кај карциномите кои во период од 5 години постоперативно дале локални или оддалечени метастази (табела 80).

Табела 80. Дистрибуција без болест / со болест – лимфонодален однос, нотингемски индекс, лимфоцитарен инфилтрат

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Лимфонодален однос								
добар	34 80,95	4 66,67	35 68,63	11 61,11	13 54,17	3 33,33	17 80,95	2 66,67
умерен	5 11,9	0	9 17,65	2 11,11	4 16,67	2 22,22	1 4,75	0
лош	0	0	6 11,76	4 22,22	3 12,5	0	2 9,52	0
многу лош	3 7,14	2 33,33	1 1,96	1 5,56	4 16,67	4 44,44	1 4,76	1 33,33
	p = 0,22* NS		p = 0,48* NS		p = 0,29* NS		p = 0,52* NS	
Нотингемски индекс								
добар	13 30,95	1 16,67	5 9,8	1 5,56	0	0	0	0
умерен	13 30,95	0	9 17,65	1 5,56	3 12,5	0	3 14,29	0
лош	12 28,57	3 50,0	20 39,22	8 44,44	8 33,33	2 22,22	12 57,14	2 66,67
многу лош	4 9,52	2 33,33	17 33,33	8 44,44	13 54,17	7 77,78	6 28,57	1 33,33
	p = 0,22* NS		p = 0,65* NS		p = 0,6* NS		p = 1,0* NS	
Лимфоцитарен инфилтрат								
слаб	38 90,48	5 83,33	35 68,63	16 88,89	12 50	4 44,44	10 47,62	2 66,67
умерен	2 4,76	1 16,67	13 25,49	1 5,56	7 29,17	3 33,33	7 33,33	1 33,33
обемен	2 4,76	0	3 5,88	1 5,56	5 20,83	2 22,22	4 19,05	0
	p = 0,5* NS		p = 0,5* NS		p = 1,0* NS		p = 1,0* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Резултатите прикажани во табела 81 сугерираат дека не постои сигнификантната поврзаност на појавата на рецидив на болеста со позитивен прогестеронски рецептор, Ки 67, p53 и позитивна експресија на онкопротеин во сите анализирани групи на карциноми.

Во однос пак на поврзаноста со статусот на естрогенскиот рецептор, статистичка сигнификантност се потврдува само во групата HER2+ (p = 0,046).

Табела 81. Дистрибуција без болест / со болест – ER, PR, Ki-67, p53, експресија на онкопротеин

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
ER								
негативен	0	0	0	0	12	8	21	3
					50,0	88,89	100	100
позитивен	42	6	51	18	12	1		
	100	100	100	100	50,0	11,11		
					p = 0,046* Sig			
PR								
негативен	0	0	11	6	18	8	21	3
			21,57	33,33	75	88,89	100	100
позитивен	42	6	40	12	6	1		
	100	100	78,43	66,67	25	11,11		
			p = 0,35** NS		p = 0,6* NS			
Ki-67								
Негативен (<14%)	42	6	7	1	4	0	3	0
	100	100	13,73	5,56	16,67		14,29	
Позитивен (>14%)	0	0	44	17	20	9	18	3
			86,27	94,44	83,33	100	85,71	100
			p = 0,67* NS		p = 0,55* NS		p = 1,0* NS	
p53								
негативен	38	6	41	13	15	3	10	0
	90,48	100	80,39	72,22	62,5	33,33	47,62	
позитивен	4	0	10	5	9	6	11	3
	9,52		19,61	27,78	37,5	66,67	52,38	100
	p = 1,0* NS		p = 0,47** NS		p = 0,24* NS		p = 0,24* NS	
Експресија на bcl2 онкопротеин								
нема експресија	16	2	32	15	18	9	17	3
	38,1	33,33	62,75	83,33	75	100	80,95	100
има експресија	26	4	19	3	6	0	4	0
	61,9	66,67	37,25	16,67	25		19,05	
	p = 1,0* NS		p = 0,11* NS		p = 0,16* NS		p = 1,0* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Во табела 82 прикажана е дистрибуцијата на пациентките со одделните типови карцином на дојка, без и со рецидив на болеста, а во зависност од стадиумот во кој болеста е детектирана.

Табела 82. Дистрибуција без болест / со болест – стадиум на болест

варијабла	Luminal A		Luminal B		HER2+		Triple-	
	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)	Б – N (%)	Б + N (%)
Стадиум								
I	21 50	1 16,67	16 31,37	2 11,11	2 8,33	0	4 19,05	1 33,33
II	16 38,09	3 50	20 39,21	7 38,89	11 45,83	4 44,44	14 66,67	1 33,33
III	5 11,9	2 33,33	15 29,42	9 50	11 45,83	5 55,55	3 14,28	1 33,33
	p = 0,33* NS		p = 0,16* NS		p = 1,0* NS		p = 0,31* NS	

Б- (без болест) Б+ (со болест)

*p (Fisher exact test) **p (Chi-square test)

Резултатите прикажани во табела 82 сугерираат дека не постои сигнификантната поврзаност на појавата на рецидив на болеста во однос на стадиумот на болеста во сите анализирани групи на карциноми.

5. ДИСКУСИЈА

Хируршката терапија извршена кај пациентките со карцином на дојка дава можности за детална хистопатолошка анализа на оперативниот материјал. При хистопатолошката анализа точно се утврдува проширеноста на неоплазмата, зафатеноста на лимфните јазли а со помош на овие параметри се одредува и стадиумот на болеста како трет основен параметар од постоперативната хистопатолошка класификација на неоплазмите. Освен тоа, хистопатолошката анализа овозможува одредување и на некои други морфометриски и морфолошки карактеристики на примарниот тумор кои може да се значајни предиктивни параметри во однос на појавата на релапси кај пациентките со карцином на дојка. Вклучувањето на овие прогностички важни параметри во деталната хистопатолошка анализа на оперативните материјали кај пациентките со карцином на дојка има за цел да ја зголеми нивната точност и да ја утврди нивната предиктивна вредност.

Одредувањето на имунофенотипот на карциномот на дојка, со помош на имунохистохемиските и молекуларно-биолошките методи во поново време, е исто така важен прогностички параметар, кој има за цел да се дефинираат подгрупите на пациенти кај кои треба да се применат различни терапевтски модалитети.

5.1 ДИЗАЈН НА СЕРИЈАТА

Испитуваната серија од 192 пациенти е релативно хетерогена ако се земе во предвид дека како основа за селекцијата и групирањето на пациентките е земен постоперативниот стадиум на болеста и имунофенотипот од аспект на молекуларната класификација на дојка при што целата група е поделена на 4 помали групи, со различни имунопрофили и согласно на тоа со различен терапевтски пристап.

Дел од резултатите се совпаѓаат со оние од досега публикуваните студии а дел се различни заради следните карактеристики на испитуваната серија:

- малите групи добиени при имунофенотипизацијата во оваа серија се недоволни за детална статистичка обработка особено од аспект на униваријантната анализа;
- и покрај големиот број на испитувани параметри истите покажуваат различен аспект во однос на појавата на релапси и преживувањето без болест кај сите 4 групи на карцином на дојка;
- во серијата се анализирани сите пациенти во одреден временски период без оглед на стадиумот на болеста што во извесна мерка ја зголемува хетерогеноста на целата серија.

Во функција на хомогеноста на серијата важен е податокот на униформната хистопатолошка обработка на оперативниот материјал со што беше овозможено детално одредување на морфолошките и морфохистолошките параметри од еден патолог. Бројот на анализирани пресеци од примарниот тумор како и од ресецираните лимфни јазли е стандардизиран со што е избегната субјективноста при евалуацијата на хистопатолошкиот наод.

Во оваа студија е евалуирано прогностичкото значење на вкупно 24 клиничко-морфохистолошки параметри корелирани со параметрите од молекуларната класификација на дојка, односно со молекуларните фенотипови на карцином на дојка. Истите можат да се поделат во 4 групи:

- Клинички податоци (возраст на пациент и тип на хируршка интервенција);

-Параметри од постоперативната (pTNM) хистопатолошка класификација на дојка (pT – туморски статус односно најголем туморски дијаметар, pN – лимфонодален статус, стадиум на болеста) и лимфонодален индекс;

-Морфохистолошки параметри (степен на хистолошка диференцијација со сите три индикатори потребни за негово одредување: формирање на тубули, митотски индекс, нуклеарен градус, потоа Нотингемскиот прогностички индекс, ресекциони маргини, емболизација во лимфоваскуларни простори и во големите крвни садови, присуството на лимфоплазмацитарен инфламаторен инфилтрат, некроза, дезмоплазија, еластоза и присуство на калцификати во туморот)

-Основни имунохистохемиски параметри во улога на сурогат во одредување на основните молекуларни подтипови (Естроген рецептор, Прогестеронски рецептор, HER-2 онкогенот, пролиферативниот индекс Ki67), како и протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 и онкопротеинот bcl2.

Во студијата не се направени корелации со дополнителните имунохистохемиски маркери кои беа употребени само за потврда на имунофенотипот на карциномот на дојка (CK5/6, CK8, CK17, CK18, CK34BE12, CD117, EGFR, Vimentin и E-cadherin).

Со евалуација на овие параметри во однос на нивното влијание на периодот без болест (DFS-disease free survival), направен е обид да се издвојат прогностички најзначајните параметри во однос на појавата на релапси. Од овие причини во анализата се вклучени сите параметри со прифатено прогностичко значење инкорпорирани во постојните класификации на туморите (големина на примарен тумор, лимфонодален статус, лимфонодален индекс, степен на хистолошка диференцијација, стадиум на болеста) како и параметри кои во публикуваната литература се реферирани како сигнификантни (статус на хормонските рецептори, пролиферативниот индекс, експресијата на HER-2 онкогенот, на протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 и на bcl-2 онкопротеинот). Останатите параметри се поретко анализирани, и во литературата се евалуирани како потенцијално сигнификантни (инфламаторен инфилтрат, еластоза, дезмоплазија, некроза, калцификати, ресекциони маргини).

5.2 УЛОГА НА КЛИНИЧКИ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ЗА ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ

5.2.1 Возраст

Речиси во сите испитувани студии на карцином на дојка, возраста како клинички податок важи за еден од најиспитуваните и најсилните предиктивни прогностички параметри (1, 2, 5, 77, 100). Во нашата студија, просечната возраст на пациентките е $57,57 \pm 11,2$ години во групата со Luminal A тип на карцином, $54,62 \pm 9,1$ години во групата со Luminal B, $54,17 \pm 8,5$ години во групата со HER2++ тип на карцином, и $50,24 \pm 11,7$ години во групата пациентки со Triple-- тип на карцином. Тестираната разлика во просечната возраст на пациентките меѓу четирите анализирани групи статистички е сигнификантна за $p < 0,05$ што се должи на значајно повисока просечна возраст во групата Luminal A споредено со групата Triple-- ($p = 0,013$). И во сите достапни студии постои јасна, сигнификантна разлика во анализираниите имунофенотипови каде пациентките со хормон позитивни карциноми се во повисоките возрастни групи во однос на HER2+ и Triple— (123, 124). Ова не е случај со студиите на Gupta *u cop.* (125) и Azizun-Nisa *u cop.* (126), каде испитуваните серии на пациентки припаѓаат на

категиите на лошо диференцирани тумори со високата преваленца на доцна дијагностика кај истите. Во нашата серија, категоризацијата по возрастни групи на пациентките е направена на два нивоа: до 40 годишна возраст и над 40 годишна возраст. Двете возрастни групи пациентки имаат сигнификантно различно време на 5-годишно преживување без болест ($p = 0,041$), а значајно подолго преживуваат пациентките од постарата возрастна група. Во нашата серија, според резултатите од мултиваријантната и униваријантната анализа, пациентките на возраст постари од 40 години, имаат за 0,335 95% CI (0,111 – 0,989) пати помал ризик од појава на рецидивантна болест, во споредба со пациентки помлади од 40 години. Оваа категоризација е јасна имајќи го во предвид фактот што постарите пациентки воглавно припаѓаат на хормон позитивните, односно луминалните подтипови на карцином на дојка, а помладите на HER2+ односно на Triple—карциноми. Во некои студии каде категоризацијата е направена до и над 50 годишна возраст оваа стратификација е послабо изразена (во помали серии како на *Calv u cop.* со 257 случаevi) (61), но е исто сигнификантна како што се и големите серии од испитувани пациенти во други студии како кај *Voduc u cop.* на серија од 2985 пациенти (90), *Cortesi u cop.* на серија од 4970 пациенти (127) и кај *Wu u cop.* на серија од 1260 пациенти (128).

5.2.2 Тип на интервенција

Добриот хируршки третман е основа за добар исход на болеста кај карцином на дојка (67). Во сите студии од понов датум се фаворизира модифицираниот третман на хируршка интервенција (квадрант ресекција или само туморектомија лимфаденектомија) во однос на техниката на радикална мастектомија заради тоа што исходот во однос на појавата на локорегионални рецидиви е речиси ист (129). Исто така и во студијата на *Wang u cop.* (130), не е најдена асоцираност на појавата на локорегионални или далечни метастази во однос на типот на оперативната техника. Овие резултати се во согласност со нашите анализи каде резултатите од мултиваријантната и униваријантната анализа покажуваат дека 5-годишното преживување без болест не зависи сигнификантно од видот на оперативна интервенција.

5.3. ПАРАМЕТРИ ОД ПОСТОПЕРАТИВНАТА (pTNM) ХИСТОПАТОЛОШКА КЛАСИФИКАЦИЈА НА ДОЈКА

5.3.1 Туморски дијаметар (pT)

Според добиените резултати од истражувањето во нашата серија на пациентки со карцином на дојка големината на примарниот тумор, анализиран преку туморскиот дијаметар, е силно асоциран со имунофенотипот на неоплазмата ($p = 0,0026$). Притоа, статистички сигнификантна разлика во туморскиот дијаметар е потврдена меѓу групите Luminal A и Luminal B ($p = 0,01$), меѓу Luminal A и HER2++ ($p = 0,001$), и меѓу групите Luminal A и Triple- ($p = 0,0015$).

Дескриптивната анализа на дијаметарот на туморот покажува дека средниот туморски дијаметар, односно медијаната на туморскиот дијаметар е најмала во групата Luminal A и изнесува 1,8 см, а најголема средна вредност туморскиот дијаметар има во Triple- групата од 2,6 см. Овие резултати се совпаѓаат со резултатите

од повеќе студии во достапната литературата каде е испитувано прогностичкото значење на големината на примарниот тумор во однос на преживувањето без болест и општото преживување (67, 100).

Ако големината на примарниот тумор се анализира преку параметрите на постоперативната хистопатолошка класификација во тој случај се покажува статистички сигнификантна разлика само во однос на големината на примарниот тумор во групата на Luminal A карциноми на дојка споредени со Triple – ($p=0,036$). Тоа е и јасно, бидејќи овие две групи се дијаметрално спротивни во спектарот на туморската големина па повеќе автори во своите студии прават дистинкција на туморска големина до 2 см и тумори поголеми од 2 см, односно во категории, pT1 наспроти pT2,3,4.

Во униваријантната анализа во нашата серија ризикот од појава на метастатска болест во однос на тумори со големина поголема од 2 см изнесува $HR=2,563$ а во мултиваријантната анализа $HR=1,19$, слично како и во студиите на *Cortesi u cop.* (127) ($HR=4,0/HR=2,47$), *Callagy u cop.* (131) ($HR=1,31/1,34$) и *Blows u cop.* (124) ($HR=1,67/HR=1,30$). Просечната големина на туморот е поголема кај пациентките со релапс на болеста во сите групи карциноми, но статистички сигнификантна е разликата меѓу пациентките со и без релапс само во групата Triple- карциноми ($p=0,016$). Во оваа група, просечната вредност на туморскиот дијаметар е $6,77\pm 8,0$ см за пациентките со релапс и $2,67\pm 0,9$ см, без локална или оддалечена метастаза. Оваа распределба е присутна и во студиите на *Voduc u cop.* (90) на серија од 2985 пациентки, и *Dent u cop.* (132) на серија од 1601 пациент, но без статистичка сигнификантност, додека во студиите на *Nguyen u cop.* (133) на 793 случаеви и на *Haffty u cop.* (134), на серија од 482 пациентки постои мал но статистички сигнификантен ризик од појава на релапси кај Triple- карциноми во споредба со останатите три групи.

Анализата пак на Kaplan-Meier-овата крива на преживување покажува дека туморскиот дијаметар има сигнификантно влијание на должината на преживување без болест ($p = 0,034$), како резултат на значајно подолго 5-годишно преживување без болест во групата пациентки со помала големина на карциномот. Во нашата студија, 5-годишната DFS стапка за карциноми со големина од 2 сантиметри и помали, и за карциноми поголеми од 2 сантиметри изнесува 86,3% и 63,9% консеквентно. Овие резултати се потврдуваат и во студиите на *Cheang u cop.* (68) како и *Veronesi u cop.* (135) каде пресечната точка над и под 2 см дава јасна демаркација на биологијата на процесот и каде се потврдува динамичкото значење на овој параметар.

5.3.2 Лимфонодален статус и лимфонодален индекс

Во нашата серија на пациентки со карцином на дојка лимфонодалниот статус сигнификантно е асоциран со појава на локални или оддалечени метастази во групата на Luminal B карциноми на дојка ($p = 0,046$). Оваа група на пациентки со позитивен лимфонодален статус, има значајно поголем процент на рецидиви споредено со оние без рецидив (77,78% вс 52,94%). Лимфонодалниот статус во униваријантната и мултиваријантната анализа во нашата студија не се издвои како прогностички важен параметар во корелација со имунофенотипот на карциномот на дојка. Сличен резултат е објавен и во студијата на *Inic u cop.* (136) каде на серија од 108 пациенти е истакнато дека Luminal B карциноми на дојка имаат 5 пати поголем процент од присутни локорегионални метастази во однос на Luminal A карциноми (10,7% наспроти 51,4%), а појавата на локорегионални рецидиви се поврзува со тоа што овие тумори се полошо

диференцирани во однос на Luminal A и се со поизразена биолошка агресивност (висок степен на пролиферативна активност). Според *Inic u cop.* (136), и некои други автори во слични студии (137, 138) појавата на регионални метастази кај Luminal B карциномите на дојка ја приближува оваа група кон останатите два, прогностички понеповолни имунофенотипови, HER2+ и Triple- карциноми на дојка. Последните години во многу студии се дискутира околу лимфонодалниот статус како прогностички параметар (88). Според некои автори како на пример *Bland u cop.* (139) и *Euhis u cop.* (140) се поставува прашањето дали ресекцијата на аксиларните лимфни јазли, освен во однос на одредувањето на стадиумот на болеста, има некаква важност во однос на понатомошниот третман. Одговорот на тоа е во студиите на неколку автори (*Cortesi u cop.* (127), *Wu u cop.*(128) *Vinh Hung u cop.* (141), *Truong u cop.* (142), *Woodward u cop.*(143)), во кои е истакнато дека не е бројот на позитивните лимфни јазли битен параметар како што е детерминирано во постоперативната класификација на тумори на дојка туку еден друг порелевантен параметар а тоа е лимфонодалниот индекс, т.е односот меѓу бројот на позитивните лимфни јазли со апсолутниот број на вкупно ресецираните лимфни јазли. Тоа е прикажано и во нашата серија каде лимфонодалниот индекс е сигнификантен параметар како во униваријантната така и во мултиваријантната анализа во однос на појавата на рецидиви. Лимфонодалниот индекс со умерен статус (вредност 0,25-0,5), го зголемува ризикот за 2,609 95% CI (1,070 – 6,36) пати, а со многу лош статус (0,75-1) за 6,151 95% CI (3,596 –14 ,574) пати за метастазирање, споредено со добар статус на лимфонодален индекс (0-0,25). Исти, односно слични резултати се прикажани и во студиите на поголем број автори каде е истакнато дека вредноста на лимфонодалниот индекс е најниска кај Luminal A имунофенотипот а поизразена кај останатите три типа карциноми на дојка (127, 128, 142).

5.3.3 Влијанието на стадиумот на болеста врз преживувањето без болест (DFS)

Од вкупниот број на пациентки во испитуваната серија, во анализата на следење добиени се податоци за 173 пациентки, и добиените резултати покажуваат дека кај 35 (20,2%) од нив, болеста рецидивирала во период од 5 години по извршената оперативна интервенција, додека кај 138 (79,8%) пациентки, во овој период не е регистриран релапс на болеста. Резултатите од нашето истражување покажаа дека 5-годишниот DFS, односно 5-годишно преживување без болест за оваа испитувана група на заболени од рак на дојка изнесува 72,7%. Пациентките со карцином на дојка дијагностицирани во стадиум III имаат за 3,678 пати 95% CI (2,212 – 10,164) поголем ризик да добијат регионална или оддалечена метастаза во однос на пациентките со карцином на дојка во стадиум I, што е прикажано и во униваријантната ($p < 0.001$) и мултиваријантната регресиона анализа ($p < 0.029$), без оглед на имунофенотипот на туморот. Овие резултати се слични на истражувањата на *Voduc u cop.* (90) и *Dawood u cop.* (144) каде на серија од 2985 односно 3093 пациентки е утврдено дека 5 и 10 годишното преживување без болест (DFS) е поизразено кај пациентки во прв или втор стадиум особено ако припаѓаат на групата на Luminal A карциноми на дојка. Оваа група на пациентки имаат помал процент на рецидиви, односно локорегионални или далечни метастази во споредба со останатите три имунофенотипови (8% кај Luminal A, наспроти 20% кај HER2+, $p = 0.0019$). Во нашата серија не е потврдена сигнификантност во однос на стадиумот на болеста и имунофенотипот на карциномот на дојка,

веројатно заради малата група на испитаници и заради интервалот на следење. Оваа претпоставка е поткрепена и во студијата на *Huе и сор.* (145) каде на серија од 5809 пациентки, стадиумот на болеста се издвојува како независен прогностички параметар без оглед на имунофенотипот на карциномот на дојка, што не е случај и во помалите серии на пациентки како кај *Molino и сор.* (63) на серија од 322 пациентки и кај *Caly и сор.* (61) на серија од 257 пациентки

5.4. УЛОГА НА ХИСТОМОРФОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ВО ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ

5.4.1 Формирање на тубули во примарен тумор

Статистичката анализа на пациентките во нашата серија, покажа дека формирањето на тубули кај карциномот на дојка, високо сигнификантно, почесто се формираат кај карциномите од група Luminal A во споредба со карциномите од другите групи. Таа разлика е најизразена меѓу групите Luminal A и Luminal B ($p=0,000016$), помалку меѓу групите Luminal A и Triple-- ($p=0,004$) а најслабо изразена меѓу Luminal A и HER2++ групата ($p=0,02$), што е и вообичаено имајќи ја предвид улогата на овој параметар во одредувањето на степенот на хистолошката диференцијација на туморот. Формирањето на тубуларни структури како еден од параметрите на Bloom-Richardson-овит скоринг систем во одредувањето на степенот на хистолошка диференцијација (48) е помалку анализиран параметар во достапната литература. Обично во студиите се среќава во состав на степенот на хистолошката диференцијација (146, 147) или групиран во состав на Нотингемскиот прогностички индекс (49). Во нашата серија формирањето на тубуларни структури како посебен параметар, не се покажа сигнификантен ниту во униваријантната ниту во мултиваријантната анализа ниту пак како предиктор во појавата на релапси кај секој од имунофенотиповите засебно што е потврдено и во неколку студии (5, 67, 148)

5.4.2 Нуклеарен градус (NG)

За разлика од формирањето на тубуларните формации, во сите студии кои ја анализираат предиктивната вредност на хистолошките параметри (112, 145, 148), нуклеарниот градус се издвојува како посебен и многу важен фактор во однос на преживувањето без болест и општото 5 и 10 годишно преживување. Во нашата студија, добар до умерен јадрен плеоморфизам најчесто манифестираат карциномите од групата Luminal A и Luminal B, а најретко Triple—карциноми, додека изразен анапластичитет пак, најчесто се регистрира кај Triple-- карциноми на дојка, кој е поредок кај карциномите од Luminal A и Luminal B типот.

Овие опишани разлики во дистрибуцијата на модалитетите на нуклеарниот градус, и статистички се потврдуваат како високо сигнификантни меѓу групата Luminal A во однос на Luminal B ($p=0,00007$), во однос на HER2+ ($p=0,0000004$), и во однос на Triple- карциноми ($p=0,000$), како и меѓу групата Luminal B во однос на HER2+ ($p=0,00095$) и во однос на Triple- карциномите ($p=0,00003$). Од друга страна разликата во 5-годишно DFS, во зависност од видот на нуклеарен градус (униформни јадра, умерен плеоморфизам, изразен анапластичитет) статистички е несигнификантна, односно незначајна ($p = 0,21$). Исто така нуклеарниот градус во нашата студија, не се

покажа значаен како параметар во униваријантната и мултиваријантната анализа, што не е во согласност со ревијалната студија на *Rakha u sor.* (148) каде нуклеарниот градус заедно со хистолошкиот степен на диференцијација се исклучително битни предиктивни фактори во одредувањето на 5-годишно DFS. Исто така во студијата на *Carey u sor.* (97) на серија од 496 пациентки со карцином на дојка, постои сигнификантност на нуклеарниот градус во однос на имунофенотиповите како и во нашата студија, но и во однос на појавата на релапси каде ризикот во однос на Luminal A е HR=6.8 (2,8-16,3), пати поголем за HER2+ пациенти, односно за HR=9,7 (5,3-18) пати во однос на Triple- карциноми.

5.4.3 Митотски индекс (MI)

Статистичката анализа на митотскиот индекс како прогностички параметар во нашата серија, како високо сигнификантна ја потврди разликата во митотскиот индекс меѓу карциномите од групата Luminal A, наспроти останатите три групи карциноми ($p=0,0000013$, $p=0,0000$ и $p=0,0000005$ консеквентно). Во нашата студија високиот митотскиот индекс, со повеќе од 10 митози, дава 3,063 пати, 95% CI (1,058 – 8,866) сигнификантно поголем ризик за метастазирање на болеста, компарирано со митотски индекс со број на митози до 5. Исто така, во нашата студија митотскиот индекс се покажа како сигнификантен фактор во појавата на релапси во Cox-овата униваријантна регресиона анализа ($p=0.039$), но не и во мултиваријантната анализа. Иако во постарите студии митотскиот индекс се промовираше како важен и независен прогностички параметар во однос на преживувањето без болест и општото преживување како на *Aaltomaa u sor.* (149), во поновите студии како на *Bult u sor.* (150), се покажа дека митотскиот индекс е сигнификантен параметар само во однос на имунофенотиповите на карциномот на дојка и во рамките на одредувањето на степенот на хистолошката диференцијација. Заклучокот на студијата на *Klintman u sor.* (151), а воедно и причината зошто постои оваа дискрепанца е дека постои силна асоцираност на митотскиот индекс во однос на добро и средно диференцираните тумори, посебно во групата на ER+ карциноми (Luminal A, Luminal B), како и во однос на 5 годишното преживување без болест, во споредба со лошо диференцираните тумори каде митотскиот индекс е речиси секогаш висок како кај Her2+ и Triple- тумори (65), што се покажа и во нашата серија.

5.4.4. Степен на хистолошка диференцијација (G)

Во однос на степенот на хистолошка диференцијација, резултатите од нашите истражувања покажуваат дека карциномите од групата Luminal A сигнификантно се разликуваат од останатите три групи ($p<0,01$), во однос на степенот на хистолошката диференцијација и почесто припаѓаат на групата G1, односно добро диференцирани тумори. И карциномите од групата Luminal B сигнификантно ($p<0,05$) почесто се добро диференцирани во споредба со карциномите од групата HER2+ и Triple-. Овие резултати се во корелација со сите достапни студии каде е анализиран овој хистолошки параметар (1, 67, 77, 152). Од друга страна во однос на 5-годишниот период на преживување без болест, степенот на хистолошка диференцијација не се издвои како сигнификантен прогностички параметар ниту во мултиваријантната ниту во униваријантната анализа. Овие резултати се во согласност, и слични со студиите на

Carey u cop. (97) на популација од 493 пациентки со карциноми на дојка и на *Al-Tamimi u cop.* (153) на популација од 231 пациент, каде исто така не е најдена корелација на степенот на хистолошка диференцијација со 5-годишното преживување без болест. Наспроти тоа во останатите студии како на пример во двете ревијални студии на *Rakha u cop.* (148, 154) и во ревијалната студија на *Barnard u cop.* (155), овој параметар се издвојува како сигнификантен предиктор во однос на подоброто 5 годишно преживување без болест врз основа на неговата асоцираност со помалите тумори, позитивниот хормонски статус на туморот и нискиот лимфонодален индекс. Исто така оваа асоцираност се поврзува и со доцната појава на локорегионални или далечни метастази но за многу подолг период на следење особено во Luminal B групата. Како причина на несовпаѓањето, авторот во анализата на 38 студии, ја наведува слабата репродукцибилност на одредувањето на степенот на хистолошката диференцијација, односно субјективниот пристап на проценката, како и студиите каде се анализирани мал број на пациенти или следењето е во краток временски интервал. Од друга страна *Desmedt u cop.* (156), смета дека степенот на хистолошката диференцијација треба да даде посебни насоки во однос на терапијата, поради што и шематизацијата на онколошкиот тертман во различни центри дава и различни резултати во однос на преживувањето без болест.

5.4.5 Нотингемски прогностички индекс (NPI)

Нотингемскиот прогностички индекс е параметар кој доста често е користен во речиси сите студии на карциномот на дојка како модел во кој се комбинирани туморската големина, лимфонодалниот статус и степенот на хистолошката диференцијација (51, 157-159). Во нашата серија разликите на Нотингемскиот прогностички индекс статистички се потврдија како високо сигнификантни меѓу групата Luminal A наспроти Luminal B, HER2+ и Triple- карциноми. Исто така постои и статистички сигнификантна разлика во модалитетите на Нотингемскиот прогностички индекс меѓу Luminal B и HER2+ карциноми. Овие резултати се во согласност со студиите на *Rakha u cop.* (154), *D'Eredita u cop.* (158) и *Adly u cop.* (157). Вредностите и стратификацијата на Нотингемскиот прогностички индекс во нашата серија потврдуваат дека истиот има сигнификантно влијание на 5-годишното преживување без болест. Заради тоа, Нотингемски прогностички индекс со вредност над 3,4 дава 4,564 95% CI (1,051 – 6,273) пати значајно поголем ризик за метастазирање од карцином на дојка, споредено со Нотингемски прогностички индекс, чија вредност е под 3,4 а која е воглавно присутна кај карциноми на дојка од типот Luminal A. Нотингемски прогностички индекс е сигнификантен параметар за појава на релапси, потврден во унииваријантната анализа на нашата серија ($p=0,046$), но не и во мултиваријантната анализа, каде покажува само благ тренд на сигнификантност. Ова е исто така потврдено и во студиите на *Callagy u cop.* (131), *Rostgaard u cop.* (159) и *Rakha u cop.* (117), со таа разлика што истите ја поврзуваат прогностичката вредност на овој параметар со некои други фактори како што се bcl-2 онкопротеинот, протеинскиот продукт на тумор супресорскиот ген p53 или васкуларната инвазија.

5.4.6. Ресекциони маргини

Статусот на ресекционите маргини е слабо испитуван параметар во евалуацијата на предиктивната вредност во однос на ризикот на појава на рецидиви кај карциномот на дојката (67, 145, 160). Иако се смета дека остаточното туморско ткиво на ресекционата маргина на оперативниот примерок може во голема мерка да го забрза процесот на локорегионална појава на метастази, сепак со новите онколошки односно хемотерапевтски модалитети на постоперативен третман тоа не е случај што е и прикажано во студиите на некои автори (90, 129, 161).

Анализираните групи карциноми на дојка во нашата серија, несигнификантно се разликуваат во однос на ресекционите маргини. Во сите групи, кај доминантен дел пациентки, ресекционите маргини се во здраво. Пациентките со карцином на дојка според мултиваријантната и униваријантната анализа имаат несигнификантно различно 5-годишно DFS, односно статусот на ресекционите маргини во нашата серија не се покажа како предиктор во однос на појавата на релапси. Со слични резултати се и студиите на некои автори и на поголеми серии (137, 162). Од друга страна во студијата на *Hennings u sor.* (163) на серија од 2657 пациентки, направена е реексизија кај 2,5% пациентки заради зафатени ресекциони маргини а локорегионална болест во период на следење од 58 месеци е утврдено кај половина од нив. Со Cox-овата регресиона анализа е утврдено дека ризикот за појава на локорегионална болест е 2 до 8 пати поголема во однос на тотално екстирпиран тумор, додека во студијата на *Wood u sor.* (160) овој ризик е 2-3,5 пати поголем.

5.4.7 Лимфоваскуларна инвазија

Присуството на лимфоваскуларната инвазија е важен прогностички параметар кој ја рефлектира појавата на релапси особено кај карциноми на дојка со негативни лимфни јазли или со мал лимфонодален индекс како што е нагласено во студијата на *Fujii u sor.* (164). Во нашата серија статистичката анализа потврди дека емболизацијата во лимфатици е сигнификантно асоцирана со карциномите од групата Luminal B во споредба со Luminal A ($p=0,0014$) и значајно почесто со Luminal B во споредба со Triple- ($p=0,019$). Емболизација во лимфатици исто така е сигнификантно асоцирана со HER2+ карциноми во споредба со Luminal A ($p=0,001$) и во споредба со Triple- карциноми ($p=0,008$). Овие резултати се совпаѓаат со истражувањата на *Fujii u sor.* (164), *Gujam u sor.* (165) и *Ferguson u sor.* (166). Исто така, во нашата серија резултатите од статистичката анализа потврдуваат поретка асоцираност на васкуларната инвазија со Luminal A карциномите во споредба со HER2+ ($p=0,0005$) и со Triple- карциноми ($p=0,04$).

Појавата на васкуларна инвазија поретко се јавува кај Luminal B карциноми на дојка во споредба со HER2+ ($p=0,038$) и Triple- карциноми во однос на HER2+ карциноми ($p=0,03$). И оваа асоцираност е опишана во многу студии (155, 167) со напомена што одредувањето на лимфоваскуларната инвазија е субјективна метода која изискува специјални хистохемиски или имунохистохемиски методи на детекција а во поново време и користење на современи анализирачки компјутерски системи. Во однос на 5-годишното преживување без болест, лимфоваскуларната инвазија во нашата серија, покажа само благ тренд на сигнификантност во однос на појавата на рецидиви, и тоа во мултиваријантната анализа. Ова не е во согласност со сличните студии во

достапната литература (165, 167-169), каде лимфоваскуларната инвазија заедно со некои други класични или помалку проучувани хистоморфолошки параметри како што се стадиумот на болеста, лимфоцитниот инфилтрат и дезмопластичната стромална реакција се предиктори во однос на одредувањето на ризикот од појавата на релапси. Од друга страна во студиите на *Cherbal u cop.* (137), *Barnard u cop.* (155) и *Voduc u cop.* (90) не е најдена асоцираност на лимфоваскуларната инвазија со појавата на релапси во регресионите модели на анализа како и во нашата серија. Причината е во гореспоменатиот факт на неупотребени објективни методи на детекција со кои би се избегнал субјективниот пристап во евалуацијата на овие параметри како што се на пример васкуларните маркери CD31, CD34, anti-podoplanin, Factor VIII и D2-40, кои имаат поголема сензитивност и специфичност во однос на рутинското хематоксилин и еозин боење (170).

5.4.8 Лимфоцитен инфилтрат

Улогата на лимфоцитниот односно моноклеарно-клеточниот инфламаторен инфилтрат кај карцином на дојка е дискутабилен (161, 169). Во нашата серија, обемен лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат е послабо изразен кај хормон зависните тумори во споредба со HER2+ и Triple- карциноми. Тој податок, статистички потврдува дека Luminal A карциноми на дојка почесто имаат отсутен до слаб лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат, во споредба со HER2+ ($p=0,001$) и Triple- карциноми ($p=0,001$) каде лимфоцитниот инфилтрат е обемен. Исто така, Luminal B карцином на дојка почесто имаат отсутен до слаб лимфоцитарен инфламаторен инфилтрат, во споредба со HER2+ ($p=0,0007$) и Triple- карциноми ($p=0,02$). Овие резултати се слични со резултатите во студијата на *Gupta u cop.* (125) каде авторот ја нагласува директната асоцираност на присуството на инфламаторниот инфилтрат со степеност на туморската диференцијација – подобро диференцирани тумори имаат слаб до отсутен имунолошки одговор и обратно. Исти согледувања се објавени и во студијата на *Goldberg u cop.* (171) и *Chavey u cop.* (172) кои ја нагласуваат улогата на цитокините во активацијата на лимфоцитите кај различни молекуларни типови на карцином на дојка при што е утврдено дека хормон негативните тумори предизвикуваат висок ниво на цитокини кои ја активираат лимфоцитната популација и предизвикуваат соодветен имун одговор.

Во анализата за 5-годишно DFS, лимфоцитарниот инфламаторен инфилтрат како прогностички параметар се покажа како несигнификантен фактор за преживување ($p = 0,349$). Исти се и резултатите во мултиваријантаната и униваријантната анализа на студиите на *Goldberg u cop.* (171) и *Chavey u cop.* (172) но не и во студијата на *Ni u cop.* (167) каде обемен лимфоцитен инфилтрат заедно со високиот стадиум на болеста, лошиот степен на хистолошка диференцијација и отсутството на дезмопластичната стромална реакција се појавуваат како независни ризик фактори во однос на појавата на рецидиви. Можното објаснување на ова несогласување со нашата и резултатите од сличните студии е веројатно во фактот што во сериите каде е почеста застапеноста на HER2+ и Triple- тумори, лимфоцитниот инфилтрат во Cox-овите регресиони анализи ќе се појави како независен прогностички параметар заедно со некои други параметри кои изостануваат кај хормон позитивните тумори (како на пример степенот на хистолошка диференцијација и дезмопластичната стромална реакција) (173).

5.4.9 Некроза

Туморската некроза е исто така често испитуван параметар во студиите на специфичното и општото преживување кај карцином на дојка (174). Нашата студија покажа дека туморската некроза, е послабо изразена кај карциномите од групата Luminal A (17,65%) и Luminal B (28,75%) во споредба со HER2+ (36,11%) и Triple-карциноми (68%). Овие опишани разлики се потврдија статистички како високо сигнификантни меѓу групите Luminal A и HER2+ ($p=0,0005$), Luminal B и HER2+ ($p=0,038$) и меѓу HER2+ и Triple- карциноми ($p=0,03$). Тестираната разлика во 5-годишно преживување без болест, меѓу групата без некроза и со некроза, статистички е сигнификантна ($p = 0,031$). Карциноми на дојка без туморска некроза имаат подолго време на DFS компарирано со карциноми со присутна некроза што е потврдено и во мултиваријантната анализа со 2,059 95% CI (1,052 – 4,03) пати сигнификантно поголем ризик од појава на локорегионална или далечна метастаза. Овие резултати се во согласност со испитувањата во слични студии како на пример во студијата на *Gupta u sor.* (125), каде туморската некроза е во корелација ($p=0,001$) со туморскиот дијаметар (поголеми тумори) и степенот на хистолошка диференцијација (G3). Овој податок е верифициран и во студијата на *El-Hawary u sor.* (175), во која некрозата се издвојува како неповолен прогностички параметар кај HER2+ и Triple- карциноми со полоша прогноза во однос на појавата на рани локорегионални метастази и пократко време на DFS.

5.4.10 Дезмоплазија

Во последната деценија, дезмопластичната стромална реакција на туморите е широко проучувана и особено присутна во литературата каде се нагласуваат генетските и молекуларно-биолошките профили на карцином на дојка (3, 67, 176). Според некои автори дезмоплазијата се поврзува со канцер асоцирани фибробласти од кои едните имаат инхибиторна, а другите имаат активаторна улога во туморскиот раст (177). Согласно на тој податок, се јавуваат и различни резултати во студиите каде дезмоплазијата е анализирана како прогностички параметар како во студиите на *de Kruiff u sor.* (178), и *Ahn u sor.* (179). Резултатите од истражувањето во нашата студија покажуваат почеста застапеност на дезмопластичната стромална реакција кај луминалните типови на карциноми (80,39% кај Luminal A и 71,25% кај Luminal B карциноми) во споредба со HER2+ (61,11%) и Triple- карциноми (48%) на дојка. Исто така, статистички сигнификантно почест е наодот на дезмопластична стромална реакција во групата Luminal A во споредба со HER2+ ($p=0,047$) и во споредба со Triple-карциноми ($p=0,0039$) како и на Luminal B карцином во споредба со Triple- карциноми ($p=0,032$). Од друга страна овој фактор се покажа статистички несигнификантен во однос на 5 годишното DFS, како во униваријантната така и во мултиваријантната регресиона анализа на Cox. Нашите анализи се совпаѓаат со резултатите од другите студии како на пример на *Ying-Chen u sor.* (180) и *Evans u sor.* (181) но не и со испитувањата на *Tchou u sor.* (182) и *Bergamaschi u sor.* (183). Исто така, *Alexandar u sor.* (176) и *Evans u sor.* (181), упатуваат на тоа дека радиографски детектирани тумори со стелатни маргини и со хистолошки верифицирана изразена дезмоплазија, се почесто присутни кај хормон позитивните карциноми на дојка со мал дијаметар и со негативни лимфни јазли. Образложението за овие несовпаѓања најверојатно е во тоа

што малигните клетки на карцином на дојка во зависност од молекуларниот профил генерираат различни канцер асоцирани фибробласти со специфична генска експресија и соодветно на тоа различен степен на дезмопластична стромална реакција. Така на пример *Bergamaschi u sor.* (183) нагласуваат дека екстрацелуларните матрикс металопротеинази од различни класи ја диктираат експресијата на молекуларните подтипови, како што се матрикс металопротеинази - 4 кои се присутни кај хормон позитивните тумори и матрикс металопротеинази - 1, присутни кај хормон независни тумори.

5.4.11 Еластоза

Еластозата е еден од послабо анализираните параметри кај карцином на дојка. Во нашата студија и покрај тоа што постои значителна процентна разлика во однос на застапеноста на еластозата во сите 4 молекуларни фенотипови, сепак таа е статистички несигнификантна. Истиот податок се потврди и во униваријантаната анализа каде пациентките со присутна еластоза несигнификантно имаат подолго време на DFS во однос на пациентките без еластоза. Слични резултати се прикажани и во студиите на *Barnes u sor.* (174) и *Azizun-Nisa u sor.* (126), каде еластозата е несигнификантна, како прогностички фактор, ни во однос на времето на преживување без болест ниту пак при општото преживување. Од друга страна, во една постара студија на *Lima-de Almeida u sor.* (184), утврдена е високо сигнификантна асоцираност меѓу појавата на еластоза со експресијата на естрогениот и прогестеронскиот рецептор. Според оваа студија се смета дека еластозата е резултат на присуството на хормон зависни стромални клетки кај карцином на дојка и важи како прогностички поволен параметар. Овие резултати се совпаѓаат со трудот на *Gupta u sor.* (125) каде е прикажано дека еластозата корелира со статусот на хормонските рецептори ($p=0,002$) и е присутна кај туморите од тип Luminal A и Luminal B, додекаа во студијата на *Ying-Chen u sor.* (180), еластозата е асоцирана и со нискиот пролиферативен индекс, добрата диференцираност на туморот и отсуството на рецидиви – карактеристики на карцином на дојка од тип Luminal A. Како образложение за оваа појава се наведува дека белковината еластан чија продукција е зависна од нивото на стероидните хормони, ја редуцира ангиогенезата и го успорува туморскиот раст што од своја страна е и одговор зошто туморите од луминален тип (особено Luminal A), имаат мал туморски дијаметар(180).

5.4.12 Калцификации

Присуството на калцификати е едно од најважните радиолошки обележја во рана детекција на карцином на дојка. На целуларно ниво, според хипотезите во некои студии (185) кај полошо диференцираните карциноми на дојка кои ја губат експресијата на цитокератини, клетките под дејство на специфични стимули попримаат мезенхимни карактеристики (стануваат позитивни за мезенхимниот маркер Виментин) и се трансформираат во остеобластни клетки, способни да формираат микрокалцификати. Присуството на калцификати кај карцином на дојка се често асоцирани со полоша прогноза и се јавуваат кај 30-50% пациентки како што е наведено во студијата на *Cox u Morgan* (186). Во нашата студија калцификацијата во примарниот тумор е присутна кај 43,23% (41,18% - Luminal A, 52,5% - Luminal B, 44,44% - HER2+, и 16% Triple-). Постои статистички сигнификантна разлика во појавата на

калцификати меѓу Luminal A наспроти Triple- карциноми ($p=0,028$), меѓу Luminal B наспроти Triple- карциноми ($p=0,001$), и меѓу HER2+ и Triple- карциноми. Присуството на калцификати, кај пациентките со карцином на дојка, дава незначајно пократко време на преживување без болест за период од 5 години. Овие резултати во нашата студија не се совпаѓаат со резултатите од слични студии во кои е анализирана предиктивната возраст во однос на молекуларните фенотипови. Според *Naseem u cop.* (187), појавата на калцификати е асоцирана со HER2+ тумори и со поодминатата возраст на пациентките како и со поголем ризик кон појава на релапси. Исто така и во студиите на *Ling u cop.* (188) и *Song u cop.* (189), е нагласено дека појавата на калцификати е неповолен прогностички параметар во однос на појавата на релапси (*Ling* на серија од 721 пациентки со 8 годишен период на следење), и во трансформацијата на лошо диференцирани примарни карциноми во метапластичен при појава на локорегионален рецидив (189). Можното објаснување за овие несовпаѓања е дадено во студиите на *Cox u cop.* (186), во кои е нагласен различниот тип на минерализација на стромалното туморско ткиво – присуството на калциум оксалат кај бенигни лезии и хидрокси апатит, воглавно присутен кај малигни тумори на дојка. Исто така, кај мали тумори со дезмопластична строма, кај кои е оневозможена ангиогенезата, се појавува т.н феномен на “burn - out” (190), односно индуцирана исхемија во која малигните клетки спонтано пропаѓаат, а на местото на нивното постоење се јавуваат подоцна микрокалцификати, што е особено нагласено кај хормон позитивните тумори (191).

5.5. ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ ПАРАМЕТРИ КАКО ПРЕДИКТОРИ ВО ПОЈАВА НА РЕЛАПСИ

5.5.1 Протеински дериват на тумор супресорски ген - p53

Во испитувана серија на нашата студија, позитивна експресија на тумор супресорски ген p53 е регистрирана кај 56 (29,17%) карциноми на дојка од кои кај 7,84% Luminal A карциноми, кај 26,25% Luminal B карциноми, кај 44,44% HER2+ карциноми, и кај најголем процент - 60%, Triple- карциноми. Овие резултати се слични со резултатите од студијата на *Bertheau u cop.* (192) кои објавуваат експресија на p53 протеинскиот продукт кај 17% Luminal A, 41% Luminal B, 50% HER2+ и кај 88% Triple- карциноми на дојка.

Корелацијата на p53 протеинскиот продукт во однос на молекуларните типови покажа поретко асоцираност на Luminal A карциномите во однос на Luminal B, на HER2+ карциноми и во однос на Triple- карциноми ($p<0,01$). Исто така, позитивна експресија на p53 поретко е асоцирана со Luminal B карциноми во однос на Triple- карциноми ($p<0,01$). Овие резултати се соодветни на резултатите од испитуваните серии на *Rossner u cop.* (193). на серија од 859 пациенти и на *Dookeran u cop.* (194). на серија од 331 пациентки, каде постои слична експресија на протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53 во однос на молекуларните подтипови на карциноми на дојка.

Нашата серија покажа дека позитивната експресија на тумор супресорскиот ген p53 е асоцирана со рецидив кај 27,7 % пациентки со рак на дојка, и со стапка на 5-годишно преживување без болест од 53,1%. Пациентките со карцином на дојка со позитивен p53, имаат несигнификантно пократко време на 5 годишно преживување без болест, споредено со пациентките без експресија на овој ген ($p = 0,093$). Слични се

и резултатите од испитувањата на *Serra u sor.* (195) како и на *Chen u sor.* (196) во кои не е најдена корелација на експресијата на p53 со времето на преживување без болест и со општото преживување. За разлика од тоа, во студиите на *Lai u sor.* (197) како и на *Nishimura u sor.* (198), експресијата на p53 е асоцирана со пократко 5 годишно време на преживување без болест, особено кај пациентки со слабо изразена прогестеронска активност на туморот и со висок степен на пролиферативна активност што е карактеристика на некои Luminal B карциноми. Истото тоа го потенцираат и *Rossner u sor.* (193) како и *Ihemelandu u sor.* (199) кои објавуваат инверзна корелација на експресијата на p53 во однос на хормонскиот статус и во однос на експресијата на bcl2 онкопротеинот. Објаснувањата за различната експресија на p53 во разни серии се дадени во студиите на *Lai u sor.* (197) и *Dookeran u sor.* (194) во кои се потенцира одредување на типот на мутацијата, бидејќи кај некои карциноми доволна е мала missense мутација и таа веднаш да се рефлектира во локорегионалните или далечните метастази иако примарниот тумор припаѓал на категоријата на хормон позитивни тумори со добри прогностички параметри. Од друга страна што е повисок стадиумот на болеста, помладата возраст на пациентката и полошата диференцираност на туморот, многу е поверојатно дека истата во примарниот тумор содржи мал хетероген фокус со популација на p53 позитивни клетки кои понатаму, во текот на следење ќе се одразат во локорегионалните или далечните метастази (194, 198).

5.5.2 Проллиферативен индекс Ki67 како маркер на биолошка агресивност

Проллиферативниот индекс Ki67 е континуирана варијабла и е важен параметар во дискриминацијата на карциномите од типот Luminal A и Luminal B, и е одличен биомаркер во детерминацијата на Luminal B карциноми на дојка. Во нашата серија и статистички се потврдува дека Luminal B, HER2+ и Triple- карциноми имаат високо сигнификантно поголема биолошка агресивност во споредба со Luminal A карциномите ($p < 0,01$). Исто така анализата со методот на Kaplan-Meier го потврди степенот на пролиферативна активност на туморот, изразена преку Ki-67, како сигнификантен фактор за 5 годишното DFS ($p = 0,011$). Пациентките со карцином на дојка со висок степен на биолошка агресивност на туморот (над 14%), имаат значајно полошо, односно пократко 5-годишно преживување без болест, компарирано со пациентките со низок степен на биолошка агресивност. Како и во нашата студија, така и студиите на *de Azembuja u sor.* (200) и *Ali u sor.* (201), покажуваат статистички сигнификантна асоцираност меѓу експресијата на Ki67 и ризикот од релапси. Евалуацијата на пролиферативниот индекс е подолго време тема на дискусија, особено во однос на дискриминацијата на хормон позитивните тумори кои припаѓаат на категоријата Luminal A и Luminal B. Во некои студии таа е 10% (202) а во некои изнесува 20% (2, 151), што резултирало со поголем број карциноми во категоријата Luminal A. Со студијата на *Yanagawa u sor.* (203), направена е ревизија во класификацијата на молекуларните типови на карциноми на дојка согласно на степенот на пролиферативна активност врз основа на *St. Gallen International expert Consensus 2011* и нивните геномски карактеристики. И во оваа студија како и во нашата, Luminal A карциноми на дојка (30,6%) со степен на пролиферативна активност под 14% се помалку застапени во однос на бројот на Luminal B карциноми (45%) кои имаат пролиферативна активност над 14%. Нашите резултати покажуваат дека карцином на дојка со пролиферативен индекс Ki-67 повисок од 14%, за 2,803 95% CI(1,222 – 6,432) пати сигнификантно го

зголемува ризикот за метастазирање односно појава на релапси споредено со пролиферативниот индекс понизок од 14%. Како и во униваријантната Сох-ова регресиона анализа така и во мултиваријантната анализа, пролиферативниот индекс Ki67, заедно со возраста, туморскиот дијаметар, лимфонодалниот индекс и стадиумот на болеста е независен прогностички параметар во однос на ризикот од појава на релапси. Слични резултати се објавени и на поголеми серии од пациенти во студиите на *Parise u cop.* (204), *Ferguson u cop.* (166), *Lee u cop.* (168), *Shim u cop.* (205) и *El-Hawary u cop.* (175).

5.5.3 Bcl2 онкопротеин

Експресијата на bcl2 онкопротеинот, е опишана во многу студии како прогностички параметар кај карцином на дојка (2, 75, 201, 206). Во нашата студија експресијата на bcl2 почесто се регистрира кај пациентките со Luminal A карцином, во однос на Luminal B, во однос на пациентките со HER2+, и во однос на пациентките со Triple- карцином ($p < 0,01$). Не е забележана статистичка сигнификантност во останатите три групи меѓусебно. Оваа дистрибуција е забележана и во студиите на *Callagy u cop.* (207) на серија од 930 пациентки и на серија од 178 пациентки во студијата на *Chen u cop.* (208), во кои е утврдено дека експресијата на bcl2 е асоцирана со помали, добро диференцирани тумори, со низок степен на пролиферативна активност, кои воглавно припаѓаат на групата Luminal A и се силен предиктор во однос на поволниот исход на болеста. *Chen u cop.* (208) во својата студија нагласува дека Luminal A карциноми на дојка со слабо изразена експресија на bcl2, а висок степен на пролиферативна активност или висок митотски индекс, се кандидати за појава на локорегионални метастази и покрај сите поволни прогностички параметри, со што ја дели оваа група на две помали подгрупи: неповолна, bcl2-низок/Ki67-висок и поволна прогностичка субгрупа, bcl2-висок/Ki67низок. Резултатите од Log Rank тестот во нашата студија и вредноста на $p = 0,006$ покажуваат дека експресијата на онкопротеин bcl2 е асоцирана со сигнификантно подолго 5-годишно DFS. Оттука и сигнификантноста на овој маркер во мултиваријантната анализа која покажа дека пациентките со изразена експресија на bcl2, имаат за 0,278 95% CI (0,105 – 0,735) пати значајно помал ризик од појава на локо-регионална или оддалечена метастаза во споредба со оние без експресија на bcl2. Истите резултати се опишани и во гореспоменатите студии како и во студиите на *Callagy u Ali u cop.* (201, 207).

5.6. ИМПЛИКАЦИИ ОД РЕЗУЛТАТИТЕ ОД МУЛТИВАРИЈАНТНАТА АНАЛИЗА

Во поголем број на студии кои се наведени и компарирани со резултатите од нашата студија, користен е Сох-овиот регресионен модел. Со оваа статистичка анализа се евалуирани меѓусебните корелации на гореопишаните прогностички параметри за да се идентифицира комбинацијата на варијаблите кои имаат најголемо предиктивно значење во однос на преживувањето без болест кај пациентки со карцином на дојка. Заради тоа, овој регресионен модел на статистичка обработка беше користен за дефинитивна анализа на прогностички важните параметри во оваа студија. При тоа, како прогностички најважни параметри кои се однесуваат за сите молекуларни подтипови на карцином на дојка се селектирани следните: возраста, туморскиот дијаметар, лимфонодалниот индекс, стадиумот на болеста и пролиферативниот

индекс. Овие резултати од мултиваријантната анализа можат да послужат понатаму како основа на други студии а нивната апликација може да се изведе на два начина. Едниот начин е преку одредувањето на ризикот од појава на релапси како што е прикажано во нашата студија (HR-hazard ratio), кој покажува какво е влијанието на секој од нив во однос на исходот од болеста (со или без рецидиви). Вториот начин е пресметувањето на индивидуалниот ризик, односно одредувањето на прогностичкиот индекс за секој пациент посебно. Во однос на одредувањето на ризикот од релапси (HR-hazard ratio), кај секој молекуларен подтип одделно, се издвоија три параметри и тоа: возраста, туморскиот дијаметар и стаидумот на болеста.

Во нашата серија, просечната возраст на пациентките во сите анализирани групи карциноми е пониска кај пациентките со релапс на болеста и независен предиктор кај сите подтипови, но статистички сигнификантна разлика ($p = 0,037$) се потврдува само во групата на Triple- карциноми. Тоа значи дека, пациентките со Triple- карцином на дојка, се значајно помлади во споредба со пациентките со овој тип на карцином без релапс на болеста, кај кои во период од 5 години постоперативно повторно се јавила болеста. Овие согледувања се слични со испитувањата на некои автори во повеќе студии (99, 132, 137), каде се анализирани и некои други прогностички фактори (паритет, раса, социо-економски услови и сл.) кои не се предмет на нашите испитувања, но без оглед на тоа во сите е нагласен фактот дека Triple- карцином се основен белег на помлади пациентки (166, 175).

Во однос на вториот сигнификантен параметар, просечната големина на туморот е поголема кај пациентките со релапс на болеста во сите 4 групи, но статистички сигнификантна е разликата меѓу пациентките со и без релапс само во групата Triple- карциноми ($p=0,016$). И овие испитувања се совпаѓаат со анализите на други автори (104, 134, 168) во кои е даден и осврт на застапеноста на овој молекуларен подтип во однос на генетската предиспозиција и етничката припадност (205, 209).

Третиот независен прогностички параметар, стадиумот на болеста, се потврди како независен сигнификантен предиктор за DFS во групата Luminal A и Luminal B. Luminal A карциномите на дојка во стадиум III даваат 4,843 95% CI (3,443 – 7,364) пати сигнификантно поголем ризик, споредено со карциномите од оваа група во стадиум I и II за појава на клинички верифицирана локо регионална или оддалечена метастаза, додека ризикот за Luminal B карциномите во стадиум III споредено со стадиум I и II е сигнификантен за 1,332 95% CI (1,11 – 2,01) пати. Овие согледувања се во корелација со испитувањата од студиите на неколку автори (155, 173, 210) кои наведуваат дека туморскиот дијаметар и лимфонодалниот статус кои се основа при одредувањето на стадиумот на болеста, битно се разликуваат во ист стадиум на болест и кај Luminal A и кај Luminal B карциноми на дојка. Насочувајќи на можноста во барање на некој параметар со поголема предиктивна вредност, Wu и сор.(128) таа можност ја анализирале преку бројот на негативните лимфни јазли како предиктор во однос на преживувањето, а во студиите на Vinh-Hung и сор.(138, 141) и Woodward и сор.(143) како прогностички важен параметар го истакнуваат лимфонодалниот однос односно лимфонодален индекс како алтернатива во одредувањето на лимфонодалниот статус (pN), како параметар од постоперативната хистопатолошка класификација.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на поставените цели на оваа студија може да се издвојат следниве заклучоци.

Во оваа студија од 192 пациентки со карцином на дојка, се анализирани корелациите на клиничките и морфохистолошките параметри со параметрите од молекуларниот подтип на карцином на дојка изразени преку нивната имунохистохемиска експресија.

Најзастапен имунофенотип во оваа серија се Luminal B карциноми на дојка (41,6%), па Luminal A (26,6%), HER2+ (18,7%) и најретки се тројно негативните односно Triple – (13,1%).

Статистичката анализа на направените корелации во однос на испитуваните параметри покажа дека, најмладите пациентки припаѓаат на категоријата Triple- карциноми (средна возраст од 50,24 години), а најстарите пациентки припаѓаат на Luminal A карциноми на дојка (средна возраст 57,57 години).

Најголем туморски дијаметар имаат пациентки во групата Triple – карциноми на дојка (просечен дијаметар 2,6 см), а најмал туморски дијаметар се среќава кај пациентки со Luminal A карциноми на дојка (1,8 см).

Појавата на лимфонодални метастази при презентација на болеста е најзастапена кај HER2+ карциноми, поретка кај Luminal B и Triple –, и најретка кај Luminal A.

Стадиумот на болеста е во корелација само меѓу карциноми од типот Luminal A и Luminal B.

Најлошо диференцирани карциноми на дојка со сите модалитети кои го одредуваат степенот на хистолошка диференцијација (формирање на тубули, нуклеарен градус и митотски индекс) се во категоријата на Triple – и HER2+ а веднаш зад нив следи и Luminal B. Карциноми од тип Luminal A се најдобро диференцирани.

Нотингемскиот прогностички индекс (модалитет од 0,8 – многу лош) е најнеповолен прогностички параметар кај HER2+ и Triple- карциноми на дојка, зад кои следат Luminal B и на крај Luminal A кои имаат најдобар Нотингемски прогностички индекс.

Лимфоваскуларната емболизација е карактеристика на HER2+ и Luminal B карциноми на дојка, а е послабо застапена кај Triple – и кај Luminal A.

Лимфоцитниот инфламаторен инфилтрат е карактеристика на Triple – и HER2+ карциноми на дојка а поретко се детектира кај Luminal B и најретко кај Luminal A карциноми на дојка.

Туморската некроза е карактеристика на Triple- и HER2+ карциноми на дојка. Многу е поретка кај Luminal B и скоро отсутна кај Luminal A карциноми на дојка.

Дезмопластичната стромална реакција и присуството на еластоза се карактеристика на Luminal A карциноми на дојка и се поретка хистолошка слика кај останатите три групи.

Калцификатите се најчести кај карциноми од тип Luminal B и HER2+, а поретки кај Luminal A и Triple-.

Експресијата на пролиферативниот индекс Ki67 е најслабо застапена кај Luminal A карциноми на дојка во споредба со останатите три групи.

Според очекувањата, експресијата на протеинскиот дериват на тумор супресорскиот ген p53 е најсилно изразена кај Triple- и кај HER2+ карциноми на дојка, а најслабо кај хормон позитивните тумори од тип Luminal A.

Обратно, експресијата на онкопротеинот bcl2 е најсилно изразена кај Luminal A карциноми на дојка а послабо во останатите три групи.

Процентот на појава на релапси во испитуваната серија од 173 пациентки кај кои е обезбедно следење изнесува 20% од кои најмал број на релапси од 12,5% е во групата на пациентки со Luminal A, а најголем процент од 28,12% според очекувањата е во групата на HER2+ карциноми на дојка.

Во однос на преживувањето без болест (DFS), според резултатите од униваријантната анализа, како прогностички неповолни прогностички параметри за целата серија пациентки се издвојуваат: возраст под 40 години, туморски дијаметар над 2 см, лимфонодален однос поголем од 0,8, висок стадиум на болеста, висок митотски индекс, неповолен Нотингемски прогностички индекс над 5,41, присутна туморска некроза, висок степен на пролиферативна активност и негативна експресија на онкопротеинот bcl2.

Според резултатите од мултиваријантната анализа како независни сигнификантни предиктори за појава на болест, односно локорегионални или далечни метастази се издвојуваат: возраста, туморскиот дијаметар, лимфонодалниот однос, стадиумот на болеста и високиот степен на пролиферативна активност детерминирана преку Ki67.

Како независни, прогностички неповолни фактори во однос на молекуларните подтипови на карцином се издвојуваат возраста, туморскиот дијаметар и стадиумот на болест.

Според овие неповолни фактори може да се дадат и одговори на поставените прашања во целите од трудот и да се заклучи следново:

Пациентка со возраст под 40 години во групата Luminal A, има подобра прогноза во однос на појава на релапс во споредба со пациентка на иста возраст која припаѓа на категоријата Luminal B или Triple – карцином на дојка.

Пациентка со Luminal A карцином на дојка со туморски дијаметар под 2 см има помала веројатност од појава на локорегионални или далечни метастази во споредба со пациентка со HER2+ или Triple- карцином со ист туморски дијаметар.

Пациентка со Luminal A карцином на дојка во I или II стадиум на болест е со помала веројатност да има релапси во однос на пациентки со Luminal B или HER2+ карцином на дојка во ист стадиум.

Појавата на релапси е почеста кај пациенти со Luminal B карцином на дојка кај кои при презентација на болеста хистолошки се верифицирани позитивни регионални лимфни јазли.

Појавата на релапси е почеста кај HER2+ карциноми на дојка кај кои при презентација на болеста хистолошки е детектирана емболизација во крвните садови.

7. ЛИТЕРАТУРА:

1. Soerjomataram I, Louwman MW, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(3):309-30.
2. Eden P, Ritz C, Rose C, Ferno M, Peterson C. "Good Old" clinical markers have similar power in breast cancer prognosis as microarray gene expression profilers. *Eur J Cancer.* 2004;40(12):1837-41.
3. F M. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology.* Berlin: Heidelberg-Springer; 2007.
4. Ellis IO SS, Sastre-Garau X, Bussolati G, Tavassoli FA, Eusebi V, et al. *Invasive Breast Carcinoma.* 3rd ed. Tavassoli FA DP, editor. Lyon, France: IARC Press; 2003.
5. Riley RD, Abrams KR, Sutton AJ, Lambert PC, Jones DR, Heney D, et al. Reporting of prognostic markers: current problems and development of guidelines for evidence-based practice in the future. *Br J Cancer.* 2003;88(8):1191-8.
6. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet.* 1998;352(9132):930-42.
7. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(19):10869-74.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2015;136(5):E359-86.
10. Hildreth NG, Shore RE, Dvoretzky PM. The risk of breast cancer after irradiation of the thymus in infancy. *The New England journal of medicine.* 1989;321(19):1281-4.
11. Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW, Jr., et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *British journal of cancer.* 2002;87(11):1234-45.
12. McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, et al. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Cohort Study. *Jama.* 2003;290(10):1331-6.
13. Johnson TW, Anderson KE, Lazovich D, Folsom AR. Association of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2002;11(12):1586-91.
14. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas.* 2001;38(1):103-13; discussion 13-6.
15. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England journal of medicine.* 2000;343(2):78-85.
16. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer.* 1996;77(11):2318-24.
17. Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, et al. Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study. *Jama.* 1993;270(3):338-43.
18. Zeleniuch-Jacquotte A, Shore RE, Koenig KL, Akhmedkhanov A, Afanasyeva Y, Kato I, et al. Postmenopausal levels of oestrogen, androgen, and SHBG and breast cancer: long-term results of a prospective study. *British journal of cancer.* 2004;90(1):153-9.

19. Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P, Levitz M, Shore RE, Koenig KL, Banerjee S, et al. Endogenous estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in postmenopausal women. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1995;4(8):857-60.
20. Weinstein IB. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer research*. 1988;48(15):4135-43.
21. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(12):5258-65.
22. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer research*. 1991;51(12):3075-9.
23. Devilee P, Schuurin E, van de Vijver MJ, Cornelisse CJ. Recent developments in the molecular genetic understanding of breast cancer. *Critical reviews in oncogenesis*. 1994;5(2-3):247-70.
24. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2002;347(25):1999-2009.
25. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
26. Poller DN, Roberts EC, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO. p53 protein expression in mammary ductal carcinoma in situ: relationship to immunohistochemical expression of estrogen receptor and c-erbB-2 protein. *Human pathology*. 1993;24(5):463-8.
27. Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopes CS. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer*. 1995;75(8):2123-31.
28. Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Human mutation*. 2003;21(3):292-300.
29. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science (New York, NY)*. 1994;266(5182):120-2.
30. Park WC, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(2):82-8.
31. Luukkainen T. Issues to debate on the Women's Health Initiative: failure of estrogen plus progestin therapy for prevention of breast cancer risk. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2003;18(8):1559-61.
32. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast cancer research : BCR*. 2002;4(5):197-201.
33. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Current opinion in cell biology*. 1999;11(2):184-9.
34. Hynes NE. Tyrosine kinase signalling in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2000;2(3):154-7.
35. Stern DF. ErbBs in mammary development. *Experimental cell research*. 2003;284(1):89-98.
36. Arteaga CL. Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2003;5(2):96-100.
37. Schroeder JA, Adriance MC, McConnell EJ, Thompson MC, Pockaj B, Gendler SJ. ErbB-beta-catenin complexes are associated with human infiltrating ductal breast and murine mammary tumor virus (MMTV)-Wnt-1 and MMTV-c-Neu transgenic carcinomas. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(25):22692-8.
38. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(32):30142-7.

39. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell*. 1995;82(4):621-30.
40. Dickson C, Fantl V, Gillett C, Brookes S, Bartek J, Smith R, et al. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer letters*. 1995;90(1):43-50.
41. Blackburn AC, Jerry DJ. Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer? *Breast cancer research : BCR*. 2002;4(3):101-11.
42. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2002;4(2):70-6.
43. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *British journal of cancer*. 1997;76(1):1-14.
44. Michaelson JS, Silverstein M, Wyatt J, Weber G, Moore R, Halpern E, et al. Predicting the survival of patients with breast carcinoma using tumor size. *Cancer*. 2002;95(4):713-23.
45. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(11):2090-100.
46. Silverberg SG. MS. Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology. The breast. New York: Churchill Livingstone; 1997. p. 579.
47. Simpson JF, Page DL. Status of breast cancer prognostication based on histopathologic data. *American journal of clinical pathology*. 1994;102(4 Suppl 1):S3-8.
48. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359-77.
49. Lee AH, Ellis IO. The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. *Pathol Oncol Res*. 2008;14(2):113-5.
50. Miller DV, Leontovich AA, Lingle WL, Suman VJ, Mertens ML, Lillie J, et al. Utilizing Nottingham Prognostic Index in microarray gene expression profiling of breast carcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2004;17(7):756-64.
51. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 1992;22(3):207-19.
52. Kollias J, Murphy CA, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. The prognosis of small primary breast cancers. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1999;35(6):908-12.
53. Roses DF, Bell DA, Flotte TJ, Taylor R, Ratech H, Dubin N. Pathologic predictors of recurrence in stage 1 (T1N0M0) breast cancer. *American journal of clinical pathology*. 1982;78(6):817-20.
54. Lee AK, DeLellis RA, Silverman ML, Heatley GJ, Wolfe HJ. Prognostic significance of peritumoral lymphatic and blood vessel invasion in node-negative carcinoma of the breast. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1990;8(9):1457-65.
55. Bettelheim R, Penman HG, Thornton-Jones H, Neville AM. Prognostic significance of peritumoral vascular invasion in breast cancer. *British journal of cancer*. 1984;50(6):771-7.
56. Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1994;24(1):41-7.
57. Barbareschi M, Dalla Palma P, Bevilacqua P, Maluta S, Caffo O, Meli S, et al. Invasive node-negative breast carcinoma: multivariate analysis of the prognostic value of peritumoral vessel invasion compared with that of conventional clinico-pathologic features. *Anticancer research*. 1994;14(5B):2229-35.
58. Clemente CG, Boracchi P, Andreola S, Del Vecchio M, Veronesi P, Rilke FO. Peritumoral lymphatic invasion in patients with node-negative mammary duct carcinoma. *Cancer*. 1992;69(6):1396-403.
59. Dawson PJ, Karrison T, Ferguson DJ. Histologic features associated with long-term survival in breast cancer. *Human pathology*. 1986;17(10):1015-21.

60. Fisher ER, Sass R, Fisher B, Gregorio R, Brown R, Wickerham L. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (protocol 6). II. Relation of local breast recurrence to multicentricity. *Cancer*. 1986;57(9):1717-24.
61. Caly M, Genin P, Ghuzlan AA, Elie C, Freneaux P, Klijanienko J, et al. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer research*. 2004;24(5B):3283-8.
62. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Val-Bernal JF. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histology and histopathology*. 2001;16(2):399-406.
63. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, et al. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer*. 1997;74(4):433-7.
64. Nakagomi H, Miyake T, Hada M, Hagiwara J, Furuya K, Muto S, et al. Prognostic and Therapeutic Implications of the MIB-1 Labeling Index in Breast Cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*. 1998;5(3):255-9.
65. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2005;16(11):1723-39.
66. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(8):1027-33.
67. Lakhani SR. El, Schnitt SJ., Tan PH., van de Vijver MJ. *WHO Classification of Tumors*. Washington DC: IARC Press; 2012. 110 p.
68. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-76.
69. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MB, Milanezi F, Carvalho S, Savage K, et al. EGFR amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *The Journal of pathology*. 2006;209(4):445-53.
70. Gholam D, Chebib A, Hauteville D, Bralet MP, Jasmin C. Combined paclitaxel and cetuximab achieved a major response on the skin metastases of a patient with epidermal growth factor receptor-positive, estrogen receptor-negative, progesterone receptor-negative and human epidermal growth factor receptor-2-negative (triple-negative) breast cancer. *Anti-cancer drugs*. 2007;18(7):835-7.
71. Castiglione F, Sarotto I, Fontana V, Destefanis M, Venturino A, Ferro S, et al. Bcl2, p53 and clinical outcome in a series of 138 operable breast cancer patients. *Anticancer research*. 1999;19(5C):4555-63.
72. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer research*. 2000;20(6B):4221-5.
73. Kroger N, Milde-Langosch K, Riethdorf S, Schmoor C, Schumacher M, Zander AR, et al. Prognostic and predictive effects of immunohistochemical factors in high-risk primary breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(1):159-68.
74. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *British journal of cancer*. 1994;69(1):135-9.

75. Abdel-Fatah TM, Powe DG, Ball G, Lopez-Garcia MA, Habashy HO, Green AR, et al. Proposal for a modified grading system based on mitotic index and Bcl2 provides objective determination of clinical outcome for patients with breast cancer. *The Journal of pathology*. 2010;222(4):388-99.
76. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992;20(6):479-89.
77. Morris SR, Carey LA. Molecular profiling in breast cancer. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2007;8(3):185-98.
78. Moll R, Krepler R, Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation; research in biological diversity*. 1983;23(3):256-69.
79. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2005;7(4):143-8.
80. Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *Journal of medical genetics*. 2004;41(1):1-5.
81. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(10):1321-8.
82. Dabbs DJ, Chivukula M, Carter G, Bhargava R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19(11):1506-11.
83. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, et al. Association between HER-2/neu and the progesterone receptor in oestrogen-dependent breast cancer is age-related. *Breast cancer research and treatment*. 2005;91(1):81-7.
84. Murad TM, Scharpelli DG. The ultrastructure of medullary and scirrhous mammary duct carcinoma. *The American journal of pathology*. 1967;50(2):335-60.
85. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3155-63.
86. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(16):9212-7.
87. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
88. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
89. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
90. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684-91.
91. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19(2):264-71.
92. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*. 2006;7:127.
93. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2008;109(1):123-39.
94. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basolumental carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and

luminal breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(14 Pt 1):4185-91.

95. Chivukula M, Bhargava R, Brufsky A, Surti U, Dabbs DJ. Clinical importance of HER2 immunohistologic heterogeneous expression in core-needle biopsies vs resection specimens for equivocal (immunohistochemical score 2+) cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2008;21(4):363-8.

96. Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, et al. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(4):R67.

97. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.

98. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007;50(4):434-8.

99. Bidard FC, Conforti R, Boulet T, Michiels S, Delaloge S, Andre F. Does triple-negative phenotype accurately identify basal-like tumour? An immunohistochemical analysis based on 143 'triple-negative' breast cancers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2007;18(7):1285-6.

100. Faratian D, Bartlett J. Predictive markers in breast cancer--the future. *Histopathology*. 2008;52(1):91-8.

101. Shin BK, Lee Y, Lee JB, Kim HK, Lee JB, Cho SJ, et al. Breast carcinomas expressing basal markers have poor clinical outcome regardless of estrogen receptor status. *Oncology reports*. 2008;19(3):617-25.

102. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *Journal of clinical pathology*. 2008;61(5):553-60.

103. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology*. 2006;49(1):10-21.

104. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52(1):108-18.

105. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Denoux Y, et al. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *The Journal of pathology*. 2005;207(3):260-8.

106. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *The American journal of surgical pathology*. 2006;30(9):1097-104.

107. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(2):R24.

108. Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin ML, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2008;21(10):1183-91.

109. Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2006;19(5):617-21.

110. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;450(1):73-80.

111. Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Cervera N, Tarpin C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(6):2170-8.
112. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(7):729-35.
113. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *The American journal of pathology*. 2002;161(6):1991-6.
114. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC cancer*. 2007;7:134.
115. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast cancer research : BCR*. 2007;9(1):R4.
116. McCarthy A, Savage K, Gabriel A, Naceur C, Reis-Filho JS, Ashworth A. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. *The Journal of pathology*. 2007;211(4):389-98.
117. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*. 2008;52(1):67-81.
118. Edge SB, BD, Compton CC., Fritz AG., Greene FL., Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, USA: Springer; 2010.
119. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(16):2784-95.
120. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11(2):155-68.
121. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of clinical pathology*. 1995;48(9):876-8.
122. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109(1):25-32.
123. Acevedo F, Camus M, Vial C, Panay S, Abarca M, Dominguez F, et al. [Predictive value of conventional immuno-histochemical biomarkers in breast cancer]. *Rev Med Chil*. 2015;143(6):724-32.
124. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7(5):e1000279.
125. Gupta D, Gupta V, Marwah N, Gill M, Gupta S, Gupta G, et al. Correlation of Hormone Receptor Expression with Histologic Parameters in Benign and Malignant Breast Tumors. *Iranian journal of pathology*. 2015;10(1):23-34.
126. Azizun N, 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.
127. Cortesi L, Marcheselli L, Guarneri V, Cirilli C, Braghiroli B, Toss A, et al. Tumor size, node status, grading, HER2 and estrogen receptor status still retain a strong value in patients with operable breast cancer diagnosed in recent years. *Int J Cancer*. 2013;132(2):E58-65.

128. Wu SG, Peng F, Zhou J, Sun JY, Li FY, Lin Q, et al. Number of negative lymph nodes can predict survival after postmastectomy radiotherapy according to different breast cancer subtypes. *J Cancer*. 2015;6(3):261-9.
129. Cao JQ, Truong PT, Olivotto IA, Olson R, Coulombe G, Keyes M, et al. Should women younger than 40 years of age with invasive breast cancer have a mastectomy? 15-year outcomes in a population-based cohort. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;90(3):509-17.
130. Wang L, Ouyang T, Wang T, Xie Y, Fan Z, Lin B, et al. Breast-conserving therapy and modified radical mastectomy for primary breast carcinoma: a matched comparative study. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(6):545-52.
131. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*. 2006;12(8):2468-75.
132. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
133. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(14):2373-8.
134. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5652-7.
135. Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A. Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2006;15(1):3-8.
136. Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djuricic I, et al. Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol*. 2014;8:107-11.
137. Cherbal F, Gaceb H, Mehemmai C, Saiah I, Bakour R, Rouis AO, et al. Distribution of molecular breast cancer subtypes among Algerian women and correlation with clinical and tumor characteristics: a population-based study. *Breast Dis*. 2015;35(2):95-102.
138. Vinh-Hung V, Verkooijen HM, Fioretta G, Neyroud-Caspar I, Rapiti E, Vlastos G, et al. Lymph node ratio as an alternative to pN staging in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1062-8.
139. Bland KI. Failure of routine axillary nodal sampling to predict survival outcomes in lymph node-negative (N0) breast cancer. *Ann Surg*. 2003;237(2):168-70.
140. Euhus DM. Are axillary lymph nodes still relevant in breast cancer ? *Ann Surg Oncol*. 2014;21(13):4051-3.
141. Vinh-Hung V, Nguyen NP, Cserni G, Truong P, Woodward W, Verkooijen HM, et al. Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer: a compiled update. *Future Oncol*. 2009;5(10):1585-603.
142. Truong PT, Woodward WA, Thames HD, Ragaz J, Olivotto IA, Buchholz TA. The ratio of positive to excised nodes identifies high-risk subsets and reduces inter-institutional differences in locoregional recurrence risk estimates in breast cancer patients with 1-3 positive nodes: an analysis of prospective data from British Columbia and the M. D. Anderson Cancer Center. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68(1):59-65.
143. Woodward WA, Vinh-Hung V, Ueno NT, Cheng YC, Royce M, Tai P, et al. Prognostic value of nodal ratios in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2910-6.
144. Dawood S, Hu R, Homes MD, Collins LC, Schnitt SJ, Connolly J, et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(1):185-92.

145. Xue C, Wang X, Peng R, Shi Y, Qin T, Liu D, et al. Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China. *Cancer Sci.* 2012;103(9):1679-87.
146. Okugawa H, Yamamoto D, Uemura Y, Sakaida N, Yamada M, Tanaka K, et al. Prognostic factors in breast cancer: the value of the Nottingham Prognostic Index for patients treated in a single institution. *Surg Today.* 2005;35(11):907-11.
147. Jakic-Razumovic J, Coric M, Vrbanec D, Babic D, Hlupic L, Belev B. [The value of searching for additional prognostic factors in combination with Nottingham Prognostic Index in breast carcinoma patients]. *Lijec Vjesn.* 2005;127(1-2):3-7.
148. 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(4):207.
149. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Mitotic indexes as prognostic predictors in female breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1992;118(1):75-81.
150. Bult P, Manders P, Straatman HM, Tjan-Heijnen VC, Beex LV, Hendriks J, et al. In primary breast cancer the mitotic activity yields similar prognostic information as the histological grade: a study with long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(1):77-86.
151. Klintman M, Strand C, Ahlin C, Beglerbegovic S, Fjallskog ML, Grabau D, et al. The prognostic value of mitotic activity index (MAI), phosphohistone H3 (PPH3), cyclin B1, cyclin A, and Ki67, alone and in combinations, in node-negative premenopausal breast cancer. *PLoS One.* 2013;8(12):e81902.
152. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3153-8.
153. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer--a Saudi population based study. *BMC Cancer.* 2010;10:223.
154. 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(7):1688-97.
155. Barnard ME, Boeke CE, Tamimi RM. Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1856(1):73-85.
156. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5158-65.
157. Adly S, Hewedi IH, Mokhtar NM. Clinicopathologic significance of molecular classification of breast cancer: relation to nottingham prognosis index. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2010;22(4):209-15.
158. D'Eredita G, Giardina C, Martellotta M, Natale T, Ferrarese F. Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution. *Eur J Cancer.* 2001;37(5):591-6.
159. Rostgaard K, Mouridsen HT, Vaeth M, Holst H, Olesen KP, Lynge E. A modified Nottingham prognostic index for breast cancer patients diagnosed in Denmark 1978-1994. *Acta Oncol.* 2001;40(7):838-43.
160. Wood WC. Close/positive margins after breast-conserving therapy: additional resection or no resection? *Breast (Edinburgh, Scotland).* 2013;22 Suppl 2:S115-7.
161. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(3):439-43.
162. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res.* 2009;7(1-2):4-13.
163. Hennigs A, Fuchs V, Sinn HP, Riedel F, Rauch G, Smetanay K, et al. Do Patients After Reexcision Due to Involved or Close Margins Have the Same Risk of Local Recurrence as Those After One-Step Breast-Conserving Surgery? *Ann Surg Oncol.* 2016.

164. Fujii T, Yajima R, Morita H, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, et al. Impact of vascular invasion of a primary tumor as a strong risk factor for disease recurrence in patients with node-positive breast cancer. *Am Surg.* 2015;81(5):523-6.
165. Gujam FJ, Going JJ, Edwards J, Mohammed ZM, McMillan DC. The role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival and methods of detection in patients with primary operable breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89(2):231-41.
166. Ferguson NL, Bell J, Heidel R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, et al. Prognostic value of breast cancer subtypes, Ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in Caucasian women. *The breast journal.* 2013;19(1):22-30.
167. Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Tse GM. A novel morphologic-molecular recurrence predictive model refines traditional prognostic tools for invasive breast carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(9):2928-33.
168. Lee Y, Kang E, Lee AS, Baek H, Kim EK, Park SY, et al. Outcomes and recurrence patterns according to breast cancer subtypes in Korean women. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151(1):183-90.
169. Turkoz FP, Solak M, Petekkaya I, Keskin O, Kertmen N, Sarici F, et al. Association between common risk factors and molecular subtypes in breast cancer patients. *Breast (Edinburgh, Scotland).* 2013;22(3):344-50.
170. Gujam FJ, Going JJ, Mohammed ZM, Orange C, Edwards J, McMillan DC. Immunohistochemical detection improves the prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in primary ductal breast cancer. *BMC Cancer.* 2014;14:676.
171. Goldberg JE, Schwertfeger KL. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Curr Drug Targets.* 2010;11(9):1133-46.
172. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlincho S, Boissiere F, Laune D, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R15.
173. Akbar M, Akbar K, Naveed D. Frequency and correlation of molecular subtypes of breast cancer with clinicopathological features. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2014;26(3):290-3.
174. Barnes NL, Boland GP, Davenport A, Knox WF, Bundred NJ. Relationship between hormone receptor status and tumour size, grade and comedo necrosis in ductal carcinoma in situ. *Br J Surg.* 2005;92(4):429-34.
175. El-Hawary AK, Abbas AS, Elsayed AA, Zalata KR. Molecular subtypes of breast carcinoma in Egyptian women: clinicopathological features. *Pathol Res Pract.* 2012;208(7):382-6.
176. Alexander MC, Yankaskas BC, Biesemier KW. Association of stellate mammographic pattern with survival in small invasive breast tumors. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(1):29-37.
177. Folgueira MA, Maistro S, Katayama ML, Roela RA, Mundim FG, Nanogaki S, et al. Markers of breast cancer stromal fibroblasts in the primary tumour site associated with lymph node metastasis: a systematic review including our case series. *Biosci Rep.* 2013;33(6).
178. de Kruijf EM, van Nes JG, van de Velde CJ, Putter H, Smit VT, Liefers GJ, et al. Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(3):687-96.
179. Ahn S, Cho J, Sung J, Lee JE, Nam SJ, Kim KM, et al. The prognostic significance of tumor-associated stroma in invasive breast carcinoma. *Tumour Biol.* 2012;33(5):1573-80.
180. Chen Y, Klingen TA, Wik E, Aas H, Vigeland E, Liestol K, et al. Breast cancer stromal elastosis is associated with mammography screening detection, low Ki67 expression and favourable prognosis in a population-based study. *Diagn Pathol.* 2014;9:230.
181. Evans AJ, Pinder SE, James JJ, Ellis IO, Cornford E. Is mammographic spiculation an independent, good prognostic factor in screening-detected invasive breast cancer? *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(5):1377-80.
182. Tchou J, Kossenkov AV, Chang L, Satija C, Herlyn M, Showe LC, et al. Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles. *BMC Med Genomics.* 2012;5:39.

183. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, Naume B, Triulzi T, Orlandi R, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J Pathol.* 2008;214(3):357-67.
184. Lima-de-Almeida FM, Brentani MM, Velludo MA, Goes JC, Baruffi I. Elastosis and steroid receptors in primary breast cancer. *Braz J Med Biol Res.* 1985;18(3):279-83.
185. Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, Pistolesse CA, Spagnoli LG, Bonanno E. Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics. *BMC Cancer.* 2014;14:286.
186. Cox RF, Morgan MP. Microcalcifications in breast cancer: Lessons from physiological mineralization. *Bone.* 2013;53(2):437-50.
187. Naseem M, Murray J, Hilton JF, Karamchandani J, Muradali D, Faragalla H, et al. Mammographic microcalcifications and breast cancer tumorigenesis: a radiologic-pathologic analysis. *BMC Cancer.* 2015;15:307.
188. Ling H, Liu ZB, Xu LH, Xu XL, Liu GY, Shao ZM. Malignant calcification is an important unfavorable prognostic factor in primary invasive breast cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2013;9(2):139-45.
189. Song Y, Liu X, Zhang G, Song H, Ren Y, He X, et al. Unique clinicopathological features of metaplastic breast carcinoma compared with invasive ductal carcinoma and poor prognostic indicators. *World J Surg Oncol.* 2013;11:129.
190. Morgan MP, Cooke MM, McCarthy GM. Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10(2):181-7.
191. Cox RF, Hernandez-Santana A, Ramdass S, McMahon G, Harmey JH, Morgan MP. Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralisation. *Br J Cancer.* 2012;106(3):525-37.
192. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast (Edinburgh, Scotland).* 2013;22 Suppl 2:S27-9.
193. Rossner P, Jr., Gammon MD, Zhang YJ, Terry MB, Hibshoosh H, Memeo L, et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. *J Cell Mol Med.* 2009;13(9b):3847-57.
194. Dookeran KA, Dignam JJ, Ferrer K, Sekosan M, McCaskill-Stevens W, Gehlert S. p53 as a marker of prognosis in African-American women with breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(5):1398-405.
195. Serra KP, Peres RM, Sarian LO, Vassallo J, Pinto GA, Silva GR, et al. Cyclooxygenase-2 (COX2) and p53 protein expression are interdependent in breast cancer but not associated with clinicopathological surrogate subtypes, tumor aggressiveness and patient survival. *Acta Histochem.* 2016.
196. Chen C, Yuan JP, Wei W, Tu Y, Yao F, Yang XQ, et al. Subtype classification for prediction of prognosis of breast cancer from a biomarker panel: correlations and indications. *International journal of nanomedicine.* 2014;9:1039-48.
197. Lai H, Ma F, Trapido E, Meng L, Lai S. Spectrum of p53 tumor suppressor gene mutations and breast cancer survival. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;83(1):57-66.
198. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Tashima R, Toyozumi Y, Arima N. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis. *World J Surg Oncol.* 2011;9:131.
199. Ihemelandu CU, Leffall LD, Jr., Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res.* 2007;143(1):109-18.
200. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1504-13.

201. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, Leung S, Nielsen T, et al. A Ki67/BCL2 index based on immunohistochemistry is highly prognostic in ER-positive breast cancer. *J Pathol.* 2012;226(1):97-107.
202. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.
203. Yanagawa M, Ikemoto K, Kawachi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes.* 2012;5:376.
204. Parise CA, Bauer KR, Brown MM, Caggiano V. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *The breast journal.* 2009;15(6):593-602.
205. Shim HJ, Kim SH, Kang BJ, Choi BG, Kim HS, Cha ES, et al. Breast cancer recurrence according to molecular subtype. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(14):5539-44.
206. Barbareschi M, Caffo O, Veronese S, Leek RD, Fina P, Fox S, et al. Bcl-2 and p53 expression in node-negative breast carcinoma: a study with long-term follow-up. *Hum Pathol.* 1996;27(11):1149-55.
207. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:153.
208. Chen LY, Tsang JY, Ni YB, Chan SK, Chan KF, Zhang S, et al. Bcl2 and Ki67 refine prognostication in luminal breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149(3):631-43.
209. Seshie B, Adu-Aryee NA, Dedey F, Calys-Tagoe B, Clegg-Lampsey JN. A retrospective analysis of breast cancer subtype based on ER/PR and HER2 status in Ghanaian patients at the Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *BMC Clin Pathol.* 2015;15:14.
210. Cirqueira MB, Moreira MA, Soares LR, Cysneiros MA, Vilela MH, Freitas-Junior R. Effect of Ki-67 on Immunohistochemical Classification of Luminal A to Luminal B Subtypes of Breast Carcinoma. *The breast journal.* 2015;21(5):465-72.