Obilježja bazalne membrane u neinvazivnom duktalnom karcinomu dojke

Ahec, Arijana

Master's thesis / Diplomski rad

2009

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:331698

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Arijana Ahec

Obilježja bazalne membrane u neinvazivnom duktalnom karcinomu dojke

Diplomski rad

Zagreb, 2009

Ovaj diplomski rad predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Ovaj rad je izrađen u Klinici za tumore pod voditeljstvom doc. dr. sc. Fabijana Kneževića i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić.

Zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Fabijanu Kneževiću na nesebičnoj pomoći i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Oršolić koja mi je svojim velikim znanjem i iskustvom pomogla u izradi ovog rada.

Zahvaljujem Snježani Ramić, dipl. ing. biol. što mi je za vrijeme izrade mog rada pružila podršku i savjetovala me.

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

OBILJEŽJA BAZALNE MEMBRANE U NEINVAZIVNOM DUKTALNOM KARCINOMU DOJKE

Arijana Ahec
Klinika za tumore
Ilica 197,10000 Zagreb

SAŽETAK

U ovom radu analizirani su podatci dobiveni od 36 pacijentica operiranih na Klinici za tumore 2006. i 2007. godine. Kod svih 36 pacijentica dijagnosticiran je DCIS, a u 12 pacijentica prisutna je dijagnoza mikroinvazivnog karcinoma. Cilj rada bio je imunohistokemijskom metodom utvrditi izraženost poliklonalnog i monoklonalnog anti-laminina u primarnom tumoru dojke, te odrediti njihovu značajnost prema pojavnosti mikroinvazije. Kod pacijentica je također analizirana i značajnost prognostičkih čimbenika dobi, stupnja diferenciranosti tumora te statusa hormonskih receptora estrogena i progesterona i HER2 u odnosu na izraženost laminina i pojavnost mikroinvazije. Srednja dob pacijentica bila je 56,5 godina. Rezultati su pokazali da je poliklonalni anti-laminin značajan prognostički čimbenik određivanja cjelovitosti bazalne membrane i pojavnosti mikroinvazije ($p=0,00026$) u donosu na monoklonalni laminin koji nema prognostički značaj određivanja cjelovitosti bazalne membrane kao ni značajan odnos prema pojavnosti mikroinvazije ($p=0,23765$) ($p<0,05$). Ostali prognostički čimbenici nisu pokazali značajnost s pojavnošću mikroinvazije kod DCIS. Poliklonalni anti-laminin pokazatelj je cjelovitosti bazalne membrane te se može koristiti kao biljeg pri utvrđivanju mikroinvazivnog karcinoma dojke.

(45 stranice, 8 slika, 5 tablica, 38 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Ključne riječi: DCIS, laminin, bazalna membrana, mikroinvazija

Voditelji: dr. sc. Fabijan Knežević, doc.; dr. sc. Nada Oršolić, prof.

Ocjenjivači: dr. sc. Fabijan Knežević, doc.; dr. sc. Nada Oršolić, prof.; dr. sc. Biserka Prugovečki, prof.; dr. sc. Ines Radanović, doc.; dr. sc. Antonija Hergold-Brundić.

Rad je prihvaćen: 15. listopada 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Diploma thesis

FEATURES OF BASEMENT MEMBRANE IN NON-INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER

Arijana Ahec
Hospital for tumors
Ilica 197,10000 Zagreb

ABSTRACT

In this work we analyzed data obtained from case-history of 36 patients operated in Hospital for tumors, Zagreb in period 2006 till 2007 year. Ductal breast cancer in situ (DCIS) were diagnosed in 24 patients while in 12 patient's diagnosis was ductal micro invasive breast cancer. Aim of thesis was to define expression of polyclonal and monoclonal anti-laminin antibodies on basement membrane of duct's in breast cancer using immunohistochemical method. We investigated whether loss of laminin in basement membrane can be a predictive marker for micro invasiveness. We also investigated association between prognostic factors as age of patients, tumor differentiation stage, steroid hormone receptors and HER2 status with anti-laminin expression and micro invasion appearance. Average age of patients was 56.5 years. The results showed that polyclonal anti-laminin is an important predictive factor of micro invasion appearance in DCIS ($p=0,00026$) comparing to monoclonal anti-laminin ($p=0,23765$) ($p<0,05$). Other prognostic factors had no significance in micro invasion, neither the importance towards laminin expression on basement membrane. Polyclonal anti-laminin found to be a good indicator of the basement membrane integrity and can be used as predictive marker of micro invasion appearance at DCIS.

(45 pages, 8 figures, 5 tables, 38 references, original in Croatian language)

Keywords: DCIS, laminin, basement membrane, microinvasion

Supervisors: dr. sc. Fabijan Knežević, Asst. Prof.; dr. sc. Nada Oršolić, Assoc. Prof..

Reviewers: dr. sc. Fabijan Knežević, Asst. Prof.; dr. sc. Nada Oršolić, Assoc. Prof.; dr. sc. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.; dr. sc. Ines Radanović, Asst. Prof.; dr. sc. Antonija Hergold-Brundić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 15 th on October, 2009

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Građa dojke 2

1.1.1. Embriologija dojke 2
1.1.2. Anatomija dojke 3
1.1.3. Fiziologija dojke 4
1.1.4. Bazalne lamine i bazalne membrane 5

1.2. Rak dojke 7

1.2.1. Podjela tumora dojke 9
1.2.1.1. Duktalni karcinom *in situ* 10
1.2.1.2. Mikroinvazivni karcinom dojke 11
1.2.2. Histološki stupanj diferenciranosti tumora (gradus) 11
1.2.3. Hormonski receptori 11
1.2.4. Epidermalni receptor za čimbenik rasta 2 12

1.3. Imunohistokemijska metoda 14

1.4. Ciljevi rada 19

2. MATERIJAL I METODE 20

2.1. Materijal 21

2.1.1. Pacijentice 21

2.2. Metode 22

2.2.1. Obrada biološkog uzorka 22
2.2.2. Primarna protutijela 22
2.2.3. Očitavanje reakcije 22

2.3. Statistička obrada podataka 23

3. REZULTATI 24

3.1. Raspon dobi u istraživanoj skupini 25

3.2. Analiza kliničkih i laboratorijskih podataka pacijentica 27

3.3. Statistička obrada podataka ANOVA testom 30

3.4. Analiza podataka testom Spearmanove korelacije 31

3.5. Analiza podataka Mann Whitney U testom 31

4. RASPRAVA 35

5. ZAKLJUČCI 40

6. POPIS LITERATURE 42

1. UVOD

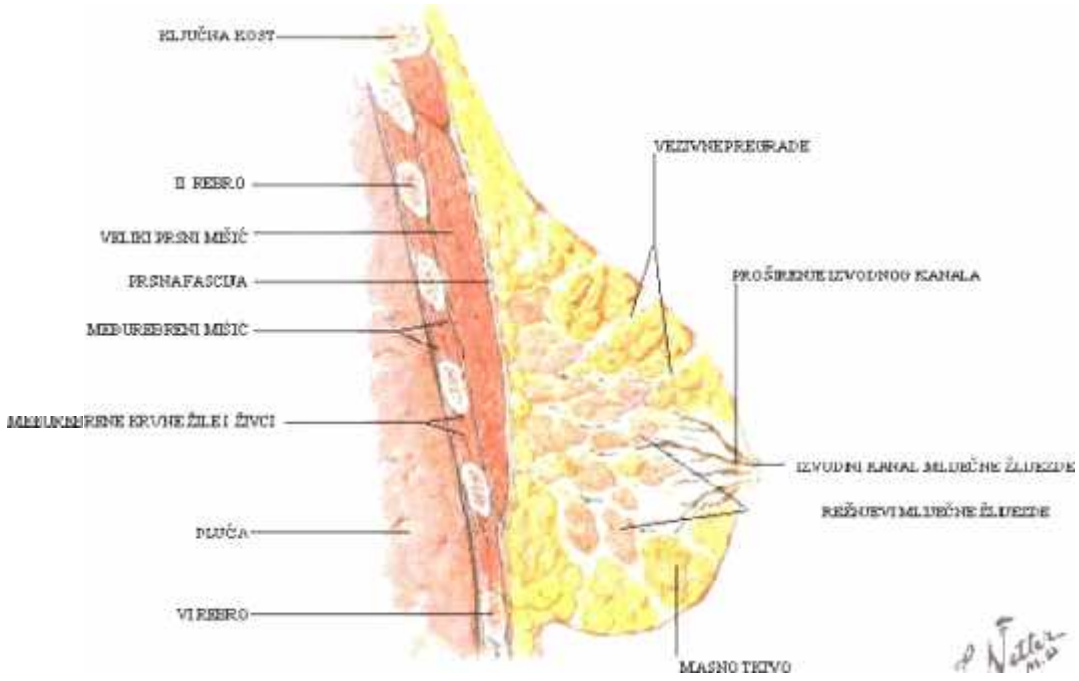
1.1. Građa dojke

1.1.1. Embriologija dojke

Dojka ili mliječna žlijezda (lat. mamma, grč. mastos) najveća je kožna žlijezda. U žena se počinje intenzivno razvijati u pubertetu, ali potpuni stupanj razvitka doseže tek za vrijeme trudnoće i dojenja (Duančić i Posinovec, 1990). Krajem prvog mjeseca embrionalnog razvitka, duž ventrolateralne strane trupa, od osnove ruke do osnove noge, razvijaju se mliječne pruge. Od njihovih kranijalnih dijelova razvijaju se mliječne žlijezde. Urastanjem zadebljanog epidermisa u mezenhim iz njegovog distalnog dijela izrasta niz epitelnih tračaka, od kojih se razviju glavni odvodni kanali režnjeva mliječne žlijezde (ducti lactiferi) (Sperof i sur., 1994). Potkraj fetalnog života epitelni tračci se razgranavaju i u njima se pojavljuju lumeni. Prema vani, ducti lactiferi se otvaraju u udubinu, od koje se, kratko nakon rođenja, formira bradavica, proliferacijom mezenhima iz dubine. Grananje epitelnih tračaka, koji predstavljaju buduće mliječne kanaliće, nastavlja se i nakon rođenja. Kod muškaraca, grananje prestane prije puberteta, pa mliječna žlijezda ostane nerazvijena. Kod žene se, u doba puberteta, dioba epitelnih tračaka nastavlja, uz istodobno gomilanje masnog tkiva. Konačno razgranjenje i formiranje žljezdanih dijelova i njihova diferencijacija u smjeru sekrecije, završava za vrijeme trudnoće, a u starosti nastupa senilna involucija (Sperof i sur., 1994; Duančić i Posinovec, 1990). Zbog opisane građe – čvrsto žljezdano i vezivno, a mekano masno tkivo – dojka se pri opipu doima kao skup malih i većih grudica i kvržica. To je važno znati, jer upravo to u neupućenih žena izaziva nedoumice i strah od raka (Margaritoni, 1993).

1.1.2. Anatomija dojke

Regio mammaria nalazi na postraničnom dijelu prednje strane prsnog koša, a prostire se od drugog do sedmog rebra. Glavna tvorba u toj regiji je dojka, mamma (Krmpotić – Nemanić i Marušić, 2004). Većinom je smještena između drugog i sedmog rebra, te između lateralnog ruba prsne kosti i srednje pazušne linije (regio mammalis). Korijen dojke (radix mammae) se nalazi u području ispod drugog rebra i nastavlja se u trup (corpus mammae). Dojka je obložena kožom koja u donjem dijelu čini oštar prijevoj, poput žlijeba (sulcus submammalis) i prelazi u kožu prsnog koša. Na vrhu dojke je bradavica (mamilla mammae), izbočina promjera i visine oko centimetar, kroz koju izlaze izvodni kanali mliječne žlijezde. Oko bradavice je kružno pigmentirano područje (areola mammae) (Nikolić, 1992). Dojku oblikuje žljezdano tkivo mliječne žlijezde (glandula mammaria) uloženo u vezivnu stromu i obloženo masnim tkivom (Slika 1).



Slika 1. Dojka, sagitalni presjek

Mliječnu žlijezdu čini 10 do 20 alveotubuloznih žlijezda, od kojih svaka ima izvodni kanal (ductus lactiferus) koji se svaki posebno otvara na bradavici dojke. Režnjevi se dijele na režnjiće (lobuli glandulae mammariae) odijeljene vezivnim pregradama. Režnjevi i njihovi izvodni kanali poredani su zrakasto oko bradavice, pa otud pravilo da svaki kirurški rez dojke ide radijalno prema bradavici. Izvodni kanal proširuje se prije ulaska u bradavicu u 5 do 9 milimetara široki sinus (sinus lactiferus), nakon čega se opet suzuje prije otvaranja na bradavici. Dojka je dobro opskrbljena krvnim i limfnim žilama (Margaritoni, 1993).

1.1.3. Fiziologija dojke

Dojka je u muškaraca rudimentirani organ, a u žena je dio spolnog aparata, koji luči mlijeko i omogućava prehranu dojenčeta djelovanjem niza hormona (Nikolić, 1992). Estrogeni u pubertetu ciklički potiču rast strome i kanalića, kao i odlaganje masti koja povećava volumen dojke. Potpuni razvoj dojke događa se u trudnoći. Placenta u trudnoći luči velike količine estrogena, koji dovode do grananja i rasta sustava kanalića, povećanja strome i ulaganja masti. Na rast sustava kanalića utjecaj imaju još najmanje četiri hormona: hormon rasta, prolaktin, glukokortikoidi nadbubrežne žlijezde i inzulin. Estrogen i progesteron imaju i specifično inhibitorno djelovanje na lučenje mlijeka. Prolaktin koji luči hipofiza majke potiče lučenje mlijeka, koncentracija mu se neprestano povećava od 5. tjedna trudnoće do porođaja. Pri porodu koncentracija prolaktina je 10 puta veća od normalne. Placenta na lučenje mlijeka utječe i lučenjem velike količine somatotropina koji djeluje blago laktogeno. Nakon poroda prestaje lučenje estrogena i progesterona, što omogućava da dođe do izražaja laktogeni učinak prolaktina.

Dva do tri dana nakon poroda počinje obilno lučenje mlijeka, za što je osim prolaktina potrebno postojanje hormona rasta, glukokortikoida nadbubrežne žlijezde i paratiroidnog hormon. Mlijeko se neprekidno luči u alveole mliječnih žlijezda, a u kanaliće, tj. do dojenčeta, dolazi kombiniranim, neurogenim i hormonskim podražajem oksitocinom. Oksitocin uzrokuje kontrakciju mioepitelnih stanica koje čine vanjski sloj stanica acinusa dojke (Guyton i Hall, 2003).

1.1.4. Bazalne lamine i bazalne membrane

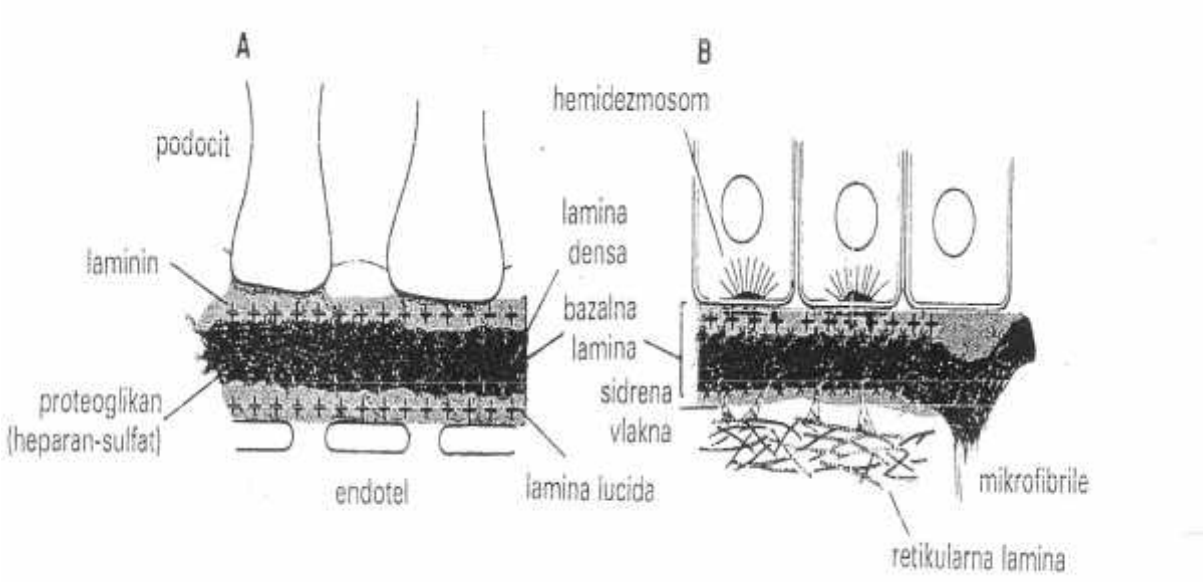
Sve epitelne stanice koje leže na podlozi od vezivnog tkiva imaju na svojoj bazalnoj plohi sloj izvanstanične tvari koja se naziva bazalna lamina. Ona se vidi samo elektronskim mikroskopom i čini gusti sloj nježne mreže tankih vlakanaca. Bazalna lamina može s jedne ili s obje strane mreže tankih vlakanaca imati i svijetli sloj. Bazalne lamine su uglavnom građene od kolagena tipa IV, glikoproteina laminina i proteoglikana. Bazalna lamina je s vanjske strane pričvršćena uz vezivno tkivo tzv. sidrenim vlakancima, izgrađenim od posebne vrste kolagena (tip VII) i snopova mikrofibrila, koje su u koži dio elastičnog sustava vlakana.

Prodor tumorskih stanica kroz bazalnu laminu je mjerilo njihove invazivnosti pa je za patologa to važan pokazatelj invazivnosti tumora. Epitelno tkivo smješteno je iznad vezivnog, te je odvojeno od njega strukturom koja se naziva bazalna membrana. Bazalna membrana je deblja od bazalne lamine, jer nastaje stapanjem dviju bazalnih lamina (Junqueira i sur., 1999).

Postoje dva tipa bazalne membrane prikazanih (Slika 2).

1. **Tip A.** Ovaj tip bazalne membrane je debeo jer je nastao stapanjem dviju bazalnih lamina, od kojih jeddna pripada epitelu, a druga endotelu. Sastoji se od središnje lamine dense (tamnije obojeno područje) i lamine lucide (svjetlije obojeno područje) smještene na obje strane.

2. **Tip B.** Uobičajeni tip bazalne membrane koji dijeli i povezuje epitel s vezivnim tkivom, nastaje spajanjem bazalne i retikularne lamine. Vide se sidrena vlakanca izgrađena od kolagena tipa VII, koja povezuju bazalnu laminu s kolagenom koji se nalazi ispod nje. Vide se i mikrofibrile sakupljene u snopove, koji prolaze kroz bazalnu laminu povezujući je sa sustavom elastičnih vlakana.



Slika 2. Dva tipa bazalnih membrana.

1.2. Rak dojke

Studije rađene u raznim zemljama pokazale su da je rak dojke najučestalija bolest u žena i da je jedan od najvećih zdravstvenih problema u razvijenim zemljama svijeta (Čović i sur., 2000). Rak dojke je najčešća maligna bolest u žena, dok je u muškaraca rijetkost. Vrlo rijetko prije puberteta, rijedak je u žena prije 30-e godine života, a učestalost mu raste i doseže maksimum u dobi od 50 godina. S povećanjem ženine životne dobi rizik raka raste (Nola i sur., 1996).

U Hrvatskoj prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za 2006. godinu, rak dojke čini 24% novih slučajeva raka kod žena (http://www.hzjz.hr/rak/novo.htm). U većini razvijenih zemalja broj žena oboljelih od raka dojke u stalnom je porastu, a isti se trend primjećuje i u Hrvatskoj. Tako je 1969. godine registrirano 900, a posljednjih godina i više od 2200 novooboljelih žena godišnje. Podaci Republičkog registra za rak pored toga pokazuju da raste broj oboljelih žena u mladim dobnim skupinama (Hrvatski zavod za javno zdravstvo). Pojava raka dojke u mladih žena objašnjava se promjenama načina življenja suvremene žene, uključujući kasniji prvi i zadnji porod, nedojenje, učestalije prekide trudnoće, porast broja nerotkinja, hormonsku terapiju, promjene životnih navika, u načinu ishrane veća je zastupljenost hrane bogate mastima i proteinima, povećana izloženost kancerogenim tvarima u hrani i okolini, te naposljetku izloženost radioaktivnosti (Boyle i sur., 2003). Na temelju navedenih čimbenika i nekih drugih obilježja, uključujući ranu pojavu prve menstruacije, trajanje generativne dobi duže od 30 godina, prisutnost karcinoma dojke u ostalih članova obitelji, primjerice majke, sestara, te ostalih rođaka ženskog spola, prisutnost mutacije BRCA gena, mogu se definirati rizične skupine za nastanak karcinoma dojke koje zahtijevaju detaljnije i češće kontrole što bi moglo omogućiti bolju ranu dijagnostiku i liječenje takvih žena. Usprkos napretku dijagnostike i terapije, rak dojke je najčešći uzrok smrti žena u dobi 35-59 godina života (Milas, 2005). Jedan od glavnih problema u liječenju raka dojke je

raznoliko biološko ponašanje tumora dojke. Unatoč prepoznavanju bolesnica s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima, u kliničkom praćenju bolesnica izdvajaju se dvije skupine bolesnica: one koje će biti izliječene ili će ući u razdoblje dugotrajne remisije bolesti, te one kod kojih će razmjerno brzo doći do ponovnog pojavljivanja bolesti. Prepoznavanje ove druge skupine bolesnica, koje treba liječiti agresivnijom kemoterapijskom shemom, od velikog je značenja za uspješno liječenje bolesnica s rakom dojke. Stoga su danas brojna istraživanja usmjerena na prepoznavanje novih čimbenika koji mogu predvidjeti biološko ponašanje tumora, odnosno tijek bolesti.

Glavne dijagnostičke metode za otkrivanje raka dojke su anamneza, fizikalni pregled, ultrazvučni pregled i mamografija. Međutim za postavljanje egzaktne dijagnoze potreban je itološki i histopatološki pregled suspektnog tkiva pod mikroskopom. U tu svrhu danas se upotrebljavaju dvije metode:

1. Citološke metode: citološki pregled iscjetka ili citološkog punktata (punkcijska biopsija)

2. Patološke metode: "core" biopsija (biopsija širokom iglom), intraoperativna ili hitna biopsija s histološkom obradom smrznutog materijala

Prvi je način koristan za postavljanje indikacije za operativni zahvat, dok je za izbor terapije bitna histološka verifikacija tumorskog tkiva te odnos malignih stanica prema bazalnoj membrani, odnosno je li riječ o neinvazivnom ili invazivnom raku (Vrdoljak i sur., 1993; Greenall, 2004).

1.2.1. Podjela tumora dojke

Tumori dojke općenito se dijele se na dobroćudne i zloćudne. S obzirom na histološki tip Svjetska zdravstvena organizacija (Lyon, 2003) predložila je klasifikaciju tumora dojke koja se danas koristi (Tavassoli i Devilee, 2003).

I. EPITELNI TUMORI
II. MIOEPITELNE LEZIJE
III. MEZENHIMALNI TUMORI
IV. FIBROEPITELNI TUMORI
V. TUMORI BRADAVICE
VI. MALIGNI LIMFOMI
VII. METASTATSKI TUMORI

Epitelni tumori dojke dijele se u dvije glavne skupine i to na dobroćudne i zloćudne epitelne tumore koji mogu nastati iz duktalnog (90%) ili lobularnog epitela (10%), a dijele se na one koji nisu probili bazalnu membranu (neinfiltrirajući ili karcinomi in situ) i na one koji su probili bazalnu membranu (infiltrirajući ili invazivni).

Najčešći od njih su:

a) Neinfiltrirajući zloćudni epitelni tumori:

1. Duktalni karcinom *in situ*
2. Lobularni karcinom *in situ*

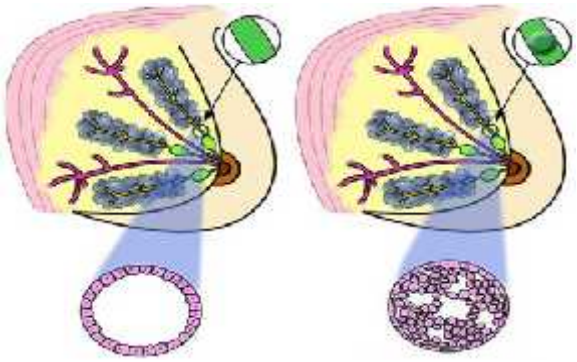
b) Infiltrirajući zloćudni epitelni tumori:

1. Invazivni duktalni karcinom
2. Invazivni lobularni karcinom

1.2.1.1. Duktalni karcinom in situ (DCIS)

Intraduktalni karcinom ili duktalni karcinom *in situ* (DCIS) je najčešći oblik neinvazivnog karcinoma dojke koji još nije prodro iz mliječnog kanalića dojke tj. koji još nije prodro kroz bazalnu membranu u okolno tkivo (Slika 3). Iako se taj tumor nalazi unutar mliječnog kanalića uvelike podiže rizik od dobivanja invazivnog karcinoma (Hannemann i sur., 2006).

U vrijeme kada je mamografija vrlo korištena metoda, DCIS je sve rasprostranjeniji, te obuhvaća 20 % mamografijom otkrivenih tumora dojke (Dillon i sur., 2006). Najčešći znak prisutstva DCIS-a su mikrokalcifikati koji se uočavaju mamografijom. Najvažniji dio liječenja je kirurško uklanjanje suspektnog područja sa zdravim okolnim tkivom dojke kako bi se osiguralo uklanjanje cijelog DCIS-a. Ako je područje zahvaćeno tumorom malo vrši se lumpektomija tj. uklanjanje tumorskog tkiva i područja oko njega. Kod većeg tumora ili kod multicentričnih tumora vrši se mastektomija tj. uklanjanje cijele dojke. Nakon lumpektomije slijedi zračenje kako bi se uništile preostale stanice raka nakon operacije. DCIS se u pravilu ne širi na limfne čvorove u pazuh (Roos i sur., 2007).



A B

Slika 3. (A) lumen kanalića dojke, (B) duktalni karcinom *in situ* (DCIS)

1.2.1.2. Mikroinvazivni karcinom dojke

Prvi znak prelaska DCIS u invazivni duktalni karcinom dojke je mikroinvazija koju karakterizira pojava nakupina tumorskih stanica izvan mliječnog kanala koje nisu veće od 1 milimetar u promjeru, što se mjeri baždarnim okularnim mikrometrom. Procjena mikroinvazije je vrlo važna zbog planiranja kirurškog zahvata. U slučaju da je riječ o mikroinvaziji ne treba se bojati udaljenih metastaza, ali bi za svaki slučaj trebalo izvršiti pregled limfnih čvorova, jer se kod oko 2 % žena sa mikroinvazijom u jednom ili više limfnih čvorova mogu pronaći stanice raka.

1.2.2. Histološki stupanj diferenciranosti tumora (gradus)

Invazivni karcinomi dojke su histološki i klinički raznolika skupina tumora, međutim njihovo biološko ponašanje korelira s histološkim izgledom pa je stupnjevanje ovih tumora prognostički neobično važno. U određivanje gradusa kod DCIS-a uključuje se veličina tumorskih jezgara i raspored kromatina, broj mitoza te prisutnost žarišta komedo nekroze unutar kanalića (Milas, 2005).

1.2.3. Hormonski receptori

Estrogenski i progesteronski receptori su nestabilni, termolabilni proteini koji se nalaze na membrani jezgre tumorskih stanica, ali i normalnih epitelnih stanica. Osim ER i PR u tu skupinu spadaju i receptori za androgene i tiroidne hormone kao i za retinoičnu kiselinu i vitamin D. Da bi se reaktivnost receptora sačuvala, važna je brza i dobra fiksacija tkiva. Ove bjelančevine imaju kompliciranu tercijarnu strukturu. Ljudski estrogenski receptor je složene građe. Do danas su otkrivena tri ER (alfa, beta i gama) različite primarne strukture. Ljudski PR se javlja u dva oblika: alfa i beta. Mehanizam djelovanja ER i PR je sličan. U nedostatku hormona receptor je transkripcijski pasivan. Nalazi se na membrani jezgre kao veliki

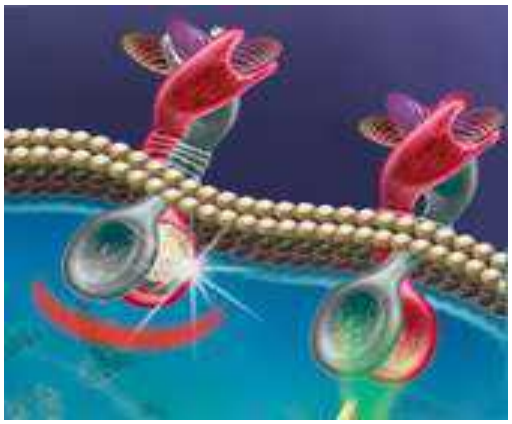
makromolekularni kompleks združen s nekoliko bjelančevina komplicirane tercijarne građe - "heat shock proteins". Steroidni hormon difundira kroz staničnu membranu te ulazi u citoplazmu. Ondje se veže za receptor. Nastali kompleks hormon-receptor djeluje na stanični ciklus i potiče rast stanica. Estrogenski i progesteronski receptori igraju ključnu ulogu u razvoju raka dojke i njegovoj progresiji (Creighton i sur., 2009). Tumorske stanice imaju pozitivne hormonske receptore kada je imunohistokemijskom analizom dobivena pozitivna reakcija obojenja jezgre u više od 10% tumorskih stanica. Tumori s pozitivnim estrogenskim i progesteronskim receptorima (ER+PR+) reagirat će na hormonsku terapiju u 78% slučajeva, ER+PR- tumori u 34% slučajeva, a ER-PR+ tumori reagirat će u 45% slučajeva. Međutim, zanimljivo je da će i tumori koji su ER-PR- u oko 10% slučajeva reagirati na hormonsku terapiju. Tumori s većom razinom hormonskih receptora reagirat će jače na hormonsku terapiju od onih s nižim razinama. ER- tumori bolje reagiraju na kemoterapiju u odnosu na ER+ tumore. Pacijenti s ER+ tumorima imaju duže preživljenje bez bolesti u odnosu na one s ER- tumorima (Milas, 2005).

1.2.4. Epidermalni receptor za čimbenik rasta 2

(HER2, eng**.** human epidermal growth factor receptor 2)

HER2/neu onkogen nalazi se na lokusu 17q21. Njegova amplifikacija dovodi do prekomjerne ekspresije HER2 glikoproteina koji je član obitelji transmembranskih receptora epidermalnih čimbenika rasta (epidermal growth factor receptors) s funkcijom tirozin kinaze (Ellsworth i sur. 2008) (Slika 4). HER2/neu onkogen je prekomjerno izražen u manje od 20% malignih tumora dojke (Esteva i sur., 2005). Aktivacija receptora (vezanjem liganda) potiče niz događanja koji uvode stanicu u S-fazu stanicnog ciklusa. HER2 receptor nema za sada poznatog vlastitog liganda ("orphan" receptor), ali se može aktivirati sam (spontana homodimerizacija u slučajevima prekomjerne ekspresije) ili ga aktiviraju drugi članovi

obitelji EGF receptora (heterodimerizacija). Pacijentice kod kojih se HER2 u tumoru prekomjerno eksprimira imaju mogućnost terapije Herceptinom (trastuzumab) tj. monoklonalnim protutijelom na HER2 protein. Za sada je terapija Herceptinom indicirana u bolesnica s metastatskom bolesti i prekomjernom ekspresijom HER2, a u tijeku su randomizirane multicentrične studije koje će pokazati učinkovitost Herceptina u kombinaciji s različitim citostaticima (Schnitt, 2001).



Slika 4. Prikaz HER2 receptora na membrani stanice

1.3. Imunohistokemijska metoda

Imunohistokemijska analiza je kombinirana histološka, imunološka i biokemijska metoda za identifikaciju specifične komponente tkiva pomoću određene antigen – antitijelo reakcije koja je vizualizirana biljezima poput fluorescentnih boja, kromogena, radioaktivnih elemenata i sl. Imunohistokemijska analiza ima veliku prednost nad tradicionalnim histokemijskim metodama jer se tkivo izlaže određenom primarnom antitijelu koje se specifično veže samo na željeni tkivni antigen. Za vizualizaciju tog kompleksa koristi se sekundarno protutijelo koje može biti direktno obilježeno bojom (fluorescentne boje) ili može biti u kompleksu s enzimima (peroksidaza ili alkalna fosfataza) koji će obraditi kromogen (DAB ili Fast red) i dati obojenje (smeđe ili crveno) vidljivo pod svjetlosnim mikroskopom. Albert H.Coons i njegovi kolege su prvi koji su označavali antitijela sa fluorescentnom bojom i koristili ga za identifikaciju antigena u preparatu tkiva. Sa razvojem i proširenjem imunohistokemijske tehnike, za označavanje su uvedeni enzimi poput peroksidaza i alkalnih fosfataza. Koloidno zlato se koristi za identifikaciju imunohistokemijske reakcije koja je vidljiva pod svjetlosnim i elektronskim mikroskopom. Ostali označivači uključuju radioaktivne elemente a imunoreakcija je vidljiva autoradiografijom (www.ihcworld.com).

Prije pristupanja imunohistokemijskoj analizi preuzeti biološki materijal potrebno je prethodno obraditi te se poduzimaju slijedeći koraci :

1. Preuzimanje uzorka tkiva
2. Fiksiranje tkiva u formalinu i ugrađivanje u parafin
3. Rezanje i montiranje na podlogu
4. Deparafiniranje i rehidriranje
5. Demaskiranje antigena
6. Imunohistokemijsko bojanje

Preuzimanje uzorka tkiva

Materijal koji liječnik specijalist patolog preuzima na odjelu za patologiju je tkivo dobiveno biopsijom ili operacijskim postupkom. Dobiveni materijal se pregleda te patolog preuzme sumnjiva mjesta s tumorom za daljnju obradu. Preuzimanje uzorka tkiva mora se obaviti brzo nakon vađenja tkiva iz organizma kako bi se izbjeglo moguće propadanje tkiva, a zbog bolje fiksacije uzorak ne smije biti veći od 1x1x0.5 cm.

Fiksiranje tkiva u formalinu i uklapanje u parafin (paraplast)

Kako bi se očuvala građa tkiva i morfologija stanica bitna je brza i adekvatna fiksacija jer dugotrajna fiksacija može značajno umanjiti sposobnost vezanja antitijela. Ne postoji niti jedan univerzalni fiksativ koji bi bio idealan za prikazivanje svih antigena. Većina antigena može se uspješno prikazati ako se tkivo fiksira u formalinu i uklopi u parafin stoga se najčešće koristi fiksiranje u 10% puferiranom formalinu u trajanju od 48 sati pri sobnoj temperaturi. S obzirom da oko 70% živih stanica čini voda, tkivo je potrebno dehidrirati rastućom koncentracijom alkohola (70%, 80%, 96%, 100%) kako bi se moglo uklopiti u parafin. U svakom alkoholu tkivo stoji 1h kako bi se sva voda postupno zamijenila alkoholom. Etanol se ne miješa s parafinom pa se nakon dehidracije tkivo uroni u benzen tijekom 1h zbog prosvjetljavanja, a potom u tekući parafin ugrijan na 62^{o}C nekoliko sati.

Od svog uvođenja parafinski vosak je ostao najčešće korišteni medij u histološkim laboratorijima, pa se prema tome najviše materijala u imonohistokemiji fiksira u formalinu i ugrađuje u parafin. Danas se međutim koristi mješavina parafina i plastičnih polimera-paraplast, s talištem 56^{o}-58^{o}C koji je puno stabilniji i čvršći pri dužem čuvanju uklopljenih uzoraka. Nakon što se tkivo proželo parafinom uklapa se u kalupe.

Rezanje i montiranje materijala

Za imunohistokemijsku analizu biološki materijal uklopljen u parafinski blok reže se na mikrotomu na tanke rezove debljine 3-5 μm. Izrezani materijal stavlja se na površinu vode u vodenu kupelj na 56^{o}C da se lagano razvuče, te montira na posebna predmetna stakla prevučena silanom da materijal ne otpadne sa stakla prilikom daljnje obrade. Nakon toga se materijal suši u termostatu na 60^{o}C oko 40 minuta.

Deparafiniranje i rehidriranje

Prije daljnjeg postupka imunohistokemijskog bojenja izrezani materijal je potrebno deparafinirati i rehidrirati jer se iz tkiva mora ukloniti sav parafin i dovesti ga u vodenu fazu. Za postupak deparafiniranja i rehidriranja koristi se ksilen i etanol.

1. Ispiranje ksilenom 2 x 10 minuta
2. Ispiranje 100% etanolom 2 x 3 minute
3. Ispiranje 95% etanolom 3 minute
4. Ispiranje 70% etanolim 2x 3 minute
5. Ispiranje u destiliranoj vodi

Demaskiranje antigena

Kod većine tkiva koja su fiksirana u formalinu i ugrađena u parafin mora se izvršiti demaskiranje antigena. Zbog svojstva formalina za stvaranje kelate s metalnim ionima u biološkom materijalu kao i međusobno povezivanje molekula aldehida koji stvaraju mostove dolazi do «zasjenjenja» tkiva. Zbog toga se tkivo treba prethodno obraditi (demaskirati) da bi željena mjesta (epitopi) postali slobodni.

Za svrhu demaskiranja epitopa može se koristiti više postupaka obrade:

a) visokom temperaturom (tzv. kuhanje) u vodenoj kupelji na 96^{o}-98^{o}C, posudi pod pritiskom (125^{o}C na 21 psi) ili mikrovalnoj pećnici (1000W)

b) korištenjem enzima (proteinaze K ili drugi proteolitički enzimi)

c) puferi s visokim pH

Imunohistokemijsko bojenje

Korištenjem specifičnih primarnih protutijela za željene tkivne elemente dobiva se reakcija samo s određenom komponentom stanične ili tkivne strukture. U tu svrhu komercijalno su dostupna monoklonalna i poliklonalna protutijela proizvedena u mišu, zecu, kozi, svinji. Cijeli postupak se odvija na sobnoj temeperaturi.Nakon rehidracije tkiva i demaskiranja epitopa, imunohistokemijskoj reakciji prethodi tretiranje tkiva s 0,3% vodikovim peroksidom da bi se inhibirale endogene peroksidaze koje se normalno nalaze u tkivu. Nakon ispiranja na uzorak se nakapava određeno protutijelo u trajanju 30 minuta. Ispiranjem se odstranjuje suvišak nevezanog protutijela te se nastali kompleks protutijela vezanog na tkivni antigen tretira univerzalnim protumišjim ili protuzečjim sekundarnim protutijelom 30 minuta. To je najčešće kozje kompleksno protutijelo kojeg čini makromolekula dekstrana na koju su vezani tercijarno protutijelo i molekule enzima peroksidaze. Za krajnju vizualizaciju nastalog kompleksa, nakon ispiranja, tkivo se tretira kromogenom (DAB, diaminobenzidin) 10 minuta koji se veže na kompleks i uz pomoć enzima peroksidaze oksidira te nastaje vidljivo smeđeobojenje na mjestu vezanog protutijela. Obzirom da se u histološkom preparatu nakon imunohistokemije reakcija očitava samo u tumorskim stanicama potrebno je preparat kontrastno obojiti hematoksilinom 5 minuta i isprati tekućom vodom.

Nakon ispiranja u vodi preparati se dehidriraju i dovedu do ksilola te poklapaju pokrovnicom s kanada balzamom ili drugom smolom spremni za mikroskopiranje. U cijelom postupku je važno da se materijal ne posuši zbog mogućnosti pojave nespecifičnog obojenja koje može onemogućiti očitavanje reakcije ili prikazati lažno pozitivni rezultat.

1.4. Ciljevi rada

U dijagnostici karcinoma dojke, posebno kod duktalnog karcinoma *in situ* (DCIS), očuvanje cjelovitosti bazalne membrane je važno jer proboj tumorskih stanica kroz bazalnu membranu upućuje na invazivnost tumora odnosno mikroinvaziju što za posljedicu ima drugačiju terapiju. U ovom istraživanju cilj je bio:

1. odrediti izraženost protutijela: zečjeg poliklonalnog (code Z0097) i mišjeg monoklonalnog (code M0638, clone 4C7) protiv laminina, kao komponente bazalne membrane u DCIS i duktalnom mikroinvazivnom karcinomu
2. utvrditi koji od dva istraživana protutijela ima bolju dijagnostičku vrijednost kako bi se mogao primjeniti u daljnjoj dijagnostici
3. utvrditi postoji li statistički značajan odnos izraženosti oba laminina prema pojavnosti mikroinvazije
4. utvrditi postoji li statistički značajan odnos izraženosti laminina prema ostalim prognostičkim čimbenicima: gradus, ER, PR i HER2

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Materijal

2.1.1. Pacijentice

U ovom radu napravljena je studija na uzorku od 36 bolesnica s duktalnim karcinomom *in situ* koje su operirane i liječene na Klinici za tumore tijekom 2006. i 2007. godine. Iz arhive Klinike za tumore gdje su pohranjene povijesti bolesti i parafinski blokovi uzeli smo podatke o dobi bolesnica te patohistološke podatke o tumoru. ER, PR i HER2 statusi te gradus tumora određivani su u *in situ* komponenti tumora za potrebe ovoga rada.

2.2. Metode

2.2.1. Obrada biološkog uzorka

U analizi smo koristili parafinske blokove iz arhive Službe za patologiju. Za imunohistokemijsku analizu iz svakog parafinskog bloka izrezali smo po dva reza debljine oko 3 μm. Za demaskiranje epitopa bazalne membrane tkivo smo obradili smjesom proteolitičkih enzima proizvođača Dako, Danska (S3007) 15 minuta. Postupak imunohistokemijskog bojenja proveden je u automatiziranom uređaju DakoAutostainer prema prethodno opisanom protokolu.

2.2.2. Primarna protutijela

Za imunohistokemijsko bojenje laminina, komponente bazalne membrane koju smo mi proučavali korištena su dva protutijela proizvođača Dako (Glostrup, Danska):

a) mišje monoklonalno, klon 4C7 (M0638), razrjeđenje 1:25, obilježeno oznakom LAM
b) zečje poliklonalno (Z0097), razrjeđenje 1:50, obilježeno oznakom LAM Z

Potrebna razrjeđenja dobili smo razrjeđenjem koncentrirane otopine s puferom Antibody Diluent (Dako, S 2022) u potrebnom omjeru.

2.2.3. Očitavanje reakcije

U biološkom materijalu mjesta na koje se vezao laminin obojena su smeđom bojom dok su ostale strukture obojene plavo. Pozitivna reakcija se očitava na strukturi bazalne membrane koja okružuje mliječne kanaliće dojke kao i proširene kanaliće koji su ispunjeni atipičnim epitelnim stanicama (intraduktalni karcinom).

Očitavanje reakcije prisutnosti laminina u bazalnoj membrani obilježavali smo vrijednostima od 0 do 3:

0 - nema reakcije oko lumena kanalića ili je djelomično izražena oko svih kanalića u preparatu

1 – potpuno izražena reakcija oko kanalića prisutna u više od 25% svih kanalića u preparatu

2 – potpuno izražena reakcija oko kanalića prisutna manje od 75% svih kanalića prisutnih u preparatu

3 – potpuna reakcija oko kanalića prisutna oko svih kanalića prisutnih u preparatu

Vrijednost očitanja reakcije 3 smatrali smo pozitivnim rezultatom tj. cjelovitom reakcijom oko lumena kanalića.

2.3. Statistička obrada podataka

U ovom radu za statističku obradu dobivenih podataka korišteni su slijedeći testovi: Neparametrijski test Spearmanove korelacije, ANOVA test, Mann-Whitney U test, te test multiple regresije. Statistički značajna vrijednost određena je na $p = 0,05$.

Anova testom napravljena je korelacija između laminina i mikroinvazije kako bi se utvrdilo imaju li poliklonalni i monoklonalni anti-laminin statističku značajnost prema pojavi mikroinvazije.

3. REZULTATI

3.1. Raspon dobi u istraživanoj skupini

U trenutku postavljanja dijagnoze pacijentice su bile u rasponu od 34-81 godina (median 56.5 godina). Od ukupno 36 pacijentica s dijagnozom DCIS, u 12 se javlja i mikroinvazija (Tablica 1). Raspon dobi pacijentica je od 34 do 81 godina (srednja dob 56,5 godina).

Tablica 1. Prikaz dobi pacijentica s postavljenom dijagnozom i histološkim gradusom tumora.

Redni broj	Dob	Dijagnoza	Gradus
1	34	DCIS	3
2	43	Mikroinvazija	3
3	43	Mikroinvazija	2
4	44	DCIS	3
5	46	DCIS	2
6	47	DCIS	3
7	47	DCIS	1
8	48	DCIS	3
9	49	DCIS	3
10	49	DCIS	3
11	49	Mikroinvazija	3
12	49	Mikroinvazija	2
13	50	DCIS	1
14	51	DCIS	3
15	52	DCIS	2
16	52	Mikroinvazija	2
17	55	Mikroinvazija	3
18	56	Mikroinvazija	2
19	57	DCIS	2
20	57	Mikroinvazija	3
21	60	DCIS	3
22	60	DCIS	3
23	60	DCIS	3
24	63	Mikroinvazija	1
25	65	DCIS	3
26	66	DCIS	3
27	66	DCIS	3
28	68	DCIS	3
29	68	Mikroinvazija	2
30	69	DCIS	2
31	70	DCIS	3
32	70	DCIS	3
33	73	DCIS	1
34	74	Mikroinvazija	3
35	75	Mikroinvazija	3
36	81	DCIS	1

DCIS, duktalni karcinom in situ.

3.2. Analiza laboratorijskih podataka pacijentica

Imunohistokemijska analiza tumora dojke na hormonske i HER2 receptore u *in situ* dijelu pokazala je da je kod 23 pacijentice tumor unutar duktusa bio pozitivan na estrogen, kod 15 pacijentica tumor unutar duktusa bio je pozitivan na progesteron, a kod 19 pacijentica reakcija na HER2 protein daje potpunu membransku reakciju u više od 30% tumorskih stanica što se smatra pozitivnim HER2 tumorom (Tablica 2). Imunohistokemijskom analizom dobili smo ekspresiju laminina na bazalnoj membrani kod svih 36 pacijentica. Jače izražena membrana je kod korištenja zečjeg poliklonalnog protutijela (LAM Z), nego kod mišjeg monoklonalnog protutijela (LAM) što je prikazano u Tablici 3. Na Slici 5 i 6 vidi se da je poliklonalni anti-laminin kvalitetnije pokazao cjelovitost bazalne membrane jer medijan kod pacjentica bez mikroinvazije pada u 3 dok kod mikroinvazivnog karcinoma pada u 1. Iz istih slika je vidljivo da medijan izražajnosti LAM za pacijentice bez i s mikroinvazijom pada u 0.

Tablica 2. Rezultati očitavanja ER, PR i HER2 statusa određenih u *in situ* komponenti tumora.

Redni broj	Dob	Estrog	Prog	HER2
1	34	0	0	0
2	43	1	1	0
3	43	0	0	1
4	44	1	1	0
5	46	1	1	1
6	47	1	1	0
7	47	1	1	0
8	48	1	1	1
9	49	0	0	1
10	49	0	0	1
11	49	1	0	1
12	49	1	1	0
13	50	1	1	1
14	51	1	1	0
15	52	0	0	0
16	52	1	1	1
17	55	0	0	1
18	56	1	0	1
19	57	1	1	0
20	57	1	0	1
21	60	1	0	1
22	60	1	0	0
23	60	1	0	1
24	63	1	0	0
25	65	1	0	0
26	66	0	0	1
27	66	0	0	1
28	68	0	0	1
29	68	1	1	1
30	69	1	1	0
31	70	0	0	0
32	70	0	0	1
33	73	1	1	0
34	74	0	0	1
35	75	0	0	0
36	81	1	1	0

ER, estrogenski receptor; PR, progesteronski receptor; HER2, epidermalni receptor za čimbenik rasta 2; 0- negativan; 1-pozitivan.
Žuto obilježene pacijentice s mikroinvazijom.

Tablica 3. Rezultati očitavanja reakcije monoklonalnog (LAM) i poliklonalnog (LAM Z) protutijela.

Redni broj	Dob	Lam	LamZ
1	34	2	2
2	43	1	1
3	43	0	1
4	44	0	3
5	46	0	3
6	47	1	3
7	47	0	1
8	48	0	3
9	49	1	3
10	49	0	2
11	49	0	2
12	49	1	1
13	50	1	3
14	51	0	1
15	52	2	1
16	52	0	2
17	55	0	1
18	56	0	2
19	57	0	3
20	57	0	1
21	60	3	3
22	60	0	3
23	60	0	3
24	63	0	2
25	65	0	1
26	66	0	3
27	66	0	3
28	68	0	3
29	68	0	1
30	69	3	3
31	70	0	2
32	70	1	3
33	73	0	3
34	74	0	1
35	75	0	2
36	81	0	1

Žuto obilježene pacijentice s mikroinvazijom.

3.3. Statistička obrada podataka ANOVA testom

ANOVA testom utvrdili smo da monoklonalni anti-laminin nema statističke značajnosti prema mikroinvaziji dok poliklonalni ima. U Tablici 4 prikazana je statistička značajnost oba anti-laminina. Prema ostalim prognostičkim čimbenicima izraženost anti-laminina ne pokazuje statističku značajnost.

Tablica 4. Prikaz statističke značajnosti anti-laminina i ostalih prognostičkih čimbenika prema pojavnosti mikroinvaziji

Odnos istraživanih parametera prema mikroinvaziji	**p-level**
GRADUS vs. mikroinvazija	0,75393
DOB vs. mikroinvazija	0,88472
ESTROGEN vs. mikroinvazija	0,81281
PROGESTERON vs. mikroinvazija	0,48747
HER2 vs. mikroinvazija	0,25016
LAM vs. mikroinvazija	0,16542
LAMZ vs. mikroinvazija	**0,00036**

n=36. Statistička značajnost $p<0,05$.

3.4. Analiza podataka testom Spearmanove korelacije

Zbog malog uzorka napravili smo i drugu analizu podataka testom Spearmanove korelacije pogodnog za male uzorke. Tim smo testom utvrdili da je mikroinvazija u negativnoj korelaciji sa lamininom, što znači gdje je bazalna membrana očuvana nema mikroinvazije. Također smo neparametrijskim testom utvrdili da pojava mikroinvazije prema monoklonalnom protutijelu (S_R=-0,20190; p=0,23765) nema statističke značajnosti, dok kod poliklonalnog ima (S_R=-0,57334 ; p =0,00026).

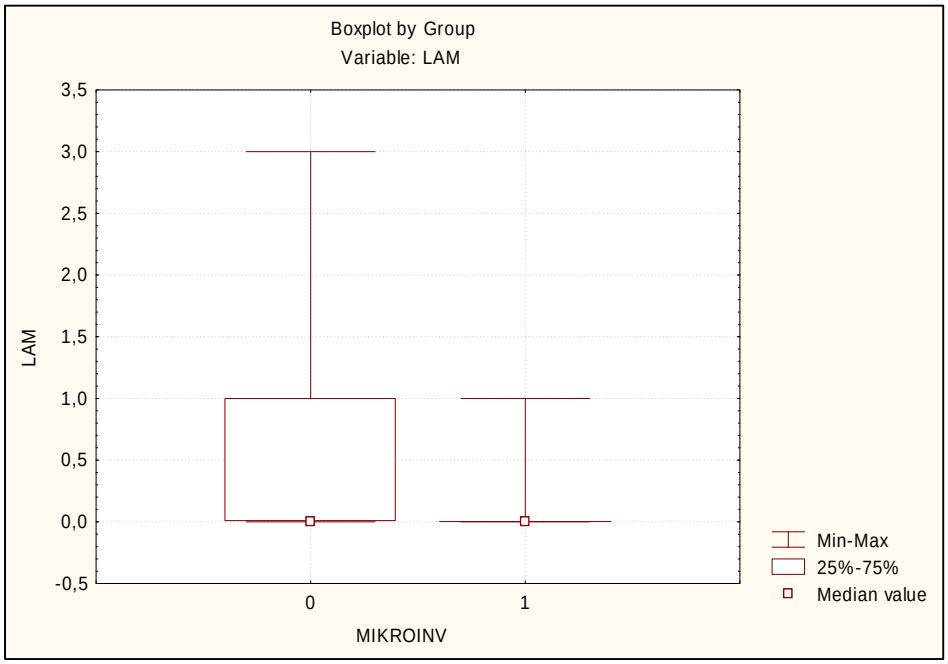
Tablica 5. Prikaz rezultata međusobne značajnosti istraživanih prognostičkih čimbenika neparametrijskim testom Spearmanove korelacije.

Međusobni odnos istraživanih parametera	**Spearman R**	**p-level**
ESTROG & PROGEST	0,63539	0,00003
GRADUS & ESTROG	-0,38465	0,02054
GRADUS & PROG	-0,48718	0,00258
MIKROINV & LAM	-0,20190	0,23765
MIKROINV & LAMZ	-0,57334	**0,00026**
PROG & HER2	-0,32918	0,04995

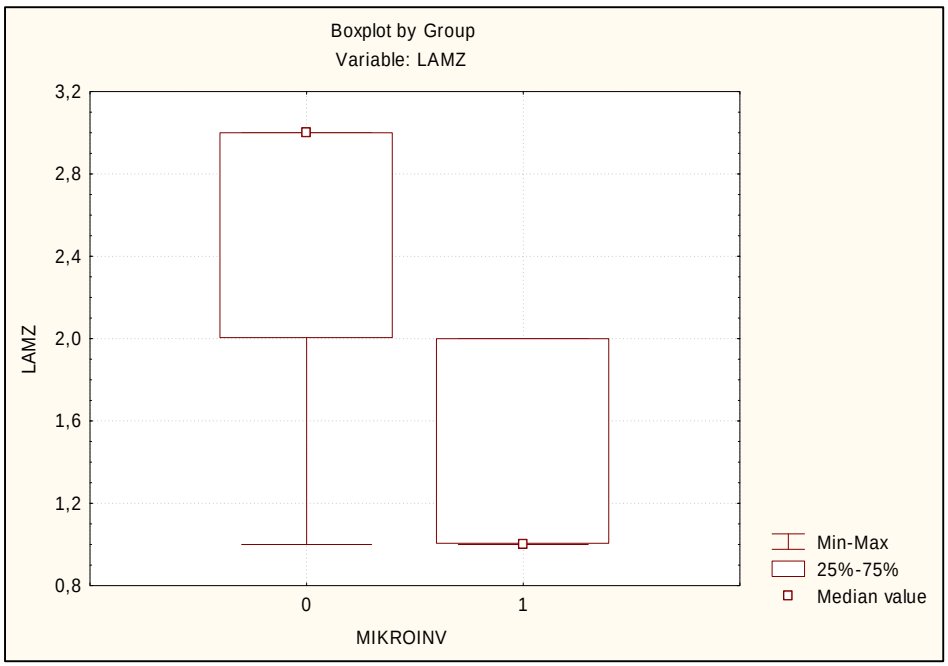
Statistička značajnost p<0,05.

3.5. Analiza podataka Mann-Whitney U testom

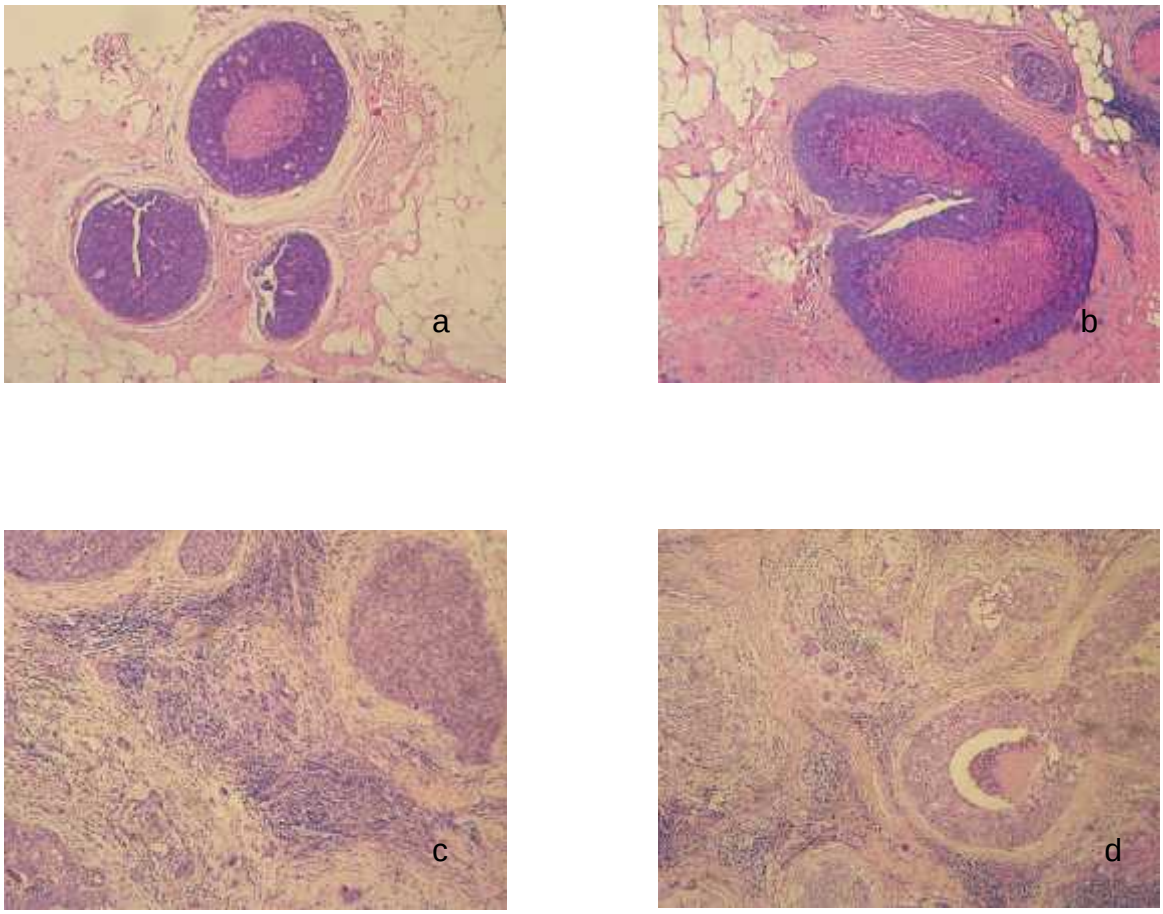
Na Mann-Whitney U testu laminin tj. monoklonalno protutijelo nije pokazalo statistički značajnu razliku u ekspresiji laminina na bazalnoj membrani između onih koji imaju mikroinvaziju i onih koji nemaju (p=0,23229) (Slika 5.) dok laminin Z tj. poliklonalno protutijelo je pokazalo statističku značajnu razliku (p=0,00069) (Slika 6.).



Slika 5. Statistička značajnost monoklonalnog anti-laminina (LAM) prema mikroinvaziji 0-mikroinvazija nije prisutna; 1-prisutna mikroinvazija

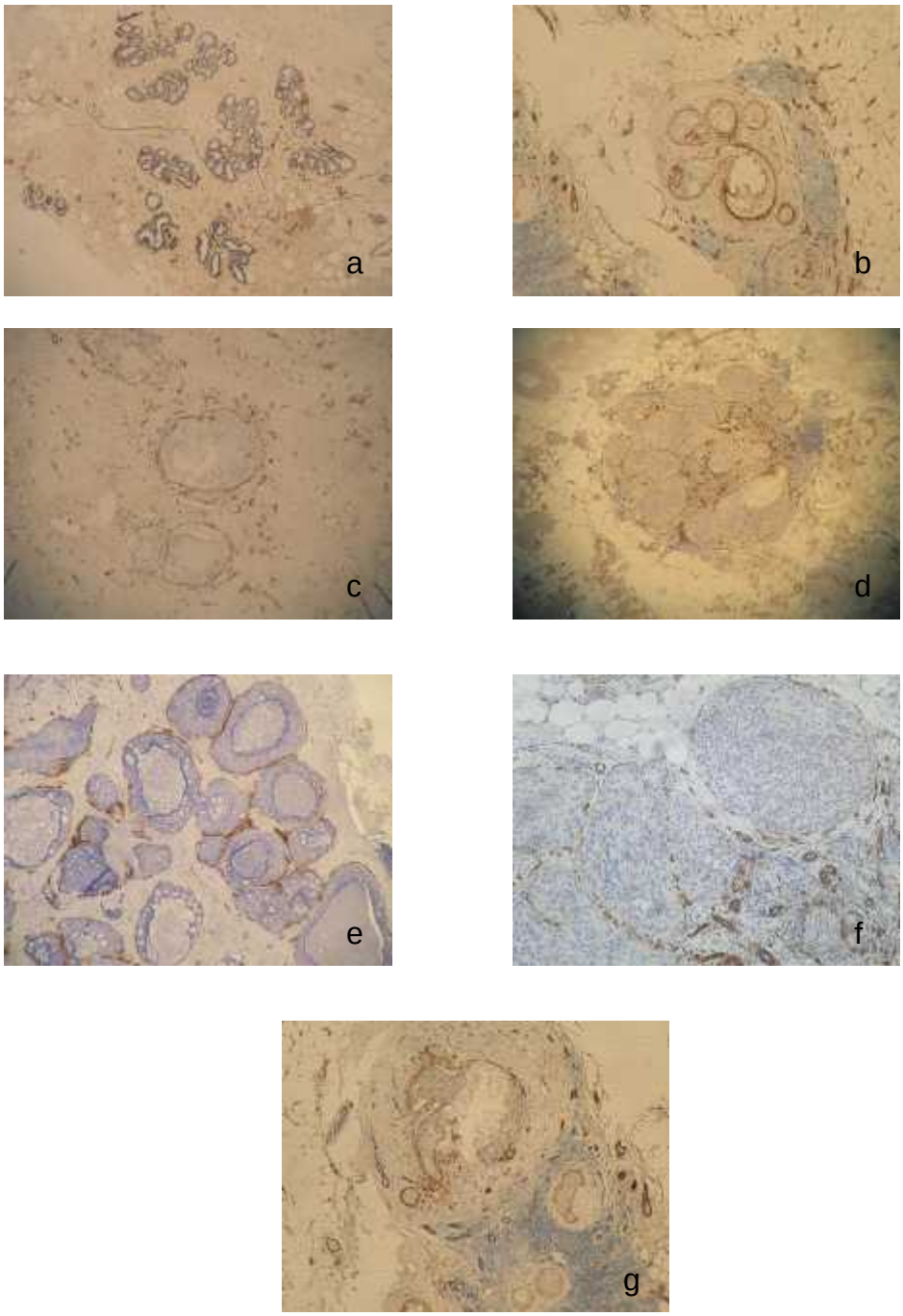


Slika 6. Statistička značajnost poliklonalnog anti-laminina (LAM Z) prema mikroinvaziji 0-mikroinvazija nije prisutna; 1-prisutna mikroinvazija



Slika 7. DCIS: a-b, povećanje 400x; ; c- d, mikroinvazivni karcinom dojke, mikroinvazivna žarišta označena strijelicom, povećanje 200x.

Obojeno hemalaun-eozinom.



Slika 8. Imunohistokemijsko bojenje bazalne membrane poliklonalnim lamininom: a, kanalići dojke s cjelovitom reakcijom; b-f, kanalići dojke ispunjeni tumorskim stanicama s različitim stupnjem obojenja; g, oštećena bazalna membrana-mikroinvazija.

4. RASPRAVA

Posljednjih godina svjedoci smo izuzetnog napretka u dijagnostici i liječenju bolesti dojki, a osobito karcinoma dojke. Uz mamografiju i ultrazvuk razvijaju se i nove slikovne dijagnostičke metode, poput magnetske rezonancije i PET (pozitronska emisijska tomografija), a usavršavaju se metode perkutane punkcije i biopsije dojke. Mogućnosti kemoterapije i radioterapije karcinoma dojke su također sve bolje, a suvremena kirurgija omogućuje vrlo kvalitetne rekonstrukcijske zahvate nakon resekcije tumora. Karcinom dojke je najčešći maligni tumor žena u razvijenim zemljama (Europa, Amerika, Azija, Australija) i vodeći uzrok smrti žena u dobi od 35 do 54 godina. Budući da liječenje i preživljavanje ovisi o stadiju bolesti pri otkrivanju, rana dijagnostika karcinoma dojke je od presudne važnosti. Dokazana je vrijednost screening-mamografije u smanjenju mortaliteta od karcinoma dojke u dobnoj skupini žena od 50-70 godina. Danas postoje jasni pokazatelji da se isti rezultati mogu uočiti i skriningom žena u dobi od 40-49 godina (Sloane, 1985; Heywang-Koebrunner, 2001; Brkljačić, 2001). Ostale bolesti dojke imaju daleko manje značenje od karcinoma. Svaki liječnik treba poznavati mogućnosti i ograničenja pojedinih dijagnostičkih postupaka i slikovnih metoda u dijagnostici karcinoma dojke. Isto tako, treba poznavati i osnovne metode operativnog i neoperativnog liječenja karcinoma i praćenja bolesnica tijekom i nakon liječenja (Sloane, 1985; Heywang-Koebrunner, 2001; Brkljačić, 2001). Karcinomi su najvažnije lezije u dojci u dijagnostičkom i terapijskom smislu. Velika većina invazivnih karcinoma nastaje iz karcinoma in situ. Karcinomi *in situ* su pokazatelji povišenog rizika za razvoj invazvinog karcinoma. Razlikuju se duktalni i lobularni karcinomi *in situ*, a miješani oblici su vrlo rijetki. Mnoga istraživanja pokazuju da se većina invazivnih duktalnih karcinoma dojke razvija iz duktalnog karcinoma *in situ* (DCIS). Mikrokalcifikacije na mamografiji su najvažniji znak DCIS-a, ali postoji i DCIS bez mikrokalcifikacija (Roos i sur., 2005).

DCIS obuhvaća 15 – 20 % svih otkrivenih tomora dojke, dok se 25 – 56 % DCIS otkrije mamografijom. Prilikom mamografije 62 – 80 % DCIS se otkrije uz pomoć mikrokacifikata, dok se 2- 23 % tumora manifestira kao masa ili asimetrična gustoća (Kim i sur., 2007).

U ovom radu analizirana je skupina od 36 pacijentica sa DCIS od kojih je u 12 dijagnosticirana mikroinvazija. Ovim istraživanjem htjelo se potvrditi da je očuvanje bazalne membrane pokazatelj neinvazivnosti karcinoma, odnosno da očuvana bazalna membrana upućuje na *in situ* karcinom. Onog trena kada bazalna membrana postane oštećena tumorske se stanice proširuju izvan kanalića i dolazi do mikroinvazije ili na posljetku do pojave invazivnog tumora.

Cilj rada bio je utvrditi izraženost poliklonalnog i monoklonalnoj protutijela protiv laminina na bazalnoj membrani kod svih 36 pacijentica. Ekspresiju laminina na bazalnoj membrani dobili smo imunohistokemijskom metodom korištenjem zečjeg poliklonalnog protutijela (klon 4C7, M0638) i mišjeg monoklonalnog (Z0097), a dobiveni rezultati su pokazali da je poliklonalni anti-laminin izraženiji od monoklonalnog. Monoklonalni anti-laminin boji samo određeni lanac laminina (aplha-5), a laminin čini samo jedan dio komponente bazalne membrane, stoga se zaključuje da taj test nema dovoljnu specifičnost kako bi se pokazalo kompletno obojenje. Poliklonalni anti-laminin boji sve lance laminina prisutne u bazalnoj membrani te nam daje jasnu sliku o njenoj cjelovitosti što se vidi na Slikama 5 i 6. U modernoj patologiji metode imunohistokemijske i molekularne analize svakodnevna su potreba i neizostavan dio. Prema Slikama 5 i 6 može se uočiti da se medijan nalazi u 3 za laminin Z kod onih koji nemaju mikroinvaziju pa se može zaključiti da je membrana u cijelosti pokazala imunološku reakciju i da nema mikroinvazije.

Pošto monoklonalni anti-laminin čiji se medijan nalazi u 1, ne pokazuje jasnu sliku o cjelovitosti bazalne membrane može se zabunom pomisliti da je bazalna membrana oštećena i da je došlo do mikroinvazije a time bi se pacijentici postavila kriva dijagnoza.

Karcinomi *in situ* su pokazatelji povišenog rizika za razvoj invazivnog karcinoma. DCIS se karakterizira kao proliferacija malignih stanica unutar kanala dojke bez probijanja bazalne membrane i evidencije invazije (Castro i sur., 2008). Mnoga istraživanja pokazuju da se većina invazivnih duktalnih karcinoma razvije iz DCIS stoga je važno na samom početku točno definirati dijagnozu, odrediti stupanj diferenciranosti DCIS kako bi se osiguralo adekvatno i uspješno liječenje karcinoma (Okumura i sur., 2008). Identifikacija novih markera vrlo je važna zbog određivanja progresije i metastaziranja raka dojke. Pošto DCIS karakterizira proliferacija epitelnih stanica unutar mliječnog kanala bez invazije, velika je vjerojatnost da se zbog otkrivanja bolesti u kasnijoj fazi DCIS-a može dogoditi mikroinvazija i tumor postaje puno opasniji i teže se liječi. Upravo je kvaliteta markera presudna za točnost dijagnoze i dalju moguću potrbnu analizu (Fujita i sur., 2004).

Dobiveni rezultati od svih 36 pacijentica obrađeni su i neparametrijskim testom Spearmanove korelacije u kojem se pokazalo da laminin nije pozitivan kod mikroinvazije. Ta zavisnost je dobra jer je u skladu sa očekivanjima, a pokazuje da na mjestima gdje je bazalna membrana očuvana mikroinvazija nije moguća, a oštećena bazalna membrana upućuje na mikroinvaziju koja je prisutna u 12 pacijentica iz ovoga rada. Prvi znak pojave mikroinvazije je karakteristična nakupina tumorskih stanica izvan mliječnog kanalića koja u promjeru nije veća od 1 mm. Procjena mikroinvazije je važna zbog planiranja kirurškog zahvata.

U slućaju da je riječ o mikroinvaziji ne treba se bojati udaljenih metastaza, ali bi trebalo za svaki slučaj izvršiti pregled limfnih čvorova, jer se kod oko 2% slučajeva žena s mikroinvazijom u jednom ili više limfnih čvorova mogu pronaći stanice raka. Testom Spermanove korelacije utvrđeno je da pojava mikroinvazije prema monoklonalnom anti-lamininu nema statističke značajnosti (S_R=-0,20190; p=0,23765), dok prema poliklonalnom ima (S_R=-0,57334; p=0,00026).

To potvrđuje činjenicu da nam monoklonalni anti-laminin kao marker nije dovoljno osjetljiv i ne može nam dati jasne rezultate o cjelovitosti bazalne membrane. Da bi se potvrdili rezultati dobiveni Testom Spearmanove korelacije, posebice jer je uzorak od 36 pacijentica vrlo mali učinjena je analiza rezultata i ANOVA testom koji je pokazao gotovo iste vrijednosti kao i predhodni test.

U ovom radu određivani su statusi estrogen, progesteron i HER2 receptora iako je bilo primarno odrediti kvalitetu markera laminina. No, htjelo se utvrditi imaju li koji drugi parametri bilo kakvu poveznicu s lamininom, jer su suvremena istraživanja usmjerena ka pronalasku novih lijekova koji efektno djeluju na stanice tumora, remeteći njihove mehanizme transdukcije, angiogeneze i apoptoze. Na taj način zdrave stanice organizma ostaju pošteđene a samim time su i neželjena djelovanja terapije smanjena. U testu mulitiple regresije može se uočiti poveznica između HER 2 i mikroinvazivnosti, jer od svih parametara poliklonalni laminin i HER2 imaju statističku značajnost prema mikroinvaziji. HER2 pozitivni tumori imaju lošiju prognozu i vrlo su agresivni (Korkaya i sur., 2008). Ostali prognostički faktori nemaju statističke značajnosti u pojavi mikroinvazije.

Iz novije literature je pojavnost mikroinvazivnosti povezana i s izraženošću matrix metaloproteinaza (MMP). To su enzimi koji se induciraju u miofibroblastima za vrijeme najranije faze invazivnosti i razgrađuju lamini i ostale komponente bazalne membrane, pa se stoga smatra da su uključeni u progresiju raka dojke (Nielsen i sur., 2008). U daljnjem istraživanju DCIS-a i prognoze bolesti slijedeći korak je svakako istraživanje poveznice MMP i izraženosti laminina i ostalih komponenti bazalne membrane kao pokazatelja invazivnog potencijala karcinoma dojke.

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Bazalna membrana kod DCIS-a jače je izražena kod korištenja zečjeg poliklonalnog anti-laminina
2. Zečji poliklonalni anti-laminin (Lam Z) ima statističku značajno smanjenu reakciju u žarištima mikroinvazivnog karcinoma dok monoklonalni nema
3. Zečji poliklonalni anti-laminin (Lam Z) je izvrstan pokazatelj očuvanosti bazalne membrane te se može koristiti u imunohistokemijskoj dijagnostici DCIS-a i mikroinvazivnog karcinoma dojke
4. HER2 receptor je povećano izražen kod mikroinvazivnog karcinoma dojke u usporedbi s DCIS-om

6. POPIS LITERATURE

Bonsing B. A., Beerman H., Dijkshoorn K. N., Fleuren G. J., Cornelisse C. J. (1993): High Levels of DNA Index Heterogeneity in Advanced Breast Carcinomas. Cancer. 71: 382-91.

Boyle P., Autier P., Bertelink H., Baselga J. i sur. (2003): European Code Against Cancer and scientific justification: Third version. Annals of Oncology. 14: 973-1005.

Brkljačić B. (2001): Dojka i bolesti dojke. U: Šimunić V. i sur. Ginekologija. Zagreb, Naklada Ljevak, str. 497-507.

Castro N. P., Osório C. A. B. T., Torres C., Bastos E. P., Mourão-Neto M., Soares F.A., Brentani H. P., Carraro D. M. (2008): Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal Carcinoma. 10:R87.

Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L. (1989): The Breast. U: Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L. Robins Pathologic Basis of Disease. 4th ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, W.B. Saunders Company, str. 1181-1204.

Creighton C. J., Osborne C. K., Marc J. van de Vijver., Foekens J. A., Klijn J., Horlings H. M., Nuyten D., Wang Y., Zhang Y., Chamness G. C., Hilsenbeck S. G., Lee A.V., Schiff R. (2009): Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. 114(2): 287–299.

Čović D., Milas I., Vukas D., Čakalo I. J. (2000): Tumori dojke. U: Samija M. i sur. Onkologija. Zagreb, Medicinska naklada, str. 316 – 325.

Dillon M. F., Quinn C. M., McDermott E. W., O'Doherty A., O'Higgins N., Hill A. D. K. (2006): Diagnostic accuracy of core biopsy for ductal carcinoma in situ and its implications for surgical practice. 59:740–743.

Duančić V., Posinovec J. (1990): Osnove histologije čovjeka. XI. izdanje. Beograd, Zagreb, Medicinska knjiga, str.315-316

Duančić V. (1983): Osnove embriologije čovjeka. Zagreb, Medicinska knjiga.

Ellsworth R. E., Ellsworth D. L., Patney H. L., Deyarmin B., Love B., Hooke J. A., Shriver C. D. (2008): Amplification of HER2 is a marker for global genomic instability. 8:297.

Esteva F. J, Hortobagy G. H. (2004): Prognostic molecular markers in early breast cancer. Breast Cancer Res 6:109-118.

Esteva F. J., Cheli C. D., Fritsche H., Fornier M., Slamon D., Thiel R. P., Luftner D., Ghani F. (2005): Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. **7**:R436-R443.

Fujita M., Khazenzon N. M., Bose S., Sekiguchi K., Sasaki T., Carter W. G., Ljubimov A. V., Black K. L., Ljubimova J. Y. (2004): Overexpression of β1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. 126(2): 432–440.

Guyton A. C., Hall J. E. (2003): Medicinska fiziologija X.izdanje. Zagreb,Medicinska naklada, str. 929 – 955.

Hannemann J., Velds A., Halfwerk B. G. J., Kreike B., Peterse J. L., Marc J van de Vijver (2006): Classification of ductal carcinoma *in situ* by gene expression profiling. 8(5): R61.

HercepTest for the Dako Autostainer Code K5207 (2007).

Heywang - Koebrunner S. H., Dershaw D. D., Schreer I. (2001): Diagnostic breast imaging. Stuttgart, Thieme.

Jakic-Razumovic J., Unušic J. (2001): Patohistološka analiza aksilarnih limfnih cvorova s posebnim osvrtom na postupak kod biopsije "sentinel" limfnog cvora. U: Bolesti dojke. Zagreb, str. 107-118.

Junqueira L. C., Carneiro J., Robert O.Kelley. (1999): Osnove histologije.VII izdanje.Zagreb, Školska knjiga, str. 67-69.

Kim D. Y., Moon W. K., Cho N., Ko E. S., Yang S. K., Park J. S., Kim S. M., In-Ae Park, Cha J. H., Lee E. H. (2007): MRI of the Breast for the Detection and Assessment of the Size of Ductal Carcinoma in Situ. 8(1): 32–39.

Korkaya H., Paulson A., Iovino F., Wicha M. S. (2008): HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. 27(47): 6120–6130

Krmpotić-Nemanić J., Marušić A. (2004): Anatomija čovjeka. Zagreb, Medicinska naklada, str.593 – 595.

Margaritoni M. (1993): Rak dojke. I izdanje. Zagreb, Školska knjiga, str 1-7.

Milas I. (2005): Prognostičko značenje ekspresije proteina Cox-2 u bolesnica s rakom dojke.

Nielsen B. S., Egeblad M., Rank F., Askautrud H. A., Pennington C. J., Pedersen T. X., Christensen Ib. J., Edwards D. R., Werb Z., Lund L. R. (2008): Matrix Metalloproteinase 13 Is Induced in Fibroblasts in Polyomavirus Middle T Antigen-Driven Mammary Carcinoma without Influencing Tumor Progression. 3(8): e2959.

Nikolić V. (1992): Dojka, mamma. U: Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb, Jumena, str. 524-528.

Nola P., Orešić V., Kolarić K. (1996): Rak dojke. U: Klinička onkologija. Zagreb, Nakladni zavod Globus. str. 577-628.

Okumura Y., Yamamoto Y., Zhang Z., Toyama T., Kawasoe T., Ibusuki M., Honda Y., Iyama K., Yamashita H., Iwase H. (2008): Identification of biomarkers in ductal carcinoma *in situ* of the breast with microinvasion. 8:287.

Roos M. A., Vegt B., Vries J., Wesseling J., Bock G. (2007): Pathological and Biological Differences Between Screen-Detected and Interval Ductal Carcinoma in situ of the Breast. 14(7): 2097–2104.

Schnitt S. J. (2001): Breast cancer in the 21st century: Neu opportunities and Neu challenges. Mod Pathol. 14:213-218.

Sloane J.P. (1985): Biopsy pathology of the breast. New York: Wiley.

Sperof L., Glass R. H., Kase N. G. (1994): Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Baltimore: Wiliams & Wilkins, str. 547-582.

Tavassoli F. A., Devilee P. (2003): World Health Organisation Classification of Tumors. Tumors of the Breast and Female Genital Organs. France, IARC Press.

Vlaisavljević V. (1989): Bolesti dojke: dijagnostika i detekcija U: Ginekologija i perinatologija. str. 477-510.

Wolf-Yadlin A., Kumar N., Zhang Y., Hautaniemi S., Zaman M., Kim H.D., Grantcharova V., Lauffenburger D. A., White F. M. (2006): Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration. 2: 54.

www.ihcworld.com

www.hzjz.hr/rak/novo.hr