

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ – СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ – СКОПЈЕ



Ас. д-р Магдалена Богдановска Тодоровска

**ДЕТЕКЦИЈА НА АМПЛИФИКАЦИЈА НА HER-2/neu ОНКОГЕНОТ СО
ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИЈА: КОРЕЛАЦИЈА СО
ИМУНОХИСТОХЕМИСКАТА ЕКСПРЕСИЈА НА HER-2 ПРОТЕИНОТ И
КАНЦЕРСКИТЕ СТЕМ КЛЕТОЧНИ МАРКЕРИ КАЈ ИНВАЗИВНИ КАРЦИНОМИ НА
ДОЈКА**

Докторска дисертација

Ментор: проф. д-р Гордана Петрушевска

Скопје, 2018

БЛАГОДАРНОСТ

Би сакала да ја искажам мојата најголема благодарност за мојот ментор, проф. д-р Гордана Петрушевска, за укажаната доверба, за несебичната помош и поддршка, за сето посветено време и внимание, за сугестиите и насочувањата низ сите фази на изработката на докторскиот труд. За целокупното пренесеното знаење, за пренесената љубов кон патологијата, за сите совети, но и добронамерни критики кои имаат огромен придонес во мојата научно-стручна надградба. Голема чест е да ве имам за ментор!

Голема благодарност за проф. д-р Лилјана Спасевска и проф. д-р Весна Јаневска, за пренесеното стручно знаење, за сите добронамерни совети и поддршка во тек на моето стручно и научно усовршување.

Благодарност за проф. д-р Снежана Смичкоска и проф. д-р Милка Здравковска за искрената поддршка и соработка, како и за позитивната оценка на мојата работа.

Голема благодарност до целиот колектив на Институтот за патологија, за помошта и поддршката при изработката на дисертацијата.

Благодарност за моите родители, Ванчо и Младенка, за сета љубов која ми ја давате, за вербата во мене, за помошта и поддршката низ годините. Вие сте виновни за тоа што сум јас денес, за секој мој приватен и професионален успех.

Благодарност за родителите на мојот сопруг, Крсто и Гордана, што сите овие години несебично ме поддржуваа и ми помагаа, особено околу грижата за децата.

Огромна благодарност за моето семејство, мојот сопруг Александар, мојот син Матеј и ќерката Михаела, за огромната поддршката, трпението и разбирањето во тек на целиот процес на изработка на докторската дисертација. Вие сте мојата непресушна инспирација, мојата сила. Вие сте мојот живот!

***На Матеј и Михаела
Светлината на мојот живот***

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	7
SUMMARY	10
ЛИСТА НА СКРАТЕНИЦИ	13
1 ВОВЕД	
1.1 ЕПИДЕМИОЛОГИЈА	15
1.2 ЕТИОЛОГИЈА И ФАКТОРИ НА РИЗИК	15
1.3 ПРОГНОСТИЧКИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ КАЈ КАРЦИНОМ НА ДОЈКА	16
1.3.1 Клинички фактори	16
1.3.2 Хистопатолошки фактори.....	16
1.3.2.1 Големина на туморот.....	17
1.3.2.2 Хистолошки тип	17
1.3.2.3 Степен на хистолошка диференцијација.....	17
1.3.2.4 Статус на аксиларни лимфни жлезди.....	18
1.3.2.5 Класификационен систем.....	19
1.3.3 Туморски биомаркери.....	20
1.3.3.1 Хормонски рецепторски статус.....	20
1.3.3.2 HER-2 статус.....	21
1.3.3.2.1 Тест методи за одредување на HER-2 статус.....	22
1.3.3.3 Пролиферативен маркер Ki67.....	24
1.3.4 Молекуларни поттипови.....	25
1.3.5 Канцерски стем клетки.....	26
1.3.5.1 Модели на карциногенеза.....	26
1.3.5.2 Канцерски стем клеточни маркери.....	28
2 МОТИВ И ЦЕЛИ	
2.1 МОТИВ.....	30
2.2 ЦЕЛИ.....	31
3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	
3.1 ДИЗАЈН НА СТУДИЈА, ПАЦИЕНТИ И ТКИВНИ ПРИМЕРОЦИ.....	32
3.2 СВЕТЛОСНО МИКРОСКОПСКА АНАЛИЗА.....	33
3.3 ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИЈА.....	33
3.3.1 Протокол број 1.....	35
3.3.2 Протокол број 2.....	36
3.3.3 Евалуација на FISH резултатите.....	36
3.4 ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ БОЕЊА.....	41

3.4.1	Имунохистохемиска детекција на HER-2 протеинот.....	41
3.4.1.1	Евалуација на протеинската експресија на HER.....	42
3.4.2	Имунохистохемиска детекција на ER, PR, Ki67 и канцерските стем клеточни маркери (CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam).....	42
3.4.2.1	Евалуација на имунохистохемиските боења за ER, PR и Ki67.....	43
3.4.2.2	Дефинирање на молекуларните поттипови.....	43
3.4.2.3	Евалуација на имунохистохемиските боења за канцерските стем клеточни маркери: CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam.....	43
3.5	СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	44
4	РЕЗУЛТАТИ	
4.1	ДЕСКРИПТИВНА АНАЛИЗА НА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ.....	45
4.2	ВОВЕДУВАЊЕ, СТАНДАРДИЗАЦИЈА И ОПТИМИЗАЦИЈА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИОНА МЕТОДА – ВЛИЈАНИЕ НА ПРЕДНАЛИТИЧКИТЕ И АНАЛИТИЧКИТЕ ВАРИЈАБЛИ.....	47
4.2.1	Компарација на два различни протоколи за FISH.....	52
4.2.2	Корелација на резултатите за HER-2 добиени со имунохистохемиска и FISH метода	53
4.2.3	Корелација на амплификација на HER-2 генот со клиничко - патолошките параметри	63
4.2.4	Дистрибуција на поттиповите од имунохистохемиски дефинираната молекуларната класификација во корелација со клиничко-патолошките параметри.....	66
4.3	ЕКСПРЕСИЈА НА КАНЦЕРСКИТЕ СТЕМ КЛЕТОЧНИ МАРКЕРИ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ КАРАКТЕРИСТИКИ НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА.....	71
4.3.1	Експресијата на CD44 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко патолошки карактеристики на карциномот на дојка.....	71
4.3.2	Експресијата на CD24 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко патолошки карактеристики на карциномот на дојка.....	77
4.3.3	Експресија на CD133 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко патолошки карактеристики на карциномот на дојка.....	82

4.3.4	Експресијата на ALDH1A1 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко патолошки карактеристики кај карциноми на дојка.....	87
4.3.5	Експресијата на ЕрСам стем клеточниот маркер и корелација со клиничко патолошки карактеристики кај карциноми на дојка.....	93
4.3.6	Експресијата на стем клеточни маркери и корелација со молекуларните поттипови на карциноми на дојка.....	96
4.4	КОРЕЛАЦИЈА НА АМПЛИФИКАЦИЈА НА HER-2 ГЕНОТ СО КАНЦЕРСКИТЕ СТЕМ КЛЕТОЧНИ МАРКЕРИ.....	99

5 ДИСКУСИЈА

5.1	ВОВЕДУВАЊЕ, СТАНДАРДИЗАЦИЈА И ОПТИМИЗАЦИЈА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИОНА МЕТО ВЛИЈАНИЕ НА ПРЕДНАЛИТИЧКИТЕ И АНАЛИТИЧКИТЕ ВАРИЈАБЛИ.....	101
5.2	КОРЕЛАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЗА HER-2 ДОБИЕНИ СО ИМУНОХИСТОХЕМИСКА И FISH МЕТОДА.....	104
5.3	АМПЛИФИКАЦИЈА НА HER-2 ГЕНОТ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ.....	108
5.4	МОЛЕКУЛАРНИ ПОТТИПОВИ НА КАРЦИНОМИ НА ДОЈКА.....	110
5.5	ЕКСПРЕСИЈА НА СТЕМ КЛЕТОЧНИТЕ МАРКЕРИ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ КАЈ КАРЦИНОМИ НА ДОЈКА.....	112
5.5.1	Експресијата на CD44 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка.....	114
5.5.2	Експресијата на CD24 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка.....	116
5.5.3	Експресијата на CD133 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка.....	118
5.5.4	Експресијата на ALDH1A1 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка.....	120
5.5.5	Експресијата на ЕрСам стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка.....	123

5.5.6	Експресијата на стем клеточните маркери и корелација со молекуларните поттипови на карциноми на дојка.....	124
5.6	Корелација на амплификација на HER-2 со експресијата на канцерските стем клеточни маркери.....	127
6	ЗАКЛУЧОЦИ.....	130
7	ЛИТЕРАТУРА.....	133

АПСТРАКТ

Вовед

Точното и прецизно одредување на HER-2 статусот кај пациентите со карцином на дојка е императив при нивната селекција за целна (таргетирана) терапија, што ја наметнува потребата за користење на соодветен тест-метод за евалуација на овој онкоген. Воведувањето на флуоресцентната ин ситу хибридизациона (FISH) метода за одредување на HER-2 статусот, би довело до поголема објективност при евалуација на резултатите и нивна поголема репродукцибилност.

И покрај напредокот во хемотерапијата, таргетираната и радиотерапијата, прогнозата на пациентите со напреднат карцином на дојка и понатаму останува неповолна, што ја наметнува потребата за дефинирање на нови прогностички и предиктивни фактори. Концептот на стем/прогенитор клетки предлага дека процесот на карциногенеза е поддржан од мала субпопулација на клетки, канцерски стем клетки (КСК) кои се одговорни за процесите на туморска иницијација и пропација. Идентификацијата и изолацијата на КСК, со користење на површински маркери, се приоритет на бројни научни истражувања, бидејќи ерадикацијата на оваа ретка популација на клетки со развој на нова целна терапија може да значи и излекување на пациентите, што го прави ова подрачје интересно за истражување.

Цели

Целта на истражувањето е да се воведат и стандардизира FISH-методата за одредување на HER-2 генскиот статус на парафински ткивни примероци од пациентите со инвазивен карцином на дојка, да се одреди совпаѓањето помеѓу имунохистохемиската (IHC) и FISH-методата и да се корелира експресијата на HER-2 со клиничко-патолошките параметри.

Имунохистохемиски да се евалуира експресијата на КСК-маркерите во примероци од дуктален инвазивен карцином на дојка, да се корелира со клиничко-патолошките параметри и со молекуларните поттипови и да се дефинираат прогностичките и предиктивните параметри што се поврзани со зголемена експресија на овие маркери.

Да се корелира HER-2 статусот со експресијата на стем клеточните маркери кај инвазивните карциноми на дојка.

Материјал и методи

Во оваа ретроспективна студија, се анализирани ткивни примероци од 73 пациенти со дуктален инвазивен карцином на дојка, дијагностицирани на Институтот за патологија, Медицински факултет - Скопје, во текот на 2014-2016 година. Амплификацијата на HER-2 генот се одреди со два различни FISH-протоколи за кои се користеше идентична, двојно означена ДНК проба (PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit), но различен кит за ткивен претретман

(Vysis/Abbott Paraffin Pretreatment Reagent Kit и DAKO Histology FISH Accessory Kit), додека протеинската експресија за HER-2 се одреди имунохистохемиски, со користење на моноклонално антителио (anti-HER-2 antibody, clone 4B5, Ventana). За детекција на канцерските стем клетки користевме имунохистохемиски маркери: CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam.

Класификацијата на карциномите во 4 молекуларни подгрупи користејќи валидиран, имунохистохемиски базиран сурогат, се изведе согласно со препораките на St Gallen-ската конференција.

Резултати

Анализата на резултатите покажа успешна хибридизација во 98,63% од случаите. Со двата протокола се добија силни и јасни сигнали кои се лесни за интерпретација. Преттретманот со DAKO Histology Kit е пократок, реагенсите се поевтини, сигналите се поуниформни и ниту еден ткивен примерок не отпадна во текот на лабораториската процедура.

Стапката на совпаѓање помеѓу ИHC и FISH методите беше највисока кај негативните ИHC 0/1+ (100%) случаи, а најниска кај двојбените ИHC 2+ (18,18%) случаи. Кога ИHC 2+/3+ случаите се анализираа како една група, вкупното совпаѓање помеѓу двете методи беше 84,72%, Карра коефициент 0,5976, со статистичка значајност за $p < 0,0001$. Земајќи ја FISH-методата како златен стандард, имунохистохемиската метода покажа позитивна предиктивна вредност на позитивните ИHC 3+ случаи од 83,3%, а негативната предиктивна вредност за негативните ИHC 0/1+ случаи беше 100%. Сензитивноста на имунохистохемијата за ИHC 2+/3+ и за ИHC 3+ групите беше 100% и 83,3%, додека специфичноста за истите групи беше 81,67% и 96,7%.

Амплификација на HER-2 генот беше детектирана во 16,44% од случаите и истата покажа значајна корелација во однос на високиот пролиферативен индекс Ki67 ($p=0,025$), негативниот естрогенски ($p=0,015$) и прогестеронски ($p = 0,016$) рецепторски статус.

Евалуацијата на експресијата на КСК-маркерите покажа дека CD44 е експресиран во 47,94% од случаите, CD24 во 27,4%, CD133 во 28,77%, ALDH1A1 во 35,62% и EpCam во 63,04% од случаите. Експресијата на стем клеточните маркери покажа значајна корелација со висока експресија на пролиферативниот маркер Ki67, висок нуклеарен градус, со висок стадиум на болест и негативен хормонски рецепторски статус.

Униваријантната регресивна анализа како сигнификантни предиктивни фактори за експресија на КСК-маркерите ги потврди: постоперативниот стадиум, естрогенскиот рецептор, прогестеронскиот рецептор и маркерот за клеточна пролиферација-Ki67. Значајна разлика беше нотирана помеѓу експресијата на CD24 ($p=0,016$), CD133 ($p < 0,0001$) и ALDH1A1 ($p=0,006$) во однос на молекуларните подгрупи. CD24 најчесто беше експресиран во Luminal B туморите;

CD133 во HER-2 и Triple negative поттиповите, додека ALDH1A1 почесто беше експресирани во Luminal B и HER-2 поттиповите.

Немаше значајна разлика во однос на експресијата на КСК-маркерите во туморите со и без амплификација за HER-2 генот. HER-2 позитивните тумори поретко од HER-2 негативните тумори беа CD44 позитивни, но почесто беа CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam позитивни.

Заклучоци

Имплементацијата на флуоресцентна ин ситу хибридизација во рутинска дијагностичка лабораторија бара стандардизација и мониторинг на методата, како и следење на протоколот за работа, но понекогаш во зависност од добиените резултати потребно е повторување на тестирањето со корекции во постапките кои ќе бидат адаптирани на претходната обработка на ткивните примероци или на индивидуалните карактеристики на ткивата што се анализираат. Поради високата сензитивност, нашите резултати потврдуваат дека имунохистохемијата е одличен иницијален скрининг тест, а поради детектираните лажно позитивни резултати потребно е ИHC 2+ и ИHC 3+ да се потврдат со FISH-методата.

Резултатите од направените анализи со КСК-маркери, покажаа присуство на хетерогена клеточна популација во карциномите на дојка. Присуството на туморски клетки што експресираат КСК-маркери, е поврзано со биолошки поагресивни тумори кои имаат полоша прогноза, па поради тоа може да се користат како прогностички фактор во идентификацијата на пациенти со понеповолна прогноза. Ваквите сознанија отвораат можности за дополнителни истражувања во оваа област, сè со цел јасно да се дефинираат и дискриминираат канцерските стем клетки од другата популација на туморски клетки преку користење на повеќе специфични маркери, што ќе доведе до развој на нови поефикасни терапевски модалитети кај пациентите со инвазивен карцином на дојка.

Клучни зборови: карцином на дојка, HER-2, флуоресцентна ин ситу хибридизација, имунохистохемија, канцерски стем клетки.

SUMMARY

Introduction

Accurate assessment of HER-2 is imperative in selecting breast cancer patients for targeted therapy. This imposes the need for using an appropriate assay for its determination. Implementation of fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in HER-2 assessment will result in more objective and reproducible evaluation of the results.

Despite the advances in chemotherapy, targeted and radiotherapy, the prognosis of patients with advanced breast cancer remains unfavorable, which imposes the need for defining new prognostic and predictive factors. The concept of stem / progenitor cells suggests that the carcinogenesis is supported by a small subpopulation of cells, cancer stem cells - CSC, that are responsible for tumor initiation and propagation. Identification and isolation of CSC using putative surface markers are a priority for numerous scientific researches, because eradication of this cells could lead to the development of new targeted therapy that makes this area interesting for research.

Aims

The aim of the study is to implement and standardize the FISH method for HER-2 assessment in formalin fixed paraffin embedded breast cancer samples, to evaluate the concordance between immunohistochemistry (IHC) and FISH and to correlate the expression of HER-2 with clinico -pathological parameters.

To evaluate the expression of CSC markers in breast cancer samples, to correlate with clinic-pathological parameters and molecular subtypes, and to define prognostic and predictive parameters associated with increased expression of these markers.

To correlate the amplification of HER-2 with the expression of CSC markers in breast cancer samples.

Material and methods

In this retrospective study we analyzed tissue samples from 73 patients with invasive breast cancer diagnosed at the Institute of Pathology, Faculty of Medicine, Skopje, during 2014-2016. The amplification of the HER-2 gene was determined by two different FISH protocols that use identical, double-labeled DNA probe (PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit), but different pre-treatment kits (Vysis / Abbott Paraffin Pretreatment Reagent Kit and DAKO Histology FISH Accessory Kit). HER-2 protein expression was assessed immunohistochemically using monoclonal antibody (anti-HER-2 antibody, clone 4B5, Ventana). For the detection of cancer stem cells, we used immunomarkers: CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 and EpCam.

Classification of carcinomas in 4 molecular subgroups using validated, immunohistochemically based surrogate was performed according to the recommendations of the St Gallen Conference.

Results

The analysis of the results showed successful hybridization in 98.63% of the cases. Both protocols gave strong and clear signals that are easy to interpret. The pretreatment with DAKO Histology Kit is shorter, the reagents are cheaper, the signals are more uniform and no tissue samples were lost during the procedure.

The concordance between IHC and FISH was highest in the negative IHC 0/1 + (100%) cases, and the lowest in equivocal IHC 2+ (18.18%) cases. When the IHC 2+ /3+ cases were analyzed as a group, the overall concordance between the two methods was 84.72%, Kappa coefficient 0.5976, $p < 0.0001$. With the FISH method as a gold standard, the positive predictive value of positive (IHC 3+) cases was 83.3% and the negative predictive value of the negative IHC 0/1+ cases was 100%. The sensitivity of IHC 2+/3+ and IHC3+ groups was 100% and 83.3%, respectively, while the specificity for the same groups was 81.67% and 96.7%.

Amplification of HER-2 was detected in 16.44% of the cases and was significantly correlated with the high proliferative index Ki67 ($p = 0.025$), negative estrogen ($p = 0.015$) and progesterone ($p = 0.016$) receptor status.

Evaluation of CSC markers showed that CD44 was expressed in 47.94% of cases, CD24 in 27.4%, CD133 in 28.77%, ALDH1A1 in 35.62% and EpCam in 63.04% of cases. The CSC expression showed a significant correlation with high nuclear grade, high stage, with high Ki67 and negative hormone receptor status.

Univariate regression analysis confirmed the postoperative stage, the estrogen receptor, the progesterone receptor, and the cell proliferation marker Ki67 as significant predictive factors for the expression of CSC markers. A significant difference was noted between the expression of CSC and different molecular subgroups: CD24 ($p = 0.016$), CD133 ($p < 0.0001$) and ALDH1A1 ($p = 0.006$). CD24 was most commonly expressed in Luminal B tumors; CD133 in the HER-2 and Triple negative, while ALDH1A1 was more frequently expressed in Luminal B and HER-2 subtype.

There was no significant difference between the CSC markers expression and tumors with and without HER-2 amplification. HER-2 positive tumors less commonly than HER-2 negative tumors were CD44 positive, but more often were CD24, CD133, ALDH1A1 and EpCam positive.

Conclusions

Implementation of FISH in routine diagnostic laboratory requires standardization and monitoring of the method, as well as monitoring of the working protocols. Sometimes depending on the results obtained, it is necessary to repeat the testing with corrections in the procedures that will be adapted to the previous tissue processing or to the individual characteristics of the tissue. High sensitivity makes immunohistochemistry a good initial screening test, but because of the false positive results, IHC 2+ and IHC 3+ should be confirmed by FISH.

Performed analysis with CSC markers showed presence of heterogeneous cell population in breast cancer samples. The presence of tumor cells that express CSC markers is associated with biologically more aggressive tumors that have worse prognosis, and therefore can be used as a prognostic factor in identifying patients with less favorable prognosis. Such findings open up opportunities for further research in this area in order to clearly define and discriminate CSC from the rest tumor population by using of more specific markers, which will lead to the development of more effective therapeutic modalities in breast cancer patients.

Key words: breast carcinoma, HER-2, fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, cancer stem cells.

ЛИСТА НА СКРАТЕНИЦИ

AJCC - American Joint Committee on Cancer

ALDH1A1 - retinal dehydrogenase 1

AML - акутна миелоична леукемија

ASCO/CAP - American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist

Bmi-1 - Polycomb complex protein BMI-1

CEP17 - центромерот на хромозом 17

CI - confidence interval

CISH - хромогена ин ситу хибридизација

CD44 - Cluster of Differentiation 44

CD24 – Cluster of Differentiation 24

CD133 - Cluster of Differentiation 133

cm - сантиметар

ДНК - дезоксирибонуклеинската киселина

DAPI - 4, 6 diamidin-2-phenylindoldihydrochloride

EGFR - Epidermal growth factor receptor

EpCam - Epithelial cell adhesion molecule

ER – Estrogen receptor

FISH - флуоресцентна ин ситу хибридизација

HER-2 – Human epidermal growth factor receptor

IHC - имунохистохемија

Ki67 – маркер на пролиферација

KCK - канцерски стем клетки

LR+ - однос на веројатност за позитивен резултат

LR- - однос на веројатност за негативен резултат

MAPK - mitogen-activated protein kinase

мм - милиметар

MES (2-[N-morpholino]ethanesulphonic acid) buffer

NaSCN - натриум тиоцијанат

NOD/SCID - non-obese severe combined immunodeficiency

NP-40 - Nonidet P-40

NPV - негативна предиктивна вредност

NST - non special type

P1- Претретман

PI3K / Akt - phosphatidylinositol-3 kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway

PPV - позитивна предиктивна вредност

PR – Progesteron receptor

SISH - сребрена ин ситу хибридизација

SSC- Saline Sodium Citrat

СТ – собна температура

ТДЛЕ - терминалната дуктално-лобуларна единица

TNM – Tumor Node Metastasis

UK RCPATH - The Royal College of Pathologists

UICC - Union for International Cancer Control

US FDA - United States *Food and Drug Administration*

WB – Wash buffer

WHO - World Health Organisation

1. ВОВЕД

Карциномот на дојка е хетерогено заболување сочинето од голем број на посебни ентитети кои засегаат ист анатомски орган и потекнуваат од иста анатомска структура (епителните клетки на терминалната дуктално-лобуларна единица - ТДЛЕ), но имаат различни фактори на ризик, различни клинички презентации и патолошки карактеристики, различен одговор на терапија, различна прогноза и преживување (1).

1.1. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

Карциномот на дојка е втора најчеста причина за смрт од малигни болести кај жените (регистрирани 522 000 смртни случаи во 2012 година) и е најчесто дијагностициран карцином во 140 од 184 земји во светот (2, 3). Тој сочинува приближно 22% од сите карциноми кај жените, што е речиси двојно повеќе од карциномите на која било друга локализација (2). Во 2012 година се дијагностицирани 1,7 милиони жени со карцином на дојка (2), што е за 20% повеќе во однос на 2008 година, а стапката на морталитет за истиот период е зголемена за 14% (2). Инциденцата зависи од географската локација и етничката припадност. Инциденцата е највисока во поразвиените региони, но смртноста е релативно многу повисока во помалку развиените земји, што се должи на отсуството на скрининг-програми, како и пристапот до современите терапевиски протоколи (2).

Согласно со податоците на Globocan (2) се проценува дека во 2012 година, во Р. Македонија имало 1152 нови случаи на карцином на дојка и 431 смртен случај од истата болест.

1.2. ЕТИОЛОГИЈА И ФАКТОРИ НА РИЗИК

Генетските фактори, стилот на живот и карциногените фактори од средината се потенцијални ризик-фактори за развој на карцином на дојка. Најголем ризик-фактор поврзан со карциномот на дојка е возраста: две третини од жените со карцином на дојка се на возраст над 50 години (3). Различни фактори од средината и животните навики (обезност, орални контрацептиви, отсуство на физичка активност, постменопаузална хормонска терапија, конзумирање на алкохол, пушење) може да доведат до хормонални промени и зголемен ризик за развој на карцином (4). Дополнителни негативни фактори се семејната историја, раната менарха и доцната менопауза (4, 5). Околу 5% до 10% од случаите со карцином на дојка се резултат на наследени мутации, а останатиот процент се спорадични случаи (4). Мутации на BRCA1 и BRCA2 генот се присутни во помалку од 1% од општата популација и кај 15%-20% од фамилијарните карциноми на дојка. Други наследени состојби поврзани со помал ризик за развој на карцином на дојка се Li-Fraumeni и Cowden синдромот (5).

1.3. ПРОГНОСТИЧКИ И ПРЕДИКТИВНИ ФАКТОРИ КАЈ КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА

Прогностичките и предиктивните фактори имаат големо значење при донесувањето на одлуки за терапевски протоколи со цел да се индивидуализира третманот кај пациентите. Тие може да потекнуваат од карактеристиките на пациентот или од типот на туморот. Прогностичките фактори имаат за цел објективно и независно да го предвидат клиничкиот исход кај нетретирани пациенти, додека предиктивните фактори имаат за цел да го предвидат одговорот на пациентите по специфичниот терапевски пристап и истите се тесно поврзани со сензитивноста или резистентноста на туморот на одредена терапија (6).

Во последно време постои пораст во имплементацијата на различни комбинации на маркери кои имаат за цел да ја дефинираат прогнозата за одреден специфичен третман. Ова е од посебен интерес во дефинирање на можниот ризик од релапс на болеста кога пациентот добива специфична терапија, но и да се оцени потенцијалната важност за дополнителни терапевски можности. Прогностичките и предиктивните фактори може да се класифицираат во неколку големи групи: клинички фактори, хистопатолошки фактори и биолошки маркери.

1.3.1. Клинички фактори

Возраста во моментот на поставување на дијагноза е корисен прогностички параметар кај карциномот на дојка. Неколку независни студии покажале дека помладите пациенти со карцином на дојка (35 до 40 години) имаат поагресивни биолошки карактеристики (поголеми тумори, позитивен лимфонодален статус, повисок хистолошки градус) и полоша прогноза (7-8). Возраста (<35 години) е еден од параметрите кој е препорачан од St Gallen-ската конференција, во одредување на „ризишна категорија“ на пациенти (9). Повозрасните пациенти (>70 години) исто така имаат полоша прогноза и повисок степен на смртност (7). Други автори прикажале дека возраста над 50 години е независен прогностички фактор кој е поврзан со лоша прогноза и пократко преживување кај пациентите (10, 11).

1.3.2. Хистопатолошки фактори

Најчесто користени прогностички маркери кои имаат голема вредност во клиничкото проследување на пациентите се: големината на туморот, хистолошкиот тип, степенот на хистолошка диференцијација, лимфонодалниот статус и стадиумот на болеста (6, 12).

1.3.2.1. Големина на туморот

Големината на туморот е независен прогностички фактор кој директно корелира со прогнозата и исходот на болеста (12, 13). Истражувањата покажаа дека стапката на преживување пропорционално се намалува со големината на туморот (13-15). Големината на туморот е во корелација и со лимфонодалниот статус: помалите тумори поретко даваат метастази во регионалните лимфни жлезди во однос на поголемите тумори (14-16). Rosen и сор. покажале дека просечната големина на тумор со позитивни жлезди била 1,3см и дека големината на примарниот тумор влијае врз прогнозата на пациентите со позитивни аксиларни лимфни жлезди (14).

1.3.2.2. Хистолошки тип

Хистолошкиот тип се однесува на моделот на раст на туморите. Идентификувани се специфични морфолошки и цитолошки карактеристики кои се конзистентни со различните клинички презентации и со исходот на болеста. Овие модели на раст се означуваат како „хистолошки типови“, тие обезбедуваат дополнителни информации и помагаат во предвидување на прогнозата кај пациентите. Најчест карцином на дојка е дукталниот инвазивен карцином или инвазивен карцином од не-специјален тип (non special type – NST), кој сочинува приближно 70-75% од сите инвазивни карциноми на дојка (1). Посебните или специјални типови на карциноми на дојка сочинуваат приближно 25% од сите карциноми на градата и се асоцирани со различни биолошки карактеристики и имаат важни клинички импликации (17, 18). Согласно со најновото издание на класификациониот систем на Светската здравствена организација (World Health Organisation - WHO), постојат најмалку 17 различни, специјални хистолошки типови на карциноми на дојка (19).

1.3.2.3. Степен на хистолошка диференцијација

Хистолошкиот градус го изразува степенот на хистолошка диференцијација на туморот и ја отсликува неговата агресивност. Најчесто користен систем за одредување на хистолошкиот градус е Нотингемската модификација (Elston-Ellis) на системот за градуирање на Scarff-Bloom-Richardson (Нотингемски систем за градуирање - Nottingham Grading System) (20), кој е препорачан од WHO (1), Американскиот заеднички комитет за канцер (American Joint Committee on Cancer - AJCC) (21) и Кралскиот колеџ на патолози (The Royal College of Pathologists - UK RCPATH) (22). Овој систем подразбира семиквантитативна евалуација на три морфолошки карактеристики: процент на тубуларни или glandularни структури, јадрен плеоморфизам и вкупен број на митози. Секој од овие параметри се бодира на скала од 1 до 3 и вкупниот збир го дефинира хистолошкиот градус, кој традиционално е поделен во 3 категории (табела 1): градус 1 (G1) се добро диференцирани тумори кои се асоцирани со добра прогноза; градус 2 (G2) се

умерено диференцирани тумори и градус 3 (G3) се лошо диференцирани тумори, асоцирани со лоша прогноза (1, 23). Степенот на хистолошка диференцијација е независен прогностички фактор кој е тесно поврзан со периодот на преживување и ремисија кај пациентите со негативен и/или позитивен лимфонодален статус (17, 23). Rakha и сор. покажале позитивна асоцијација помеѓу хистолошкиот градус и клиничко-патолошките варијабли. Имено, туморите со низок хистолошки градус позитивно корелираат со мала димензија на туморот, отсуство на метастази во регионалните лимфни јазли, отсуство на васкуларна инвазија и позитивен хормонски рецепторски статус (23). Воедно покажале дека туморите со висок хистолошки градус се асоцирани со полоша прогноза, пократко преживување кај пациентите со негативен и позитивен лимфонодален статус. Ваквата поврзаност била независна од големината на туморот. Мултиваријантните анализи покажале дека градусот е прогностички фактор кој е независен од другите прогностички варијабли, како што се лимфонодалниот статус и големината на туморот (17).

Табела 1. Elston и Ellis модификација на системот за градуирање на Bloom и Richardson (одредување на хистолошка диференцијација кај инвазивните карциноми на дојка)

Градуирање	бод
Тубули	
> 75% од туморот е сочинет од тубули	1
10-75% од туморот е сочинет од тубули	2
< 10% од туморот е сочинет од тубули	3
Јадрен плеоморфизам	
Јадрата се мали и униформни	1
Умерени варијации во формата и големината на јадрата	2
Назначени варијации во формата и големината на јадрата	3
Митотски индекс	
Зависи од големината на микроскопското поле	1-3
Комбиниран хистолошки градус	
Добро диференцирани тумори (G1)	3-5
Умерено диференцирани тумори (G2)	6-7
Лошо диференцирани тумори (G3)	8-9
	Вкупен збир

1.3.2.4. Статус на аксиларни лимфни жлезди

Лимфонодалниот статус е еден од најсилните независни прогностички фактори кај карциномот на дојка и маркер за поагресивен фенотип кој корелира со

полоша прогноза и поагресивен третман (12, 14, 16). Десетгодишното преживување кај пациентите со негативен лимфонодален статус е 70-75% во споредба со 25-30% кај пациентите со позитивна лимфонодална болест (12). Прогнозата, исто така, се влошува со зголемување на бројот на позитивни лимфни жлезди: 5-годишното преживување кај пациентите со четири или повеќе позитивни лимфни жлезди е пониско во споредба со пациентите со три или помалку позитивни лимфни жлезди (12, 14). Rosen и сор. покажале дека бројот на позитивни лимфни жлезди бил поголем кај туморите со поголем дијаметар и дека нема голема разлика во 10-годишното преживување кај пациентите со микро и макрометастази (14).

1.3.2.5. Класификационен систем

TNM класификациониот систем ја дефинира анатомската раширеност на туморот на примарната локализација и има голема прогностичка вредност кај карциномот на дојка (6). Тој ги интегрира големината на туморот (T), лимфонодалниот статус (N) и статусот на далечни метастази (M) во одредување на постоперативниот стадиум на туморите кој е дефиниран од страна на Американскиот заеднички комитет за канцер / Унија за меѓународна контрола на канцер (American Joint Committee on Cancer – AJCC/Union for International Cancer Control - UICC). Со комбинирање на T, N и M компонентите се добиваат 4 групи (не земајќи ја предвид 0 група кај ин ситу карциномите), означени со римски броеви од I до IV, во однос на стапката на преживување кај пациентите (табела 2). T параметарот се бодира од 1 до 4, и е одреден од најголемата димензија на туморот. N стадиумот се бодира од 0 до 3, и е одреден од вкупниот број на позитивни лимфни жлезди. Присуството на далечни метастази (M параметарот) е третиот клинички значаен фактор, кој се бодира од 0 до 1, во зависност од присуството или отсуството на далечни метастази во моментот на иницијалната дијагноза (12).

Табела 2. AJCC Staging system

Stage	pT	pN	pM
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T0, T1	N1mi	M0
Stage IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stage IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stage IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stage IIIC	Any T	N3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

Стадиумот на болеста обезбедува форма за универзална размена на информации во врска со раширеноста на болеста, изборот на иницијален терапевтски пристап и утврдување на потребата за адјувантна терапија. Ова групирање има за цел да обезбеди хомогеност на групите во однос на преживувањето (пр. пациенти во I стадиум на болест имаат добра прогноза и обично ја преживуваат болеста, додека оние во IV стадиум имаат најлоша прогноза и обично подлегнуваат на болеста) (12). Петгодишното преживување кај пациентите во I стадиум на болеста е 90%, а кај пациентите во II и III стадиум на болеста е 60-80% односно 40-50% (12). Десетгодишното преживување кај пациентите во IV стадиум на болеста е само 6% (12).

1.3.3 Туморски биомаркери

1.3.3.1. Хормонски рецепторски статус

Одредувањето на хормонскиот рецепторски статус е главен биолошки параметар со важни импликации врз прогнозата и третманот на пациентите со карцином на дојка. Согласно со препораките на Американското здружение за клиничка онкологија/Колеџ на американски патолози (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist – ASCO/CAP) за употреба на туморските маркери, естрогенскиот (ER) и прогестеронскиот (PR) рецепторски статус треба да се тестираат на примероци од примарен карцином на дојка и евентуално на примероци од метастатски карцином, доколку тоа влијае на терапијата кај пациентите (24).

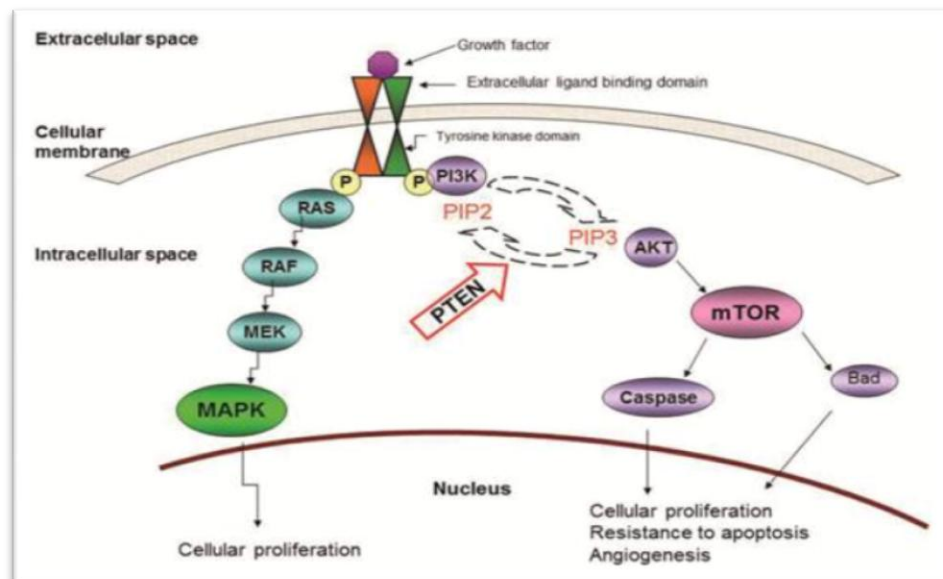
Естрогенскиот рецептор е нуклеарен транскриптивен фактор кој е активиран од естрогенот и е вклучен во контрола на развојот и диференцијацијата на нормалните, хиперпластичните и неопластичните епителни клетки на дојка. Врзувањето на естрогенот за рецепторот ја стимулира пролиферацијата на мамарните клетки, што ќе доведе до зголемена клеточна делба, зголемена репликација на дезоксирибонуклеинската киселина (ДНК) и зголемена стапка на мутации. Ова доведува до нарушување на нормалниот клеточен циклус, нарушување на процесите на апоптоза и репарација на ДНК, што на крај ќе резултира со малигна трансформација на клетките (25).

Прогестеронскиот рецептор учествува во контрола на клеточната пролиферација и развојот на дојката, индиректно преку секреција на паракрините фактори за раст, а воедно е одговорен и за клеточната пролиферација во текот на малигна трансформација кај карциномите на дојка (28). ER и PR се експресирани во околу 15-30% од нормалните луминални клетки на дојка додека базалните клетки не експресираат хормонски рецептори (26). Околу 70-80% од карциномите на дојка експресираат ER; 55-65% покажуваат зголемена експресија на PR; 25% се ER+ и PR-, а околу 20% се негативни за ER и PR (27-29). Експресијата на ER и PR е релативно слаб прогностички, но силен предиктивен фактор за одговор на ендокрин третман кај пациентите со карцином на дојка (29-31). Истражувањата

покажале дека ER/PR статусот е позитивно асоциран со подобра прогноза, повозрасни пациенти, низок хистолошки и нуклеарен градус, а негативно корелира со HER-2 статусот и со вредностите за маркерот на клеточна пролиферација Ki67 (29, 32-34).

1.3.3.2. HER-2 статус

Генот за рецепторот на хуманиот епидермален фактор на раст 2 (HER-2, HER-2/neu или *c-erbB-2*), е локализиран на долгиот крак на хромозомот 17 и кодира трансмембрански рецепторен протеин со тирозин киназна активност, кој е член на фамилијата рецептори за епидермален фактор на раст (Epidermal growth factor receptor-EGFR) или HER фамилијата, кои се одговорни за меѓуклеточна и клеточно-стромална комуникација преку процесот на сигнална трансдукција (35). Активацијата на HER рецепторите преку нивната тирозин киназна активност резултира со сигнална трансдукција во јадрото што на крај ќе доведе до активација на нуклеарните гени кои го оркестрираат опстанокот на клетките, нивна пролиферација и диференцијација, процеси кои ја поттикнуваат прогресијата на туморот. HER-2 рецепторот нема свој лиганд, тој дејствува како корецептор, формира хомо- или хетеродимери со другите членови од HER-2 фамилијата на рецептори (HER-1, HER-3 или HER-4) и учествува во активација на сигналните патишта - phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR) и mitogen-activated protein kinase (MAPK), во отсуство на специфични лиганди (36) (слика 1).



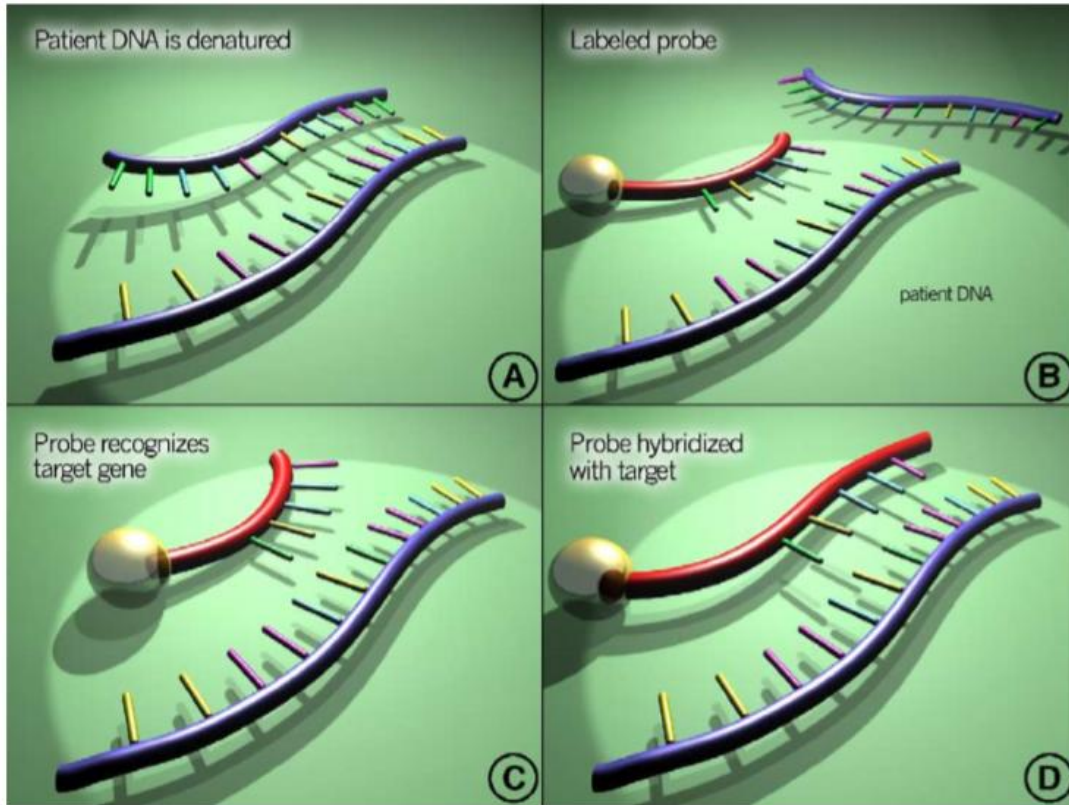
Слика 1. Активација на два главни сигнални патишта по димеризација на HER-2. Преземено од Lin и сор. 2012 (36).

Амплификацијата на HER-2 генот (генерирање на повеќе од 2 нормални генски копии) е најчестиот механизам кој води до прекумерна експресија на рецепторот и нарушување на нормалните контролни механизми, кои потенцијално може да доведат до формирање на агресивни туморски клетки. Амплификацијата на HER-2 генот кај карциномите на дојка е асоцирана со зголемена клеточна пролиферација, туморска инвазивност, прогресивни регионални и далечни метастази, зголемена ангиогенеза и редуцирана апоптоза (35). Амплификација на генот или прекумерна експресија на HER-2 протеинот се сретнува кај приближно 15 до 20% од карциномите на дојка (35, 37). Овие тумори се асоцирани со висок хистолошки градус, негативен хормонски рецепторски статус и позитивни регионални лимфни жлезди во моментот на поставување на дијагноза (35). HER-2 генската амплификација и прекумерната експресија на протеинот се молекуларна цел за специфични терапии, како што се трастузумаб (инхибитор на мембранските сигнални патишта) и лапатиниб (инхибитор на тирозин киназна активност), кои се поврзани со добри клинички резултати кај рани и метастатски HER-2 позитивни, инвазивни карциноми на дојка (38-40). Точното утврдување на HER-2 статусот е од клучно значење за оптимизација на клиничките резултати кај пациентите, па поради тоа, користењето на дијагностички точен, високо сензитивен и специфичен тест за негово одредување е императив при селекција на пациентите за таргетирана терапија (38, 40).

1.3.3.2.1. Тест-методи за одредување на HER-2 статусот

HER-2 статусот кај пациентите со дијагностициран карцином на дојка може да се одреди со различни тест-методи, но најчесто користени се имунохистохемијата (IHC) и ин ситу хибридизациските методи: флуоресцентна ин ситу хибридизација- FISH, хромогена ин ситу хибридизација-CISH, сребрена ин ситу хибридизација-SISH), кои се изведуваат на примероци од туморско ткиво фиксирано во формалин и калапено во парафин (41, 43).

Иако IHC и FISH се најчесто користени методи при рутинска анализа во клиничките лаборатории, сепак и двете методи имаат предности и недостатоци. Бројни студии кои ја евалуирале конзистентноста помеѓу двете методи и нивното влијание врз одговорот на терапијата со трастузумаб покажале контрадикторни резултати (44). Имунохистохемијата, како метода, користи антитела за детекција на експресијата на HER-2 протеинот на површината на туморските клетки, додека FISH е молекуларна метода која користи флуоресцентно означени ДНК проби (флуоресцентно означена ДНК проба за HER-2-специфична секвенца и флуоресцентно означена ДНК проба за центромерот на хромозом 17- CEP17), за одредување на бројот на HER-2 генски копии во интерфазни јадра (42) (слика 2).



Слика 2. FISH тестирањето за HER-2 користи флуоресцентно означена ДНК проба за да се одреди бројот на HER-2 генски копии. По претходна обработка (преттретман) на ткивните пресеци сè со цел да се отстранат цитоплазматските и нуклеарните протеини, што може да биде пречка за пенетрација на пробата, целната ДНК се денатурира (A). Означената проба се додава на ткивниот пресек (B), кој ќе го препознае (C) и ќе хибридуира со целната ДНК (D). Потоа следува стрингентно испирање за да се елиминира неспецифичното врзување на пробата. Преземено од Nick и сор. 2005 (42).

Зависноста на имунохистохемиските тестови од преданалитичката обработка на ткивата, поттикна бројни дискусии во научната јавност кои ја доведоа во прашање сигурноста на оваа техника за точна проценка на HER-2 статусот во рутински примероци, како и опасноста од лажно позитивни и лажно негативни резултати (38, 40, 45-48). Сензитивноста на антителата што се користат за HER-2 се движи во граници од 6 до 80%; додека грешки во преттретманот или проблеми во протоколите за работа се детектирани во 35%, односно во 20% од случаите (48). Gokhale и сор. покажале висока специфичност (94%), но ниска сензитивност (43%) на имунохистохемијата во споредба со FISH методата (44).

Флуоресцентната ин ситу хибридизација е многу посигурна метода која обезбедува 96,5% сензитивност и 100% специфичност за детекција на HER-2 генската амплификација кај пациентите со инвазивен карцином на дојка (47). Стабилноста на хромозомската ДНК ја прави FISH методата помалку осетлива на

фактори поврзани со презервација и складирање на ткивата (38). Таа е златен стандард за проценка на HER-2 статусот кај инвазивни карциноми на дојка (37, 38). Флуоресцентната ин ситу хибридизација е попрецизна и порепродуцибилна процедура во споредба со имунохистохемиската метода, а истовремено овозможува и полесна интерпретација на резултатите (44, 48). Dowsett и сор. покажале дека интерлабораториската усогласеност за FISH тестирањето е 80% (41), додека овој процент е значително повисок во истражувањето на Sauter и сор. (38) и истиот изнесува од 92% до 99%. Воедно, Sauter и сор. покажале дека перформансите на лабораториите кои изведувале FISH тестирање се далеку над перформансите на лабораториите што изведувале имунохистохемиско тестирање (односно 89%-96%, наспроти 57%-65%) (38). Dybdal и сор. покажале дека усогласеноста помеѓу имунохистохемиските и FISH- резултатите е 82%, додека дека интерлабораториската усогласеност на лабораториите што изведувале FISH анализи е 92% (49).

Бројни автори потврдиле дека флуоресцентната ин ситу хибридизација е супериорен метод во селекција на пациенти за терапија со трастузумаб, како и во предвидување на нивниот одговор кон дадената терапија (38, 44, 47, 50, 51). Други автори пак не покажале супериорност на оваа метода во предвидување на терапискиот одговор и прогнозата кај пациентите со инвазивен карцином на дојка (52). Повеќе автори препорачуваат FISH-методата да се користи како примарна метода за анализа на HER- 2 онкогенот (38, 46). Земајќи ја FISH-методата како златен стандард за точна детерминација на HER-2 статусот, Gokhale и сор. (44) покажале висока усогласеност помеѓу FISH и имунохистохемиски детерминираниите 3+ групи и слаба усогласеност кај 0, 1+ и 2+ групите, што се должи на ниската сензитивност на методата и осетливоста на протеинот на преданалитичките варијабли, техничките процедури, како и субјективноста при интерпретација на резултатите. Покрај нестандартизираност на преданалитичката, аналитичката или постаналитичката фаза, како причина за дискрепанца помеѓу IHC и FISH се наведува и полизомија на хромозом 17 (47).

1.3.3.3. Пролиферативен маркер Ki 67

Антигенот Ki67 првпат е идентификуван од Gerdes и сор. во почетокот на 1980 година (53). Тој е различно експресиран во различни фази од клеточниот циклус, со *пик* за време на M фазата (54). Експресијата на Ki67 се зголемува прогресивно во континуитет од бенигни лезии на дојка (<3%), преку ин ситу карциномите до инвазивните карциноми на дојка (средна вредноста 16-17%) (55). Корелацијата помеѓу Ki67 и другите прогностички и предиктивни фактори кај инвазивните карциноми на дојка е проучувана интензивно. Неколку студии покажале позитивна корелација со хистолошкиот градус, лимфонодалниот статус и со големината на примарниот тумор. Хормонскиот рецепторски статус е обратно пропорционален од вредностите за Ki67 (56, 57), додека релацијата на експресијата на HER-2 рецепторот и Ki67 е контроверзна (58).

Употребата на Ki67 како прогностички и предиктивен маркер кај карциномот на дојка, е цел на бројни студии. Дел од нив укажуваат на важната улога на Ki67 во дискриминација на Luminal A и Luminal B поттиповите и во предвидување на користа од адјувантната терапија кај различни поттипови на карциноми на дојка (59-62). Во секојдневната пракса, нивото на експресија на Ki67 се одредува имунохистохемиски, но до сега сè уште нема јасно дефинирана и општоприфатена апсолутна стандардна методологија, како и „cut off“ или пресечна точка за овој маркер кај инвазивните карциноми на дојка, поради што постоечките упатства на ASCO не го вклучуваат во листа на потребни рутински биолошки маркери. Сепак, група експерти на St Gallen-конференција во 2009 година предложи употреба на пролиферативниот маркер - Ki67, при изборот на дополнителна хемотерапија кај пациентите со позитивен хормонски рецепторски статус (63).

1.3.4 Молекуларни поттипови

Неодамна, како резултат на развојот на технологиите за генска експресија, традиционалните класификациони методи на карциномот на дојка, кои се базираа на морфологијата и на имунохистохемијата, се надополнија со молекуларна класификација којашто води до значително подобрување на индивидуализираната терапија, а со тоа и на преживувањето кај пациентите. Студиите на генска анализа идентификуваат најмалку 4 молекуларни типови: Luminal A, Luminal B, HER-2 и Triple negative, кои покажуваат разлики во однос на прогресијата на болеста, одговорот на терапија и прогнозата на пациентите. Во услови кога молекуларните анализи не се достапни, сурогатната дефиниција на молекуларните поттипови може да се добие со имунохистохемиска детекција на ER, PR, Ki67 и HER-2 (59, 64, 65). Важна молекуларна разлика помеѓу Luminal A и Luminal B поттиповите, базирана на основа на генската експресија е: повисока експресија на ER-асоцирани гени, пониска експресија на HER-2 гени и гени поврзани со пролиферација во Luminal A поттипот, додека Luminal B поттипот има пониска експресија на гени за ER, променлива експресија на HER-2 гени и повисока експресија на гени поврзани со пролиферација (66). Приближно 40% од карциномите на дојка се Luminal A, а 20% се Luminal B (66-67). Luminal A поттипот има подобра прогноза, во споредба со Luminal B поттипот, кој има повисок хистолошки градус, полоша прогноза и послаб одговор на хормонска терапија (68-69). Препорачана терапија за Luminal A поттипот е ендокрината терапија, додека терапевски пристап за Luminal B поттипот опфаќа системска хемотерапија проследена со ендокрина терапија (65, 70). HER-2 поттипот сочинува 15%-20% од карциномите на дојка и се карактеризира со ниска експресија на ER-гени, но висока експресија на HER-2 генот и гени поврзани со пролиферација. Тројно негативните тумори се лошо диференцирани тумори, со висок Ki67 и висок p53 (71).

1.3.5. Канцерски стем клетки

Дојката е динамичен орган кој е подложен на значајни развојни промени за време на бременоста, доењето и инволуцијата, кои се генерирани од резидентни стем клетки кои имаат способност за самообновување и диференцијација (72). Адултните стем клетки се делат бавно, долго живеат и се изложени на штетни влијанија во текот на подолг временски период, па поради тоа, може да акумулираат мутации што на крај ќе резултира со малигна трансформација на клетките.

Изминатите неколку години, експерименталните анализи ја поддржуваат теоријата дека туморите, вклучувајќи го и карциномот на дојка, се состојат од хетерогена клеточна популација со различни биолошки својства и дека процесот на туморогенеза е поддржан од мала субпопулација на клетки кои се нарекуваат канцерски стем клетки (КСК). Канцерските стем клетки се дефинирани според нивната способноста за самообновување, способност да иницираат тумори кај имунокомпромитирани глувци и способност да диференцираат во неопластични клетки кои ја формираат масата на туморот.

Во прилог на улогата на матичните клетки во карциногенезата доаѓа и опсервацијата дека нормалните и канцерските стем клетки делат неколку важни особини, како што се: способност за самообновување, диференцијација, активна теломеразна активност, зголемена транспортна мембранска активност, способност за миграција и метастазирање (72). Сепак, она што го разликува туморското од нормалното ткиво е губење на хомеостатските механизми кои го одржуваат нормалниот број на клетки. Најголем дел од оваа регулација нормално се јавува на ниво на матични клетки.

1.3.5.1. Модели на карциногенеза

Податоците од литературата предлагаат два различни модела на туморски раст кои се одговорни за хетерогеноста на туморите и за нивниот незапирлив раст: моделот на стем клетки и моделот на клонална еволуција.

Моделот на стем клетки (слика 3А), укажува дека карциномите потекнуваат од резидентни стем или прогенитор клетки во ткивата кои се здобиле со способност за самообновување, како резултат на нарушување на сигналните патишта (Hedgehog, Notch и Wnt) и факторот на транскрипција Bmi-1 (Polycomb complex protein BMI-1) (72-78), што ќе резултира со нивна експанзија. Овие клетки дополнително подлежат на генетски или епигенетски промени кои водат до нивна малигна трансформација. Последователната девијантна диференцијација како резултат на епигенетските промени придонесува за фенотипска клеточна хетерогеност (72, 74-75).

Хипотезата за КСК предлага хиерархиска организација на клетките во туморот, каде што КСК подлежат на асиметрична или симетрична делба. При асиметрична делба се добива една клетка ќерка која има неограничен капацитет за клеточната делба и една прогенитор клетка со ограничен капацитет за делба,

која на крајот ќе диференцира во матурна клетка, додека при симетрична делба се добиваат две идентични стем клетки, ќерки кои имаат неограничен капацитет за делба (74, 76- 80).

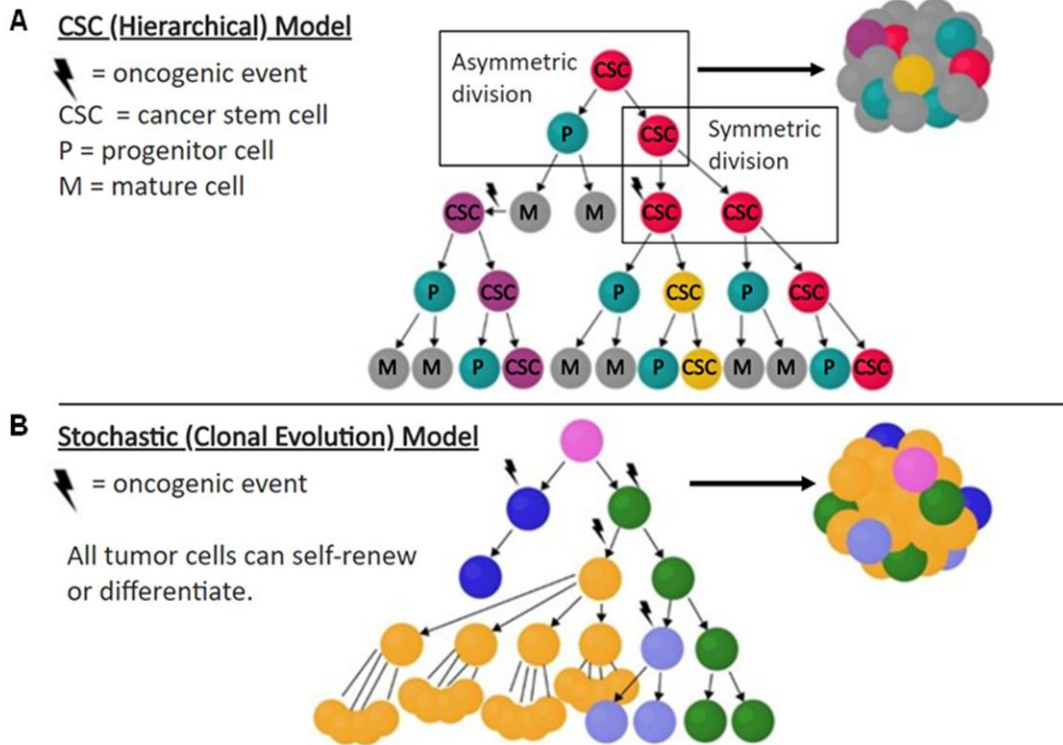
Во моделот на матични клетки, растот на туморот, идентично како и развојот на нормалните ткива, се потпира исклучиво на ретки матични клетки во него, додека најголемиот број на клетки, добиени со диференцирање од КСК, немаат потенцијал за самообновување и не придонесуваат значително за негово одржување (74).

Стохастичкиот модел или модел на клонална еволуција (слика 3Б), предлага дека карциномите се развиваат преку случајни мутации кои потоа се прошируваат преку клонална селекција (74-75, 78). Согласно со овој модел, која било клетка може да биде цел на трансформација (78). Генетската нестабилност, клоналната селекција и влијанието на микросредината, несомнено, придонесуваат за туморската хетерогеност и за прогресија на туморот. Овој модел предвидува дека туморот е составен од субклонови во различни стадиуми на туморска прогресија, од кои секој има варијабилен раст и преживување во однос на нормалните клетки.

Моделот на КСК е организиран хиерархиски, со единствена самообновувачка клетка на врвот на пирамидата, додека моделот на клонална еволуција најголемиот дел на интратуморската варијација го припишува на субклоналните разлики во мутацискиот профил, и сите, освен терминално диференцираните клетки, можат да имаат капацитет за самообновување (74). Соодветно на тоа, во моделот на КСК, фенотипски различен и генерално редок тип на клетка го одржува растот на туморот, додека кај моделот на клонална еволуција, доминантниот субклон/субклонови се одговорни за одржување на растот на туморот. Сепак, моделот на туморски стем клетки не ја исклучува важноста на стохастички или селективни настани во еволуцијата на туморот, па според тоа и двата модела, може да бидат одговорни за туморогенезата, прогресијата и хетерогеноста на туморот (75).

Иако идејата за потеклото на карциномите од матични клетки е стара околу 150 години (75), истата не била експериментално поткрепена сè до крајот на 1990-тите кога Bonnet и Dick покажале дека мала група на клетки се способни да иницираат акутна миелоична леукемија (АМЛ) кога се трансплантирани во имуносупримирани глвци (81). Неколку години подоцна, улогата на КСК во туморогенезата на солидни тумори беше потврдена од Al Najj и сор. кои докажале дека карциномот на дојка може да биде трансфериран во имуносупримирани глвци со мала туморогена субпопулација на клетки (ESA + CD44 + CD24-/ low), која сочинува околу 1% до 10% од туморските клетки (82). Во следните години, КСК беа идентификувани во повеќе солидни тумори, како што се: карциномите на белите дробови, дебелото црево, простатата, овариумите, мозокот и меланомите (83-84).

CSC Model vs Stochastic Model



Слика 3. Модели на туморски раст. **А**, Моделот на КСК е организиран хиерархиски, КСК се наоѓаат на врвот на пирамидата имаат способност за самообновување и истите подлежат на симетрична и асиметрична делба. **Б**, Во моделот на клонална еволуција било која туморска клетка може да има способност за самообновување или диференцијација. Преземено од Hochster и сор. 2015 (79).

1.3.5.2. Канцерски стем клеточни маркери

Поради улогата на КСК во туморската иницијација, прогресија, метастазирање и резистентност на лекови (74, 75, 84), идентификацијата и карактеризацијата на овие клетки од вкупната популација на туморски клетки е од суштинско значење за детални анализи. Различни и специфични биомаркери можат да се користат со цел да се одделат КСК од другите туморски клетки кај карциномите на дојка: EpCam, CD44, CD24, ALDH1A1, CD133, CD34 (82, 85-90). Бројни студии покажаа варијабилна експресија и асоцијација на КСК-маркери со различни клиничко- патолошки и молекуларни карактеристики во карциномите на

дојка, поради што нивното клиничко значење сè уште е предмет на екстензивни истражувања. КСК-маркери покажале варијабилна дистрибуција кај различни молекуларни поттипови, со највисока клеточна експресија кај тројно негативните карциноми со базален молекуларен фенотип (91). Неколку автори покажаа дека ALDH1A1 позитивните туморски клетки се асоцирани со лоша прогноза, пократко преживување (85, 91-94) и со висок микроваскуларен дензитет (94).

Високата експресија на CD24 (95) и EpCam (96) е поврзана со малигна трансформација и прогресија на карциномите на дојка. CD24 е независен лош прогностички фактор кај Luminal A и тројно негативните карциноми на дојка (97). ALDH1A1+ и CD44+/CD24- туморските клетки се прогностички фактор кај карциномот на дојка и асоцирани со полоша прогноза и пократко преживување (98, 99). Спротивно на ваквите резултати, Ahmed и сор. сугерираат дека CD44-/CD24+ фенотипот е лош прогностички маркер кај рани карциноми на дојка и дека CD44+/CD24- е асоциран со најдобра, додека CD44-/CD24+ со најлоша прогноза (100). Слични резултати добиле и Kim и сор. укажувајќи дека CD24 е лош прогностички маркер кај хормон рецептор позитивни карциноми, додека CD44 е добар прогностички маркер кај хормон рецептор негативната група (101). Спротивно на досега изнесеното, неколку групи автори не покажале поврзаност помеѓу експресијата на CD44+/CD24- или ALDH1A1 со другите прогностички, клиничко-патолошки фактори или со преживувањето кај одделни молекуларни подгрупи (102-105). Atkinson и сор. покажале повисока експресија на КСК-маркерите во нормалното ткиво на дојка во непосредна близина на тројно негативните карциноми на дојка, укажувајќи на нивната улога како предиктивен маркер за развој на тројно негативни карциноми (106). Некои автори потврдиле намалена експресија на CD133 кај тумори со висок стадиум и лимфоваскуларна инвазија (107), додека други укажуваат на негова поврзаност со полоша прогноза и појава на рецидиви (88).

2. МОТИВ И ЦЕЛИ

2.1. МОТИВ

Точното и прецизно одредување на HER-2 статусот кај пациентите со карцином на дојка е императив при нивната селекција за таргетирана терапија, што ја наметнува потребата за користење на високо сензитивен и специфичен тест за евалуација на овој онкоген. Повеќето автори ја препорачуваат FISH-методата како супериорна во предвидување на клиничкиот исход кај пациентите со инвазивен карцином на дојка.

Недостигот на меѓулабораториската репродукцибилност која е резултат на разлики во ткивната обработка, како и субјективната евалуација на резултатите, се главен проблем на имунохистохемијата како тест-метод. Флуоресцентната ин ситу хибридизација е помалку засегната од артефакти поврзани со обработка на ткивото и поретко се јавуваат грешки при проценка на бројот на генски копии. Поради тоа, воведувањето на флуоресцентната ин ситу хибридизациона техника за одредување на HER-2 статусот кај пациенти со инвазивен карцином на дојка би довело до поголема објективност при евалуација на резултатите и нивна поголема репродукцибилност.

Ткивните примероци што се анализираат најчесто се со варијабилна преданалитичка обработка, поради тоа, неопходно е дефинирање на универзален протокол за работа кој ќе даде оптимални резултати во најголем број на анализирани ткивни примероци, независно од времето или условите на фиксација, сè со цел да се намали бројот на повторени анализи што подразбира и намалување на дополнителното трошење на скапи реагенси и дополнително потрошено време за анализа.

Карциномот на дојка е голем здравствен проблем на денешницата. И покрај напредокот во хемотерапијата, таргетираната и радиотерапијата, прогнозата на пациентите со напреднат карцином и понатаму останува лоша, што ја наметнува потребата од дефинирање на нови прогностички и предиктивни фактори кај карциномите на дојка.

Концептот дека карциномите се болест на стем/прогенитор клетки има длабоки импликации во развојот на нови стратегии за нивна превенција и терапија. Идентификацијата на КСК со користење на површински маркери се приоритет на бројни научни истражувања, бидејќи ерадикацијата на оваа ретка популација на клетки со развој на нова таргетирана терапија ќе значи и подобар исход или излекување на пациентите, што го прави ова подрачје интересно за истражување. Сè уште нема јасно дефинирани, специфични маркери за стем клетките кај карциномите на дојка, што ја наметнува потребата за дополнителни истражувања во оваа област.

2.2. ЦЕЛИ

1. Да се воведе, оптимизира и стандардизира FISH-методата за одредување на HER-2 генскиот статус на парафински ткивни примероци од пациенти со инвазивен карцином на дојка, кои се претходно фиксирани во формалин и калапени во парафин:
 - а. да се одреди влијанието на преданалитичките и аналитичките фактори врз FISH- резултатите;
 - б. да се споредат два различни протоколи на FISH за кои се користи идентична ДНК проба но различни китови за парафински преттретман;
 - в. да се корелираат резултатите од тестовите за HER-2 добиени со имунохистохемиската и со FISH-методата и да се утврди усогласеноста помеѓу двете методи;
 - г. да се корелира амплификацијата на HER-2 со клиничко-патолошките параметри.
2. Имунофенотипски да се карактеризираат канцерските стем/прогенитор клетки во инвазивен дуктален карцином на дојка, да се корелираат со клиничко-патолошките параметри и да се дефинираат прогностичките и предиктивните параметри кои се поврзани со зголемена експресија на стем клеточните маркери:
 - а. да се корелира експресијата на канцерските стем клеточни маркери со различните молекуларни поттипови на карциноми на дојка дефинирани врз основа на валидиран панел на имунохистохемиски маркери (HER-2, естрогенскиот рецептор, прогестеронскиот рецептор и маркерот на клеточна пролиферација-Ki67).
3. Да се корелира HER-2 статусот со експресијата на стем клеточните маркери кај инвазивните карциноми на дојка.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

3.1. ДИЗАЈН НА СТУДИЈА, ПАЦИЕНТИ И ТКВНИ ПРИМЕРОЦИ

Студијата е реализирана на Институтот за патологија, Медицински факултет – Скопје, и истата претставува ретроспективна студија во период од 2 години (2014-2016 година). Во оваа студија беа вклучени ткивни примероци од вкупно 88 пациенти поделени во две групи: група на испитаници и контролна група.

Група испитаници. Ја сочинуваат ткивни примероци од 73 пациенти од женски пол со дијагностициран примарен, дуктален инвазивен карцином на дојка кај кои била направена мастектомија со аксиларна лимфна дисекција. Ниту една од пациентките не примала терапија предоперативно, ниту имала докажани далечни метастази во моментот на иницијалната дијагноза (пациентките беа во I, II и III постоперативен стадиум). Во оваа група не беа вклучени пациенти од машки пол, пациенти кои имале дијагностициран само ин ситу карцином (пациенти во 0 стадиум на болест), пациенти со дијагностициран инвазивен карцином од специјален хистолошки тип, пациенти кај кои не била направена дисекција на лимфните жлезди, пациенти кои примале неoadјувантна терапија или пациенти кои имале докажани далечни метастази во моментот на иницијалната дијагноза (IV стадиум на болест).

Оперативниот материјал беше добиен од Клиниката за торакална и васкуларна хирургија во Скопје, Клиничката општа болница „Св. Наум Охридски“ во Скопје, Општата болница во Струга, Гевгелија и Велес. Оперативниот материјал од 40 пациенти од Клиниката за торакална и васкуларна хирургија во Скопје беше фиксиран на Институтот за патологија. Свежо добиениот материјал беше сериски расечен и потопен во 10% пуфериран формалин во текот на 24 часа (преку ноќ), на собна температура. Оперативниот материјал од 33 пациенти (од општите болници) беше доставен претходно фиксиран во формалин, после 24-96 часовна фиксација. За ниту еден од добиените оперативни материјали немавме податок за времето на ладна исхемија (односно времето поминато од моментот на хируршка ексцизија до моментот на отпочнување на фиксацијата).

Стандардниот макроскопскиот опис на оперативниот материјал опфаќаше: тежина и димензии на дојката и аксиларното масно ткиво, димензии на туморот, негова оддалеченост од ресекционите маргини, како и број на изолирани лимфни жлезди. По завршената анализа беа земени стандарден број примероци за рутинска, хистолошка анализа, еден репрезентативен примерок од туморското ткиво за имунохистохемиски боења за предиктивни маркери (HER-2, ER, PR, Ki67) кој го користевме и за флуоресцентна ин ситу хибридизација за одредување на амплификација на HER-2 генот. Еден од примероците од туморското ткиво кој содржеше доволно материјал за анализа се користеше за имунохистохемиски боења за канцерските стем клеточни маркери: CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam.

Контролна група. Ја сочинуваат ткивни примероци од 15 пациенти со бенигни лезии на дојка кај кои нема претходно дијагностициран карцином на дојка. Овие примероци ги користевме за да ја дефинираме нормалната целуларна дистрибуција на стем клеточните маркери во бенигно ткиво на дојка.

3.2. СВЕТЛОСНО-МИКРОСКОПСКА АНАЛИЗА

За стандардна хистолошка анализа се користеа ткивни пресеци со дебелина од 3 до 4 микрони, кои се нанесуваат на стандардни микроскопски стакла и се бојат со хематоксилин и еозин (H&E). Микроскопскиот опис опфаќа дефинирање на хистолошкиот тип на туморот, степенот на хистолошка диференцијација и нуклеарен градус, лимфо-васкуларна инвазија и број на позитивни лимфни јазли. Примероците се анализираа на светлосен микроскоп Nikon ECLIPSE 80i (Nikon instruments, Австрија).

Одредувањето на степенот на хистолошка диференцијација се базира на препораките на Нотингемскиот систем за градуирање (21), додека стадиумот на болеста се одреди согласно со критериумите на постоперативната pTNM-класификација од 2010 година на AJCC (108).

3.3. ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИЈА

За одредување на амплификација на HER-2 генот, ткивните примероци беа обработени со два различни протоколи за FISH за кои користевме идентична ДНК проба, но различен кит за парафински преттретман (слика 4). За анализа користевме двојно означена ДНК проба (PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit), која содржи LSI-HER-2 ДНК проба маркирана со SpectrumOrange флуоресцентна боја, специфична за HER-2 генскиот локус и ДНК проба за центромерот на хромозом 17 (CEP-17) која е маркирана со SpectrumGreen флуоресцентна боја.



Слика4. Реагенси за флуоресцентна ин ситу хибридизација.

Со цел воведување на FISH-методата, оптимизација на двата FISH-протокола (пред сè поради различното време на фиксација на ткивните примероци во преданалитичката фаза) и утврдување на влијанието на аналитичките фактори врз крајните резултати, иницијално изведовме серија на експерименти на 5 репрезентативни ткивни примероци, кај кои користевме варијабилни вредности за температурата и времето на инкубација за главните аналитички чекори (преттретман, ензимска дигестија и постхибридизациско испирање), прикажани во табела 3. За првиот протокол (протокол 1) користевме кит за преттретман - Paraffin Pretreatment Reagent Kit (Vysis/Abbott, IL, USA), додека за вториот протокол (протокол 2) користевме Histology FISH Accessory Kit (DAKO, Denmark).

Табела 3. Експериментален пристап во стандардизација на два протокола за FISH

Протокол 1 (Vysis Paraffin Pretreatment Reagent Kit, Vysis/Abbott, IL, USA)					
Преттретман- NaSCN		Дигестија- протеаза		Постхибридизациско испирање	
Температура	Инкубација	Температура	Инкубација	Температура	Инкубација
80°C	30 min 40 min	37°C	10 min 30 min 60 min 100 min	60°C 65°C 72°C	2 min 5 min 10 min
Протокол 2 (Histology FISH Accessory Kit, DAKO, Denmark)					
Преттретман - MES buffer		Дигестија- ладен пепсин		Постхибридизациско испирање	
Температура	Инкубација	Температура	Инкубација	Температура	Инкубација
95°C	10 min 20 min	37°C	3 min 5 min 10 min 15 min	60°C 65°C 75°C	2 min 5 min 10 min

NaSCN-Sodium Thiocyanate, MES - 2-[N-morpholino]ethanesulphonic acidbuffer

Анализата на резултатите од овие примероци опфаќа утврдување на успешноста и квалитетот на хибридизацијата, анализа на јадрената морфологија и квалитетот на сигналите. Успешната хибридизација подразбираше присуство на сигнали (кои се силни и лесни за интерпретација) во најмалку 70% од туморските јадра, отсуство на автофлуоресценција или неспецифични сигнали. По направената евалуација на резултатите, се дефинираа оптималните температурни и временски интервали за клучните чекори во двата протокола, во согласност со кои беа процедурирани другите примероци: 40/73 (20 примерока со 24-часовна фиксација и 20 примерока со пролонгирана - 48-96-часовна фиксација), ткивни примероци со протокол 1, а 33/73 (20 примерока со 24-часовна фиксација и 13 примерока со пролонгирана фиксација) со протокол 2. Со секоја

серија на примероци што се обработуваа, додаваеме контролни ткивни примероци со цел да се обезбедат адекватни перформанси на анализата.

За секој пациент користевме по два ткивни пресека од туморското ткиво со дебелина од 3 до 4 микрони: еден за стандардно H&E бојење и еден за FISH-анализа. Пресеците за FISH беа аплицирани на силанизиран, атхезивни стакла (Canelli, Italy или Thermo Scientific, Germany) и се сушеа на собна температура. За подобра атхезија на ткивните примероци, истите беа оставени преку ноќ во термостат, на температура од 56°C, а наредниот ден се продолжи со процесот на депарафинација. Пресеците со H&E бојење беа анализирани микроскопски со цел да се идентификува инвазивната компонента на туморот која потоа се маркираше од задната страна од предметното стакло на кое беше поставен ткивниот пресек, со помош на обележувач со остар врв.

3.3.1. Протокол број 1

Ткивните пресеци се депарафинираат во три последователни сада со ксилол во времетраење од 10 минути и два последователни сада со 96% алкохол во времетраење од 5 минути, се сушат 10 минути на собна температура и се потопуваат во раствор за преттретман [Pretreatment Solution –NaSCN (натриум тиоцијанат)], кој е претходно загреан во водена бања на температура од 80°C, во времетраење од 30 или 40 минути. Потоа примероците се оставаат 2 минути во дестилирана вода и се сушат 10 минути на собна температура. Следува дигестија со протеаза, 30 (10, 60 или 100) минути во водена бања на температура од 37°C. По завршената дигестија, примероците се промиваат 2 минути со дестилирана вода и се дехидрираат низ серија на алкохоли со концентрација од 70%, 80% и 96% во траење од 2 минути за секој чекор. Примероците повторно се сушат 10 минути на собна температура. Следните чекори се работат во темна просторија. Откако ќе се исушат примероците, се додаваат 3-10 микролитри (во зависност од големината на ткивниот примерок) флуоросцентно означена ДНК проба (претходно извадена на собна температура и извортексирана), се покриваат со покровно стакло и се фиксираат странично со лепак. Потоа следува автоматска денатурација и хибридизација, која се изведува во хибридизер (ThermoBrite, StatSpin Inc., USA), во кој се поставуваат две ленти за контрола на влажност. Денатурацијата е 5 минути на 37°C, додека хибридизацијата е од 16 до 18 часа (преку ноќ) на температура од 72°C. Наредниот ден се изведуваат постхибридизациските постапки, исто така во темна просторија. По отстранување на лепакот, пресеците се потопуваат во пуфер за испирање (2xSSC/0,3%NP40), за да се одлепат покровните стакла. Откако ќе се извадат покровните стакла, пресеците повторно се потопуваат во пуфер за испирање во времетраење 2 од (5 или 10 минути), претходно загреан во водена бања на температура од 72°C (60 или 65°C). Потоа примероците се сушат 10 минути на собна температура, се додава 4, 6 diamidin-2-phenylindoldihydrochloride (DAPI), како контраобојување и се покриваат со покровно стакло.

3.3.2. Протокол број 2

По депарафинизација на ткивните пресеци, која се изведува во три последователни сада со ксилол во времетраење од 5 минути и два последователни сада со 96% алкохол во времетраење од 5 минути, примероците се сушат 10 минути на собна температура и се испираат 3 минути во пуфер, исто така на собна температура. Потоа примероците се инкубираат 10 (или 20 минути), во раствор за преттретман [Pretreatment Solution- MES (2-[N-morpholino]ethanesulphonic acid) buffer], кој е претходно загреан во водена бања на температура од 95°C. По завршената инкубација, примероците се оставаат 15 минути на собна температура да се оладат и повторно се потопуваат уште 10 минути во преттретман на собна температура. На крајот примероците се испираат во пуфер за испирање, во два последователни сада по 3 минути. Следува дигестија со ладен пепсин: примероците се поставуваат во хибрилизер кој е претходно загреан на 37°C, врз нив се капнува 3 до 5 капки ладен пепсин и се инкубираат 5 (3, 10, 15 минути) на температура од 37°C. По завршената дигестија, пресеците се испираат во пуфер, двапати по 3 минути, се дехидрираат низ серија на алкохоли со променлива концентрација (70%, 80% и 96%), и се сушат на собна температура. Следните два чекора, хибрилизација и постхибрилизација, се изведуваат во темна просторија. Централно на примероците се додава од 3 до 10 микролитри (зависно од големината на ткивниот примерок) флуоросцентно означена ДНК проба (претходно извадена на собна температура и извортексирана), се покрива со покровно стакло, странично се става лепак и примероците се поставуваат во хибрилизер. Следува автоматска денатурација во траење од 5 минути на 72°C и хибрилизација во траење од 16 до 18 часа (преку ноќ) на 37°C. Наредниот ден се отстранува лепакот и примероците се потопуваат 10 минути во пуфер за испирање, на собна температура. Откако ќе отпаднат покровните стакла, примероците се инкубираат во претходно загреан пуфер на температура од 65°C (60°C или 75°C) во водена бања, во времетраење од 5 (2 или 10 минути). Повторно се испираат во пуфер, 3 минути на собна температура, се дехидрираат низ серија на алкохоли и се сушат 10 минути на собна температура. На секој пресек се додава 5-10 микролитри DAPI и се поставува покровно стакло.

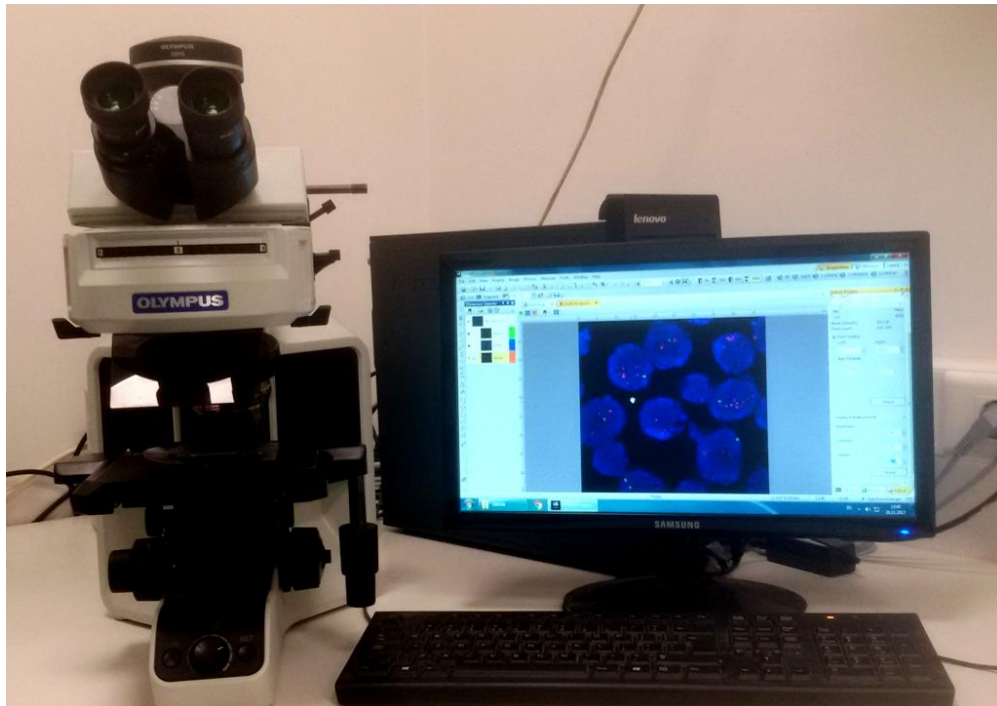
По завршената процедура примероците се оставаат да стојат најмалку 1 час во фрижидер на температура од + 4°C, сè со цел да се стабилизираат сигналите. Доколку резултатите не се евалуираат истиот ден, примероците се чуваат во замрзнувач на -20°C и истите се анализираат во текот на наредните 24-72 часа.

3.3.3. Евалуација на FISH- резултатите

Тестовите за анализа користат ДНК проби кои се означени со флуорофори кои емитуваат флуоресценција со различна бранова должина кога се ексцитирани од фотони од живина лампа со моќност од 100 вати. Емитираните бранови

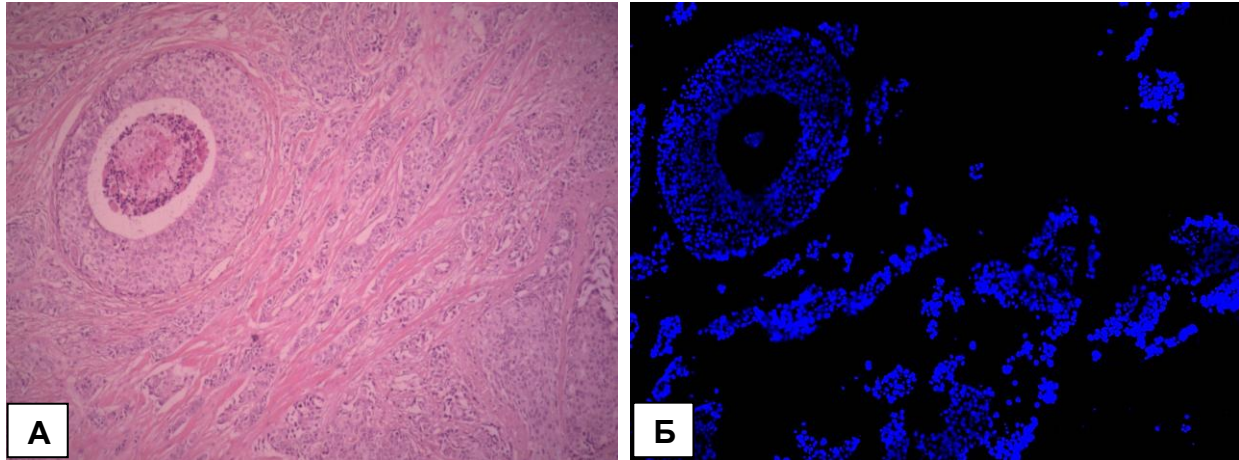
должини од различни флуорофори се фокусираат преку специфични филтри за детекција кои се неопходни за правилна интерпретација на FISH- резултатите.

Резултатите се анализираат во темна просторија со помош на флуоресцентен микроскоп Olympus BX43 (Olympus Corporation, Japan) (слика 5), опремен со Spectrum Orange, Spectrum Green и DAPI моно филтри, како и Spectrum Orange/Spectrum Green двоен филтер. Секој случај е фотодокументиран со XM10 (Olympus) монохроматска камера и анализиран со помош на софтвер Olympus cellSens Standard, Version 1.15.

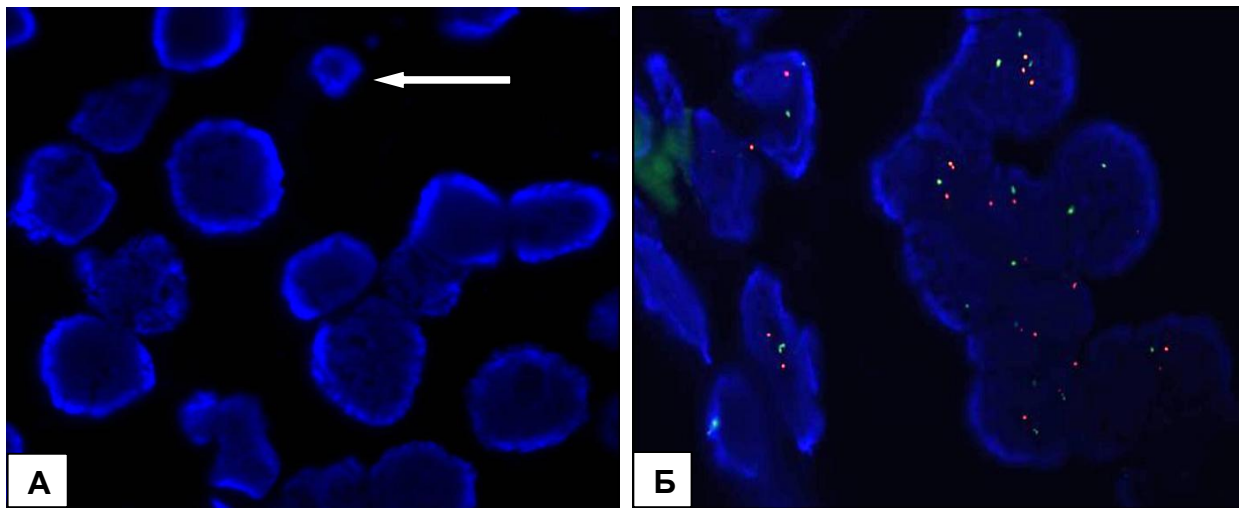


Слика 5. Флуоресцентен микроскоп, Olympus BX43.

Тестовите се анализираа паралелно со H&E бојење за точно да се локализира зоната на инвазивен тумор (слика 6). Нумерички се евалуираа сигналите во јадра со интактна нуклеарна мембрана, кои не се преклопуваа и имаа најмалку еден сигнал за HER-2 генот и центромерот на хромозом 17 (слика 7A). Нормалниот дуктален епител, стромалните клетки и лимфоцитите служеа како нормална внатрешна контрола при броење на сигналите (слика 7Б).



Слика 6. **А**, Н&Е боење, примерок од карцином на дојка (Н&Е x100); **Б**, DAPI боење, паралелен пресек со Н&Е, инвазивна компонента (долу десно), ин ситу карцином (горе лево) (DAPI counterstain x100);

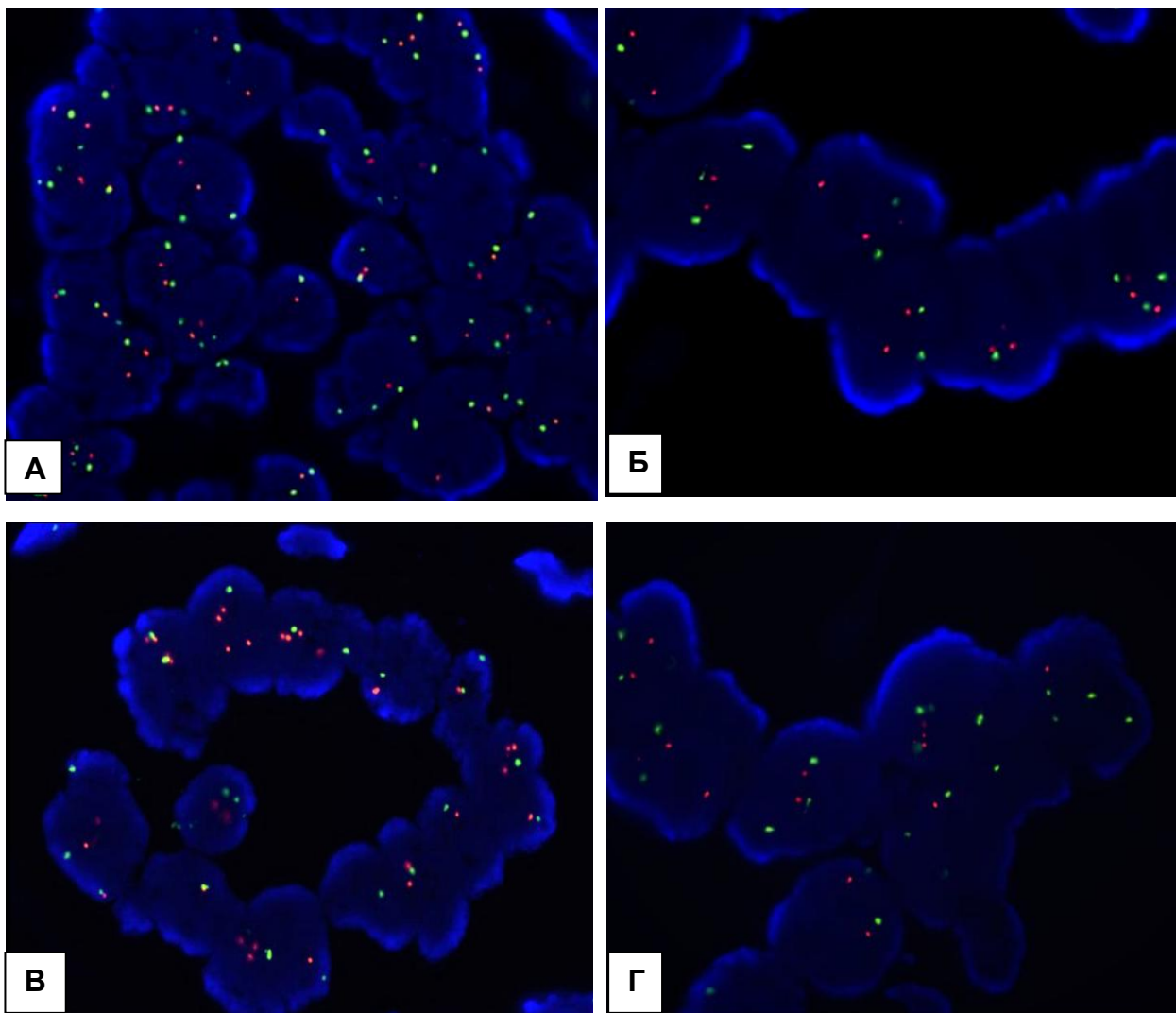


Слика 7. **А**, Јадра со интактна јадрена мембрана, кои не се преклопуваат и се со приближно ист дијаметар. Мали јадра (стрелка), кои се резултат на скратување во текот на сечење не се анализираат (DAPI counterstain x1000); **Б**, Стромалните клетки (лева половина) се нормална внатрешна контрола при евалуација на сигналите во туморските јадра (десна половина),(DAPI counterstain x1000);

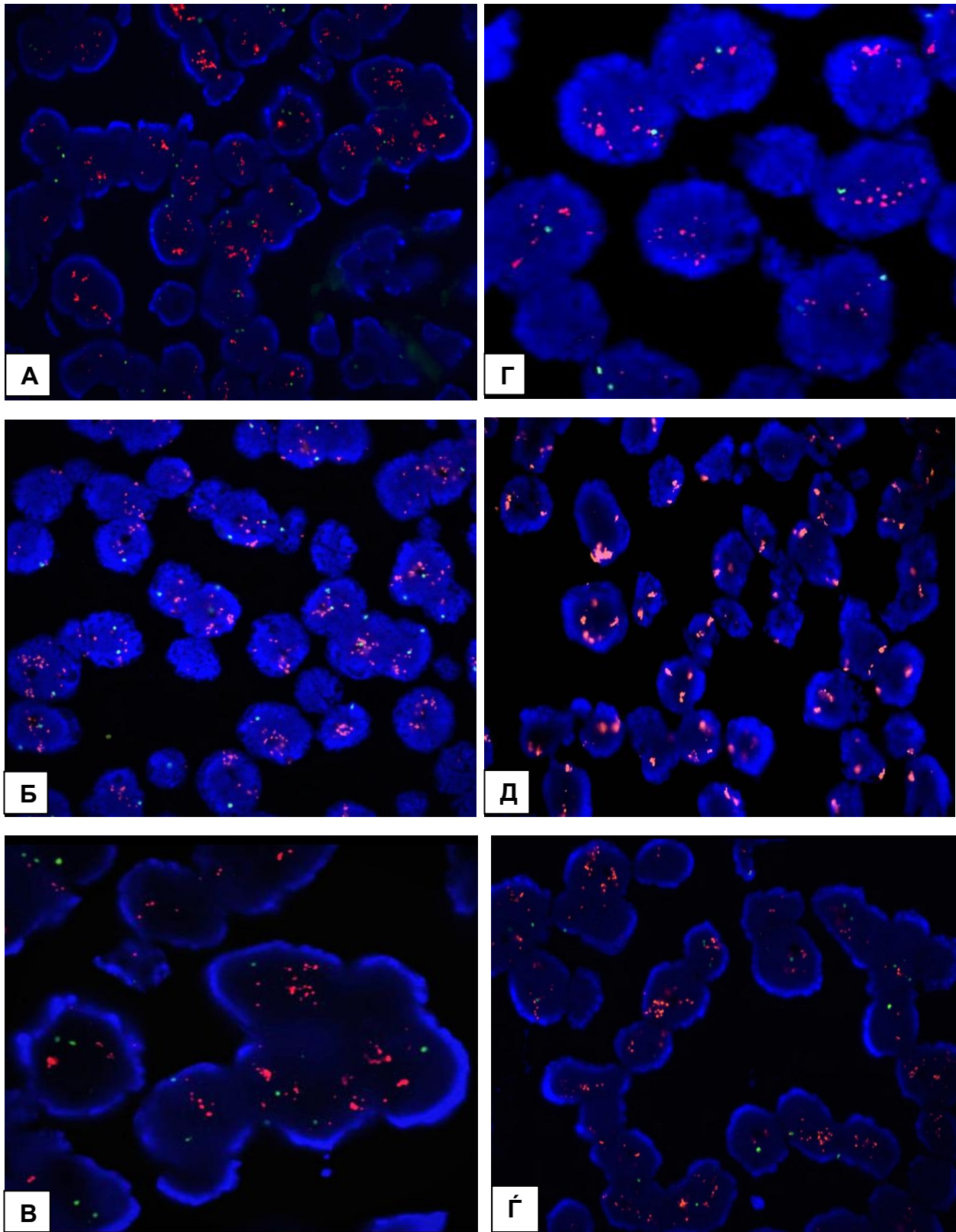
Бидејќи сигналите што се евалуираат често се наоѓаат во различни рамнини на фокусот, тие се фокусираат низ пресекот во текот на анализата, сè со цел да се најдат сите сигнали присутни во туморското јадро. Сигналите се бројат на зголемување x1000. За анализа се користи имерзионо масло без автофлуоресценција (Sigma-Aldrich, USA) и соодветен филтер: Spectrum Orange

за HER-2 генот (портокалов сигнал) и Spectrum Green за CEP-17 (зелен сигнал). Нумерички се одредува бројот на сигнали, во вкупно 40 јадра (4 фокуси по 10 јадра), по што се одредува соодносот HER-2/CEP-17. Резултатите се интерпретираат согласно со препораките на (ASCO/CAP), каде HER-2 статусот се дефинира како позитивен кога соодносот HER-2/CEP17 е поголем од 2, и негативен кога соодносот е помал од 2 (43). Соодносот HER-2/CEP-17 се користи сè со цел корекција на евентуална полизомија за хромозом 17.

На слика 8 се прикажани примери за HER-2 неамплифицирани случаи (HER-2/CEP17 < 2), додека на слика 9 се прикажани примери за HER-2 амплифицирани случаи (HER-2/CEP17 > 2).



Слика 8. А-Г, Примери за HER-2/FISH неамплифицирани случаи, сооднос HER-2/CEP17 < 2, (DAPIcounterstain x1000).



Слика 9. А-Г, Примери за HER-2/FISH амплифицирани случаи, HER-2/CEP17 > 2, (DAPI counterstain x1000).

3.4. ИМУНОХИСТОХЕМИСКИ БОЕЊА

За имунохистохемиска анализа се користат парафински ткивни пресеци со дебелина 3-4 микрони, аплицирани на силанизирани предметни стакла. Антителата што се користат за имунохистохемиска анализа се прикажани во табела 4.

3.4.1. Имунохистохемиска детекција на HER-2 протеинот

За семиквантитативна детекција на HER-2 антигенот, боењето се изведува во апарат за автоматизирана имунохистохемија, Benchmark GX, (Ventana Medical Systems, Inc., USA). Накратко, примероците од туморското ткиво со дебелина од 3 до 4 микрони се поставуваат на силанизирани предметни стакла, се депарафинизираат со EZ Prep и се претретираат со Cell Conditioning 1, 36 минути на температура од 100°C. По инкубацијата со примарно антитело (20 минути на температура од 37°C) и по апликацијата на систем за хромогена детекција - ultraView Universal DAB Detection Kit, Ventana (8 минути, на температура од 37°C), се додава контрабоја- Hematoxylin II и bluing reagent, секој од нив во времетраење од 4 минути. На крај, се додава покровен медиум и покровно стакло. Како позитивна контрола за HER-2 се користи туморско ткиво од дојка, кое е претходно бодено со 3+, додека како негативна контрола, ткиво со претходен бод 0.

Табела 4. Антитела користени за имунохистохемиска анализа

Антитело	Клон	Производител	Разредување	Тип на сигнал
HER2	4B5	Ventana, USA	Ready to use	Мембрански
ER	EP1	DAKO, Denmark	1:50	Јадрен
PR	PgR636	DAKO, Denmark	1:100	Јадрен
Ki 67	MIB1	DAKO, Denmark	1:150	Јадрен
CD44	DF 1485	DAKO, Denmark	1:50	Мембрански
CD24	8.B.76	Abcam	1:100	Мембрански
ALDH1A1	EP1933Y	Abcam	1:100	Цитоплазматски
CD133	AC133	Miltenyi Germany	Biotec, 1:30	Мембрански
EpCam	Ver-EP4	DAKO, Denmark	1:100	Мембрански

3.4.1.1. Евалуација на протеинската експресија на HER-2

Имунохистохемиската анализа за HER-2 експресија подразбира евалуација на мембрански позитивитет согласно со критериумите на ASCO/CAP 2013 (37), кој идентификува 4 категории (0 негативен, 1+ негативен; 2+ двојбен и 3+ позитивен) (табела 5). Независно од имунохистохемскиот скор, кај сите случаи дополнително се работеше флуоресцентна ин ситу хибридизација, за да се одреди присуството на амплификацијата на HER-2 генот.

Табела 5. Дефинирање на HER-2 експресијата согласно со ASCO/CAP 2013

HER2 експресија	Мембрански позитивитет
HER2 0	Отсутно мембранско обојување или нецелосно, слабо, едвај забележливо мембранско пребојување во $\leq 10\%$ од инвазивните туморски клетки
HER2 1+	Нецелосно мембранско пребојување кое е слабо/ едвај видливо $>10\%$ од инвазивните туморски клетки
HER2 2+	Циркумференцијално мембранско пребојување кое е нецелосно и/или слабо/умерено во $>10\%$ од инвазивните туморски клетки, или комплетно и циркумференцијално мембранско пребојување кое е интензивно и во $\leq 10\%$ од инвазивните туморски клетки
HER2 3+	Циркумференцијално, комплетно и силно мембранско пребојување во $>10\%$ од инвазивните туморски клетки

3.4.2. Имунохистохемиска детекција на ER, PR, Ki67 и канцерските стем клеточни маркери (CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam)

За имунохистохемиска анализа се користеше полуавтоматизирана PT Link имунопероксидазна техника. Накратко, парафинските ткивни пресеци со дебелина од 3 до 4 микрони, се аплицираат на силанизирани предметни стакла, се депарафинираат и рехидрираат по стандардна постапка, по што следува преттретман со EnVision FLEX Target Retrieval Solution, (со висок pH= 9,0 за ER, PR, Ki67, CD44, CD133, ALDH1A1 и EpCam, а со низок pH= 6,0 за CD24), 20 минути на температура од 97°C; инактивација на ендогената пероксидаза со EnVision FLEX Peroxidase- Blocking reagent и инкубација со примарно антителио 20 минути на собна температура. Потоа следува апликацијата на EnVision FLEX/HRP полимер 20 минути на собна температура и систем за визуализација со хромоген (ди-амино-бензедин - DAB) во траење од 5 минути, исто така, на собна температура. Следен чекор е контраобојување со хематоксилин, по што се додава покровен медиум и покровно стакло. Препаратите се анализираат на светлосен микроскоп, Nikon, ECLIPSE 80i (Nikon Instruments, Austria).

Како позитивна контрола за секое имунобоење се користат ткивни контроли кои се препорачани од производителот.

3.4.2.1. Евалуација на имунохистохемиските боења за ER, PR и Ki67

Кај сите антитела микроскопски се евалуира интензитетот на пребојување, процентот на обоени клетки, како и субцелуларната дистрибуција на сигналот. За ER и PR се евалуира јадрениот позитивитет, а $\geq 1\%$ е пресечна точка (cut-off point), која служи за разграничување на позитивни од негативни случаи (25). Како позитивна контрола за хормонските рецептори се користи туморско ткиво од карцином на дојка со претходно утврден позитивен сигнал (силен јадрен позитивитет во најголем процент од јадрата). Маркерот на клеточна пролиферација - Ki67 се дефинира како процент на позитивни клетки од вкупниот број на клетки (108), а 20 проценти е „cut-off“ кој ги разграничува случаите со низок, односно со висок пролиферативен индекс (Ki67-low/ Ki67-high) (65). Како позитивна контрола за Ki67 се користи тонзила (согласно со препораките на производителот).

3.4.2.2. Дефинирање на молекуларните поттипови

Туморите се класифицираат во 4 молекуларни поттипови користејќи валидиран, имунохистохемиски базиран сурогат, согласно со препораките на St Gallen-ската конференција (65): Luminal A (ER + и/или PR+, Ki67 low и HER-2 -), Luminal B (ER + и/или PR+, Ki67 high и/или HER-2+), HER-2 позитивен (ER-, PR- и HER-2+) и Triple negative (ER-, PR- и HER-2-).

3.4.2.3. Евалуација на имунохистохемиските боења за канцерските стем клеточни маркери: CD44, CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam

До денес сè уште нема стандардизирани критериуми за евалуација на стем клеточните маркери, ниту пак јасно дефинирани и прифатени гранични вредности кои корелираат со типот на антитела што се користат или со типот на сигнал што се анализира. Канцерските стем клеточни маркери се одредуваат семиквантитативно. Дел од авторите го користат системот за бодирање на Allred (109), кој се дефинира како збир од интензитет на пребојување (0 нема пребојување, 1 слабо пребојување, 2 умерено пребојување, 3 силно пребојување) и процент на обоени клетки (0 = 0%; 1 = 1%; 2 = 1 до 10%; 3 = 11 до 33%; 4 = 34 до 66%; 5 = > 66%), со крајни вредности кои се движат во граници од 0 до 8 (интензитет на пребојување + процент на обоени клетки = 0 до 8). Како позитивна контрола се користат ткива кои се препорачани од производителот: хепатално ткиво за ALDH1A1; дебело црево за CD24, бубрежно ткиво за EpCam, тонзила за CD44 и за CD133.

Евалуацијата на протеинската експресија на CD44, CD24, CD133 и EpCam, подразбира анализа на степенот и интензитет на имунореактивност на клеточната мембрана, додека за ALDH1A1 се евалуира цитоплазматскиот позитивитет. Како „cut off“ вредност за дефинирање на позитивитет на CD44, CD24. EpCam и ALDH1A1 е Allred-ов збир ≥ 4 (109, 110), додека CD133 се дефинира како позитивен доколку $\geq 1\%$ од клетките покажат позитивен сигнал (87,106).

3.5. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Статистичката анализа на податоците добиени од истражувањето е направена во статистичката програма SPSS 23,0.

За тестирање на нормалноста на добиените податоци се користеше Shapiro-Wilk's *W* test.

Категориските параметри се прикажани со апсолутни и релативни броеви. Квантитативните варијабли се прикажани со просек и стандардна девијација.

Совпаѓањето на IHC и FISH методите се анализираше со Каппа коефициент, а за одредување на точноста на IHC методот во однос на FISH, се пресметаа неговите дијагностички перформанси (сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност, позитивен и негативен однос на веројатност).

За компарирање на анализираниите варијабли се користеа Chi square test, Fisher exact two tailed test, Student t-test, Analysis of Variance (ANOVA) test.

Логистичка регресивна анализа со одредување на Odd ratio (OR) и 95% CI се користеше за одредување на предиктивното влијание на одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри во експресијата на стем клеточните маркери.

Статистичката сигнификантност се дефинираше на ниво на $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ДЕСКРИПТИВНА АНАЛИЗА НА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ

Во истражувањето беа вклучени ткивни примероци од оперативен материјал на 73 пациентки со дијагностициран дуктален инвазивен карцином на дојка. Пациентките беа на возраст од 41 до 86 години, со просечна возраст од $59,25 \pm 11,02$ години. Повеќе од половина од пациентките, 50 (68,49%), беа постари од 50 години (табела 6).

Просечниот дијаметар на туморите изразен во милиметри беше $27,31 \pm 13,9$ милиметри. Најмалиот измерен дијаметар беше 5 милиметри, додека најголемиот измерен дијаметар беше 75 милиметри. Најголемиот број, 46 (63,01%), од пациентките имаа тумор со големина од 20 до 50 милиметри; 24 (32,88%) пациентки имаа тумори со големина ≤ 20 милиметри, а само 3 (4,11%) пациентки имаа тумор со големина > 50 милиметри (табела 6).

Табела 6. Дистрибуција на пациентите во однос на возраста и големината на туморот

Варијабла	n (%)	
Возраст	≤ 50	23 (31,51)
	> 50	50 (68,49)
	mean \pm SD (min-max)	$59,25 \pm 11,02$ (41–86)
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)
	20-50	46 (63,01)
	> 50	3 (4,11)
	mean \pm SD (min-max)	$27,31 \pm 13,9$ (5–75)

Во табела 7 е прикажана дистрибуцијата на пациентките во однос на класичните хистопатолошки карактеристики (хистолошки и нуклеарен градус, туморски статус, лимфонодален статус и стадиум на болеста).

Согласно со прикажаните резултати, тумори со висок нуклеарен градус (NG3), како и лошо диференцирани тумори (G3), беа детектирани во повеќе од 2/3 од случаите, односно 57 (78,08%) и 51 (69,86%), соодветно. Пациентките со туморски статус -pT2 и pT1 беа најзастапени во анализираната група, 42 (57,53%) и 24 (32,88%), соодветно. Најголем број од пациентките или немаа метастатски депозити во регионалните лимфни жлезди, 28 (38,36%) или имаат до 3 позитивни лимфни жлезди (pN1), 21 (28,76%). Најголем процент (42,46%) од пациентките беа дијагностицирани во II стадиум на болеста, 35,62% во III стадиум на болеста, а само 21,92% во I стадиум на болеста.

Табела 7. Дистрибуција на пациентите во однос на класичните хистопатолошки карактеристики

Варијабла		n (%)
G	1	3 (4,11)
	2	19 (26,03)
	3	51 (69,86)
NG	1	1 (1,37)
	2	15 (20,55)
	3	57 (78,08)
pT	1	24 (32,88)
	2	42 (57,53)
	3	2 (2,74)
	4	5 (6,85)
pN	0	28 (38,36)
	1	21 (28,77)
	2	12 (16,44)
	3	12 (16,44)
Stage	I	16 (21,92)
	II	31 (42,46)
	III	26 (35,62)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 8 е прикажана дистрибуцијата на пациентите во однос на експресијата на ER, PR и Ki67. Повеќе од 2/3 од анализираните случаи покажаа позитивна експресија за естрогенскиот и прогестеронскиот рецептор: 62 (84,93%) и 53 (72,6%), соодветно. Во однос на експресијата на маркерот на клеточна пролиферација, најголем процент (63,02%) од испитаниците покажаа висока експресија за Ki67, а 36,98% покажаа ниска експресија за Ki67.

Табела 8. Дистрибуција на пациентите во однос на експресијата на ER, PR и Ki67.

Варијабла		n (%)
ER	H	11 (15,07)
	П	62 (84,93)
PR	H	20 (27,4)
	П	53 (72,6)
Ki67	low	27 (36,98)
	high	46 (63,02)

ER- естрогенски рецептор, PR- прогестеронски рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, H- негативен, П- позитивен

Во табела 9 е прикажана експресијата на канцерските стем клеточни маркери во контролната група. Контролната група во нашата студија ја сочинуваат 15 ткивни примероци од пациентки со бенигни лезии на дојка, на возраст од 25 до 45 години, кај кои нема претходно дијагностициран карцином на дојка. CD44, CD133 и EpCam покажаа варијабилна експресија, со различен интензитет и различен процент на обоени клетки (епителни, миоепителни или стромални) во сите анализирани примероци (100%); CD24 беше експресиран во 40% од случаите, додека ALDH1A1 беше експресиран во 33,33% од случаите.

Табела 9. Дистрибуција на стем клеточни маркери во бенигно ткиво на дојка

Варијабла	вкупно	Контролна група n (%)
CD44	H	0
	П	15 (100)
CD24	H	9 (60)
	П	6 (40)
CD133	H	0
	П	15 (100)
ALDH1A1	H	10 (66,67)
	П	5 (33,33)
EpCam	H	0
	П	15 (100)

4.2. ВОВЕДУВАЊЕ, СТАНДАРДИЗАЦИЈА И ОПТИМИЗАЦИЈА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИОНА АМЕТОДА – ВЛИЈАНИЕ НА ПРЕДНАЛИТИЧКИТЕ И АНАЛИТИЧКИТЕ ВАРИЈАБЛИ

Во истражувањето, првично се анализираше влијанието на аналитичките варијабли (раствор за преттретман, ензимска дигестија и постхбридизациско испирање) врз FISH- резултатите добиени на пет репрезентативни ткивни примероци од карцином на дојка, по што дефиниравме два најуспешни протокола.

Резултатите од влијанието на преттретманот и ензимската дигестија врз процесот на хбридизација се прикажани во табела 10. Различното време на инкубација во растворот за преттретман, во двата протокола, не покажа значајно влијание врз квалитетот на резултатите (интензитетот на сигналите или присуството на автофлуоресценција), па поради тоа пократкиот период на инкубација го одбравме како посоодветен.

Во однос на процесот на ензимска дигестија, експерименти беа изведени само во однос на времето на инкубација. Случаите со пократка дигестија покажаа поголема абсорпција на DAPI, автофлуоресценција и некомплетна хбридизација (слика 10A). Пролонгираната ензимска дигестија доведе до деструкција на

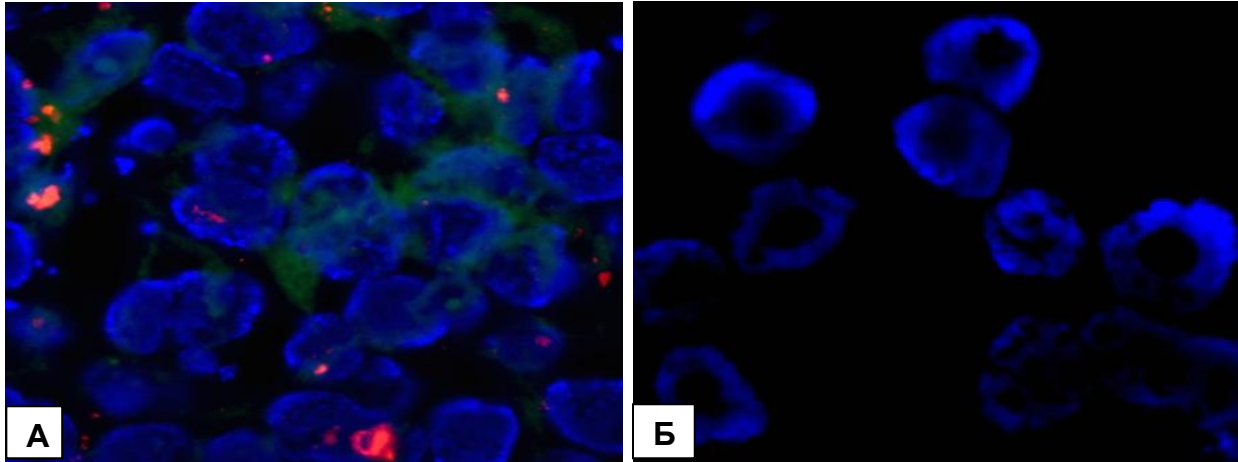
нуклеарната морфологија, намален интензитет на сигналите или во дел од случаите целосна загуба на сигналите (слика 10Б).

Инкубацијата на примероците во протеазен раствор во текот на 10 минути во првиот протокол резултираше со неуспешна хибридизација и овие тестови беа несоодветни за анализа поради отсуството на сигнали. Дигестијата на примероците со протеаза во времетраење од 30 и 60 минути резултираше со сигнали со умерен или добар квалитет во најголем број од случаите. Подолга инкубација со пепсин (10 и 15 минути во вториот протокол) доведе до деструкција на јадрата, што резултираше со делимна загуба на сигналите (при 15-минутна дигестија) во дел од анализираните примероци и истите беа несоодветни за анализа.

Квалитативно најдобри резултати (силни сигнали и добра јадрена морфологија) во сите експериментални случаи, беа добиени при 100-минутна дигестија со протеазен раствор при користење на Vysis Paraffin Pretreatment Kit и 5 минутна дигестија со ладен пепсин со DAKO Pretreatment Kit.

Табела 10. Влијание на преттретманот и ензимската дигестија врз FISH-резултатите

Кит	Преттретман		Дигестија		Коментар
	Температура(°C)	Време(min)	Температура(°C)	Време(min)	
Vysis/ Abbott	80	30	37	10	Автофлуоресценција, слаб/отсутен сигнал
				30	Умерени, добри сигнали
		60		Добри сигнали	
		100		Оптimalно Силни сигнали, добра јадрена морфологија	
DAKO	95	10	37	3	Релативно добри сигнали
				5	Оптimalно Силни сигнали, добра јадрена морфологија
		10		Нуклеарна деструкција	
		20		Нуклеарна деструкција, загуба на сигнали	

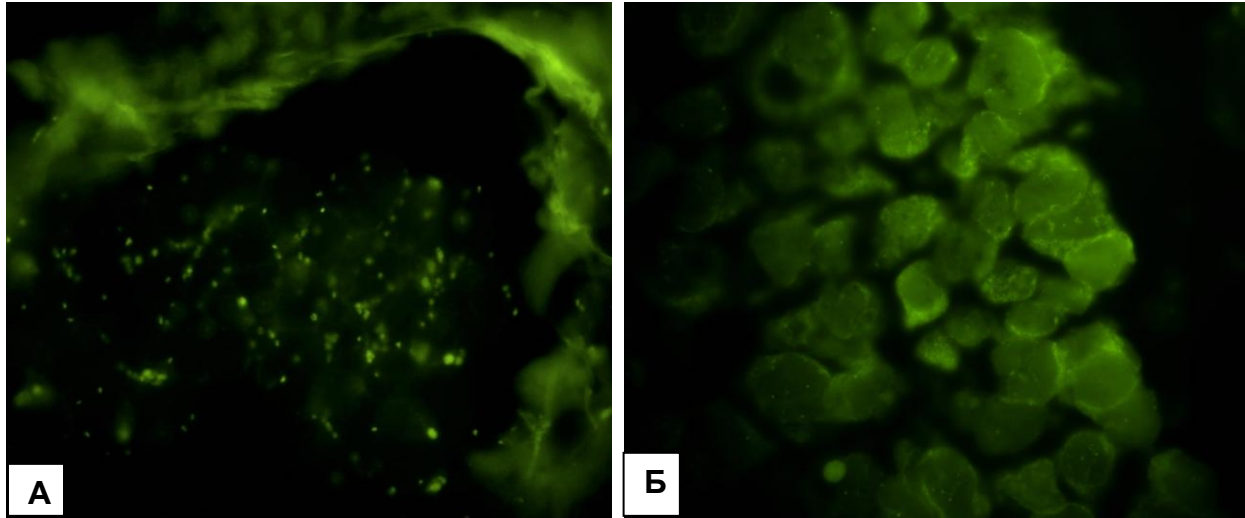


Слика10. Несоодветни FISH резултати за евалуација поради неадекватна ензимска дигестија: **А**, Автофлуоресценција и отсуство на специфични сигнали во јадрата како резултат на некомплетна хибридизација при недоволна дигестија, Vysis Pretreatment kit, протеаза 10 минути (DAPI counterstain x1000); **Б**, Деструкција на нуклеарната морфологија и неадекватна апсорпција на DAPI како резултат на прекумерна дигестија, DAKO Pretreatment kit, пепсин 15 мин. (DAPI counterstain x1000).

Промените во постхибридациското испирање, исто така, покажаа значајно влијание врз квалитетот и успешноста на хибридизацијата (слика11).

Високата температура на пуферот за испирање или пролонгирано испирање резултираше со слаби сигнали или комплетна загуба на сигналите (75°C во текот на 5 минути или 10 минути со DAKO HistologyKit), поради што тестовите беа несоодветни за анализа. Пократка инкубација или пониска температура на пуферот за испирање (60°C во текот на 2 минути или 5 минути со Vysis Pretreatmentkit, како и 60°C во тек на 2 минути со DAKO Histology Kit) резултираше со нагласена автофлуоресценција која ја отежнува или оневозможува евалуацијата на сигналите. Останатите експериментални чекори во најголем број случаи резултираа со сигнали кои може да се анализираат.

Оптимални резултати во сите анализирани случаи добивме при 2-минутно испирање на 72°C користејќи 2XSSC /0.3% NP-40 Vysis пуфер за испирање, и при 5-минутно испирање на температура од 60°C кога беше користен (Tris/HCl) пуфер за испирање од DAKO. Речиси идентични резултати добивме и при 5-минутно испирање на температура од 65°C со Tris/HCl пуфер за испирање од DAKO.



Слика 11. Примери за FISH кои се несоодветни за евалуација поради неадекватно постхбридизациско испирање: **А**, Неспецифични сигнали, автофлуоресцентни партикли (Spectrum Green x1000); **Б**, Автофлуоресценција која ги маскира сигналите (Spectrum Green x1000).

По направената евалуација на добиените резултати, прецизно се дефинираа оптималните временски и температурни интервали во сите последователни чекори, во двата протокола за FISH, кои се користеа како работни протоколи во понатамошниот дел од истражувањето (табела 11).

Табела 11. Приказ на два протокола за FISH

Постапки	Протокол 1	Протокол 2
Кит за преттретман	Vysis Paraffin Pretreatment Reagent Kit, Vysis/Abbott, IL, USA	Histology FISH Accessory Kit, DAKO, Denmark
ПРВ ДЕН		
Депарафинација	3x10 мин Xylol; 2x5 мин 96% Alcohol; 10 мин /CT;	3x5 мин Xylol; 2x5 мин 96% Alcohol; 10 мин /CT; 3 мин /CT /WB6;
Преттретман	30 мин /80°C Раствор за преттретман; 2 мин /CT /Дестилирана вода;	10 мин /95°C P1; 15 мин / CT; 10 мин / CT/ P1; 2x3 мин / CT / WB6;
Дигестија	100 мин /37°C Протеазен раствор; 2 мин /RT / Дестилирана вода;	5 мин /37°C Ладен пепсин во хибридизер; 2x3 мин /CT/WB6;
Дехидратација	2 мин 70% Alcohol; 2 мин 80% Alcohol; 2 мин 96% Alcohol; 10 мин /CT;	Идентично
Хибридизацијата и постхибризациските постапки се изведуваат во темна просторија		
ДНК проба	3-10µl ДНК проба;	Идентична
Денатурација	5 мин/72°C;	Идентично
Хибридизација	16 часа/37°C;	Идентично
ВТОР ДЕН		
Пост-хибризациско испирање	Отстрани лепак; Потопи во 2xSSC/0,3%NP40/ pH7-7,5/CT; Отстрани покровно стакло; 2 мин /72°C 2xSSC/0,3%NP40; 1 мин /CT /Дестилирана вода; 10 мин /CT;	Отстрани лепак; Потопи во WB4/CT; Отстрани покровно стакло; 5 мин /60°C WB4; 2x3 мин /CT WB6; 2 мин 70% Alcohol; 2 мин 80% Alcohol; 2 мин 96% Alcohol; 10 мин /CT;
Контраобојување	10µl DAPI II Pathvysion; Покровно стакло	Fluorescence medium 100 pg/LDAPI Покровно стакло

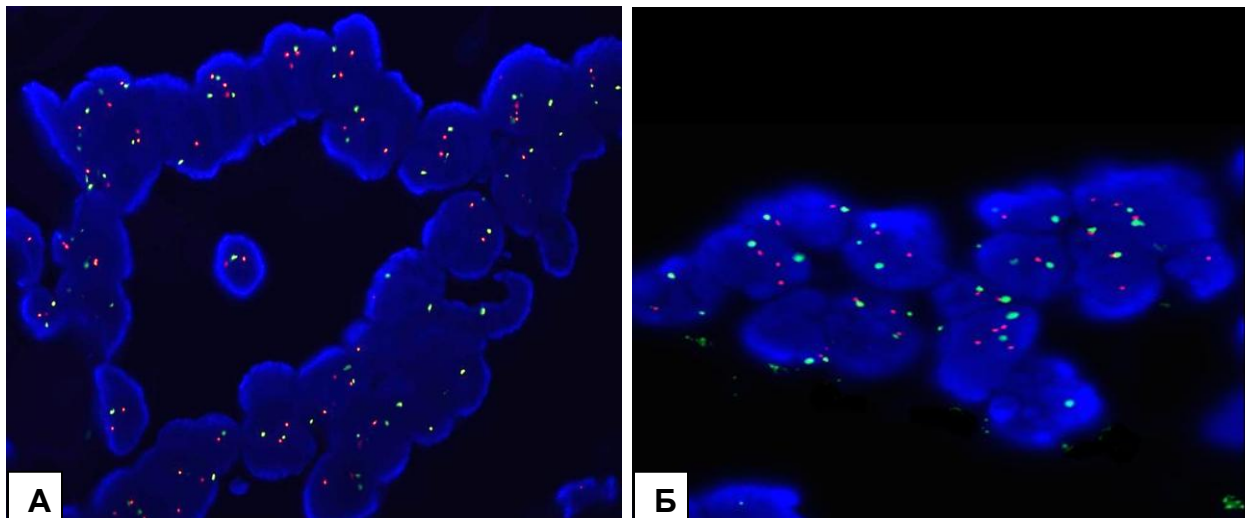
CT- Собна температура; P1- Преттретман; WB – Пуфер за испирање; DNA- Deoxyribonucleic acid; SSC- Saline Sodium Citrate; NP40- Nonionic Detergent; DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole.

4.2.1. Компарација на два различни протоколи за FISH

Од вкупно 73 анализирани ткивни примероци, успешна хибридизација беше постигната во 72 (98,63%) од случаите. Само еден (1/40) ткивен примерок, со пролонгирана фиксација, обработен со протоколот 1 не покажа успешна хибридизација, додека сите 33 примерока обработени со протоколот 2 покажаа успешна хибридизација. Овој ткивен примерок беше тестиран дополнително и со протоколот 2, но повторно не беше постигната успешна хибридизација.

При преттретман на примероците со NaSCN и ензимска дигестија со протеаза (VysisParaffin Pretreatment Kit), отпаднаа вкупно 6 (15%) ткивни примероци во текот на анализата, особено после ензимскиот преттретман. Спротивно на ваквите резултати, ниту еден ткивен примерок не отпадна во текот на преттретман со DAKO Histology Kit, што беше статистички значајно ($p=0,029$).

Анализата за квалитетот на сигналите и во двата FISH протокола покажа силни, јасни сигнали кои се лесни за интерпретација. Притоа, при користење на Vysis Paraffin Pretreatment Kit, зелените сигнали се понагласени од црвените, додека при тестирање со DAKO Histology Kit се добиваат поуниформни сигнали (слика12). Сепак, во случаи кога беше добиен послаб зелен сигнал со DAKO реагенсите, повтореното тестирањето со Vysis-китот за преттретман, резултираше со зелени сигнали со значително подобар квалитет.



Слика 12. **А,** Силни униформни сигнали, лесни за интерпретација, DAKO Pretreatment Kit (DAPI counterstain x1000); **Б,** Силни сигнали, со понагласен зелен сигнал, Vysis Pretreatment Kit (DAPI counterstain x1000).

4.2.2. Корелација на резултатите за HER-2 добиени со имунохистохемиска и со FISH-метода

Во однос на имунохистохемиската експресија за HER-2, сите случаи беа класифицирани во 4 групи: IHC 0 (негативни), IHC 1+ (негативни), IHC 2+ (двојбени) и IHC 3+ (позитивни). Најголем број од случаите, 32 (43,84%), беа класифицирани како IHC 0, по што следуваат 18 (24,66%) случаи класифицирани како IHC 1+, 12 (16,44%) случаи класифицирани како IHC 3+ и 11 (15,07%) случаи класифицирани како IHC 2+.

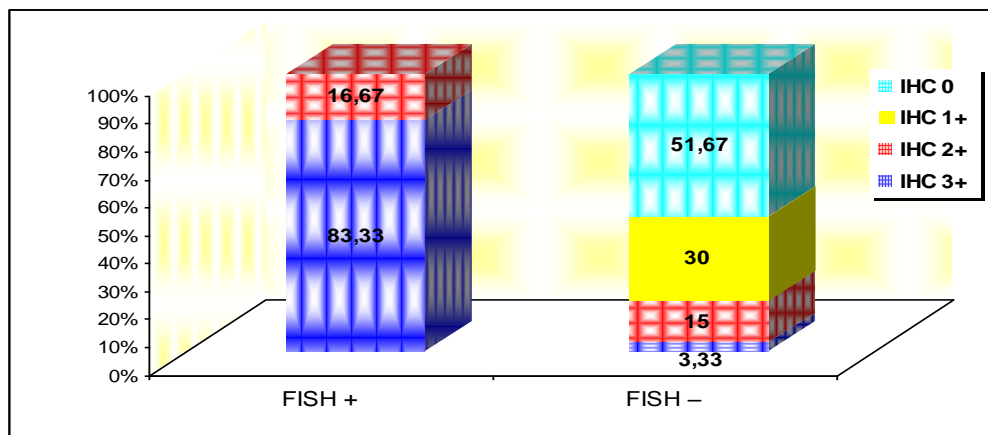
Резултатите од FISH-методата покажаа амплификација во 12 (16,44%) од случаите, 60 (82,19%) од случаите не покажаа амплификација за HER-2 генот, а кај 1 (1,37%) случај немавме успешна хибридизација и овој случај беше исклучен од корелациите во однос на HER-2 статусот.

Од вкупно 72 случаи со успешна хибридизација, 31 (43,05%) случаи, беа класифицирани како IHC 0, 18 (25%) случаи беа класифицирани како IHC 1+, 12 (16,67%) случаи беа класифицирани како IHC 3+ и 11 (15,28%) случаи како IHC 2+.

Дистрибуцијата на пациентите со имунохистохемиски детерминиран HER-2 статус во FISH позитивни и негативни случаи е прикажана во табела 12 и на слика 13. Од 12 HER-2 амплифицирани случаи, 10 (83,33%) беа дефинирани како IHC 3+, а 2 (16,67%) како IHC 2+. Во групата на 60 FISH негативни случаи, само 2 (3,33%) беа IHC 3+/ позитивни, додека останатите случаи беа или IHC 2+ двојбени 9 (15%) или IHC 0/1+ негативни 49 (81,7%)

Табела 12. Дистрибуцијата на HER-2/IHC тумори во однос на HER-2/FISH групите

HER-2/IHC	HER-2/FISH+ n (%)	HER-2/FISH- n (%)	Вкупно
0 (n=31)	0 (0)	31 (51.67)	31
1+ (n=18)	0 (0)	18 (30)	18
2+ (n=11)	2 (16.67)	9 (15)	11
3+ (n=12)	10 (83.33)	2 (3.33)	12
Вкупно	12 (100)	60 (100)	72



Слика 13. Дистрибуција на HER-2/IHC тумори во однос на HER-2/FISH групите

Стапката на совпаѓање помеѓу IHC и FISH во одредување на HER-2 статусот е прикажана во табела 13. Резултатите од анализата за совпаѓање помеѓу имунохистохемиската и FISH-методата, покажаа дека сите 49 примероци класифицирани како IHC 0 и 1+ се FISH негативни, односно процентот на совпаѓање е 100%; 2 од вкупно 11 случаи класифицирани како IHC 2+ се FISH позитивни, односно процентот на совпаѓање е 18,18%; и 10 од вкупно 12 случаи класифицирани како IHC 3+ се FISH позитивни, односно процентот на совпаѓање е 83,33%.

Табела 13. Стапка на совпаѓање помеѓу IHC и FISH во детерминирање на HER-2.

IHC scoring	HER-2/FISH+	HER-2/FISH-	Concordance by IHC	Discordance by IHC
0 /1+(n=49)	0	49	100% (49/49)	0% (0/49)
2+ (n=11)	2	9	18,18% (2/11)	81,82% (9/11)
3+ (n=12)	10	2	83,33% (10/12)	16,67% (2/12)

Во прикажаната дистрибуција на примероците како IHC 2+/3+ и FISH позитивни или IHC 0/1+ и FISH негативни, 12 примероци беа детектирани како IHC 2+/3+ и FISH позитивни, а 49 примероци како IHC 0/1+ и FISH негативни. Процентот на совпаѓање помеѓу двете методи беше 84,72% (61/72), Карра коефициент 0,5976, што укажува на умерен степен на совпаѓање помеѓу двете методи, со статистичка значајност од $p < 0,0001$. По исклучувањето на IHC 2+ случаите, стапката на совпаѓање помеѓу двете методи се подобри на 96,72% (59/61).

Совпаѓањето помеѓу двете методи беше анализирано и со одредување на валидноста, односно точноста на имунохистохемијата во детерминирање на HER-2 статусот, користејќи ја FISH-методата како референтен тест, односно како златен стандард.

Споредените резултати од дијагностичкиот тест (тест чија валидност се одредува), и од референтниот тест се претставени во дијагностичка таблица 2 x 2 (табела 14), во која резултатите се класифицираат како позитивни и негативни врз основа на златниот стандард и тестот што се испитува. Перформансите на дијагностичкиот тест што се анализира се: сензитивност, специфичност, позитивна предиктивна вредност (PPV), негативна предиктивна вредност (NPV), однос на веројатност за позитивен и негативен резултат (LR+ и LR-).

Табела 14. Одредување на валидност на имунохистохемиската метода

Дијагностички тест	Златен стандард		Вкупно
	+	-	
+	ВП	ЛП	ВП + ЛП
-	ЛН	ВН	ЛН + ВН
Вкупно	ВП + ЛН	ЛП + ВН	ВП + ЛП + ЛН +ВН

ВП – вистински позитивни, ЛП – лажно позитивни, ЛН – лажно негативни, ВН – вистински негативни

Во табела 15 се прикажани перформансите на имунохистохемиската метода во детерминирање на HER-2 2+ и HER-2 3+ туморите како една група, во однос на златниот стандард - FISH-методата. Со ИHC методата се добиени 23 HER-2 2+ и HER-2 3+ позитивни тумори, од кои 12 се вистински позитивни и 11 се лажно позитивни. Добиени се и 49 HER-2 0 и HER-2 1+ негативни тумори, од кои сите се вистински негативни.

Под табелата се дадени пресметаните вредности за перформансите на имунохистохемиската метода како дијагностичка метода во откривање на HER-2 2+ и HER-2 3+ позитивни карциноми на дојка.

Табела 15. ИHC во детерминирање на HER-2 2+/3+туморите, во однос на FISH.

(HER-2/ИHC)	FISH +	FISH -	Вкупно
2+/3+	12	11	23
0 /1+	0	49	49
Вкупно	12	60	72

Fisher exact, two tailed $p < 0,0001$

Sensitivity	1	[0,758 to 1]
Specificity	0,817	[0,701 to 0,894]
PPV	0,522	[0,33 to 0,708]
NPV	1	[0,927 to 1]
LR+	5,464	[3,198 to 9,304]
LR-	0	[0 to NaN]

Во табела 16 се прикажани перформансите на имунохистохемиската метода во одредување на HER-2 2+ туморите, во однос на златниот стандард - FISH-методата. Со имунохистохемиската метода се добиени 11 HER-2 2+ позитивни тумори, од кои 2 се вистински позитивни и 9 се лажно позитивни. Добиени се и 61 HER-2 негативни тумори, од кои 51 се вистински негативни и 10 се лажно негативни.

Под табелата се дадени пресметаните вредности за перформансите на имунохистохемиската метода како дијагностичка метода во детекција на HER-2 2+ туморите на дојка.

Табела 16. ИHC во детерминирање на HER-2 2+туморите во однос на FISH

(HER-2/IHC)	FISH +	FISH -	Вкупно
2+	2	9	11
0/1+/3+	10	51	61
Вкупно	12	60	72

Fisher exact, two tailed p<0,0001

Sensitivity	0,167	[0,047 to 0,448]
Specificity	0,85	[0,739 to 0,919]
PPV	0,182	[0,051 to 0,477]
NPV	0,836	[0,724 to 0,908]
LR+	1,113	[0,274 to 4,511]
LR-	0,98	[0,745 to 1,29]

Во табела 17 се прикажани перформансите на имунохистохемиската метода во одредување на HER-2 3+ позитивните тумори во однос на FISH-методата. Со имунохистохемиската метода се добиени 12 HER-2 3+ позитивни тумори, од кои 10 вистински позитивни и 2 лажно позитивни. Добиени се и 60 HER-2 негативни тумори, од кои 58 се вистински негативни и 2 се лажно негативни.

Под табелата се дадени пресметаните вредности за перформансите на имунохистохемиската метода како дијагностичка метода во откривање на HER-2 3+ позитивните тумори на дојка.

Табела 17. ИHC во детерминирање на HER-23+туморите во однос на FISH

(HER-2/IHC)	FISH +	FISH -	Вкупно
3+	10	2	12
0/1+/2+	2	58	60
Вкупно	12	60	72

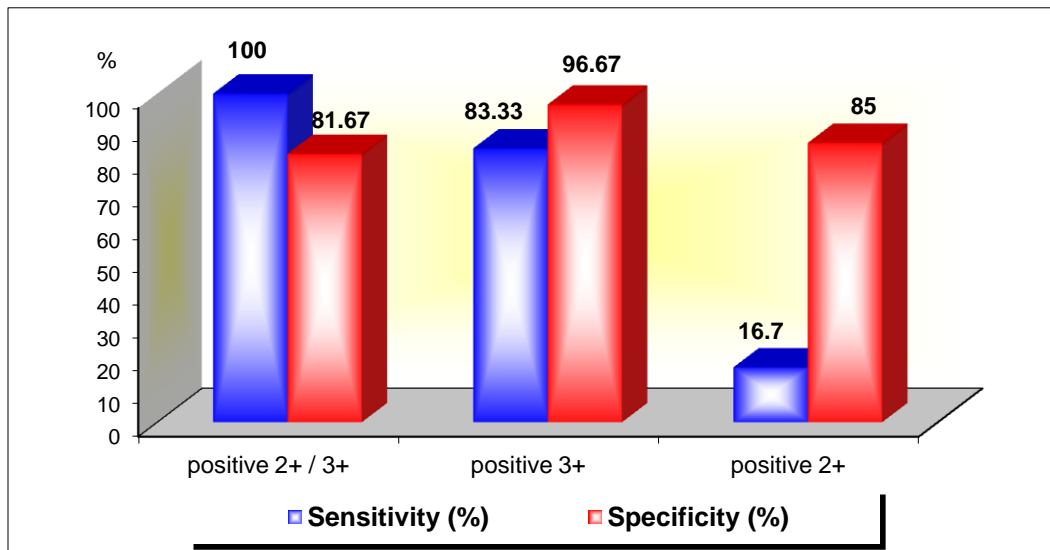
Fisher exact, two tailed p<0,0001

Sensitivity	0,833	[0,552 to 0,953]
Specificity	0,967	[0,886 to 0,991]
PPV	0,833	[0,552 to 0,953]
NPV	0,967	[0,886 to 0,991]
LR+	25,242	[6,252 to 99,961]
LR-	0,173	[0,049 to 0,612]

Во табела 18 и на слика 14, сумарно и компаративно се презентирани дијагностичките перформанси на IHC методата во детектирање на HER-2 позитивните и HER-2 негативни тумори. Земајќи ја FISH-методата како златен стандард, позитивната предиктивна вредност за позитивните IHC 3+ случаи е 83,3%, додека негативната предиктивна вредност за негативните IHC 0/1+ случаи е 100%. Сензитивноста на имунохистохемијата за IHC 2+/3+ и за IHC 3+ групите е 100% и 83,3%, соодветно, додека специфичноста за истите групи е 81,67% и 96,7%.

Табела 18. Сензитивност, специфичност, позитивна и негативна предиктивна вредност на IHC во однос на FISH

IHCscoring	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
2+/3+ positive	100(75,8-100)	81,67(70,1-89,4)	52,2(33,01-70,8)	100(92,7-100)
3+ positive	83,3(55,2-95,3)	96,7(88,6-99,1)	83,3(55,2-95,3)	96,7(88,6-99,1)
2+ positive	16,7(4,7-44,8)	85(73,9-91,9)	18,2(5,1-47,7)	83,6(72,4-90,8)



Слика 14. Сензитивност и специфичност на IHC во однос на FISH

Од вкупно 72 случаи со успешна хибридизација, полизомија за хромозомот 17 беше детектирана во 14 (19,44%) од нив (табела 19). Ниту еден случај во анализираната група не покажа монозомија за хромозом 17.

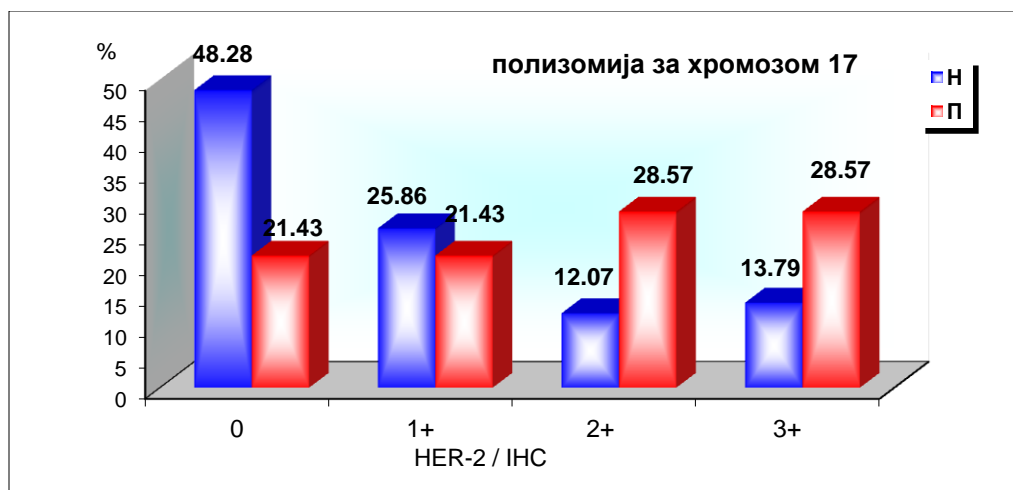
Табела 19. Дистрибуција во однос на полизомија за хромозомот 17

Варијабла		n (%)
Полизомија за	присутна	14 (19.45)
хромозом 17	отсутна	58 (80.55)

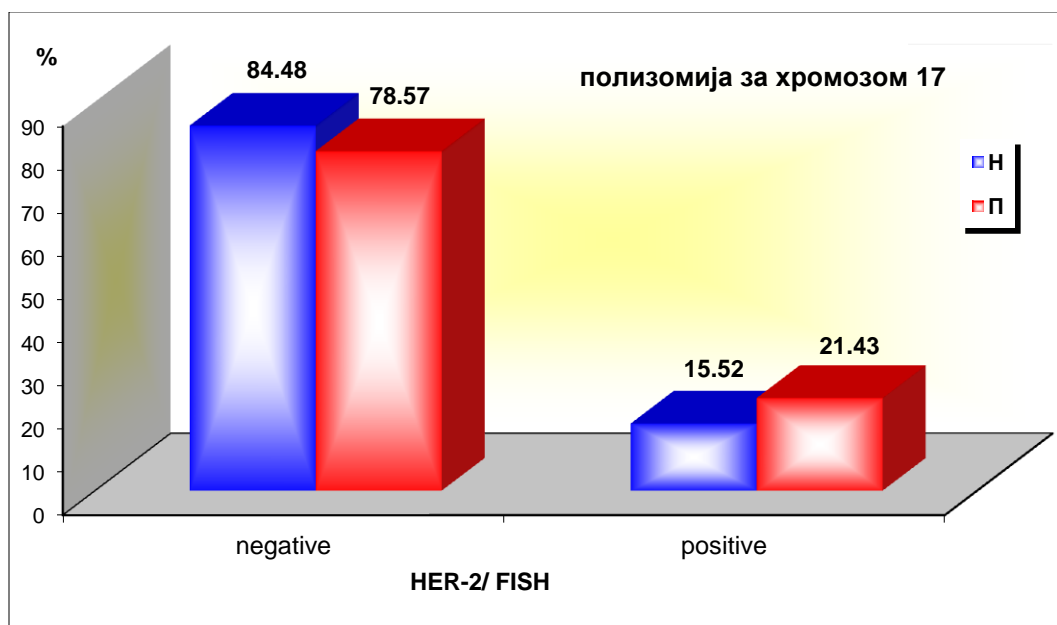
Корелацијата на случаите со полизомија за хромозомот 17, во однос на HER-2 IHC и FISH- резултатите е прикажана во табела 20 и на сликите 15 и 16. Од вкупно 14 случаи со полизомија за хромозомот 17, по 4 (28,57%) од нив беа класифицирани како IHC 3+ и IHC 2+; додека по 3 (21,43%) случаи беа класифицирани како IHC 1+ и IHC 0. Инциденцата на полизомија за хромозомот 17 беше 12,5% (6/48) во IHC 0/1+ случаите, 36,36% (4/11) во IHC 2+ случаите и 33,33% (4/12) во IHC 3+ случаите.

Табела 20. Полизомија за хромозомот 17 во корелација со HER-2 статусот.

Варијабла	Полизомија за хромозом 17		p value
	Отсутна n=58 (80,55%)	Присутна n=14 (19,44%)	
HER-2 / IHC			p=0,24
0	28 (48,28)	3 (21,43)	
1+	15 (25,86)	3 (21,43)	
2+	7 (12,07)	4 (28,57)	
3+	8 (13,79)	4 (28,57)	
HER-2 / FISH			p=0,69
негативни	49 (84,48)	11 (78,57)	
позитивни	9 (15,52)	3 (21,43)	
Fisher exact, two tailed p<0,001			

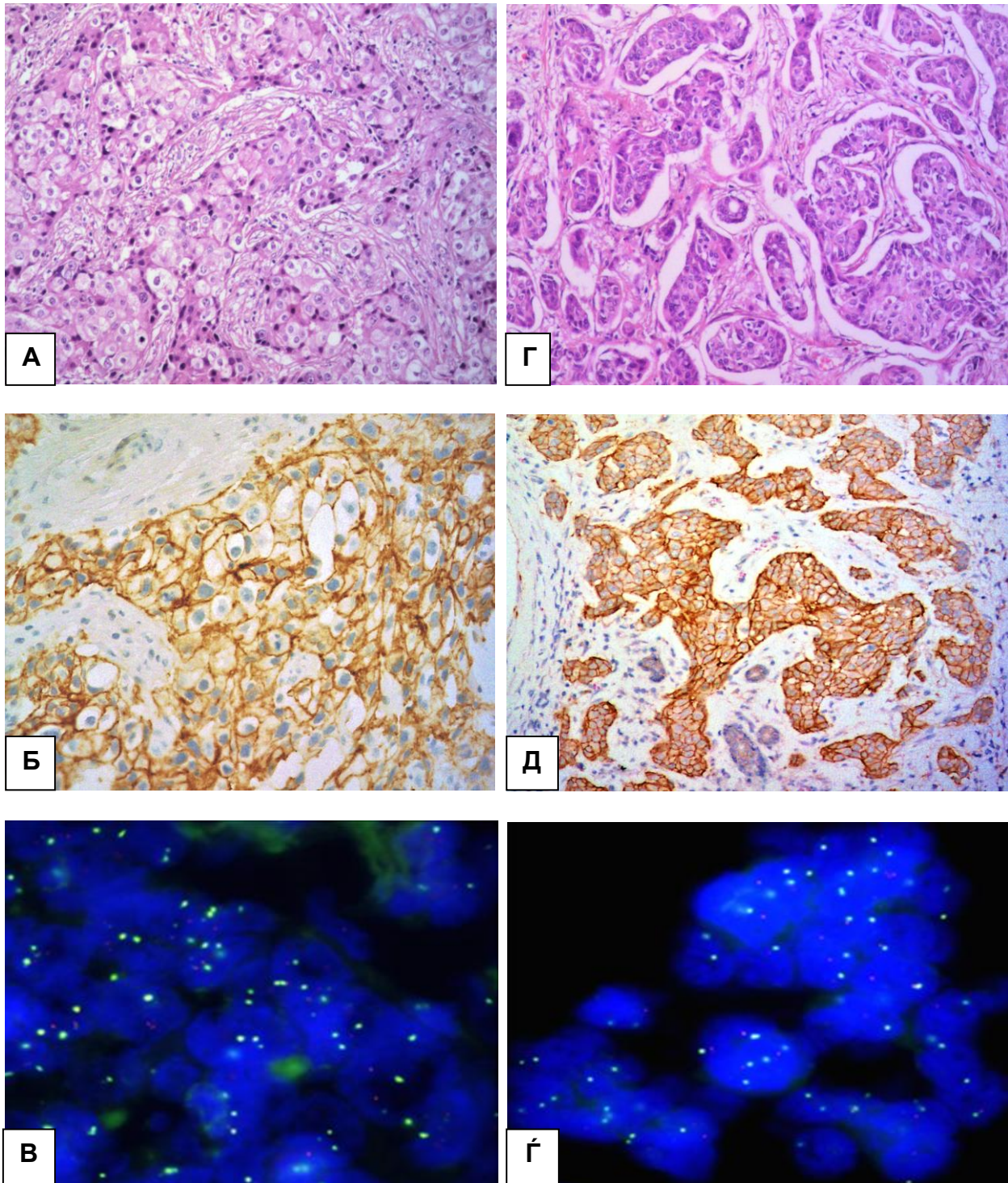


Слика 15. Полизомија за хромозомот 17 во корелација со HER-2/IHC резултатите.



Слика 16. Полизомија за хромозомот 17 во корелација со HER-2/FISH резултатите.

Кај 2 случаи со HER-2 3+ експресија и отсуство на амплификација HER-2 генот (слика 17), и во еден од двата HER-2 2+ случаи кои беа FISH позитивни, беше детектирана полизомија за хромозомот 17. Пет (41,66%) од случаите дефинирани како IHC 2+/IHC 3+ и FISH негативни покажаа полизомија за хромозомот 17, додека овој процент изнесуваше само 12,5% (6/48) во групата на пациенти дефинирани како IHC 0/1+. Полизомијата за хромозомот 17 беше детектирана во 21,43% (3/12) од FISH позитивните случаи и во 78,57% (11/60) од FISH негативните случаи.



Слика 17. Неусогласеност помеѓу HER-2 ИHC и FISH во два случаи. **Случај 1:** А, Инвазивен карцином на дојка (H&E x 200); Б, HER-2/IHC 3+ (HER-2 x 200); В, FISH, HER-2/Chr 17 <2, неамплифициран, присутна полизомија (DAPI counterstain x 1000). **Случај 2:** Г, Инвазивен карцином на дојка (H&E x 200); Д, HER-2/IHC 3+ (HER-2 x 100); Ѓ, FISH, HER-2/Chr 17 <2, неамплифициран, присутна полизомија (DAPI counterstain x 1000).

4.2.3. Корелација на амплификацијата на HER-2 генот со клиничко - патолошките параметри

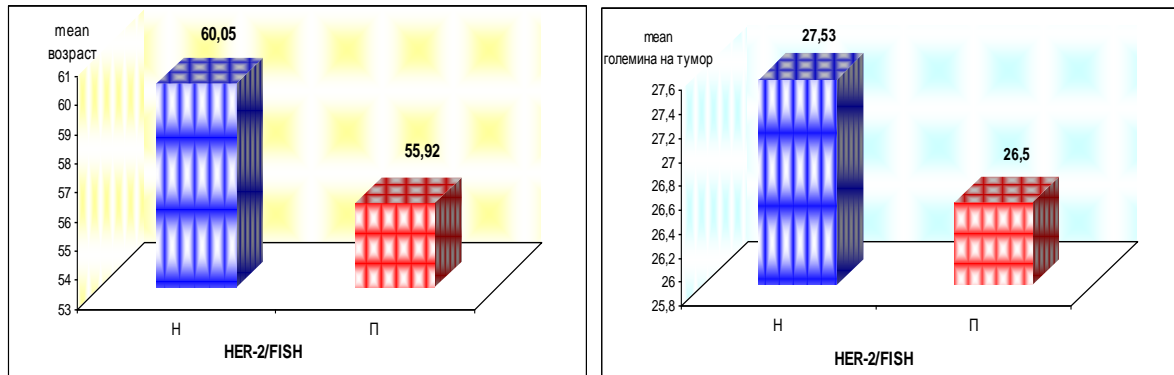
Во табела 21 и на слика 18 е прикажана дистрибуцијата на пациентите со и без амплификација за HER-2 генот во однос на возраста и големината на туморите.

Пациентките со детектирана амплификација за HER-2 генот беа подеднакво застапени во групата под и во групата над 50 години. Пациентките на возраст под 50 години почесто покажаа амплификација за HER-2 генот. И средната возраст на пациентките со позитивен HER-2 статус беше пониска во однос на пациентките без амплификација за HER-2 генот ($55,92 \pm 9,4$ vs $60,05 \pm 11,3$; $p=0,24$). Овие пациентки имаа и помал туморски дијаметар во однос на пациентките без амплификација за HER-2 генот ($26,5 \pm 16,0$ vs $27,53 \pm 13,6$; $p=0,82$). Пациентките со HER-2 позитивен статус, најчесто имаа тумори со големина од 20 до 50 милиметри, но почесто од пациентките со HER-2 негативен статус имаа тумори со пречник над 50мм. Според анализата, не беше детектирана значајна разлика помеѓу возраста на пациентките или големината на туморот во групите со и без амплификација на HER-2 генот.

Табела 21. Дистрибуција на пациентите во однос на возраста, големината на туморот и HER-2 статусот

варијабла		вкупно n (%)	HER-2/FISH		p value
			H(n=60)	П(n=12)	
возраст	≤ 50	23 (31,94)	17 (28,33)	6 (50)	^b p=0,18
	> 50	49 (68,06)	43 (71,67)	6 (50)	
	mean ± SD (min-max)			60,05±11,3 (41–86)	55,92±9,4 (43–74)
големина на тумор	≤ 20	24 (33,33)	19 (31,67)	5 (41,67)	^b p=0,36
	20-50	45 (62,5)	39 (65)	6 (50)	
	> 50	3 (4,17)	2 (3,33)	1 (18,33)	
	mean ± SD (min-max)			27,53±13,6 (8–75)	26,5±16,0 (5–55)

p(Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)



Слика 18. Дистрибуција на пациентите со и без амплификација на HER-2 во однос на возраста на пациентките и големината на туморот

Статистички, немаше значајна разлика во однос на амплификација на HER-2 генот и хистопатолошките параметри: хистолошки градус ($p=0,26$), нуклеарен градус ($p=0,12$), туморски статус ($p=0,34$), лимфонодален статус ($p=0,13$) и постоперативен стадиум на болеста ($p=0,66$) (табела 22, слика 19).

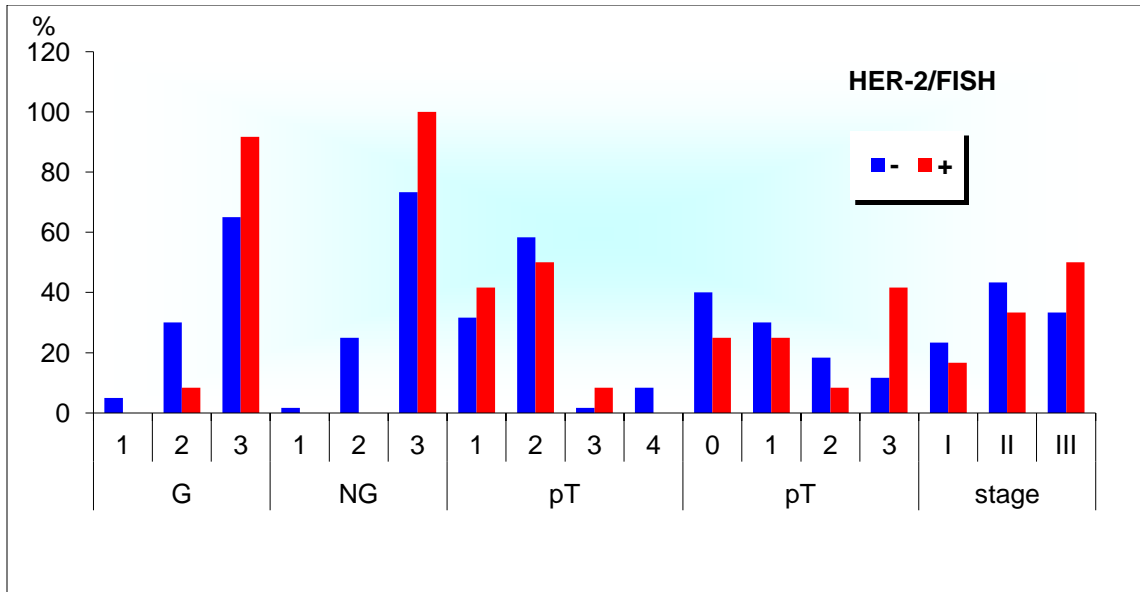
HER-2 позитивните тумори почесто беа лошо диференцирани во однос на HER-2 негативните тумори (91,67% vs 65%). Во групата на пациентки со амплификација на HER-2 немаше добро диференцирани тумори: 8,33% од туморите беа умерено диференцирани, додека останатиот процент (91,67%) беа лошо диференцирани. Сите 12 тумори со амплификација за HER-2 генот имаа нуклеарен градус 3. Во оваа серија на примероци, немаше HER-2 позитивни тумори со pT4. Повеќе од деведесет проценти (91,67%) од туморите со докажана амплификација за HER-2 генот се наоѓаа во pT1/pT2 стадиум. Туморите со присутна амплификација за HER-2 генот почесто презентираа позитивен лимфонодален статус (75%), и најголемиот процент од нив (41,67%) имаа 10 или повеќе позитивни регионални лимфни жлезди (pN3). Најголем процент (83,33%) од HER-2 позитивните тумори беа дијагностицирани во II и III стадиум на болест. HER-2 позитивните тумори почесто од HER-2 негативните тумори беа во III постоперативен стадиум.

Табела 22. Дистрибуција на пациентите во однос на хистопатолошките параметри и HER-2 статусот

варијабла		вкупно n (%)	HER-2/FISH		p value
			H (n=60)	П (n=12)	
G	1	3 (4,17)	3 (5)	0	p=0,26 ns
	2	19 (26,39)	18 (30)	1 (8,33)	
	3	50 (69,44)	39 (65)	11 (91,67)	
NG	1	1 (1,39)	1 (1,67)	0	p=0,12 ns
	2	15 (20,83)	15 (25)	0	
	3	56 (77,78)	44 (73,33)	12 (100)	
pT	1	24 (33,33)	19 (31,67)	5 (41,67)	p=0,34 ns
	2	41 (56,94)	35 (58,33)	6 (50)	
	3	2 (2,78)	1 (1,67)	1 (8,33)	
	4	5 (6,94)	5 (8,33)	0	
pN	0	27 (37,5)	24 (40)	3 (25)	p=0,13 ns
	1	21 (29,17)	18 (30)	3 (25)	
	2	12 (16,67)	11 (18,33)	1 (8,33)	
	3	12 (16,67)	7 (11,67)	5 (41,67)	
Stage	I	16 (22,22)	14 (23,33)	2 (16,67)	p=0,66 ns
	II	30 (41,67)	26 (43,33)	4 (33,33)	
	III	26 (36,11)	20 (33,33)	6 (50)	

p(Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.



Слика 19. Дистрибуција на пациентите во однос на HER-2 статусот и патохистолошките параметри

Во табела 23 и на слика 20 е прикажана корелацијата помеѓу амплификација на HER-2 генот во однос на ER, PR и Ki67.

Експресијата на естрогенскиот и прогестеронскиот рецептор значајно поретко беше детектирана во HER-2 позитивните тумори, споредено со HER-2 негативните случаи (58,33% vs 90%; 41,67% vs 78,33% консеквентно), со значајност од $p=0,015$ и $p=0,016$, соодветно.

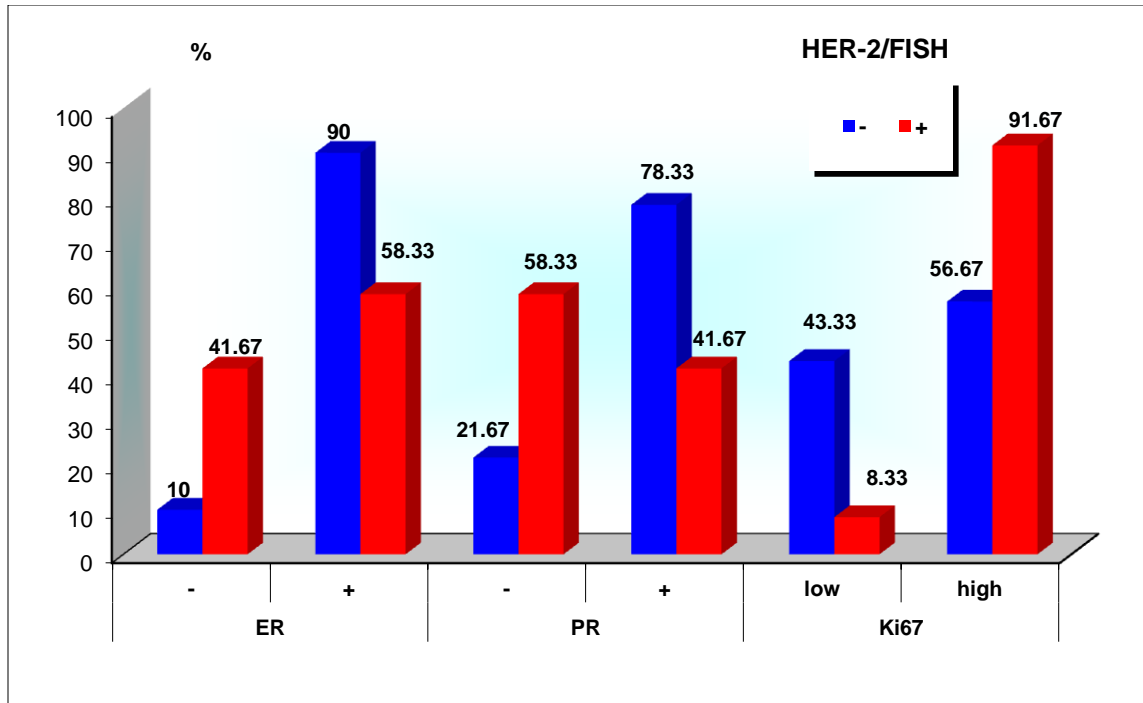
За $p=0,025$ се потврди сигнификантна асоцијација во однос на експресијата на Ki67 и амплификација за HER-2 генот. Високиот пролиферативен индекс значајно почесто беше асоциран со HER-2 позитивните во однос на HER-2 негативните тумори (91,67% vs 56,67%).

Табела 23. Дистрибуција на амплификација на HER-2 генот во однос на ER, PR и Ki67

Варијабла		вкупно n (%)	HER-2/FISH		p value
			H (n=60)	П (n=12)	
ER	H	11 (15,28)	6 (10)	5 (41,67)	$p=0,015$
	П	61 (84,72)	54 (90)	7 (58,33)	
PR	H	20 (27,78)	13 (21,67)	7 (58,33)	$p=0,016$
	П	52 (72,22)	47 (78,33)	5 (41,67)	
Ki67	low	27 (37,5)	26 (43,33)	1 (8,33)	$p=0,025$
	high	45 (62,5)	34 (56,67)	11 (91,67)	

p(Fisher exact, two tailed test)

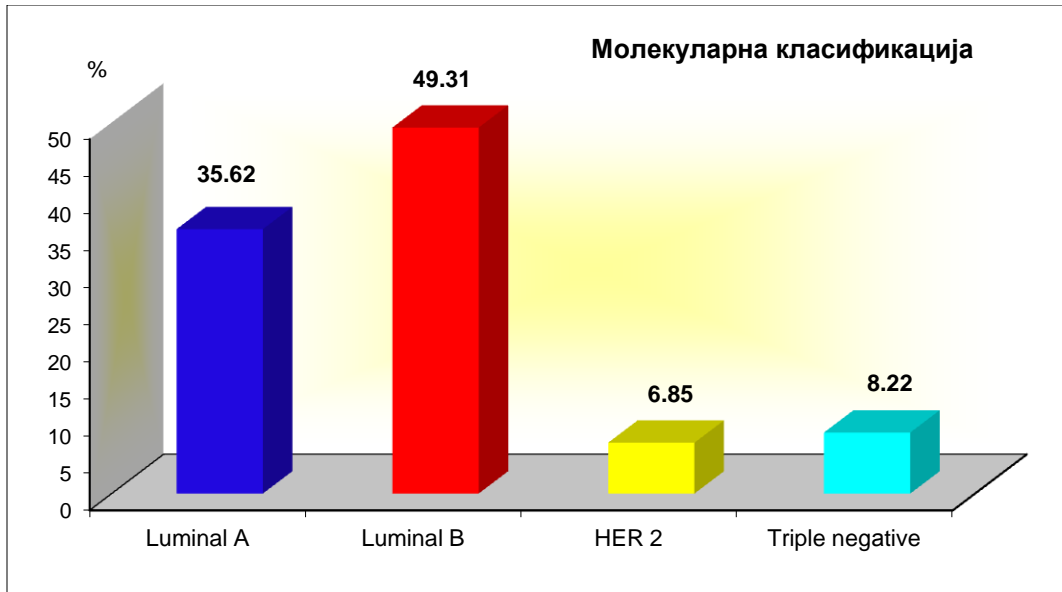
ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, H- негативен, П- позитивен



Слика 20. Дистрибуција на HER-2 позитивните тумори во однос на ER, PR и Ki67

4.2.4. Дистрибуција на поттиповите од имунохистохемски дефинираната молекуларна класификација во корелација со клиничко-патолошките параметри

На слика 21 е прикажана дистрибуцијата на пациентите во однос на молекуларните поттипови дефинирани врз основа на имунохистохемската експресија на молекуларните маркери. Согласно со претходно прикажаните резултати од анализата на молекуларните маркери (ER, PR, HER-2) и маркерот на клеточна пролиферација Ki67: 26 (35,62%) тумори припаѓаа на молекуларниот поттипна Luminal A, 36 (49,31%) на Luminal B, 5 (6,85%) на HER-2 поттипот и 6 (8,22%) на Triple negative туморите.



Слика21. Дистрибуција на пациентите во однос на молекуларната класификација

Во табела 24 е прикажана корелација на поттиповите од молекуларната класификација со возраста на пациентките и големината на туморот.

Добиените резултати не покажаа статистички значајна корелација помеѓу молекуларните поттипови во однос на возраста на пациентките или во однос на големината на туморот. Сите молекуларни поттипови во анализираната група беа позастапени во групата на пациентки над 50 години. Туморите со различен молекуларен поттип несигнификантно се разликуваа во однос на возраста на пациентките ($p=0,4$). Најмала просечна возраст од $55,6\pm 5,9$ години беше регистрирана во групата пациентки со HER-2 молекуларен поттип, а најголема просечна возраст од $62,17\pm 11,9$ години во групата пациентки со Triple negative молекуларен поттип.

Luminal B туморите несигнификантно почесто имаа поголем дијаметар во однос на другите поттипови ($29,69\pm 13,6$ мм), додека Triple negative и HER-2 поттиповите покажаа најмала просечна големина на туморите ($22,17 \pm 10,4$ и $22,2 \pm 20,6$, соодветно). Luminal B туморите почесто од останатите поттипови имаа тумори поголеми од 20 милиметри (75%), додека Triple negative туморите најчесто имаа дијаметар ≤ 20 милиметри. HER-2 поттипот почесто од останатите поттипови имаа дијаметар > 50 милиметри.

Табела 24. Дистрибуција на молекуларните типови во однос на возраста и големината на туморите

Варијабла		Молекуларна класификација				p value
		Luminal A (n=26)	Luminal B (n=36)	HER 2 (n=5)	Triple neg (n=6)	
Возраст	≤ 50	11 (42,31)	9 (25)	2 (40)	1 (16,67)	^b p=0,4
	> 50	15 (57,69)	27 (75)	3 (60)	5 (83,33)	
	mean±SD (min-max)	57,27±11,9 (42–86)	60,69±10,8 (41–82)	55,6±5,9 (50–64)	62,17±11,9 (48–79)	^d p=0,6
Големина на тумор	≤ 20	11 (42,31)	8 (22,22)	2 (40)	3 (50)	^b p=0,2
	20-50	14 (53,85)	27 (75)	2 (40)	3 (50)	
	> 50	1 (3,84)	1 (2,78)	1 (20)	0	
	mean±SD (min-max)	24,85±13,6 (8–70)	29,69±13,6 (8–75)	22,2±20,6 (5–55)	22,17±10,4 (9–36)	^d p=0,5

^bp(Fisher exact, two tailed test), ^dp(Analysis of Variance)

Во табела 25 и на слика 22 е прикажана дистрибуцијата на пациентите во однос на поттиповите од молекуларната класификација и хистопатолошките параметри. Резултатите од истражувањето покажаа значајна корелација помеѓу молекуларните поттипови и хистолошкиот градус ($p < 0,0001$), нуклеарниот градус ($p < 0,0001$), лимфонодалниот статус ($p < 0,003$) и стадиумот на болеста ($p < 0,0001$).

Luminal A туморите значајно поретко беа лошо диференцирани во однос на другите молекуларни поттипови (34,62% vs 86,11% Luminal B, 100% HER-2, 100% Triple neg). Сите HER-2 и Triple negative тумори беа лошо диференцирани; 86,11% од Luminal B туморите беа лошо диференцирани, а само 13,89% беа умерено диференцирани.

Luminal A туморите значително поретко имаа висок нуклеарен градус во однос на другите молекуларни поттипови (46,15% vs 94,44% Luminal B, 100% HER-2 и 100% Triple negative). Сите HER-2 и Triple negative тумори имаа висок нуклеарен градус.

Triple negative туморите значајно почесто од останатите поттипови беа со негативен лимфонодален статус (83,33% vs 50% Luminal A, 40% HER-2 и 22,22% Luminal B). Позитивен лимфонодален статус најчесто беше детектиран кај Luminal B 28 (77,78%) и HER-2 3(60%) туморите. HER-2 туморите почесто од другите поттипови имаа ≥ 10 позитивни лимфни жлезди (40% vs 25% Luminal B, 16,67% Triple negative и 0% Luminal A). Luminal A туморите почесто од останатите имаа ≤ 3 позитивни лимфни жлезди (38,46% vs 30,56% Luminal B и 0% HER-2 и Triple negative).

Luminal B поттипот поретко од другите беше во I стадиум на болеста (5,56% vs 34,62% Luminal A, 40% HER-2 и 50% Triple negative). Luminal B (50%) и HER-2 (60%) поттиповите најчесто беа дијагностицирани во III стадиум на болеста, Luminal A во II стадиум на болеста, а Triple negative во I стадиум на болеста.

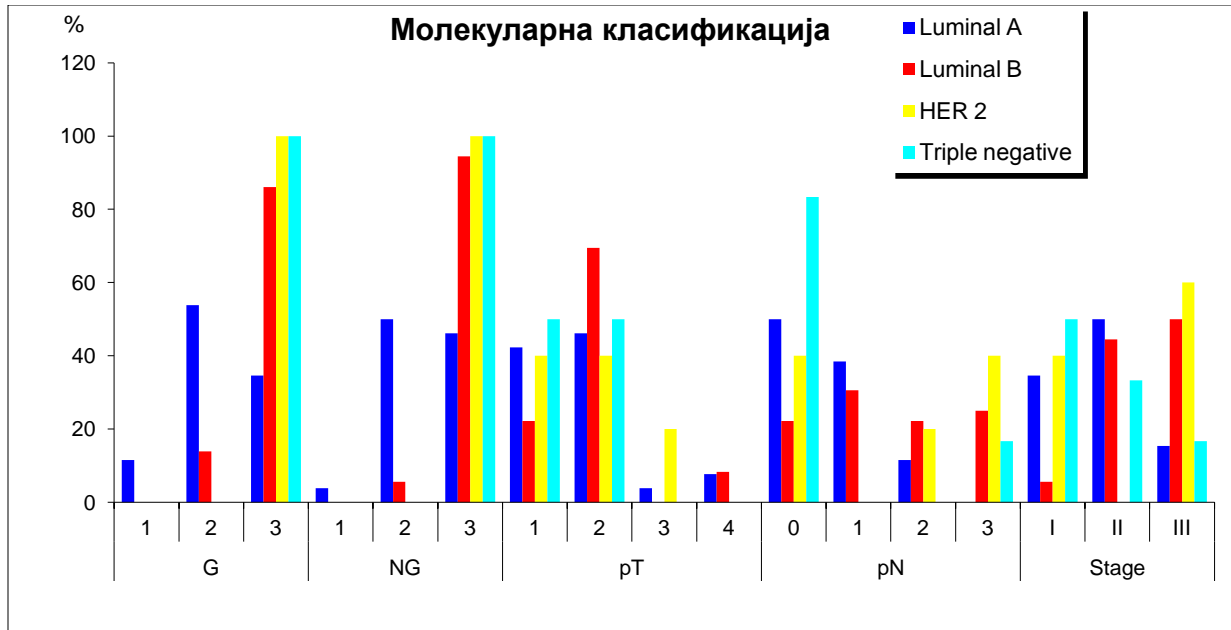
Статистички значајна поврзаност не беше нотирана само во однос на туморскиот статус. Во сите молекуларни поттипови доминираа тумори во pT1 и pT2 стадиум, а мнозинството тумори имаа туморски статус - pT2 (46,15% Luminal A, 69,44% Luminal B. 40% HER-2 и 50% Triple negative). Само Luminal A и Luminal B поттиповите имаа тумори во pT4 стадиум, додека само Luminal A и HER-2 поттиповите имаа тумори во pT3 стадиум.

Табела 25. Дистрибуција на пациентите во однос на молекуларната класификација и хистопатолошките параметри

Варијабла		вкупно n (%)	Молекуларна класификација				p value
			Luminal A (n=26)	Luminal B (n=36)	HER-2 (n=5)	Triple neg (n=6)	
G	1	3(4,11)	3(11,54)	0	0	0	p<0,0001
	2	19(26,03)	14(53,85)	5(13,89)	0	0	
	3	51(69,86)	9(34,62)	31(86,11)	5(100)	6(100)	
NG	1	1(1,37)	1(3,85)	0	0	0	p<0,0001
	2	15(20,55)	13(50)	2(5,56)	0	0	
	3	57(78,08)	12(46,15)	34(94,44)	5(100)	6(100)	
pT	1	24(32,88)	11(42,31)	8(22,22)	2(40)	3(50)	p=0,26
	2	42(57,53)	12(46,15)	25(69,44)	2(40)	3(50)	
	3	2(2,74)	1(3,85)	0	1(20)	0	
	4	5(6,85)	2(7,69)	3(8,33)	0	0	
pN	0	28(38,36)	13(50)	8(22,22)	2(40)	5(83,33)	p=0,003
	1	21(28,77)	10(38,46)	11(30,56)	0	0	
	2	12(16,44)	3(11,54)	8(22,22)	1(20)	0	
	3	12(16,44)	0	9(25)	2(40)	1(16,67)	
stage	I	16(21,92)	9(34,62)	2(5,56)	2(40)	3(50)	p<0,0001
	II	31(42,46)	13(50)	16(44,44)	0	2(33,33)	
	III	26(35,62)	4(15,38)	18(50)	3(60)	1(16,67)	

p(Chi-square test), p(Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.



Слика 22. Дистрибуција на пациентите во однос на молекуларната класификација и хистопатолошките параметри

Во табела 26 и на слика 23 е прикажана дистрибуцијата на пациентите во однос на молекуларната класификација и експресијата на пролиферативниот маркер Ki67.

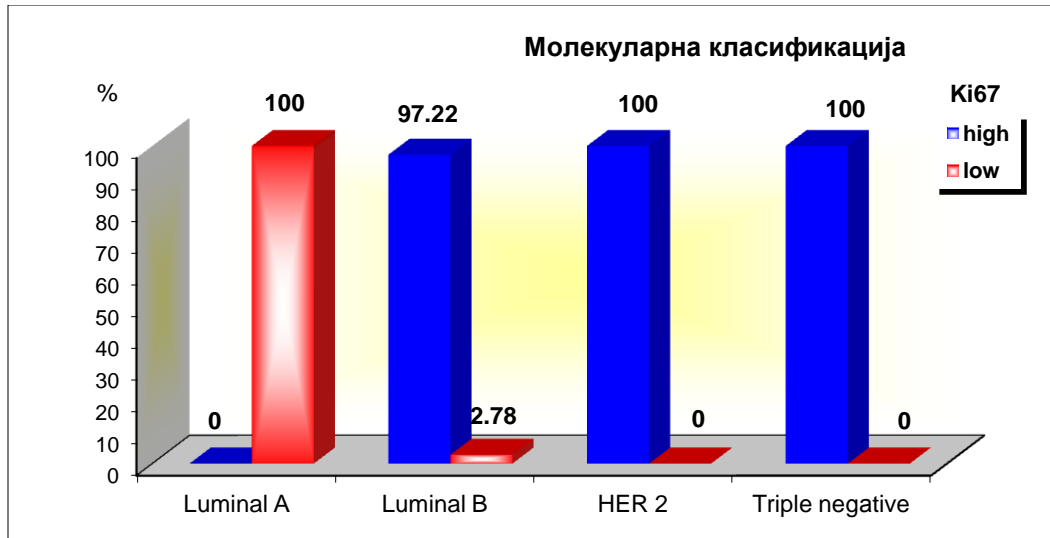
Статистички сигнификантна асоцираност во молекуларните подгрупи беше потврдена и во однос на експресијата на Ki67 ($p < 0,0001$). Висока експресија на овој клеточен маркер беше детектирана во 35 (97,22%) Luminal B тумори и во сите HER-2 и Triple negative тумори. Ниска експресија на Ki67 беше детектирана во сите Luminal A тумори.

Табела 26. Дистрибуција на пациентите во однос на молекуларната класификација и експресијата на пролиферативниот маркер Ki67

варијабла	вкупно n (%)	Молекуларна класификација				p value
		Luminal A (n=26)	Luminal B (n=36)	HER 2(n=5)	Triple neg (n=6)	
Ki67	high	46(63,01)	0	35 (97,22)	5 (100)	p<0,0001
	low	27(36,99)	26 (100)	1 (2,78)	0	

p(Fisher exact, two tailed test)

Ki 67- маркер на клеточна пролиферација

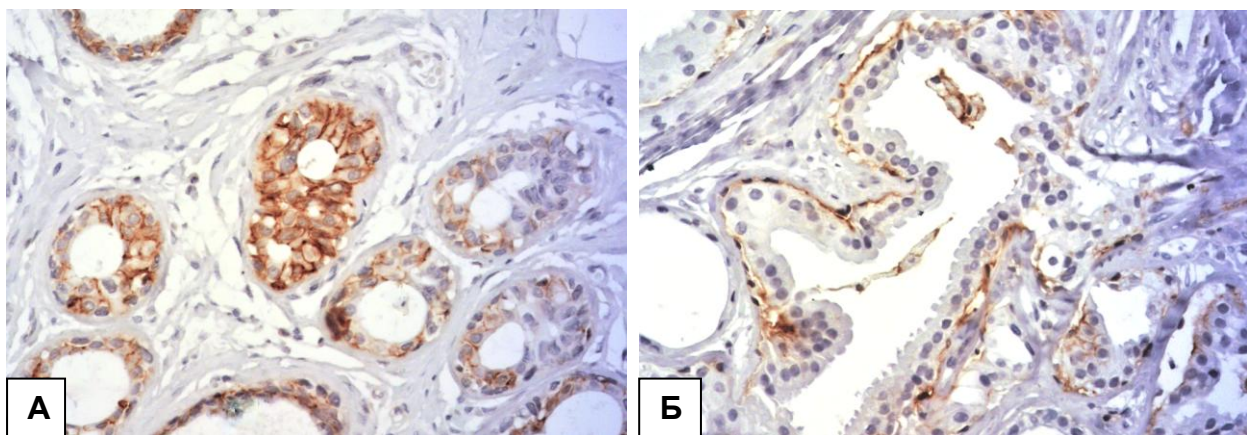


Слика 23. Дистрибуција на пациентите во однос на експресијата на пролиферативниот маркер Ki67 и молекуларните поттипови

4.3. ЕКСПРЕСИЈА НА КАНЦЕРСКИТЕ СТЕМ КЛЕТОЧНИ МАРКЕРИ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ КАРАКТЕРИСТИКИ НА КАРЦИНОМОТ НА ДОЈКА

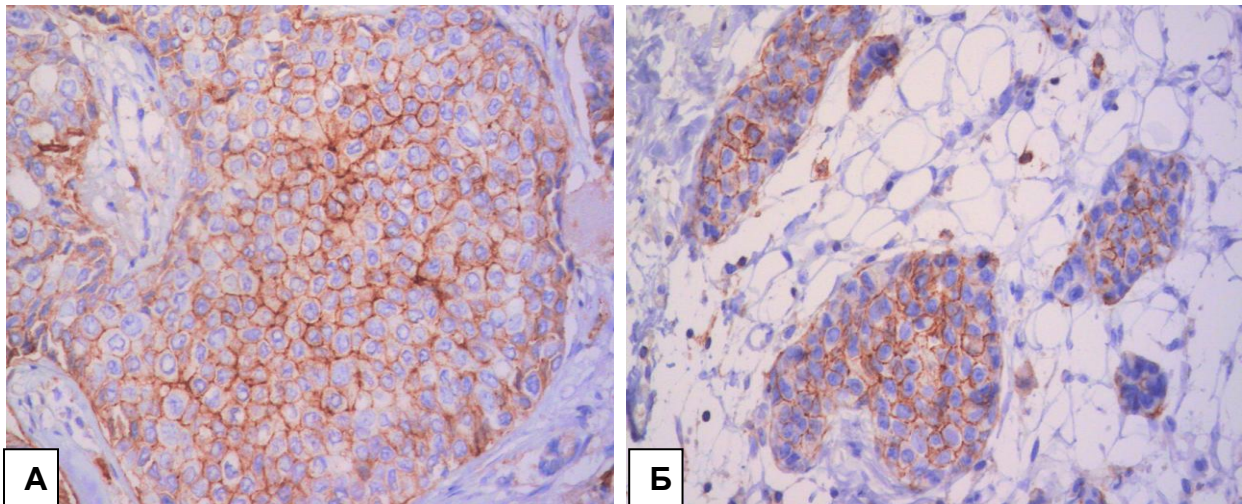
4.3.1. Експресија на CD44 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките карактеристики на карциномот на дојка

Анализата на експресијата на CD44 стем клеточниот маркер во контролната група, покажа циркумференцијален мембрански позитивитет во луминалните и миоепителните клетки во бенигно ткиво од дојка, со варијабилна доминантна експресија во епителните или миоепителните клетки во различни случаи (слика 24).



Слика 24. Експресија на CD44 во бенигно ткиво на дојка. **А,** Мембрански позитивитет во епителни клетки на ТДЛЕ (CD44 x 200). **Б,** Мембрански позитивитет во миоепителни клетки (CD44 x 200).

Во испитуваната група CD44 покажа мембрански позитивитет со различен интензитет и различна процентуална застапеност во туморските клетки (слика 25). Во дел од примероците беше детектиран силен, а во дел слаб или умерен мембрански позитивитет, кој процентуално се движеше во граници од 1 до 90% во туморските клетки. Варијации во однос на интензитетот на пребојување беа забележани и во различни туморски клетки во склоп на ист тумор. Покрај во туморските клетки, CD44 позитивен сигнал беше детектиран и во дел од стромалните клетки. Позитивна експресија за CD44 стем клеточниот маркер беше детектирана во 35 (47,94%) од вкупно 73 пациентки со инвазивен карцином на дојка.



Слика 25. Експресија на CD44 стем клеточниот маркер во епителни туморски клетки во примероци од инвазивен карцином на дојка. **А** и **Б**, умерен до силен, циркумференцијален мембрански позитивитет во малигни епителни клетки (CD44x 200).

Во табела 27 и на слика 26 е прикажана експресијата на CD44 во корелација со возраста на пациентките и големината на туморот.

Просечната возраст на пациентките со позитивна експресија на CD44 стем клеточниот маркер беше помала во однос на пациентките со отсутна експресија за овој маркер ($58,89 \pm 10,9$ vs $59,58 \pm 11,3$; $p=0,8$). Повеќе од половина 24 (68,57%) од пациентките со позитивна експресија за CD44 беа на возраст над 50 години. Дистрибуцијата на пациентки со и без експресија на CD44 беше речиси идентична и во двете возрасни групи. Прикажаните разлики не покажаа статистичка значајност во однос на возраста кај пациентки со и без присутна експресија за CD44.

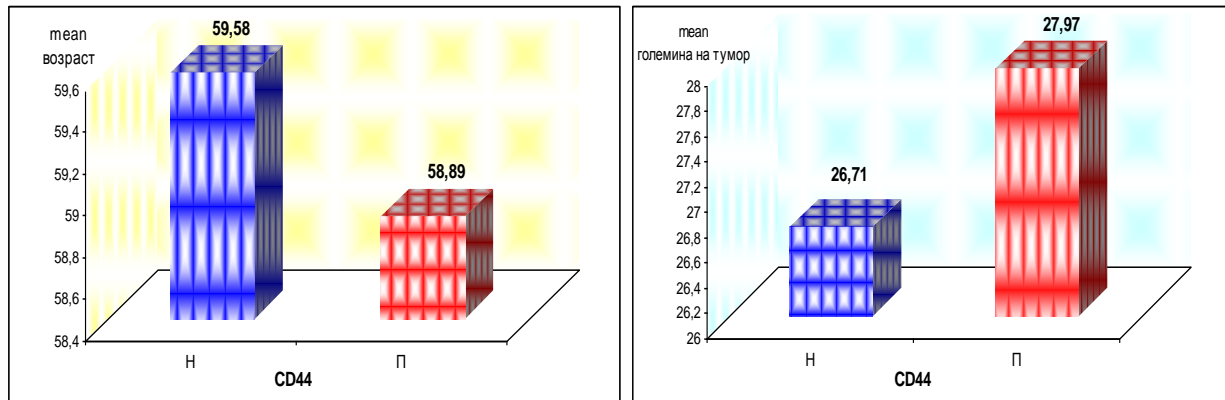
Статистички не беше детектирана значајна разлика ниту во однос на големината на туморите кај пациентки со и без експресија на CD44. Туморите со големина од 20 до 50 мм беа најзастапени во групата со и во групата без

експресија за CD44 (62,86% vs 66,67%; $p=0,85$), а просечната големина на туморите со експресија на CD44 беше несигнификантно поголема во однос на просечната големина на туморите без експресија за овој маркер ($27,97 \pm 15,1$ vs $26,71 \pm 12,8$; $p=0,7$).

Табела 27. Експресија на CD44 во корелација со возраста и големината на туморите

Варијабла		Вкупно n (%)	CD44		p value
			Н(n=38)	П (n=35)	
Возраст	≤ 50	23 (31,51)	12 (31,58)	11 (31,43)	^a $p=0,99$
	> 50	50 (68,49)	26 (68,42)	24 (68,57)	
	mean ± SD (min-max)		59,58±11,3 (42–80)	58,89±10,9 (41–86)	^c $p=0,8$
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)	13 (36,11)	11 (31,43)	^b $p=0,85$
	20 -50	46 (63,01)	24 (66,67)	22 (62,86)	
	> 50	3 (4,11)	1 (2,78)	2 (5,71)	
	mean ± SD (min-max)		26,71±12,8 (5–55)	27,97±15,1 (9–75)	^c $p=0,7$

^ap (Chi-square test), ^bp(Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)



Слика 26. Графички приказ на експресија на CD44 клеточниот маркер во корелација со возраста на пациентите и големината на туморите

Во табела 28 е прикажана експресијата на CD44 стем клеточниот маркер во корелација со хистопатолошките параметри.

Не беше детектирана сигнификантна асоцираност во однос на експресијата на CD44 стем клеточниот маркер со степенот на хистолошка диференцијација ($p=0,76$), со нуклеарниот градус ($p=0,2$), со туморскиот статус ($p=0,9$), со лимфонодалниот статус ($p=0,16$), и со стадиумот на болеста ($p=0,21$). Иако статистички незначајно, експресијата на CD44 клеточниот маркер покажаа тренд на позитивна корелација со поагресивни хистолошки карактеристики на туморите, имено, CD44 позитивните тумори почесто од CD44 негативните тумори беа лошо диференцирани (74,29% vs 65,79%), со висок нуклеарен градус (85,71% vs

71,05%) и со висок туморски статус- pT4 (8,57% vs 5,26%). Почесто имаа позитивен лимфонодален статус (71,43% vs 52,63%) и почесто беа дијагностицирани во III стадиум на болеста (45,71% vs 26,32%).

Табела 28. Експресија на CD44 во корелација со хистопатолошките параметри

варијабла		вкупно n (%)	CD44		p value
			H(n=38)	П (n=35)	
G	1	3 (4,11)	2 (5,26)	1 (2,86)	^b p=0,76
	2	19 (26,03)	11 (28,95)	8 (22,86)	
	3	51 (69,86)	25 (65,79)	26 (74,29)	
NG	1	1 (1,37)	1 (2,63)	0	^b p=0,2
	2	15 (20,55)	10 (26,32)	5 (14,29)	
	3	57 (78,08)	27 (71,05)	30 (85,71)	
pT	1	24 (32,88)	13 (34,21)	11 (31,43)	^b p=0,9
	2	42 (57,53)	22 (57,89)	20 (57,14)	
	3	2 (2,74)	1 (2,63)	1 (2,86)	
	4	5 (6,85)	2 (5,26)	3 (8,57)	
pN	0	28 (38,36)	18 (47,37)	10 (28,57)	^a p=0,16
	1	21 (28,77)	11 (28,95)	10 (28,57)	
	2	12 (16,44)	3 (7,89)	9 (25,71)	
	3	12 (16,44)	6 (15,79)	6 (17,14)	
Stage	I	16 (21,92)	9 (23,68)	7 (20)	^a p=0,21
	II	31 (42,46)	19 (50)	12 (34,29)	
	III	26 (35,62)	10 (26,32)	16 (45,71)	

^ap (Chi-square test), ^bp(Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 29 и на слика 27 е прикажана експресијата на CD44 во однос на прогностичките и предиктивните маркери (ER, PR и Ki67).

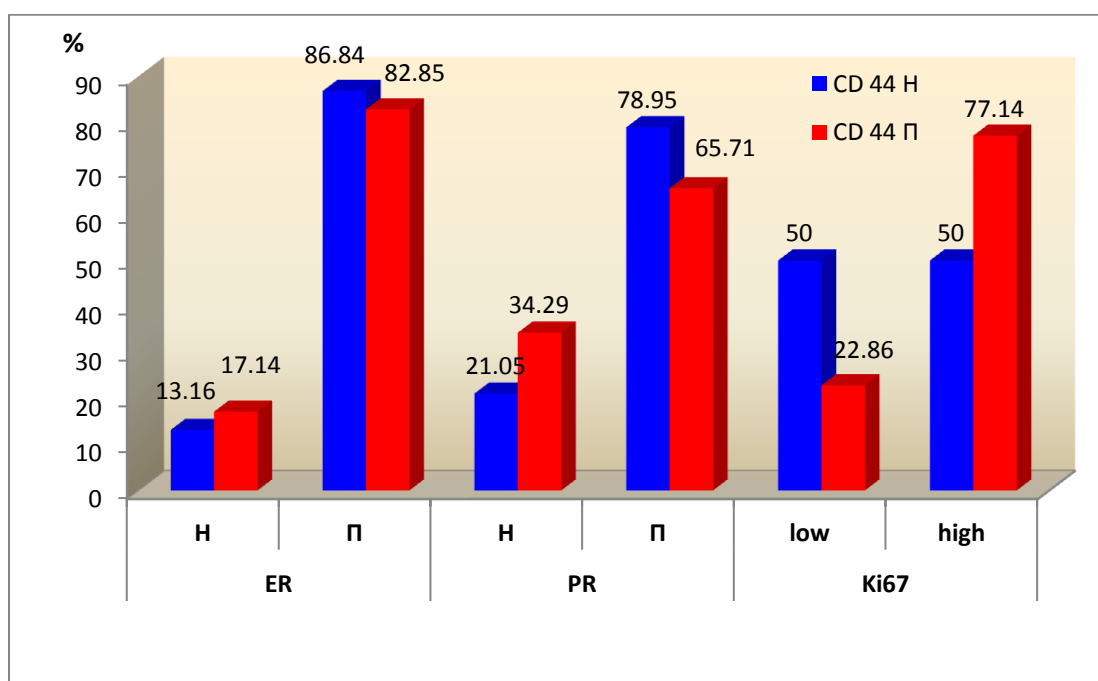
CD44 стем клеточниот маркер несигнификантно поретко беше експресиран во групата на естроген и прогестерон рецептор позитивни тумори (82,85 vs 86,84 и 65,71 vs 78,95, соодветно). Статистички значајна асоцијација (p=0,016) беше нотирана само во однос на експресијата на пролиферативниот маркер Ki67, имено, експресијата на CD44 позитивно корелира со висока експресија на Ki67.

Табела 29. Експресија на CD44 во корелација со ER, PR и Ki67

варијабла		вкупно n (%)	CD44		p value
			Н (%)	П (%)	
ER	Н	11 (15,07)	5 (13,16)	6 (17,14)	^a p =0,63
	П	62 (84,93)	33 (86,84)	29(82,85)	
PR	Н	20 (27,40)	8 (21,05)	12 (34,29)	^a p =0,21
	П	53 (72,60)	30 (78,95)	23 (65,71)	
Ki67	low	27 (36,99)	19 (50)	8 (22,86)	^a p =0,016
	high	46 (63,01)	19 (50)	27 (77,14)	

^ap (Chi-square test), ^b p(Fisher exact, two tailed test)

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен



Слика 27. Графички приказ на експресијата на CD44 стем клеточниот маркер во корелација со ER, PR и Ki67

Логистичката регресивна анализа за одредување на предиктивната улога за одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресијата на CD44, како значаен фактор го потврди маркерот на клеточна пролиферација Ki67 ($p=0,019$). Пациентките со висока експресија на Ki67 имаат за околу 3 пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD44 стем клеточниот маркер во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67– 3,375 (95,0% CI 1,225 – 9,297) (табела 30).

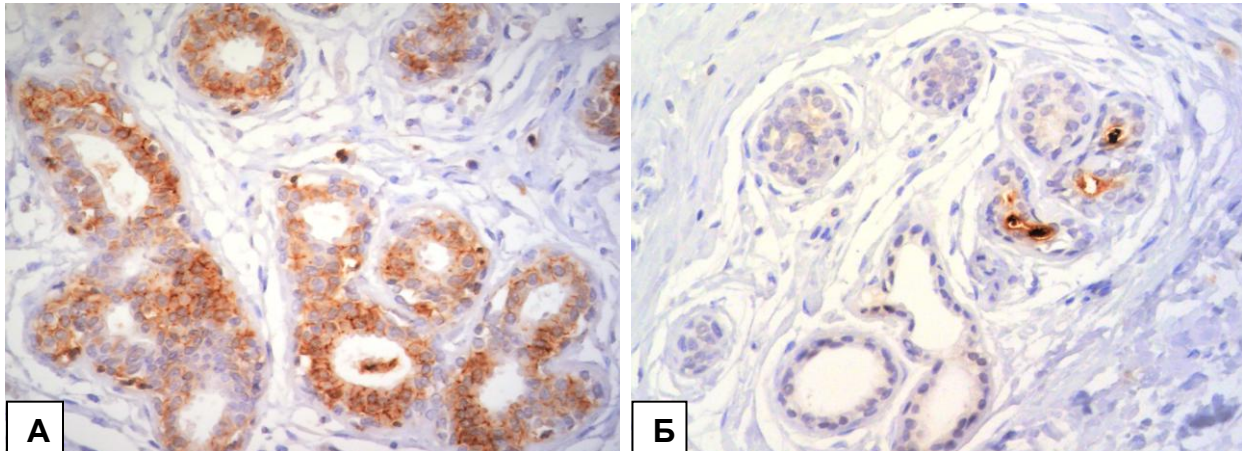
Табела 30. Логистичка регресивна анализа за одредување на предиктивната улога на одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресијата на CD44

Варијабла	Crude OR	CI 95%	p-value
возраст	0,994	0,953 – 1,037	0,787
≤ 50	ref (1)		
> 50	0,889	0,327 – 2,417	0,818
големина на тумор	1,007	0,974 – 1,041	0,7
≤ 20	ref (1)		
> 20 mm	1,135	0,426 – 3,020	0,8
хистолошки градус			
G1 /G2	ref (1)		
G3	1,502	0,546 – 4,132	0,431
нуклеарен градус			
NG1 /NG2	ref (1)		
NG3	2,444	0,753 – 7,940	0,137
туморски статус			
pT1	ref (1)		
pT2 – pT4	1,135	0,426 – 3,020	0,8
лимфонодален статус			
pN0	ref (1)		
pN1-3	2,250	0,852 – 5,943	0,102
постоперативен стадиум			
I /II	ref (1)		
III	2,358	0,883 – 6,293	0,087
HER 2			
H	ref (1)		
П	0,468	0,127 – 1,721	0,253
ER			
H	ref (1)		
П	0,732	0,202 – 2,653	0,635
PR			
H	ref (1)		
П	0,511	0,179 – 1,456	0,209
Ki 67			
low	ref (1)		
high	3,375	1,225 – 9,297	0,019

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, H- негативен, П- позитивен

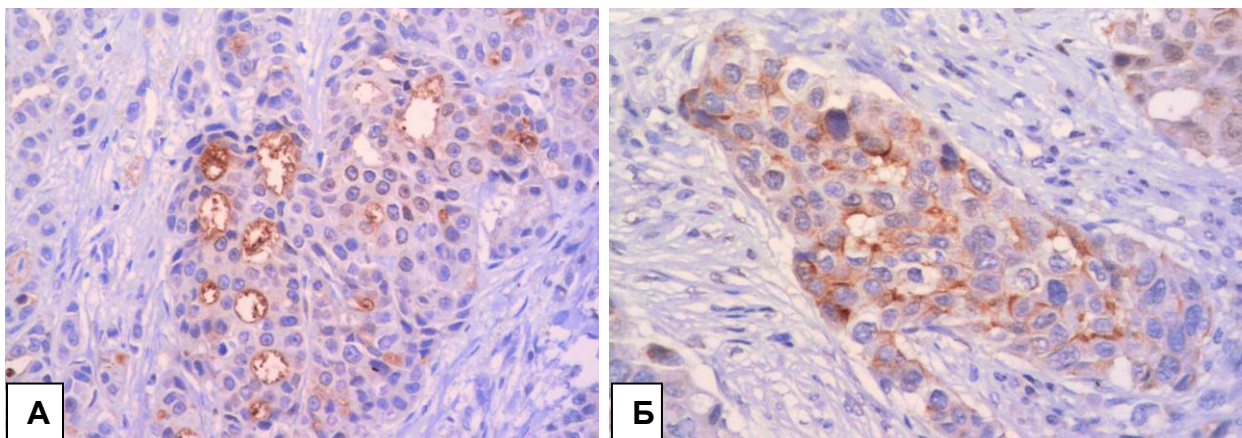
4.3.2. Експресија на CD24 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошки карактеристики на карциномот на дојка

Анализата на експресијата на CD24 стем клеточниот маркер покажа варијабилна експресија во контролната група: во дел се детектираше циркумференцијален мембрански позитивитет во епителните клетки на дуктусите или ТДЛЕ, а во дел, CD24 ја маркираше само апикалната површина на луминалните клетки и интралуминалниот секрет (слика 28).



Слика 28. Експресија на CD24 во бенигно ткиво на дојка. **А**, мембрански позитивитет во епителните клетки на ТДЛЕ (CD24x200); **Б**, апикален луминален позитивитет во ТДЛЕ (CD24x200).

Во испитуваната група, CD24 покажа мембрански, мембрано-цитоплазматски или апикален луминален позитивитет во туморските клетки (слика 29). CD24 стем клеточниот маркер покажа позитивна експресија во 20 (27,4%) од случаите со инвазивен карцином на дојка.



Слика 29. Експресија на CD24 во карциноми на дојка. **А**, апикален луминален позитивитет (CD24x200); **Б**, циркумференцијален мембрански позитивитет (CD24x200).

Во табела 31 е прикажана експресијата на CD24 во однос на возраста на пациентките и големината на туморот.

Пациентките со CD24 позитивни тумори почесто од пациентките со CD24 негативни тумори, беа постари од 50 години (75% vs 66,04%). Просечната возраст на пациентките во двете групи беше идентична (59,65±10,6 vs 59,09 ± 11,3, p=0,85). Детектираните разлики не покажаа статистички значајна асоцираност помеѓу експресијата на CD24 стем клеточниот маркер и возраста на пациентките (p=0,46).

Туморите со големина од 20 до 50 мм беа најзастапени во групата со и во групата без експресија на CD24 (65% vs 62,26%; p=0,81). Просечната големина на туморите со позитивна експресија на CD24 беше незначително помала во однос на просечната големина на туморите без експресија на CD24 (24,6± 11,2 vs 28,34± 11,2; p=0,31). Резултатите од истражувањето не покажаа статистички значајна асоцираност помеѓу експресијата на CD24 и големината на туморот (p=0,81).

Табела 31. Експресија на CD24 во однос на возраста и големината на туморот

Варијабла		вкупно n (%)	CD24		p value
			Н (n=53)	П(n=20)	
Возраст	≤ 50	23 (31,51)	18 (33,96)	5 (25)	^a p=0,46
	> 50	50 (68,49)	35 (66,04)	15 (75)	
	mean ± SD (min-max)		59,09±11,3 (41–86)	59,65±10,6 (42–78)	^c p=0,85
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)	17 (32,07)	7 (35)	^b p=0,81
	20-50	46 (63,01)	33 (62,26)	13 (65)	
	> 50	3 (4,11)	3 (5,67)	0	
	mean ± SD (min-max)		28,34±14,7 (5–75)	24,6±11,2 (8–45)	^c p=0,31

^ap (Chi-square test), ^b p(Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)

Во табела 32 е прикажана дистрибуцијата на пациентите со и без експресија на CD24 во однос на хистопатолошките параметри.

Експресијата на CD24 клеточниот маркер не беше значајно асоцирана со хистолошкиот градус (p=0,11), со туморскиот статус (p=0,81), со лимфонодалниот статус (p=0,98) и со стадиумот на болеста (p=0,53). Иако статистички незначајно, CD24 позитивните тумори почесто од CD24 негативните тумори беа лошо диференцирани (85% vs 64,15%), со позитивен лимфонодален статус (65% vs 60,38%), дијагностицирани во III стадиум на болест (45% vs 32,08%). Значајна разлика беше забележана само во однос на нуклеарниот градус (p=0,002). Најголем процент, 95%, од CD24 позитивните тумори беа со нуклеарен градус 3, додека останатите 5% беа со нуклеарен градус 1. Во групата на CD24 позитивни

тумори немаше тумори со нуклеарен градус 2 наспроти 28,3% тумори кај CD24 негативните тумори.

Табела 32. Експресија на CD24 во однос на хистопатолошките параметри

варијабла		вкупно n (%)	CD24		p value
			H (n=53)	П (n=20)	
G	1	3 (4,11)	2 (3,77)	1 (5)	^b p=0,11
	2	19 (26,03)	17 (32,08)	2 (10)	
	3	51 (69,86)	34 (64,15)	17 (85)	
NG	1	1 (1,37)	0	1 (5)	^b p=0,002
	2	15 (20,55)	15 (28,3)	0	
	3	57 (78,08)	38 (71,7)	19 (95)	
pT	1	24 (32,88)	17 (32,08)	7 (35)	^b p=0,81
	2	42 (57,53)	31 (58,49)	11 (55)	
	3	2 (2,74)	2 (3,77)	0	
	4	5 (6,85)	3 (5,66)	2 (10)	
pN	0	28 (38,36)	21 (39,62)	7 (35)	^b p=0,98
	1	21 (28,77)	15 (28,3)	6 (30)	
	2	12 (16,44)	9 (16,98)	3 (15)	
	3	12 (16,44)	8 (15,09)	4 (20)	
Stage	I	16 (21,92)	13 (24,53)	3 (15)	^a p=0,53
	II	31 (42,46)	23 (43,4)	8 (40)	
	III	26 (35,62)	17 (32,08)	9 (45)	

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 33 и на слика 30 е прикажана дистрибуцијата на експресијата на CD24 во однос на прогностичките и предиктивните маркери (ER, PR и Ki67).

Експресијата на CD24 беше незначајно асоцирана со експресијата на ER ($p=1,0$) и PR ($p=0,78$). CD24 позитивните тумори почесто од CD24 негативните тумори беа PR позитивни (75% vs 71,70%). CD24 позитивните и CD24 негативните тумори покажаа идентична застапеност во групата на ER позитивните тумори (85% vs 84,9%).

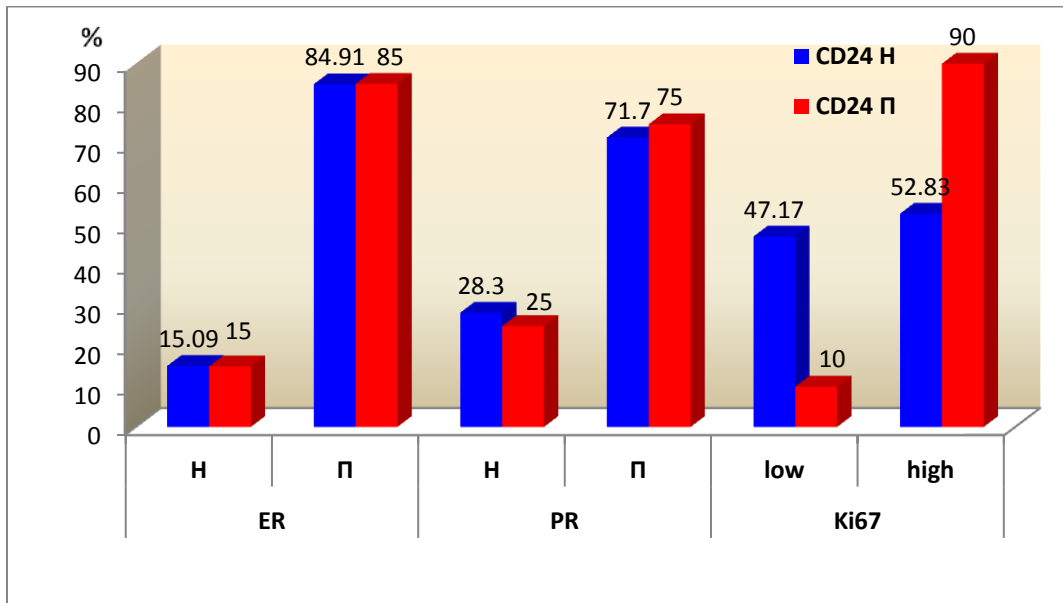
Статистички значајна разлика беше нотирана само во однос на експресијата на пролиферативниот маркер Ki67: CD24 позитивните тумори почесто од CD24 негативните тумори покажаа висока експресија за Ki67 (90% vs 52,83%; $p=0,003$). Од вкупно 20 пациентки со позитивна експресија на CD24, кај 18 (90%) од нив беше регистрирана висока, а само кај 2 (10%) пациентки ниска експресија на клеточниот маркер Ki67.

Табела 33. Експресија на CD24 во однос на ER, PR и Ki67.

варијабла		вкупно n (%)	CD24		p value
			Н (%)	П (%)	
ER	Н	11 (15,07)	8 (15,09)	3 (15)	^b p=1,0
	П	62 (84,93)	45 (84,91)	17(85)	
PR	Н	20 (72,60)	15 (28,30)	5 (25)	^a p =0,78
	П	53 (27,40)	38 (71,70)	15 (75)	
Ki67	low	27 (36,99)	25 (47,17)	2 (10)	^a p=0,003
	high	46 (63,01)	28 (52,83)	18 (90)	

^ap (Chi-square test) ^bp Fisher exact, two tailed test

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен

**Слика 30.** Графички приказ на експресијата на CD24 стем клеточниот маркер во однос на ER, PR и Ki67.

Логистичката регресивна анализа за одредување на предиктивната улога за одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресијата на CD24, како значаен фактор го потврди маркерот на клеточната пролиферација Ki67 ($p=0,009$). Пациентките со висока експресија на Ki67 во туморското ткиво имаат за околу 8 пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD24– 8,036 (95,0% CI 1,693 – 38,135), во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67 (табела 34).

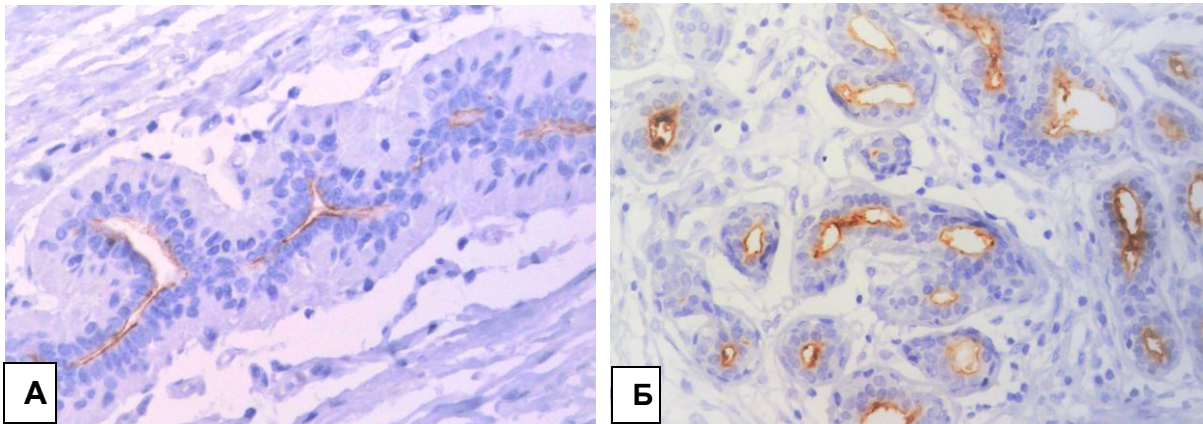
Табела 34. Логистичка регресивна анализа за одредување на предиктивната улога на одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресија на CD24

Варијабла	Crude OR	CI 95%	p-value
возраст	1,005	0,959 – 1,053	0,847
≤ 50	ref (1)		
> 50	1,417	0,442 – 4,541	0,558
големина на тумор	0,979	0,939 – 1,020	0,305
≤ 20	ref (1)		
> 20	0,877	0,296 – 2,595	0,813
хистолошки градус			
G1 /G2	ref (1)		
G3	3,167	0,821 – 12,211	0,094
нуклеарен градус			
NG1 / NG2	ref (1)		
NG3	7,50	0,920 – 61,113	0,06
туморски статус			
pT1	ref (1)		
pT2 – pT4	0,877	0,296 – 2,595	0,813
лимфонодален статус			
pN0	ref (1)		
pN1-3	1,219	0,418 – 3,557	0,717
постоперативен стадиум			
I / II	ref (1)		
III	1,733	0,605 – 4,966	0,306
HER 2			
H	ref (1)		
П	1,50	0,395 – 5,70	0,552
ER			
H	ref (1)		
П	1,007	0,239 – 4,250	0,992
PR			
H	ref (1)		
П	1,184	0,366 – 3,836	0,778
Ki 67			
low	ref (1)		
high	8,036	1,693 – 38,135	0,009

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, H- негативен, П- позитивен

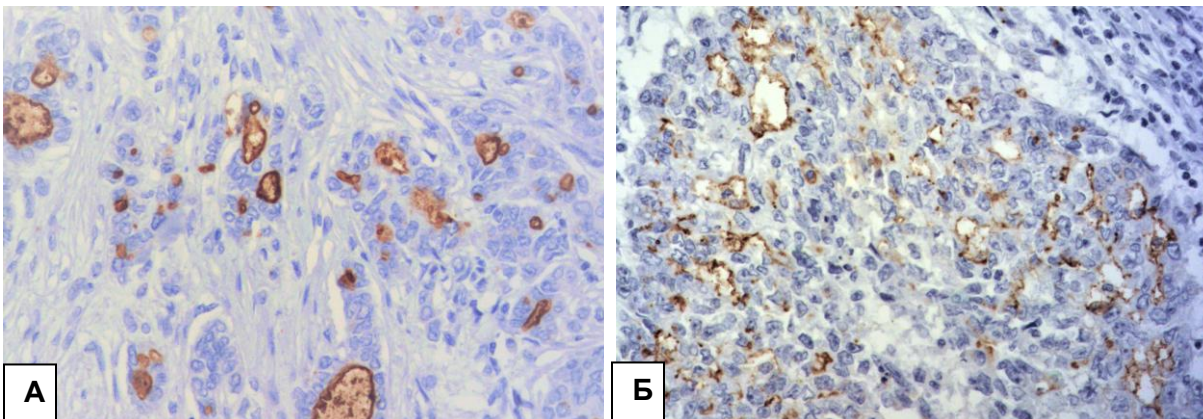
4.3.3. Експресија на CD133 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко- патолошките карактеристики на карциномот на дојка

Анализата на експресијата на CD133 во контролната група покажа мембрански позитивитет со доминантна апикална ориентација во епителните клетки на дуктусите и ТДЛЕ (слика31).



Слика31. Експресија на CD133 во карциноми на дојка. **А**, апикален мембрански позитивитет во дуктусите (CD133x200); **Б**, апикален мембрански позитивитет во ТДЛЕ (CD133x200).

Во испитуваната група, CD133 покажа, исто така, мембрански позитивитет со доминантна апикална ориентација, а поретко се детектираше и циркуференцијален мембрански позитивитет во епителните туморски клетки (слика 32). CD133 стем клеточниот маркер беше експресиран во 21 (28,77%) од случаите со инвазивен карцином на дојка.



Слика32. Експресија на CD133 во епителни туморски клетки. **А**, апикален луминален позитивитет во карциноми на дојка (CD133 x200); **Б**, апикален или мембрански циркуференцијален позитивитет во карциноми на дојка (CD133 x200).

Во табела 35 е прикажана експресијата на CD133 во однос на возраста на пациентките и големината на туморот.

Не е детектирана значајна разлика помеѓу возраста на пациентките и експресијата на CD133 ($p > 0,05$). Повеќе од две третини (66,67%) од пациентките со експресија на CD133 беа постари од 50 години. Просечната возраст на пациентките со позитивна експресија на CD133 беше незначајно пониска во однос на пациентките со негативна експресија за CD133 ($58,76 \pm 10,1$ vs $59,55 \pm 11,5$).

Туморите со големина од 20 до 50 мм најчесто беа застапени и во групата со и во групата без експресија на CD133 (57,14% vs 65,38%). Просечниот дијаметар на туморите беше идентичен и во двете групи ($27,47 \pm 15,8$ vs $27,25 \pm 13,1$). Резултатите од истражувањето не покажаа значајна асоцираност помеѓу експресијата на CD24 и големината на туморот ($p = 0,8$).

Табела 35. Експресија на CD133 во однос на возраста и големината на туморот

варијабла		вкупно n (%)	CD133		p value
			H (n=52)	П (n=21)	
возраст	≤ 50	23 (31,51)	16 (30,77)	7 (33,33)	^a $p = 0,83$
	> 50	50 (68,49)	36 (69,23)	14 (66,67)	
	mean ± SD (min-max)		59,44±11,5 (41–86)	58,76±10,1 (45–80)	^c $p = 0,8$
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)	16 (30,77)	8 (38,09)	^b $p = 0,8$
	20 - 50	46 (63,01)	34 (65,38)	12 (57,14)	
	> 50	3 (4,11)	2 (3,85)	1 (4,77)	
	mean ± SD (min-max)		27,25±13,1 (8–75)	27,47±15,8 (5–70)	^c $p = 0,95$

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)

Во табела 36 е прикажана експресијата на CD133 во однос на хистопатолошките параметри.

Експресијата на CD133 стем клеточниот маркер не беше значајно асоцирана со хистолошкиот градус ($p = 0,44$), со нуклеарниот градус ($p = 0,36$), со туморскиот статус ($p = 0,75$) и со лимфонодалниот статус ($p = 0,16$). Иако статистички незначајно, пациентките со позитивна експресија на CD133 почесто имаа лошо диференцирани тумори, со висок нуклеарен градус и со позитивен лимфонодален статус.

Сигнификантна корелација беше детектирана само во однос на стадиумот на болеста ($p = 0,048$). Туморите со позитивна експресија за CD133 значително почесто беа дијагностицирани во III стадиум на болеста, во однос на туморите без експресија за CD133 (57,14% vs 26,92%).

Табела 36. Експресијата на CD133 во однос на хистопатолошките параметри

варијабла		вкупно n (%)	CD133		p value
			Н (n=52)	П (n=21)	
G	1	3 (4,11)	3 (5,77)	0	^b p=0,44
	2	19 (26,03)	15 (28,85)	4 (19,05)	
	3	51 (69,86)	34 (65,38)	17 (80,95)	
NG	1	1 (1,37)	1 (1,92)	0	^b p=0,36
	2	15 (20,55)	13 (25)	2 (9,52)	
	3	57 (78,08)	38 (73,08)	19 (90,48)	
pT	1	24 (32,88)	16 (30,77)	8 (38,1)	^b p=0,75
	2	42 (57,53)	31 (59,62)	11 (52,38)	
	3	2 (2,74)	1 (1,92)	1 (4,76)	
	4	5 (6,85)	4 (7,69)	1 (4,76)	
pN	0	28 (38,36)	22 (42,31)	6 (28,57)	^b p=0,16
	1	21 (28,77)	17 (32,69)	4 (19,05)	
	2	12 (16,44)	6 (11,54)	6 (28,57)	
	3	12 (16,44)	7 (13,46)	5 (23,81)	
Stage	I	16 (21,92)	12 (23,08)	4 (19,05)	^a p=0,048
	II	31 (42,46)	26 (50)	5 (23,81)	
	III	26 (35,62)	14 (26,92)	12 (57,14)	

^ap (Chi-square test), ^bp(Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 37 и на слика 33 е прикажана експресијата на CD133 во однос на ER, PR и Ki67.

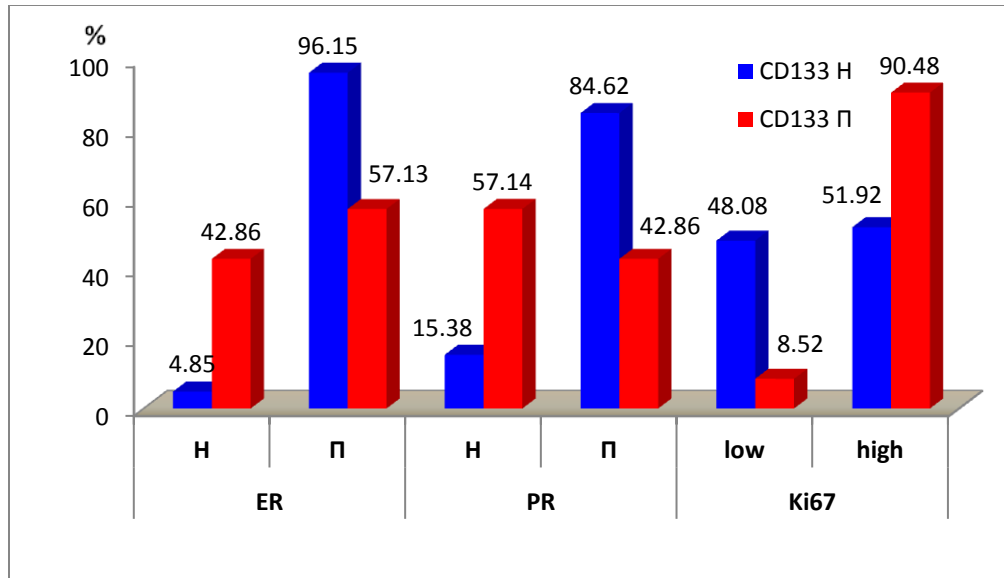
Анализата на резултатите покажа статистички значајна разлика во однос на експресијата на ER ($p=0,0001$), PR ($p=0,0003$) и Ki67 ($p=0,002$) помеѓу тумори со и без експресија на CD133. CD133 позитивните тумори поретко од CD133 негативните тумори беа ER и PR позитивни (57,13% vs 96,15% и 42,86% vs 84,62%), а почесто покажаа висока експресија за Ki67 клеточниот маркер (90,48% vs 51,92%).

Табела 37. Експресија на CD133 во однос на ER, PR и Ki67

варијабла		вкупно n (%)	CD133		p value
			Н (%)	П (%)	
ER	Н	11 (15,07)	2 (4,85)	9 (42,86)	^b p=0,0001
	П	62 (84,93)	50 (96,15)	12 (57,13)	
PR	Н	20 (72,60)	8 (15,38)	12 (57,14)	^a p=0,0003
	П	53 (27,40)	44 (84,62)	9 (42,86)	
Ki67	low	27 (36,99)	25 (48,08)	2 (8,52)	^a p=0,002
	high	46 (63,01)	27 (51,92)	19 (90,48)	

^ap (Chi-square test), ^bp Fisher exact, two tailed test

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен



Слика 33. Експресија на CD133 во однос на ER, PR и Ki67

Логистичката регресивна анализа за одредување на предиктивната улога за одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресијата на CD133, како сигнификантни фактори ги потврди: постоперативниот стадиум ($p=0,017$), естрогенскиот рецептор ($p=0,001$), прогестеронскиот рецептор ($p=0,001$) и маркерот за клеточна пролиферација Ki67 ($p=0,006$) (табела 38).

Пациентките во III постоперативен стадиум имаат за околу 3,5 пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD133– 3,619 (95,0% CI 1,255 – 10,44) во однос на пациентките во I / II стадиум на болеста.

Експресијата на естрогенскиот и прогестеронскиот рецептор во туморското ткиво ја намалуваат веројатноста за експресија на CD133 во туморското ткиво. Пациентките со експресија на ER во туморското ткиво имаат за 0,05 пати помала веројатност за позитивна експресија на CD133 стем клеточниот маркер – 0,053 (95,0% CI 0,01 – 0,28) од пациентките без ER експресија. Исто така, пациентките со позитивна експресија за PR имаат за околу 0,14 пати помала веројатност за позитивна експресија на CD133 стем клеточниот маркер – 0,136 (95,0% CI 0,043 – 0,429) во однос на пациентките без PR експресија.

Пациентките со висока експресија на Ki67 во туморското ткиво имаат за околу 8,5 пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD133 клеточниот маркер – 8,796 (95,0% CI 1,857 – 41,662), во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67.

Табела 38. Логистичка регресивна анализа за одредување на предиктивната улога на одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри за експресија на CD133

Варијабла	Crude OR	CI 95%	p-value
возраст	0,994	0,949 – 1,042	0,810
≤ 50	ref (1)		
> 50	1,111	0,364 – 3,388	0,853
големина на тумор	1,001	0,965 – 1,039	0,949
≤ 20	ref (1)		
> 20	0,722	0,250 – 2,083	0,547
хистолошки градус			
G1 / G2	ref (1)		
G3	2,250	0,658 – 7,697	0,196
нуклеарен градус			
NG1 / NG2	ref (1)		
NG3	3,50	0,720 – 17,003	0,120
туморски статус			
pT1	ref (1)		
pT2 – pT4	0,722	0,250 – 2,083	0,547
лимфонодален статус			
pN0	ref (1)		
pN1-3	1,833	0,613 – 5,480	0,278
постоперативен стадиум			
I / II1	ref (1)		
III	3,619	1,255 – 10,440	0,017
HER 2 ген			
Н	ref (1)		
П	3,0	0,840 – 10,721	0,091
ER			
Н	ref (1)		
П	0,053	0,010 – 0,280	0,001
PR			
Н	ref (1)		
П	0,136	0,043 – 0,429	0,001
Ki 67			
low	ref (1)		
high	8,796	1,857 – 41,662	0,006

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен

Во табела 39 се прикажани резултатите од мултиваријантната логистичка регресивна анализа за детерминирање на независните предиктивни фактори за експресија на CD133 во карциноми на дојка. Во анализата беа вклучени варијаблите, односно факторите на ризик кои се покажаа како сигнификантни во униваријантната анализа.

Мултиваријантната регресиона анализа како значаен фактор за предикција на експресија на CD133 го потврди само постоперативниот стадиум на болеста ($p=0,021$). Пациентките со III постоперативен стадиум имаат за околу 5,6 пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD133 стем клеточниот маркер – 5,647 (95,0% CI 1,295 – 24,62) од пациентките во I/ II стадиум на болеста.

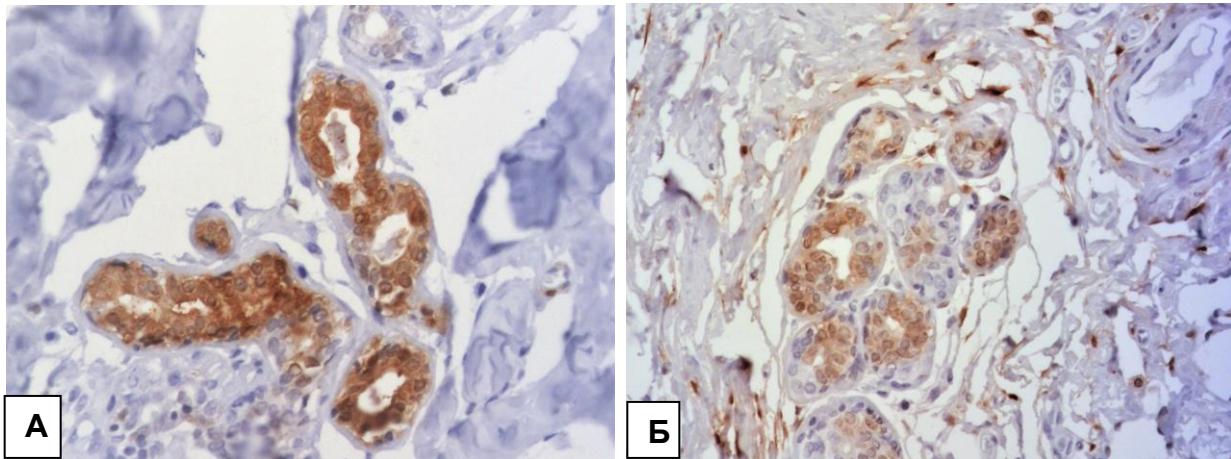
Табела 39. Мултиваријантна логистичка регресиона анализа за одредување на предиктивната улога на одредени клиничко-патолошки параметри за експресија на CD133

варијабла	B	S,E,	Wald	p-value	AOR	CI 95%
Stage	1,731	0,751	5,309	0,021	5,647	1,295 – 24,620
ER	-2,039	1,133	3,239	0,072	0,130	0,014 – 1,199
PR	-1,206	0,944	1,631	0,202	0,300	0,047 – 1,905
Ki 67	1,013	0,881	1,322	0,250	2,754	0,490 – 15,482

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација

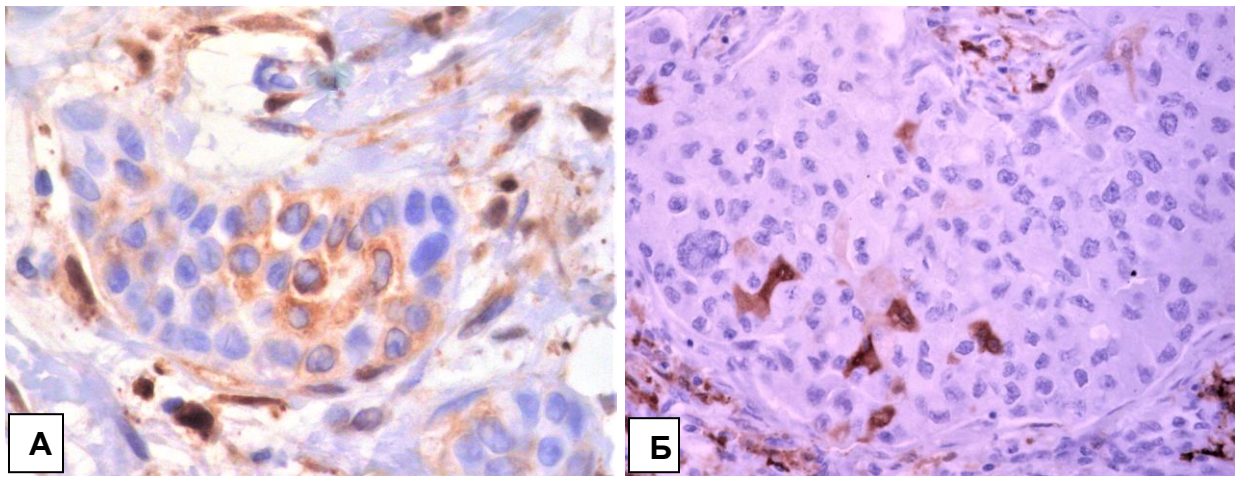
4.3.4. Експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките карактеристики кај карциноми на дојка

Анализата на експресијата на ALDH1A1 во контролната група покажа цитоплазматска експресија во луминалните клетки на терминалната дуктално-лобуларна единица или во епителните клетки кои ги обложуваат дуктусите (слика 34). ALDH1A1 беше експресиран и во стромалните клетки.

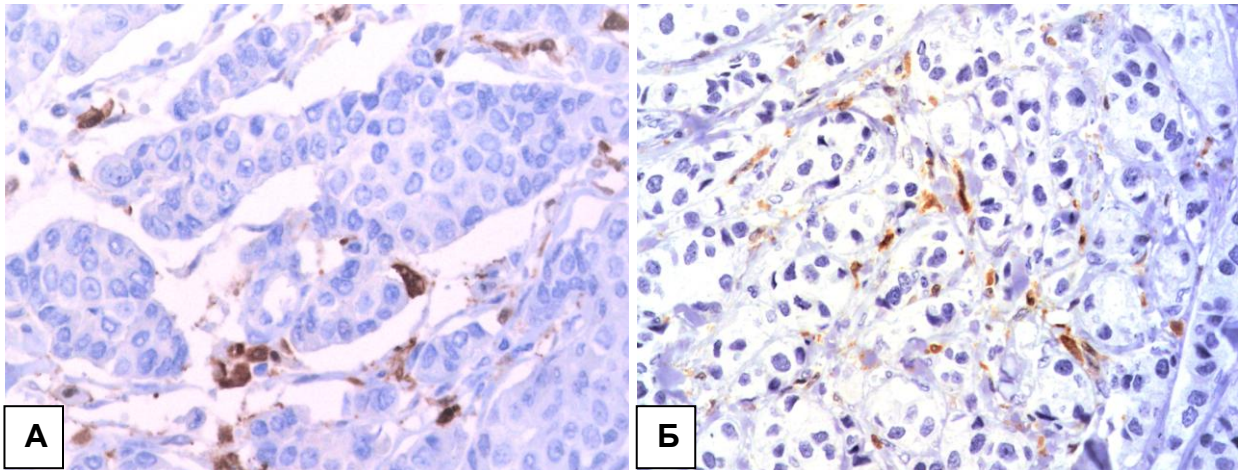


Слика 34. Експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер во бенигно ткиво на дојка. **А**, цитоплазматски позитивитет во епителните клетки на ТДЛЕ (ALDH1A1 x200); **Б**, цитоплазматски позитивитет во епителните клетки на ТДЛЕ и во стромалните клетки (ALDH1A1 x200).

Во испитуваната група ALDH1A1 покажа цитоплазматска експресија во епителните туморски клетки или во стромалните клетки (слика 35 и 36). ALDH1A1 беше експресиран во 26 (35,62%) од вкупно 73 анализирани случаи.



Слика 35. Експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер во карциноми на дојка. **А** и **Б**. Цитоплазматски позитивитет во малигни туморски клетки (ALDH1A1x200).



Слика 36. Експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер во карциноми на дојка. **А** и **Б** (ALDH1A1x200). Цитоплазматски позитивитет во стромалните клетки во примерок од карцином на дојка, додека епителните туморски клетки се негативни.

Во табела 40 е прикажана експресијата на ALDH1A1 во корелација со возраста на пациентките и големината на туморот. Повеќе од 2/3 (73,08%) од пациентките со позитивна експресија на ALDH1A1 беа на возраст над 50 години. Пациентките со позитивна експресија на ALDH1A1 беа незначително постари во однос на пациентките без експресија за ALDH1A1 ($59,73 \pm 10,3$ vs $58,98 \pm 11,5$).

Туморите со позитивна експресија за ALDH1A1 имаа просечен дијаметар на туморот од $29,15 \pm 15,7$ мм, и беа незначително поголеми од ALDH1A1 негативните тумори ($26,29 \pm 12,8$; $p=0,4$). И во двете групи, најголем број на пациентки имаа тумори со големина 20-50мм. Добиените резултати не покажаа статистички значајна поврзаност помеѓу експресијата на ALDH1A1 стем клеточниот маркер ниту со возраста на пациентките ниту со големината на туморите.

Табела 40. Експресија на ALDH1A1 во однос на возраста и големината на туморот

Варијабла		вкупно n (%)	ALDH1A1		p value
			H(n=47)	П (n=26)	
Возраст	≤ 50	23 (31,51)	16 (34,04)	7 (26,92)	^a p=0,53
	> 50	50 (68,49)	31 (65,96)	19 (73,08)	
	mean ± SD (min-max)		58,98±11,5 (43–86)	59,73±10,3 (41–82)	^c p=0,78
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)	16 (34,04)	8 (30,77)	^b p=0,63
	20 - 50	46 (63,01)	30 (63,83)	16 (61,54)	
	> 50	3 (4,11)	1 (2,13)	2 (7,69)	
	mean ± SD (min-max)		26,29±12,8 (8-70)	29,15±15,7 (5–75)	^c p=0,4

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)

Во табела 41 е прикажана експресијата на ALDH1A1 во однос на хистопатолошките параметри. Туморите со и без експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер незначајно се разликуваа во однос на хистолошкиот градус ($p=0,19$), нуклеарниот градус ($p=0,13$), туморскиот статус ($p=1,0$), лимфонодалниот статус ($p=0,11$) и постоперативниот стадиум ($p=0,37$).

Иако статистички незначајно, ALDH1A1 позитивните тумори почесто од ALDH1A1 негативните тумори беа лошо диференцирани ($76,92\%$ vs $65,96\%$), со висок нуклеарен градус ($84,62\%$ vs $74,47\%$), почесто имаа метастази во регионалните лимфни жлезди ($65,38\%$ vs $59,57\%$) и почесто беа во III стадиум на болест ($46,15$ vs $29,79\%$).

Табела 41. Експресијата на ALDH1A1 во однос на хистопатолошките параметри

варијабла		вкупно n (%)	ALDH1A1		p value
			H(n=47)	П (n=26)	
G	1	3 (4,11)	1 (2,13)	2 (7,69)	^b p=0,19
	2	19 (26,03)	15 (31,91)	4 (15,38)	
	3	51 (69,86)	31 (65,96)	20 (76,92)	
NG	1	1 (1,37)	0	1 (3,85)	^b p=0,13
	2	15 (20,55)	12 (25,53)	3 (11,54)	
	3	57 (78,08)	35 (74,47)	22 (84,62)	
pT	1	24 (32,88)	16 (34,04)	8 (30,77)	^b p=1,0
	2	42 (57,53)	27 (57,45)	15 (57,69)	
	3	2 (2,74)	1 (2,13)	1 (3,85)	
	4	5 (6,85)	3 (6,38)	2 (7,69)	
pN	0	28 (38,36)	19 (40,43)	9 (34,62)	^b p=0,11
	1	21 (28,77)	16 (34,04)	5 (19,23)	
	2	12 (16,44)	8 (17,02)	4 (15,38)	
	3	12 (16,44)	4 (8,51)	8 (30,77)	
Stage	I	16 (21,92)	11 (23,4)	5 (19,23)	^a p=0,37
	II	31 (42,46)	22 (46,81)	9 (34,62)	
	III	26 (35,62)	14 (29,79)	12 (46,15)	

^ap (Chi-square test), ^b p(Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 42 и на слика 37 е прикажана експресијата на ALDH1A1 во однос на експресијата на биолошките маркери: ER, PR и Ki67.

Добиените резултати не покажаа значајна поврзаност помеѓу експресијата на ALDH1A1 и експресијата на хормонските рецептори ER ($p=0,51$) и PR ($p=0,3$). Иако статистички незначајно, ALDH1A1 позитивните тумори поретко од ALDH1A1 негативните тумори беа позитивни на хормонските рецептори.

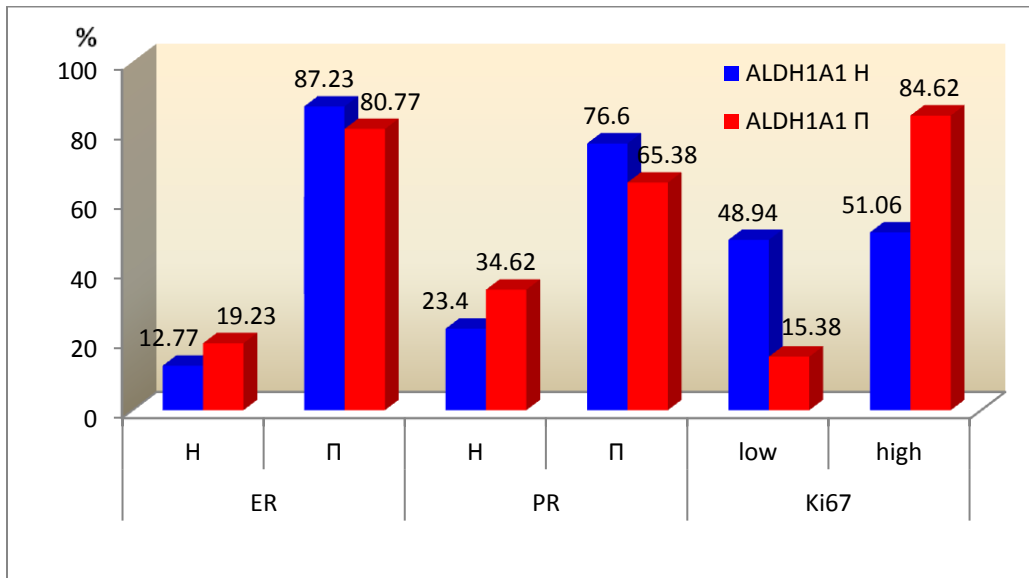
Според анализата, статистички значајна разлика ($p=0,005$) беше нотирана само во однос на експресијата на Ki67 и стем клеточниот маркер ALDH1A1. Имено, ALDH1A1 позитивните умори значително почесто имаа висока експресија за пролиферативниот маркер Ki67, во однос на ALDH1A1 негативните тумори (84,62% vs 51,06 %).

Табела 42. Експресија на ALDH1A1 во однос на ER, PR и Ki67

Варијабла		вкупно n (%)	ALDH1A1		p value
			Н (%)	П (%)	
ER	Н	11 (15,07)	6 (12,77)	5 (19,23)	^b p=0,51
	П	62 (84,93)	41 (87,23)	21 (80,77)	
PR	Н	20 (72,60)	11 (23,40)	9 (34,62)	^a p=0,3
	П	53 (27,40)	36 (76,60)	17 (65,38)	
Ki67	low	27 (36,99)	23 (48,94)	4 (15,38)	^a p=0,005
	high	46 (63,01)	24 (51,06)	22 (84,62)	

^ap (Chi-square test), ^bp(Fisher exact, two tailed test)

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен



Слика37. Дистрибуција на пациентите во однос на експресија на ALDH1A1 со ER, PR и Ki67

Униваријантната анализа за одредување на предиктивната улога за одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри врз експресијата на ALDH1A1, како сигнификантен фактор го потврди маркерот на клеточна пролиферација Ki67 ($p=0,007$), (табела 43).

Пациентките со висока експресија на Ki67 во туморското ткиво имаат за околу 5 пати поголема веројатност за позитивна експресија на ALDH1A1– 5,271 (95,0% CI 1,573 – 17,661) во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67.

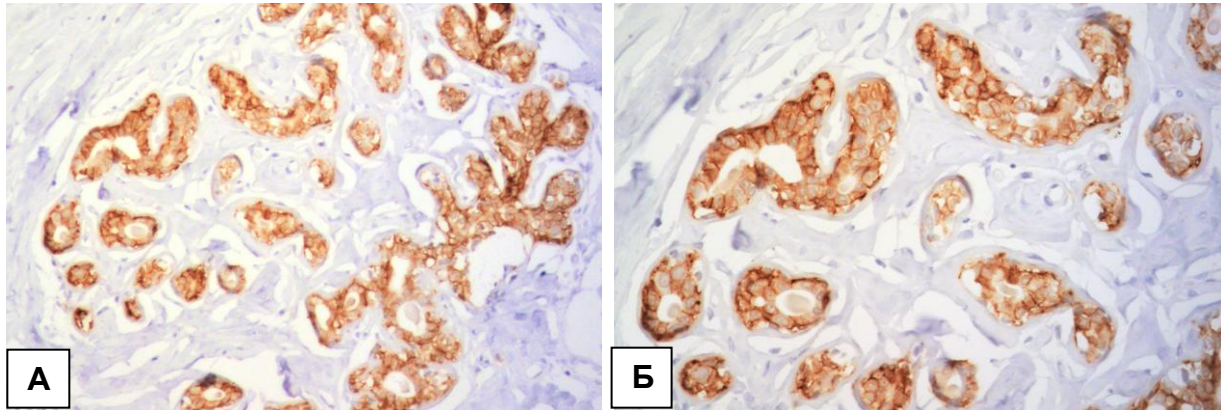
Табела 43. Логистичка регресиона анализа за одредување на предиктивната улога на одредени клиничко-патолошки и биолошки параметри за експресија на ALDH1A1

Варијабла	Crude OR	CI 95%	p-value
возраст	1,006	0,963 – 1,051	0,779
≤ 50	ref (1)		
> 50	1,272	0,440 – 3,678	0,657
големина на тумор	1,0015	0,980 – 1,051	0,40
≤20	ref (1)		
> 20	1,161	0,415 – 3,248	0,776
хистолошки градус			
G1 / G2	ref (1)		
G3	1,720	0,576 – 5,136	0,331
нуклеарен градус			
NG1 / NG2	ref (1)		
NG3	1,886	0,540 – 6,588	0,320
туморски статус			
pT1	ref (1)		
pT2 – pT4	1,161	0,415 – 3,248	0,776
лимфонодален статус			
pN0	ref (1)		
pN1-3	1,282	0,473 – 3,471	0,625
постоперативен стадиум			
I / II	ref (1)		
III	2,020	0,749 – 5,452	0,165
HER 2 ген			
Н	ref (1)		
П	2,158	0,615 – 7,574	0,230
ER			
Н	ref (1)		
П	0,615	0,168 – 2,251	0,462
PR			
Н	ref (1)		
П	0,577	0,201 – 1,654	0,306
Ki 67			
low	ref (1)		
high	5,27	1,573 – 17,661	0,007

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен

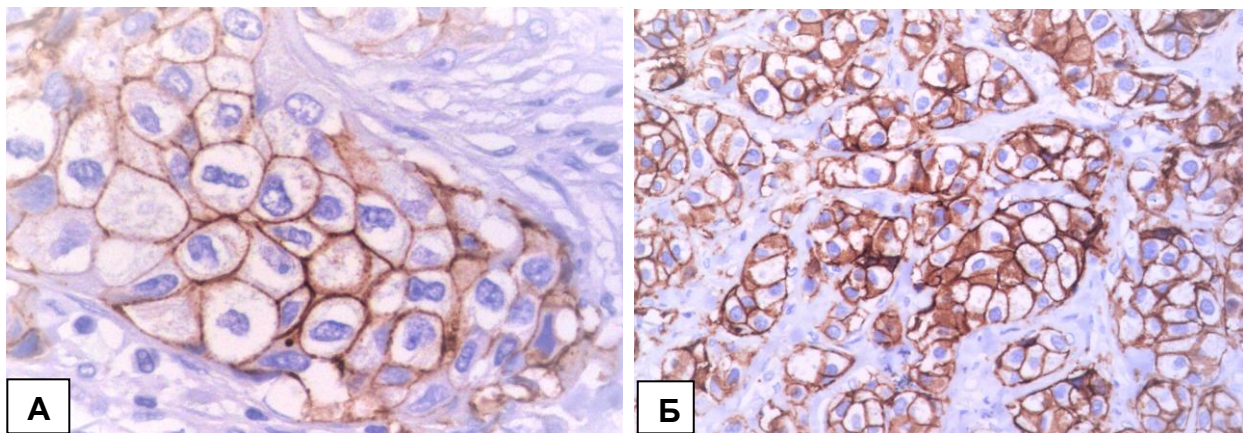
4.3.5. Експресија на ЕрСам стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките карактеристики кај карциноми на дојка

Во контролната група, ЕрСам покажа мембрански позитивитет со варијабилен интензитет во епителните клетки на дуктусите и ТДЛЕ (слика 38).



Слика 41. Експресија на ЕрСам стем клеточниот маркер во бенигно ткиво на дојка. Мембрански позитивитет во епителните клетки на ТДЛЕ. **А**, (ЕрСам x100); **Б**, (ЕрСам x200).

Во испитуваната група, ЕрСам покажа доминантно мембранска експресија со варијабилен интензитет и варијабилна процентуална застапеност во туморските клетки (слика 39). Од вкупно анализирани 73 примероци, позитивна експресија за ЕрСам беше докажана во 46 (63,04%) од нив.



Слика 39. Експресија на ЕрСам стем клеточниот маркер во карциноми на дојка. Умерен до силен, доминантно мембрански позитивитет во малигни туморски клетки **А**, (ЕрСам x400); **Б**, Силен мембрански позитивитет во дел со цитоплазматска реакција во туморските клетки (ЕрСам x200).

Во табела 44 е прикажана експресијата на ЕрСам во корелација со возраста на пациентите и големината на туморот.

Статистичката анализа не покажа значајна поврзаност помеѓу експресијата на ЕрСам и возраста на пациентите. Просечната возраст на пациентите со позитивна експресија за ЕрСам беше $59,72 \pm 11,3$ години, наспроти $58,44 \pm 10,8$ години во групата без експресија на овој маркер. Повеќе од половина (65,22%) од пациентите со позитивна експресија за ЕрСам беа на возраст над 50 години.

Статистички несигнификантна беше разликата помеѓу пациентите со и без експресија на ЕрСам, а во однос на големината на туморот ($p > 0,05$). Туморите со големина од 20 до 50 мм беа почести во групата на пациентки со позитивна експресија за ЕрСам (67,39% vs 55,55%). Просечната големина на туморите со експресија на ЕрСам беше $28,37 \pm 13,9$ милиметри, наспроти $25,52 \pm 13,8$ милиметри во групата без експресија за овој маркер.

Табела 44. Експресија на ЕрСам во однос на возраста и големината на туморот

Варијабла		вкупно n (%)	ЕрСам		p value
			Н (n=27)	П (n=46)	
Возраст	≤ 50	23 (31,51)	7 (25,93)	16 (34,78)	^a p=0,43
	> 50	50 (68,49)	20 (74,07)	30 (65,22)	
	mean ± SD (min-max)		$58,44 \pm 10,8$ (41 – 82)	$59,72 \pm 11,3$ (44 – 86)	^c p=0,64
Големина на тумор (мм)	≤ 20	24 (32,88)	11 (40,74)	13 (28,26)	^b p=0,58
	20 - 50	46 (63,01)	15 (55,55)	31 (67,39)	
	> 50	3 (4,11)	1 (3,71)	2 (4,35)	
	mean ± SD (min-max)		$25,52 \pm 13,8$ (8 – 75)	$28,37 \pm 13,9$ (5 – 70)	^c p=0,39

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test), ^cp (Student t-test)

Во табела 45 е прикажана експресијата на ЕрСам во однос на хистопатолошките параметри.

Експресијата на ЕрСам клеточниот маркер не беше значајно асоцирана со хистолошкиот градус ($p=0,41$), со нуклеарниот градус ($p=0,43$), со туморскиот статус ($p=0,64$), со лимфонодалниот статус ($p=0,91$) и со постоперативниот стадиум на болеста ($p=0,75$).

Иако статистички незначајно, ЕрСам позитивните тумори почесто од ЕрСам негативните тумори беа лошо диференцирани (73,91% vs 62,96%) и со висок нуклеарен градус (80,43% vs 74,07%), но поретко имаа метастази во аксиларните лимфни жлезди (58,7% vs 66,67%) и поретко беа дијагностицирани во III стадиум на болеста (32,61% vs 40,74%).

Табела 45. Дистрибуција на пациентите во однос на хистопатолошките параметри и експресијата на ЕрСам

варијабла		вкупно n (%)	ЕрСам		p value
			Н (n=27)	П (n=46)	
G	1	3 (4,11)	2 (7,41)	1 (2,17)	^b p=0,41
	2	19 (26,03)	8 (29,63)	11 (23,91)	
	3	51 (69,86)	17 (62,96)	34 (73,91)	
NG	1	1 (1,37)	1 (3,7)	0	^b p=0,43
	2	15 (20,55)	6 (22,22)	9 (19,57)	
	3	57 (78,08)	20 (74,07)	37 (80,43)	
pT	1	24 (32,88)	11 (40,74)	13 (28,26)	^b p=0,64
	2	42 (57,53)	14 (51,85)	28 (60,87)	
	3	2 (2,74)	0	2 (4,35)	
	4	5 (6,85)	2 (7,41)	3 (6,52)	
pN	0	28 (38,36)	9 (33,33)	19 (41,3)	^b p=0,91
	1	21 (28,77)	8 (29,63)	13 (28,26)	
	2	12 (16,44)	5 (18,52)	7 (15,22)	
	3	12 (16,44)	5 (18,52)	7 (15,22)	
Stage	I	16 (21,92)	5 (18,52)	11 (23,91)	^a p=0,75
	II	31 (42,46)	11 (40,74)	20 (43,48)	
	III	26 (35,62)	11 (40,74)	15 (32,61)	

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test)

G- хистолошки градус, NG- нуклеарен градус, pT- туморски статус, pN- лимфонодален статус.

Во табела 46 е прикажана експресијата на ЕрСам во однос на експресијата на биолошките маркери: ER, PR и Ki67.

Статистичката анализа не покажа значајна асоцираност во однос на експресијата на ЕрСам со ER (p=0,19), PR (p=0,19) и Ki67 (p=0,61). Иако статистички незначајно, ЕрСам позитивните тумори почесто од ЕрСам негативните тумори покажаа висока експресија за пролиферативниот маркер Ki67 (65,28% vs 59,26%), но поретко беа ER (80,43% vs 92,59%) и PR (67,39% vs 81,48%) рецептор позитивни.

Табела 46. Експресија на ЕрСам во однос на ER, PR и Ki67

варијабла		вкупно n (%)	ЕрСам		p value
			Н (%)	П (%)	
ER	Н	11 (15,07)	2 (7,41)	9 (19,57)	^b p=0,19
	П	62 (84,93)	25 (92,59)	37 (80,43)	
PR	Н	20 (27,60)	5 (18,52)	15 (32,61)	^a p=0,19
	П	53 (72,40)	22 (81,48)	31 (67,39)	
Ki67	low	27 (36,99)	11 (40,74)	16 (34,72)	^a p=0,61
	high	46 (63,01)	16 (59,26)	30 (65,28)	

^ap (Chi-square test), ^bp (Fisher exact, two tailed test)

ER- естроген рецептор, PR- прогестерон рецептор, Ki 67- маркер на клеточна пролиферација, Н- негативен, П- позитивен

Ниту еден од анализираните прогностички или предиктивни маркери не беше потврдено како значаен фактор за експресија на EpCam во униваријантната анализа.

4.3.6. Експресија на стем клеточните маркери и корелација со молекуларните поттипови на карциноми на дојка

Во табела 47 и на слика 40 е прикажана дистрибуцијата на пациентите во однос на експресијата на стем клеточните маркери и молекуларната класификација.

За вредност на $p=0,13$ не беше потврдена статистички значајна разлика помеѓу молекуларните подгрупи, а во однос на експресијата на CD44. CD44 стем клеточниот маркер покажа различна експресија во различни молекуларни подгрупи: 22,86% од CD44 позитивните тумори беа Luminal A, 60% беа Luminal B, 5,71% беа HER-2 и 11,43% беа Triple negative. CD44 позитивните тумори почесто од CD44 негативните тумори беа Triple negative (11,43% vs 5,26%) и Luminal B (60% vs 39,47%). Triple negative туморите почесто од другите молекуларни поттипови беа CD44 позитивни (66,67% Triple negative vs 40% HER-2, 58,33% Luminal B и 30,77% Luminal A).

За вредност на $p=0,016$ беше потврдена статистички значајна разлика помеѓу молекуларните подгрупи а во однос на експресијата на CD24. Молекуларните поттипови покажаа различна експресија за CD24 стем клеточниот маркер: 7,69% од Luminal A туморите, 41,67% од Luminal B туморите, 20% од HER-2 и 33,33% од Triple negative беа CD24 позитивни. CD24 стем клеточниот маркер покажа различна експресија во различни молекуларни подгрупи: 10% од CD24 позитивните тумори беа Luminal A, 75% беа Luminal B, 5% беа HER-2 и 10% беа Triple negative. CD24 позитивните тумори почесто од CD24 негативните тумори беа класифицирани како Luminal B и Triple negative (75% vs 39,26%, 10% vs 7,55%). Luminal B поттипот почесто од останатите молекуларни поттипови покажа позитивна експресија за CD24 (41,67% vs 33,33% Triple neg, 20% HER-2 и 7,69% Luminal A).

Статистички значајна разлика ($p=0,0001$) беше потврдена помеѓу експресијата на CD133 стем клеточниот маркер, а во однос на молекуларната класификација. CD133 позитивните тумори поретко од CD133 негативните тумори беа класифицирани како Luminal A (9,52% vs 50%), додека почесто беа класифицирани како Triple negative (19,05% vs 1,92%) и HER-2 тумори (23,81% vs 1,92%). Triple negative и HER-2 туморите почесто од останатите молекуларни поттипови беа CD133 позитивни (83% Triple negative и 80% HER-2 vs 27,78% Luminal B и 7,69% Luminal A).

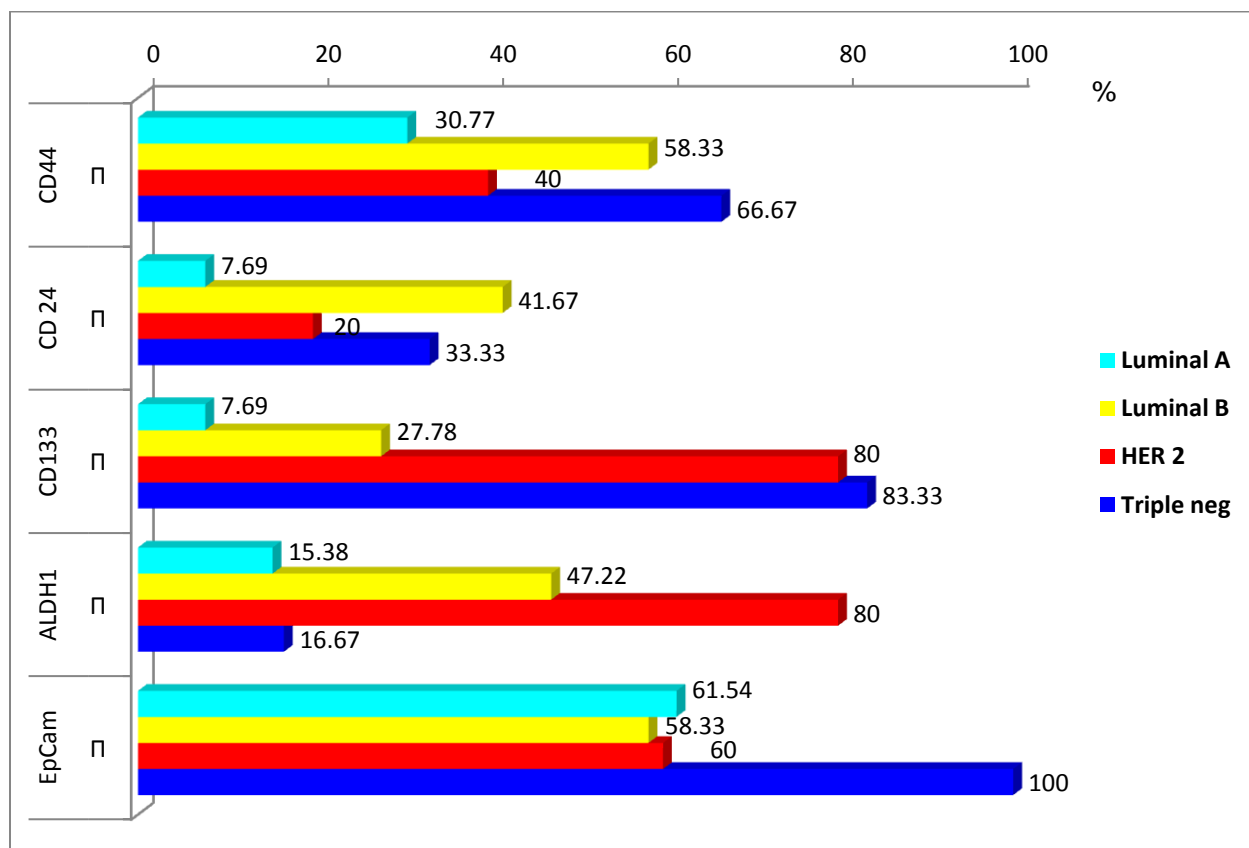
Статистички значајна разлика беше нотирана и помеѓу молекуларните поттипови, а во однос на експресијата на ALDH1A1 ($p=0,006$). HER-2 поттипот почесто од другите поттипови покажа позитивна експресија за ALDH1A1 (80% HER-2 vs 47,22% Luminal B, 16,67% Triple neg и 15,38% Luminal A). Повеќе од 2/3 од HER-2 туморите беа позитивни за ALDH1A1 (4/5, 80%). ALDH1A1 позитивните тумори покажаа различна експресија во молекуларните поттипови: 15,38% од ALDH1A1 позитивните тумори беа Luminal A, 65,38% беа Luminal B, 15,38% беа HER-2 и само 3,86% беа Triple negative. ALDH1A1 позитивните тумори поретко од ALDH1A1 негативните тумори беа Luminal A и Triple negative (15,38% vs 46,81% и 3,85% vs 10,64%, соодветно), а почесто беа HER-2 и Luminal B (15,36% vs 2,13% и 65,38% vs 40,43%, соодветно).

Експресијата на EpCam не беше значајно асоцирана со подгрупите од молекуларната класификација ($p=0,059$). Иако статистички незначајно, EpCam позитивните тумори поретко припаѓаа на Luminal B поттипот, а почесто на Triple negative (13,04% vs 0) молекуларниот поттип. Triple negative туморите почесто од другите поттипови беа EpCam позитивни (100% Triple neg vs 61,54% Luminal A, 60% HER-2 и 58,33% Luminal B).

Табела 47. Дистрибуција на пациентите во однос на експресијата на стем клеточните маркери и молекуларните поттипови

варијабла	вкупно n (%)	Молекуларни поттипови				p value
		Luminal A (n=26)	Luminal B (n=36)	HER 2 (n=5)	Triple neg (n=6)	
CD44	H (n=38)	18 (69,23)	15 (41,67)	3 (60)	2 (33,33)	p=0,13
	П (n=35)	8 (30,77)	21 (58,33)	2 (40)	4 (66,67)	
CD24	H (n=53)	24 (92,31)	21 (58,33)	4 (80)	4 (66,67)	p=0,016
	П (n=20)	2 (7,69)	15 (41,67)	1 (20)	2 (33,33)	
CD133	H (n=52)	24 (92,31)	26 (72,22)	1 (20)	1 (16,67)	p<0,0001
	П (n=21)	2 (7,69)	10 (27,78)	4 (80)	5 (83,33)	
ALDH1A1	H (n=47)	22 (84,62)	19 (52,78)	1 (20)	5 (83,33)	p=0,006
	П (n=26)	4 (15,38)	17 (47,22)	4 (80)	1 (16,67)	
EpCam	H (n=27)	10 (38,46)	15 (41,67)	2 (40)	0	p=0,059
	П (n=46)	16 (61,54)	21 (58,33)	3 (60)	6 (100)	

p(Fisher exact, two tailed test)



Слика 40. Дистрибуција на пациентите во однос на експресијата на стем клеточните маркери и молекуларната класификација

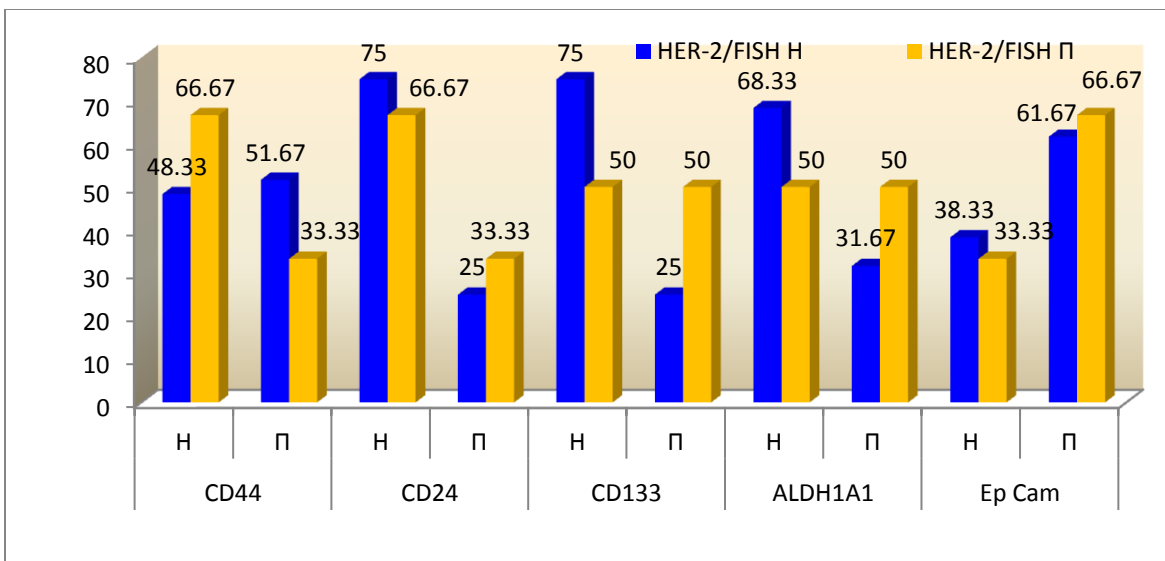
4.4. Корелација на амплификацијата на HER-2 генот со канцерските стем клеточни маркери

Добиените резултати не покажаа сигнификантна корелација во однос на амплификацијата на HER-2 генот и експресијата на стем клеточните маркери CD44 ($p=0,35$), CD24 ($p=0,72$), CD133 ($p=0,09$), ALDH1A1 ($p=0,32$) и EpCam ($p=1,0$), (табела 48 и слика 41). HER-2 позитивните тумори поретко од HER-2 негативните тумори беа CD44 позитивни (33,33% vs 51,67%); но почесто беа CD24 (33,33% vs 25%), CD133 (50% vs 25%) и ALDH1A1 (50% vs 31,67%). EpCam стем клеточниот маркер покажа речиси идентична застапеност во групата со и без амплификација за HER-2 генот (66,67% vs 61,67%), додека CD133 покажа гранична сигнификантност ($p=0.09$) во однос на HER-2.

Табела 48. Дистрибуција на пациентите во однос на HER-2 и канцерските стем клеточни маркери

варијабла		вкупно n (%)	HER-2 /FISH		p value
			Н (n=60)	П (n=12)	
CD44	Н	37 (51,39)	29 (48,33)	8 (66,67)	p=0,35
	П	35 (48,61)	31 (51,67)	4 (33,33)	
CD24	Н	53 (73,61)	45 (75)	8 (66,67)	p=0,72
	П	19 (26,39)	15 (25)	4 (33,33)	
CD133	Н	51 (70,83)	45 (75)	6 (50)	p=0,09
	П	21 (29,17)	15 (25)	6 (50)	
ALDH1A1	Н	47 (65,28)	41 (68,33)	6 (50)	p=0,32
	П	25 (34,72)	19 (31,67)	6 (50)	
EpCam	Н	27 (37,5)	23 (38,33)	4 (33,33)	p=1,0
	П	45 (62,5)	37 (61,67)	8 (66,67)	

p(Fisher exact, two tailed test)



Слика 41. Амплификација на HER-2 во корелација со експресијата на канцерските стем клеточни маркери

5. ДИСКУСИЈА

5.1. ВОВЕДУВАЊЕ И СТАНДАРДИЗАЦИЈА НА ФЛУОРЕСЦЕНТНАТА ИН СИТУ ХИБРИДИЗАЦИЈА, ВЛИЈАНИЕ НА ПРЕДНАЛИТИЧКИТЕ И АНАЛИТИЧКИТЕ ВАРИЈАБЛИ

Флуоресцентната ин ситу хибридизација е молекуларна цитогенетска метода која овозможува детекција на специфични структурни и нумерички хромозомски аберации (амплификации, транслокации, преуредувања, фузии, делеции), во цитолошки примероци или во парафински ткивни примероци (111, 112, 113). Флуоресцентната ин ситу хибридизација е прецизна и сигурна метода во рутинската клиничката дијагностика (114). Поради високата сензитивност и специфичност на FISH-методата, подобрените протоколи на хибридизација, како и брзината со која може да се изведе анализата, FISH-методата обезбеди значителен напредок во истражувањето, дијагнозата и прогнозата на хематолошките неоплазми и солидните тумори преку евалуација на варијабилни аберации, како на пример: детекција на амплификација на HER-2 генот кај карциноми на дојка, амплификација на n- MYC во неуробластоми, преуредување на ALK генот во белодробни карциноми, BCR/ALB1 транслокација во хронична миелоидна леукемија, мапирање на гени или идентификација на нови онкогени или генетски аберации што се вклучени во карциногенезата и може да бидат таргет за специфични терапии (111, 113, 114). Амплификацијата на онкогените е важен фактор во карциногенезата и често корелира со прогресивниот туморски раст и лошата прогноза кај пациентите, поради тоа идентификацијата и карактеризацијата на овие гени е неопходна за евалуација на прогнозата кај пациентите кои се кандидати за таргетирана терапија (114). Еволуцијата на FISH-методата во последниве години доведе до развој на т.н. мултиплекс FISH (m-FISH) техника, која овозможува истовремена визуализација на сите метафазни хромозоми во различни бои како резултат на симултана хибридизација на хромозом специфични проби кои се обележани со различни флуорохроми или со комбинација на флуорохроми (114).

И покрај широката употреба на FISH-методата во развиените земји, таа има ограничена употреба во земјите во развој, пред сè поради ограничените финансиски средства и недостигот на стручен кадар (112).

FISH-методата се базира на комплементарно врзување на флуоресцентно означена ДНК проба со специфична, таргет секвенца. Резултатите се анализираат со флуоресцентен микроскоп сè со цел да се потврди присуството или отсуството на одредена генетска аберација (113). FISH процедурата се состои од пет основни чекори: преттретман, денатурација, хибридизација, детекција на пробата и микроскопска анализа (113). Исходот на FISH-анализата зависи од повеќе параметри во преданалитичката и аналитичката фаза, како што се: времето на ладна исхемија, времето на фиксација, обработката на ткивата, квалитетот на ДНК пробата, достапноста на таргетот за хибридизација (42, 51, 115-118).

Користењето на парафински ткивни примероци за анализа може да биде проблематично, првенствено затоа што фиксацијата со формалин во голема мера влијае на достапноста на таргетот за хибридизација што бара соодветен преттретман на ткивото со оптимизација на протоколите за работа, кои пак зависат од претходната обработка на ткивата (42, 51, 116-117).

Со цел воведување на FISH-методата на Институтот за патологија, Медицински факултет - Скопје, оптимизација на протоколите за работа и утврдување на влијанието на аналитичките фактори врз добиените резултати, иницијално изведовме серија на експерименти на пет репрезентативни, парафински ткивни примероци (со различно време на фиксација и со непознато време на ладна исхемија) од карцином на дојка. Притоа беше анализирано влијанието на преттретманот, дигестијата и постхибридизациското испирање врз ефикасноста и квалитетот на хибридизацијата. Примероците во нашата студија беа анализирани со два различни FISH –протокола за кои користевме идентична ДНК проба (PathVysion™ HER-2 DNA Probe Kit), но различен кит за парафински преттретман (Vysis/Abbott Paraffin Pretreatment Reagent Kit и DAKO Histology FISH Accessory Kit).

Реагенсите за преттретман влијаат врз ефикасноста на хибридизацијата со тоа што овозможуваат полесна пермеабилитација на таргетот, а истовремено ја намалуваат автофлуоресценцијата (42, 119-120). Различното време на инкубација во растворот за преттретман во двата протокола во студијата, не покажа значајно влијание врз добиените резултати, односно немаше значајни разлики во однос на интензитетот на сигналите или присуството на автофлуоресценција. Варијациите во времето на ензимска дигестија покажаа значаен ефект врз процесот на хибридизација, па поради тоа оптимизацијата на овој чекор во процесот на FISH е неопходен за успешна хибридизација. Подолгата инкубација со пепсин доведе до оштетување на јадрената морфологија, што резултираше со намален број на сигнали или во дел од примероците до целосна загуба на сигналите. Пократката ензимска дигестија резултираше со зголемена апсорпција на DAPI, слаби или отсутни сигнали, или присутна автофлуоресценција. Инсуфициентната пермеабилитација води до заробување на пробата помеѓу клетките, што резултира со редукција на сигналите во јадрата (121). Ефикасноста на хибридизацијата е во негативна корелација со јадрената морфологија. Агресивниот преттретман на ткивата кој ја подобрува ефикасноста на хибридизацијата може да доведе до деструкција на јадрата. Спротивно на тоа, послабиот преттретман кој ја штеди јадрената морфологија, може да биде недоволен за пенетрација на пробата и успешност на хибридизацијата (118).

Идеалниот преттретман има за цел демаскирање на целната ДНК со што ќе се овозможи полесна пенетрација на пробата, а истовремено ќе даде добра јадрена морфологија (120). Најдобра пермеабилитација во нашата студија беше постигната при 100-минутна инкубација со Vysis protease buffer во протоколот 1, и 5-минутна инкубација со ладен пепсин (DAKO), во протоколот 2. Деструкцијата на јадрената морфологија може да биде резултат и на несоодветна претходна обработка на ткивото или пак да е поврзана со карактеристиките на

анализираниот материјал, што понекогаш бара адаптација на протоколот согласно со индивидуалните карактеристики на ткивата (116, 119).

Протоколите со несоодветно постхибризациско испирање имаат негативен ефект врз FISH-резултатите: отсутни или слаби сигнали, неспецифични сигнали и автофлуоресценција. Поради тоа, самиот протокол понекогаш бара адаптација на температурата или времето на инкубација во врска со типот на ткивото што се анализира, должината на фиксација или староста на парафинските блокови (42, 119). Најдобри резултати во нашата студија беа добиени при 2-минутна инкубација на примероците на температура од 72°C со пуферот за испирање од Abbott и 5-минутна инкубација на 60°C со DAKO пуферот за испирање.

Ткивните примероци што беа обработени со ист протокол во експерименталната фаза дадоа варијабилен квалитет на хибридизација, со различни несакани ефекти врз крајните резултати, што веројатно се должи на варијации во преданалитичката фаза или на карактеристиките на самото ткиво, што го потврдуваат и други автори (116, 119).

Податоците во литературата покажуваат дека стапката на неуспех на FISH-методата е само 5% (122). И покрај тоа што за анализа користевме ткивни примероци со варијабилно време на фиксација и непознато време на ладна исхемија, неуспешна хибридизација имавме во само еден од вкупно 73 анализирани случаи, со стапка на неуспех 1,37%. Високиот процент (98,63%) на успешни тестови во нашата студија, укажува дека FISH-методата е помалку осетлива на процесот на фиксацијата поради стабилноста на хромозомската ДНК на преданалитичката обработка на ткивата, што е потврдено и од други автори (38). Неуспешната хибридизација во анализираната група може да се должи на несоодветна преданалитичка обработка на ткивото.

Недоволната фиксација на ткивата со формалин резултира со алкохолно фиксирање во ткивниот процесор, што на крајот води до неспецифична автофлуоресценција во финалните тестови (42). Од друга страна пак, прекумерната фиксација на ткивата резултира со екстензивно врзување на протеините што бара поагресивен преттретман кој може да ги оштети јадрата и да доведе до губење на сигналите (42, 51, 115-117).

Проблемите што се јавуваат во текот на процедурата за флуоресцентна ин ситу хибридизација (губење на ткивата, автофлуоресценција, лоша ткивна морфологија), најчесто се поврзани со прекумерна (повеќе од 24 часа) или недоволна фиксација и автолиза (118). Khoury и сор. го анализирале влијанието на одложена фиксација врз HER-2 FISH-резултатите и заклучиле дека компромитација во интерпретацијата на резултатите се јавува по само 1 час одложена фиксација на ткивата и истата е статистички значајна по само 2 часа одложена фиксација (118).

Двата протокола во нашата студија покажаа оптимална ефикасност со добар квалитет на сигналите. Употребата на Vysis Pretreatment Kit резултираше со

поголема загуба на ткивните примероци (15%), во текот на ткивниот преттретман (инкубација во раствор за преттретман или во протеаза), во споредба со преттретманот од DAKO каде што немавме ниту еден отпаднат ткивен примерок во текот на процедурата. Chin и сор. (120), покажале поголема загуба на ткивните пресеци (околу 44,5%) при преттретман со NaSCN, во споредба кога користеле пуфер на цитратна киселина за преттретман.

Сигналите што се добиваат со DAKO преттретманот се поуниформни, полесни за интерпретација и имаат поголема репродукцибилност. Во случаи кога имавме слаб зелен сигнал со DAKO преттретманот, употребата на Vysis Pretreatment Kit даде подобри резултати. Времето потребно за преттретман со Vysis Pretreatment Kit е околу 4,5 часа, додека со DAKO преттретманот околу 2,5 часа.

Согласно со препораките во литературата, тестовите не треба да се анализираат во случаи кога има прекумерна заднинска автофлуоресценција која ги маскира сигналите во повеќе од 10% од инвазивните клетки или доколку сигналите се слаби и неуниформни во повеќе од 25% од јадрата, што може да укажува на прекумерна дигестија или неадекватна фиксација (37,46). Сигналите добиени со FISH-анализа избледуваат со тек на времето, па поради тоа се препорачува да се направат репрезентативни фотографии од секој случај, а стаклата да се чуваат на температура од -20°C, во текот на 12 месеци (37).

При користење на конвенционална камера за фотодокументација на FISH-резултатите, сигналите мора да се јасни и со силен интензитет, особено кога се користи повеќе од еден флуорохром, бидејќи комбинираниите филтри дозволуваат помал проток на светлина, па дел од сигналите се губат (119). Овој проблем може се надмине со користење на соодветен софтвер (119).

Во случаи кога контролните тестови не го даваат очекуваниот резултат, кога нуклеарната морфологија е оштетена, кога значителен дел од сигналите се со лош квалитет и тешки за интерпретација, кога повеќе од 10% од сигналите се јавуваат надвор од јадрата, кога автофлуоресценцијата е силна, во тој случај треба да се нагласи дека резултатот не може да се интерпретира и потребно е тестот да се повтори на истиот или на друг примерок или анализата да се повтори со друг алтернативен тест (123).

5.2. КОРЕЛАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИТЕ ЗА HER-2 ДОБИЕНИ СО ИМУНОХИСТОХЕМИСКА И FISH-МЕТОДА

Со оглед на придобивките и несаканите ефекти што пациентите би ги имале од целната терапија, употребата на соодветен тест за проценка на HER-2 статусот е од суштинско значење при селекција на пациентите за третман (38-40). Точното и репродукцибилно одредувања на HER-2 статусот со користење на стандардизирани тестови бара строго придружување кон пропишаните протоколи за работа, строга контрола на квалитетот, како и преземање на активности што ќе

обезбедат квалитет на работа при секојдневно рутинско тестирање на ткивните примероци (35, 124, 125). Имунохистохемијата и FISH-методата се најчесто користени рутински тест-методи во патохистолошките лаборатории. И двете методи имаат свои предности и недостатоци. Во научната јавност сè уште се води дебата за тоа која единствена метода е најдобра за одредување на HER-2 статусот. Според некои автори, употребата на IHC и FISH во комбинација е најефикасна, но финансиски неисплатлива тест-метода (126, 127).

Флуоресцентната *in situ* хибридизација е метода на избор при селекција на пациенти за HER-2 таргетирана терапија во смисла на точност, репродукцибилност и предиктивност (38). Таа обезбедува 96,5% сензитивност и 100% специфичност во детекција на амплификација на HER-2 генот кај пациенти со дијагностициран карцином на дојка (47). Повеќе големи студии кои користеле ткивни примероци со варијабилна фиксација и ткивна обработка покажале поголем успех со FISH отколку со IHC тесирањето (38, 128, 129). Во некои центри FISH-методата е примарна тест-метода за анализа (38, 128, 129). И покрај тоа што имунохистохемијата е релативно евтина метода, брза и лесна за изведување, сепак таа не е оптимален квантитативен тест за проценка на HER-2 статусот, пред сè поради нејзината осетливост на неизбежните варијации во постапките за фиксација и обработка на ткивата, варијациите во протоколите за анализа, варијации во сензитивноста на антителата кои се користат, како и субјективноста во интерпретацијата на резултатите (130, 131). Друг недостаток на IHC е отсуство на внатрешна контрола, што ја доведува во прашање веродостојноста на анализата, особено кога HER-2 IHC резултатите се негативни (38, 131). За разлика од IHC, FISH-методата обезбедува внатрешна контрола во истиот дел од ткивото кое се анализира (38, 131).

Во оваа студија го евалуиравме совпаѓањето помеѓу FISH и имунохистохемиската метода во детекција на HER-2 статусот кај пациенти со инвазивен карцином на дојка користејќи тестови што се одобрени од Управата за храна и лекови на Соединетите Држави (United States Food and Drug Administration – US FDA). Во однос на имунохистохемиската анализа, најголем процент од анализираниите случаи беа дефинирани како негативни 68,05% IHC - 0/1+, 16,67% случаи беа дефинирани како позитивни - IHC 3+ и 15,28% случаи како двојбени - IHC 2+. Во однос на FISH-анализата, 16,67% од случаите покажаа амплификација за HER-2 генот, додека во 83,33% не беше детектирана амплификација за генот. Ниту еден од IHC 0/1+ случаите не покажа амплификација за HER-2 генот. Два случаи од IHC 2+ групата беа FISH позитивни, а два случаи од IHC 3+ групата беа FISH негативни. Процентот на совпаѓање помеѓу имунохистохемиските групи и FISH-методата беше 100%, 83,33% и 18,18% за IHC 0/1+, 3+ и 2+ групите, соодветно. Кога 2+ и 3+ позитивните тумори беа групирани заедно, стапката на совпаѓање помеѓу IHC и FISH беше 84,72%, κ карпа 0,598, ($p < 0,0001$). По исклучувањето на IHC 2+ случаите, стапката на усогласеност се подобри на 96,72%. Според податоците објавени во литературата, совпаѓањето помеѓу IHC и FISH се движи во граници помеѓу 79% и 100% за 3+ случаите (128, 132) и од 12% до 36% за 2+ случаите (133, 134). Couturier и сор.(135) покажале висока усогласеност помеѓу IHC и FISH во 98 од 100 испитувани случаи, со висока стапка

на сензитивност од 92% и специфичност од 99%. Високо ниво на совпаѓање од 92% помеѓу методите потврдиле и Jacobs и сор (136).

Спротивно на нашите резултати, Gokhale и сор. (44) покажале значително совпаѓање помеѓу FISH и IHC во 3+ групите и ниско совпаѓање во 0, 1+ и 2+ групите. И Sui и сор. (137), покажале највисока стапка на совпаѓање од 92,9% во IHC 3+ случаите, а значително пониска (80%) во IHC 0/1+ негативните случаи. Анализата на резултатите во нашата студија покажа највисок процент на совпаѓање од 100% во IHC негативните (0 и 1+) групи, а најниска усогласеност од само 18,18% во IHC 2+ групата, што е во согласност со веќе објавените податоци во литературата (49, 138).

Во студија од 102 случаи, Hammock и сор. (130) покажале дека само 49% од IHC 3+ случаите, 6% од IHC 2+ случаите и 4% од IHC негативните случаи потврдиле амплификација за HER-2 генот со FISH-методата. Ниската стапка на совпаѓање од само 51% помеѓу IHC и FISH-методата, се должела на субјективност во интерпретацијата, анеуплидија за хромозомот 17, како и варијации во техничките аспекти на процесите на обработка на ткивата и изведување на IHC методата. Owens и сор. (139) покажале амплификација на генот во 4,1% од IHC 0 случаите, во 7,4% од IHC 1+ случаите, во 23,3% од IHC 2+ случаите и во 91,7% од IHC 3+ случаите.

Во голема ретроспективна студија за контрола на квалитет, Varga и сор. (140) покажале конзистентност и стабилност на FISH- резултатите во текот на 12 години, за разлика од IHC тестирањето кое покажало значајни варијации во резултатите. Стандардизацијата на протоколите за работа и имплементацијата на препораките од меѓународните водичи за обезбедување на контрола на квалитет, резултирале со значително подобрување на усогласеноста помеѓу методите од 84% на 97%. Слични резултати објавиле и Sarode и сор. (141). Тие покажале значително подобрување на стапката на совпаѓање помеѓу имунохистохемијата и FISH во период од 10 години што се должелo на стандардизација на преданалитичките и аналитичките варијабли, како и стекнатото искуство во интерпретација на HER-2 резултатите. Флуоресцентната ин ситу хибридизациска метода имала поконзистентни резултати во текот на целиот тест-период, што се должи на нејзината поголема објективност и помала афектираност од процесите на фиксација и обработка на ткивата. Вкупната усогласеност помеѓу методите се подобрила од 87,2%, во 2002 до 90%, 10 години подоцна. Највисока била усогласеноста за IHC 0/1+ групите, со константна негативната предиктивна вредност од 95% во текот на целиот тест-период и со просечно ниво на лажно негативни резултати од 1,5%. Сите имунохистохемиски детерминирани негативни (IHC 0/1+) случаи во нашата студија, се потврдија како вистински негативни со FISH-методата.

Yaziji и сор. (122) анализирале туморски примероци од 2963 пациенти и покажале дека совпаѓањето помеѓу имунохистохемијата и FISH било 64,9% кога IHC 2+/3+ позитивните тумори биле групирани заедно, а кога IHC 2+ туморите биле исклучени од групата процентот на совпаѓање се подобрил на 96,1%.

Позитивната предиктивна вредност на позитивните IHC 3+ случаи била 91,6%, а негативната предиктивна вредност за негативните IHC 0/1+ случаи била 97,2%. Сензитивноста на имунохистохемијата во IHC 2+/3+ била 92,6%, а специфичноста на IHC 3+ групата 98,8%

Земајќи го FISH-тестот како златен стандард, позитивната предиктивна вредност на позитивните IHC 3+ случаи во нашата студија беше 83,3%, а негативната предиктивна вредност за негативните IHC 0/1+ случаи беше 100%. Сензитивноста и специфичноста на имунохистохемијата беа анализирани со и без IHC 2+ групата во комбинација на позитивните IHC 3+ случаи. Сензитивноста на имунохистохемијата за IHC 2+/3+ и за IHC 3+ групите беше 100% и 83,3%, соодветно, додека специфичноста за истите групи беше 81,67% и 96,7%.

Според некои автори (122, 138, 141) финансиски најисплатлива тест-анализа за детекција на HER-2 е сите пациенти да се скринираат со имунохистохемиската метода (поради нејзината висока негативна предиктивна вредност), а само случаите кои се имунохистохемиски класифицирани како 2+ и 3+ дополнително да се анализираат со FISH-методата (138). Иако FISH-методата е значително поскапа во однос на имунохистохемијата, сепак FISH-тестот никогаш не ја надминува цената за терапевски третман на пациенти кои не би имале корист од целната терапија, поради лажно позитивниот имунохистохемиски резултат (138). Резултатите од истражувањето, исто така, покажаа дека лажно позитивните, а не лажно негативните имунохистохемиски резултати се поголем проблем при HER-2 тестирањето. Ваквите резултати, земајќи ја при тоа во предвид и високата сензитивност на IHC методата, наведуваат на заклучок дека IHC треба да се користи како иницијален тест за скрининг, а доколку постојат услови IHC 2+ и IHC 3+ случаите да се потврдат со FISH-методата.

Наодот на IHC 3+ случаи во отсуство на генска амплификација, главно се должи на лажно позитивно имунобоење кога се користат нестандардизирани или невалидирани имунохистохемиски методи или пак на присуство на полизомија за хромозомот 17 (142, 143). Полизомијата е дефинирана како присуство на екстра копии од еден или повеќе хромозоми, односно како повеќе од 3 сигнали за CEP17 по јадро (38, 143). Иако полизомијата на хромозомот 17 е алтернативен механизам кој обезбедува зголемување на бројот на копии на HER-2 генот, нејзиниот ефект врз експресијата на HER-2, другите клиничко-патолошки варијабли, прогнозата и одговорот на третман, сè уште се недоволно разјаснети (144). Неколку студии покажале дека полизомијата за хромозомот 17 е одговорна за дискрепанца помеѓу протеинската експресија и генската амплификација и дека овие пациенти имаат слична прогноза како и пациентите без алтерации на HER-2 генот (47, 145). Оваа дискрепанца зависи и од начинот на интерпретација на резултатите, односно дали се користи соодносот HER-2/ CEP17 или пак средниот број на копии за HER-2 по единица клетка (146). Дел од истражувачите потврдуваат дека корекцијата на бројот на копии за хромозомот 17 е од суштинско значење за прецизно дефинирање на HER-2 статусот (38, 146), додека други автори имаат поинаков став (128).

При интерпретацијата на резултатите ние го користевме соодносот HER-2/CEP17 во дефинирање на присуството или отсуството на амплификација за HER-2 генот. Двата IHC 3+ случаи во нашата студија, кои не покажаа амплификација за HER-2 генот, имаа полизомија за хромозом 17. Hammonk и сор. (130) исто така покажале дека IHC 3+ случаите без амплификација за HER-2 генот се резултат на полизомија за хромозом 17. Downey и сор. потврдиле дека прекумерната протеинска експресија без придружна амплификација на генот може да се должи на зголемен број копии на хромозом 17 со последователно зголемување на бројот на копии на HER-2 генот во отсуство на вистинска амплификација за HER-2 (145). Ваквите наоди говорат во прилог на улогата на полизомијата како причина за неусогласеност помеѓу имунохистохемијата и FISH-методата .

Huyn и соработниците (147) покажале значително поголема инциденца на полизомија 17 во IHC 2+/3+ туморите, во споредба со IHC 0/1+ туморите. Исто така, потврдиле дека во отсуство на HER-2 амплификација, зголемен број на CEP17 копии почесто бил асоциран со IHC 2+ туморите и дека зголемениот број на копии на HER-2 генот, последователно на полизомија 17, води до HER-2 прекумерна експресија во дел од IHC 2+/3+ карциномите на дојка, во отсуство на амплификација за генот. Спротивно на ваквите тврдења, Vanden Bempt и соработниците (148) не покажале дека полизомијата 17 води до прекумерна експресија за HER-2 протеинот.

Стапката на несовпаѓање на IHC тестовите со FISH-резултатите во нашата студија може да се должат на присутната полизомија на хромозомот 17 или да се резултат на варијациите во преданалитичката обработка на ткивните примероци.

5.3. АМПЛИФИКАЦИЈА НА HER-2 ГЕНОТ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ

HER-2 е протоонкоген кој во нормални физиолошки услови е неактивен, но во услови на негова активација доведува до појава и развој на карцином на дојка (149). HER-2 генската амплификација и/или протеинската експресија се детектирани во 10%–34% од инвазивните карциноми на дојка, иако повеќето истражувачи информираат дека вистинската позитивна стапка се движи во граници од 15% до 20% (35, 37). Резултатите од нашата студија покажаа амплификација во 16,67% од анализираните примероци. Амплификацијата на HER-2 генот во карциномите на дојка е асоцирана со зголемена клеточна пролиферација, присуство на регионални и далечни метастази, забрзана ангиогенеза и редуцирана апоптоза (35, 151). Во споредба со HER-2 негативните тумори, HER-2 позитивните тумори почесто се умерено или лошо диференцирани, почесто имаат негативен хормонски рецепторски статус, почесто имаат метастази во регионалните лимфни жлезди, почесто имаат висок степен на клеточна пролиферација и p53 мутации (35).

Резултатите од истражувањето не покажаа значајна поврзаност на HER-2 со возраста на пациентките, иако пациентките со HER-2 позитивни тумори почесто

од пациентките со HER-2 негативни тумори беа помлади од 50 години. И други автори (151-153) не покажале значајна поврзаност помеѓу возраста на пациентките и амплификацијата на HER-2 генот. Shokouh и сор. (154) покажале почеста фреквенција на HER-2 позитивните тумори кај пациентки на возраст под 50 години, додека пак Zhou и сор. (155) покажале дека 52,2% од HER-2 позитивните пациентки биле на возраст над 50 години.

Не беше детектирана значајна поврзаност ниту помеѓу амплификација на HER-2 генот со големината на туморите. Повеќе од половина (58,33%) од пациентките со амплификација за HER-2 генот имаа тумори со големина >20мм, а просечната големина на туморите беше помала во однос на пациентките без амплификација за генот. И други автори (151-153) не покажале статистички значајна поврзаност помеѓу големината на туморите и HER-2 статусот. Спротивно на ваквите резултати Bartlett и сор. (156) покажале дека поголема димензија на туморите статистички почесто била асоцирана со зголемена фреквенција на позитивен HER-2 статус за тумори со дијаметар помеѓу 20-50мм и за дијаметар поголем од 50мм.

Иако HER-2 генската амплификација е во позитивна корелација со високиот нуклеарен и хистолошки градус, позитивниот лимфонодален статус и со високиот стадиум на болеста, ниту еден од овие резултати не беше статистички значаен. Статистички значајна корелација беше детектирана само во однос на негативниот естрогенски ($p=0,015$) и прогестеронски рецепторски ($p = 0,016$) статус, како и со висока експресија на маркерот за клеточна пролиферација, Ki67 ($p=0,025$). Ваквите резултати се во корелација со поагресивната слика за HER-2 позитивните тумори.

Во голема студија од 3565 пациенти, Bartlett и сор. (156) покажале сигнификантна корелација на ER и PR-негативните тумори со HER-2 позитивниот статус. Воедно потврдиле дека пациентите со четири или повеќе позитивни жлезди значително почесто биле HER-2 позитивни отколку пациентите со една до три позитивни жлезди и дека лошо диференцираните тумори приближно двојно почесто биле HER-2 позитивни во споредба со умерено диференцираните тумори и речиси 5 пати почесто биле HER-2 позитивни од добро диференцираните тумори.

Ranjwani и сор. (151) покажале значајна позитивна корелација на HER-2 генската амплификација со степенот на хистолошка диференцијација (64,5% од лошо диференцираните тумори биле асоцирани со HER-2 позитивни тумори), како и сигнификантна инверзна корелација со хормонскиот рецепторски статус, но не покажале значајна корелација со лимфонодалниот статус.

Повеќе автори покажале позитивна корелација помеѓу HER-2 позитивните тумори и експресијата на пролиферативниот маркер (141, 153, 154). Спротивно пак на ваквите резултати Zhou P и сор. (155) покажале позитивна корелација на HER-2 со позитивен хормон рецепторски статус.

5.4. МОЛЕКУЛАРНИ ПОТТИПОВИ НА КАРЦИНОМИ НА ДОЈКА

Традиционално, пациентите со инвазивен карцином на дојка се класифицираат во две групи: пациенти со висок и пациенти со низок ризик, дефинирани врз основа на неколку клиничко-патолошки параметри: големина на туморот, степенот на хистолошка диференцијација, лимфонодалниот статус и хормонскиот рецепторски статус (157). Сепак, податоците од литературата покажуваат дека 15% од пациентите со ниско-ризични параметри (големина на тумор <1 см, добро диференцирани тумори, негативни лимфни јазли, ER позитивни) имаат рецидивирачка болест и обично умираат од метастази, додека 15% од пациентите со високоризични параметри (големина на тумор > 5 см, лошо диференцирани тумори, позитивни лимфни јазли, ER негативни) имаат неочекувано поволен клинички исход. Овие пациенти може да бидат несоодветно третирани врз основа на хистопатолошката класификација, па поради тоа се јавува потребата за воведување на нови маркери во рутинската дијагностика кои би довеле до попрецизна класификација на пациентите и воспоставување на попрецизни молекуларни шеми за класификација (157). Голем број трудови покажаа дека новата молекуларна класификација на карциномите на дојка овозможува екстензивна анализа на генската експресија и има важна прогностичка вредност (68).

Користејќи различни тестови за генетска анализа (MammaPrint, Oncotype DX, PAM 50), карциномите на дојка се поделени во четири кохерентни групи (68, 158) кои се поврзани со сличен тераписки протокол и сличен одговор на терапија кај пациентите (159, 160). Употребата на молекуларни тестови за рутинска анализа е ограничена само на мал број лаборатории, пред сè поради технички и финансиски причини. Имунохистохемски базираниот сурогат систем за класификација, кој користи лесно достапни и евтини имунохистохемски тестови за детекција на ER, PR, HER-2 и Ki67, се покажал како веродостојна замена во најголемиот број лаборатории и истиот добро корелира со генската молекуларна класификација (65, 71, 161, 162). Студиите на генска анализа идентификуваат најмалку 4 молекуларни типови: Luminal A, Luminal B, HER-2 и Triple negative, кои покажуваат различна прогресија на болеста, различен одговор на терапијата и различна прогноза кај пациентите.

Luminal A туморите се добро диференцирани, со добра прогноза и добар одговор на ендокрината терапија, во споредба со Luminal B поттипот, кој има повисок хистолошки градус, полоша прогноза и послаб одговор на хормонската терапија (68, 69). HER-2 туморите имаат висок градус, позитивен лимфонодален статус и полоша прогноза. (163) Тројно негативните тумори се лошо диференцирани тумори, со висок Ki67 и се асоцирани со лоша прогноза (72).

Согласно со препораките во литературата, користевме имунохистохемски панел (ER, PR, Ki 67 и HER-2) за дефинирање на молекуларните поттипови: Luminal A (ER+ и/или PR+, HER2-, Ki67/low); Luminal B (ER+ и/или PR+ и HER2+ или ER+ и/или PR+, HER-2- и Ki67/high); HER-2 (ER-, PR- и HER-2+), и Triple negative (ER-, PR-, HER-2-) (60, 65, 66). Во нашата студија најзастапени беа пациентки со молекуларен поттип Luminal B (49,31%), по што следуваа пациентки

со молекуларен поттип Luminal A (35,62%), Triple negative (8,22%) и HER-2 (6,85%) поттип.

Во група од 1134 испитаници (користејќи ги само ER / PR и HER-2), Onitilo и сор. (164) покажале дека 68,9% биле ER/PR+, HER-2-; 10,2% биле ER/PR+, HER-2+; 7,5% биле ER/PR- , HER-2+ и 13,4% биле класифицирани како triple negative. Слично на резултатите од нашата студија и во други студии Luminal B поттипот бил најзастапен во испитуваната група (71, 153, 163, 165, 166). Други автори, Bhargava и сор. (161) и Carey и сор. (167) покажале најчеста фреквенција на Luminal A поттипот во испитуваните групи. Ваквата дискрепанца во дел може да се објасни со тоа што претходно пролиферативниот маркер не бил вклучен во дефинирање на молекуларните поттипови и туморите со висок пролиферативен индекс биле класифицирани како Luminal A поттип.

Тројно негативните карциноми обично се дијагностицирани кај помлади особи, на возраст под 40-50 години, со инциденца која се движи во граници помеѓу 10-24% (168).

Молекуларните поттипови во нашата студија не покажаа статистички значајна корелација со возраста на пациентките и големината на туморите, додека статистички сигнификантна разлика беше потврдена во однос на степенот на хистолошката диференцијација ($p < 0,0001$), нуклеарниот градус ($p < 0,0001$), лимфонодалниот статус ($p = 0,003$), стадиумот на болеста ($p < 0,0001$) и експресијата на пролиферативниот маркер Ki67 ($p < 0,0001$).

Во група од 5809 пациенти со дијагностициран дуктален инвазивен карцином на дојка, Хуе и сор. (163), ретроспективно ги анализирале клиничко-патолошките карактеристики на молекуларните поттипови во корелација со стапката на преживување. Триесет и еден процент од туморите во нивната студија биле Luminal A, 43,4% биле Luminal B (Luminal B /high Ki- 67 и Luminal B HER2/neu+), 9,0% биле HER2 и 16,5% биле Triple negative. Најниска средна возраст (43 години) имале пациентките со Luminal B поттип, додека највисока средна возраст (51 година) имале пациентките со Luminal A поттип. Luminal B поттипот бил најчесто застапен кај пациентките под 35 години и 35-69 години, додека Luminal A поттипот бил најзастапен на возраст над 70 години. Најголем процент од тумори со дијаметар поголем од 50мм бил забележан во HER-2 и Luminal B поттипот. Најголем процент од пациентките со негативен лимфонодален статус имале тумори со Luminal A (57,6%) и Triple negative (53,6%) поттип; Triple negative и HER-2 имале највисок хистолошки градус (G3), додека Luminal B и HER-2 поттиповите биле најзастапени во III стадиум на болеста. Слично на нивните резултати и во нашата студија Luminal B (49,31%) поттипот беше најзастапен; најголем просечен дијаметар на туморот покажаа пациентки со Luminal B поттип; Triple negative туморите почесто од останатите имаа негативен лимфонодален статус; Luminal B (50%) и HER-2 (60%) поттиповите најчесто беа во III стадиум на болеста и сите HER-2 и Triple negative тумори во нашата група беа лошо диференцирани.

Спротивно на резултатите на Хуе и сор. (163), најниска просечна возраст ($55,6 \pm 5,9$ години), во нашата серија беше детектирана во HER-2 поттипот, а највисока ($62,17 \pm 11,9$ години) во Triple negative поттипот. Luminal A поттипот беше најчесто застапен кај пациентки ≤ 50 години, додека Triple negative и Luminal B поттипот на возраст над 50 години. Ваквите резултати може да се должат и на разликите во возрастната група на пациентките во испитуваната група, имено повеќе од 2/3 од пациентките во нашата студија беа на возраст над 50 години, со средна возраст $59,25 \pm 11,02$ години, за разлика од испитуваната група на Хуе и соработниците каде што најмалата средна возраст на пациентките била $43,0 \pm 9,7$, како и во однос на поделбата на пациентки во различни возрастни групи.

Пациентките со Luminal A молекуларен поттип значително поретко ($p < 0,0001$) од останатите поттипови беа лошо диференцирани и со висок нуклеарен градус; почесто од останатите имаа ≤ 3 позитивни лимфни жлезди и ниска експресија на Ki67 што се карактеристики на помалку агресивни тумори кои имаат добра прогноза. Пациентките со Luminal B и HER-2 молекуларен поттип во нашата група, почесто од останатите имаа поголеми тумори, со позитивен лимфонодален статус, дијагностицирани во III стадиум на болеста. Сагеу и сор. (167) исто така потврдиле почесто присуство на метастази во лимфните жлезди во HER-2 и Luminal B поттиповите. Сите Triple negative и HER-2 тумори во нашата студија беа лошо диференцирани, со висок нуклеарен градус и висок пролиферативен индекс, што говори за тумори со поагресивни биолошки карактеристики. Ваквите наоди се во согласност со веќе објавените резултати во литературата (71, 167, 169). Пациентките со Triple negative тумори најчесто имаа помали тумори, со негативен лимфонодален статус, дијагностицирани во I стадиум на болеста. Контрадикторно на ваквите резултати, Qiao и соработниците (170) покажале дека Luminal A поттипот најчесто се тумори без метастази во регионалните лимфни жлезди, додека (167, 169) слично како и резултатите од нашата студија, потврдиле пониска инциденца на позитивен лимфонодален статус во Triple negative туморите, што веројатно се должи на склоноста за хематогено ширење на овие тумори.

5.5. ЕКСПРЕСИЈА НА СТЕМ КЛЕТОЧНИТЕ МАРКЕРИ И КОРЕЛАЦИЈА СО КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИТЕ ПАРАМЕТРИ КАЈ КАРЦИНОМИ НА ДОЈКА

Канцерските стем клетки се актуелна тема од моментот кога оваа фундаментална теорија беше изнесена во научната јавност. Екстензивните истражувања во оваа област потврдуваат дека малигните неоплазми се хиерархиски организирани и се сочинети од туморски клетки кои ја сочинуваат најголемата туморска маса и канцерски стем клетки кои се ретка популација на клетки во солидните тумори. КСК, како и нормалните стем клетки, имаат капацитет за самообновување, диференцијација, како и капацитет за иницијација и пропација на тумори (171-174). Теоријата за КСК доведе до нови насоки и перспективи во туморската патологија кои резултираа со преиспитување на причините на туморска иницијација и терапевска резистентност, но исто така обезбедија нови идеи за дијагноза и третман на пациентите со малигни

заболувања. Според моделот на КСК, карциномите потекнуваат од адултни стем или прогенитор клетки кои се малигно трансформирани како резултат на нарушена регулација на нормалните, строго контролирани програми за самообновување. Ова води до клонална експанзија на матичните/прогенитор клетки кои подлежат на дополнителни генетски или епигенетски промени што на крај ќе резултира со нивна комплетна трансформација (74).

Истражувањата покажуваат дека нарушената регулација на Notch, Wnt/ β -catenin или Hedgehog сигналните патишта може да придонесе за туморогениот потенцијал на КСК (173, 175-178). Феноменот на епително-мезенхимална транзиција и мезенхимално-епителната транзиција во карциномите на дојка во текот на туморската прогресија се исто така важни откритија кои ја објаснуваат способноста на КСК за инвазија и метастазирање (179).

Канцерските стем клетки може да се дискриминираат од другите туморски клетки преку идентификација на специфични молекуларни маркери експресирани на површината на клетките. Кај карциномите на дојка откриени се неколку површни маркери за кои е докажано дека маркираат клеточна популација која има карактеристики на стем клетки: CD24, CD44, CD133 и ALDH1 (84, 87-91, 173). Идентификацијата на нормалните и малигните стем / прогенитор клетки со ист маркер го поддржува концептот дека матичните и прогенитор клетките се примарна цел за малигна трансформација, на тој начин давајќи дополнителна поддршка на хипотезата за канцерските стем клетки.

Неколку автори ја анализирале имунохистохемиската експресијата на стем клеточните маркери во бенигни и малигни ткива од дојка со цел да ја дефинираат нивната улога и влијание во предвидувањето на развојот на карциноми. Kupju и сор. (180) покажале дека ALDH1 е експресиран во епителни и стромални клетки од ткиво на дојка и дека позитивната експресија за овој маркер во епителните и стромалните клетки е поврзана со зголемен ризик за развој на карцином на дојка. Тие, исто така покажале дека проширувањето на популацијата на ALDH1 позитивните стромални клетки надвор од перилобуларната строма е асоцирано со развој на карциноми, што ја поддржува улогата на микросредината во процесот на карциногенеза. Park и сор. (181) покажале пониска експресија на CD44 во инвазивните и микроинвазивните карциноми на дојка во споредба со ин ситу дукталниот карцином сугерирајќи дека бројот на CD44+ клетки се намалува со прогресија на туморот. Guan и сор. (182) ја евалуирале експресијата на ALDH1 во цитоплазмата на дуктални инвазивни карциноми на дојка (Invasive duct carcinoma - IDC), атипична дуктална хиперплазија (Atypical duct hyperplasia - ADH) и обична дуктална хиперплазија (Usual duct hyperplasia - UDH) и покажале негативен тренд на експресијата на овој маркер во IDC во однос на ADH и UDH (35% vs 64%, и 80%, соодветно, $p < 0,05$), што укажува на можната улога на ALDH1 во процесот на еволуција на хиперплазија во карцином на дојка. DA Cruz Paula и сор. (183), ја анализирале експресијата на ALDH1 и CD44 во примероци од малигно и бенигно ткиво на дојка. Експресија на ALDH1 била детектирана во 85,4%, а на CD44 во 90,3% од случаите, со хомогена дистрибуција помеѓу анализираниите групи. Процентот на позитивни клетки за овие маркери бил повисок во примероците со

ин ситу карцином, ALDH1 (91,2%) и CD44 (94,8%), додека во примероците со бенигно ткиво биле ALDH1 87,5% и CD44 81,1%, а во примероците со инвазивен карцином биле ALDH1 81,5% и CD44 80,9%. Други автори покажале дека експресијата на ALDH1 почесто била детектирана во малигни тумори, во споредба со параканцерозни лезии или фиброаденоми (93). Charafe-Jauffret и сор. покажале дека клетките со КСК-фенотип дефинирани со ALDH1 имале поголема способност за метастатско однесување ин витро (атхезија, формирање на колонии, миграција и инвазија) и формирање на метастази ин vivo, поддржувајќи ја теоријата дека КСК може да дејствуваат како тумор иницирачки клетки (184).

Повеќето тераписки модалитети што се користат за третман на пациентите со малигни заболувања, не успеваат целосно да ги елиминираат КСК, што доведува до појава на рецидиви и прогресија на болеста. Поради тоа, селективното таргетирање на КСК со моноклонални антитела претставува нова терапевтска стратегија против карциномите. Употребата на моноклонални антитела насочени против специфични КСК-протеини, довело до редукција на туморското ткиво во експериментални глувци, а некои од нив покажале антитуморна активност и во клинички услови (185).

5.5.1. Експресија на CD44 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка

CD44 е трансмембрански гликопротеински рецептор кој се врзува за екстрацелуларниот гликозаминогликан хијалурон. Овој протеин, познат уште како атхезивна клеточна молекула, е вклучен во процесите на клеточна атхезија, миграција и инвазија кои се битни за прогресија на туморите (186).

Неколку автори, кои ја анализирале имунохистохемиската експресија на CD44, покажале негова експресија во епителните, миоепителните и стромалните клетки во бенигното и во малигното ткиво од дојката (109, 181, 183). Слични резултати покажаа и нашите анализи. Имено, во контролната група, CD44 стем клеточниот маркер покажа циркумференцијален мембрански позитивитет во луминалните и миоепителните клетки во бенигното ткиво од дојката, додека во испитуваната група CD44 покажа варијабилен мембрански позитивитет во епителните туморски клетки или поретко во стромалните клетки.

Податоците во литературата покажуваат дека експресијата на CD44 во инвазивни карциноми на дојка се движи во граници помеѓу 32%-90,3% (181, 183, 187). Објавените разлики во однос на инциденцата на CD44 може да се должат на варијации во начинот на интерпретација на резултатите и различните гранични вредности што се користат за дискриминација на CD44 позитивните од CD44 негативните тумори. Резултатите од нашата студија покажаа експресија во 47,94% од анализираниите тумори. Не беше детектирана значајна поврзаност помеѓу експресијата на CD44 со клиничко-патолошките параметри и биолошките маркери. Иако статистички незначајни, присутните процентуални разлики покажаа тренд на позитивна експресија на CD44 клеточниот маркер со поагресивни хистолошки

карактеристики на туморите: висок хистолошки и нуклеарен градус, позитивен лимфонодален статус, повисок стадиум на болеста и негативен хормонски рецепторски статус. Статистички значајна асоцираност ($p=0,016$) беше нотирана само во однос на високата експресија на пролиферативниот маркер Ki67.

Во студијата на de Веса и сор. (91), CD44 стем клеточниот маркер бил експресиран во 78,2% (68/87) од случаите со дијагностициран специјален хистолошки тип на карцином на дојка, особено во тубуларниот и медуларниот тип и истиот не бил асоциран со анализираниите клиничко-патолошките параметри. Jang и сор. (186), исто така, не покажале значајна асоцираност на CD44 со возраста на пациентите, големината на туморот, лимфонодалниот статус, стадиумот на болеста и хормонскиот рецепторски статус. Нивните резултати потврдиле сигнификантна корелација само со негативен HER-2 статус. Da Cruz Paula и сор. (183) не покажале значајна разлика помеѓу експресијата на CD44 и хормонскиот рецепторски статус.

Повеќето автори користат комбинација на повеќе стем клеточни маркери во дефинирање на клеточна популација која најблиску би ги отсликувала туморските клетки со карактеристики на стем клетки. CD44 и CD24 е најчесто користена и најпроучувана комбинација на стем клеточните маркери. Пионерската студија на Al-Hajj и сор. покажа дека се потребни само 100 клетки со CD44+/CD24- фенотип кај пациентите со карцином на дојка за да формираат тумори кај имунодефициентните глувци, во споредба со десетици илјади клетки со алтернативни фенотипови кои не успеале да иницираат тумор (82).

Abraham и сор. не била покажана значајна корелација помеѓу преваленцата на овој фенотип со прогресијата на туморот, појавата на рецидиви и преживувањето на пациентите (190). Bernardi и сор. (189) ја евалуирале експресијата на CD44 и CD24 во 95 случаи со инвазивен карцином на дојка, а во зависност од експресијата на овие маркери, анализираниите случаи дополнително биле поделени во 4 фенотипови, со следнава дистрибуција: CD44+/CD24- (8,4%), CD44+/CD24+ (45,3%), CD44-/CD24- (6,3%) и CD44-/CD24+ (16,8%). CD44 бил експресиран во 57,9% од случаите и истиот не бил асоциран со ER, PR, Ki67 и со клиничко-патолошките карактеристики, освен детектирана гранична поврзаност со туморскиот градус ($p=0,08$). Значајна разлика не била детектирана ниту во однос на вкупното преживување или преживувањето без болест. Нивните резултати не покажале значајна корелација помеѓу различните фенотипови со клиничко-патолошките параметри: pTNM стадиум, статусот на лимфните жлезди, SK7, SK5, SK18, експресијата на claudin-7. Маргинална асоцијација ($p = 0,08$) била нотирана само во однос на високиот процент на двојно позитивните случаи со висок нуклеарен градус и позитивна фреквенција на Ki-67 со CD44-/ CD24+ тумори ($p=0,06$). Највисоката фреквенција на метастази била поврзана со CD44+/ CD24+ фенотипот (82,4%), во однос на другите фенотипови: CD44-/ CD24+ (11,8%), CD44-/ CD24- (5,9%) и CD44+/ CD24- (0%).

Униваријантната анализа во нашата студија, како сигнификантен предиктивен фактор за експресија на CD44 го потврди само маркерот на клеточна пролиферација Ki67 ($p=0,019$). Имено, пациентките со висока експресија на Ki67

имаат за 3,375 (95,0% CI 1,225 – 9,297) пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD44 стем клеточниот маркер во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67. Camerlingo и сор. покажале статистички сигнификантна поврзаност помеѓу CD44+/CD24-/low фенотипот и туморите со висок градус, кои се негативни за хормонските рецептори, но се позитивни за висок Ki-67, укажувајќи на поврзаноста на експресијата на CD44+ туморите со агресивни клиничко-патолошки карактеристики (191).

5.5.2. Експресија на CD24 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка

CD24 е гликолизирана, мала, протеинска молекула, локализирана на површината на клетките во голем број на карциноми, која има значајна улога во меѓуклеточните интеракции, како и во интеракциите помеѓу клетките и матриксот (192). Варијабилната гликолизација на CD24 придонесува за различни функции во различни клетки, вклучувајќи ги и туморските клетки, од кои дел сè уште се неразјаснети. CD24 е силно експресиран во карциномите на овариум, дојка, простата, мочен меур, бубрег и има улога во процесот на метастазирање (192). Поврзаноста на CD24 со процесот на метастазирање ја зголемува неговата важност како прогностички и КСК маркер.

Во контролната група, CD24 покажа доминантно апикален, луминален позитивитет во епителните клетки на дуктусите или терминалните дуктално-лобуларни единици. Во испитуваната група, CD24 покажа доминантен мембрански или мембрано-цитоплазматски и поретко апикален, луминален, позитивитет во туморските клетки и истиот беше експресиран во 27,4% од анализираниите случаи. Податоците од литературата детерминираат варијабилна експресија на CD24 во анализираниите групи. Ricardo и сор. (187), покажале експресија во 11,4% од карциномите, Park и сор. (181) во 28%, додека Kristiansen и сор. (193) во 84,6% од карциномите (мембрански позитивитет во 55,7% и цитоплазматски во 76,1%). Идентично на нашите резултати, Park и сор. (181) покажале два различни типа на експресија на CD24 во примероците од туморско ткиво: апикален мембрански позитивитет и циркумференцијален мембрано-цитоплазматски позитивитет.

Резултатите од истражувањето не покажаа значајна асоцираност помеѓу експресијата на CD24 со возраста на пациентките ($p=0,46$), големината на туморот ($p=0,81$), хистолошкиот градус ($p=0,11$), туморскиот статус ($p=0,81$), со лимфонодалниот статус ($p=0,98$), со стадиумот на болеста ($p=0,53$), со естрогенскиот ($p<1,0$) и прогестеронскиот ($p=0,78$) рецепторски статус. Статистички значајна поврзаност беше забележана само во однос на високиот нуклеарен градус ($p=0,002$) и високата експресија на Ki67 ($p=0,003$). И други автори не покажале значајна поврзаност помеѓу експресијата на CD24 со хистопатолошките карактеристики на туморите (106, 184, 185).

De Vesa и сор. (91) покажале значајна поврзаност помеѓу експресијата на CD24 со лошо диференцирани тумори ($p=0,011$), со негативен ER статус ($p=0,009$)

и прекумерна експресија на HER-2 ($p=0,005$). Спротивно на ваквите резултати, Kristiansen и сор. (193) не нашле значајна поврзаност на CD24 со возраста на пациентите, типот и големина на туморите, со хистолошкиот градус, со експресијата на ER, PR и HER-2. Сигнификантна корелација била потврдена само во однос на позитивниот лимфонодален статус и со периодот на преживување без болест.

Во голема студија која опфаќа 16 публикации и 5697 случаи со карцином на дојка, Wang и сор. ја анализирале поврзаноста помеѓу експресијата на CD24 и CD44 стем клеточните маркери со прогностичките параметри во карциноми на дојка (194). Нивната анализа покажала дека зголемената експресија на CD24 е сигнификантно асоцирана со високиот хистолошки градус ($OR = 1,52$; 95% CI 1,12-2,06, $p = 0,007$) и со високиот стадиум на болест ($OR = 1.74$; 95% CI 1,27-2,40, $p < 0,001$), но не и со големината на туморот или лимфонодалниот статус. Сигнификантна корелација била нотирана и во однос на пократкото преживување ($HR = 1,48$; 95% CI 1,21-1,80, $p < 0,001$) и преживувањето без болест ($HR 1,45$, 95% CI 1,19-1,76, $p < 0,001$), додека ваква поврзаност не била детектирана кога анализите биле ограничени само на CD44 и CD44+/CD24- фенотиповите. Воедно, покажале дека CD24 е независен лош прогностички фактор кај пациентите со карцином на дојка, на тој начин поддржувајќи ја неговата улога во процесот на карциногенеза.

Логистичката регресивна анализа како сигнификантен предиктивен фактор за експресија на CD24 стем клеточниот маркер го потврди само пролиферативниот маркер Ki67 ($p=0,009$). Имено, пациентките со висока експресија на Ki67 во туморското ткиво имаат за 8,036 (95,0% CI 1,693 – 38,135) пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD24 во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67. Collina и сор. (87), исто така, покажале силна асоцијација помеѓу експресијата на CD24 и пролиферативниот маркер во Triple negative карциномите на дојка.

Bernardi и сор. (189) покажале значајна позитивна корелација помеѓу експресијата на CD24 со експресијата на ER ($P=0,05$), PR ($P=0,02$) и висок Ki-67 ($P=0,01$). Воедно потврдиле почеста појава на метастази кај пациентите со CD24+ фенотиповите (CD44+/CD24+ и CD44-/CD24+). Shipitsin и сор. покажале дека CD24+ и CD44+ клетките во карциноми на дојка претставуваат дефинирани клеточни популации со различен генетски профили, дека CD24+ клетките се подиференцирани, додека CD44+ туморските клетки покажуваат повеќе progenitor-like карактеристики (188). Парадоксално на ваквите наоди, тие покажале зголемена експресија на CD24+ туморски клетки во далечните метастази, што би можело да се објасни со промена на фенотипот на туморските клетки во текот на процесот на метастазирање.

5.5.3. Експресија на CD133 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка

CD133, познат како prominin-1, е трансмембрански гликопротеин со молекуларна тежина од 120 kDa, локализиран во испакнувања (протрузии) на плазма мембраната. CD133 иницијално бил дефиниран како маркер за хематопоетски стем клетки. Биолошките функции на CD133 вклучуваат туморска иницијација, клеточна миграција, васкулогена мимикрија и резистентност на лекови (195). Клетките со ниска експресија на CD133 имаат пониска стапка на пролиферација и намалена брзина на миграција, што укажува на подиференциран фенотип, додека пак туморските клетки со висока експресија на CD133 покажуваат повисока способност за инвазија, како и зголемена експресија на протеини кои се вклучени во процесот на метастазирање и резистентност на лекови кај пациентите со карцином на дојка (185).

CD133 се смета за важен биомаркер во карциномите на дојка, бидејќи тој корелира со големината на туморот, присуството на метастази и клиничкиот стадиум кај пациентите (185). Нивото на експресија на CD133 пред неoadјувантна хемотерапија е важен маркер во предвидување на ефективност од терапијата и појавата на рецидиви после хемотерапијата (185).

Во контролната група, CD133 покажа мембрански позитивитет со доминантна апикална ориентација во епителните клетки на дуктусите или ТДЛЕ. Во испитуваната група, CD133, исто така, покажа апикален луминален мембрански позитивитет во епителните туморски клетки. CD133 беше експресиран во 28,77% од карциномите во нашата студија. Експресијата на CD133 стем клеточниот маркер не покажа сигнификантна поврзаност со степенот на туморска диференцијација ($p=0,44$), со нуклеарниот градус ($p=0,36$), со туморскиот статус ($p=0,75$) и со лимфонодалниот статус ($p=0,16$). Иако статистички незначајна, експресијата на CD133 позитивно корелираше со лошо диференцирани тумори, со висок нуклеарен градус, со позитивен лимфонодален и HER-2 статус, параметри кои се одлика на тумори со агресивен фенотип. Статистички сигнификантна корелација беше потврдена со високиот стадиум на болеста ($p=0,048$), со негативната експресија за естрогенскиот ($p<0,001$) и прогестеронскиот рецептор ($p<0,001$), како и со високите вредности за Ki67 ($p=0,002$), што, исто така, се карактеристика на биолошки агресивни карциноми на дојка.

Според податоците во литературата, експресијата на CD133 во инвазивните карциноми на дојка се движи во граници помеѓу 25 и 74,4% (94, 195-197). Kim и сор. (198) покажале сигнификантна корелација на CD133 со големината на туморот, присуството на метастази во лимфни жлезди, стадиумот на болеста, со експресијата на HER-2, со инверзната експресија на хормонските рецептори, со Triple negative карциномите и со стапката на рецидиви. Во студија со 67 Triple negative карциноми, Zhao и сор. (199) покажале дека CD133 корелира со големината на туморите, лимфонодалниот статус и стадиумот на болеста и е силно асоциран со вкупното преживување и преживувањето без болест. Статистички значајна разлика не била потврдена во однос на возраста на

пациентите и туморскиот градус. Спротивно на ваквите резултати, Ieni и сор. (200) покажале дека CD133 е независен прогностички фактор за пациентите со негативен лимфонодален статус, но без значајна корелација со клиничко-патолошките параметри.

Карисуоглу и сор. (105) покажале инверзна корелација на експресијата на CD133 со големината на туморите и стадиумот на болеста, додека Nadal и сор. (201) покажале висок процент на CK⁺/CD133⁺ циркулирачки туморски клетки во тумори со низок Ki67 и отсутна амплификација на HER-2 генот. Тие не покажале значајна корелација со возраста на пациентите, типот на туморите, големината на туморот, лимфо-нодалниот статус, хистолошкиот градус, хормонскиот рецепторски статус и вредноста за p53 статусот. Martin и сор. (89) потврдиле позитивна корелација со степенот на диференцијација, TNM-стадиумот и лоша прогноза кај пациентите, додека Mansour и сор. (196) дополнително покажале значајна корелација и со возраста на пациентите, но не и со туморскиот градус.

Во голем труд, кој опфаќа 13 студии и 1734 пациенти, Li и сор. (178) покажале сигнификантна поврзаност помеѓу експресијата на CD133 и позитивниот хормонски рецепторски статус, HER-2 статусот, присуството на метастази во лимфните жлезди и со туморскиот градус, но без значајна поврзаност со возраста на пациентите и со големината на туморите. Метаанализата на Han и сор. (202), која опфаќа 11 студии и 1447 пациенти, покажала значајна корелација помеѓу експресијата на CD133 со високиот туморски градус (OR=1,82, 95% CI=1,4-2,36, P<0,001), присуството на лимфо-нодални метастази (OR=2,21, 95% CI=1,75-2,79, P<0,001), со негативниот PR статус (OR=0,62, 95% CI=0,47-0,81, P=0,001), негативниот ER статус (OR=0.4, 95% CI=0.19-0.86, P=0.018), со напреднатиот TNM стадиум (OR=2.74, 95% CI=2,05-3,66, P<0,001) и со позитивниот HER-2 статус (OR=2,00, 95% CI=1,04-3,85, P=0,039). Тие, исто така, покажале негативна корелација со вкупното преживување кај пациентите (HR=2,04, 95% CI=1,32-3,14, P<0,001). Добиените резултати довеле до заклучок дека CD133 би можел да биде ефективен маркер за дијагноза, но и важен прогностички маркер кај пациентите со карциноми на дојка.

Улогата на CD133 како прогностички маркер кај пациентите со инвазивен карцином на дојка е контроверзна. Kim и сор. (198) сугерираат дека високата експресија на CD133 е поврзана со вкупното преживување и преживувањето без болест. Спротивно на ваквите тврдења, Currie и сор. (94) не покажале сигнификантна разлика во преживувањето кај пациентите со висока и ниска експресија на CD133. Високата експресија на CD133 е лош прогностички маркер и потенцијален терапевтски таргет кај пациентите со карцином на дојка (178).

Униваријантната анализа како сигнификантни предиктивни фактори за експресија на CD133 стем клеточниот маркер ги потврди: постоперативниот стадиум (p=0,017), естрогенскиот рецептор (p=0,001), прогестеронскиот рецептор (p=0,001) и маркерот за клеточна пролиферација Ki67 (p=0,006). Имено, пациентките во III постоперативен стадиум и со висока експресија на Ki67 имаат за 3,619 (95,0% CI 1,255 – 10,44) пати, односно за 8,796 (95,0% CI 1,857 – 41,662)

пати поголема веројатност за позитивна експресија на CD133. Пациентките со позитивна експресија на ER и PR во туморското ткиво имаа за 0,053 (95.0% CI 0,01 – 0,28), односно за 0,136 (95,0% CI 0,043 – 0,429) пати помала шанса за позитивна експресија на CD133 стем клеточниот маркер. Мултиваријантната анализа, пак како независен сигнификантен фактор за предикција на експресијата на CD133 го потврди само постоперативниот стадиум на болеста ($p=0,021$).

Kim и сор. (198) покажале дека експресијата на CD133, големината на туморот, лимфонодалниот статус и стадиумот на болеста се независни прогностички фактори за преживување без болест (DFS), во униваријатната анализа, а само стадиумот на болеста ($p < 0,001$) е независен прогностички фактор за DFS во мултиваријантната анализа.

Резултатите од нашата студија покажаа дека инвазивните карциноми на дојка со позитивна експресија на CD133, имаат биолошки агресивен фенотип и овој маркер може да се користи како прогностички фактор во предвидување на исходот на болеста, но и како можен предиктивен маркер кој би имал улога во утврдување на нови терапевтски модалитети кај пациентите.

5.5.4. Експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка

Од неодамна, ALDH1 е предложен како маркер за канцерски стем клетки (85). Тој е ензим кој катализира оксидација на алдехиди и е вклучен во детоксикација на ксенобиотици и ендогени алдехиди (85, 203). ALDH1, исто така, го конвертира ретинолот во ретиноична киселина, која е модулатор на клеточната пролиферација и може да влијае на пролиферацијата на канцерските стем клетки (204). На тој начин, ALDH1-позитивните клетки може да придонесат за развој на агресивни тумори и резистентност на адјувантната хемотерапија (205-207). ALDH1 е цитоплазматски стем клеточен маркер кој е детектиран во карциноми на дојка и е поврзан со туморските иницирачки клетки (198). Ginestier и сор. потврдиле дека ALDH1 има значајна улога како маркер за нормалните и малигни епителни клетки со стем/прогениотор клеточни карактеристики (85). Тие успеале да генерираат стабилен тумор преку инјектирање на 500 ALDH1-позитивни клетки (евалуирани со ALDEFLUOR тест) во масно мamarно ткиво на имунодефициентни (NOD/SCID) глувци. Туморогената способност била значително поголема кога биле користени комбинирани ALDEFLUOR-позитивни/CD44+/CD24- клетки, бидејќи само 20 клетки со ваков фенотип биле доволни за генерирање на тумори кај животни, на тој начин покажувајќи дека со комбинирањето на маркери за детекција на КСК може да се зголеми чистотата на изолираната КСК популација (85).

Во контролната група, ALDH1A1 покажа цитоплазматска експресија во луминалните клетки на ТДЛЕ, во епителните клетки на дуктусите и во стромалните клетки, додека во испитуваната група беше нотирана цитоплазматска експресија во епителните туморски или во стромалните клетки (173, 180). Идентична целуларна дистрибуција покажале и други автори (85, 173,

180). ALDH1A1 стем клеточниот маркер беше детектиран во 26 (35,62%) од анализираните случаи. Слично на резултатите од нашата студија, Guan и сор. (182) покажале позитивна експресија на ALDH1A1 во 35% од анализираните случаи. Други автори евалуирале помала процентуална застапеност на овој маркер во примероци од карциноми на дојка која се движела во граници помеѓу 7% и 21,3% (187, 208, 209), додека Yao и сор. (209), DA Cruz Paula и сор. (183) и Pan H и сор. (211), покажале дека овој процент е значително повисок, односно 52,6%, 85,4% и 93%, соодветно. Оваа голема разлика во преваленцата на експресија на ALDH1A1 може да се должи на разлики во селекцијата на примероци за анализа, различните гранични вредности, различните методи и различните антители за идентификација.

Анализите во нашата студија не покажаа сигнификантна поврзаност помеѓу експресијата на ALDH1A1 стем клеточниот маркер и клиничко-патолошките параметри (возраст, големина на тумор, хистолошки и нуклеарен градус, лимфонодален статус и стадиум на болеста), сепак експресијата на ALDH1A1 покажа тренд на позитивна асоцираност со поагресивни биолошки карактеристики на туморите (висок хистолошки и нуклеарен градус, позитивен лимфонодален статус, висок стадиум на болеста и негативен хормонски рецепторски статус). Позитивна сигнификантна поврзаност ($p=0,005$) беше нотирана само во однос на експресијата на ALDH1A1 и пролиферативниот маркер Ki67.

Madjd и сор. (212) не покажале статистички значајна корелација помеѓу експресијата на ALDH1 и туморските карактеристики, освен забележлив тренд на корелација со тумори со висок хистолошки градус. Во студија со 577 испитаници, Ginestier и сор. (85) покажале поврзаност на ALDH1 позитивни тумори со висок хистолошки градус, прекумерна експресија на HER-2 и отсуство на експресија на естрогенски и прогестеронски рецептори. Yao и сор. (209) покажале значајна корелација на протеинската експресија на ALDH1 со хистолошкиот градус, големината на туморите, напреднат TNM стадиумот, но не и со возраста на пациентите или присуството на лимфонодални метастази. Позитивна корелација со лимфонодален статус била нотирана и во студиите на Lee и сор. (213) и Mansour и сор. (196). Pan и сор. (211) покажале дека експресијата на ALDH1 корелира со големината на туморите, хистолошкиот градус и експресијата на Ki67, додека Ieni и сор. (200) покажале дека ALDH1 е независен прогностички фактор за пациенти со негативен лимфонодален статус, но без значајна корелација со клиничко-патолошките параметри.

Kim и сор. (198) ја евалуирале и корелирале експресијата на CD133 и ALDH1, со клиничко-патолошките карактеристики и со прогнозата на 291 пациент со примарен инвазивен карцином на дојка. Тие покажале значајна корелација помеѓу експресијата на CD133 со големината на туморот ($p<0,001$), присуството на метастази во регионалните лимфни жлезди ($p=0,019$), стадиумот на болеста ($p=0,001$), негативен ER статус ($p<0,001$), негативен PR статус ($p=0,024$), позитивен HER-2 статус ($p=0,001$), со одговорот на хемотерапија ($p=0,041$), и со стапката на рецидиви ($p=0,001$). Експресијата на ALDH1 значајно корелирала со големината на туморот ($p=0,004$), стадиумот на болеста ($p=0,011$), негативен ER

статус ($p < 0,001$), и со стапката на рецидиви ($p = 0,046$), но без значајна разлика во однос на вкупното преживување и преживувањето без болест. Тие, исто така покажале дека CD133 е силно асоциран со биолошки поагресивните тумори во однос на ALDH1. Комбинираната експресија на CD133 и ALDH1 била значајно асоцирана со големината на туморот, стадиумот на болеста, хистолошкиот градус, негативниот ER и позитивниот HER-2 статус, како и со вкупното преживување и преживувањето без болест. Нивната студија потврдила дека експресијата на CD133 или комбинација на CD133 и ALDH1 може да бидат важни клинички маркери за идентификација на биолошки агресивни карциноми на дојка и во предвидување на преживувањето.

Повеќето истражувачи покажале дека пациенти со ALDH1 позитивни карциноми на дојка имале пократко преживување и полоша прогноза (85, 86, 92). Додека други автори не ги потврдиле ваквите наоди (208, 214). Мултиваријантните анализи покажале дека пациенти со висока експресија на ALDH1 имаат пократко преживување во споредба со ALDH1 негативните тумори (215), што укажува на поврзаноста на ALDH1 со агресивните карактеристики на карциномите на дојка кои може да се рефлексја на потенцијалот за самообновување и диференцијација.

Miyoshi и сор. (92) идентификувале повеќе ALDH1 позитивни случаи кај пациенти со рани рецидиви во ER-позитивни / HER-2 негативни карциноми. Тие, исто така, покажале дека пациентите со ALDH1 позитивни тумори имале поагресивен фенотип и тенденција за пократко преживување.

Логистичката регресивна анализа како сигнификантен предиктивен фактор за експресија на ALDH1A1 стем клеточниот маркер во нашата студија го потврди пролиферативниот маркер Ki67 ($p = 0,007$). Имено, пациентките со висока експресија на Ki67 во туморското ткиво имаат за 5,271 (95,0% CI 1,573 – 17,661) пати поголема веројатност за позитивна експресија на ALDH1 во однос на пациентките со ниска експресија за Ki67. И други автори потврдиле дека ALDH1 позитивните тумори се асоцирани со висока експресија на Ki67 (92, 187, 207, 208, 216), еден од маркерите кој е предиктор за лоша прогноза и одговор на адјувантната хемотерапија. Комбинирањето на високата пролиферативна активност заедно со карактеристиките на канцерските стем клетки може да помогне во идентификација на група пациенти со зголемен ризик за рецидиви.

Во студија од 203 пациенти со примарен карцином на дојка, Morimoto и сор. (208) ги анализирале клиничко-патолошките карактеристики на туморите со ALDH1 позитивни KCK и покажале дека ALDH1 позитивните тумори биле сигнификантно асоцирани со негативен ER статус ($P = 0,004$), негативен PR статус ($P = 0,025$), позитивен HER-2 статус ($P = 0,001$), висок Ki67 ($P < 0,001$) и со TOP2A позитивен ($P = 0,012$) статус. Не била детектирана значајна поврзаност со возраста, менопаузалниот статус, големината на туморот, лимфонодалниот статус и со хистолошкиот градус. Дополнително, користејќи двојно имунохистохемиско бојење за ALDH1 и Ki67, тие покажале дека ALDH1 позитивните туморски клетки најчесто биле Ki67 негативни, додека ALDH1 негативните туморски клетки најчесто биле Ki67 позитивни. Ваквите резултати

укажуваат дека КСК бавно се делат, додека околните туморски (прогенитор) клетки се размножуваат побрзо, што е во согласност со теоријата дека КСК се релативно мирни, но со делба даваат прогенитор клеточна популација која брзо се дели. Воедно, заклучиле дека, иако ALDH1 позитивните тумори се најверојатно Ki67 позитивни тумори, не значи дека тоа се однесува на ALDH1 позитивните туморските клетки, туку дека ALDH1 позитивните тумори имаат повисок процент на ALDH1 негативни и Ki67 позитивни тумор клетки кои ги опкружуваат ALDH1 позитивните туморски клетки. Добиените резултати ги навеле на заклучоци дека карциномите на дојка со ALDH1 позитивни КСК поседуваат биолошки агресивен фенотип кој е поврзан со лоша прогноза; дека ALDH1 позитивните КСК се карактеризираат со Ki67-, ER- и HER-2 + фенотип и дека имунохистохемиска детекција на ALDH1 е клинички важен маркер за идентификација на биолошки агресивни карциноми на дојка..

5.5.5. Експресија на ЕрСам стем клеточниот маркер и корелација со клиничко-патолошките параметри кај карциноми на дојка

ЕрСам е трансмембрански гликопротеин кој е кодиран од ген локализиран на долгиот крак на хромозомот 4 (217). Тој е експресиран во голем број епителни тумори, прогенитор и стем клетки, поради што привлекува големо внимание во научната јавност како таргет за имунотерапија кај поголем број на неоплазми (217-219). Таргетираната терапија за ЕрСам со хуманизирано моноклонално антителио (Adecatumumab) во мултицентрична студија за третман на метастатски карцином на дојка, резултирала со редукција во формирањето на нови метастатски лезии (220).

Во карциномите на дојка, ЕрСам е одговорен за клеточна пролиферација, миграција и туморска инвазија (217), што ја објаснува поврзаноста на зголемената експресија на ЕрСам со лоша прогноза кај пациентите со карцином на дојка (221). Hiraga и сор. покажале дека зголемената експресија на ЕрСам во канцерските клетки е асоцирана со CSC-like фенотипот кој придонесува за развој на коскени метастази преку зголемување на туморогеноста на клетките (222).

Во контролната група, ЕрСам покажа силен мембрански позитивитет во епителните клетки на дуктусите и на ТДЛЕ. Доминантно мембрански позитивитет беше нотирани и во испитуваната група. Идентични резултати се потврдени и во други студии (109, 218, 221, 223, 224). ЕрСам беше експресиран во 46 (63,04%) од случаите во нашата студија. Во литературата е прикажана варијабилна експресија на овој маркер во примероци од карцином на дојка, која се движи во граници помеѓу (26,4%-72,2%) (109, 221). Во студијата на Cimino и сор. (225) експресија на ЕрСам била забележана во сите анализирани примероци, но со варијабилна застапеност.

Резултатите од нашата студија не покажаа значајна поврзаност помеѓу експресијата на ЕрСам со клиничко-патолошките параметри и биолошките маркери (возраст, големина на туморот, хистолошки и нуклеарен градус,

лимфонодален статус, ER, PR и Ki67). Иако статистички незначајно, ЕрСам позитивните тумори покажаа позитивна асоцијација со: висок хистолошки и нуклеарен градус, висок Ki67 и негативен хормонски рецепторски статус.

Други автори покажале значајна позитивна корелација помеѓу експресијата на ЕрСам со хистолошкиот градус и големината на туморот, како и значајна инверзна корелација со експресијата на ER и PR, но без значајна корелација со HER-2 (109). Spizzo и сор. (224) покажале дека зголемената експресија на ЕрСам е асоцирана со хистолошкиот градус, хистолошкиот тип и HER-2 статусот, како и со полоша прогноза кај пациентите. Schmidt и сор. (221) покажале значајна корелација на ЕрСам со хистолошкиот градус и инверзна корелација со естрогенскиот рецепторски статус, но не покажале значајна поврзаност со возраста, pT стадиумот, прогестерон рецепторскиот статус и HER-2 статусот кај пациентите со негативен лимфонодален статус. Воедно, покажале дека високата експресија на ЕрСам е поврзана со преживувањето кај пациентите, независно од другите клиничко-патолошки параметри (возраста, хистолошкиот градус, хормон рецепторскиот и HER-2 статусот), сугерирајќи на негова можна улога како таргет за специфична терапија, особено во тројно негативните тумори.

Cimino и сор. (225) покажале зголемена експресија на ЕрСам во 82% од метастатските карциноми во споредба со примарните тумори, што укажува на можната улога на ЕрСам во процесот на метастазирање и го потврдува како терапевтски таргет кај пациентите со метастатски карцином на дојка. ЕрСам, таргетираната терапија со моноклоналното антитело ги намалува ЕрСам позитивните туморски клетки во коскената срцевина кај пациентите со метастатска или локално рекурентна болест (219). Други автори, пак не покажале значајна разлика помеѓу експресијата на ЕрСам во примарните тумори и во метастазите во регионалните лимфни жлезди (109).

5.5.6. Експресија на стем клеточните маркери и корелација со молекуларните поттипови на карциноми на дојка

Luminal A, Luminal B, HER-2 и Triple negative туморите во нашата серија незначајно се разликуваа во однос на експресијата на CD44 ($p=,13$) и ЕрСам ($p=0,059$), а значајно се разликуваа во однос на експресијата на CD24 ($p=0,016$), CD133 ($p<0,0001$) и ALDH1A1 ($p=0,006$).

Иако статистички незначајно, CD44 позитивните тумори почесто од CD44 негативните тумори беа Triple negative (11,43% vs 5,26%) и Luminal B (60% vs 39,47%). Triple negative туморите почесто од другите молекуларни поттипови покажаа позитивна експресија за CD44 (66,67% Triple negative vs 40% HER-2, 58,33% Luminal B и 30,77% Luminal A).

Молекуларните подгрупи покажаа различна експресија за CD24 стем клеточниот маркер: 7,69% од Luminal A туморите, 41,67% од Luminal B туморите, 20% од HER-2 туморите и 33,33% од Triple negative туморите беа CD24 позитивни.

CD24 позитивните тумори почесто од CD24 негативните тумори беа класифицирани како Luminal B (75% vs 39,26%). Luminal B туморите почесто од останатите беа CD24 позитивни.

CD133 позитивните тумори поретко од CD133 негативните тумори беа класифицирани како Luminal A (9,52% vs 50%), додека почесто беа класифицирани како Triple negative (19,05% vs 1,92%) и HER-2 (23,81% vs 1,92%). Triple negative и HER-2 туморите почесто од другите молекуларни поттипови беа CD133 позитивни (83% Triple negative и 80% HER-2 vs 27,78% Luminal B и 7,69% Luminal A).

Туморите со и без експресија на ALDH1A1 сигнификантно се разликуваа во однос на молекуларната класификација ($p=0,006$): 15,38% од ALDH1A1 позитивните тумори беа Luminal A; 65,38% беа Luminal B; 15,38% беа HER-2 и само 3,86% беа Triple negative. ALDH1A1 позитивни тумори поретко од ALDH1A1 негативните тумори беа Luminal A и Triple negative (15,38% vs 46,81% и 3,85% vs 10,64%, соодветно), а почесто беа HER-2 и Luminal B (15,36% vs 2,13% и 65,38% vs 40,43%, соодветно). HER-2 туморите почесто од другите поттипови покажа позитивна експресија за ALDH1A1 (80% HER-2 vs 47,22% Luminal B, 16,67% Triple negative и 15,38% Luminal A).

Експресијата на EpCam во нашата студија покажа гранична асоцираност со подгрупите од молекуларната класификација ($p=0,059$). Иако статистички незначајно, EpCam позитивните тумори поретко од EpCam негативните тумори беа Luminal A (13,04% vs 37,04%), а почесто беа Triple negative (13,04% vs 0). Имено, сите Triple negative тумори во нашата серија покажаа зголемена експресија за EpCam.

Ricardo и сор. (187) покажале сигнификантна асоцираност на експресијата на CD44 ($p<0,0001$), но не и на CD24 ($p=0,418$) со молекуларните поттипови. Најголем број (80,9%, 55/68) од basal-like карциномите во нивната група биле CD44+; CD24+ случаите почесто биле детектирани во Luminal A туморите (34/53, 64,2%), додека ALDH1+ најчесто бил детектиран во HER-2 и basal/epithelial клеточни линии. Повеќето basal-like тумори биле CD24^{-/low} (64/68, 94,1%), укажувајќи на нивната поврзаност со понедиференцирани тумори. Basal-like карциномите покажале највисок процент на експресија на туморските клетки со CD44+CD24^{-/low} фенотип и ALDH1 позитивитет, додека Luminal и HER-2 карциномите доминантно покажале присуство на туморски клетки со CD44^{-/low}CD24+ фенотипот.

Bernardi и сор. (189) не покажале значајна асоцираност во однос на дистрибуцијата на CD44/CD24 фенотиповите во различни подгрупи на карциномот на дојка. Сепак, CD44+/CD24- фенотипот почесто бил детектиран во Triple negative тумори, отсутен во HER-2 групата, а со ниска фреквенција (10%) во Luminal B поттипот. CD44+/CD24+ и CD44-/CD24+ тумори почесто биле застапени во луминалните подгрупи.

Park и сор. (181) евалуирале различна целуларна експресија на CD24 стем клеточниот маркер во корелација со молекуларните поттипови на карциноми на

дојка: апикален позитивитет, кој доминираше во добро диференцираните Luminal A тумори и циркумференцијален мембрански и цитоплазматски позитивитет, кој бил почесто детектиран во Luminal B и HER-2 поттиповите, укажувајќи на поврзаноста на типот на експресија со поагресивните туморски карактеристики. Евалуирајќи го цитоплазматскиот позитивитет, Honeth и сор. (103), покажале доминантна експресија на CD24 во HER-2 молекуларниот поттип. Во нашата студија доминираше мембранската експресија на CD24 стем клеточниот маркер што може да ја објасни почестата застапеност на CD24 позитивните тумори во Luminal B молекуларниот поттип.

Nadal и соработниците (201) покажале сигнификантна поврзаност на CD133 со Luminal туморите. Имено тие покажале дека 90,9% од циркулирачките туморски клетки во Luminal туморите и 50% од циркулирачките туморски клетки во Triple negative туморите биле CD133 позитивни. Повеќе од 2/3 од Triple negative (83,33%) и HER-2(80%) туморите во нашата студија покажаа позитивна експресија за CD133, што укажува на поврзаност со агресивен туморски фенотип. И други автори покажале позитивна асоцираност помеѓу експресијата на CD133 со Triple negative туморите. CD133 е важен прогностички маркер во Triple negative туморите (185).

Во дел од истражувањата покажана е почеста експресија на ALDH1 во HER-2 и Triplenegative молекуларните поттипови (208-210), додека Ricardo и сор. (187) покажале сигнификантна асоцираност на ALDH1 само со Triple-negative туморите. Abd El-Maqsoud и сор. покажале значајна корелација помеѓу експресијата на EpCam со тројно негативните тумори (110). Schmidt и сор. (221) покажале полоша прогноза кај пациенти со EpCam позитивни, Triple negative тумори. Во студијата на Soysal и сор. прекумерната експресија на EpCam била највисока во basal-like (64%) и HER-2 (73%) поттиповите, а најниска во Luminal A поттипот (23%) (226). Високата експресија на EpCam значајно корелирала со висок Ki-67 во сите молекуларни подгрупи, со исклучок на Luminal A поттипот.

Друга група автори покажале дека EpCam е силно експресиран во HER-2 поттипот (73,0%), и дека овие пациенти имаат значително подобро преживување ($P=0,0004$) од другите пациенти (225). Конзистентно со ваквите наоди, ин витро анализите покажале дека надолната регулација (downregulation) на EpCam води до зголемена одржливост на SKBR3 клеточните линии од карцином на дојка кои одговараат на HER-2 поттипот и дека нивната зголемена одржливост по специфична аблација на EpCam ги поддржува тврдењата дека EpCam е поврзан со поволна прогноза во овој поттип на карцином на дојка. Спротивно на ваквите тврдења, други автори сугерираат дека истовремената експресија на EpCam и HER-2 е поврзана со полоша прогноза кај пациентите (224).

Дистрибуцијата на канцерските стем клеточни маркери во различни молекуларни поттипови може да е рефлексивна на нивното различно клеточно потекло или пак на алтерации во експресијата на stem cell-like гените како резултат на специфични туморски трансформирачки процеси. Потеклото на хормон рецептор позитивни и HER-2+ тумори (Luminal B поттип) сè уште е контроверзно, но се шпекулира дека Luminal B поттипот со ALDH1+ туморски

клетки потекнува од хормон рецептор негативни, мамарни стем клетки и покажуваат одредена тенденција да диференцираат во ER + туморски клетки (208). Исто така, ALDH1 позитивните туморски клетки најчесто се ER негативни и ALDH1 негативните туморски клетки имаат поголема веројатност да бидат ER позитивни во даден тумор, што имплицира дека ALDH1 позитивните и ER негативните КСК може да диференцираат во ALDH1 негативни и ER позитивни туморски клетки (208). Коркава и сор. забележале дека егзогената експресија на HER-2 ја зголемува фреквенцијата на ALDH+ клетките во клеточните линии на карциноми на дојка, сугерирајќи дека ефектите од HER-2 амплификацијата врз карциногенезата може да се должат на нејзините ефекти врз нормалните и малигни стем /прогенитор клетки (227).

Стем клеточните маркери најчесто беа детектирани во HER-2, Triple negative и Luminal B молекуларните поттипови кои се поврзани со агресивни тумори и отпорност на хемотерапија, додека, значително поретко беа експресирани во Luminal A поттипот кој е поврзан со подобро диференцирани тумори, кои даваат добар одговор на терапија, имаат добра прогноза и преживување.

Анализираните канцерски стем клеточни фенотипови веројатно идентификуваат КСК со различен степен на диференцијација, односно CD44, CD133 и EpCam беа почесто поврзани со Triple negative карциномите кои водат потекло од недиференцирани мамарни стем клетки, додека CD24 и ALDH-1 со Luminal B и HER-2 поттиповите, кои водат потекло од подиференцираните луминални клетки.

5.5.7. Корелација на амплификацијата на HER-2 со експресијата на канцерските стем клеточни маркери

Нашите резултати не покажаа статистички значајна корелација помеѓу HER-2 генот и експресијата на стем клеточните маркери CD44 ($p=0,35$), CD24 ($p=0,72$), CD133 ($p=0,09$), ALDH1A1 ($p=0,32$) и EpCam ($p=1,0$). Иако статистички незначајно, HER-2 позитивните тумори почесто од HER-2 негативните тумори беа CD24, CD133 и ALDH1A1 позитивни, додека CD44 беше почесто експресиран во HER-2 негативните тумори.

Публикуваните трудови покажуваат контрадикторни резултати во однос на експресијата на стем клеточните маркери и HER-2 статусот. Статистички значајна корелација помеѓу експресијата на КСК-маркери и HER-2 позитивните тумори не била потврдена ниту во истражувањата на Kristiansen и сор. (193), Nadal и сор. (201) и Abd El-Maqsooudi сор. (110). Други автори пак потврдиле сигнификатна поврзаност на HER-2 позитивните тумори со CD24 (91), CD133 (198, 178, 202), ALDH1A1 (208) и Ep-CAM (224). Зголемената експресија на стем клеточните маркери во HER-2 позитивните тумори сугерира нивна поврзаност со поагресивен туморски фенотип.

Jang и сор. (186) потврдиле сигнификантна корелација на CD44 со негативен HER-2 статус, што сугерира можна улога на CD44 маркерот во туморогенезата на HER-2 негативните карциноми на дојка.

Развојот на HER-2 таргетираната терапија драматично ја измени природната историја на HER-2 позитивните карциноми на дојка и често се наведува како одличен пример за ефективност на молекуларно таргетираната терапија. Извонредната клиничка ефикасност на ваквите терапевтски агенци може да биде поврзана со нивната способност да таргетираат популација на канцерски стем клетки. Неколку истражувања покажуваат дека HER-2 е важен регулатор на КСК-популацијата во HER-2 позитивните карциноми на дојка. Прекумерната експресија на HER-2 ја зголемува, додека, блокирањето на HER-2 ја намалува КСК-популацијата во клеточните линии од карцином на дојка и во ксенотрансфери на глувци (227). Во карциномите на дојка постои корелација помеѓу HER-2 амплификацијата и фреквенцијата на КСК (85). Луминалните карциноми во кои постои ко-експресија на HER-2 и КСК-маркер, ALDH1, во исти туморски клетки, имаат корист од адјувантната терапија со трастузумаб (227).

Ефектите на амплификацијата на HER-2 врз карциногенезата, се резултат на ефектот на овој сигнален пат на канцерските стем клетки, односно на неговата способност да го зголеми процентот на стем/прогенитор клеточна популација, како и да ја зголеми туморогеноста и инвазивноста на оваа клеточна популација. Разјаснувањето на молекуларните механизми со кои HER-2 сигнализирањето го движи базенот на матични клетки може да доведе до нови цели за терапија на карциномот на дојка.

Кај одреден процент на пациенти третирани со трастузумаб се јавуваат релапси, една третина од пациентите со напредна болест не реагираат на терапијата, а поголем дел од испитаниците покажуваат прогресија на болеста во рок од една година. Развојот на ефективни стратегии за третман на овие тумори отпорни на терапија со трастузумаб ќе биде олеснет со појасно разбирање на механизмите со кои прекумерната експресија на HER-2 предизвикува агресивно однесување на карциномот на дојка и молекуларните механизми на отпорност на трастузумаб (227).

HER-2 ја регулира КСК популацијата во карциноми на дојка преку PI3 киназа, Akt и Wnt сигналните патишта. Повеќето пациенти со напреднат карцином на дојка развиваат резистентност кон трастузумаб, што делумно се должи на губењето на експресија на туморскиот супресорен ген PTEN преку активирање на инфламаторна јамка, посредувана од NF- κ B и IL-6 или преку интеракција со други КСК регулаторни патишта и Notch сигналниот пат кој ја регулира експресијата на HER-2 (228).

Seo и сор. (229) покажале дека експресијата на КСК-маркерите, особено CD44+/CD24- фенотип е независен фактор за лоша прогноза кај пациенти со HER-2 позитивни, примарни карциноми на дојка, сугерирајќи дека експресијата на КСК-маркерите има предиктивна улога за одговор на трастузумаб. Поврзаноста на КСК со резистентноста на трастузумаб е поддржано со податокот дека CD44+/CD24-

фенотипот е асоциран со лош клинички исход кај пациентите со HER2-позитивни карциноми на дојка третирани со адјувантна терапија со трастузумаб. Тие, исто така покажале дека CD44+/CD24- фенотипот е лош прогностички фактор кај HER2-позитивните карциноми на дојка што не биле третирани со адјувантната терапија со трастузумаб. Поради тоа, асоцираноста на CD44+/CD24- со лош клинички исход кај пациентите што примаат адјувантна терапија со трастузумаб не може да се објасни само со отпорност на КСК врз лекот, но исто така се објаснува и со прогностичкото значење на КСК-фенотипот.

Morimoto и сор. (208) покажале дека HER-2+ туморите почесто се ALDH1+, независно од хормонскиот рецепторски статус. Се претпоставува дека HER-2+ и хормон рецептор негативните тумори потекнуваат од ER негативни мамарни стем клетки. КСК кои се трансформирани со HER-2 генска амплификација веројатно имаат висок капацитет за самообновување и експанзија. Двојното имунохистохемиско боене во нивната студија покажало дека ALDH1 + туморските клетки најчесто се преклопуваат со HER-2+ туморските клетки, што укажува на тоа дека HER-2 генската амплификација најверојатно се случила во ER- мамарни стем клетки кои се трансформирале во КСК.

Во студија на Hosonaga и сор. била детектирана позитивна асоцијација помеѓу експресијата на HER-2 и CD24 (230). Тие покажале дека аберантната активација на HER2-PI3K-Akt сигналниот пат преку CD24 придонесува за резистенција на лапатиниб во HER-2 карциноми на дојка. Деплецијата на CD24 ја зголемува HER-2 негативната клеточна популација сугерирајќи дека CD24 позитивно го регулира HER2-Akt сигнализирањето и промовира резистентност на HER-2 таргетираната терапија со последователна туморска прогресија. Поради тоа, терапевтско таргетирање на CD24 може да ја зголеми ефикасноста на HER-2 таргетираната терапија.

6. ЗАКЛУЧОЦИ

Врз основа на поставените цели и анализата на податоците во студијата може да се изведат следните заклучоци:

- 1) Флуоресцентната ин ситу хибридизација во рутинската дијагностичка лабораторија бара стандардизација и мониторинг на методата, како и следење на протоколот за работа со цел да се избегне повторување на тестирањето што би имало импликации врз цената на чинење на тестот. Повеќе фактори може да влијаат на резултатите од FISH тестирањето.
 - Разликите во аналитичката фаза (процесот на дигестија, постхибридизациско испирање) влијаат врз успешноста и квалитетот на тестовите, поради тоа оптимизацијата на овие чекори во стандардните протоколи е неопходна за добивање на квалитативно добри и дијагностички точни резултати.
 - Во зависност од добиените резултати понекогаш е потребно повторување на методата со корекции во постапките кои ќе бидат адаптирани на претходната обработка на ткивниот примерок или на индивидуалните карактеристики на ткивото што се анализира.
 - И покрај тоа што се анализираа ткивни примероци со варијабилна фиксација и непознато време на ладна исхемија, вкупната стапка на неуспех во студија беше само 1,37%, што ја потврдува стабилноста на FISH методата во однос на преданалитичката обработка на ткивните примероци.
 - Двата протоколи во студијата за кои се користеше различен кит за ткивен преттретман (Vysis Pretreatment Kit и Histology FISH accessory kit), покажаа квалитативно одлични резултати. Успешна хибридизација беше добиена во 98,63% од анализираните случаи.
 - Преттретманот со DAKO Histology Kit е пократок, реагенсите се поевтини, сигналите се поуниформни и ниту еден ткивен примерок не отпадна во текот на процедурата. Овие карактеристики му даваат предност на DAKO Histology Kit преттретманот за рутинска пракса.
- 2) Со оглед на придобивките и несаканите ефекти што пациентите би ги имале од целната терапија, употребата на соодветен тест за проценка на HER-2 статусот е од суштинско значење при селекцијата на пациенти за третман.
 - Стапката на совпаѓање помеѓу IHC и FISH-методите варира во различни имунохистохемиски групи, највисока е во негативните IHC 0/1+ (100%) случаи, а најниска во двојбените IHC 2+ (18,18%) случаи. Кога IHC 2+/3+ случаите се анализираат како една група, совпаѓањето помеѓу двете методи е 84,72%, карра коефициент 0,5976, со статистичка значајност за $p < 0,0001$.
 - Земајќи ја FISH-методата како златен стандард, позитивната предиктивна вредност на позитивните IHC 3+ случаи е 83,3%, а негативната предиктивна вредност за негативните IHC 0/1+случаи е

100%. Сензитивноста на имунохистохемијата за IHC 2+/3+ и за IHC 3+ групите е 100% и 83,3%, соодветно, додека специфичноста за истите групи е 81,67% и 96,7%.

- Полизомијата за хромозом 17 може да е одговорна за дискрепанца помеѓу IHC и FISH методата во одредување на HER-2 статусот.
- Поради високата сензитивност, добиените резултати потврдуваат дека имунохистохемијата е одличен иницијален скрининг тест, а поради детектираните лажно позитивни резултати потребно е IHC 2+ и IHC 3+ да се потврдат со FISH-методата.
- Амплификацијата на HER-2 генот е присутна во 16,44% од анализираните примероци. Амплификацијата на HER-2 значајно корелира со висок Ki67 ($p=0,025$), негативниот естрогенски ($p=0,015$) и прогестеронскиот ($p = 0,016$) рецепторски статус.

3) Резултатите од студијата покажаа присуство на хетерогена клеточна популација во карциномите на дојка и во однос на експресијата на КСК-маркерите. Присуството на туморски клетки кои експресираат КСК-маркери е поврзано со биолошки поагресивните тумори кои имаат полоша прогноза, па поради тоа може да се користат како прогностички фактор во идентификацијата на пациенти со понеповолна прогноза. Ваквите сознанија отвораат можности за дополнителни истражувања во оваа област сè со цел јасно да се дефинираат и дискриминираат канцерските стем клетки од другата популација на туморски клетки преку користење на специфични маркери, што ќе доведе до развој на нови поефикасни терапевтски модалитети кај пациентите со инвазивен карцином на дојка.

- Евалуацијата на експресијата на КСК-маркери покажа дека CD44 е експресиран во 47,94% од случаите, CD24 во 27,4%, CD133 во 28,77%, ALDH1A1 во 35,62% и EpCam во 63,04% од случаите.
- Високата експресија на КСК-маркерите покажа статистички значајна корелација со патохистолошките и биолошки параметри: CD44 (висока експресија на Ki67), CD24 (висок нуклеарен градус и висок Ki67), CD133 (висок стадиум, негативен ER и PR и висок Ki67) и ALDH1A1 (висок Ki67).
- Униваријантната анализа како сигнификантни предиктивни фактори за експресија на КСК-маркери ги потврди: постоперативниот стадиум (CD133), естрогенскиот рецептор (CD133), прогестеронскиот рецептор (CD133) и маркерот за клеточна пролиферација Ki67 (CD44, CD24, CD133 и ALDH1A1). Мултиваријантната анализа покажа дека само постоперативниот стадиум е независен значаен фактор за предикција на експресијата на CD133.

4) Имунохистохемиски дефинираните молекуларни поттипови на карциноми на дојка покажаа значајна разлика во однос на експресијата на CD24 ($p=0,016$), CD133 ($p<0,0001$) и ALDH1A1 ($p=0,006$) КСК-маркери.

- CD24 најчесто беше експресиран во Luminal B туморите; CD133 во HER-2 и Triple negative поттиповите, додека ALDH1A1 почесто беше експресиран во HER-2 и Luminal B поттиповите. Иако статистички

- незначајно CD44 и EpCam почесто беа експресирани во Triple negative поттипот.
- Дистрибуцијата на канцерските стем клеточни маркери во различни молекуларни поттипови може да е рефлексивна на нивното различно клеточно потекло или пак на алтерации во експресијата на stem-cell like гените како резултат на туморските специфични трансформирачки процеси. Бидејќи експресијата на КСК-маркери е поврзана со молекуларниот поттип, тие може да бидат прогностички фактори кои може да се поврзат со исходот на болеста во рамките на молекуларниот поттип. Во склоп на луминалните поттипови, КСК-маркери може да идентификуваат групи на пациенти со полоша прогноза.
- 5) Анализата во нашата студија не покажа значајна разлика во однос на експресијата на КСК-маркерите и туморите со и без амплификација за HER-2 генот. HER-2 позитивните тумори поретко од HER-2 негативните тумори се CD44 позитивни, но почесто се CD24, CD133, ALDH1A1 и EpCam позитивни. Зголемената експресија на КСК-маркерите може да идентификува група пациенти со HER-2 позитивни тумори кои се поврзани со полоша прогноза.

7. ЛИТЕРАТУРА:

1. Tavassoli FA, Devillee P eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon, France; 2003.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>.
3. DeSantis C, Jiemin Ma, Leah B, Ahmedin J. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):52–62. doi: 10.3322/caac.21203.
4. Martin AM, Weber BL. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(14):1126-1135. doi: 10.1093/jnci/92.14.1126.
5. American Cancer Society. Breast Cancer Facts and Figures 2013-2014. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2013.
6. Weigel MT, Dowsett M. Biomarkers in breast cancer *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):R245–R262. doi: 10.1677/ERC-10-0136.
7. Brandt J, Garne JP, Tengrup I, Manjer J. Age at diagnosis in relation to survival following breast cancer: a cohort study. *World J Surg Oncol*. 2015;13:33. doi: 10.1186/s12957-014-0429-x.
8. Sundquist M, Thorstenson S, Brudin L et al. Incidence and prognosis in early onset breast cancer. *The Breast*. 2002;11(1):30-35. doi: 10.1054/brst.2001.0358.
9. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann of Oncol*. 2007;18(7):1133–1144. doi: 10.1093/annonc/mdm271.
10. Largillier R, Ferrero JM, Doyen J. Prognostic factors in 1038 women with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2008;19(12):2012–2019. doi: 10.1093/annonc/mdn424.
11. Kadaoui N, Guay M, Baron Get al. Breast cancer screening practices for women aged 35 to 49 and 70 and older. *Can Fam Physician*. 2016;62(2):131–138.
12. Pinder SE, Harris G, Elston CW. The role of the pathologist in assessing prognostic factors for breast cancer. In: Walker R, Thompson AM, eds. *Prognostic and predictive factors in breast cancer*. London: Informa Healthcare, 2008:6-17.
13. Joensuu H, Pylkkanen L, Toikkanen S. Late Mortality from pT1N0M0 Breast Carcinoma. *Cancer*. 1999;85(10):2183–2189.
14. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW et al. Prognosis in Stage II (T1,N1M0) Breast Cancer. *Ann. Surg*. 1981;194(5):576-584.
15. Rosen PP, Saigo PE, Braun DW et al. Predictors of Recurrence in Stage I (T1N0M0) Breast Carcinoma. *Ann Surg*. 1981;193(1):15-25.
16. Say CC, Donegan WL. Invasive carcinoma of the breast: prognostic significance of tumor size and involved axillary lymph nodes. *Cancer*. 1974;34(2):468-471.
17. Rakha EA, El-Sayed ME, Baehner F et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607.

18. Weigelt B. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol.* 2010;4(3):192-208. doi: 10.1016/j.molonc.2010.04.004.
19. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (eds) *World Health Organization Classification of Tumors. WHO Classification of Tumors of the Breast.* 4th ed. Lyon: IACR;2012.
20. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-410.
21. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D et al: Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):966-978. doi: 10.1043/0003-9985(2000)124<0966:PFIBC>2.0.CO;2.
22. NHS Breast Screening Programme: Guidelines for Pathology Reporting in Breast Cancer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. Sheffield, United Kingdom, NHS, 2005.
23. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH et al. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008; 26(19):3153-3158. doi: 10.1200/JCO.2007.15.5986.
24. Hammond E, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784-3543. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.
25. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):561-570. doi:10.1172/JCI27987.
26. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res.* 2002;4(5):197-201.
27. Collins LC, Botero ML, Schnitt SJ. Bimodal Frequency Distribution of Estrogen Receptor Immunohistochemical Staining Results in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):16-20.
28. Dowsett M, Houghton J, Iden C et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol.* 2006;17(5):818–826.
29. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Moralez AR. Immunohistochemistry of Estrogen and Progesterone Receptors Reconsidered. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(1):21-27.
30. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen Receptor Status by Immunohistochemistry Is Superior to the Ligand-Binding Assay for Predicting Response to Adjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(5):1474-1481.
31. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM et al. Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *J Clin Oncol.* 2003;21(10):1973-1979.

32. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev.* 2004;25(6):869-898.
33. Sirvent JJ, Salvadol MT, Santafe M et al. p53 in breast cancer. Its relation to histological grade, lymph-node status, hormone receptors, cell-proliferation fraction (ki-67) and c-erbB-2. *Immunohistochemical study of 153 cases. Histol Histopathol.* 1995;10(3):531-539.
34. Rudolph P, Olsson H, Bonatz G et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J. Pathol.* 1999;187(2):207–216.
35. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist.* 2009;14:320–368.
36. Lin F, Baracat E, Carvalho F. Amplification of the Oncogene HER2 in Breast Cancer: Molecular Basis and Therapeutic Significance. *Journal of the Senologic International Society.* 2012;1(2)
37. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(1):18-43. doi: 10.1043/1543-2165.
38. Sauter G, Lee J, Bartlett JMS et al. Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1323-1333. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8197.
39. Sapino A, Goia M, Recupero D, Marchio C. Current challenges for HER2 testing in diagnostic pathology: state of the art and controversial issues. *Front Oncol.* 2013;3(129):1-9.
40. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S et al. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol.* 2005;205(5):577–584.
41. Dowsett M, Hanna WM, Kockx M et al. Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol.* 2007;20(5):584–591. doi:10.1038/modpathol.3800774.
42. Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol.* 2005;36(3):250–261. doi: 10.1016/j.humpath.2004.11.010.
43. Wolff AC, Hammond EM, Hick DG et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013.
44. Gokhale S, Gatalica Z, Mohammad A et al. FISH for HER-2/neu in breast cancer: Standardization makes the difference! *Indian J Cancer.* 2004;41(4):152-158.
45. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(12):5321-5325.
46. Provenzano E, Johnson N. Overview of recommendations of HER2 testing in breast cancer. *Diagn Histopathol.* 2009;15(10):478-484.

47. Pauletti G, Dandekar S, Rong HM et al. Assessment of Methods for Tissue-Based Detection of the HER-2/neu Alteration in Human Breast Cancer: A Direct Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 2000;18(21):3651-3664.
48. Shah S, Chen B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. *Patholog Res Int.* 2011; 2011: 903202. doi: 10.4061/2011/903202.
49. Dybdal NI, Leieberman G, Anderson S et al. Determination of HER2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization and concordance with the clinical trials immunohistochemical assay in women with metastatic breast cancer evaluated for treatment with trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;93(1):3–11. doi 10.1007/s10549-004-6275-8.
50. Kammori M, Kurabayashi R, Kashio M et al. Prognostic utility of fluorescence in situ hybridization for determining HER2 gene amplification in breast cancer. *Oncol Rep.* 2008;19(3):651-656.
51. Mass RD, Press MF, Anderson S et al. Evaluation of Clinical Outcomes According to HER2 Detection by Fluorescence In Situ Hybridization in Women with Metastatic Breast Cancer Treated with Trastuzumab. *Clin Breast Cancer.* 2005;6(3):240-246.
52. Dressler LG, Berry DA, Broadwater G et al. Comparison of HER2 Status by Fluorescence in Situ Hybridization and Immunohistochemistry to Predict Benefit From Dose Escalation of Adjuvant Doxorubicin- Based Therapy in Node-Positive Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol.* 2005;23(19):4287-4297. doi:10.1200/jco.
53. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1)13–20. doi:10.1002/ijc. 2910310104.
54. Lopez F, Belloc F, Lacombe F et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry.* 1991;12(1):42–49. doi:10.1002/cyto.990120107.
55. Harper-Wynne C, Ross G, Sacks N et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: a pilot study for breast cancer prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(7):614–621.
56. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;37(2):101–113. doi:10.1007/BF01806492.
57. Niikura N, Masuda S, Kumaki N et al. Prognostic Significance of the Ki67 Scoring Categories in Breast Cancer Subgroups. *Clin Breast Cancer.* 2014;14(5):323-29.
58. Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer.* 1993;29(7):1018–1023. doi:10.1016/S0959-8049(05)80215-1.
59. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. Strategies for subtypes e dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-1747. doi: 10.1093/annonc/mdr304.

60. Cheang MC, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736–750.
61. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro GJ et al. Ki67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1504–1513. doi: 10.1038/sj.bjc.6603756.
62. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *The Breast.* 2008;17(4):323-334. doi: 10.1016/j.breast.2008.02.002.
63. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1319–1329. doi: 10.1093/annonc/mdp322.
64. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol.* 2010;23(2):S60–S64. doi: 10.1038/modpathol.2010.33.
65. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9): 2206–2223. doi:10.1093/annonc/mdt303.
66. Fan C, Oh DS, Wessels L et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(6):560-569. doi: 10.1056/NEJMc062416.
67. Inic, Z, Zegarac M, Inic M 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;8:107-111. doi: 10.4137/CMO.S18006.
68. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A et al. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1533-1546. doi:10.1093/annonc/mdv221.
69. Falck AK, Ferno M, Bendahl PO, Ryden L. St Gallen molecular subtypes in primary breast cancer and matched lymph node metastases - aspects on distribution and prognosis for patients with luminal A tumours: results from a prospective randomised trial. *BMC Cancer.* 2013;13:558. doi:10.1186/1471-2407-13-558.
70. Brouckaert O, Laenen A, Vanderhaegen J et al: Applying the 2011 St Gallen panel of prognostic markers on a large single hospital cohort of consecutively treated. *Ann Oncol.* 2012;23(10):2578–2584. doi.org/10.1093/annonc/mds062.
71. Morrison DH, Rahardja D, King E et al. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(2):382–387. doi:10.1038/bjc.2012.219.
72. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):86–95. doi:10.1186/bcr1021.
73. Rapp UR, Ceteci F, Schreck R. Oncogene-induced plasticity and cancer stem cells. *Cell Cycle.* 2008;7(1):45–51. doi: 10.4161/cc.7.1.5203.

74. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB et al. Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–9344. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.
75. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Res.* 2006;66(4):1883-1890. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153.
76. Yoo YD, Kwon YT. Molecular mechanisms controlling asymmetric and symmetric self-renewal of cancer stem cells. *J Anal Sci Technol.* 2015;6(1):28. doi: 10.1186/s40543-015-0071-4.
77. Bu P, Chen KY, Lipkin SM, Shen X. Asymmetric division: a marker for cancer stem cells? *Oncotarget.* 2013;4(7):950–951. doi: 10.18632/oncotarget.1029.
78. Adams JM, Strasser A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 2008;68(11):4018-4021. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6334.73.
79. Hochster H, Shah MA, Wicha MS (2015). Key Concepts in Targeting Cancer Stem Cells To Manage Disease. [PowerPoint slides]. Retrieved from <http://slideplayer.com/slide/8855803/>
80. Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL. The cancer stem cell hypothesis: a work in progress. *Lab Invest.* 2006;86(12):1203–1207. doi: 10.1038/labinvest.3700488.
81. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730-737. doi:10.1038/nm0797-730.
82. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(7):3983–3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
83. McDermott SP, Wicha MS. Targeting Breast Cancer Stem Cells. *Mol Oncol.* 2010;4(5):404–419. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.005.
84. Chen K, Huang YH, Chen JL. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):732-740. doi: 10.1038/aps.2013.27.
85. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555–67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.
86. Zhong Y, Shen S, Zhou Y et al. ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD24- phenotype. *Med Oncol.* 2014;31(3):864. doi: 10.1007/s12032-014-0864-0.
87. Collina F, Di Bonito M, Bergolis VL et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cells Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *BioMed Res Int.* 2015;2015:158682. doi:10.1155/2015/158682
88. Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res.* 2013;5(6):563-581.
89. Martin TA, Jiang WG. Evaluation of the expression of stem cell markers in human breast cancer reveals a correlation with clinical progression and metastatic disease in ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;31(1):262-272. doi: 10.3892/or.2013.2813.

90. Imrich S, Hachmeister M, Gires O. EpCam and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr.* 2012;6(1):30–38. doi: 10.4161/cam.18953.
91. de Beca F, Caetano P, Gerhard R et al. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol.* 2013;66(3):187-191. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201169.
92. Miyoshi Y, Shien T, Ogiya A et al. Differences in expression of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 among estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer cases with early, late, and no recurrence *Breast Cancer Res.* 2016;18:73. doi 10.1186/s13058-016-0731-3
93. Zheng R, Wang J, Wu Q, et al. Expression of ALDH1 and TGFβ2 in benign and malignant breast tumors and their prognostic implications. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4173-4183.
94. Currie MJ, Beardsley BE, Harris GC et al. Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in invasive breast carcinoma and associated ductal carcinoma in situ: relationships with markers of tumor hypoxia and microvasculature. *Hum Pathol.* 2013;44(3):402-411. doi: 10.1016/j.humpath.2012.06.004.
95. Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S et al. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract.* 2006;202(8):569-576.
96. Cimino A, Halushka M, Illei P et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(3):701–708. doi:10.1007/s10549-009-0671-z.
97. Kwon MJ, Han J, Seo JH et al. CD24 Overexpression Is Associated with Poor Prognosis in Luminal A and Triple-Negative Breast Cancer. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139112. doi:10.1371/journal.pone.0139112.
98. Al-Ejeh F, Smart CA, Morrison BJ et al. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. *Carcinogenesis* 2011;32(5):650–658. doi:10.1093/carcin/bgr028.
99. Horimoto Y, Arakawa A, Sasahara N et al. Combination of Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24 Is Superior to ALDH1 as a Prognostic Indicator in Breast Cancer Patients with Distant Metastases. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165253. doi:10.1371/journal.pone.0165253.
100. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA et al. CD44⁻ /CD24⁺ phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(3):979-995. doi: 10.1007/s10549-011-1865-8.
101. Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH et al. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *Breast.* 2011;20(1):78-85. doi: 10.1016/j.breast.2010.08.00.
102. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K et al. Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4234-4241. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1479.

103. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53. doi:10.1186/bcr2108
104. Hashimoto K, Shimizu C, Tsuda H et al. Immunohistochemical detection of breast cancer stem cells in hormone receptor-positive breast cancer and their role in response to endocrine therapy and clinical outcome. *Oncology.* 2012;82(3):168-174. doi: 10.1159/000336078.
105. Kapucuoglu N, Bozkurt KK, Baspinar S et al. The clinicopathological and prognostic significance of CD24, CD44, CD133, ALDH1 expressions in invasive ductal carcinoma of the breast: CD44/CD24 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2015;211(10):740-747. doi: 10.1016/j.prp.2015.05.011.
106. Atkinson RL, Yang WT, Rosen DG et al. Cancer stem cell markers are enriched in normal tissue adjacent to triple negative breast cancer and inversely correlated with DNA repair deficiency. *Breast Cancer Res.* 2013;15(5):R77. doi: 10.1186/bcr3471.
107. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (eds). *AJCC Cancer Staging Handbook.* 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2010.
108. Dowsett M, Nielsen TO, Ahern R et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656–1664. doi: 10.1093/jnci/djr393.
109. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM et al. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6): R118F. doi: 10.1186/bcr3061.
110. Abd El-Maqsoud NM, Abd El-Rehim DM. Clinicopathologic Implications of EpCAM and Sox2 Expression in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2014;14(1):e1-9. doi: 10.1016/j.clbc.2013.09.006.
111. Kearney L. The impact of the new FISH technologies on the cytogenetics of haematological malignancies. *Br J Haematol.* 1999;104(4):648–658. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01181.x
112. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue. *The Journal of molecular diagnostics: JMD.* 2006;8(2):141-151. doi:10.2353/jmoldx.2006.050083.
113. Bishop R. Applications of fluorescence in situ hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons.* 2010;3(1):85-95
114. Ratan Z, Zaman S, Mehta V et al. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus.* 2017;9(6): e1325. doi 10.7759/cureus.1325
115. Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A et al. Improved Procedure for Fluorescence In Situ Hybridization on Tissue Microarrays. *Cytometry.* 2001;45(2):83–86.
116. Hyytinen E, Visakorpi T, Kallioniemi A et al. Improved Technique for Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumors by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cytometry.* 1994;16(2):93-99. doi: 10.1002/cyto.990160202.

117. Bartlett JMS, Starczynski J, Atkey N et al. HER2 testing in the UK: recommendations methods for breast and gastric in-situ hybridization. *J Clin Pathol*. 2011;64:649-653. doi:10.1136/jcp.2011.089847.
118. Khoury T, Sait S, Hwang H et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol*. 2009; 22, 1457–1467; doi:10.1038/modpathol.2009.117.
119. Petersen BL, Sorensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence In Situ Hybridization on Formalin-fixed and Paraffin-Embedded Tissue: Optimizing the Method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:259–65.
120. Chin SF, Daigo Y, Huang HE et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol*. 2003;56(5):275-279.
121. Kernohan KD, Berube NG. Three dimensional dual labelled DNA fluorescent in situ hybridization analysis in fixed tissue sections. *Methodsx*. 2014;1:30-35. doi: 10.1016/j.mex.2014.04.001.
122. Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA*. 2004;291(16):1972-1977. doi:10.1001/jama.291.16.1972.
123. Rakha EA, Pinder SE, Bartlett JMS et al. Updated UK Recommendations for HER2 assessment in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2015;68(2):93-99. doi: 10.1136/jclinpath-2014-202571.
124. Walker RA, Bartlett JM, Dowsett M et al. HER2 testing in the UK: further update to recommendations. *J Clin Pathol*. 2008;61(7):818-824. doi: 10.1136/jcp.2007.054866
125. Perez EA, Cortes J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JMS. HER2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(2):276–284. doi: 10.1016/j.ctrv.2013.09.001.
126. Ellis CM, Dyson MJ, Stephenson TJ, Maltby EL. HER2 amplification status in breast cancer: a comparison between immunohistochemical staining and fluorescence in situ hybridisation using manual and automated quantitative image analysis scoring techniques. *J Clin Pathol* 2005;58(7):710–714. doi: 10.1136/jcp.2004.023424.
127. Bilous M, Dowsett M, Hanna W et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol* 2003;16(2):173–182. doi: 10.1097/01.MP.0000052102.90815.82
128. Tubbs RR, Pettay JD, Roche PC et al. Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J Clin Oncol*. 2001;19(10):2714–2721. doi: 10.1200/JCO.2001.19.10.2714.
129. Press MF, Sauter G, Bernstein L et al. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(18):6598–6607. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-05-0636.
130. Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu Protein Overexpression by Immunohistochemistry Often Does Not Predict Oncogene

- Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization. *Hum Pathol* 2003;34(10):1043-7.
131. Nitta H, Kelly BD, Allred C et al. The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future. *Pathol Int.* 2016;66(6):313–324. doi: 10.1111/pin.12407
 132. Lebeau A, Deimling D, Kaltz C et al. HER-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: Comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Oncol.* 2001;19:354-363. doi: 10.1200/jco.2001.19.2.354
 133. Perez EA, Roche PC, Jenkins RB et al. HER-2/neu testing in patients with breast cancer: Poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc.* 2002;77(2):148-154. doi: 10.4065/77.2.148.
 134. Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. *Mod Pathol.* 2000;13(8):866-873. doi: 10.1038/modpathol.3880154.
 135. Couturier J, Salomon AV, Nicolas A et al. Strong correlation between results of fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry for the assessment of the ERBB2 (HER-2/neu) gene status in breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2000;13(11):1238–1243. doi: 10.1038/modpathol.3880228.
 136. Jacobs T, Gown A, Yaziji H et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(7):1974–82. doi: 10.1200/JCO.1999.17.7.1974.
 137. Sui W, Ou M, Chen J et al. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2009;7:83. doi:10.1186/1477-7819-7-83.
 138. Dendukuri N, Khetani K, Mclsaac M, Brophy J. Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *CMAJ.* 2007;176(10):1429–1434. doi: 10.1503/cmaj.061011.
 139. Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer.* 2004;5(1):63-69.
 140. Varga Z, Noske A, Ramach C et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: overall positivity rate and accuracy by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a single institution over 12 years: a quality control study. *BMC Cancer.* 2013;13:615. doi: 10.1186/1471-2407-13-615.
 141. Sarode VR, Xiang QD, Christie A et al. Evaluation of HER2/neu Status by Immunohistochemistry Using Computer-Based Image Analysis and Correlation With Gene Amplification by Fluorescence In Situ Hybridization Assay: A 10- Year Experience and Impact of Test Standardization on Concordance Rate. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(7):922-928. doi: 10.5858/arpa.2014-0127-OA.
 142. Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G et al. HER-2/neu assessment in breast cancer using the original FDA and new ASCO/CAP guidelines recommendation: impact in selecting patients for Herceptin therapy. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(6):907-911. doi: 10.1309/md79cdxn1d01e862.

143. Roche PC, Suman VJ, Jenkins RB et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the Breast Intergroup Trial N9831. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(11):855-857.
144. Hanna WM, Ruschoff J, Bilous M et al. HER2 in situ hybridization in breast cancer: clinical implications of polysomy 17 and genetic heterogeneity. *Mod Pathol.* 2014;27(1):4–18. doi:10.1038/modpathol.2013.103.
145. Downey L, Livingston RB, Koehler M et al. Chromosome 17 Polysomy without Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Amplification Does Not Predict Response to Lapatinib Plus Paclitaxel Compared with Paclitaxel in Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(4):1281-1288. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1643.
146. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C et al. Correction for chromosome-17 is critical for the determination of true Her-2/neu gene amplification status in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(10):2572–2579. doi: 10.1158/1535-7163.mct-06-0129.
147. Hyun CL, Lee HE, Kim KS et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2008;61:317–321. doi:10.1136/jcp.2007.050336
148. Vanden Bempt I, Van LP, Drijkoningen M et al. Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing. *J Clin Oncol.* 2008;26(30):4869–4874. doi: 10.1200/JCO.2007.13.4296.
149. Gown AM. Current issues in ER and HER-2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 2008;21(Suppl 2):S8–S15. doi: 10.1038/modpathol.2008.34.
150. Wang S, Saboorian MH, Frenkel E et al. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol.* 2000;53(5):374–381.
151. Panjwani P, Epari S, Karpate A et al. Assessment of HER-2/neu status in breast cancer using fluorescence in situ hybridization & immunohistochemistry: Experience of a tertiary cancer referral centre in India. *Indian J Med Res.* 2010;132:287-294.
152. Onody P, Bertrand F, Muzeau F et al. Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemical Assays for HER-2/ neu Status Determination. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(6):746–750.
153. Qiao EQ, Ji M, Wu J et al. Joint detection of multiple immunohistochemical indices and clinical significance in breast cancer. *Mo Clinl Onco.* 2013;1(4):703-710. doi:10.3892/mco.2013.111.
154. Shokouh TZ, Ezatollah A, Barand P. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study. *Medicine.* 2015;94(32):e1359. doi:10.1097/MD.0000000000001359.
155. Zhou P, Jiang YZ, Hu X et al. Clinicopathological characteristics of patients with HER2-positive breast cancer and the efficacy of trastuzumab in the People's Republic of China. *Onco Targets Ther.* 2016;9:2287-2295. doi:10.2147/OTT.S97583.

156. Bartlett JM, Ellis IO, Dowsett M et al. Human epidermal growth factor receptor 2 status correlates with lymph node involvement in patients with estrogen receptor (ER) negative, but with grade in those with ER-positive early-stage breast cancer suitable for cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4423-4430. doi: 10.1200/JCO.2007.11.0973.
157. Hu L, Ru K, Zhang L et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomark Res.* 2014;2(1):3. doi:10.1186/2050-7771-2-3.
158. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.
159. Prat A, Cheang MC, Martin M et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203-209. doi:10.1200/JCO.2012.43.4134.
160. Nielsen TO, Parker JS, Leung S et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5222-5232. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1282.
161. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2(5):444-455.
162. Parise CA, Caggiano V. Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers. *Journal of Cancer Epidemiology*, vol. 2014, Article ID 469251, 11 pages, 2014. doi:10.1155/2014/469251
163. Xue C, Wang X, Peng R et al. Distribution, clinicopathologic features and survival of breast cancer subtypes in Southern China. *Cancer Sci.* 2012;103(9):1679-1687. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02339.x
164. 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. doi:10.3121/cm.2009.825
165. Lv M, Li B, Li Y et al. Predictive Role of Molecular Subtypes in Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients in Northeast China. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2011;12(9):2411-2417.
166. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(10):1974-1981.
167. Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295(21):2492–2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
168. Jitariu A-A, Cîmpean AM, Ribatti D, Raica M. Triple negative breast cancer: the kiss of death. *Oncotarget.* 2017;8(28):46652-46662. doi:10.18632/oncotarget.16938.
169. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(20):1938–1948. doi: 10.1056/NEJMra1001389.

170. Qiao EQ, Ji M, Wu J et al. Joint detection of multiple immunohistochemical indices and clinical significance in breast cancer. *Mo Clinl Onco*. 2013;1(4):703-710. doi:10.3892/mco.2013.111.
171. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–111. doi: 10.1038/35102167.
172. Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997;124(10):1929–1939.
173. DA Cruz Paula A, Marques O, Rosa AM et al. Implications of Different Cancer Stem Cell Phenotypes in Breast Cancer. *Anticancer Res*. 2017;37(5):2173-2183. doi: 10.21873/anticancer.11552.
174. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010;120(1):41-50. doi:10.1172/JCI41004.
175. Diehn M, Cho RW, Lobo NA et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*. 2009;458(7239):780-783. doi: 10.1038/nature07733.
176. Jang GB, Hong IS, Kim RJ et al. WNT/ β -catenin small-molecule inhibitor CWP232228 preferentially inhibits the growth of breast cancer stem-like cells. *Cancer Res*. 2015;75(8):1691-1702. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2041.
177. Yamashita YM, Yuan H, Cheng J, Hunt AJ. Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(1):a001313. doi: 10.1101/cshperspect.a001313.
178. Li Z, Yin S, Zhang L et al. Clinicopathological characteristics and prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in breast cancer: a meta-analysis. *OncoTargets Tther*. 2017;10:859-870. doi:10.2147/ott.s124733.
179. Gupta PB, Filmore CM, Jiang G et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-644. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.026.
180. Kunju LP, Cookingham C, Toy KA et al. EZH2 and ALDH-1 mark breast epithelium at risk for breast cancer development. *Modern Pathol*. 2011;24(6):786-793. doi: 10.1038/modpathol.2011.8.
181. Park SY, Lee HE, Li H et al. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(3):876. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1532.
182. Guan X, Shi A, Han Lu et al. Expression of Stem Cells Marker ALDH1 in Premalignant Lesions, Cancer, Benign Hyperplasia and Normal Duct of Human Breast. *Adv Cancer Prev*. 2016;1:107. <http://dx.doi.org/10.4172/2472-0429.1000107>.
183. DA Cruz Paula A, Marques O, Rosa AM et al. Co-expression of Stem Cell Markers ALDH1 and CD44 in Non-malignant and Neoplastic Lesions of the Breast. *Anticancer Res*. 2014;34(5):1427-1434.
184. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Lovino F et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*. 2009;69(4):1302-1313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741.

185. Tume L, Paco K, Ubidia-Incio R, Moyab J. CD133 in breast cancer cells and in breast cancer stem cells as another target for immunotherapy. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2016;15(1):22-30
186. Jang MH, Kang HJ, Jang KS et al. Clinicopathological analysis of CD44 and CD24 expression in invasive breast cancer. *Oncol Lett*. 2016;12(4):2728-2733. doi:10.3892/ol.2016.4987.
187. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011;64:937-946. doi: 10.1136/jcp.2011.090456.
188. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007;11(3):259-73. doi: 10.1016/j.ccr.2007.01.013.
189. Bernardi M, Logullo AF, Pasini FS et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep* 2012;27(1):28-38. doi: 10.3892/or.2011.1477.
190. Abraham BK, Fritz P, McClellan M et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1154-1159.
191. Camerlingo R, Ferraro GA, De Francesco F et al. The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer. *Oncol Rep*. 2014;31(3):1127-1132. doi: 10.3892/or.2013.2943.
192. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2012, Article ID 708036, 11 pages, 2012. doi:10.1155/2012/708036.
193. Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E et al. CD24 Expression Is a New Prognostic Marker in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):4906–4913.
194. Wang Z, Wang Q, Wang Q, Wang Y, Chen J. Prognostic significance of CD24 and CD44 in breast cancer: a meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 2017;32(1):e75-e82. doi: 10.5301/ijbm.5000224.
195. Han Z, Chen Z, Zheng R et al. Clinicopathological significance of CD133 and CD44 expression in infiltrating ductal carcinoma and their relationship to angiogenesis. *World J Surg Oncol*. 2015;13:56. doi: 10.1186/s12957-015-0486-9
196. Mansour SF, Atwa MM. Clinicopathological Significance of CD133 and ALDH1 Cancer Stem Cell Marker Expression in Invasive Ductal Breast Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7491-7496.
197. Yang F, Cao L, Sun Z et al. Evaluation of Breast Cancer Stem Cells and Intratumor Stemness Heterogeneity in Triple-negative Breast Cancer as Prognostic Factors. *Int J Biol Sci*. 2016;12(12):1568-1577. doi:10.7150/ijbs.
198. Kim SJ, Kim YS, Jang ED et al. Prognostic impact and clinicopathological correlation of CD133 and ALDH1 expression in invasive breast cancer. *J Breast Cancer*. 2015;18(4):347-355. doi:10.4048/jbc.2015.18.4.347.
199. Zhao P, Lu Y, Jiang X, Li X. Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Sci* 2011;102(5):1107-1111. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01894.x.
200. Ieni A, Giuffre G, Adamo V, Tuccari G. Prognostic impact of CD133 immunoexpression in node-negative invasive breast carcinomas. *Anticancer Res*. 2011;31(4):1315-1320.

201. Nadal R, Ortega FG, Salido M et al. CD133 expression in circulating tumor cells from breast cancer patients: potential role in resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*. 2013;133(10):2398-407. doi: 10.1002/ijc.28263.
202. Han L, Gao X, Gu X et al. Prognostic significance of cancer stem cell marker CD133 expression in breast cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2017;10(3):4829-4837. www.ijcem.com /ISSN:1940-5901/IJCEM0046490.
203. Magni M, Shammah S, Schiro R et al. Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood*. 1996;87(3):1097-1103.
204. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(31):11707-11712. doi: 10.1073/pnas.0603806103.
205. Lawson DA, Bhakta NR, Kessenbrock K et al. Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature*. 2015;526(7571):131–135. doi: 10.1038/nature15260.
206. Ye X, Tam WL, Shibue T et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*. 2015;525(7568):256–260. doi: 10.1038/nature14897.
207. Liu S, Cong Y, Wang D et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Rep*. 2014;2(1):78–91. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.009.
208. Morimoto K, Kim SJ, Tanei T et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*. 2009;100(6):1062-1068. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01151.x.
209. Kida K, Ishikawa T, Yamada A et al. Effect of ALDH1 on prognosis and chemoresistance by breast cancer subtype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;156(2):261–269. doi: 10.1007/s10549-016-3738-7.
210. Yao J, Jin Q, Wang X et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression is correlated with poor prognosis in breast cancer. *Medicine*. 2017;96(25):e7171. doi:10.1097/md.00000000000007171.
211. Pan H, Wu N, Huang Y et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression correlates with the invasion of breast cancer. *Diagn Pathol*. 2015;10:66. doi: 10.1186/s13000-015-0301-5.
212. Madjd Z, Ramezani B, Molanae S, Asadi-Lari M. High Expression of stem cell marker ALDH1 is associated with reduced BRCA1 in invasive breast carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(6):2973-2978.
213. Lee HE, Kim JH, Kim YJ et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(11):1730-8. doi: 10.1038/bjc.2011.159.
214. Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandrasekhar R et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy. *Mod Pathol*. 2012;25(3):388–397. doi: 10.1038/modpathol.2011.172.

215. Ma F, Li H, Li Y et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Yang. H, ed. Medicine*. 2017;96(14):e6561. doi:10.1097/MD.0000000000006561.
216. Liu Y, Lv DL, Duan JJ et al. ALDH1A1 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:444. doi: 10.1186/1471-2407-14-444.
217. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K et al. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res*. 2004;64:5818–5824. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0754.
218. Spizzo G, Gastl G, Wolf D et al Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. *Br J Cancer*. 2003;88:574-578. doi: 10.1038/sj.bjc.6600741.
219. Braun S, Hepp F, Kentenich CR, et al Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3999-4004.
220. Schmidt M, Scheulen ME, Dittrich C et al. An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2010;21(2):275-282. doi: 10.1093/annonc/mdp314.
221. Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M et al. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18): 5849–5855. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0669.
222. Hiraga T, Ito S, Nakamura H. EpCAM expression in breast cancer cells is associated with enhanced bone metastasis formation. *Int J Cancer*. 2016;138(7):1698–1708. doi: 10.1002/ijc.29921.
223. Lu X, Li H, Xu K et al. MUC-1-/ESA+ progenitor cells in normal, benign and malignant human breast epithelial cells. *Histol Histopathol*. 2009;24(11):1381-1390. doi: 10.14670/HH-24.1381.
224. Spizzo G, Obrist P, Ensinger C et al. Prognostic significance of Ep- CAM AND Her- 2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;98(6):883-888.
225. Cimino A, Halushka M, Illei P et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is overexpressed in breast cancer metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;123(3):701-708. doi:10.1007/s10549-009-0671-z.
226. Soysal SD, Muenst S, Barbie T, et al. EpCAM expression varies significantly and is differentially associated with prognosis in the luminal B HER2+, basal-like, and HER2 intrinsic subtypes of breast cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(7):1480-1487. doi:10.1038/bjc.2013.80.
227. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. 2008; 27:6120–6130. [PubMed: 18591932.

228. Korkaya H, Wicha MS. HER2 and breast cancer stem cells: More than meets the eye. *Cancer Res.* 2013;73(12):3489–3493. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0260.
229. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ et al. Expression of breast cancer stem cell markers as predictors of prognosis and response to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer.* 2016;114:1109–1116. doi:10.1038/bjc.2016.101
230. Hosonaga M, Arima Y, Sugihara E et al. Expression of CD24 is associated with HER2 expression and supports HER2-Akt signaling in HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2014;105(7):779-787. doi: 10.1111/cas.12427. Epub 2014 Jun 2.